

雌激素缺乏对小鼠抑郁样行为和海马线粒体功能的影响

蒋梦若¹ 徐永君² 王立源³ 盛 慧³

摘要 目的 阐明雌激素缺乏对小鼠抑郁样行为和海马线粒体功能的影响,并探讨其中的联系。方法 将33只C57BL/6雌性小鼠随机分为假手术(Sham)组、去卵巢(Ovx)组、去卵巢+雌激素(Ovx+E₂)组,建立假手术和去卵巢模型,术后1周,Ovx+E₂组小鼠腹部皮下注射17 β -雌二醇(E₂)持续4周。另取48只C57BL/6雌性小鼠随机分为假手术(Sham)组、假手术+MnTBAP(Sham+Mn)组、去卵巢(Ovx)组、去卵巢+MnTBAP(Ovx+Mn)组,Sham+Mn组和Ovx+Mn组海马注射锰(III)(四苯甲酸)卟啉氯化物(MnTBAP)持续1周。利用糖水偏好实验和强迫游泳实验检测各组小鼠的抑郁样行为。提取小鼠的海马组织线粒体,研究各组动物海马线粒体ATP合成、线粒体膜电位和活性氧(ROS)生成情况。结果 与Sham组相比,Ovx组小鼠表现出抑郁样行为及海马线粒体功能异常,包括线粒体ATP合成减少、线粒体膜电位降低和ROS生成增多,雌激素替代治疗可缓解这种抑郁样行为并逆转海马线粒体功能的障碍;海马注射MnTBAP改善线粒体功能,可以缓解Ovx组小鼠的抑郁样行为。Ovx组小鼠出现糖水消耗百分比下降和强迫游泳不动时间延长及海马线粒体功能改变,包括线粒体ATP合成减少、线粒体膜电位降低和ROS生成增多,雌激素替代治疗可逆转这些行为以及海马线粒体功能的变化;海马注射MnTBAP增加Ovx组小鼠糖水消耗百分比并降低其强迫游泳不动时间。结论 雌激素缺乏通过损伤海马线粒体功能导致小鼠出现抑郁样行为。

关键词 线粒体;抑郁;雌激素

中图分类号 R 338.2; R 749.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)04-0672-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.025

抑郁症是一种以情绪障碍为主要特征的全球性心理疾病^[1]。研究^[2]表明,女性罹患抑郁症的风险远大于男性,尤其是在雌激素急剧减少的围产期和

围绝经期。雌激素如雌二醇(estradiol, E₂)等主要由卵巢分泌,参与生殖、情绪反应等生理过程^[3]。目前有关雌激素对抑郁情绪的影响及其内在机制并未完全阐明。有研究^[4]表明线粒体功能障碍参与了人抑郁症的发生。另有研究表明雌激素缺乏能影响动物的线粒体功能^[5]。然而,雌激素缺乏对动物抑郁样行为和脑线粒体功能的影响及两者之间的联系尚不明确。

该研究基于去卵巢(ovariectomy, Ovx)动物模型探讨雌激素缺乏对动物抑郁样行为的影响及其可能的线粒体相关机制,这将有助于进一步阐明女性雌激素缺乏所致抑郁症的发病机制,并为临床开展更有针对性的抗抑郁治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及实验材料

1.1.1 实验动物 81只6周龄雌性SPF级C57BL/6小鼠(18 \pm 1)g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物许可证编号:SCXK(沪)2013-0016。小鼠在动物房内适应性饲养1周,自由饮食。动物房内保持清洁卫生、通风良好,温度控制在20~24℃,相对湿度保持在40%~70%,光照周期为12h(7:00—19:00)。本研究通过海军军医大学科学研究伦理委员会审核,所有操作均遵循《实验动物管理条例》及《国家实验动物管理实施细则》。

1.1.2 主要试剂及仪器 组织线粒体分离试剂盒(货号:C3606)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒(货号:S0026)购自上海碧云天生物技术有限公司;线粒体膜电位检测试剂盒(货号:CS0390)和17 β -E2(货号:E2257)购自美国Sigma-Aldrich公司;MitoSOX(货号:M36008)购自美国Invitrogen公司;锰(III)(四苯甲酸)卟啉氯化物[manganese(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin chloride, MnTBAP, 货号:B5964]购自美国APEX-BIO公司;脑立体定位仪、微量进样泵购自深圳瑞沃德生命科技有限公司;多功能酶标仪(型号:Cytation 3)购自美国BioTek公司;强迫游泳设备购自上海软隆科技有限公司。

2023-02-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81671176)

作者单位:¹海军军医大学基础医学院学员一大队,上海 200433

² 联勤保障部队第九〇〇医院基础医学实验室,福州 350025

³ 海军军医大学基础医学院生理学教研室,上海 200433

作者简介:蒋梦若,女,本科;

盛 慧,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: huisheng7979@126.com

1.2 研究方法

1.2.1 小鼠模型的建立 首先,将33只C57BL/6雌性小鼠随机分为假手术(Sham)组、去卵巢(Ovx)组、去卵巢+雌激素(Ovx + E₂)组。给予Ovx组小鼠腹腔注射5%的水合氯醛0.2 ml麻醉后,剪开皮肤、肌肉层,找到卵巢并结扎卵巢与输卵管连接处后剪去卵巢并缝合。Sham组的手术操作同Ovx组,但不切除卵巢,而是切除卵巢周边与其大小相似的一块脂肪组织。Ovx术后1周,Ovx + E₂组小鼠皮下注射0.1 ml 30 μg/kg的17β-E₂溶液(以芝麻油配置),每日1次,持续4周。Sham组及Ovx组皮下注射等量芝麻油。然后,另取48只小鼠随机分为假手术(Sham)组、假手术+MnTBAP(Sham + Mn)组、去卵巢(Ovx)组、去卵巢+MnTBAP(Ovx + Mn)组,每组12只。建立假手术和去卵巢模型后,在Sham + Mn组和Ovx + Mn组小鼠海马脑区注射2 μl 0.5 μmol/kg的MnTBAP,每日1次,持续1周。对照组海马注射等量的生理盐水。

1.2.2 海马注射 用水合氯醛腹腔注射麻醉后,将小鼠固定于脑立体定位仪上,参照小鼠脑立体定位图谱向两侧海马CA1处(前囟点后2.3 mm,旁开2.0 mm,深度2.0 mm)植入一直径0.9 mm带有内芯的不锈钢套管,固定。术后给予2万单位青霉素钠肌注以防感染。恢复1周后,用微量注射器将2 μl药物或生理盐水缓慢通过埋植套管注入海马,匀速给药,10 min内注完,停针5 min防止药物外溢。

1.2.3 行为学实验

1.2.3.1 糖水偏好实验 将小鼠单只分笼饲养,鼠笼分别放置装有自来水及1%糖水的饮水瓶,以每日上午8:00为时间起点,每隔12 h将两只饮水瓶位置互换1次,持续1周。当日上午8:00正式实验,称量记录装满自来水及1%的糖水的饮水瓶,放置后当晚20:00将饮水瓶位置对调1次,次日上午8:00称量记录各饮水瓶的总质量。

1.2.3.2 强迫游泳实验 在高25 cm、直径18 cm的透明玻璃圆筒中完成,游泳时水温控制在22~26℃,控制水位使小鼠游泳时尾巴不能触碰到圆筒底部。记录前让小鼠预游60 s,正式实验时采用动物行为分析系统(Any-Maze)自动记录并分析5 min游泳过程中的不动时间。每次实验完成后清理并更换洁净水。

1.2.4 海马组织获取与检测 完成行为学实验后,断头处死小鼠,剪开颅骨,取出脑组织,暴露海马,PBS洗涤1次后,称重并记录。

在海马取出后1 h内,使用组织线粒体分离试剂盒提取海马中的线粒体。ATP检测试剂盒基于ATP生物发光法检测海马组织上清液及不同浓度ATP标准品中ATP的RLU值,来衡量海马组织中ATP的浓度。基于荧光探针JC-1能根据线粒体膜电位的高低选择性地聚集在线粒体内或线粒体外而发出不同颜色的荧光,采用线粒体膜电位检测试剂盒检测海马组织内线粒体的膜电位。将海马线粒体混悬液与MitoSOX工作液以一定比例在黑色96板中混匀,恒温孵育后测定活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成量。

1.3 统计学处理 采用SPSS 18.0软件进行统计学分析,所有数据均以均数±标准误表示。多组间比较先用Bartlett检验方差齐性,然后用单因素或双因素方差分析(One-way或Two-way ANOVA)进行统计,组内两两比较用方差分析后的Student-Newman-Keuls检验。以P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 去卵巢和雌激素替代治疗对小鼠抑郁样行为的影响 糖水偏好实验结果显示,与Sham组相比,Ovx组小鼠24 h糖水消耗百分比明显降低,而Ovx + E₂组相较于Ovx组糖水消耗百分比明显提高,差异有统计学意义(F = 27.006, P < 0.01),见图1A。强迫游泳实验结果显示,与Sham组相比,Ovx组小鼠在强迫游泳中不动时间明显升高,而Ovx + E₂组相较于Ovx组不动时间明显降低,差异有统计学意义(F = 15.451, P < 0.01),见图1B。

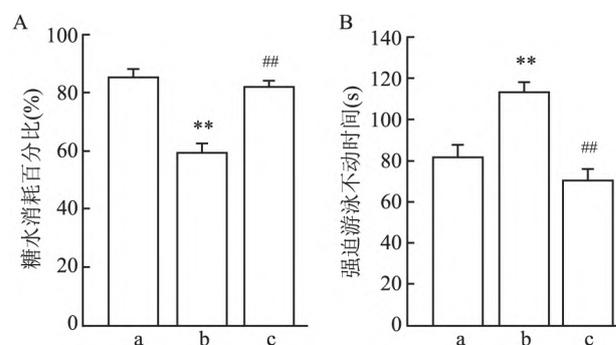


图1 去卵巢和雌激素替代治疗对小鼠抑郁样行为的影响

A: 糖水偏好实验; B: 强迫游泳实验; a: Sham组; b: Ovx组; c: Ovx + E₂组; 与Sham组比较: **P < 0.01; 与Ovx组比较: ##P < 0.01

2.2 去卵巢和雌激素替代治疗对小鼠海马线粒体功能的影响 海马组织线粒体功能检测结果显示,

与 Sham 组相比 ,Ovx 组小鼠海马线粒体 ATP 生成量减少 ($P < 0.01$)、线粒体膜电位降低 ($P < 0.01$) 以及线粒体 ROS 生成量增加 ($P < 0.01$); 与 Ovx 组比较 ,Ovx + E₂ 组小鼠海马线粒体 ATP 生成量增加 ($P < 0.01$)、线粒体膜电位升高 ($P < 0.01$) 和线粒体 ROS 生成量减少 ($P < 0.01$)。见图 2。

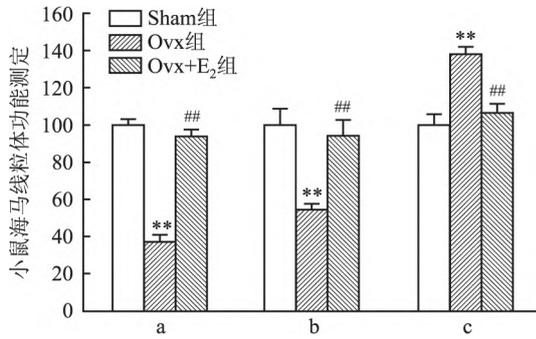


图2 去卵巢和雌激素替代治疗对小鼠海马线粒体功能的影响
a: 线粒体 ATP 相对生成量; b: 线粒体膜电位相对变化量; c: 线粒体 ROS 相对生成量; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Ovx 组比较: ## $P < 0.01$

2.3 海马注射 MnTBAP 改善 Ovx 小鼠抑郁样行为 糖水偏好实验结果显示 ,与 Ovx 组相比 ,Ovx + Mn 组小鼠 24 h 糖水消耗百分比明显提高 ($F = 15.971, P < 0.01$) ,但 Ovx + Mn 组与 Sham + Mn 组、Sham 组与 Sham + Mn 组之间的差异无统计学意义 ,见图 3A。强迫游泳实验结果显示 ,与 Ovx 组相比 ,Ovx + Mn 组小鼠在强迫游泳中不动时间明显降低 ($F = 7.119, P < 0.05$) ,但 Ovx + Mn 组与 Sham + Mn 组之间的差异无统计学意义 ,Sham 组与 Sham + Mn 组之间的差异无统计学意义 ,见图 3B。

3 讨论

雌激素是主要由卵巢生成的一类类固醇激素 ,它与机体生殖发育、情绪反应及神经保护等密切相关^[3]。流行病学调查显示 ,女性一生中罹患抑郁症的风险是男性的两倍 ,尤其是围产期和围绝经期 ,这与女性体内雌激素水平的变化密切相关^[6]。临床研究^[7]报道 ,雌激素能缓解围绝经期重度抑郁症患者的抑郁症状 ,且血中 E₂ 水平的升高与抑郁症状的改善呈正相关。动物研究^[8]显示 ,雌激素缺乏导致抑郁样行为增加 ,E₂ 替代治疗具有抗抑郁效应。该研究同样证实 ,Ovx 小鼠表现出糖水消耗百分比下降和强迫游泳不动时间延长等抑郁样行为 ,这均可被雌激素替代治疗所缓解。

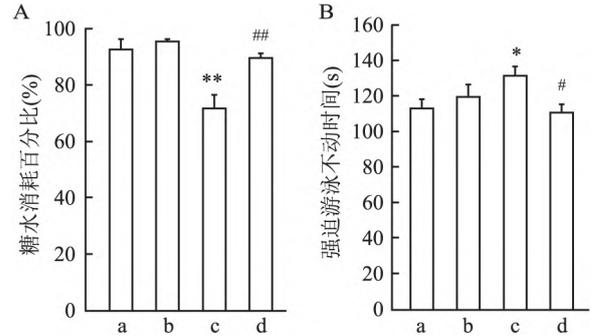


图3 MnTBAP 对假手术组和去卵巢组小鼠抑郁样行为的影响
A: 糖水偏好实验; B: 强迫游泳实验; a: Sham 组; b: Sham + Mn 组; c: Ovx 组; d: Ovx + Mn 组; 与 Sham 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Ovx 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

近年研究^[9]表明 ,线粒体功能障碍是抑郁症最主要的发病机制之一。线粒体功能异常主要表现为 ATP 合成减少、膜电位降低、氧化呼吸链功能异常等。线粒体是细胞合成 ATP 的主要场所 ,ATP 合成减少提示线粒体的能量代谢功能受损; 线粒体膜电位不仅参与了线粒体 ATP 的生物合成 ,也是诱导受损线粒体清除的关键因素; 线粒体 ROS 参与了细胞的氧化应激反应 ,与线粒体功能密切相关^[10]。有研究^[11-12]报道 ,重度抑郁症患者基底神经节中 β -ATP 的浓度显著降低、体内氧化应激水平显著升高; Zou et al^[13]发现慢性应激的抑郁小鼠前额皮质中线粒体膜电位的降低。这些研究提示线粒体功能异常与抑郁情绪密切相关。但其与雌激素缺乏所致抑郁间的关系 ,尚不明确。本研究证实 Ovx 小鼠海马中 ATP 水平减少、线粒体膜电位降低、ROS 蓄积 ,而雌激素替代治疗能逆转这些变化。这些研究表明雌激素缺乏导致海马线粒体功能障碍。

为明确线粒体功能异常是否介导了雌激素缺乏所致抑郁 ,本研究进一步研究了改善脑内线粒体功能能否影响 Ovx 小鼠的抑郁样行为。海马脑区与情绪反应密切相关 ,且高表达雌激素受体^[14] ,因此选取海马进行研究。在 Sham 和 Ovx 小鼠海马内注射了生理盐水或 MnTBAP ,观察各组间动物抑郁样行为的改变。研究表明 ,海马内注射 MnTBAP 能缓解 Ovx 小鼠的抑郁样行为 ,提示雌激素缺乏所致海马线粒体功能障碍参与了抑郁样行为的发生。

参考文献

[1] Malhi G S , Mann J J. Depression [J]. Lancet ,2018 ,392 (10161): 2299 - 312.

[2] Soares C N ,Shea A K. The midlife transition ,depression , and its

- clinical management [J]. *Obstet Gynecol Clin North Am* ,2021 , 48(1) : 215 –29.
- [3] Dwyer J B , Aftab A , Radhakrishnan R , et al. Hormonal treatments for major depressive disorder: state of the art [J]. *Am J Psychiatry* ,2020 ,177(8) : 686 –705.
- [4] Chung J K , Lee S Y , Park M , et al. Investigation of mitochondrial DNA copy number in patients with major depressive disorder [J]. *Psychiatry Res* 2019 ,282:112616.
- [5] Torres M J , Kew K A , Ryan T E , et al. 17 β -Estradiol directly lowers mitochondrial membrane microviscosity and improves bioenergetic function in skeletal muscle [J]. *Cell Metab* 2018 ,27(1) : 167 –79. e7.
- [6] Seney M L , Glausier J , Sibille E. Large-scale transcriptomics studies provide insight into sex differences in depression [J]. *Biol Psychiatry* ,2022 ,91(1) : 14 –24.
- [7] Joffe H , Petrillo L F , Koukopoulos A , et al. Increased estradiol and improved sleep , but not hot flashes , predict enhanced mood during the menopausal transition [J]. *J Clin Endocrinol Metab* , 2011 ,96(7) : E1044 –54.
- [8] Zhang W Y , Guo Y J , Wang K Y , et al. Neuroprotective effects of vitamin D and 17 β -estradiol against ovariectomy-induced neuroinflammation and depressive-like state: role of the AMPK/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol* ,2020 ,86: 106734.
- [9] Giménez-palomo A , Dodd S , Anmella G , et al. The role of mitochondria in mood disorders: from physiology to pathophysiology and to treatment [J]. *Front Psychiatry* ,2021 ,12: 546801.
- [10] Vaváková M , Ďuračková Z , Trebatická J. Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression disorder [J]. *Oxid Med Cell Longev* 2015 ,2015: 898393.
- [11] Moore C M , Christensen J D , Lafer B , et al. Lower levels of nucleoside triphosphate in the basal ganglia of depressed subjects: a phosphorous-31 magnetic resonance spectroscopy study [J]. *Am J Psychiatry* ,1997 ,154(1) : 116 –8.
- [12] Mathew B , Srinivasan K , Johnson P , et al. Elevated levels of glutathionyl haemoglobin as an oxidative stress marker in patients with major depressive disorder [J]. *Indian J Med Res* 2019 ,149(4) : 497 –502.
- [13] Zou T , Zhang J , Liu Y , et al. Antidepressant-like effect of geniposide in mice exposed to a chronic mild stress involves the microRNA-298-5p-Mediated Nox1 [J]. *Front Mol Neurosci* ,2020 ,13: 131.
- [14] Liu F , Day M , Muñoz L C , et al. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory [J]. *Nat Neurosci* 2008 ,11(3) : 334 –43.

Effects of estrogen deficiency on depression-like behavior and hippocampal mitochondrial function in mice

Jiang Mengruo¹ , Xu Yongjun² , Wang Liyuan³ , Sheng Hui³

(¹1th Battalion Student Brigade , College of Basic Medicine Naval Medical University , Shanghai 200433;

²Basic Medical Laboratory , The 900th Hospital of Joint Logistics Support Force , PLA , Fuzhou 350025;

³Dept of Physiology , College of Basic Medicine Naval Medical University , Shanghai 200433)

Abstract Objective To investigate the effects of estrogen deficiency on depression-like behavior and mitochondrial function in hippocampus , and to study the underlying mechanisms. **Methods** The female adult C57BL/6 mice were randomly assigned to Sham group , Ovx group and Ovx + E₂ group. On the 7th day after operation , Ovx + E₂ group was subcutaneously injected with 17 β -estradiol (E₂) for 4 weeks. Then another 48 female adult C57BL/6 mice were randomly divided into Sham group , Sham + MnTBAP group , Ovx group and Ovx + MnTBAP group. After operation for one week , MnTBAP was injected into the hippocampus of mice in Sham + MnTBAP group and Ovx + MnTBAP group. The depression-like behaviors of the mice were monitored by sucrose preference test and forced swimming test. Then the mice were decapitated , and the hippocampus samples were collected. Mitochondria of hippocampus were isolated using mitochondria fractionation kit. The concentrations of adenosine triphosphate (ATP) , reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential were determined , respectively. **Results** Compared with Sham mice , Ovx showed a decrease in the percentage of sucrose consumption , an increase in immobility time and the alterations of hippocampal mitochondrial function , which were reversed by estrogen treatment. Intrahippocampal injection of MnTBAP significantly increased the percentage of sucrose consumption and decreased immobility time in Ovx mice. **Conclusion** Hippocampal mitochondrial dysfunction contributes to estrogen deficiency-induced depression-like behaviors.

Key words mitochondria; depression; estrogens