## 研究论文

# 海马微量注射神经肽 Y 通过抑制一氧化氮合酶改善大鼠抑郁 样行为

廉婷,安书成\*

陕西师范大学生命科学学院,西安 710062

摘要:本文旨在探讨在慢性应激性抑郁发生过程中海马神经肽Y (neuropeptide Y, NPY)和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的关系。建立慢性不可预见性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)抑郁模型,大鼠海马定位并分别微量 注射 NPY、NPY-Y1 受体阻断剂 GR231118 和 NOS 抑制剂 *L*-NAME,测量、计算动物体重变化并通过糖水偏爱测试、旷 场和强迫游泳实验等方法检测大鼠行为,免疫组织化学方法检测海马内 NPY、神经元型 NOS (neuronal nitric oxide synthase, iNOS)和诱导型 NOS (inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达。结果显示,与对照组相比,CUMS 组大鼠表现出明显 的抑郁样行为变化,且海马 NPY 表达下降、NOS 表达显著升高;海马微量注射 NPY 明显改善应激引起的抑郁样行为表现,并降低海马 NOS 表达;用 GR231118 选择性阻断 NPY-Y1 受体后,大鼠的行为学表现能力下降,海马 NOS 表达升高;而 CUMS 以及 GR231118 所导致的行为学表现能力下降的现象均可被海马微量注射 *L*-NAME 所反转。以上结果表明,CUMS 引起海马 NPY 表达下降,NOS 表达升高,NO 过量产生,导致抑郁发生;而 NPY 通过 NPY-Y1 受体抑制 NOS 的 过量表达是 NPY 抗抑郁的一个重要途径。

关键词:抑郁; 海马;慢性不可预见性应激;神经肽Y; 一氧化氮合酶 中图分类号:Q189; R749.4

# Antidepressant effect of microinjection of neuropeptide Y into the hippocampus is mediated by decreased expression of nitric oxide synthase

LIAN Ting, AN Shu-Cheng\*

College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract:** Accumulating evidence indicates an important role of hippocampal dendrite atrophy in the development of depression, while neuropeptide Y (NPY) participates in hippocampal dendrite growth. The present study was aimed to investigate the relationship between NPY and nitric oxide synthase (NOS) in chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced depression. CUMS-induced depression model was established in Sprague-Dawley rats. Intrahippocampal microinjections of NPY, NPY-Y1 receptor antagonist GR231118 and non-specific NOS inhibitor *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (*L*-NAME) were respectively adopted by rat brain stereotaxic coordinates. The behavioral observations were conducted by sucrose consumption test, open field test and forced swimming test. The expressions of NPY, neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in hippocampus were detected by immunohistochemistry. The results showed that, compared with the control group, rats receiving CUMS for 21 d or intrahippocampal microinjection of GR231118 showed a significant reduction in body weight and depression-like behavior, which included reductions in sucrose preference, locomotor activity, rearing and grooming in open field test, and increased duration of immobility in forced swimming test. Moreover, the expression of NPY significantly decreased (P<0.01), while the expressions of nNOS and iNOS increased obviously in the hippocampal dentate gyrus (DG) and CA3 regions (P<0.01). Intrahippocampal microinjections of nNOS and iNOS

Received 2010-02-02 Accepted 2010-04-16

This work was supported by Fundamental Research Funds for the Central Universities (No.GK200901011) and grant from Natural Science Foundation of Shaanxi Province, China (No. 2006C240).

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-29-85310261; Fax: +86-29-85310261; E-mail: shuchengan@snnu.edu.cn

in the hippocampal DG and CA3 regions (P<0.01). Intrahippocampal microinjections of GR231118 reduced behavioral ability of the rats dramatically and significantly increased the expressions of hippocampal nNOS and iNOS (P<0.01). Intrahippocampal microinjections of *L*-NAME suppressed the depression-like behavioral changes induced by CUMS or intrahippocampal microinjection of GR231118. In conclusion, reduced expression of NPY and increased expression of NOS in hippocampus may make significant contributions to CUMS-induced depression. These results suggest that the antidepressant function of NPY associates with down-regulation of NOS expression in hippocampus, possibly mediated via NPY-Y1 receptor.

Key words: depression; hippocampus; chronic unpredictable mild stress; neuropeptide Y; nitric oxide synthase

随着社会竞争和压力的增大,抑郁征发病率不断攀升,有关抑郁征发生的原因、机制及防治策略的研究已受到广泛关注<sup>[1]</sup>。以往的研究提出抑郁征的发生与慢性应激有关<sup>[2-5]</sup>,但应激是如何引起抑郁的发生还不清楚。最近的研究表明,海马是应激激素作用的靶部位,海马不仅是应激反应的高位调节中枢,更是受应激累及最严重的区域,与应激性抑郁的发生密切相关<sup>[3, 6-8]</sup>。

有关抑郁征的发生机制,先后出现了单胺类递 质失调学说<sup>[9]</sup>、神经可塑性变化学说<sup>[10]</sup>等。近年 来,人们更加关注谷氨酸及其受体、神经肽与神经 营养因子在抑郁发生中的作用<sup>[11]</sup>。随着研究的逐步 深入,神经肽Y (neuropeptide Y, NPY)因其在情感 及行为应激反应中发挥重要功能而引起普遍关注, 一般认为抑郁与 NPY 有着密切的联系。

Heilig等<sup>[12]</sup>研究发现,单相难治性抑郁征患者脑 脊液中 NPY 水平较正常人明显降低。有研究显示, 海马微量注射NPY可明显改善慢性不可预见性温和 应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)诱发的 抑郁样行为表现<sup>[13]</sup>。CUMS可能使谷氨酸过量释 放, N- 甲基 -D- 天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体过度激活,抑制 NPY 表达,导致抑郁 发生<sup>[14]</sup>。有文献报道,NPY 具有保护海马神经元 的作用,可通过Y1型受体的介导促进海马神经元 细胞的增殖<sup>[15, 16]</sup>。Vezzani等<sup>[17]</sup>认为由海马的新突触 处释放的NPY通过原有的或新形成的NPY-Y1受体 再兴奋颗粒细胞,从而促进了苔藓纤维的出芽及突 触重建。药理学的研究证实,应用 NPY-Y1 受体激 动剂可以模拟 NPY 抗应激性情绪反应,而 NPY-Y1 受体阻滞剂可以阻断 NPY 的这一作用<sup>[18]</sup>,海马注射 NPY-Y1 受体阻断剂能诱发抑郁样行为表现<sup>[14]</sup>。这 些研究结果提示NPY通过NPY-Y1受体参与神经生 长、维持、突触可塑性和应激情绪反应的调节。

NO 作为一种非典型的神经信使,近年来备受 关注。有研究表明,NO 参与精神性疾病如抑郁、 双向情感障碍、精神分裂等<sup>[19]</sup>。NOS 与抑郁发生 密切相关, NO 释放过量导致海马神经元损伤可能 在抑郁征发病机制中起重要作用<sup>[20, 21]</sup>。因此减少海 马NO的产生可能有利于突触的生长<sup>[22-26]</sup>。NO 合酶 (nitric oxide synthase, NOS)分为神经元型NOS (neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、内皮型 NOS (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和诱导型NOS (inducible nitric oxide synthase, iNOS)三种, 其中 nNOS和iNOS因产生过量的NO而具有神经毒作用<sup>[22]</sup>。 Wang 等<sup>[4]</sup>的研究结果显示,海马注射 iNOS 抑制剂 具有抗应激性抑郁的作用,脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)抗抑郁与其 对海马 nNOS 表达的抑制有关<sup>[27]</sup>。BDNF 和 Kalirin-7 可通过抑制 NOS 的过量表达起到神经保护作用<sup>[28-31]</sup>。 NMDA受体过度激活引起抑郁样行为与海马NOS表 达升高有关[32]。

以上所述表明,海马NPY可通过保护神经元起 到抗抑郁作用,而NMDA受体过度激活抑制NPY表 达而诱发抑郁;NO过多会损伤海马神经元引发抑 郁,NOS抑制剂具有抗抑郁作用;BDNF和kalirin-7 等抗抑郁和保护神经元均通过抑制NOS实现。因 此,我们推测NPY也可能通过抑制NOS发挥其抗 抑郁作用。为了证明这一猜想,本研究通过建立 CUMS抑郁动物模型,采用海马内微量注射NPY和 NPY-Y1受体阻断剂(GR231118)、NOS抑制剂(*N*nitro-*L*-arginine methyl ester,*L*-NAME)等,进行行 为学测试并结合免疫组织化学方法探讨慢性应激性 抑郁发生中海马NPY和NOS的关系,为抑郁发生 机制的研究提供新的思路。

# 1 材料和方法

**1.1 实验动物及分组** 健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 60 只(250~300 g,约 90 日龄),由陕西 省中医研究院实验动物中心提供。实验前饲养一周

以适应环境,自由进食饮水。动物随机分为6组: 正常对照(Control)组,正常饲养,每周海马微量注 射生理盐水一次,每次1 µL; CUMS 组, CUMS 模型大鼠,每周海马微量注射生理盐水一次,每次 1 μL; NPY+CUMS 组, CUMS 模型大鼠, 每周海 马微量注射 NPY 一次,每次注射 10 μg (体积 1 μL); GR231118组,每周海马微量注射GR231118一次, 每次注射 5 µg (体积 1 µL); L-NAME+CUMS 组, CUMS 模型大鼠,每周海马微量注射 L-NAME 一次, 每次注射 25 µg (体积 1 µL); L-NAME+GR231118 组, 每周海马联合注射一次,每次注射L-NAME (50 µg/µL) 与 GR231118 (10 ug/uL)各 0.5 uL。对照组、CUMS 组、NPY+CUMS 组和 GR231118 组,进行行为学测 试,并且采用免疫组织化学方法观察 NPY、nNOS 和 iNOS 在海马的表达情况。L-NAME+ CUMS 组和 L-NAME+GR231118 组只进行行为学实验。

1.2 实验材料 NPY和GR231118购于Anaspec 公司, *L*-NAME由Sigma公司提供;抗NPY抗体由 美国Connecticut大学神经科学实验室馈赠,抗 nNOS、抗 iNOS抗体为Santa cruz公司产品;SABC 免疫组化染色试剂盒购于武汉博士德生物技术工程有 限公司,DAB试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有 限公司。脑立体定位仪(51600)为美国Stoelting公司产品。

# 1.3 方法

1.3.1 脑立体定位及海马微量注射 具体实验方 法参见余伶等<sup>[14]</sup>,大鼠麻醉后参照大鼠脑立体定位 图谱<sup>[33]</sup>,向海马处(AP -3.8 mm, RL +/-2.5 mm, H 2.5 mm)植入一带有内芯的不锈钢套管,妥善固定。手 术一周后海马微量注射药物。在实验的第1、7、 14、21天采用微量进样器通过埋植套管给海马微注 射药品。两种药联合注射时,注射时间间隔 10 min。实验结束后,取脑行冠状切片鉴定套管定位 是否准确。

**1.3.2 CUMS模型的建立** 模型建立方法参见Luo 等<sup>[13]</sup>,具体实验步骤见余伶等<sup>[14]</sup>。动物孤养并进行应激,9种刺激随机安排到21d内,每天一种,每种刺激出现2~3次,同种刺激不能连续出现,使动物不能预料刺激的发生。对照组、GR231118组及 *L*-NAME+GR231118组动物群养且不予任何刺激, 正常进食饮水。各组分别在第1、7、14、21天称量动物体重并在海马微量注射相应的药物,建模 21 d 后,进行行为学实验。

**1.4 体重测量** 建模第1、7、14、21天,微量注射药物及应激前称量大鼠的体重,计算体重变化百分率。体重变化百分率=(第1、7、14、21天的体重-第1天的体重)/第1天的体重×100%。

1.5 行为学测试

**1.5.1 糖水测试** 具体实验方法参见余伶等<sup>[14]</sup>, 训练动物适应含糖饮水后,进行动物的糖水消耗实 验,最后糖水测试并计算动物的糖水偏好率。糖 水偏好率=糖水消耗/总液体消耗×100%<sup>[34]</sup>。

**1.5.2 旷场实验** 具体实验方法参见余伶等<sup>[14]</sup>, 观察指标有:(1)水平穿行方格数(locomotion): 三 爪以上跨入邻格或者重心落入;(2)竖直站立次数 (rearing):前肢离开水平地面1cm以上的次数;(3)修 饰次数(grooming):理毛或者洗脸的次数,分别计 算水平运动得分、垂直运动得分和修饰得分。

**1.5.3 强迫游泳实验** 具体实验方法参见余伶等<sup>[14]</sup>,大鼠游泳进行6 min,前2 min不作记录, 而观察记录后4 min内的漂浮不动时间,用鼠漂浮 不动时间作为判断抑郁严重程度的指标。

1.6 免疫组织化学实验 行为测试后第二天进行 免疫组织化学实验,具体实验步骤参照文献<sup>[14]</sup>。 1.7 数据处理 参照大鼠脑立体定位图谱<sup>[33]</sup>,从 每只鼠的切片中随机各取10张。每张切片同一脑 区在光镜下随机选取10个视野,用目镜测微网格 在面积为5×5 mm<sup>2</sup>的网格中数出阳性细胞数目。数 据用 mean±SEM 表示。采用 SPSS16.0软件进行数据 分析,组间差异检验用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较行 LSD 检验;体重变化率的 比较采用重复测量方差分析检验;以*P*<0.05 作为判 断差异显著性的标准,*P*<0.01 表示有极显著性差异。

#### 2 结果

#### 2.1 体重测量结果

各组大鼠体重变化率总体比较有显著差异(F<sub>5,47</sub>= 27.10, P<0.01)。对照组大鼠体重呈明显增长趋势; 与对照组相比,CUMS组和GR231118组大鼠的体 重增长率明显降低,差异具有极显著性(P<0.01); NPY+CUMS组体重增长率与CUMS组比较明显升 高,差异具有显著性(P<0.05); L-NAME+CUMS组 体重与CUMS组相比明显升高,差异具有极显著性 (P<0.01),但仍显著低于对照组(P<0.05); L-



图 1. 各组大鼠体重变化

Fig. 1. Effects of different treatments on body weight change. Rats were weighed on day 1, 7, 14, 21. The body weight change was calculated as percentages in body weight over that at day 1. Mean±SEM. Control: *n*=8; CUMS: *n*=10; NPY+CUMS: *n*=9; GR231118: *n*=9; *L*-NAME+CUMS: *n*=7; *L*-NAME + GR231118: *n*=10.

NAME+GR231118组大鼠的的体重增长率显著高于GR231118组和CUMS组(P<0.01)(图1)。

# 2.2 行为学测试结果

# 2.2.1 糖水偏好测试

大鼠的糖水偏好率各组间差异具有统计学意义 (*F*<sub>5,47</sub>=18.97, *P*<0.01)。CUMS 组大鼠的糖水偏好率 显著低于对照组(*P*<0.01);与对照组比较,GR231118 组大鼠糖水偏好率有明显下降(*P*<0.01);NPY+CUMS 组和 *L*-NAME+CUMS 组大鼠的糖水偏好率相对 CUMS 组明显提高(*P*<0.01),而与对照组相比无显 著性差异;*L*-NAME + GR231118 组大鼠的糖水偏 好率明显高于CUMS 组和 GR231118 组 (*P*<0.01)(图 2)。

#### 2.2.2 旷场实验

各组大鼠在旷场实验中的水平得分、垂直得分 和修饰得分总体比较有显著差异(水平得分: *F*<sub>5,47</sub>= 13.30, *P* <0.01; 垂直得分: *F*<sub>5,47</sub>=7.87, *P*<0.01; 修饰得分: *F*<sub>5,47</sub>=12.61, *P*<0.01)。21 天慢性应激 后, CUMS 组的水平运动得分和修饰得分均明显低 于对照组(*P*<0.01),垂直运动得分也低于对照组(*P*< 0.05);与 CUMS 组相比,NPY+CUMS 组水平运动得 分、垂直运动得分和修饰得分均显著增加(*P*<0.01, *P*<0.05, *P*<0.01),而与对照组相比均无显著性差



图 2. 各组大鼠糖水偏好率

Fig. 2. Effects of different treatments on sucrose preference. Mean±SEM. Control: n=8; CUMS: n=10; NPY+CUMS: n=9; GR231118: n=9; *L*-NAME+CUMS: n=7; *L*-NAME+GR231118: n=10. \*\*P<0.01 vs Control; ##P<0.01 vs CUMS; &&P<0.01 vs GR231118.

异; GR231118 组各项得分与对照组比较均极显著 性降低(P<0.01); L-NAME+CUMS 组的水平运动得 分、垂直运动得分和修饰得分均显著高于 CUMS 组 (P<0.05, P<0.05, P<0.01); L-NAME+GR231118 组 水平运动得分、垂直运动得分和修饰得分均明显高 于 GR231118 组(P<0.01, P<0.01, P<0.05)(图 3)。

## 2.2.3 强迫游泳实验

各组大鼠在强迫游泳实验中的不动时间差异显 著(*F*<sub>5,47</sub>=7.13, *P*<0.01)。CUMS 组和 GR31118 组的 游泳不动时间均显著长于对照组(*P*<0.01); NPY+CUMS组大鼠的游泳不动时间与CUMS组相比 显著缩短(*P*<0.01),而对照组相比无明显差异;*L*-NAME+CUMS组的游泳不动时间显著短于CUMS组 (*P*<0.05),与对照组相比无显著差异;*L*-NAME+ GR231118组的游泳不动时间显著短于GR231118组 和 CUMS 组 (*P*<0.01)(图 4)。

#### 2.3 免疫组织化学结果

#### 2.3.1 NPY 在海马的表达

相对对照组,CUMS 组大鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)和 CA3 区 NPY 均显著降低,差异有统计 学意义(*F*<sub>1,11</sub>=13.63, *P*<0.01; *F*<sub>1,11</sub>=6.61, *P*<0.05)(图 5)。 **2.3.2 nNOS 在海马的表达** 

不同处理组的大鼠海马DG和CA3区nNOS表达



图 4. 各组大鼠在强迫游泳实验中的游泳不动时间 Fig. 4. Effects of different treatments on immobility time in the forced swimming tests. Mean±SEM. Control: *n*=8; CUMS: *n*=10; NPY+CUMS: *n*=9; GR231118: *n*=9; *L*-NAME+CUMS: *n*=7; *L*-NAME+GR231118: *n*=10. \*\**P*<0.01 *vs* control; \**P*<0.05, ##*P*<0.01 *vs* CUMS; &&*P*<0.01*vs* GR231118.



图 3. 各组大鼠在旷场实验中的行为表现

Fig. 3. Effects of different treatments on locomotion (*A*), rearing (*B*) and grooming (*C*) in the open field test. Mean±SEM. Control: n=8; CUMS: n=10; NPY+ CUMS: n=9; GR231118: n=9; *L*-NAME+CUMS: n=7; *L*-NAME+GR231118: n=10. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 *vs* Control; \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 *vs* CUMS; \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 *vs* GR231118.

之间存在统计学差异 (*F*<sub>3,23</sub>=14.84, *P*<0.01; *F*<sub>3,23</sub>=21.38, *P*<0.01)。与对照组相比, CUMS 组大鼠海马 DG 与 CA3 区 nNOS 的表达显著升高,差异具有极显著 性(*P*<0.01);与CUMS 组相比, NPY+CUMS 组海马 DG 与 CA3 区 nNOS 的表达均有极显著性下降(*P*<0.01),而与对照组相比无显著差异;GR231118 组 海马 DG 和 CA3 区 nNOS 表达与对照组相比均有极 显著升高(*P*<0.01)(图 6)。

### 2.3.3 iNOS 在海马的表达

不同处理组大鼠的海马DG与CA3区iNOS表达 之间存在统计学差异(*F*<sub>3,22</sub>=21.45, *P*<0.01; *F*<sub>3,22</sub>=6.83, *P*<0.01)。21天的CUMS后大鼠海马DG与CA3区 iNOS的表达与对照组相比均有极显著性升高(*P*< 0.01);与CUMS组相比,NPY+CUMS组大鼠海马DG 区 iNOS的表达显著下降(*P*<0.01),而CA3区iNOS 表达无明显下降;海马微量注射GR231118后,海 马DG和CA3区iNOS的表达与对照组相比均有极显 著性升高(*P*<0.01)(图7)。



图 5. 对照和 CUMS 组大鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)和 CA3 区中 NPY 的表达

Fig. 5. NPY expressions in hippocampal dentate gyrus (DG) and CA3 regions in rats of control and CUMS groups detected by immunohistochemistry method. *A*: Microphotographs of hippocampal slices. The arrows indicate the NPY-immuoreactive neurons. Scale bar, 100  $\mu$ m. *B*, *C* indicate the amounts of NPY-immuoreactive neurons in hippocampal DG and CA3 regions respectively. Mean±SEM. Control: *n*=8; CUMS: *n*=10. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 *vs* Control.



图 6.各组大鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)和CA3区中nNOS的表达

Fig. 6. nNOS expressions in hippocampal dentate gyrus (DG) and CA3 regions in rats of control, CUMS, NPY+CUMS and GR231118 groups detected by immunohistochemistry method. *A*: Microphotographs of hippocampal slices. The arrows indicate the nNOS-immuoreactive neurons. Scale bar, 100  $\mu$ m. *B*, *C* indicate the amounts of nNOS-immuoreactive neurons in hippocampal DG and CA3 regions respectively. Mean±SEM. Control: *n*=8; CUMS: *n*=10; NPY+CUMS: *n*=9; GR231118: *n*=9. \*\**P* <0.01 *vs* Control; ##*P*<0.01 *vs* CUMS.



图 7. 各组大鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)和CA3区中iNOS的表达

Fig. 7. iNOS expression in hippocampal dentate gyrus (DG) and CA3 regions in rats of control, CUMS, NPY+CUMS and GR231118 groups detected by immunohistochemistry method. A: Microphotographs of hippocampal slices. The arrows indicate the iNOS-immuoreactive neurons. Scale bar, 100  $\mu$ m. *B*, *C* indicate the amounts of iNOS-immuoreactive neurons in hippocampal DG and CA3 regions respectively. Mean±SEM. Control: *n*=8; CUMS: *n*=10; NPY+CUMS: *n*=9; GR231118: *n*=9. \*\**P*<0.01 *vs* Control; ##*P*<0.01 *vs* CUMS.

# 3 讨论

研究显示,应激性事件是人类抑郁征的明显促 发因素,其中慢性低强度的日常压力是引发抑郁的 主要原因<sup>[10]</sup>。CUMS 模型持久而稳定,是广泛应用 于啮齿类动物的应激抑郁模型。多数学者认为 CUMS 模型主要模拟了人类抑郁征的核心症状—— 对奖赏的反应性下降,即快感缺失<sup>[34, 35]</sup>,糖水偏好 程度为其衡量的有效指标<sup>[34]</sup>。本实验结果显示, CUMS 大鼠糖水偏好率显著下降,表明此时动物对 幸福事件反应能力的降低。有研究认为应激引起的 体重降低也是抑郁征的一个重要的症状<sup>[2, 36]</sup>。另 外有研究者发现CUMS能够减少旷场实验中大鼠水 平运动的活动度<sup>[4, 13, 32, 37]</sup>,它能够形象模拟人类生 理运动的迟缓<sup>[34]</sup>;大鼠在旷场实验中垂直运动和自 我修饰次数都降低<sup>[13, 14, 27, 38, 39]</sup>,表明"兴趣降 低",这些都是人类抑郁征的主要相关症状<sup>[10]</sup>。强 迫游泳实验普遍应用于啮齿动物抑郁严重程度的评价,是检测抗抑郁能力最广泛使用的快速、灵敏、有效的可视方法<sup>[40, 41]</sup>。抑郁动物在该测试中表现出的兴趣丧失、活动能力下降主要是通过不动时间来反映,CUMS 会显著增加强迫游泳实验中的漂浮不动时间<sup>[2, 13, 27, 42]</sup>,表明"行为的绝望"<sup>[43]</sup>,这也是人类抑郁征的一个主要症状。本研究中成功地建立了大鼠 CUMS 模型,并在模型上观察到大鼠体重增长缓慢,糖水偏爱率降低,旷场实验中大鼠的水平运动能力、垂直运动能力和自我修饰次数均降低,强迫游泳的漂浮不动时间显著延长。

海马属于边缘前脑,对情绪反应有重要的调控 作用<sup>[44]</sup>。最近研究表明抑郁征是控制心境相关的大 脑不同区域神经可塑性改变的结果,这些变化主要 表现在海马区域神经发生减少,海马锥体神经元萎 缩、神经胶质细胞密度减低,海马体积减小<sup>[10, 45, 46]</sup>。 NPY广泛分布于哺乳动物的中枢神经系统、周围神 经系统及其他器官中,而且含量丰富。长期的应激 会导致动物处于抑郁状态,这种情绪与NPY的表达 有密切联系。Heilig 等<sup>[12]</sup>研究发现,抑郁征患者中 枢 NPY 信号系统受损。有研究显示, NPY 在情感 及应激行为发生的机制中均发挥重要功能,给大鼠 锂盐28天或电休克(electroconvulsive shock, ECS)10 天后,发现海马DG区NPY的mRNA浓度显著增加<sup>[25]</sup>。 行为学研究发现, NPY 能够在多种应激动物模型中 发挥抗紧张和抗焦虑的效应, 药理学研究证实这些 效应是通过 NPY-Y1 受体介导的<sup>[18, 47]</sup>。Vezzani 等<sup>[17]</sup> 认为由海马新突触处释放的NPY通过原有的或新形 成的NPY-Y1受体再兴奋颗粒细胞,从而促进了苔 藓纤维的出芽及突触重建。本实验结果也显示 CUMS 诱发抑郁样行为产生,并引起海马 NPY 阳性 反应神经元数量显著下降,海马微量注射NPY 可明 显改善应激引起的抑郁样行为表现,特异性阻断 NPY-Y1受体,大鼠的行为学表现能力下降,这与 慢性应激所诱导的抑郁征相似,这些结果与以往的 报道一致<sup>[13,14]</sup>。说明应激性抑郁的发生与海马 NPY 降低有关,海马NPY 抗抑郁作用与NPY-Y1受体有 关。

据报道,海马内NO的过量产生可能是海马神 经元损伤的重要原因<sup>[20, 21]</sup>。海马神经元萎缩与抑郁 征的发生有关<sup>[24, 26]</sup>。Suzuki 等通过临床研究检测到 抑郁患者血浆 NO 水平明显升高<sup>[48]</sup>。nNOS 和 iNOS 产生过量的 NO 有神经毒作用,有研究发现慢性综 合应激可导致大脑边缘系统和海马NOS阳性神经元 增加,使NO过多,海马神经元受损<sup>[22]</sup>。新近的 研究还表明iNOS抑制剂可以改善CUMS引起的行为 学变化<sup>[4]</sup>,慢性应激引起NMDA受体过度激活,使 海马nNOS和iNOS表达显著升高,导致抑郁发生<sup>[32]</sup>。 研究结果显示, CUMS 大鼠海马nNOS 和iNOS 表达 显著升高,且NOS抑制剂L-NAME可以逆转CUMS 所引起的抑郁样行为变化。Wang 等<sup>[27]</sup>的研究也发 现,CUMS 及海马 BDNF 下降所引起的抑郁样行为 表现与海马 nNOS 升高密切相关。可见,海马 NOS 增多是引起抑郁发生的重要环节。为了探讨应激引 起抑郁发生中NPY/NPY-Y1受体与NO的关系,本 实验通过海马注射 NPY 及特异性 NPY-Y1 阻断剂, 在观察动物行为变化的同时,也对海马 nNOS 和 iNOS 的免疫阳性反应神经元数量进行了观察统计, 研究结果显示, CUMS 和海马注射特异性 NPY-Y1

阻断剂均能增加海马 nNOS、iNOS 的表达,并导 致抑郁样行为发生。而海马注射 NPY 可以改善 CUMS 所引起的抑郁样行为变化并降低海马 nNOS、 iNOS 的免疫阳性反应神经元数量,海马注射 NPY-Y1阻断剂引起的抑郁样行为变化可以被NOS阻断剂 反转。提示 NO 的过量释放可能在慢性应激性抑郁 征发病中起重要作用,而 NPY 可以通过 NPY-Y1受 体抑制 NOS。NPY 减少或 NPY-Y1 受体抑制,可 引起 NOS 高表达,使 NO 过量产生。

综上所述, CUMS 和海马注射 NPY-Y1 受体阻断剂均能引起抑郁样行为表现,同时,海马 NOS 表达升高。NPY 能抑制应激引起的 NOS 的高表达,有效地改善慢性应激引起的抑郁样行为表现。NOS 阻断剂可反转CUMS和海马注射NPY-Y1阻断剂引起的抑郁样行为变化。以上结果表明 CUMS 引起 NPY 表达降低,使 NOS 高表达、NO 过量产生,导致海马神经元损伤可能是慢性应激性抑郁发生的主要原因之一。而 NPY 系统可作为治疗应激相关的抑郁等精神疾病的药理学新靶标。

**致 谢**:感谢美国 Connecticut 大学神经科学系马新 明博士为本研究提供 NPY 抗体。

# 参 考 文 献

- Schechter LE, Ring RH, Beyer CE, Hughes ZA, Khawaja X, Malberg JE, Rosenzweig-Lipson S. Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies. NeuroRx 2005; 2(4): 590-611.
- 2 Wang MH (王明华), AN SC. The association of hippocampal glutamate with depression and the effects on gastric mobility. Chin J Appl Physiol (中国应用生理杂志) 2009; 25(2): 196-202 (Chinese, English abstract).
- 3 McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. Annu Rev Neurosci 1999; 22: 105-122.
- 4 Wang D, An SC, Zhang X. Prevention of chronic stressinduced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. Neurosci Lett 2008; 433(1): 59-64.
- 5 Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation.
  Psychopharmacology (Berl) 1997; 134(4): 319-329.
- 6 Nacher J, Pham K, Gil-Fernandez V, McEwen BS. Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex. Neuroscience 2004; 126(2): 503-509.
- 7 Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic

plasticity and lost memories. Nat Rev Neurosci 2002; 3(6): 453-462.

- 8 McEwen BS. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. Ann N Y Acad Sci 2001; 933: 265-277.
- 9 Stockmeier CA. Neurobiology of serotonin in depression and suicide. Ann N Y Acad Sci 1997; 836(1): 220-232.
- 10 Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. Neurosci Biobehav Rev 2005; 29(4-5): 525-546.
- 11 Ruhe HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. Mol Psychiatry 2007; 12(4): 331-359.
- 12 Heilig M, Zachrisson O, Thorsell A, Ehnvall A, Mottagui-Tabar S, Sjogren M, Asberg M, Ekman R, Wahlestedt C, Agren H. Decreased cerebrospinal fluid neuropeptide Y (NPY) in patients with treatment refractory unipolar major depression: preliminary evidence for association with preproNPY gene polymorphism. J Psychiatr Res 2004; 38(2): 113-121.
- 13 Luo DD, An SC, Zhang X. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. Brain Res Bull 2008; 77(1): 8-12.
- 14 Yu L (余伶), An SC, Lian T. Involvement of hipppocampal NMDA receptor and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. Acta Physiol Sin (生理学 报) 2010; 62(1): 14-22 (Chinese, English abstract).
- 15 Bjørnebekk A, Mathé AA, Brené S. The antidepressant effects of running and escitalopram are associated with levels of hippocampal NPY and Y1 receptor but not cell proliferation in a rat model of depression. Hippocampus 2009; DOI 10.1002/ hipo.20683.
- 16 Howell OW, Doyle K, Goodman JH, Scharfman HE, Herzog H, Pringle A, Beck-Sickinger AG, Gray WP. Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus. J Neurochem 2005; 93(3): 560-570.
- 17 Vezzani A, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Borroni A, Rizzi M, Samanin R, Maj R. Brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the limbic system of rats after acute seizures and during spontaneous convulsions: temporal evolution of changes as compared to neuropeptide Y. Neuroscience 1999; 90(4): 1445-1461.
- 18 Redrobe JP, Dumont Y, Herzog H, Quirion R. Neuropeptide Y (NPY) Y2 receptors mediate behaviour in two animal models of anxiety: evidence from Y2 receptor knockout mice. Behav Brain Res 2003; 141(2): 251-255.
- 19 Franke L, Schewe HJ, Uebelhack R, Muller-Oerlinghausen B. High platelet-serotonin uptake activity is associated with a rapid response in depressed patients treated with amitriptyline.

Neurosci Lett 2003; 345(2): 105-108.

- 20 Jahng JW, Choi SH, Kim DG, Houpt TA. Central Nomeganitro-*L*-arginine methyl ester does not influence lithiuminduced c-Fos and conditioned taste aversion. Yonsei Med J 2003; 44(5): 869-874.
- 21 Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Nitric oxide-mediated Ca<sup>++</sup>-influx in neuronal nuclei and cortical synaptosomes of normoxic and hypoxic newborn piglets. Neurosci Lett 2002; 318(2): 93-97.
- 22 Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. Am J Physiol Renal Physiol 2003; 285(2): F178-F190.
- 23 Trimm KR, Rehder V. Nitric oxide acts as a slow-down and search signal in developing neurites. Eur J Neurosci 2004; 19 (4): 809-818.
- 24 Welshhans K, Rehder V. Local activation of the nitric oxide/ cyclic guanosine monophosphate pathway in growth cones regulates filopodial length via protein kinase G, cyclic ADP ribose and intracellular Ca<sup>2+</sup> release. Eur J Neurosci 2005; 22 (12): 3006-3016.
- 25 Wortwein G, Husum H, Andersson W, Bolwig TG, Mathe AA. Effects of maternal separation on neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide in "depressed" Flinders Sensitive Line rats: a study of gene-environment interactions. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2006; 30(4): 684-693.
- 26 Yamada RX, Matsuki N, Ikegaya Y. Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate-mediated growth cone collapse of dentate granule cells. Neuroreport 2006; 17(6): 661-665.
- 27 Wang D, An SC. Role of brain-derived neurotrophic factor and neuronal nitric oxide synthase in stress-induced depression. Neural Regener Res 2008; 3(4): 384-389.
- 28 Wu CL, Hwang CS, Yang DI. Protective effects of brainderived neurotrophic factor against neurotoxicity of 3nitropropionic acid in rat cortical neurons. Neurotoxicology 2009; 30(4): 718-726.
- 29 Wu W, Li L, Yick LW, Chai H, Xie Y, Yang Y, Prevette DM, Oppenheim RW. GDNF and BDNF alter the expression of neuronal NOS, c-Jun, and p75 and prevent motoneuron death following spinal root avulsion in adult rats. J Neurotrauma 2003; 20(6): 603-612.
- 30 Takahata K, Katsuki H, Kume T, Nakata D, Ito K, Muraoka S, Yoneda F, Kashii S, Honda Y, Akaike A. Retinal neuronal death induced by intraocular administration of a nitric oxide donor and its rescue by neurotrophic factors in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44(4): 1760-1766.
- 31 Ratovitski EA, Alam MR, Quick RA, McMillan A, Bao C, Kozlovsky C, Hand TA, Johnson RC, Mains RE, Eipper BA,

生理学报 Acta Physiologica Sinica, June 25, 2010, 62(3): 237-246

Lowenstein CJ. Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. J Biol Chem 1999; 274(2):993-999.

- 32 Li QJ (李庆娇), An SC. Involvement of hippocampal NMDA receptor and nitric oxide synthase in depression induced by chronic unpredicted mild stress. Zool Res (动物学研究) 2009; 30(6): 653-661 (Chinese, English abstract).
- 33 Paxins G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic coordinates. Fourth Edition. San Diego: Academic Press, 1998.
- 34 Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. Psychopharmacology (Berl) 1987; 93(3): 358-364.
- 35 Naranjo CA, Tremblay LK, Busto UE. The role of the brain reward system in depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2001; 25(4): 781-823.
- 36 Matthews K, Forbes N, Reid IC. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. Physiol Behav 1995; 57(2): 241-248.
- 37 D'Aquila PS, Peana AT, Carboni V, Serra G. Different effect of desipramine on locomotor activity in quinpirole-treated rats after repeated restraint and chronic mild stress. J Psychopharmacol 2000; 14(4): 347-352.
- 38 D'Aquila PS, Peana AT, Carboni V, Serra G. Exploratory behaviour and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine. Eur J Pharmacol 2000; 399 (1): 43-47.
- 39 Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. Neurosci Biobehav Rev 1981; 5(2): 247-251.
- 40 Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modi-

fied rat forced swimming test. Neurosci Biobehav Rev 2005; 29(4-5): 547-569.

- 41 Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. Preclinical models: status of basic research in depression. Biol Psychiatry 2002; 52(6): 503-528.
- 42 Bielajew C, Konkle AT, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Hutchins AA, Santa-Maria Barbagallo L, Fouriezos G. Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. Stress 2003; 6(4): 269-280.
- 43 Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. Nat Rev Drug Discov 2005; 4(9): 775-790.
- 44 Sapolsky RM. Why stress is bad for your brain. Science 1996; 273(5276): 749-750.
- 45 Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingstrom A, Papp M, Wiborg O. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. Neuropsychopharmacology 2006; 31(11): 2395-2404.
- 46 Moghaddam B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. J Neurochem 1993; 60(5): 1650-1657.
- 47 Ishida H, Shirayama Y, Iwata M, Katayama S, Yamamoto A, Kawahara R, Nakagome K. Infusion of neuropeptide Y into CA3 region of hippocampus produces antidepressant-like effect via Y1 receptor. Hippocampus 2007; 17(4): 271-280.
- 48 Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, Kanba S, Asai M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. J Affect Disord 2001; 63(1-3): 221-224.

#### 246