

有氧运动与黑构黄酮对抑郁症小鼠的干预及TLR4/MyD88/NF- κ B通路相关因子组织差异表达

张宇^{1*} 陈伟² 毛海峰¹

(¹宜春学院体育学院, 宜春 336000; ²湖南师范大学, 体适能与运动康复湖南省重点实验室, 长沙 410012)

摘要 该文探讨了有氧游泳运动(aerobic swimming, SW)与黑构黄酮(*Lycium ruthenicum* murr flavones, LRMF)对抑郁症小鼠的抗抑郁作用及TLR4/MyD88/NF- κ B相关因子在脑和血液组织中的差异性表达。该研究构建了50只雄性KM小鼠抑郁症模型, 采用游泳运动和/或黑构黄酮(200 mg/kg)灌胃干预。通过行为学评估、Elisa酶联免疫、脑组织尼氏染色、免疫组织化学法(IHC)及qRT-PCR法研究有氧运动与黑构黄酮干预下小鼠的行为、脑组织形态学改变及相关因子蛋白、mRNA的表达。行为学评估结果显示, 建模后, 与对照组比较, 慢性轻度不可预见性应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)组行为学评估具有显著性差异($P < 0.01$); 干预后, 与模型组比较, 干预组行为学评估出现不同程度的改善($P < 0.05$, $P < 0.01$)。干预组脑组织单胺类递质5-HT(5-hydroxytryptamine)、NE(norepinephrine)、DA(dopamine)含量较M组上升, 黑构黄酮联合游泳运动组最高($P < 0.01$), 其次为游泳运动组。显微观察发现, 模型组脑组织神经元损伤程度最高, 核固缩、深染及空泡明显, 黑构黄酮联合游泳干预效果最佳($P < 0.01$)。IHC结果显示, 干预组TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β 蛋白表达水平较模型组降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且黑构黄酮联合游泳组蛋白表达水平最低($P < 0.01$), 游泳组优于黑构黄酮组。qRT-PCR检测结果显示, TLR4、MyD88在脑组织中表达水平平均高于血液组织($P < 0.05$), 且呈正相关。与模型组比较, 黑构黄酮联合游泳组TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β mRNA表达最低($P < 0.01$), 游泳组低于黑构黄酮组($P < 0.05$)。以上结果表明, 有氧游泳运动及黑果枸杞黄酮能缓解或治疗小鼠抑郁症所导致的脑损伤, 增强免疫及神经元修复, 联合干预效果最佳。具体机制可能是有氧运动和LRMF抑制TLR4的活性, 同时, 下调MyD88的表达, 从而上调抗炎基因的表达。此外, TLR4、MyD88在脑组织和血液组织中存在中度相关关系。作为一种早期检测手段, 检测血浆中相关因子循环RNA可诊断和监测抑郁症致脑损伤的情况, 具有良好的临床应用前景。

关键词 有氧运动; 黑果枸杞黄酮; 抑郁症; Toll样受体; MyD88; 循环血RNA

Intervention of Aerobic Exercise and *Lycium ruthenicum* Murr Flavone on Mice with Depression and Differential Expression of TLR4/MyD88/NF- κ B Related Factors

Zhang Yu^{1*}, Chen Wei², Mao Haifeng¹

(¹Sports College of Yichun University, Yichun 336000, China; ²Hunan Provincial Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise Rehabilitation, Hunan Normal University, Changsha 410012, China)

收稿日期: 2018-07-04

接受日期: 2018-09-25

江西省教育厅科学技术研究项目(批准号: GJJ14705)和江西省卫计委科技计划项目(批准号: 20175563)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0795-3202065, E-mail: 443999908@qq.com

Received: July 4, 2018

Accepted: September 25, 2018

This work was supported by Jiangxi Provincial Department of Education Science and Technology Research Project (Grant No.GJJ14705) and Jiangxi Provincial Health Planning Commission Science and Technology Plan Project (Grant No.20175563)

*Corresponding author. Tel: +86-795-3202065, E-mail: 443999908@qq.com

网络出版时间: 2018-10-26 11:10:35

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1110.012.html>

Abstract This work was aim to investigate the antidepressant effect of aerobic swimming (SW) and *Lycium ruthenicum* murr flavones (LRMF) on depressed mice and the differential expression of TLR4/MyD88/NF- κ B related factors in brain and blood. Fifty male KM mice were used to construct a depression model, which was administered by swimming and/or black flavonoids (200 mg/kg). The behavior of mice, the morphological changes of brain tissue and the expression of related factors proteins and mRNA under the intervention of aerobic exercise and flavonoids were tested by behavioral assessment, ELISA, brain tissue Nissl staining, immunohistochemistry (IHC) and qRT-PCR. The results of behavioral evaluation showed that the CUMS group had a very significant differences in behavioral evaluation compared with the control group after modeling ($P<0.01$). After intervention, intervention group had different degrees of improvement in behavioral evaluation compared with group M ($P<0.05$, $P<0.01$). The contents of 5-HT (5-hydroxytryptamine), NE (norepinephrine) and DA (dopamine) in the brain tissue of the intervention group were higher than those in the M group, and the LRMF+SW was highest ($P<0.01$), followed by the SW group. The results of microscopic observation showed that the neurons in the model group had the highest degree of injury, nuclear fixation, deep stained and cavitation, and the LRMF+SW group had the best intervention effect. IHC showed that the expressions of TLR4, MyD88, NF- κ B and IL-1 β protein in the intervention group were lower than those in M group ($P<0.05$, $P<0.01$), and the expression level of LRM+SW group protein was the lowest ($P<0.01$), followed by the LRMF group. The results of qRT-PCR showed that the expression levels of TLR4 and MyD88 in brain tissues were higher than those in blood tissues ($P<0.05$), and they were positively correlated. Compared with group M, the expressions of *TLR4*, *MyD88*, *NF- κ B* and *IL-1 β* mRNA in LRMF+SW group were the lowest ($P<0.01$), and SW group was lower than those in LRMF group ($P<0.05$). The results showed aerobic swimming and dark fruit flavonoids could relieve or treat brain damage caused by depression in mice, enhance immunity and neuronal repair, and the combined intervention had the best effect. The mechanism may be through antagonizing TLR4 inhibition MyD88, anti-inflammatory gene activation, TLR4, MyD88 in the brain tissue and blood tissue there is a moderate correlation. As an early detection method, the detection of circulated RNA in plasma is a good clinical prospect for the diagnosis and monitoring of brain injury caused by depression.

Keywords aerobic exercise; *Lycium ruthenicum* murr flavones; depression; Toll-like receptor; MyD88; circulated blood RNA

抑郁症是一种常见的心理疾病, 其临床特征为心境低落, 并伴有快感缺乏、认知功能障碍、精神运动延迟等, 甚至出现幻觉、绝望等精神病症状。心理因素与环境、人格特征等是抑郁症发病的重要因素。研究发现, 生物学中遗传以及神经的内分泌、生化、再生等对抑郁症患者有着重要的影响, 而其治疗主要以药物和心理进行干预, 据统计, 治疗后十年内, 78%左右患者存在多次复发, 迄今为止对于抑郁症的治疗缺乏双赢的方法^[1]。

有氧运动康复训练是一种简单、易行、经济的治疗手段, 能促进机体免疫力提升, 随着研究的深入, 在心脑血管疾病等慢性疾病的预防和康复治疗中越来越得到重视。长期进行有氧运动能改善心肺功能及大脑皮层工作效率, 促进海马神经元的分裂, 增强空间学习和记忆功能, 提高机体免疫能力^[2]。黑

果枸杞为青海柴达木地区特有珍稀植物, 其生活条件苛刻, 是一种保健及药用价值极高, 又非常稀少的原生态高档滋补佳品。黑果枸杞主要有三种提取物。其中, 黄酮成分在改善毛细血管韧性与通透性上效果显著, 并且具有很强的免疫激活作用, 可以特异性激活自然杀伤T淋巴细胞与磷酸激酶和ATP酶的相互作用, 干扰它们调节细胞的内稳态, 从而导致巨噬细胞诱导的细胞因子适当起到及时调动机体免疫系统的作用, 对细胞免疫和体液免疫功能具有良好的促进作用^[3]。

Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是世界公认的与天然免疫系统紧密相关的重要信号通路, 是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁^[4]。该信号通路的激活主要有两个途径, 一条是依赖性MyD88通路调节炎症反应, 另一条是活化TIR(Toll/IL-1

receptors)通路, 促进I型干扰素(interferon, IFN)的释放, 调节免疫功能。TLRs不仅在感染性疾病中发挥着重要作用, 在无菌炎症所导致疾病的发生发展及预后中也至关重要。

本研究以昆明小鼠为实验对象, 采用随机慢性应激构建抑郁模型。通过黑果枸杞黄酮灌胃及有氧游泳运动的单独、联合干预, 探讨对抑郁症小鼠脑组织神经元损伤和免疫系统的影响及脑和血液相关细胞因子的差异表达, 观察其因子在两种组织中mRNA表达的相关性。本研究结果有望在抑郁症脑神经损伤疾病的康复治疗中提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

本研究的健康雄性成年昆明种(KM)小鼠由湖南斯莱克景达实验动物中心(许可证SCXK(Xiang)2011-0003)提供。健康雄性成年昆明种(KM)小鼠50只, SPF级, 体重为18~22 g, 分笼喂养7天。50只构建抑郁症模型并随机分成模型组(M组)、干预组[游泳组(SW)、黑果黄酮组(LRMF)、黑果黄酮联合游泳组(LRMF+SW)]、空白对照组(OG)。每组10只且分笼饲养, 温度调控于至23~25 ℃, 相对湿度调控至40%~60%, 小鼠饮食自由, 采用国家标准啮齿类动物饲料(湖南斯莱克景达实验动物中心提供)饲养。

1.2 动物CUMS诱导抑郁模型构建

人类抑郁症的发作主要原因由于外界环境的应激, 慢性轻度不可预见性应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)能较好模拟其病因的发生, 也是当前公认的构建动物抑郁模型的方法^[5]。除OG组外, CUMS组(M组、SW组、LRMF组、LRMF+SW组)均给予慢性轻度不可预见性应激建立抑郁模型。刺激模式共有13种, 采用随机数字生成的方法, 构建模

型期间每种刺激因子不连续且不超过3次, 且每天给予1~2种不同的应激, 让小鼠不可预见应激的发生。各种应激方法如下: 倾斜45°鼠笼(CT, 12 h)、45 ℃高温游泳(S, 5 min)、水平震荡(CS, 1次/s, 5 min)、禁食(F, 24 h)、光照性质(O, 12 h)、4 ℃冰水游泳(C, 5 min)、尾根1 cm处轻夹鼠尾(T, 2 min)、昼夜调整(R, 24 h)、束缚(B, 25 min)、潮湿垫料(M, 8 h)、白噪音(WN, 24 h)、禁水(W, 24 h)、间断(闪光)刺激(IS, 5 h)。共进行28天(表1)。待应激结束后进行抑郁行为学指标(糖水偏好实验、敞箱实验、强迫游泳、强迫悬尾)检验模型。

1.3 干预方案

构建抑郁模型成功后, SW组、LRMF+SW组采用游泳训练, 每天下午4点在水深为35 cm, 直径80 cm的游泳桶中进行, 前3天适应性游泳30 min/d, 随后3天递增10 min/d, 直至60 min/d, 维持此强度运动6周, 每周休息1天。游泳后的小鼠用干毛巾擦拭毛发并用吹风机吹干。LRMF组、LRMF+SW组采用黑果枸杞黄酮灌胃, 其等效剂量按人与小鼠体表面积折算为200 mg/kg, 溶解至0.2 mL, 每天1次, 共6周。M组及OG组不进行干预。

1.4 黑果枸杞黄酮的提取及有效成分的纯化

将黑果枸杞果实粉碎过筛, 收集一定量的残渣于烧瓶中, 导入96%的工业乙醇(固液质量比为1:10)作为溶剂, 置于80 ℃的环境下(微波炉)提取, 重复3次。合并收集的滤液, 采用真空浓缩回收其溶剂, 获得黑果枸杞黄酮浸膏。利用超声波技术对浸膏进行二次提取, 功率为200 W, 加入乙酸乙酯(固液比为1:6), 在70 ℃的环境下提取1 h, 重复3次。收集滤液, 真空浓缩及干燥, 获得黑果枸杞黄酮。添加甲醇溶液经微孔滤膜过滤, 利用应用制备型高效液相色谱仪纯化, 确认最佳色谱条件, 柱温调控至25 ℃, 流动相进行洗脱, 最适波长及流速下进行色谱分析, 相比芦丁标准品确定芦丁, 收集高纯度芦丁^[6]。

表1 抑郁模型构建中各刺激因子流程表

Table 1 Flow chart of each stimulate factor in the construction of depression model

时间 Time	第1天 First day	第2天 Second day	第3天 Third day	第4天 Fourth day	第5天 Fifth day	第6天 Sixth day	第7天 Seventh day
The first week	O, M	S, IS	CS, T	M, CT	F	C, B	CS, O
The second week	WN	W	B, IS	R	CT, C	O, T	B, M
The third week	IS, CT	WN	M, T	C, S	CT	F	C, IS
The fourth week	R	S, CS	WN	T, M	O, CS	M, B	S, C

1.5 样品采集与处理

实验结束后,小鼠禁食过夜,采用1%戊巴比妥钠(500 mg/kg)进行麻醉,剪去眼球周边较长毛发,摘眼球法收集血液于5 mL抗凝管中,室温4 000 r/min离心15 min,吸取上清,血液RNA采用吉玛磁珠法提取,上清及血液RNA于-80 °C保存备用。收集完血液随后脱颈椎处死,手术剪小心剥离颅骨,暴露脑组织,弯镊从后下方进入将其整个拖出(去除与大脑相连的嗅球、小脑和脑干)。于前额叶皮层用手术刀冠状面切取脑组织50 mg,放入装有1 mL Trizol溶液的离心管中待取RNA;部分用于组织裂解液提取蛋白,其余部分置于4%多聚甲醛溶液中固定48 h以上,石蜡包埋。本实验已获得宜春学院伦理委员会批准。

1.6 动物行为学观察

1.6.1 糖水偏好实验(sucrose preference test, SPT) 糖水偏好实验前需进行糖水饮用适应,将一瓶装有1%蔗糖水及一瓶纯水放入笼中,12 h后,调换两瓶水位置(排除位置干扰),自由饮用24 h。糖水偏好实验在禁水不禁食24 h后,每笼放入1%蔗糖水及纯水各150 mL。2 h后将两瓶水调换,共记录4 h内蔗糖水及纯水的摄入量,计算糖水偏好度。糖水偏好=(糖水消耗量/总液体消耗量)×100%。

1.6.2 敞箱实验(open box test, OBT) 敞箱选用50×50×50 cm³的白色正方体,在其底部用马克笔分割成25个边长为10 cm的正方形,在整个实验过程中应避免自然光的照射,选用白炽灯照明。将摄像头固定至敞箱上方,记录小鼠自由活动的整个过程。每只检测的小鼠需从敞箱中央放入,检测时间为5 min,记录穿越中央及周边格子数、不动时间、站立次数。进行第二只检测前,需清理敞箱内的环境,并用酒精擦拭。

1.6.3 强迫游泳测试(forced swimming test, FST) 将小鼠置于装有温水的高20 cm、边长为15 cm的玻璃器皿中。摄像头记录6 min小鼠行为的变化,前2 min是适应时间,主要收集后4 min行为数据。将在水中攀爬挣扎(前爪攀登)及不动时间(身体悬浮)指标进行统计。每个游泳容器只进行一只小鼠检测,实验完成后立即将毛发吹干,放回笼中。

1.6.4 强迫悬尾测试(forced tail suspension test, FTST) 采用悬挂装置,系绳于小鼠尾端2 cm处,距离地面50 cm,将小鼠倒挂悬空。防止在实验过程中因挣扎导致系绳处脱落,用胶带进行固定。此实验为检测小

鼠可变性行为状态下的绝望程度。实验记录6 min,前1 min为适应期,统计后4 min小鼠悬挂状态下不动时间。

1.7 脑组织指标检测

在冰面上称取40 mg脑组织前额叶皮层于EP管中,加入组织裂解液600 μL(可根据需要的蛋白样品浓度调节)。4 °C、11 000 r/min离心5 min,吸取上清液于1.5 mL EP管中,-70 °C保存待测。采用Elisa酶联免疫法对单胺类递质5羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)及多巴胺(DA)的浓度进行检测,试剂盒购自上海劲马生物科技有限公司。

1.8 尼氏染色观察

脑组织冠状面切片,厚度为5 μm,摊片温度为40 °C,烘片过夜。二甲苯脱蜡2次(15 min, 10 min)。梯度酒精复水:100%酒精2次(5 min/次) 95%、90%及80%酒精各5 min。蒸馏水配制1%甲苯胺蓝,恒温箱40 °C染色15 min,流水冲洗,镜下观察染色程度,可用0.5%冰醋酸进行分化。酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,观察脑组织神经细胞结构及受损情况。

1.9 免疫组织化学

采用SABC法免疫组织化学法检测脑组织TLR4、MyD88、NF-κB、IL-1β蛋白表达水平。脑组织冠状面切片、脱蜡、复水,加入枸橼酸盐缓冲液煮沸进行抗原修复3 min,流水冲洗。免疫组化笔于组织样本周围划圈,PBST冲洗(PBS、蒸馏水、TWEEN-20按说明书比例配比),吸取H₂O₂阻断液50 μL。室温静置10 min,去除PBS,PBS磷酸缓冲盐溶液洗涤3次×3 min。吸取动物血清,室温干燥,滴入1:300 PBS作为阴性对照,室温孵育1 h,PBS冲洗,滴入二抗,15 min后洗去,DAB显色(现配现用)4 min,蒸馏水冲洗20 min,镜下观察,滴入苏木素复染,流水冲洗,酒精与盐酸1:99配制1%盐酸进行分色,冲洗。观察成色度用饱和碳酸锂返蓝5~10 s,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Simple PCI高性能专业图像分析软件观察相关因子阳性表达面积,阳性表达面积=阳性反应面积/图片面积。

1.10 qRT-PCR检测脑组织及血液中TLR4、MyD88、NF-κB、IL-1β mRNA表达

1.10.1 组织总RNA提取及反转录 脑组织及血液RNA提取采用Trizol法(动物外周血白细胞分离液试剂盒购自上海易佰聚经贸有限公司)。

反转录试剂盒购自TaKaRa公司, 所有反应数按+2体系配制。去除基因组DNA的具体操作如下: 冰上操作, 吸取5 $\times$ gDNA Eraser Buffer 2.0 μ L, gDNA Eraser 1.0 μ L, 分装, 每管吸取RNase Free dH₂O及Total RNA(根据Total RNA浓度)至10 μ L, 25 $^{\circ}$ C反应25 min, 制备混合液Master Mixm。反转录操作如下: 冰上操作, RNase Free dH₂O 4.0 μ L、5 $\times$ Prime Script Buffer 2(for Real time) 4.0 μ L、RT Primer Mix 1.0 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μ L, 分装10 μ L至去除基因组DNA反应管中, 37 $^{\circ}$ C孵育15 min。合成的cDNA可-20 $^{\circ}$ C保存或进行下一步PCR的应用程序。

1.10.2 qRT-PCR 根据SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(TaKaRa公司)试剂盒说明书在冰上进行操作。引物序列为, *TLR4*上游引物: 5'-GAA TGA GGA CTG GGT GAG AAA C-3', *TLR4*下游引物: 5'-ACC AAC GGC TCT GGA TAA AGT-3'; *MyD88*上游引物: 5'-GCC TTG TTA GAC CGT GAG GA-3', *MyD88*下游引物: 5'-GGG ACA CTG CTT TCC ACT CT-3'; *NF- κ B*上游引物: 5'-GCA TTC TGA CCT TGC CTA TCT-3', *NF- κ B*下游引物: 5'-CTC CAG TCT CCG AGT GAA GC-3'; *IL-1 β* 上游引物: 5'-GGT ATG AAA TGG CAA ATC G-3', *IL-1 β* 下游引物: 5'-GTC GTA GCA AAC CAC CAA G-3'; *GAPDH*上游引物: 5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC-3', *GAPDH*下游引物: 5'-TGG GAT TTC CAT TGA TGA CAA G-3'。表达量=2^{- $\Delta\Delta C_t$} , 其中, $\Delta\Delta C_t$ =[目的基因的Ct值(样本组)-管家基因的Ct值(样本组)-目的基因的Ct值(校正组)-管家基因的Ct值(校正组)]。

1.11 统计学分析

应用SPSS 19.0软件包进行统计学分析。数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用双侧 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 行为学评估

在构模后及干预后进行2次抑郁行为指标评估, 分别记I、II。行为学评估方法有: 糖水偏好实验、敞箱实验、强迫游泳和强迫悬尾测试。

由图1可知, I、II期中M组、OG组无显著性差异($P>0.05$)。I期中, 与OG组比较, CUMS组糖水消耗量显著降低, 敞箱实验穿越格子数减少, 不动时间

增加, 强迫游泳、悬尾实验绝望不动时间显著上升, 且攀爬次数减少($P<0.01$)。II期中, 与M组比较, 干预组糖水消耗百分数、格子穿越数、攀爬次数出现不同程度上升, 禁止不动时间减少($P<0.05$, $P<0.01$), 且LRMF+SW组最佳, 其次为SW组。

2.2 脑组织单胺类递质5-HT、NE、DA检测

图2可知, 相比M组, OG组、干预组脑组织5-HT、NE、DA含量有不同程度升高($P<0.05$, $P<0.01$), LRMF+SW干预效果最佳($P<0.01$)。与LRMF组比较, LRMF+SW组5-HT、NE、DA含量具有极显著性差异($P<0.01$)。与SW组比较, LRMF+SW组具有显著性差异($P<0.05$), OG组具有极显著性差异($P<0.01$)。

2.3 脑组织尼氏染色

图3显示, 甲苯胺蓝染色剂使神经元尼氏小体呈紫色, 胶质细胞、细胞核呈浅紫色。M组中尼氏小体深染, 出现大量空泡及核固缩、坏死现象。与M组比较, 干预组中尼氏小体的数目增多, 形状正常, 核固缩、空泡、坏死等情况出现不同程度降低; SW组、LRMF+SW组神经元损伤显著减少, 尼氏体颗粒清晰可见, 仅次于OG组。

2.4 免疫组织化学染色

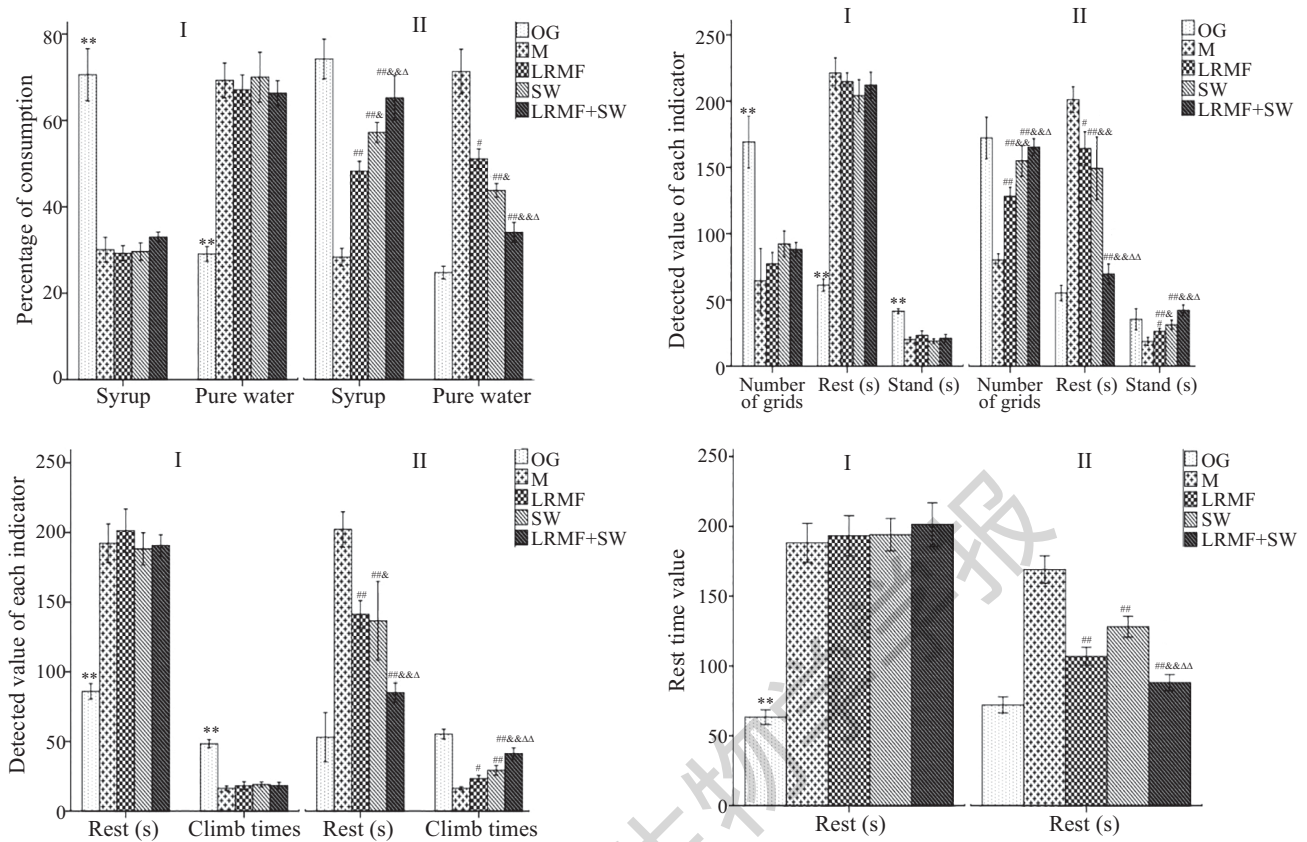
由图4、图5可知, 干预组中TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β 蛋白表达水平平均低于M组, 且LRMF+SW组表达最低($P<0.01$), 其次为SW组。阳性表达面积依次是OG<LRMF+SW<SW<LRMF<M。

2.5 脑组织TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β 蛋白含量测定

由图6可知, M组中脑组织前额叶皮层TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β 蛋白含量最高, OG组最低。相比M组, SW组、LRMF组TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β 蛋白含量具有显著性差异($P<0.05$), LRMF+SW组、OG组蛋白含量具有极显著性差异($P<0.01$)。与LRMF组比较, LRMF+SW组TLR4、MyD88、NF- κ B蛋白含量具有极显著性差异($P<0.01$), IL-1 β 蛋白含量具有显著性差异($P<0.05$)。

2.6 血液及脑组织TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β mRNA表达

由图7可知, M组脑组织及血液中TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β mRNA表达最高, 相比M组, 干预组各因子mRNA表达下降($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。与LRMF组比较, LRMF+SW、OG组表达具有极显著性差异($P<0.01$), SW组具有显著性差异($P<0.05$)。

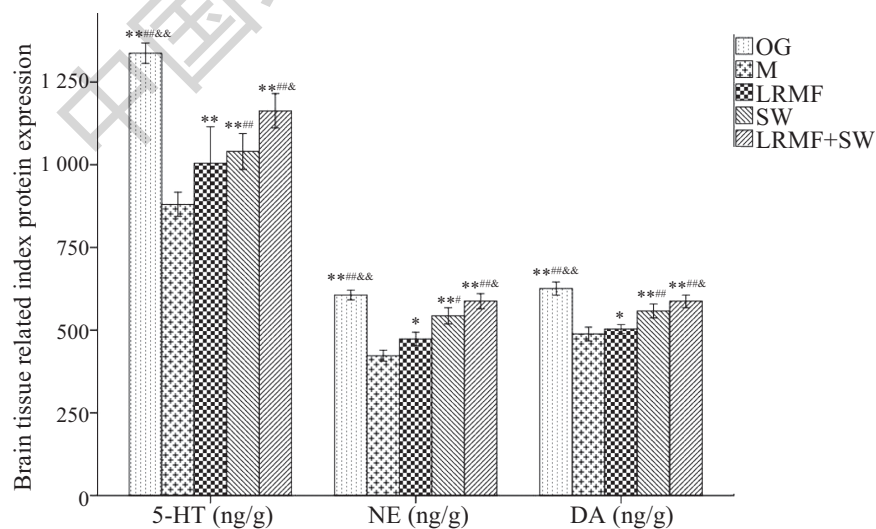


** $P < 0.01$, 与OG组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与M组比较; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, 与LRMF组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与LRMF+SW组比较。

** $P < 0.01$ vs OG group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs M group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs LRMF group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs LRMF+SW group.

图1 各组小鼠不同时期行为学评估

Fig.1 Behavioral assessment of mice in different groups at different times



** $P < 0.01$, 与M组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与SW组比较; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, 与LRMF组比较。

** $P < 0.01$ vs M group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs SW group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs LRMF group.

图2 各组脑组织中单胺类神经递质5-HT、NE、DA的含量

Fig.2 Contents of monoamine neurotransmitters 5-HT, NE and DA in brain tissue of each group

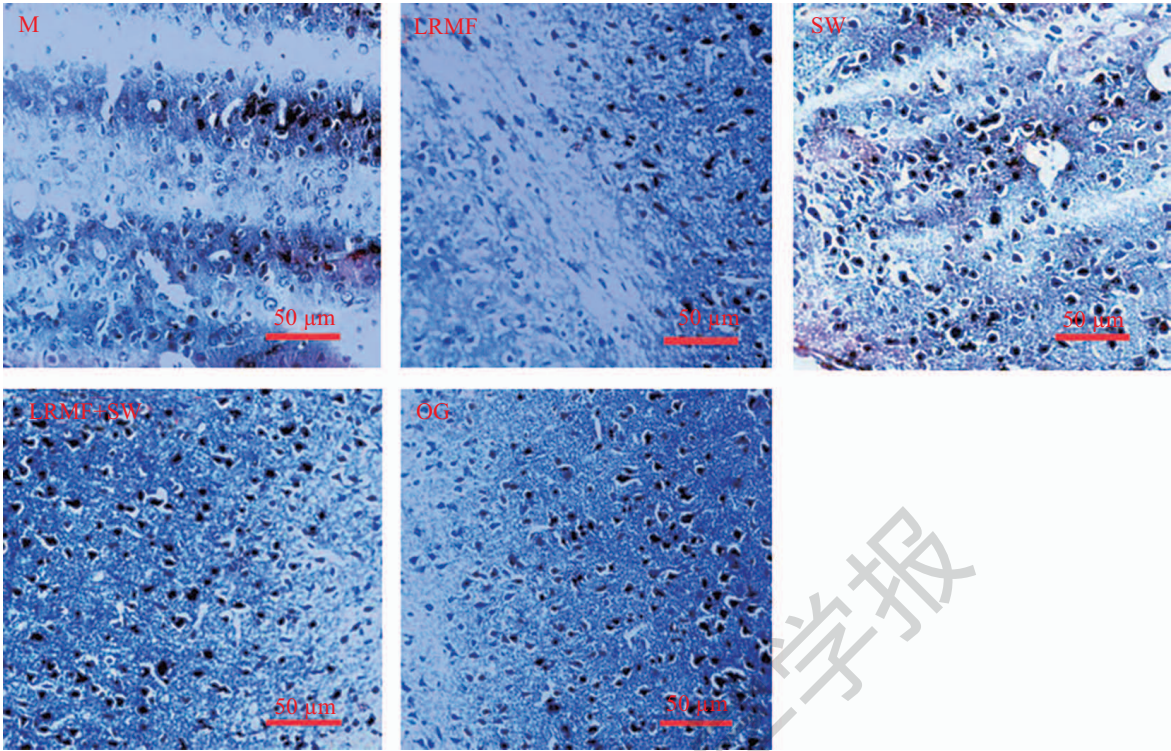


图3 各组小鼠前额叶皮质尼氏染色

Fig.3 Nissl staining of the prefrontal cortex of mice in each group

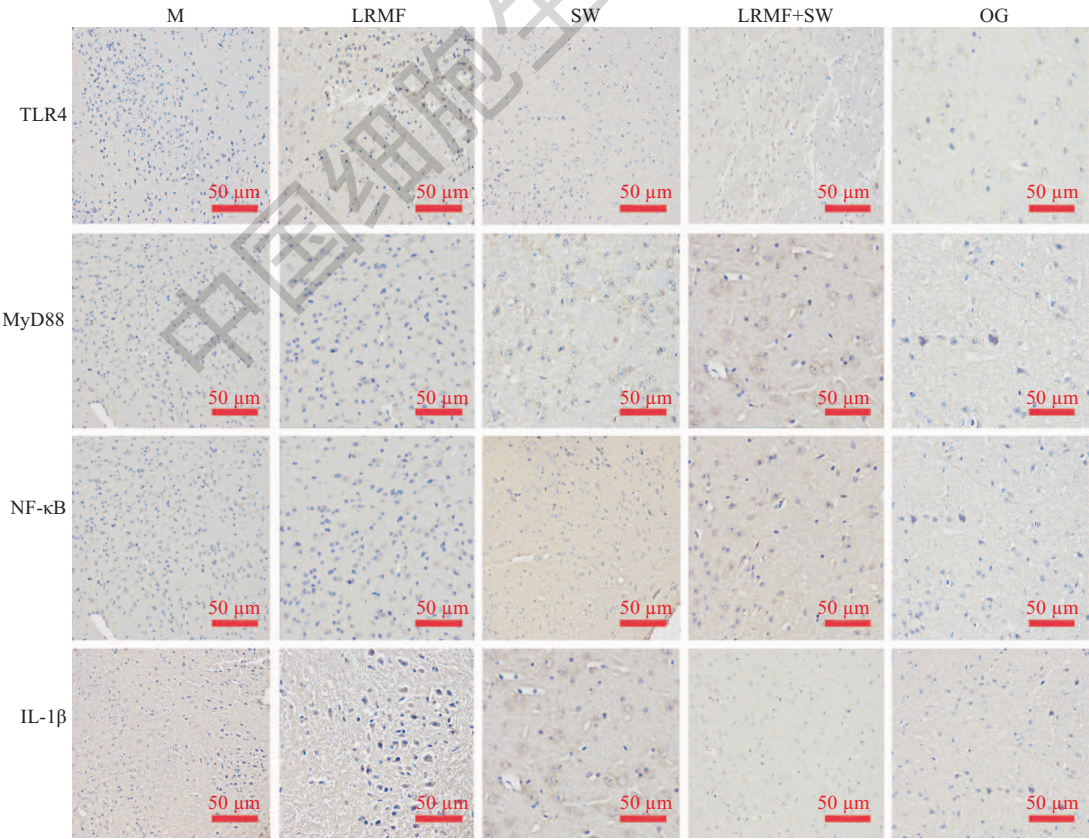
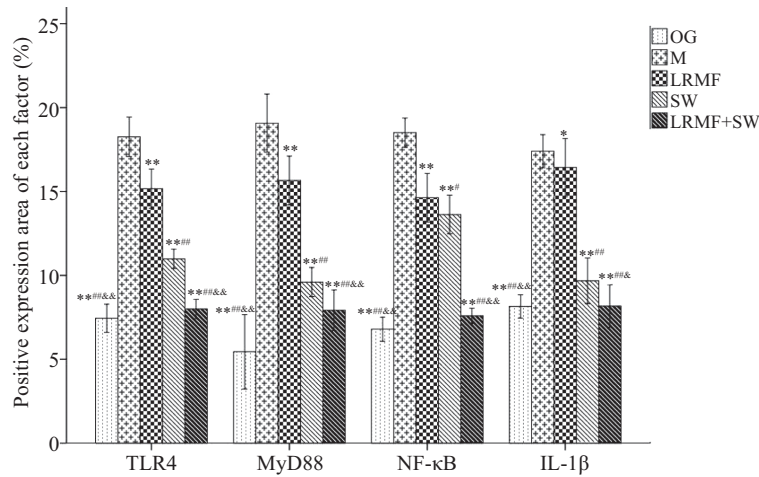


图4 各组小鼠脑组织相关因子蛋白的免疫组化染色

Fig.4 Immunohistochemical staining of brain tissue related factor protein in each group of mice

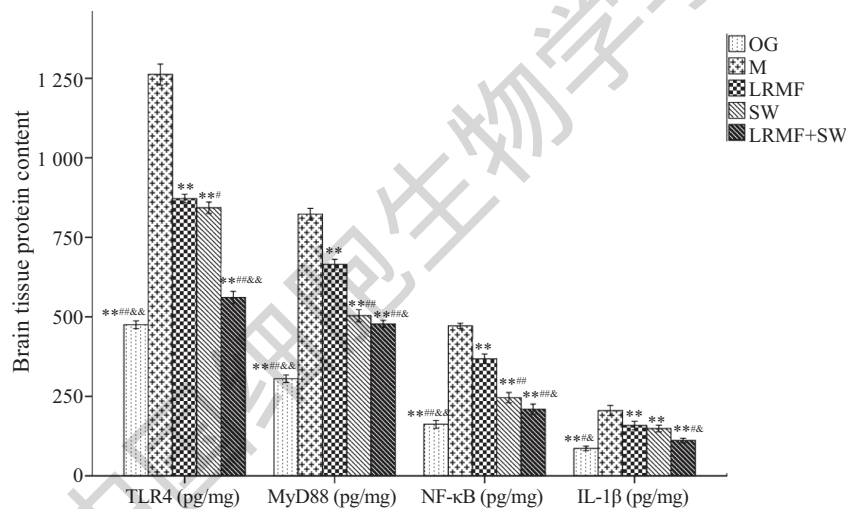


** $P < 0.01$, 与M组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与LRMF组比较; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, 与SW组比较。

** $P < 0.01$ vs M group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs LRMF group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs SW group.

图5 各组小鼠TLR4、MyD88、NF-κB和IL-1β阳性表达的比较

Fig.5 Comparison of positive expression of TLR4, MyD88, NF-κB and IL-1β in each group of mice



** $P < 0.01$, 与M组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与LRMF组比较; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, 与SW组比较。

** $P < 0.01$ vs M group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs LRMF group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs SW group.

图6 各组脑组织前额叶皮质相关因子蛋白含量

Fig.6 Protein content of prefrontal cortex in each group of brain tissue

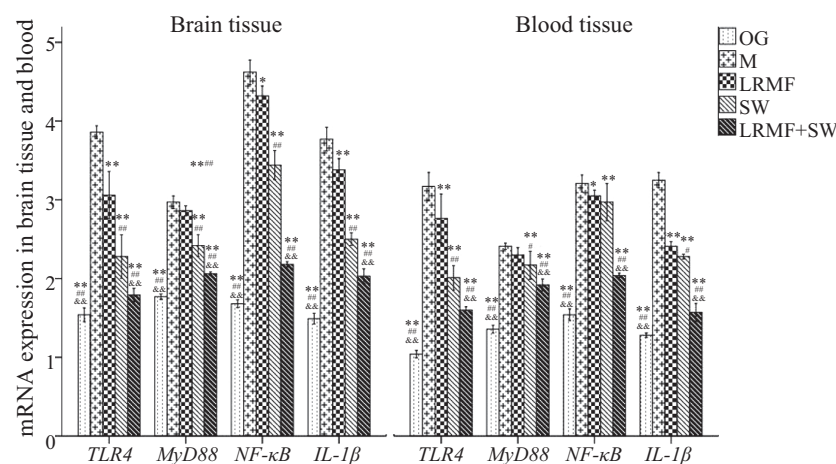
与SW组比较, LRMF+SW组表达具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.7 血液及脑组织相关因子mRNA表达相关性

表2可知, 抑郁症小鼠在血液中TLR4、MyD88、NF-κB、IL-1β mRNA的表达低于脑组织($P < 0.05$), 通过对小鼠脑组织及血液中TLR4、MyD88、NF-κB、IL-1β mRNA表达的相关程度分析, 发现TLR4、MyD88在两者中存在中度相关关系($r > 0.5$), 且具有显著性差异($P < 0.05$)。NF-κB、IL-1β在两者中无相关性($r < 0.5$)。

3 讨论

目前, 确定抑郁症病因主要与心理、生物及社会环境紧密相关, 在一些临床治疗中主要以提高机体神经兴奋、降低炎症反应及相关炎症因子的释放, 缓解抑郁症状所诱发的脑神经损伤, 而动物抑郁模型的构建是研究抑郁疾病的关键。在众多的研究中, 主要采用基因敲除构建抑郁模型, 时间短且成功率高, 但其成本高, 与自然环境或心理因素情况下形成的抑郁大相径庭。目前学者认为, 慢性轻度不可预见性应激能较全面地模拟抑郁患者所处环境,



** $P<0.01$, 与M组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与LRMF组比较; & $P<0.05$, && $P<0.01$, 与SW组比较。
** $P<0.01$ vs M group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs LRMF group; & $P<0.05$, && $P<0.01$ vs SW group.

图7 小鼠血液及脑组织中TLR4、MyD88、NF-κB、IL-1β mRNA的表达
Fig.7 Expression of TLR4, MyD88, NF-κB, IL-1β mRNA in blood and brain of mice

表2 脑组织与血液TLR4、MyD88、NF-κB、IL-1β mRNA表达的相关性
Table 2 Correlation of brain tissue, blood TLR4, MyD88, NF-κB, IL-1β mRNA expression

指标 Index	血液 Blood	脑组织 Brain tissue	相关系数 Correlation coefficient
TLR4	2.11±0.16	2.51±0.42	0.55*
MyD88	2.03±0.32	2.42±0.39	0.63*
NF-κB	2.56±0.27	3.25±0.25	0.37
IL-1β	2.15±0.36	2.63±0.18	0.42

* $P<0.05$, 与脑组织相比。
* $P<0.05$ compared with brain tissue.

也是构建动物抑郁模型最可信、最有价值的干预方法。Song等^[7]采用慢性不可预知轻度应激构建小鼠抑郁模型发现, M组快感缺乏且精神活动下降, 兴奋性降低, 出现一系列绝望行为。Mousavi等^[8]通过脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导构建小鼠抑郁模型, 此模型对于因环境及心理因素诱发的抑郁患者难以切合, 不能完全模拟抑郁症病因。本研究实验对象为KM小鼠, 通过13种不同的慢性轻度不可预见性应激, 模拟人类抑郁环境及心理, 应激频率1~2种/天, 共28天。小鼠存活率达到100%, 应激结束后, 通过抑郁行为评估发现, CUMS组反应迟钝、意志活动衰退且对于糖水快感缺乏, 精神活动明显延迟, 绝望行为显著。此类行为表现与抑郁患者的核心症状吻合。Nissl染色显示, 神经元尼氏体数量降低, 空泡、核固缩等症状明显。因此判断此模型构建成功并可应用于本次研究。

早发性抑郁及成年抑郁患者脑组织中都存在

单胺类神经递质系统失调的特点。5-HT是与ATP等能量物质共同储存在细胞颗粒内, 相应的刺激可促使5-HT释放弥散到血液。与机体睡眠及精神类疾病的发生等紧密相关, 对5-HT系统功能的改变能起到抗抑郁作用^[9]。Barua等^[10]发现, 通过改变5-HT的浓度并结合药物的抗炎潜力表现出抗抑郁活性。去甲肾上腺素(NE)是最早被发现神经递质, 主要依赖交感节后神经元和脑内肾上腺素能神经末梢, Bai等^[11]发现, NE的含量降低与抑郁症疾病的发生起到重要的作用。多巴胺(DA)是一种关键神经递质, 促进细胞间脉冲信号的传送, 可调控大脑的情欲, 并传递兴奋、快感及亢奋等信息。Salama等^[12]发现, 改善纹状体中多巴胺(DA)能够保护患有抑郁症小鼠脑组织免受神经炎症的影响且提高抑郁小鼠的神经兴奋性。本实验研究发现, 与M组比较, 干预组5-HT、NE、DA在血清中的含量均有不同程度的上升, SW组高于LRMF组, 且LRMF+SW组最高。以上结果表

明, 游泳运动及黑果枸杞黄酮均能增强抑郁小鼠单胺类神经递质的合成与释放, 促进其精神活动、神经元兴奋性等情绪调节行为, 起到抗抑郁作用, 且联合干预效果更佳。

目前, 有氧运动对于慢性疾病的治疗越来越受到科研的重视。有规律的有氧运动能抑制机体内神经毒性物质的堆积, 增强血管内皮生长因子及生成素的活化, 促进血管的生成。Lattari等^[13]研究发现, 有氧运动可以促进急性焦虑的增加, 而有规律的有氧运动可以促进焦虑水平的降低。Greer等^[14]在研究运动对抑郁症的干预效应中发现, 有规律的锻炼可以改善重度抑郁症和其他大脑疾病认知的机制, 是脑组织慢性疾病致使认知障碍的有益治疗方法或增强策略。对于天然药物的开发是医学界的关注点, 黑果枸杞黄酮成分能降低毛细血管通透性、增强机体免疫、促进T细胞与靶细胞之间的相互作用等。Stagni等^[15]在研究黄酮类物质改善认知障碍小鼠的机制中发现, 黄酮类物质能促进神经发生增加和减轻神经元成熟受损。本实验中, 6周的有氧运动及在黑果枸杞黄酮的干预作用下, 行为学评估显示, 干预组抑郁行为显著下降, 其精神兴奋性及活动明显增加。血清中单胺类神经递质含量出现不同程度的上升。Nissl染色显示, 两种干预明显减少了抑郁症小鼠大脑皮质神经元损伤, 神经元丢失减少, 具有神经元保护作用。空泡、核固缩、核坏死等神经元损伤症状减轻, 且联合干预效果最佳, 游泳组优于黑果枸杞黄酮组。

研究发现, 人类或动物在患有抑郁时脑组织中存在大量的炎症因子, 且炎症反应明显, 导致神经元细胞损伤^[16]。单个炎症因子的抑制剂或增强剂难以抵抗错综复杂的免疫系统, 故在其上游找到一条重要的免疫调节信号通路, 掌握其机制并进行干预。Toll样受体是世界公认的与天然免疫系统紧密相关的重要信号通路, 其TLR4-MyD88-NF- κ B信号传导的激活对启动对入侵病原体或自身免疫应答的抵抗有着重要的影响^[17]。受体TLR4被激活后结合于MyD88, 通过TLR4受体上的死亡域结合于IL-1受体的激酶(receptor associated kinase, IRAK), 促进IRAK的活化, 激活TRAF6, 从而导致MAPK家族的激活, 其中NF- κ B诱导激酶激活I- κ B家族中 α 、 β 激酶, 使I- κ B磷酸化降解, 促进NF- κ B进入到细胞核, 发挥生物学效应, 启动IL-1、TNF- α 、IL-6等因子的转录。

对抑郁症脑损伤病理生理机制的实验表明, 构建抑郁症模型后TLR4活化, 促进NF- κ B产生IL-1 β 等炎症因子, 致使脑损伤症状的发生^[18]。本实验中, 与M组比较, 干预组中TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β 的蛋白及mRNA表达均有不同程度的下降, SW组低于LRMF组, LRMF+SW组最低, 说明游泳运动和黑果枸杞黄酮能减轻抑郁症所诱发的炎症反应, 改善抑郁症小鼠脑损伤的程度, 增强神经元功能的恢复, 且联合干预效果最佳。此结果应证了抑郁行为学评估及病理学切片结果, 其作用机制可能是通过调节Toll样受体通路中TLR4-MyD88-NF- κ B相关因子的信号传导实现的。同时细胞凋亡或死亡后可释放内源性循环RNA, 或某些细胞主动分泌来提供。据报道, 循环RNA-蛋白质复合物可以用作敏感和有效的肿瘤标志物^[19]。本实验研究发现, 抑郁症小鼠脑组织中TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β mRNA表达高于血液组织。其中, TLR4、MyD88 mRNA表达量存在中度相关关系, NF- κ B、IL-1 β 在脑组织和血液中无相关性, 且也无显著差异性。

本研究结果表明, 有氧游泳运动与黑果枸杞黄酮能够抑制Toll样受体通路中TLR4-MyD88-NF- κ B相关因子的信号传导, 调节相关的免疫系统, 降低炎症因子的表达和炎症反应, 对脑组织神经元起到保护作用, 减轻抑郁行为表现, 有氧游泳运动干预效果优于黑果枸杞黄酮, 且联合干预效果最佳。但此结果的出现, 到底是增强的免疫系统所致还是神经递质的改变促进抑郁症状减轻, 或者是两者之间交互作用, 其机制尚不清楚, 有待进一步的研究。TLR4、MyD88在脑组织和血液组织存在中度相关关系。这提示, 在外周血中TLR4、MyD88 mRNA的表达水平可作为分子标记, 跟踪抑郁症患者脑损伤的病理生理变化情况。

参考文献 (References)

- 1 Yamagata H, Uchida S, Matsuo K, Harada K, Kobayashi A, Nakashima M, *et al.* Altered plasma protein glycosylation in a mouse model of depression and in patients with major depression. *J Affect Disord* 2018; 23: 79-85.
- 2 Cheng M, Cong J, Wu Y, Xie J, Wang S, Zhao Y, *et al.* Chronic swimming exercise ameliorates low-soybean-oil diet-induced spatial memory impairment by enhancing BDNF-mediated synaptic potentiation in developing spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Res* 2018; 43(5): 1047-57.
- 3 Miao M, Zhang X, Zhang F, Wang C, Fang X, Bai M, *et al.* Effects of *Scrambling trumpet Creeper flavone* on transient

- cerebral ischemia model (TIA) in rat. *Saudi J Biol Sci* 2011; 25(3): 479-86.
- 4 Tan L, Schedl P, Song HJ, Garza D, Konsolaki M. The Toll-NF κ B signaling pathway mediates the neuropathological effects of the human Alzheimer's A β 42 polypeptide in *Drosophila*. *PLoS One* 2008; 3(12): e3966.
- 5 Li X, Liu C, Jiang B, Chen K, Li W, Wang H. The antidepressant-like effects of sinomenine in mice: a behavioral and neurobiological characterization. *Behav Pharmacol* 2018; 29(4): 306-15.
- 6 Das PR, Eun JB. A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. *Food Chem* 2018; 25(3): 22-9.
- 7 Song W, Guo Y, Jiang S, Wei L, Liu Z, Wang X, *et al.* Antidepressant effects of the ginsenoside metabolite compound K, assessed by behavioral despair test and chronic unpredictable mild stress model. *Neurochem Res* 2018; 12(8): 136-9.
- 8 Mousavi SE, Saberi P, Ghasemkhani N, Fakhraei N, Mokhtari R, Dehpour AR. Licofelone attenuates LPS-induced depressive-like behavior in mice: a possible role for nitric oxide. *J Pharm Pharm Sci* 2018; 21(1): 184-94.
- 9 Zhao DH, Wang YC, Zheng LW, Liu BY, Guan LP. Antidepressant-like effect of a chalcone compound, DHIPC and its possible mechanism. *Iran J Pharm Res* 2018; 17(1): 193-201.
- 10 Barua CC, Haloi P, Saikia B, Sulakhiya K, Pathak DC, Tamuli S, *et al.* Zanthoxylum alatum abrogates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviours in mice by modulating neuroinflammation and monoamine neurotransmitters in the hippocampus. *Pharm Biol* 2018; 56(1): 245-52.
- 11 Bai Y, Song L, Dai G, Xu M, Zhu L, Zhang W, *et al.* Antidepressant effects of magnolol in a mouse model of depression induced by chronic corticosterone injection. *Steroids* 2018; 13(5): 73-8.
- 12 Salama RM, Tadros MG, Schaalán MF, Bahaa N, Abdel-Tawab AM, Khalifa AE. Potential neuroprotective effect of androst-5-ene-3 β , 17 β -diol (ADIOL) on the striatum, and substantia nigra in Parkinson's disease rat model. *J Cell Physiol* 2018; 233(8): 5981-6000.
- 13 Lattari E, Budde H, Paes F, Neto GAM, Appolinario JC, Nardi AE, *et al.* Effects of aerobic exercise on anxiety symptoms and cortical activity in patients with panic disorder: a pilot study. *Clin Pract Epidemiol Ment Health* 2018; 14: 11-25.
- 14 Greer TL, Furman JL, Trivedi MH. Evaluation of the benefits of exercise on cognition in major depressive disorder. *Gen Hosp Psychiatry* 2017; 49: 19-25.
- 15 Stagni F, Giacomini A, Guidi S, Emili M, Uguagliati B, Salvalai ME, *et al.* Flavonoid agonist of the TrkB receptor for BDNF improves hippocampal neurogenesis and hippocampus-dependent memory in the Ts65Dn mouse model of DS. *Exp Neurol* 2017; 29(12): 79-96.
- 16 Gupta S, Ahsan AU, Wani A, Khajuria V, Nazir LA, Sharma S, *et al.* The amino analogue of β -boswellic acid efficiently attenuates the release of pro-inflammatory mediators than its parent compound through the suppression of NF- κ B/I κ B α signalling axis. *Cytokine* 2018; 34(12): 93-104.
- 17 Zhang L, Chopp M, Liu X, Teng H, Tang T, Kassis H, *et al.* Combination therapy with VELCADE and tissue plasminogen activator is neuroprotective in aged rats after stroke and targets microRNA-146a and the toll-like receptor signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(8): 1856-64.
- 18 Kang JW, Koh EJ, Lee SM. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. *J Pineal Res* 2011; 50(4): 403-11.
- 19 de Gonzalo-Calvo D, Dávalos A, Fernández-Sanjurjo M, Amado-Rodríguez L, Díaz-Coto S, Tomás-Zapico C, *et al.* Circulating microRNAs as emerging cardiac biomarkers responsive to acute exercise. *Int J Cardiol* 2018; 264: 130-6.
- 20 Liu W, Xue X, Xia J, Liu J, Qi Z. Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins. *J Affect Disord* 2018; 227: 126-35.
- 21 Ostadhadi S, Norouzi-Javidan A, Chamanara M, Akbarian R, Imran-Khan M, Ghasemi M, *et al.* Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of tramadol in the mouse forced swimming test. *Brain Res Bull* 2017; 134: 136-41.
- 22 Ostadhadi S, Akbarian R, Norouzi-Javidan A, Nikoui V, Zolfaghari S, Chamanara M, *et al.* Possible involvement of ATP-sensitive potassium channels in the antidepressant-like effects of gabapentin in mouse forced swimming test. *Can J Physiol Pharmacol* 2017; 95(7): 795-802.
- 23 张懿. NLRP3炎性小体在抑郁样行为中的作用及分子机制. 第二军医大学(博士毕业论文)(Zhang Yi. The role and molecular mechanism of NLRP3 inflammatory bodies in depression-like behavior. The Second Military Medical University), 2016.