

Sigma-1 受体基因敲除诱发雄鼠抑郁样行为

瞿伟骏, 沙 莎, 陈 玲*

(南京医科大学基础医学院生理学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨 sigma-1(σ_1)受体对情绪行为的调节作用。方法: 采用旷场试验、悬尾试验、强迫游泳试验和 Y 迷宫的检测方法, 分析 5 月龄雌和雄 σ_1 受体基因敲除(σ_1 受体-KO)小鼠的抑郁样行为。用放射性免疫技术检测血浆的雌二醇和睾酮水平。结果: 与野生型(WT)雄鼠相比, σ_1 受体-KO 雄鼠在旷场中央区的运动时间明显减少, 在悬尾试验和强迫游泳中的不动时间显著延长, 在 Y 迷宫 Novel 臂的时间减少。但是, σ_1 受体-KO 雌鼠的雌二醇水平和 σ_1 受体-KO 雄鼠的睾酮水平与对照组相比都没有改变。结论: σ_1 受体-KO 诱发的抑郁样行为是雄鼠特异性的, 可能与雌激素的抗抑郁作用有关。

[关键词] sigma-1(σ_1)受体; σ_1 受体基因敲除(σ_1 受体-KO); 抑郁; 雌二醇(E2)

[中图分类号] Q343

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)04-421-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130401

Sigma-1 receptor knockout induces depression-like behaviors in male mice

Qu Weijun, Sha Sha, Chen Ling*

(Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** This study examined the influence of sigma-1 receptor (σ_1 R) knockout on affective behaviors. **Methods:** We employed 5-month-old σ_1 R knockout (σ_1 R-KO) mice. Depression-like behaviors were evaluated through open-field test (OFT), tail suspension test (TST), forced swimming test (FST) and Y-maze task. **Results:** In comparison with male wide-type (WT) mice, male σ_1 R-KO mice spent less time in the center field of OFT, and had longer immobility time in FST and TST. Furthermore, the male σ_1 R-KO mice spent less time in the novel arm than the known arm in Y-maze. By contrast, no difference in depression-like behaviors was found between female WT mice and σ_1 R-KO mice. In addition, the serum levels of estrogen in female KO mice and testosterone in male KO mice were not altered compared to WT mice. **Conclusion:** The σ_1 R-KO induced depression-like behaviors were male mice-specific, and maybe related with the antidepressant effect of estrogen.

[Key words] sigma-1 receptor (σ_1 R); σ_1 R knockout; depression; 17 β -estradiol (E2)

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 421-425]

Sigma-1(σ_1)受体是含有 223 个氨基酸残基的 G 蛋白偶联受体。在中枢神经系统高表达的 σ_1 受体主要分布于细胞膜、内质网和线粒体膜, 有两个跨膜域, N 端有内质网停泊信号^[1]。 σ_1 受体被认为是多种临床抗抑郁药物的关键靶点^[2]。接受抗抑郁药治疗能增加中枢神经系统的 σ_1 受体水平^[3], 预示 σ_1 受体可能参与情绪行为的调控。

σ_1 受体对谷氨酸受体和胆碱能神经系统发挥

正性调节作用, 而对 γ 氨基丁酸受体是负性调节。本题组近年的研究发现, σ_1 受体通过促进海马突触的谷氨酸释放, 能增加 NMDA 受体 NR2B 亚基的磷酸化, 启动 Src/c-fos 信号分子, 易化突触可塑性^[4-5]。抑郁症患者的脑源性神经营养因子(BDNF)水平降低, 而 σ_1 受体激动剂能提高 BDNF 水平^[6]。此外, σ_1 受体活化通过调节脂筏中半乳糖神经酰胺可以促进少突胶质细胞的分化和髓鞘的形成。 σ_1 受体通过激活 JAK-2/STAT-3 信号分子, 能阻止小胶质细胞介导的免疫应答^[7-8]。阿尔茨海默病患者多伴有抑郁样症状。阿尔茨海默病患者脑的 σ_1 受体密度减少, σ_1 受体与配体的结合力降低, σ_1 受体的基因具有多态性(G-241T/C-240T)^[9]。资料表明, 围绝经期后女性

[基金项目] 国家自然科学基金(81071027)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lingchen@njmu.edu.cn

cn

雌激素水平的剧烈下降导致易患抑郁症。此外,抑郁症女性患者血浆中雌激素的水平显著低于同性别正常对照组,提示雌激素水平与抑郁症密切相关。

本研究首先通过检测 5 月龄 σ_1 受体基因敲除 (σ_1 受体-KO) 小鼠的抑郁样行为,探讨 σ_1 受体在抑郁症发病中的作用;其次通过比较雌雄 σ_1 受体-KO 小鼠的抑郁样行为,检测 σ_1 受体-KO 是否影响雌激素水平,进一步讨论雌激素的潜在性抗抑郁作用。

1 材料与方法

1.1 材料

σ_1 受体-KO 小鼠由美国加利福尼亚大学 Zorilla 教授赠送^[10]。小鼠饲养于 SPF 级环境。纯合子小鼠由杂合子交配得到。取生后第 21 天小鼠尾部组织的 DNA,用 PCR 方法鉴定小鼠的基因型。同窝出生的野生型(WT)小鼠用作对照。本实验选用 5 月龄的 σ_1 受体-KO 及 WT 小鼠。

实验所用旷场测试仪(OF2325-0222)、悬尾测试仪(TS100)、强迫游泳测试仪(FS2000)购于美国 Hamilton kinder 公司;Y 迷宫(MG-2)购于江苏省沙洲县三兴声电公司;雌二醇和睾酮的放射免疫分析试剂盒购于美国 National Hormone and Peptide 公司。

1.2 方法

1.2.1 σ_1 受体-KO 小鼠基因型鉴定

仅在 529 bp 处出现条带判断为 σ_1 受体-KO 纯合子小鼠,在 529 bp 和 1 160 bp 处均有条带判断为 σ_1 受体-KO 杂合子小鼠,在 1 160 bp 处出现条带判断为野生型小鼠(图 1)。



图 1 σ_1 受体-KO 小鼠基因型鉴定结果

Figure 1 The genotyping results of σ_1 受体-KO mice

1.2.2 旷场试验

旷场试验(open-field test,OFT)用于评价小鼠的情绪行为。旷场区域是由 1 个 80 cm × 80 cm 的底面,四面 20 cm 高的壁构成,底部分割成 16 个(4 × 4)相同大小(20 cm × 20 cm)的区域。测试开始时,小鼠被置于旷场的 1 个角落,面向墙壁,自由活动 5 min。旷场试验反映的是动物总体的活动性和探知行为。记录小鼠 5 min 内在旷场中的穿行格数、竖立次数

和在中央区域停留的时间,分别反映小鼠的水平垂直自发活动度及在新异环境中的探究能力。当小鼠的后爪越过 1 格的边界时,算作穿行 1 格。每只动物测试结束后用 75%酒精清洁旷场。

1.2.3 悬尾试验

悬尾试验(tail suspension test,TST)用于观察不良环境的绝望情绪。测试时,小鼠尾部末端用胶带固定于仪器中,使其倒悬,头部距离桌面 5 cm 左右,前后左右均无攀抓的可能,记录 6 min 内小鼠的不动时间。

1.2.4 强迫游泳

强迫游泳试验(forced swimming test,FST)用于观察小鼠的绝望行为。将小鼠置于直径 12 cm,高 32 cm 的玻璃缸中强迫游泳,水温(24 ± 1)°C,水深 28 cm,小鼠不会因为碰到泳池的底部而产生适应性行为。预游泳 15 min,24 h 后,将小鼠再次置于泳池中,记录总 5 min 中后 4 min(第 2~5 min)游泳的不动时间。

1.2.5 Y 迷宫

Y 迷宫试验(Y-maze task)用于观测小鼠的探究行为。Y 迷宫也称三等分辐射式迷路箱,由等长的 3 个臂(长 38.5 cm × 上宽 8 cm/下宽 3.5 cm × 高 12 cm)和三者的交界区组成。此试验包括两个部分,中间间隔 4 h。Y 迷宫的 3 个臂分别命名为 Start、Known、Novel。第一部分将 Novel 臂用黑色的木板阻隔,把每只小鼠放于 Start 臂的末端,面向墙壁,自由活动 15 min;第二部分将木板撤掉,把小鼠同样放于 Start 臂的末端,面向墙壁,自由活动 5 min。记录第二部分小鼠在每个臂停留的时间。进入任一臂以小鼠 4 只脚均进入到臂内为准,中途 1 只脚从该臂中退出即视为进入活动完成。每只小鼠测试后清除粪便并用 75%酒精清洗以去除气味。

1.2.6 血浆激素测定

取小鼠颈总静脉血约 1 ml/只,于肝素抗凝的 Eppendorf 管中,静置 30 min 后离心(3 500 r/min, 15 min),吸取上层血浆,储存于 -80°C 冰箱内备用。血浆睾酮(T)和雌二醇(E2)水平的检测,按照放免试剂盒的操作步骤完成。

1.3 统计学方法

所有统计采用 SPSS16.0 软件进行分析,各组数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素(One-Way)或双因素(Two-Way)方差分析联合 Bonferroni's post-hoc 检验判断组间差异的显著性,两组间应用双尾 Student *t* 检验进行, $P \leq 0.05$ 为差

具有统计学意义。

2 结果

2.1 旷场试验

与 WT 雄鼠相比, σ_1 受体-KO 雄鼠 5 min 内的穿行格数和竖立次数没有明显差异 ($P > 0.05$, 图 1A~B); 而在旷场中央区域的运动时间明显减少 ($P < 0.01$, 图 1C)。与 WT 雌鼠相比, σ_1 受体-KO 雌鼠的穿行格数、竖立次数和在中央区域的运动时间均无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 悬尾试验

与 WT 雄鼠相比, σ_1 受体-KO 雄鼠的不动时间显著延长 ($P < 0.05$, 图 2)。而与 WT 雌鼠相比, σ_1 受体-KO 雌鼠的不动时间无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.3 强迫游泳试验

与 WT 雄鼠相比, σ_1 受体-KO 雄鼠的不动时间

明显增加 ($P < 0.05$, 图 3)。而与 WT 雌鼠相比, σ_1 受体-KO 雌鼠的不动时间无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.4 Y 迷宫

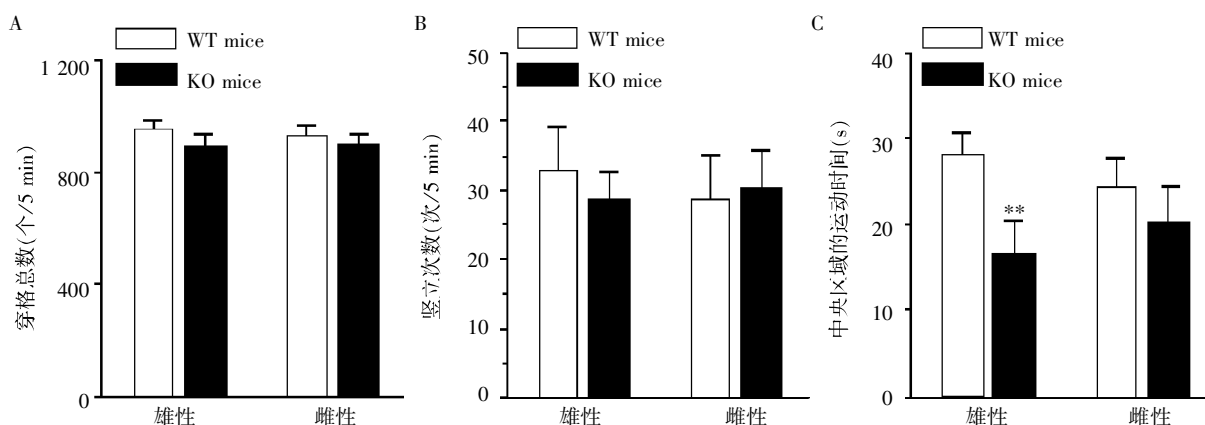
与 WT 雄鼠相比, σ_1 受体-KO 雄鼠在 Known 臂的时间明显延长 ($P < 0.05$, 图 4), 而在 Novel 臂的时间减少 ($P < 0.01$)。与 WT 雌鼠相比, σ_1 受体-KO 雌鼠在各个臂的时间无显著差异 ($P > 0.05$)。总进臂次数在各组间无差异。

2.5 血浆激素水平

与 WT 雄鼠相比, σ_1 受体-KO 雄鼠血浆睾酮 (T) 水平无明显差异 ($P > 0.05$, 图 5)。与 WT 雌鼠相比, σ_1 受体-KO 雌鼠在动情间期和动情前期的血浆雌二醇 (E2) 水平均无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

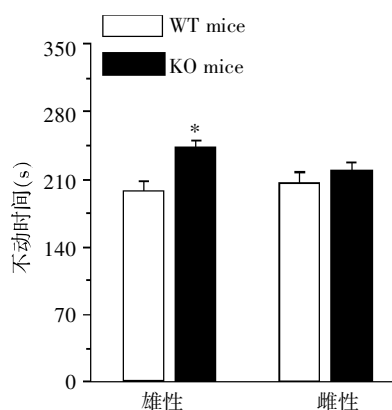
本研究的结果显示: ① σ_1 受体-KO 雄鼠的旷场



A: 5 min 内的穿格总数; B: 5 min 内的竖立次数; C: 在旷场中央区域的运动时间。KO 代表 σ_1 受体-KO 小鼠, WT 代表野生型小鼠; ** $P < 0.01$ vs. 雄性野生型小鼠。

图 2 σ_1 受体-KO 小鼠的旷场试验结果

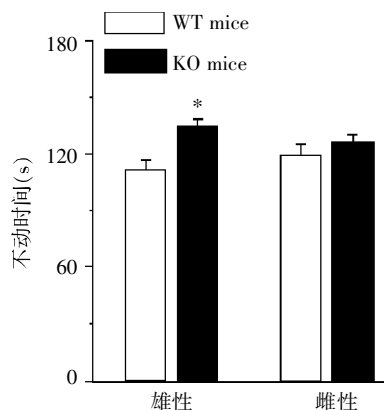
Figure 2 Results of open-field test in σ_1 R-KO mice



纵坐标代表 6 min 内的不动时间。* $P < 0.05$ vs. 雄性野生型小鼠。

图 3 σ_1 受体-KO 小鼠的悬尾试验结果

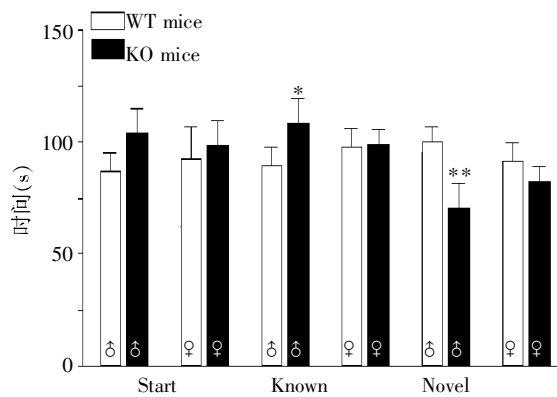
Figure 3 Results of tail suspension test in σ_1 R-KO mice



纵坐标代表第 2~5 min 的不动时间。* $P < 0.05$ vs. 雄性野生型小鼠。

图 4 σ_1 受体-KO 小鼠强迫游泳试验的结果

Figure 4 Results of forced swimming test in σ_1 R-KO mice



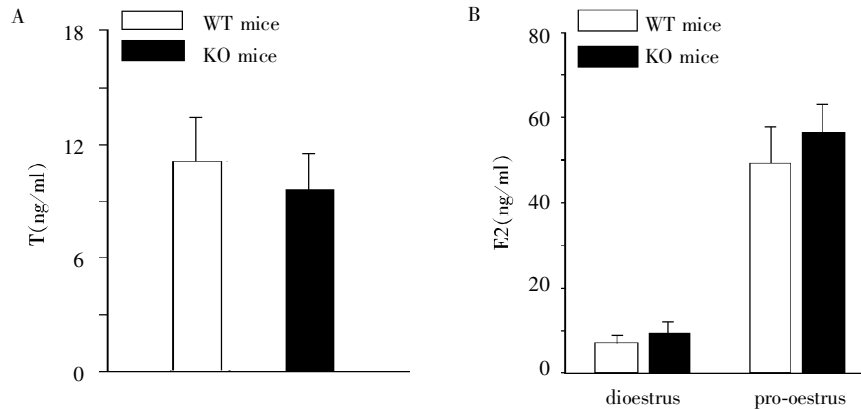
小鼠在第二部分试验的 5 min 内停留在 3 个臂 (Start, Known, Novel) 的时间。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 雄性野生型小鼠。

图 5 σ_1 受体-KO 小鼠的 Y 迷宫试验结果

Figure 5 Results of Y-maze task in male σ_1 R-KO mice

中央区运动时间减少, 悬尾和强迫游泳的不动期延长, 以及 Y 迷宫试验中在 Novel 臂的运动时间减少, 提示 σ_1 受体-KO 雄鼠的抑郁样行为增强; ②与 WT 雌鼠相比, σ_1 受体-KO 雌鼠没有发生情绪行为的改变; ③ σ_1 受体-KO 雌鼠的雌二醇(E2)水平明显高于 σ_1 受体-KO 雄鼠, 提示雌激素能拮抗 σ_1 受体-KO 诱发的抑郁样行为。

为什么 σ_1 受体-KO 能增强抑郁样行为? 人类精神情感活动接受单胺类神经递质去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT) 的调节。单胺类神经递质的缺乏被认为是抑郁症发病的主要机制之一。提高中枢神经系统单胺类神经递质功能或提高它们在神经突触间隙的浓度都能改善抑郁症状。



A: 雄鼠血浆睾酮(T)水平; B: 雌鼠发情前期及发情间期血浆雌二醇(E2)水平。

图 6 σ_1 受体-KO 小鼠的血浆性激素水平检测

Figure 6 Results of testosterone in male σ_1 R-KO mice and estradiol in female σ_1 R-KO mice

σ_1 受体能调节黑质和腹侧被盖区的多巴胺能神经元功能, 增强腹侧被盖区多巴胺能神经元功能。 σ_1 受体能够增强中缝核区的 5-HT 和蓝斑核区的去甲肾上腺素活性^[11]。在另一方面, σ_1 受体激动剂的抗抑郁作用也可能与调节细胞膜谷氨酸 NMDA 受体和三磷酸肌醇受体, 增加神经元的钙离子内流和钙离子从内质网的释放有关^[12]。此外, σ_1 受体调节生长因子介导的神经元生长发育也被认为是抗抑郁作用的机制之一^[13]。因此, σ_1 受体-KO 有可能导致单胺类神经递质的缺乏, 单胺类神经系统的功能减退, 海马突触传递效能降低, 或神经再生功能障碍而引起抑郁样行为的增强。

雌激素是否能拮抗 σ_1 受体-KO 诱发的抑郁样行为? 当遭遇应激性刺激时, 下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 释放增加, 刺激腺垂体产生促肾上腺皮质激素 (ACTH), 导致糖皮质激素 (glucocorticoid) 的释放增加。下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA)

轴活性增强, 导致神经内分泌失衡被认为是抑郁症发病的另一个主要机制。动物实验的结果报道, 雌激素对 HPA 轴的活动有抑制作用^[14]。临床资料显示, 对于绝经前和绝经后的妇女, 雌激素替代疗法能够显著抑制应激诱导的 HPA 轴反应。在另一方面, 抑郁症患者通常伴有海马结构和功能上的缺陷, 因此海马也被认为是情感障碍疾病的重要病理改变脑区之一。近年的研究报道, 神经元型一氧化氮合酶 (nNOS)-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (NO-CREB) 是参与情感行为调节的信号分子, 是抗抑郁药的重要分子机制^[15]。慢性温和性应激特异性地导致雌鼠海马 nNOS 表达下降。E2 给药可改善慢性温和性应激诱导的 nNOS 表达下降, 而睾酮无明显作用^[14]。E2 对海马 CREB 磷酸化的水平有正性调控作用。在卵巢摘除雌鼠, E2 通过激活雌激素受体 ER β , 增加 nNOS 表达—促进 NO 生成—提高 CREB 磷酸化水平, 发挥明显的抗抑郁作用^[16]。雌激素治疗明显上调

海马的BDNF水平^[17]。E2还能通过其膜受体G蛋白偶联受体30(GPR30)激活下游的磷脂酰肌醇(PI3)-蛋白激酶B(Akt)-NO途径,增加NOS的活化和NO的产生。临床治疗发现,E2可通过GPR30介导的非基因组效应提高5-HT再摄取抑制剂的疗效^[18]。本研究结果提示, σ_1 受体-KO雌鼠没有明显抑郁样行为发生可能是与雌激素受体介导的抗抑郁作用有关。

根据本研究的结果提示,① σ_1 受体对情绪行为具有重要的调控作用, σ_1 受体下调可能是抑郁等情绪行为疾病的发病机制之一;②雌激素可能具有拮抗 σ_1 受体-KO诱发抑郁样行为的作用。

[参考文献]

- [1] Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, et al. Pharmacology and therapeutic potential of sigma-1 receptor ligands[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2008, 6(4):344-366
- [2] Iyo M, Shirayama Y, Watanabe H, et al. Fluvoxamine as a sigma-1 receptor agonist improved cognitive impairments in a patient with schizophrenia [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008, 32(4):1072-1073
- [3] David DJ, Samuels BA, Rainer Q, et al. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression[J]. *Neuron*, 2009, 62(4):479-493
- [4] Chen L, Dai X, Sokabe M. Chronic administration of DHEAS primes for facilitation induction of long-term potentiation via sigma 1 receptor; optical imaging study in rat hippocampal slices[J]. *Neuropharmacology*, 2006, 50(3):380-392
- [5] Chen L, Miyamoto Y, Mori N, et al. Chronic DHEAS administration facilitates hippocampal long-term potentiation via an amplification of Src-dependent NMDA receptor signaling[J]. *Neuropharmacology*, 2006, 51(3):659-670
- [6] Xu B, Yang R, Li L, et al. Neurosteroid PREGS protects neurite growth and survival of newborn neurons in the hippocampal dentate gyrus of APP^{swe}/PS1^{dE9} mice[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2012, 9(3):361-372
- [7] Palacios G, Muro A, Vela JM, et al. Immunohistochemical localization of the sigma1-receptor in oligodendrocytes in the rat central nervous system[J]. *Brain Res*, 2003, 961(1):92-99
- [8] Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, et al. Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection[J]. *Pharmacol Rev*, 2009, 61(1):39-61
- [9] Uchida N, Ujike H, Tanaka Y, et al. A variant of the sigma receptor type-1 gene is a protective factor for Alzheimer disease [J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2005, 13(12):1062-1066
- [10] Sabino V, Cottone P, Parylak SL, et al. Sigma-1 receptor knockout mice display a depressive-like phenotype [J]. *Behav Brain Res*, 2009, 198(2):472-476
- [11] Maurice T, Su TP. The pharmacology of sigma-1 receptors [J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 124(2):195-206
- [12] Chen L, Miyamoto Y, Mori N, et al. PREGS induces LTP in the hippocampal dentate gyrus of adult rats via the tyrosine phosphorylation of NR2B coupled to ERK/CREB signaling[J]. *J Neurophysiology*, 2007, 98(5):1538-1548
- [13] Yagasaki Y, Numakawa T, Kumamaru E, et al. Chronic antidepressants potentiate via sigma-1 receptors the brain-derived neurotrophic factor-induced signaling for glutamate release [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(18):12941-12949
- [14] Hu Y, Wu DL, Luo CX, et al. Hippocampal nitric oxide contributes to sex difference in affective behaviors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(35):14224-14229
- [15] Zhou QG, Zhu LJ, Chen C, et al. Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(21):7579-7590
- [16] Zhou QG, Hu Y, Wu DL, et al. Hippocampal telomerase is involved in the modulation of depressive behaviors[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(34):12258-12269
- [17] Harte-Hargrove L, Maclusky NJ, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor-estrogen interactions in hippocampal mossy fiber pathway: Implications for normal brain function and disease[J]. *Neuroscience*, 2012, [Epub ahead of print]
- [18] Ropero AB, Pang Y, Alonso-Magdalena P, et al. Role of ER β and GPR30 in the endocrine pancreas: A matter of estrogen dose[J]. *Steroids*, 2012, 77(10):951-958

[收稿日期] 2013-01-07