

· 基础研究 ·

# 米非司酮通过抑制糖皮质激素受体缓解应激后抑郁样行为的研究

韩雨清<sup>1</sup>, 牛海晨<sup>2</sup>, 李海英<sup>3</sup>, 周 阳<sup>1</sup>, 包海军<sup>1\*</sup><sup>1</sup>徐州医科大学第一临床医学院法医学教研室, <sup>2</sup>生命科学院遗传学教研室, <sup>3</sup>基础医学院病理学教研室, 江苏 徐州 221004

**[摘要]** 目的:探讨米非司酮(mifepristone, RU486)与中缝背核区域内糖皮质激素(glucocorticoid, GC)受体在调控抑郁样行为症状中的作用,为抑郁症的治疗提供新的治疗靶点。方法:将8周龄健康雄性C57BL/6J小鼠32只分为对照组( $n=8$ )、模型组( $n=8$ )、溶媒组( $n=8$ )和RU486组( $n=8$ )。首先采用单一刺激禁饲法建立应激小鼠模型,采用高架十字迷宫实验和悬尾实验检测小鼠行为学改变,然后选取中缝背核脑组织制备冰冻切片,采用免疫荧光染色法检测小胶质细胞和GC受体的激活情况。结果:①高架十字迷宫实验结果表明,与对照组相比,模型组小鼠处于闭臂的时间占比明显增多,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。悬尾实验结果表明,与对照组相比,模型组小鼠静止时间明显增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。②免疫荧光染色结果显示,应激后小鼠中缝背核区域内GC受体荧光占比增加( $P < 0.05$ ),同时应激后中缝背核区域内小胶质细胞荧光占比上升( $P < 0.05$ ),且激活荧光占比增多( $P < 0.05$ )。③腹腔注射RU486后,可见中缝背核区域内GC受体荧光占比减少( $P < 0.05$ ),小胶质细胞荧光占比无明显改变( $P > 0.05$ )、激活荧光占比降低( $P < 0.05$ ),抑郁样行为学表现减轻。结论:RU486通过激活中缝背核区域内小胶质细胞,缓解抑郁样行为,为治疗抑郁症提供了新的治疗靶点和治疗药物。

**[关键词]** 应激状态;米非司酮;糖皮质激素受体;抑郁样行为**[中图分类号]** R363**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)08-1102-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20230809

## Mifepristone relieving stress induced depressive - like behavior through inhibiting glucocorticoid receptors

HAN Yuqing<sup>1</sup>, NIU Haicheng<sup>2</sup>, LI Haiying<sup>3</sup>, ZHOU Yang<sup>1</sup>, BAO Haijun<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Forensic, the First Clinical Medicine College, <sup>2</sup>Department of Genetics, Public Experimental Research Center, <sup>3</sup>Department of Pathology, Basic Medicine College, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the neural circuit of depressive symptoms derived from glucocorticoid (GC) receptor in dorsal raphe nucleus. **Methods:** Firstly, a stress mouse model was established using a single stimulus confinement method, and the mice were divided into four groups: control group, stresssd group, mifepristone-treated group and vehicle group, then the mice were injected with GC receptor antagonists to test behavioral changes by tail suspension test and elevated plus maze test. Immunofluorescence was utilized to detect the activation of GC receptors and microglial. **Results:** ① Compared with the control group, the immunofluorescence result showed that the number of GC receptors in dorsal raphe nucleus was increased after stress stimulate. ② After intraperitoneal injection of the GC receptor antagonists (mifepristone, RU486), the amount of GC receptors and the activated microglial cells were decreased in the dorsal raphe nucleus of the mice, and the depression-like behaviors were also attenuated. **Conclusion:** The above results indicated that mifepristone regulates microglial cell activation in dorsal raphe nucleus to eventually reduce depression-like behavior.

**[Key words]** stress-state; mifepristone; glucocorticoid receptor; depression-like behavior

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(08): 1102-1107]

**[基金项目]** 江苏省重点实验室开放课题(JBSL1703);徐州市科技计划(KC20120)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: bahajun@163.com

随着生活节奏加快,抑郁症成为一种具有高自杀率、高致残率、高患病率特征的常见精神病,尤其是青少年学生,心理尤为脆弱,易感性增加。目前,药物治疗仍然是治疗抑郁症的首选方法。然而,这些药物往往具有不良反应多、起效慢、停药易复发等缺点。研究新型的抗抑郁药物仍然是亟需解决的关键问题。

应激是指机体在受到各种内外环境因素、社会因素和心理因素等刺激时出现的全身非特异性适应反应,又称应激反应,其包括多种生理和心理方面的改变并常常伴有焦虑、抑郁等症状<sup>[1]</sup>,研究显示约60%的抑郁症患者在发病前曾经历过应激事件,提示应激是抑郁的重要诱因<sup>[2]</sup>。小胶质细胞作为中枢神经系统内固有的免疫效应细胞,具有多突触及可塑性的特点。神经系统的紊乱通常导致炎症和小胶质细胞的激活,表现为小胶质细胞数量增加、表型发生改变并释放炎症介质导致氧化应激反应,介导阿尔兹海默症、帕金森病、抑郁样等多种慢性神经变性疾病的生理过程<sup>[3]</sup>。应激可影响小胶质细胞释放细胞因子和神经营养因子,促进小胶质细胞介导的突触吞噬作用。

有证据表明,在焦虑和抑郁相关疾病中,患者血浆皮质醇浓度明显升高或降低,这可能与下丘脑-垂体-肾上腺轴(the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)的过度刺激有关<sup>[4]</sup>。也有人提出下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin-releasing factor, CRF)增加,导致垂体水平上CRF受体的适应性降低,进而引起肾上腺糖皮质激素(glucocorticoid, GC)受体敏感性增加,GC分泌增加<sup>[5]</sup>。在冠心病引起的全身慢性炎症疾病(如类风湿性关节炎)中,糖皮质激素系统和炎症反应的变化被认为是一个完整的病理过程的一部分,其中GC和GC受体位于调节多种炎症途径的信号网络顶端,而GC信号和/或水平的改变,将导致不受抑制的炎症反应发生,从而促进病理发展。最新的研究发现,GC处理小鼠后中缝背核区域内色氨酸羟化酶(tryptophan hydroxylase, TPH)信使RNA水平降低,额叶皮质区域内血清素合成减少并出现抑郁样行为<sup>[6]</sup>,这种作用可被米非司酮(mifepristone, RU486)联合给药阻断,表明GC升高可能与精神疾病有关<sup>[7]</sup>。

本研究推测, RU486将通过抑制中缝背核区域内GC受体结合,减少小胶质细胞激活并缓解抑郁样行为,进而起到治疗抑郁症的作用。因此,本实验首先检测应激后中缝背核区域内GC受体和小胶

质细胞激活情况,并通过行为学评估焦虑与抑郁程度,然后对应激后小鼠进行RU486药物处理,进一步观察其中缝背核区域内GC受体和小胶质细胞的激活情况,以及抑郁行为学的变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

8周龄C57BL/6雄性小鼠,购自山东济南鹏悦实验动物繁育有限公司(生产许可证号:SCXK鲁2019003)。实验过程中小鼠饲养于徐州医科大学动物实验中心,生长环境为SPF级,昼夜循环(12 h/12 h),恒温(21~25℃),恒湿,所有实验均经过徐州医科大学实验动物伦理委员会审批通过(D2020017)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型的建立

选取健康的8周龄雄性C57BL/6小鼠,随机分为对照组( $n=8$ )、模型组( $n=8$ )、溶媒组( $n=8$ )和RU486组( $n=8$ )。模型组、溶媒组和RU486组采取单一刺激禁餵法(每日禁餵2 h)<sup>[8]</sup>,连续7 d,构建应激模型,对照组不做处理。应激模型鼠造模完成后进行高架十字迷宫实验、悬尾实验检测小鼠应激及抑郁样行为表现<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.2 高架十字迷宫实验(elevated plus maze, EPM)

EPM是评价啮齿类动物焦虑反应常用的实验方法,具有伤害性小、操作简单等优点。高架十字迷宫为黑色无味塑料材质,由两个开臂、两个闭臂和中间平台组成(臂长50 cm,宽10 cm,高于地面70 cm)。测试开始前30 min将小鼠放置于实验室内,使其熟悉实验室环境,并在实验前让小鼠在迷宫中自由探索5 min。实验开始时,将小鼠放置于中间平台并记录5 min内小鼠位于高架上的位置及时间,重复测量3 d,使用ANYmaze软件记录。评价指标:闭臂时间占比=进入闭臂时间/(开臂时间+闭臂时间)<sup>[10]</sup>。

#### 1.2.3 悬尾实验(tail suspension test, TST)

TST是一种经典而又能快速评价抑郁程度及抗抑郁药疗效的方法,其原理是小鼠悬尾后企图逃脱但又无法逃脱,从而放弃挣扎,进入特有的抑郁不动状态,实验过程中记录动物不动时间来反映抑郁状态,抗抑郁药物、兴奋药物能明显地改变其状态。实验前30 min将小鼠放入实验室熟悉环境。实验时,将小鼠尾部后1/3固定于悬挂支架上,头部离地面约20 cm,进行摄像,摄像背景与小鼠颜色呈明显反差。使用ANYmaze软件记录小鼠5 min内静

止与活动的时间(s)。评价指标:活动时间/(活动时间+静止时间)<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.4 灌注取材

对小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠溶液(0.008 mg/g)进行麻醉后,将小鼠沿腹中线剪开,暴露胸腔心脏。将灌注用针头自左心室下角插入后,剪开右心耳,通过针头先注入20 mL 0.9% NaCl,可见小鼠肝脏颜色变化。待右心耳流出清澈液体后,注入20 mL 4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)。灌注完毕后,用剪刀分离小鼠头部,从后向前剥离颅骨取出鼠脑。将取出的鼠脑放入4% PFA中固定。24 h后,换成20%蔗糖溶液继续固定。待鼠脑沉底后,更换为25%蔗糖溶液继续固定。鼠脑再次沉底后,更换为30%蔗糖溶液固定。待鼠脑于30%蔗糖溶液中沉底,表明沉糖完毕,鼠脑中水分已经充分排出。

#### 1.2.5 免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色

将冰冻玻片从冰箱取出,放入37℃温箱内复温30 min后,取出于PBS清洗(0.01 mol/L, 3 min×3次),滤纸吸干多余水分后用组化笔圈画组织。将0.3% Triton X-100溶液和10%驴血清加入PBS中稀释后滴加于玻片上,室温封闭1 h。封闭完成后用PBS清洗(0.01 mol/L, 3 min×3次),滤纸吸干多余水分后滴加一抗,包括小鼠抗GC受体抗体(1:400, 上海Absin公司)、兔抗IBA1抗体(1:100, Novus Biologicals公司,美国)和大鼠抗CD11b抗体(1:100; Thermo Fisher Scientific公司,美国)加PBS稀释后滴加与玻片上,4℃过夜。一抗孵育完成后取出,用PBS清洗(0.01 mol/L, 3 min×3次)后滴加二抗室温孵育2 h,清洗后DAPI复染10 min, PBS清洗后封片镜下观察,观察使用研究级倒置荧光显微镜(BX53/DP73, Olympus公司,日本)。

#### 1.2.6 药物处理

将应激后小鼠随机分为RU486组和溶媒组, RU486组腹腔注射糖皮质激素受体抑制剂(1 mg/100 g, 每天4次, Mifepristone-84371-65-3, 上海Absin公司),将RU486按适当浓度溶解于无水乙醇溶液中,充分溶解后加入无菌生理盐水稀释,稀释完成后通过腹腔注射给药。溶媒组腹腔注射乙醇盐溶液(1 mg/100 g, 每天4次)<sup>[11]</sup>,乙醇盐溶液是将无水乙醇,按同样比例加入无菌生理盐水后稀释而成,通过腹腔注射给药。

#### 1.3 统计学方法

应用SPSS 26.0统计学软件进行统计分析,计

量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间多重比较采用SNK-*q*检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RU486对中缝背核区域内GC受体的影响

从IF染色实验结果中发现,模型组小鼠中缝背核区域内GC受体荧光面积占比增加,显著高于对照组小鼠[(1.084±0.386)% vs. (0.291±0.130)% ,  $P < 0.05$ ];与溶媒组相比,经RU486药物处理后,小鼠中缝背核区域内GC受体荧光面积占比明显降低[(1.273±0.431)% vs. (0.623±0.299)% ,  $P < 0.05$ , 图1]。

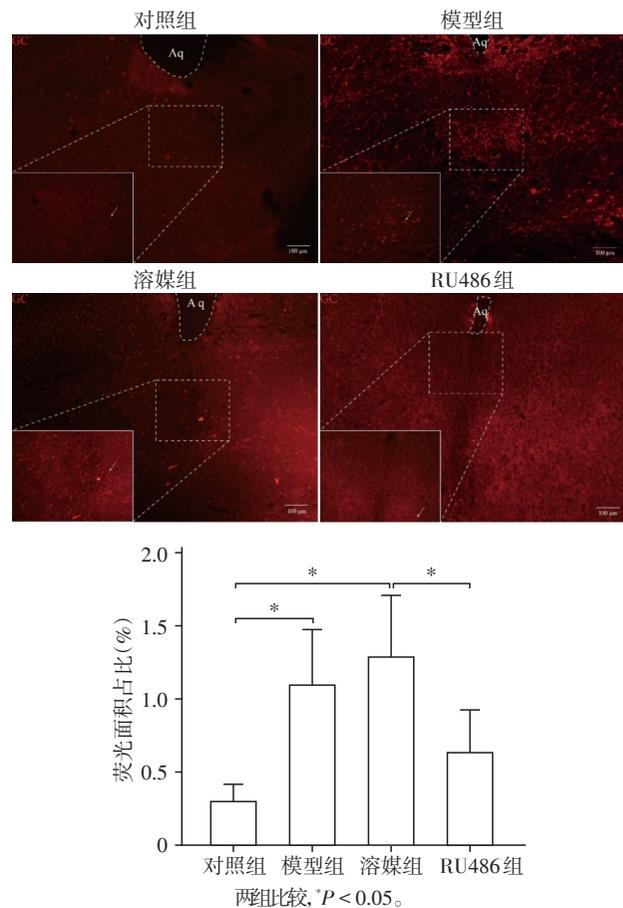


图1 RU486对中缝背核区域内GC受体数量的影响(IF, ×10, 左下角×20)

Figure 1 The count of GC receptor changes in dorsal raphe nucleus area before and after stressed or RU486 injection (IF, ×10 or ×20)

### 2.2 RU486对中缝背核区域内小胶质细胞的影响

从IF染色实验结果中发现,与对照组相比,模型组小鼠中缝背核区域内小胶质细胞荧光面积占

比明显增加 $[(0.979 \pm 0.146)\% \text{ vs. } (1.584 \pm 0.186)\%, P < 0.05]$ ;经RU486药物处理后,与溶媒组相比,RU486组小鼠中缝背核区域内小胶质细胞荧光面积占比无明显变化 $[(1.523 \pm 0.402)\% \text{ vs. } (1.575 \pm 0.269)\%, P > 0.05]$ ,图2)。

### 2.3 RU486对 中缝背核区域内小胶质细胞激活状态的影响

从IF染色实验结果中发现,与对照组相比,模型组已激活的小胶质细胞荧光面积占比同样增加 $[(0.040 \pm 0.012)\% \text{ vs. } (0.507 \pm 0.150)\%, P < 0.05]$ ;经RU486药物处理后,与溶媒组相比,RU486组小鼠中缝背核区域内已激活小胶质细胞荧光面积占比明显减少 $[(0.342 \pm 0.069)\% \text{ vs. } (0.132 \pm 0.023)\%, P < 0.05]$ ,图3]。

### 2.4 行为学分析小鼠应激及抑郁状态

应激模型建立后,与对照组相比,小鼠在悬尾实验中静止时间增加,出现明显抑郁样行为

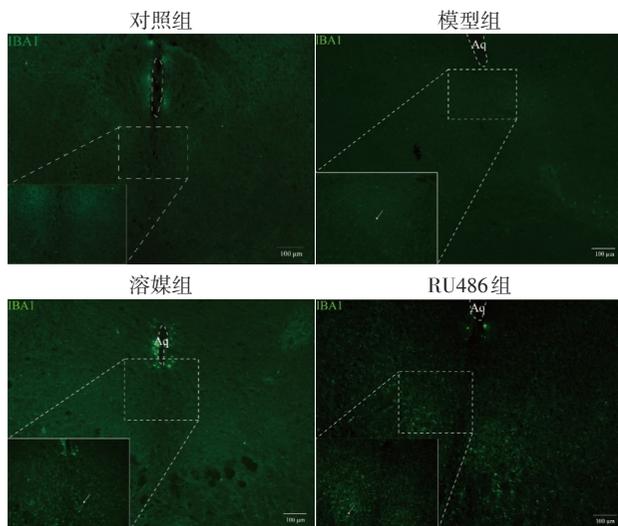


图2 RU486对 中缝背核区域内小胶质细胞数量的影响 (IF,  $\times 10$ , 左下角 $\times 20$ )  
Figure 2 The level of IBA1 changes in dorsal raphe nucleus area before and after RU486 injection (IF,  $\times 10$  or  $\times 20$ )

Figure 2 The level of IBA1 changes in dorsal raphe nucleus area before and after RU486 injection (IF,  $\times 10$  or  $\times 20$ )

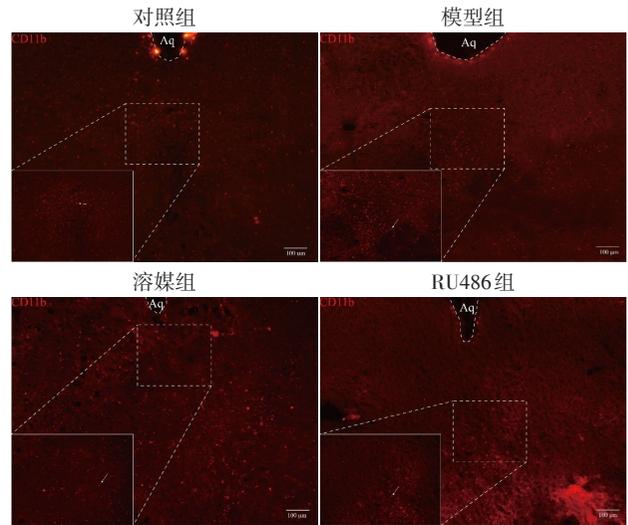
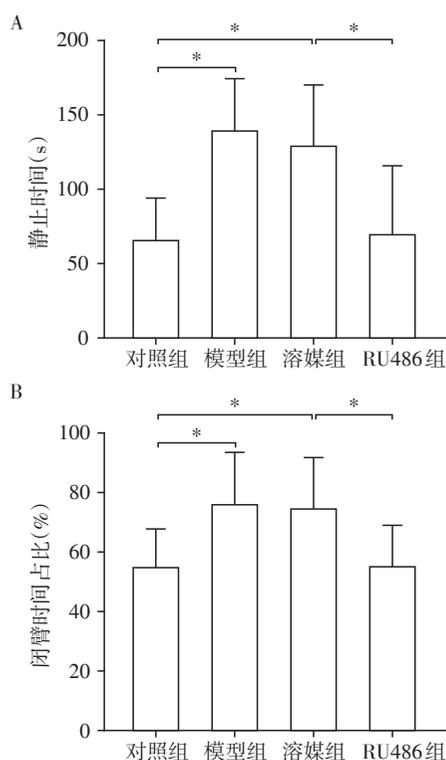


图3 RU486对 中缝背核区域内小胶质细胞状态的影响 (IF,  $\times 10$ , 左下角 $\times 20$ )  
Figure 3 The state of CD11b changes in dorsal raphe nucleus area before and after RU486 injection (IF,  $\times 10$  or  $\times 20$ )

Figure 3 The state of CD11b changes in dorsal raphe nucleus area before and after RU486 injection (IF,  $\times 10$  or  $\times 20$ )

$[(64.825 \pm 30.511) \text{ s vs. } (139.550 \pm 35.936) \text{ s}, P < 0.05]$ ;RU486药物处理后检测行为学发现,与溶媒组小鼠相比,RU486组小鼠悬尾实验中静止时间亦明显降低 $[129.100 \pm 41.688) \text{ s vs. } (69.438 \pm 47.160) \text{ s}, P < 0.05]$ ,图4A]。

高架十字迷宫结果发现,各组小鼠处于闭臂时间占比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图4B)。与对照组相比,应激模型建立后小鼠在高架十字迷宫实验中处于闭臂时间占比增加 $[(54.513 \pm 13.063)\% \text{ vs. } (75.831 \pm 18.082)\%, P < 0.05]$ ,反映小鼠焦虑增加处于应激状态;药物处理后检测行为学发现,与溶媒组小鼠相比,RU486组小鼠在高架十字迷宫实验中处于闭臂的时间占比明显减少 $[(74.226 \pm 17.949)\% \text{ vs. } (54.829 \pm 14.319)\%, P < 0.05]$ ,两种行为学检测结果均有差异性,提示RU486注射后可有效缓解小鼠应激状态与降低抑郁样行为。



A: 悬尾实验; B: 高架十字迷宫实验。两组比较, \* $P < 0.05$ 。

图4 小鼠应激和抑郁状态的行为学分析

Figure 4 The states of stress and depressive in mice detected by tail suspension test and elevated plus maze test

### 3 讨论

抑郁症为一种高自杀率、高致残率、高患病率的常见精神病,给社会、家庭和个体带来了严重损害,一直是科学研究的重点和难点。目前,药物治疗仍然是治疗抑郁症的首选方法。然而,这些药物往往具有不良反应多、起效慢、停药易复发等缺点,研究新型的抗抑郁药物仍然是亟需解决的关键问题<sup>[11]</sup>。

研究表明,应激作为抑郁样症状的重要诱因,其作用机制涉及HPA轴、神经递质、神经免疫、神经可塑性等多条途径,其中神经炎症在抑郁症发生发展中的作用备受关注。本研究选取HPA轴最终产物糖皮质激素进行研究,在应激小鼠中缝背核区域内输注GC受体抑制剂后观察到GC受体表达降低,同时炎症相关小胶质细胞激活减少,小鼠抑郁样行为缓解,表明糖皮质激素可能通过免疫炎症反应在抑郁症的发病机制中发挥重要作用。另有研究发现,抑郁症患者血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8等多种炎症因子表达增加,同样证实了炎症与抑郁症发病密切相关<sup>[12-13]</sup>。

小胶质细胞约占脑神经细胞的10%,主要分布

于中缝背核脑区并在脑内炎症发生发展中起重要作用<sup>[14]</sup>。在应激条件下,小胶质细胞胞体增大、分支减少,转化为激活状态并分化为M1和M2两种极化分型<sup>[15]</sup>。M1型主要产生IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8和肿瘤坏死因子等多种细胞因子,参与促炎症反应<sup>[16]</sup>。其中,增加的促炎细胞因子如IL-1 $\beta$ ,可能在抑郁症产生过程中起重要作用,其通过诱导HPA轴释放GC,使血清素和去甲肾上腺素传递功能障碍,而GC持续升高又可能进一步激活小胶质细胞诱导神经炎症,抑制星形胶质细胞产生神经营养因子,最终导致神经元凋亡。

本研究观察应激后中缝背核区域内GC受体免疫荧光面积占比、小胶质细胞与激活状态免疫荧光面积占比,以及小鼠应激后抑郁行为学有无改变,结果显示,应激后模型组中缝背核区域内GC受体免疫荧光面积占比明显增加,同时小胶质细胞免疫荧光面积占比上升并转化为激活态,并出现明显抑郁样行为。在此研究基础上,为了进一步验证RU486对GC受体及抑郁样行为的影响,本研究对应激小鼠进行了RU486药物处理,随后观察到RU486能有效降低中缝背核区域内GC受体的免疫荧光面积占比,虽然RU486并不能明显改变中缝背核区域内小胶质细胞免疫荧光面积占比,但能有效抑制其激活,进而缓解抑郁样行为。

综上所述,RU486通过抑制中缝背核中GC受体的激活,进而在缓解应激诱导的抑郁样行为中起重要作用。本研究进一步拓展了抑郁症的发病机制,提供了新的潜在治疗靶点和治疗药物。

#### [参考文献]

- [1] SLAVICH G M, SACHER J. Stress, sex hormones, inflammation, and major depressive disorder: extending social signal transduction theory of depression to account for sex differences in mood disorders [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2019, 236(10): 3063-3079
- [2] RUGULIES R, SØRENSEN K, ALDRICH P T, et al. Onset of workplace sexual harassment and subsequent depressive symptoms and incident depressive disorder in the danish workforce [J]. *J Affect Disord*, 2020, 277: 21-29
- [3] LIU C P, ZHONG M, SUN J X, et al. miR146a reduces depressive behavior by inhibiting microglial activation [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 463
- [4] CLARK J A, FLICK R B, PAI L Y, et al. Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal

- cortex of C57/Bl6 mice[J]. *Mol Psychiatry*, 2008, 13(5): 498-506
- [5] TSEILIKMAN V, DREMENCOV E, TSEILIKMAN O, et al. Role of glucocorticoid- and monoamine-metabolizing enzymes in stress-related psychopathological processes [J]. *Stress*, 2020, 23(1): 1-12
- [6] VINCENT M Y, DONNER N C, SMITH D G, et al. Dorsal raphe nucleus glucocorticoid receptors inhibit tph2 gene expression in male C57BL/6J mice [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 665: 48-55
- [7] WICHMANN S, KIRSCHBAUM C, BÖHME C, et al. Cortisol stress response in post-traumatic stress disorder, panic disorder, and major depressive disorder patients [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 83: 135-141
- [8] SOUZA R R, NOBLE L J, MCINTYRE C K. Using the single prolonged stress model to examine the pathophysiology of PTSD[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 615
- [9] RAHMAN S U, ALI T, HAO Q, et al. Xanthohumol attenuates lipopolysaccharide-induced depressive like behavior in mice: involvement of NF- $\kappa$ B/Nrf2 signaling pathways[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(12): 3135-3148
- [10] KRAEUTER A K, GUEST P C, SARNYAI Z. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 69-74
- [11] ZHANG Y P, WANG H Y, ZHANG C, et al. Mifepristone attenuates depression-like changes induced by chronic central administration of interleukin-1 $\beta$  in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2018, 347: 436-445
- [12] DAS R, EMON M P Z, SHAHRIAR M, et al. Higher levels of serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are associated with an increased probability of major depressive disorder[J]. *Psychiatry Res*, 2021, 295: 113568
- [13] FAN N, LUO Y, OU Y, et al. Altered serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-18 in depressive disorder patients [J]. *Hum Psychopharmacol*, 2017, 32(4): doi: 10.1002/hup.2588
- [14] ZHU L, LIU X, NEMETH D P, et al. Interleukin-1 causes CNS inflammatory cytokine expression via endothelial-microglia bi-cellular signaling [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 81: 292-304
- [15] WU H, ZHENG J, XU S, et al. Mer regulates microglial/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neuroinflammation following traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 2
- [16] HARUWAKA K, IKEGAMI A, TACHIBANA Y, et al. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5816

[收稿日期] 2023-03-29

(本文编辑:唐震)