



SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE 学者介绍



王泽剑 博士
WANG Ze-jian Ph.D

副教授、硕士生导师
Associate Professor, Master Supervisor

ORCID ID: 0000-0002-9024-509X

王泽剑 (1972—), 博士, 上海交通大学副教授、硕士生导师, 亚洲干细胞库研发部高级管理人员。现任上海市老年病学会委员、上海市药理毒理学会委员。2003年于原上海第二医科大学(现上海交通大学医学院)获得博士学位, 2003年9月在上海交通大学药学院药理课题组工作。2007—2008年在巴黎第十三大学从事博士后工作。2014年加入亚洲干细胞库, 主要从事干细胞与美容、衰老研究。2003—2006年主持上海市科学技术委员会自然科学基金“PPAR作为神经保护新药靶点可行性研究”。主持上海交通大学医工交叉基金2项(穿心莲内酯通过NLRP3炎症复合体调控小胶质细胞表型及转化抑制神经系统炎症的机制研究、慢性牙周炎与阿尔茨海默病相互关联机制的实验研究)和国家自然科学基金2项(A β_{42} 通过甲酰肽样受体-1造成神经干/前体细胞老化; 喹啉类分子在AD转基因鼠模型中的神经保护作用及机制研究)。目前累计发表论文30余篇, 其中在心脑保护、再生、抑郁及抗癌研究等衰老性疾病方面共计发表SCI论文20余篇。另参与国家自然科学基金4项, 参编专著3部, 参与研发专利3项。

该研究依托上海交通大学医学院“双一流”暨高水平地方高校建设一流学科—药学。

代表性论著

1. Pu J, Zhu S, Zhou D, Zhao L, Yin M, Wang Z, Hong J. Propofol alleviates apoptosis induced by chronic high glucose exposure via regulation of HIF-1 α in H9c2 cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4824035.
2. Liu S, Tang SQ, Cui HJ, Yin S, Yin M, Zhao H, Meng LH, Wang ZJ, Lu Y. Dipotassium N-stearoyltyrosinate ameliorated pathological injuries in triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Pharmacol Sci*, 2016, 132(1): 92–99.
3. He N, Jin WL, Lok KH, Wang Y, Yin M, Wang ZJ. Amyloid- β_{1-42} oligomer accelerates senescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(11): e924.
4. Wang Z, Chen Y, Li X, Sultana P, Yin M, Wang Z. Amyloid- β_{1-42} dynamically regulates the migration of neural stem/progenitor cells via MAPK-ERK pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 298: 96–103.
5. Zhang C, Ge X, Lok K, Zhao L, Yin M, Wang ZJ. RhoC involved in the migration of neural stem/progenitor cells[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(3): 409–417.



论著·基础研究

抑郁模型小鼠海马中胆汁酸受体变化的研究

吴 静¹, 李学义¹, 陈京红², 王泽剑¹

1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 上海交通大学医学院附属精神卫生中心, 上海 200030

[摘要] **目的**·探索胆汁酸受体在抑郁模型小鼠海马中的表达变化以及可能的机制。**方法**·将30只4周龄C57BL/6雌性小鼠随机分为对照(control, CON)组10只、地塞米松(dexamethasone, DEX)组10只、慢性不可知性应激(chronic unexpected mild stress, CUMS)组10只。CUMS组每日给予不同的CUMS; DEX组每日2次给予0.2 mg/kg的DEX灌胃给药, CON组和CUMS组每日给予等体积的羧甲基纤维素钠(溶剂)灌胃。造模持续5周, 每周称重。造模结束后, 各组小鼠分别进行强迫游泳实验、悬尾实验和糖水偏好实验, 观察小鼠的行为学变化。实验结束后处死小鼠, 分离并称取小鼠海马及各脏器质量, 采用Western blotting检测小鼠海马中脑源性神经生长因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、法尼酯X受体(farnesoid X receptor, FXR)和G蛋白偶联胆汁酸受体1(G protein-coupled bile acid receptor 1, GPBAR1, 又称为TGR5)的改变; 小鼠血清胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)和成纤维细胞生长因子15(fibroblast growth factor 15, FGF15)含量使用ELISA试剂盒检测。同时使用不同浓度DEX处理大鼠胶质瘤细胞(C6)株, 采用Western blotting检测细胞中FXR和TGR5蛋白水平, 使用ELISA试剂盒检测C6细胞培养基中BDNF和胶质细胞源性神经生长因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)含量, 活性氧试剂盒检测细胞内氧化应激水平。用5 mmol/L N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)提前预处理C6细胞2 h, 观察DEX对胆汁酸受体影响的变化。**结果**·与CON组相比, DEX组和CUMS组糖水偏好度降低, 强迫游泳实验和悬尾实验的不动时间延长(均 $P<0.05$), 胆囊系数显著升高(均 $P<0.05$)。DEX组血清FGF15水平较CON组显著升高, CUMS组则显著降低(均 $P<0.05$); CUMS组CCK水平较CON组显著增高($P<0.05$)。此外, 2种抑郁模型小鼠海马中TGR5蛋白表达水平显著下降, FXR显著增加(均 $P<0.05$)。C6细胞使用200 $\mu\text{mol/L}$ 和400 $\mu\text{mol/L}$ DEX处理3 d后, 细胞内TGR5表达量显著减少, FXR表达量显著增加, 培养基中GDNF和BDNF(BDNF仅在400 $\mu\text{mol/L}$ 组)水平显著降低(均 $P<0.05$)。200 $\mu\text{mol/L}$ DEX可显著提高C6细胞中的活性氧水平。NAC预处理可部分逆转DEX诱导的C6细胞胆汁酸受体改变。**结论**·DEX和CUMS抑郁模型小鼠海马内存在相似的胆汁酸受体改变, 即TGR5减少, FXR增加; 该变化可能与氧化应激水平升高有关。

[关键词] 抑郁症; 胆汁酸代谢; 胆汁酸受体; 海马; 氧化应激**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.12.012 **[中图分类号]** R964 **[文献标志码]** A

Study on changes of hippocampal bile acid receptors in the depression mouse models

WU Jing¹, LI Xue-yi¹, CHEN Jing-hong², WANG Ze-jian¹

1. Shanghai Jiao Tong University School of Pharmacy, Shanghai 200240, China; 2. Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China

[Abstract] **Objective**·To explore the changes of bile acid receptors in hippocampi of depression mouse models. **Methods**·Thirty female C57BL/6 mice with the age of 4 weeks were randomly divided into control (CON, $n=10$) group, chronic unexpected mild stress (CUMS, $n=10$) group and dexamethasone (DEX, $n=10$) group. CUMS group mice were treated with different CUMS every day, DEX group mice were administered with DEX (0.2 mg/kg) by oral gavage twice a day, and CON group and CUMS group were given equal volumes of CMC-Na (solvent) by oral gavage every day. The treatments lasted for 5 weeks, and the mice were weighed once a week. After modeling, the forced swimming test, the tail suspension test and the sucrose preference test were applied to detect the depression-like behavior in mice. After the mice being sacrificed, the hippocampus and the other organs were separated and weighed. The expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), farnesoid X receptor (FXR) and G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1, also TGR5) in the hippocampus were evaluated by Western blotting. The serum levels of fibroblast growth factor 15 (FGF15) and cholecystokinin (CCK) were detected by ELISA kits. Meanwhile, in the rat glioma cell line (C6) incubated with different concentrations of DEX, the expressions of FXR and TGR5 were detected by Western blotting, and the levels of BDNF and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the cell culture medium were detected by ELISA kits. The ROS assay kit was used to detect intracellular oxidative stress levels. C6 cells were pretreated with 5 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC) for 2 h, and the effects of DEX on bile acid receptors were observed. **Results**·Compared with CON group, both DEX group and CUMS group had decreased sucrose preference, prolonged immobility time in the forced swimming test and the tail suspension test ($P<0.05$) and greater organ relative mass of gallbladder ($P<0.05$). The level of serum FGF15 in DEX group was significantly higher than that in CON group, but significantly lower in CUMS group ($P<0.05$); the level of CCK in CUMS group was significantly higher than that in CON group ($P<0.05$).

[基金项目] 上海市重性精神病重点实验室开放课题资助项目(13dz2260500)。**[作者简介]** 吴 静(1996—), 女, 硕士生; 电子信箱: wjszmwzswy@sjtu.edu.cn。**[通信作者]** 王泽剑, 电子信箱: wangzejian@sjtu.edu.cn。**[Funding Information]** Shanghai Key Laboratory of Psychotic Disorders Research Fund (13dz2260500)。**[Corresponding Author]** WANG Ze-jian, E-mail: wangzejian@sjtu.edu.cn。**[网络首发]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20210918.1715.022.html> (2021/9/23 10:19:35)。

Additionally, in the hippocampi of the two different depression models, the protein levels of TGR5 and FXR decreased and increased, respectively ($P < 0.05$). The 200 $\mu\text{mol/L}$ and 400 $\mu\text{mol/L}$ DEX increased the expression of FXR, while significantly inhibited the expression of TGR5 in C6 cells; the levels of GDNF and BDNF (BDNF only in 400 $\mu\text{mol/L}$ group) significantly decreased ($P < 0.05$) in the culture medium. DEX at 200 $\mu\text{mol/L}$ significantly increased the levels of ROS in the C6 cells. The cells pretreated with NAC partially reversed the overexpression of FXR and the low expression of TGR5 induced by DEX. **Conclusion** The similar changes of bile acid receptors, *i. e.* decreased TGR5 and increased FXR, are found in the hippocampi of depression mouse models induced by CUMS and DEX, respectively. These changes may be related to the elevated level of oxidative stress.

[Key words] depression; bile acid metabolism; bile acid receptor; hippocampus; oxidative stress

重度抑郁症 (major depressive disorder, MDD) 是神经精神疾病中最重要的疾病之一, 也是一种基因与环境交互影响的异质性重大精神疾病, 以显著而持久的心境低落与兴趣减少为主要临床特征。目前现有临床药物对约 30% MDD 患者的临床疗效欠佳。因此, 抑郁症仍需寻找新的治疗靶点^[1]。

女性 MDD 发生率约为男性的 2 倍, 其高发年龄段分别为青春期、孕产期和绝经期; 这 3 个阶段均与女性体内雌激素水平急剧改变有关。现代医学认为: 雌激素受体属于核受体之一, 高水平雌二醇可以干扰肝脏胆汁酸受体后信号造成肝内胆汁淤积^[2]。清代叶天士在《临证指南医案》中指出: “女子以肝为先天。”《中医基础理论》中藏象学说指出: 肝“主疏泄, 其性升发, 喜条达恶抑郁, 以舒畅全身气机, 调节情志”。由此可见, 女性更容易受情绪影响出现“郁证”。传统中医认为: 抑郁症属于“郁证”的范畴, 其发生与肝郁气滞或肝郁脾虚有关。因此, 中医常采用疏肝、利胆、健脾的方法如解郁丸、逍遥丸等治疗^[3-4], 临床起效快, 并有确切疗效。胆汁酸在肠道主要通过其受体发挥抗炎、抑菌作用。牛磺熊去氧胆酸可减轻脂多糖诱发的小鼠抑郁样行为及神经炎^[5]; 它可能是通过小胶质细胞膜上 G 蛋白偶联胆汁酸受体 1 (G protein-coupled bile acid receptor 1, GPBAR1, 又称为 TGR5) 发挥抗炎作用^[6]。这些结果提示脑内同样存在胆汁酸受体, 但其功能尚不完全清楚。

下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴是哺乳动物的一个生物稳态调节系统, 在各种生理、病理性应激反应中发挥长期调节作用。HPA 轴功能障碍在抑郁症和慢性疲劳综合征等神经内分泌疾病中得到了广泛的研究。有研究^[7-8]表明, HPA 轴功能异常在女性 MDD 形成中作用更为显著。C57BL/6 小鼠压力应激诱导下产生的应激行为可以被糖皮质激素的拮抗剂所逆转^[9]。海马是 MDD 研究中常见的脑区之一。MDD 患者尸检^[10]发现: 海马 CA1 区体积减小, 伴星形胶质细胞大量丢失和萎缩。本实验采用在体动物实验和离体细胞学研究相结合的方法, 初步探索抑郁症患者脑内海马区胆汁酸受体变化及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞 SPF 级 C57BL/6 健康雌性小鼠, 4 周龄, 体质量 15~17 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2017-0005。小鼠饲养于上海交通大学动物实验中心, 环境温度 (22±3) °C、湿度 40%~70%、12 h 明暗交替; 实验动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2018-0028。实验动物操作经上海交通大学动物伦理委员会批准, 伦理批号为 20181112。

大鼠胶质瘤细胞 (C6) 购于中国科学院上海细胞库, 细胞使用含有 10% 胎牛血清的 F-12 培养基, 于 5%CO₂、37 °C 培养箱中培养。

1.1.2 实验试剂 TGR5 一抗购于英国 Abcam 公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体购于美国 Bioworld 公司, β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体、法尼脂 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 一抗和脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 一抗购于美国 Proteintech 公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和山羊抗鼠抗体购于美国 Jackson ImmunoResearch 公司, 地塞米松 (dexamethasone, DEX) 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 小鼠成纤维细胞生长因子 15 (fibroblast growth factor 15, FGF15) ELISA 试剂盒、小鼠胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) ELISA 试剂盒、大鼠 BDNF ELISA 试剂盒和 大鼠胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF) ELISA 试剂盒购于上海榕珉生物 (XLPCC) 公司, RIPA 蛋白裂解液、BCA 检测试剂盒、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将 30 只小鼠适应性饲养 1 周后, 按照随机分配方法分为 3 组, 对照 (control, CON) 组、慢性不可知性应激 (chronic unpredicted mild stress, CUMS)

组和DEX组, 每组10只。DEX组按每次2.0 mg/kg的剂量给予DEX灌胃, 每日2次(上午8点和下午5点); CON组和CUMS组同样每日灌胃2次, 给予等体积的溶剂(羧甲基纤维素钠, CMC-Na)。造模时间5周, 每周固定时间称取小鼠体质量。

1.2.2 CUMS模型的建立 CUMS组在每日灌胃处理之后给予不同刺激造模, 持续5周。刺激方法为昼夜颠倒、冰水游泳5 min、倾斜鼠笼45°、潮湿垫料、电击鼠尾、束缚3 h、禁水禁食、噪声刺激3 h。刺激方式每日随机产生, 同一种刺激方式不能连续出现。除部分CUMS刺激周期内, 小鼠其他时段均正常提供饮食。

1.2.3 行为学研究

(1) 强迫游泳实验(forced swimming test, FST) 将小鼠单独放置在直径14 cm、水深20 cm的烧杯内, 水温22℃。游泳时长6 min, 记录小鼠后4 min内静止不动的时间。每只小鼠结束实验后, 及时换水, 避免对后面实验小鼠产生影响。

(2) 悬尾实验(tail suspension test, TST) 安静环境下, 将实验小鼠尾部末端1/3处固定在实验装置上, 倒置小鼠。实验记录6 min, 记录小鼠后4 min内静止不动的时间。

(3) 糖水偏好实验(sucrose preference test, SPT) 小鼠首先进行糖水适应性实验, 待适应性实验结束后小鼠正式进行SPT。禁水禁食24 h, 24 h后进行实验, 每只鼠笼放入2瓶100 mL的水, 一瓶为1%蔗糖溶液, 一瓶为纯净水。12 h后调换2瓶水的位置, 24 h后结束实验, 记录糖水和纯水消耗量。计算糖水消耗百分比=糖水消耗量/(糖水消耗量+纯净水消耗量)×100%。

1.2.4 ELISA检测血清中FGF15和CCK含量 小鼠完成行为学实验之后进行眼球取血, 血液于4℃静置2 h, 5 300×g离心15 min, 收集上清液, -80℃保存备用。使用小鼠FGF15和CCK ELISA试剂盒, 按说明书进行检测, 于波长450 nm处测定吸光度(D), 绘制标准曲线, 根据标准曲线获得样品浓度。

1.2.5 小鼠脏器质量及组织分离 实验结束后, 称取小鼠体质量, 颈椎脱臼处死, 分别取出脑、心脏、肝脏、脾、肺、肾脏、胸腺及胆囊, 用吸水纸吸干不同脏器表面血迹及体液, 置于电子天平上(精度为0.000 1 g), 称取各脏器质量, 比较各组脏器系数差异, 脏器系数=脏器质量/小鼠体质量。脑组织称重结束后, 在冰上迅速分离两侧海马组织, 并立即置于-80℃冰箱保存待用。

1.2.6 Western blotting检测小鼠海马组织及C6细胞中相关蛋白水平变化 从-80℃冰箱取出海马组织, 加入RIPA蛋白裂解液, 使用匀浆机在冰上裂解30 min, 于

4℃, 12 000×g离心10 min取上清液。C6细胞使用25、50、100、200和400 μmol/L DEX处理3 d后, 去除培养基, 使用RIPA蛋白裂解液裂解后, 于4℃, 12 000×g离心10 min取上清液。利用BCA试剂盒测定蛋白浓度, 根据不同蛋白的相对分子质量选择合适浓度的聚丙烯酰胺凝胶。随后进行蛋白变性、上样、电泳、转膜和封闭, 一抗4℃孵育过夜, 次日洗膜, 加入二抗孵育, 最后用ECL发光液曝光、显影, 以GAPDH或β-actin作为内参, 以目的蛋白和内参的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.2.7 ELISA检测C6细胞培养基中GDNF和BDNF含量 C6细胞使用不同剂量DEX处理3 d后, 收集细胞培养基, 使用大鼠BDNF和GDNF ELISA试剂盒检测细胞培养基中BDNF和GDNF的含量。

1.2.8 细胞内ROS含量检测 C6细胞使用DEX 200 μmol/L进行处理, 处理3 d后, 去除细胞培养基, 使用胰酶消化, 收集细胞; 每管加入100 μL浓度为10 mol/L的DCFH-DA荧光探针, 37℃细胞培养箱孵育20 min, 孵育结束后, 使用无血清培养基洗涤3次, 去除多余的荧光探针; 随后每管加入200 μL无血清培养基, 使用荧光检测仪检测荧光强度, 激发波长488 nm, 发射波长525 nm; 同时使用细胞计数仪对细胞进行计数, 以荧光强度/细胞数代表细胞内ROS含量。

1.2.9 N-乙酰-L-半胱氨酸处理C6细胞 C6细胞先加入5 mmol/L N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)处理2 h, 然后加入200 μmol/L DEX孵育3 d, 提取细胞内蛋白, 使用Western blotting检测细胞内蛋白水平变化。

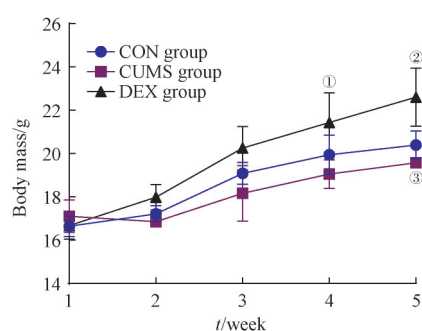
1.3 统计学分析

采用软件GraphPad Prism 7.0和SPSS 22.0对数据进行统计学处理。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 满足正态分布的数据采用t检验或单因素方差分析检验或双因素方差分析检验, 进一步组间两两比较使用Student-Newman-Keuls检验; 非正态分布数据采用非参数检验(Kruskal-Wallis秩和检验)进行事后分析。

2 结果

2.1 小鼠体质量

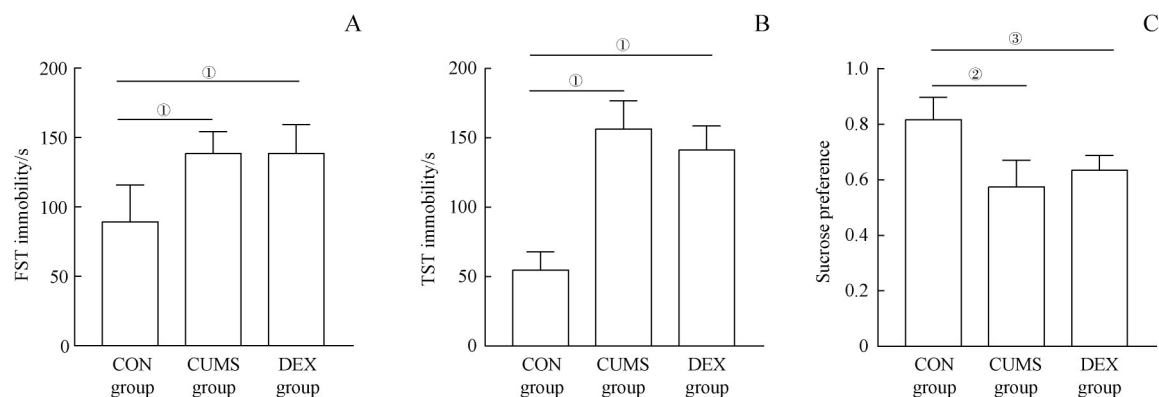
建模完成后发现各组小鼠体质量差异有统计学意义($P < 0.05$) (图1): 与CON组比较, CUMS组的体质量显著下降($P < 0.05$), DEX组小鼠的体质量与CON组相比显著上升($P < 0.05$)。



Note: ① $P=0.011$, ② $P=0.001$, ③ $P=0.004$, vs CON group at the same time.

图1 小鼠建模过程中体质量动态变化趋势

Fig 1 Dynamic change trend of body mass in mice during modeling



Note: A. FST. B. TST. C. SPT. ① $P=0.000$, ② $P=0.007$, ③ $P=0.030$, vs CON group.

图2 小鼠建模完成后行为学指标变化

Fig 2 Behavioral changes after mice modeling

2.3 小鼠脏器系数比较

对各脏器系数进行组间比较发现, 各组小鼠胆囊系数差异具有统计学意义 ($P<0.05$): 与 CON 组相比, CUMS 组和 DEX 组胆囊系数均显著上升 (图 3A)。

2.4 外周血中 FGF15 和 CCK 的含量

ELISA 结果显示, FGF15 在 DEX 组和 CUMS 组中呈相反趋势, CUMS 组较 CON 组显著下降 ($P<0.05$), DEX 组则显著上升 ($P<0.05$); CCK 含量在 CUMS 组中显著上

2.2 行为学指标

2.2.1 FST 建模后各组小鼠不动时间差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2A): 与 CON 组相比, CUMS 组和 DEX 组不动时间均显著延长。

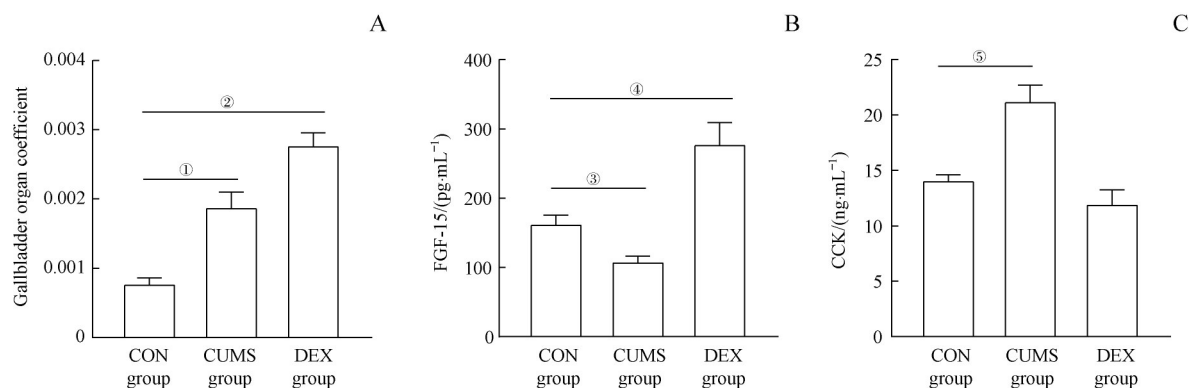
2.2.2 TST 建模后各组小鼠不动时间差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2B): 与 CON 组相比, CUMS 组和 DEX 组不动时间均显著延长。

2.2.3 SPT 建模后各组小鼠糖水消耗百分比差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2C): 与 CON 相比, CUMS 组和 DEX 组糖水消耗百分比均降低。

升 ($P<0.01$), DEX 组与 CON 组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 3B、C)。

2.5 海马中 BDNF、TGR5、FXR 蛋白的表达水平

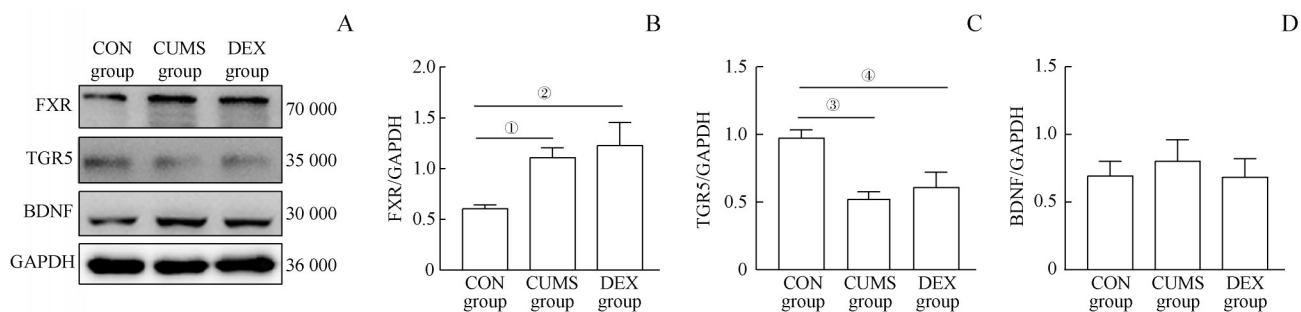
各组小鼠海马组织中 BDNF 蛋白表达水平差异不具有统计学意义, FXR 和 TGR5 蛋白表达水平差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与 CON 组相比, CUMS 组和 DEX 组 FXR 蛋白表达水平显著上升, TGR5 蛋白表达水平显著下降 (均 $P<0.05$) (图 4)。



Note: A. Gallbladder organ coefficient. B. FGF15 content. C. CCK content. ① $P=0.003$, ② $P=0.000$, ③ $P=0.041$, ④ $P=0.018$, ⑤ $P=0.001$, vs CON group.

图3 各组小鼠胆囊系数及血清中 FGF15 和 CCK 的含量

Fig 3 Gallbladder organ coefficient and serum levels of FGF-15 and CCK in each group



Note: A. The expression of FXR, TGR5 and BDNF verified by Western blotting. B–D. Quantitation of FXR (B), TGR5 (C) and BDNF (D). ① $P=0.012$, ② $P=0.005$, ③ $P=0.001$, ④ $P=0.003$, vs CON group.

图4 小鼠建模后海马内相关蛋白水平的变化

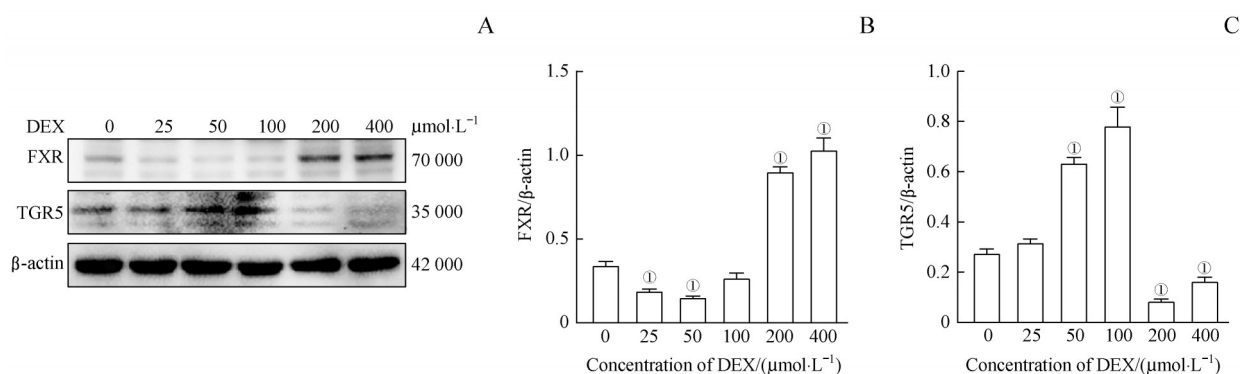
Fig4 Changes in related protein levels in mouse hippocampus after modeling

2.6 C6细胞中FXR、TGR5蛋白的表达水平

为研究HPA轴功能异常对星形胶质细胞功能影响,我们采用胶质细胞系C6细胞建立体外模型。C6细胞使用25、50、100、200和400 $\mu\text{mol/L}$ DEX孵育3 d后,200 $\mu\text{mol/L}$ 和400 $\mu\text{mol/L}$ DEX组与对照组相比,FXR蛋白表达水平显著升高(均 $P<0.05$),TGR5蛋白表达水平显著下降(均 $P<0.05$,图5)。

2.7 C6细胞分泌神经营养因子的水平

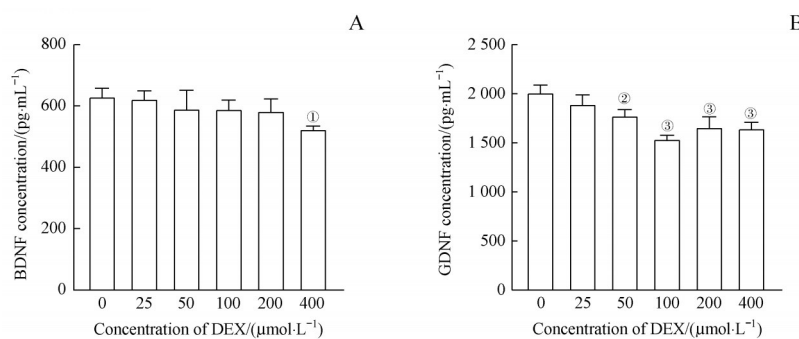
C6细胞使用25、50、100、200和400 $\mu\text{mol/L}$ 的DEX孵育3 d后,400 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比,BDNF含量在培养基中显著下降($P<0.05$,图6A),50、100、200和400 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比GDNF含量显著下降(均 $P<0.05$,图6B)。鉴于该结果,后续研究采用200 $\mu\text{mol/L}$ DEX作为体外模型的造模剂量。



Note: A. The expression of FXR and TGR5 verified by Western blotting. B/C. Quantitation of FXR (B) and TGR5 (C). ① $P=0.000$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ group.

图5 C6细胞使用DEX处理后相关蛋白水平的变化

Fig 5 Changes in related protein levels in C6 cells treated with DEX



Note: A/B. The concentrations of BDNF (A) and GDNF (B) in the culture medium. ① $P=0.025$, ② $P=0.018$, ③ $P=0.000$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$ group.

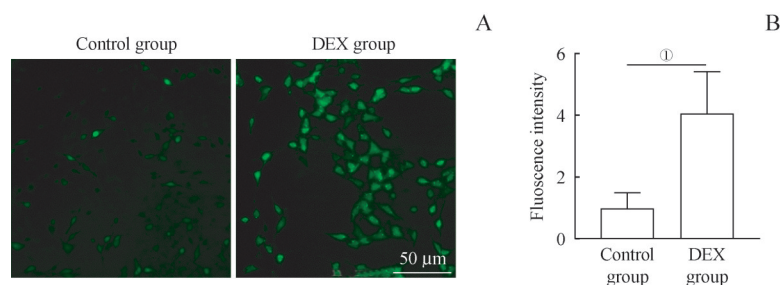
图6 C6细胞使用DEX处理后培养基中神经营养因子的含量变化

Fig 6 Changes of BDNF and GDNF concentrations in the cell culture medium in C6 cells treated with DEX

2.8 C6细胞内的ROS水平

C6细胞在使用200 $\mu\text{mol/L}$ 的DEX孵育3 d后,与对照组相比,荧光强度显著增强,ROS水平显著升高;经量化

检测,200 $\mu\text{mol/L}$ DEX组的荧光强度约是对照组的4倍,差异具有统计学意义($P<0.05$)。由此可见,C6细胞经200 $\mu\text{mol/L}$ DEX孵育后,ROS水平显著升高(图7)。



Note: A. ROS assay in C6 cells after exposure to $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEX for 3 d. B. Quantitative analysis of the images obtained from fluorescence microscopy. ^① $P=0.000$, vs control group.

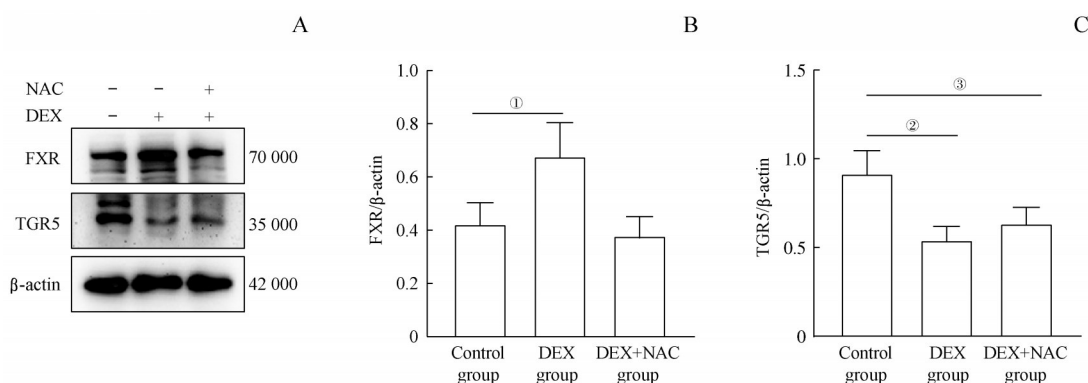
图7 C6细胞加入DEX孵育3 d后细胞内ROS水平的变化

Fig7 Change of ROS level in the C6 cells treated with DEX for 3 d

2.9 NAC对DEX造成C6细胞FXR和TGR5改变的影响

在 $200 \mu\text{mol/L}$ DEX 处理前, 加入 5 mmol/L NAC 预处理 2 h, Western blotting 检测细胞内 FXR 和 TGR5 表达

水平。由图8可以看出, DEX+NAC组C6细胞内FXR含量较DEX组显著降低 ($P<0.05$); TGR5含量略上升 ($P>0.05$), 但差异无统计学意义。



Note: A. The expression of FXR and TGR5 verified by Western blotting. B/C. Quantitation of FXR (B) and TGR5 (C). ^① $P=0.038$, ^② $P=0.009$, ^③ $P=0.003$, vs Control group.

图8 NAC预处理2 h对DEX处理3 d的C6细胞内FEX和TGR5表达变化的影响

Fig 8 Effect of NAC pretreatment for 2 h on the expression of FEX and TGR5 in the C6 cells treated with DEX for 3 d

3 讨论

目前MDD动物造模方法有皮质类固醇喂养、CUMS以及获得性无助等。由于青春期是女性MDD的高发年龄段^[11], 因此本研究采用4周龄雌性小鼠用于本次试验。

CUMS模型是目前经典动物抑郁模型, 具有与MDD相似的一系列神经生物学效应, 包括HPA轴异常、海马神经再生障碍、神经递质水平改变等^[12-13]; 但由于各实验室CUMS应激顺序和方式不同, 其糖水偏好实验往往重复性较差^[14]。另外, 高水平皮质类固醇激素长期暴露可模拟慢性应激^[15], 其HPA轴的功能障碍与MDD患者相似, 伴随快感消失; 且由于类固醇激素可以精确定量, 其在快感缺失的糖水偏好实验中重复性较好。本研究利用2种雌性抑郁动物模型, 探索抑郁行为与外周胆汁酸受体后信号和中枢胆汁酸相关受体变化的关系。

与CON组相比, 2种雌性动物模型均显示出了明显的快感消失、悬尾及游泳不动时间延长, 提示2种抑郁动物模型成功。动物解剖过程中发现抑郁模型动物胆囊体

积增大, 与CON组相比胆囊系数差异有统计学意义。为此, 我们检测了外周血清中FGF15和CCK。胆汁酸激活小肠上皮细胞内FXR后, 可产生FGF15, 负反馈性抑制肝脏胆酸从头合成途径。

肝脏细胞内FXR激活后可促进肝脏胆酸排泄, 抑制胆酸肠肝循环。以往文献显示: DEX低剂量可促进胆汁酸转运和排出, 高剂量可通过非FXR依赖方式抑制胆汁酸合成及转运调控作用^[16-17], 因此DEX可用于治疗胆汁淤积性肝炎。与CON组相比, DEX组血清FGF15含量显著增加, 伴随有CCK下降趋势, 提示DEX促进胆汁酸转运入盲肠, 刺激肠道FXR/FGF15通路, 抑制肝脏胆汁酸从头合成途径; 由于CCK水平的降低, 胆囊收缩能力下降, 可能与本研究中胆囊系数增加有关。与CON组相比, CUMS组血清FGF15含量显著减少(提示肝脏分泌进入肠道的胆汁酸含量减少), CUMS组CCK显著增加; 虽然CCK可收缩胆囊, 但高水平的CCK也可抑制胃肠道蠕动, 造成动物食量下降, 体质量减轻, 其结果符合中医“肝失疏泄, 横逆犯胃, 胃失和降”的描述。因此,

2组不同抑郁模型可能与外周原发性和继发性的胆汁酸代谢异常有关,但外周胆汁酸代谢异常如何引起中枢神经系统改变还需进一步研究。

与CON组相比,雌性抑郁小鼠海马区TGR5蛋白显著减少,伴随FXR显著增加。TGR5是胆汁酸的细胞膜受体,胆汁酸激动外周TGR5/胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 途径,在调节糖脂代谢、胆汁代谢以及抑制核转录因子 κ b (nuclear factor- κ b, NF- κ b) 激活中发挥重要作用^[18]; TGR5在脑卒中动物模型中显示出神经保护作用^[6],而在肝性脑病动物模型的神经胶质细胞中的表达量显著减少^[19],为此我们认为抑郁动物模型海马区TGR5表达减少可能增强了MDD模型中海马对慢性应激造成损伤的敏感性。脑内通过慢病毒高表达FXR蛋白可诱导大鼠产生显著抑郁行为伴随脑内BDNF蛋白量降低^[20],而敲除脑内FXR可阻断CUMS对大鼠行为学和BDNF的影响;我们首次在2种不同抑郁动物模型中显示脑内海马区胆汁酸膜受体减少,伴随胆汁酸核受体增加。此外,我们发现雌性啮齿类动物造模后脑内海马区BDNF表达水平未出现明显降低,该结果与以往报道^[21]相似,CUMS造成的海马区BDNF表达水平降低更

容易出现在雄性啮齿类动物中,可能与雌性动物青春期内分泌水平造成的脑保护作用有关。

我们使用DEX处理C6细胞研究HPA轴功能紊乱对脑内星形胶质细胞的影响。实验发现200 μ mol/L和400 μ mol/L DEX可增加FXR、减少TGR5的蛋白水平。以往文献显示:FXR高表达可加重淀粉样蛋白触发的神经细胞凋亡,敲减FXR可以翻转淀粉样蛋白触发的神经细胞凋亡^[22]。本研究证实高剂量DEX可同时造成星形胶质细胞内TGR5蛋白水平的降低和FXR蛋白水平的增高,伴随细胞内ROS水平激增,以及BDNF和GDNF显著下降,使用抗氧化剂NAC可显著逆转FXR蛋白水平,提示DEX造成的氧化应激在星形胶质细胞胆汁酸受体异常改变中发挥重要作用。我们推测DEX造成氧化应激水平升高与胆汁酸受体表达异常有关。

综上,本研究发现DEX和CUMS小鼠抑郁模型中小鼠海马区胆汁酸受体表达改变,该效应可能与HPA轴功能异常造成的星形胶质细胞内高氧化状态有关,NAC可部分逆转DEX造成的星形胶质细胞模型的胆汁酸受体异常。氧化应激造成星形胶质细胞胆汁酸受体改变的具体机制及抗氧化剂是否能够改善小鼠抑郁行为仍有待进一步探索。

参·考·文·献

- [1] Ionescu DF, Rosenbaum JF, Alpert JE. Pharmacological approaches to the challenge of treatment-resistant depression[J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2015, 17(2): 111-126.
- [2] Chen Y, Vasilenko A, Song X, et al. Estrogen and estrogen receptor- α -mediated transrepression of bile salt export pump[J]. *Mol Endocrinol*, 2015, 29(4): 613-626.
- [3] 李赛, 许筱颖, 张琳, 等. 逍遥丸联合心理疏导法治疗老年期阈下抑郁症60例[J]. *陕西中医*, 2017, 38(6): 769-770.
- [4] 钱虹. 解郁丸治疗更年期抑郁症64例疗效观察[J]. *国医论坛*, 2017(5): 42.
- [5] Cheng L, Huang C, Chen Z. Tauroursodeoxycholic acid ameliorates lipopolysaccharide-induced depression like behavior in mice via the inhibition of neuroinflammation and oxido-nitrosative stress[J]. *Pharmacology*, 2019, 103(1/2): 93-100.
- [6] Yanguas-Casás N, Barreda-Manso MA, Nieto-Sampedro M, et al. TUDCA: an agonist of the bile acid receptor GPBAR1/TGR5 with anti-inflammatory effects in microglial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(8): 2231-2245.
- [7] Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration[J]. *Ageing Res Rev*, 2005, 4(2): 141-194.
- [8] Labad J, Soria V, Salvat-Pujol N, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the comorbidity between obsessive-compulsive disorder and major depression[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, 93: 20-28.
- [9] Gasser BA, Kurz J, Senn W, et al. Stress-induced alterations of social behavior are reversible by antagonism of steroid hormones in C57/BL6 mice[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2021, 394(1): 127-135.
- [10] Mechawar N, Savitz J. Neuropathology of mood disorders: do we see the stigmata of inflammation?[J]. *Transl Psychiatry*, 2016, 6(11): e946.
- [11] Goodwill HL, Manzano-Nieves G, Gallo M, et al. Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(4): 711-720.
- [12] Li K, Yan L, Zhang Y, et al. Seahorse treatment improves depression-like behavior in mice exposed to CUMS through reducing inflammation/oxidants and restoring neurotransmitter and neurotrophin function[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112487.
- [13] Stetler C, Miller GE. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research[J]. *Psychosom Med*, 2011, 73(2): 114-126.
- [14] Planchez B, Surget A, Belzung C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges[J]. *J Neural Transm*, 2019, 126(11): 1383-1408.
- [15] 左玲俊, 徐俊冕. HPA轴功能与抑郁症[J]. *中国心理卫生杂志*, 2001, 15(2): 112-113, 109.
- [16] 周华金, 杨家昶, 张辉, 等. 糖皮质激素对鸡胚肝细胞脂肪和胆汁酸代谢相关基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(10): 4262-4268.
- [17] Rosales R, Romero MR, Vaquero J, et al. FXR-dependent and -independent interaction of glucocorticoids with the regulatory pathways involved in the control of bile acid handling by the liver[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(6): 829-838.
- [18] Holter MM, Chirikjian MK, Govani VN, et al. TGR5 signaling in hepatic metabolic health[J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2598.
- [19] McMillin M, Frampton G, Tobin R, et al. TGR5 signaling reduces neuroinflammation during hepatic encephalopathy[J]. *J Neurochem*, 2015, 135(3): 565-576.
- [20] Hu W, Wu J, Ye T, et al. Farnesoid X receptor-mediated cytoplasmic translocation of CRTC2 disrupts CREB-BDNF signaling in hippocampal CA1 and leads to the development of depression-like behaviors in mice[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2020, 23(10): 673-686.
- [21] Hayley S, Du L, Litteljohn D, et al. Gender and brain regions specific differences in brain derived neurotrophic factor protein levels of depressed individuals who died through suicide[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 600: 12-16.
- [22] Chen Q, Ma H, Guo X, et al. Farnesoid X receptor (FXR) aggravates amyloid- β -triggered apoptosis by modulating the cAMP-response element-binding protein (CREB)/brain-derived neurotrophic factor (BDNF) pathway *in vitro*[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 9335-9345.

[收稿日期] 2021-03-08

[本文编辑] 瞿麟平

