

丙酸睾酮对 CUMS 模型小鼠行为影响及机制研究

Effect of Testosterone Propionate on the Behavior of Rats with Chronic Unpredictable Mild Stress-induced and Its possible Mechanism

余敏 刘佳 周和雨 施博文 陈亚欣 韩丽*

Yu Min, Liu Jia, Zhou Heyu, Shi Bowen, Chen Yaxin, Han Li*

(长沙医学院 湖南长沙 410219)

(Changsha Medical University, Hunan, Changsha 410219)

摘要: 目的探究丙酸睾酮对 CUMS 模型小鼠行为影响及机制。方法: 8 周内雄性 KM 小鼠 36 只, 随机分为空白组, 抑郁模型组, 抑郁模型+补充丙酸睾酮组, 每组 12 只。除空白组外, 其余二组均采用慢性不可预见刺激构建抑郁模型, 连续 21d。补充 1mg/(Kg·d) TP 治疗 8d 后, 对各组小鼠进行行为学指标测定, 采用酶联免疫吸附法分析肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 (IL-6)。结果: 与对照组相比, 模型组小鼠表现出不动时间显著增加 ($p < 0.05$)、游泳时间显著减小, 模型小鼠潜伏时间与对照组相比有显著性增加 ($p < 0.05$)。糖水偏好降低 ($P < 0.01$); 血清促炎因子 IL-6 和 TNF- α 水平显著性增加; 而丙酸睾酮组表现出治疗作用, 能减轻慢性不可预见刺激造成的病理损伤。结论: 丙酸睾酮改善小鼠抑郁行为, 可能是通过降低炎症反应改善小鼠的抑郁症。

Abstract: To observe the effects and mechanism of testosterone propionate on behaviors. Method: Thirty-two KM rats were divided into three groups: control group, model group, TP group. Rats were exposed to alternative stress for 21 days to induce depression. After 8 days of treatment with 1mg/(Kg·d) TP supplementation, the changes of behaviors in rat were observed by deterring autonomous activity. Using the radio immunoassay to detect serum level of TNF- α and IL-6. Result: Compared with control group, swimming time and the consumption of sugar water decreased markedly in model group, which combined with a significant increase in the level of serum IL-6 and TNF- α ; Compared with model group, TP group show a significant recovery. Conclusion: Testosterone propionate improves depressive behavior in rats, possibly by reducing inflammatory response to improve depression in rats.

关键词: 丙酸睾酮; CUMS; 炎症因子

Keywords: Testosterone Propionate; CUMS; Inflammatory factors

抑郁症是一种常见的精神疾病, 以心境低落, 兴趣或愉快感缺乏, 活动减少为主要表现, 可伴有不同程度的认知和行为改变^[1]。世界卫生组织预计到 2030 年, 抑郁症将成为全球疾病负担的主要原因之一^[2]。传统的抗抑郁药对许多抑郁症患者的疗效不佳。因此, 需要寻找对抑郁症更加积极有效的治疗方法。通过对特定激素进行干预的方法, 在抑郁症的治疗方面有着潜在的应用前景。睾酮是一种神经活性类固醇激素, 对神经系统起重要影响作用^[3-5], 睾酮水平较高的男性抑郁症发病率较低^[6-7]。海马体是参与学习和记忆的关键中枢, 高密度的雄激素受体 (ARs) 存在于海马体中^[8]。但丙酸睾酮 (Testosterone Propionate, TP) 对抑郁症的具体作用机制还未见报道。本研究通过慢性不可预见刺激构建小鼠抑郁模型, 探究 TP 对抑郁模型小鼠的抗抑郁作用及可能的机制, 以期寻找抗抑郁药物的新靶点

1、材料与与方法

1.1 实验动物 36 只 8 周内雄性 KM 小鼠, 实验前一周, 大鼠可以自由获得食物和水来适应环境。小鼠均饲养于长沙医学院动物中心 SPF 环境, 饲养环境保持在温度 22℃ 左右, 相对湿度约 55% ~ 60%, 12 h 昼夜交替。本研究通过长沙医学院动物伦理委员会动物伦理审查, 实验过程中依照 3R 原则给予所有动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器 TNF- α 、IL-6 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒; 4%多聚甲醛; 磷酸缓冲液 (PBS); SDS-PAGE 转膜缓冲液 (10X); TBST 溶液; 1.5%戊巴比妥钠 (0.5mL/100g); 1%蔗糖溶液; 75%乙醇溶液; 1mg/kg 丙酸睾酮; 1mg/kg 金龙鱼花生油; 电子称; HH-W600 数显三用恒温水箱; 显微镜及摄像系统; DK-522 型电热恒温水浴锅; 旷场反应箱; 强迫游泳水缸; 高速离心机; 低温冷冻箱。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及抑郁模型构建 36 只雄性 KM 小鼠随机分为对照组, 抑郁模型组, 模型+丙酸睾酮组, 每组各 12 只。对照组正常喂养, 5 只一笼, 模型组, 一只一笼。模型构建方法参考中华中医药学会中药实验药理专业委员会抑郁症模型制备规范。冷水游泳 3 分钟, 热水浴 3 分钟, 夹尾 2min, 断食 24 小时, 断水 24 小时, 笼子倾斜 (45°) 12h, 通宵照明, 陌生异常物品刺激过夜, 湿垫料过夜, 冷环境 2h, 每天给予 2 种刺激, 同一种刺激一周内不重复两次以上并在笼子里单独饲养 21d, 共执行三周。从第 4 周开始, 观察糖水摄入量百分比。TP 组小鼠给予背部皮下注射 1mg/kg TP, 对照组、抑郁模型组小鼠于同样方法给予等量花生油。17:00 至 18:00 点间给

药, 与行为学检测的前两天开始给药, 直到行为学检测结束为止, 一共连续给药 8 天。

1.3.2 糖水偏好测试 (Sucrose preference test, SPT) 第一天, 两瓶均装 1% 的蔗糖溶液; 第二天一瓶蒸馏水, 一瓶 1% 的蔗糖溶液, 每隔四小时换一次水瓶位置, 第三天禁食禁水, 第四天上午, 给与 1% 的蔗糖溶液, 蒸馏水各一瓶, 2h 后取走所有水瓶并称量, 计算糖水偏好率 (1%糖水消耗量/总水消耗量), 在建模完成后再一次 SPT 测试。

1.3.3 旷场试验测试 (Open Field Test, OFT) 实验开始前将小鼠置于实验室 1h 适应环境, 观察时将单只小鼠置于 50cm*50cm*40cm 光洁敞箱中央, 在同一环境下引入新物品 (放入中心位置), 将小鼠放入测试箱, 由摄像机记录小鼠 6min 内的在中心位置的探索时间, 每次测试完成之后, 应用酒精擦除上只小鼠的气味和粪便。实验结束后用动物行为分析软件分析旷场视频。

1.3.4 悬尾试验 (Tail Suspension Test, TST) 实验开始前将小鼠尾部悬吊, 呈倒悬体位, 小鼠头部与悬尾箱底部保持一定的距离。总实验时间为 6min, 一名记录员记录 6min 内小鼠静止不动的时间。

1.3.5 强迫游泳实验测试 (Forced Swimming Test, FST) 第一天将小鼠放入高 50cm, 直径 20cm 的圆柱形桶中, 桶内装满水 6min, 温度适宜 (24℃)

第二天将小鼠放入高 50cm, 直径 20cm 的圆柱形桶中。由一名观察员记录小鼠 6min 内悬浮水中的不动时间。

1.3.6 ELISA 采用 ELISA 法, 取各组大鼠血清 96 孔板布局, 绘制标准曲线。标准浓度是以 1:3 稀释的最高标准。用标准曲线测定样品浓度。

1.4 统计学方法

本文所有对比实验数据用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较用独立的 t 检验, 多组间比较采用单因素分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 丙酸睾酮增加 CUMS 模型小鼠的糖水偏好度

与对照组相比, 模型组糖水偏好度显著性下降 ($p < 0.01$), 与模型组相比, TP 组的糖水偏好度显著性增加。(见图 1)

与对照组比, ** P < 0.01, **** P < 0.01, 与模型组比, **** P < 0.01

2.2 丙酸睾酮改善小鼠的抑郁样行为

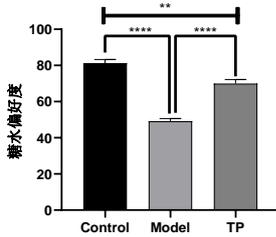


图1 糖水偏好实验

在皮下注射 TP48 h 后, 进行行为学检测, 结果显示: 与对照组相比, 抑郁模型组和 TP 组 OFT 的中心时间显著下降 ($p < 0.01$), 与模型组相比, TP 组 OFT 的中心时间显著增加 ($p < 0.01$, 见图 2); 与对照组相比, 模型组 FST 和 TST 的不动时间显著增加 ($p < 0.01$), 与模型组相比, TP 组 FST 和 TST 的不动时间显著下降 ($p < 0.01$, 见图 3,4), 对照组与 TP 组 FST 和 TST 的不动时间无显著性差异 (见图 3,4)。以上结果显示小鼠抑郁模型构建成功, 在 1mg/kg TP 的干预下, 上述现象发生逆转, TP 改善了小鼠的抑郁样行为。

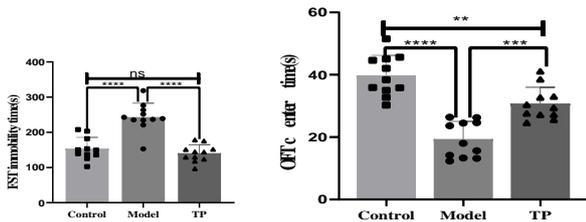


图2 旷场实验结果

图3 强迫游泳实验结果

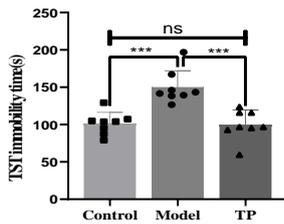


图4 悬尾试验结果

与对照组比, $** P < 0.01$, $****/***** P < 0.01$, ns 无显著性差异, 与模型组比, $****/***** P < 0.01$

2.3 丙酸睾酮降低外周血清炎症因子

与对照组相比, 模型组的炎症因子 IL-6、INF- α 水平显著增加 ($p < 0.01$), TP 组较模型组炎症因子 IL-6、INF- α 水平显著减低 ($p < 0.05$), 见图 5。

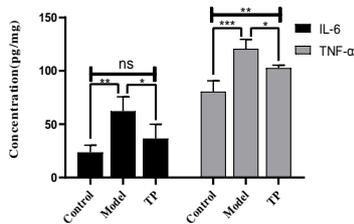


图5 炎症因子水平

与对照组比, $** P < 0.01$, $*** P < 0.01$, ns 无显著性差异, 与模型组比, $* P < 0.05$

3. 讨论

抑郁症是一种常见的慢性情绪障碍疾病, 抑郁症的发生受年龄, 遗传, 药物和社会环境等因素的影响, 其中应激性刺激是抑郁症的重要危险因素, 约 80% 抑郁症患者在遭受应激性刺激后发病^[9]。慢性不可预计刺激 (CUMS) 模型是一种国际上应用较为广泛的抑郁动物模型, 使动物产生一系列的抑郁症状, 如糖水偏好降低, 探索行为, 性行为, 自发活动出现减少^[10]

抑郁症状在临床性腺功能减退的男性中很常见, 随着男性年龄的增长, 雄激素水平下降。睾酮水平低的群体中, 非抑郁中年男性

发展为抑郁症的可能性更高^[11]。本研究中, 补充了睾酮的 TP 组与模型组相比抑郁样行为得到了较大的改善。

睾酮是主要的男性性腺激素, 也是维持男性整体生理功能的重要激素。研究表明, 性腺机能减退的男性睾酮缺乏增加了炎症水平生物标志物与心血管事件的风险^[12]。在前列腺平滑肌细胞中, 睾酮能通过抑制 TLR4 表达及其下游信号通路 NF- κ B 活化, 减少炎症因子释放^[13]。本研究中也证实了 TP 的抗炎作用, TP 可以显著降低炎症因子 IL-6、INF- α 水平, 说明 TP 可能通过降低炎症反应改善抑郁症状。

本研究验证了 TP 对 CUMS 模型小鼠抑郁样行为的改善作用, 为 TP 在临床抗抑郁治疗中提供了动物实验依据。在行为学实验的基础上, 我们通过蛋白质水平验证 TP 可能通过抑制外周血清炎症因子的激活发挥抗抑郁作用。

参考文献:

- [1]王睿;黄树明.抑郁症发病机制研究进展.医学研究生学报.2014年
- [2]徐睿.抑郁症的发病机制和中西医治疗进展[J].中华中医药杂志.2021,36(09):5436-5440.
- [3]Shan Dan, Zheng YuanDian, Froud Karen. Brain-Derived Neurotrophic Factor as a Clinical Biomarker in Predicting the Development of Post-Stroke Depression: A Review of Evidence.[J]. Cureus Journal of Medical Science, 2021, 13(6):e15662-e15662.
- [4]Zhang Xiao,Zhao Hongwei,Horney Jennifer,Johnson Natalie,Saad Farid,Haider Karim Sultan,Haider Ahmad,Xu Xiaohui. Testosterone Deficiency, Long-Term Testosterone Therapy, and Inflammation.[J]. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics,2021,26(6):
- [5]Jamid Reza Nakhai-Pour,Diederick E. Grobbee,Marielle H. Emmelot-Vonk,Michiel L. Bots,Harald J.J. Verhaar,Yvonne T. van der Schouw. Oral testosterone supplementation and chronic low-grade inflammation in elderly men: A 26-week randomized, placebo-controlled trial[J]. American Heart Journal,2007,154(6):
- [6]崔瑞.丙酸睾酮对老年大鼠运动相关行为及黑质纹-纹状体多巴胺能神经元的改善作用.河北医科大学.2012年(12)
- [7]闫文升.丙酸睾酮对线粒体电子传递链功能障碍的脑区特异性改善及其机制.河北医科大学.2016年(08)
- [8]Tully, Phillip, Baumeister, Harald, Martin, Sean, et al. Elucidating the Biological Mechanisms Linking Depressive Symptoms With Type 2 Diabetes in Men: The Longitudinal Effects of Inflammation, Microvascular Dysfunction, and Testosterone.Psychosom Med.2016;78(2):221-232. doi:10.1097/PSY.0000000000000263
- [9]地力下·司马义. HTR2A、TPH2 基因多态性与 2 型糖尿病合并抑郁症的相关性研究[D].新疆医科大学,2022.DOI:10.27433/d.cnki.gxyku.2022.001071.
- [10]徐春悦. 疏脑解郁汤对 CUMS 抑郁大鼠海马 CA3 区 BDNF/TrkB 通路的调控作用[D].山西省中医药研究院,2022.DOI:10.27286/d.cnki.gszy.2022.000021.
- [11]史常赛,宋佳璐,张卓等.雄激素对 SAMP8 小鼠学习记忆能力的影响[J].长治医学院学报.2019,33(03):161-164+168.
- [12]郑晓彬, et al."中老年男性血清睾酮与动脉粥样硬化的相关性研究." 中华男科学杂志 21.06(2015):536-540. doi:10.13263/j.cnki.nja.2015.06.011.
- [13]Leimgruber C, Quintar AA, Garc í a LN, et al. Testosterone abrogates TLR4 activation in prostate smooth muscle cells contributing to the preservation of a differentiated phenotype. J Cell Physiol, 2013, 228(7):1551-60

基金项目:湖南省大学生创新创业训练计划项目:湘教通[2021]47号-064

第一作者:余敏,2000.12,女,长沙医学院2019级临床医学本科在读生 主要研究方向:临床医学

通讯作者:韩丽 1982.1 女 汉 博士 毕业于中南大学湘雅医学院 长沙医学院副教授, 主要研究方向:神经系统与呼吸系统共患病研究