·基础研究·

丰富环境对抑郁大鼠行为学及海马CA1区脑源性神经营养因子、酪氨酸激酶受体B蛋白表达的影响*

陈 霄[1] 严隽陶[1,3] 尹 露[1] 安 云[1] 张 涛[1] 闫慧新[1] 孙萍萍[1,2]

摘要

目的:观察丰富环境对抑郁大鼠行为学、海马CA1区脑源性神经营养因子(BDNF)、酪氨酸激酶受体B(TrkB)蛋白表达的影响。

方法:实验大鼠30只,通过基线行为学测试剔除异常行为学指标的大鼠后,随机分为空白组、模型组及丰富环境组,每组8只。采用慢性温和不可预知应激建立抑郁模型,空白组及模型组不予干预,丰富环境组在应激21天后给予丰富环境干预。干预21天后采用糖水偏爱实验、旷场实验、强迫游泳实验检测大鼠抑郁样行为;HE染色、免疫组化染色法、免疫蛋白印迹法观察海马CA1区神经元形态及BDNF、TrkB蛋白表达的情况。

结果:慢性应激可导致大鼠体重增长缓慢,糖水偏爱率下降,旷场内运动总距离、中心区活动距离及停留时间降低,游泳不动时间增加($P<0.01$),海马CA1区BDNF、TrkB表达下降($P<0.05$),提示抑郁模型建立。与模型组相比,丰富环境组大鼠糖水偏爱率升高,游泳不动时间下降($P<0.01$),旷场内运动总距离、中心区活动距离及停留时间($P<0.05$)均增加,海马CA1区神经元数量减少、胞体固缩破碎明显改善,BDNF、TrkB含量明显升高($P<0.05$)。

结论:丰富环境能够改善慢性应激导致的抑郁样行为,其机制可能与促进海马区BDNF、TrkB的表达有关。

关键词 丰富环境;抑郁;神经可塑性;应激;海马;脑源性神经营养因子;酪氨酸激酶受体B

中图分类号:R749.4,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-01-0021-06

Effects of enriched environment on behavior and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B in hippocampal CA1 region of depressed rats/CHEN Xiao, YAN Juntao, YIN Lu, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(1): 21—26

Abstract

Objective: To observe the effects of enriched environment on behavior and protein expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase receptor B (TrkB) in hippocampal CA1 region of depressed rats.

Method: Thirty experimental rats were randomly divided into blank group, model group and enriched environment group after the rats with abnormal behavior indexes were eliminated through baseline behavior test, with 8 rats in each group. The depression model was established by chronic mild unpredictable stress. The blank group and model group did not being intervened, while the enriched environment group was given enriched environment intervention after 21 days of stress. After 21 days of intervention, the depression-like behavior of rats was detected by sugar water preference test, open field test and forced swimming test, and the morphology of neurons in hippocampal CA1 region and the expression of BDNF and TrkB protein were observed by HE staining, immunohistochemical staining and Western Blot.

Result: Chronic stress could lead to slow growth of body weight, decrease of sugar preference rate, decrease of total exercise distance, central activity distance and residence time in open field, and increase of swimming

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.01.005

*基金项目:SMC中国传统康复医学研究项目(SMC2013);上海市卫健委临床研究专项基金项目(20194Y0486)

1 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院,上海市,200437; 2 上海中医药大学康复医学院; 3 通讯作者

第一作者简介:陈霄,女,硕士,初级治疗师;收稿日期:2020-11-25

immobility time ($P<0.01$), the expression of BDNF and TrkB in the hippocampal CA1 region decreased ($P<0.05$). Those suggested the establishment of depression model. Compared with the model group, the sugar water preference rate of rats in the enriched environment group increased, the swimming immobility time decreased ($P<0.01$), and the total distance of exercise in the open field, the distance of movement in the central area and stay time increased ($P<0.05$), the number of neurons in the hippocampal CA1 region of the rats decreased, and the pyknosis and fragmentation of the cell bodies were significantly improved, and the contents of BDNF and TrkB were increased significantly ($P<0.05$).

Conclusion: Enriched environment can improve depression-like behavior induced by chronic stress, and its mechanism may be related to promoting the expression of BDNF and TrkB in hippocampus.

Author's address Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437

Key word environmental enrichment; depression; neuroplasticity; stress; hippocampus; brain-derived neurotrophic factor; tyrosine kinase receptor B

抑郁症是现代社会患病率较高的情感类精神障碍，发病机制尚不明确，涉及生物、心理、社会等多方面因素，而环境是其重要诱因[1]。研究表明慢性应激和负性生活事件会严重损害情绪、认知及记忆能力，导致海马神经可塑性功能障碍，神经再生受到抑制，神经营养因子表达下降，进而增大抑郁患病风险[2—4]。脑源性神经营养因子（brain derived neurotrophic factor，BDNF）是神经营养蛋白家族中重要一员，可结合并激活下游靶标蛋白TrkB，在神经元修复再生，可塑性增强方面扮演重要角色[5]。

丰富环境是通过环境改造而给予生物体更多感觉、身体及社会刺激，调节并恢复正常大脑结构和功能的一种潜在疗法[6]。在既往报道中，丰富环境干预多集中在脑部损伤疾病模型，而对抑郁模型研究相对较少[7]。因此本研究从诱发抑郁环境因素角度入手，采用慢性温和不可预知应激（chronic unpredictable mild stress，CUMS）抑郁模型，通过观察行为学改变，海马CA1区神经元形态和BDNF、TrkB蛋白的表达，以探究丰富环境抗抑郁作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30只5—6周龄SPF级雄性SD大鼠，体重（180±10）g，适应性饲养3天。通过基线行为学测试剔除异常行为学指标大鼠。称重编号后随机分为空白组8只和模型组20只。所有动物购自上海吉辉实验动物有限公司，合格证号为SCXK（沪）2017—0012，整个实验过程遵循上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物中心动物管理及使用的相关规定。

1.2 主要仪器及试剂

Smart3.0动物行为学视频采集与分析仪（西班牙Panlab公司）；显微镜（Nikon）；高速冷冻离心机（DRAGONLAB）；酶标仪（Rayto）；一抗BDNF（货号：AB108319）购自美国Abcam公司；一抗TrkB（货号：GB11295—2）、二抗HRP山羊抗兔（货号：GB23303）、正常兔血清（货号：G1209）、BSA（货号：G5001）、蛋白酶抑制剂（G2007）、RIPA裂解液（G2002）、BCA蛋白定量检测试剂盒（G2026）等均购自武汉Servicebio科技有限公司。

1.3 模型制备

动物模型建立参考文献略作改动，采用CUMS联合孤养制作，模型组大鼠单笼饲养并每天随机接受一种不同的应激刺激，共21天。具体方法如下：①束缚2h；②鼠笼拥挤4h；③4℃水游泳5min；④45℃水游泳5min；⑤禁食24h；⑥禁水24h；⑦垫料潮湿24h；⑧昼夜颠倒；⑨夹尾1min；⑩摇晃5min。其中，束缚和鼠笼拥挤刺激时间为晚18:00至22:00，游泳、夹尾、摇晃刺激时间为白天9:00至11:00或14:00至17:00。同一应激刺激不连续用3天，以免动物对刺激产生预见性。若模型组大鼠行为学指标与空白组相比差异有显著性意义，则认为造模成功。

1.4 饲养环境及分组

筛选造模成功大鼠16只，随机分为模型组8只和丰富环境组8只。空白组4只/笼和模型组1只/笼饲养于标准鼠笼中，丰富环境组8只/笼饲养于自制鼠笼中，干预时间为每晚8点至次日早8点，共12h，

其余时间饲养于标准鼠笼中1只/笼,共21天。

丰富环境装置参考文献自行设计,由透明亚克力塑料制成(100×60×45)cm^3的鼠笼,顶盖打有气孔,可自由开关。笼内装有不同颜色和形状的隧道、跑轮、爬梯、木屋、磨牙石、饼干、积木等,并放有充足的食物和水,大鼠可自由活动、玩耍互动。为保持新颖性,笼内布置每3天更换一次。标准鼠笼为(42×27×20)cm^3,自由进食进水。

1.5 行为学检测

1.5.1 糖水偏爱实验:在正式实验前进行糖水训练,第一天每笼外放两瓶1%糖水,第二天用纯水代替其中一瓶,中间交换位置,适应后,禁食禁水24h,随机放称重过的1%糖水和纯水各一瓶,12h后交换位置,24h后再次称重,计算糖水偏好值,公式为糖水偏爱率=糖水消耗量/(糖水+纯水消耗量)×100%。

1.5.2 旷场实验:每次实验均在上午进行,房间安静无干扰,敞箱(100×100×40)cm^3由黑色地板组成,上方放有摄像头,Smart3.0软件记录分析5min内大鼠旷场内行进总距离、中心区活动距离、中心区停留时间及运动轨迹,每次测量前用低浓度酒精清洗,避免残留气味干扰。

1.5.3 强迫游泳实验:将大鼠放入高40cm,直径20cm的透明玻璃桶中,水深约30cm,水温保持22—25℃。Smart3.0软件记录6min内大鼠游泳及漂浮时间,取后4min不动时间进行统计,以大鼠漂浮于水面,停止挣扎或只是做些小动作来保持头部在水面上为不动的判断标准。

1.6 海马CA1区HE染色

末次行为学测试结束后,腹腔注射麻醉,打开胸腔,暴露心脏,依次用生理盐水冲洗、4%多聚甲醛固定后断头取脑,固定、脱水、包埋、切片、染色、封片后,于显微镜下观察海马CA1区染色结果。

1.7 免疫组化

石蜡切片脱蜡入水后用抗原修复缓冲液进行抗原修复,以双氧水阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,滴加一抗、二抗进行孵育,用DAB显色液进行显色后复染细胞核,脱水封片后拍照。细胞阳性表达呈棕黄色或棕褐色斑块,以胞浆或胞膜染色为主。用Image Pro Plus软件计算海马CA1区BDNF、TrkB阳性细胞的平均光密度值,随机选取3张切片,在400倍光学显微镜下,取平均值进行统计分析。

1.8 免疫蛋白印迹法

采用Western Blot进行蛋白定量分析,检测BDNF、TrkB的蛋白水平。提取大鼠海马区蛋白,使用BCA蛋白浓度测定试剂盒对蛋白浓度进行测定,按照4∶1的比例加入5倍还原型蛋白上样缓冲液,沸水浴15min,保存备用,SDS—PAGE电泳后转膜,经脱脂牛奶封闭,加入一抗4℃孵育,TBST涮洗,加入二抗室温孵育,暗室曝光显影,采集条带灰度值得到灰度比值。

1.9 统计学分析

采用SPSS24.0软件进行统计分析,数据以均数±标准差表示,若数据满足正态性及方差齐性,组间比较采用独立样本t检验和单因素方差分析,不满足采用非参数检验,实验结果中以$P<0.05$表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 体重

在应激刺激期间,与空白组相比,模型组和丰富环境组大鼠随应激时间增加,体重增长愈发缓慢,差异有显著性意义($P<0.01$)。而随着应激结束,模型组和丰富环境组大鼠体重增长均有所好转,但丰富环境组大鼠体重低于模型组,差异有显著性意义($P<0.01$或$P<0.05$)。见表1。

2.2 糖水实验结果

与空白组相比,模型组大鼠的糖水偏爱率明显降低($P<0.01$)。而丰富环境能够提高大鼠糖水偏爱率,缓解大鼠快感缺乏症状,差异有显著性意义($P<0.01$)。见表2。

表1 各组大鼠不同时间点体重变化 (n=8,$\bar{x}\pm s$,g)

组别	应激			干预		
	第1周	第2周	第3周	第1周	第2周	第3周
空白组	334.3±16.5	390.5±21.9	438.5±22.2	487.0±29.8	496.0±29.2	502.8±30.2
模型组	300.0±19.1②	334.5±23.2②	358.0±24.5②	433.3±22.1②	462.1±15.4①	482.6±13.3
丰富环境组				382.0±36.4②④	412.1±44.1②④	436.9±44.8②③

注:与空白组比较,①$P<0.05$,②$P<0.01$;与模型组比较,③$P<0.05$,④$P<0.01$

2.3 旷场及强迫游泳实验结果

与空白组相比，模型组大鼠旷场内中心区活动距离、停留时间明显下降，运动总距离及强迫游泳不动时间也显著增加（$P<0.01$）。与模型组相比，丰富环境能够提高大鼠旷场内运动总距离、中心区活动距离及停留时间（$P<0.05$），游泳不动时间也显著下降（$P<0.01$），差异有显著性意义。见表3，图1。

2.4 海马CA1区HE染色

在光镜下，与空白组相比，模型组大鼠海马CA1区锥体神经元数量减少，排列不规则且松散，大量神经元胞体固缩破碎，体积变小，呈长条状，染色加深。而丰富环境组较模型组大鼠来说，海马CA1区细胞数量及形态有明显的改善，细胞排列及紧密程度均有所恢复。见图2。

2.5 BDNF、TrkB组化表达情况

与空白组相比，模型组大鼠在慢性应激后，海马CA1区BDNF、TrkB表达明显下降（$P<0.01$或$P<0.05$）。经环境丰富化的干预后，与模型组相比，丰富环境能够明显升高BDNF、TrkB的表达量，差异有显著性意义（$P<0.05$）。见表4，图3—4。

2.6 BDNF、TrkB免疫蛋白印迹表达情况

表2 丰富环境对大鼠糖水偏爱率的影响 （$\bar{x}\pm s$）

组别	鼠数	糖水偏爱率（%）
空白组	8	79.24±6.00
模型组	8	59.14±6.22②
丰富环境组	8	70.75±8.25①③

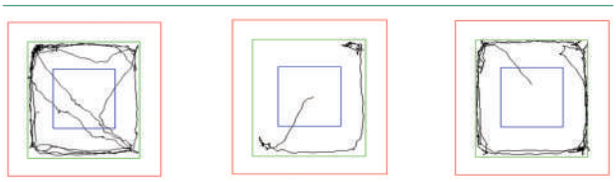
注：与空白组比较，①$P<0.05$，②$P<0.01$；与模型组比较，③$P<0.01$

表3 丰富环境对大鼠旷场及强迫游泳实验的影响（n=8，$\bar{x}\pm s$）

组别	旷场内行进总距离（cm）	中心区活动距离（cm）	中心区停留时间（s）	强迫游泳不动时间（s）
空白组	2569.14±301.03	58.77±44.52	6.48±4.27	16.00±26.79
模型组	1332.89±495.12①	3.66±1.60①	0.35±0.24①	77.38±26.44①
丰富环境组	1903.75±457.82①②	15.05±7.90②	2.10±0.79②	39.31±18.78③

注：与空白组比较，①$P<0.01$；与模型组比较，②$P<0.05$，③$P<0.01$

图1 各组大鼠旷场轨迹图



空白组　　模型组　　丰富环境组

表4 各组大鼠海马CA1区BDNF及TrkB平均光密度值 （$\bar{x}\pm s$）

组别	鼠数	BDNF（IOD值）	TrkB（IOD值）
空白组	8	0.0057±0.0027	0.0009±0.0006
模型组	8	0.0018±0.0015②	0.0003±0.0003①
丰富环境组	8	0.0039±0.0013③	0.0009±0.0007③

注：与空白组比较，①$P<0.05$，②$P<0.01$；与模型组比较，③$P<0.05$

Western Blot检测结果显示，与空白组相比，模型组大鼠海马CA1区BDNF、TrkB蛋白表达水平明显下降（$P<0.01$），与模型组相比，丰富环境组大鼠海马中BDNF、TrkB蛋白表达上调（$P<0.05$）。见图5。

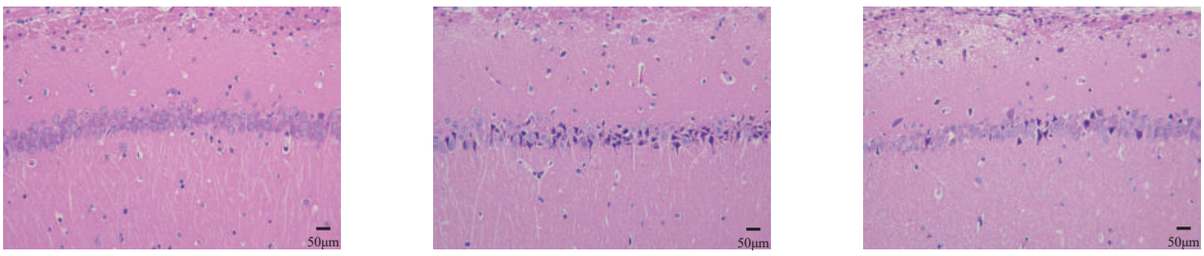
3 讨论

CUMS抑郁模型能够较好地模拟人们在日常生活中经历的负性事件如疼痛、恶劣环境、饮食失常、孤独等，与人类抑郁症发病的诱因高度相似，是目前公认、可靠且有效的啮齿动物抑郁模型[2]。本研究结果表明，模型组大鼠体重增长缓慢，糖水偏爱率下降，旷场内自主活动减少，探索欲望降低，对陌生环境的适应力下降，强迫游泳不动时间延长，提示抑郁模型复制成功。

丰富环境是联合了多种有益于生理和心理健康的刺激元素的一种非侵入性疗法，环境内可布置不同形状、大小、颜色、质地、气味的“玩具”，来增加环境的复杂性、新奇性和互动性。环境的丰富化能够提高动物的感官刺激，认知活动和运动锻炼水平，而这些感觉运动活动的增强进一步刺激中枢和外周神经元活动，从而引起大脑结构和功能的改变[8—9]。研究发现，积极的环境刺激和自发的运动行为能够促进神经发生及神经营养蛋白表达，增强大脑可塑性，提高生物体对外界环境变化的适应力，修复损伤的神经和细胞，进而调节情绪状态，改善认知能力[10]。本研究中，经过3周的丰富环境干预，大鼠的糖水消耗量增加，旷场内自主活动增多，游泳不动时间也明显下降，说明环境的丰富化能够改善大鼠的抑郁和焦虑样行为，调节不良情绪，产生抗抑郁效果。已有研究表明，运动能够有效缓解抑郁症状，减轻压力的负面影响[11]。在本实验中，因丰富环境内足够的空间和跑轮装置能提供充足的运动量，大鼠体重增长并不明显，这也侧面验证了自主锻炼的有益作用。

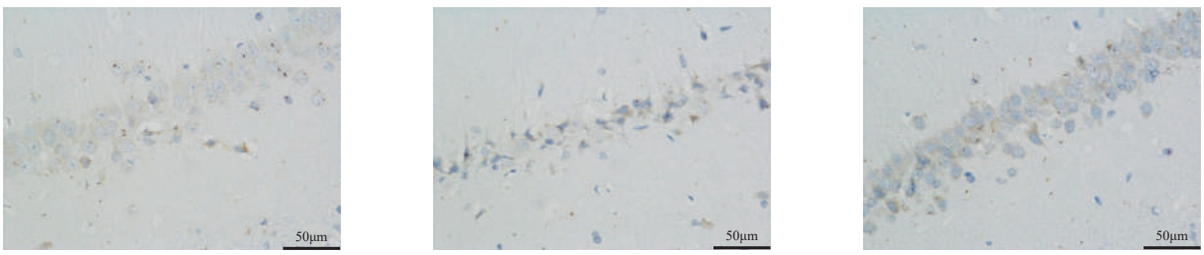
大脑适应外界各种刺激而做出的结构和功能的

图2 各组大鼠海马CA1区锥体神经元形态 (HE,×200)



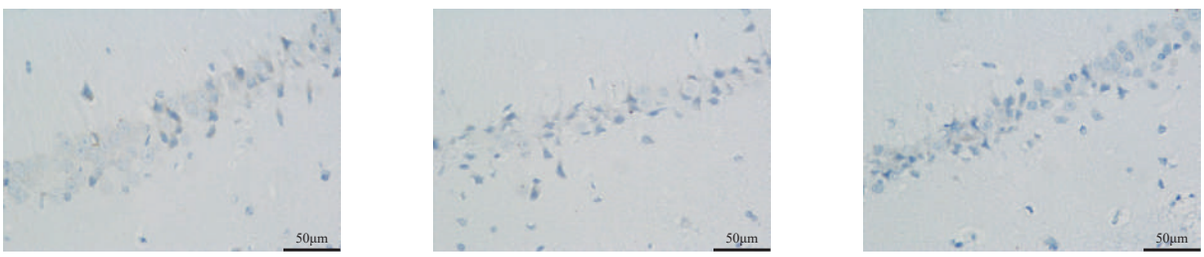
空白组 模型组 丰富环境组

图3 各组大鼠海马CA1区BDNF表达情况 (免疫组化染色,×400)



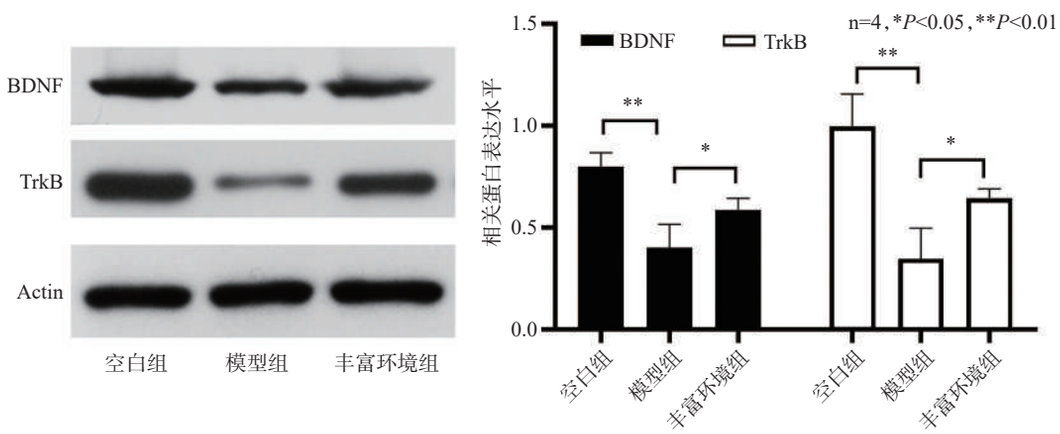
空白组 模型组 丰富环境组

图4 各组大鼠海马CA1区TrkB表达情况 (免疫组化染色,×400)



空白组 模型组 丰富环境组

图5 各组大鼠海马CA1区BDNF、TrkB表达情况



改变被称为神经可塑性，压力和负性应激导致的神经可塑性功能障碍是抑郁症发生的病理机制之一，其中海马可塑性的变化最常见[12]。当机体处于负性刺激中，下丘脑—垂体—肾上腺轴被过度激活，大量糖皮质激素释放，导致海马神经发生减少，神经元凋亡，神经营养因子水平下降[13]。海马头部主要是CA1区折叠而成，由排列密集的大锥体神经元构成，当出现压力、缺血缺氧等损伤时，CA1区最为敏感，可抑制其突触可塑性的表达，因而海马头部也是最易受损的区域[14]。研究发现，BDNF是一种参与多种学习记忆功能的神经营养蛋白，可结合其高亲和力受体TrkB，激活相关信号传导通路，调节神经递质释放，增强突触效力，同时BDNF可参与并调控情绪和认知神经环路中神经元的存活、生长和发育，修复神经损伤，改善抑郁症状，恢复大脑正常功能[15—17]。本研究结果表明，慢性应激能够降低海马CA1区BDNF、TrkB的表达水平，导致抑郁样行为出现，而丰富环境可改善应激导致的蛋白水平下降，促进BDNF、TrkB的表达，这说明新颖复杂的环境能够提高神经营养因子及其受体的表达，增强信号传导，修复脑损伤，加强神经保护作用，并且进一步推测丰富环境可能是通过调节BDNF、TrkB的表达来改善抑郁样行为的，这与Seong[18]的研究结果一致。然而BDNF是多条信号传导通路发挥作用的调控因子，本研究仅关注了BDNF及其受体的变化，丰富环境对BDNF所在相关信号通路的动态影响及其相互联系还未完全阐明，本课题组日后将在此基础上，进行更深入挖掘。

综上所述，丰富环境能够改善慢性应激所造成的大鼠抑郁样行为包括提高糖水偏爱率，增加旷场内自主活动，减少游泳不动时间，其机制可能是通过增强BDNF表达，并促使其与TrkB结合，激活相关信号传导通路，促进损伤区域细胞的修复再生，从而产生的抗抑郁作用。

参考文献

[1] Malhi GS, Mann JJ. Depression[J]. Lancet, 2018, 392(10161):2299—2312.

[2] Antoniuk S, Bijata M, Ponimaskin E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability[J]. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2019, 99:101—116.

[3] Liu W, Ge T, Leng Y, et al. The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex[J]. Neural Plasticity, 2017, 2017:6871089.

[4] Yang L, Zhao Y, Wang Y, et al. The effects of psychological stress on depression[J]. Current Neuropharmacology, 2015, 13(4):494—504.

[5] Björkholm C, Monteggia LM. BDNF - a key transducer of antidepressant effects[J]. Neuropharmacology, 2016, 102:72—79.

[6] Kempermann G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality[J]. Nature Reviews. Neuroscience, 2019, 20(4):235—245.

[7] Sampedro-Piquero P, Begega A. Environmental enrichment as a positive behavioral intervention across the lifespan[J]. Current Neuropharmacology, 2017, 15(4):459—470.

[8] Hannan AJ.Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity[J]. Neuropathology and Applied Neurobiology,2014,40(1):13—25.

[9] Coleman K, Novak MA. Environmental enrichment in the 21st century[J]. ILAR Journal, 2017, 58(2):295—307.

[10] Rogers J, Renoir T, Hannan AJ. Gene-environment interactions informing therapeutic approaches to cognitive and affective disorders[J]. Neuropharmacology, 2019, 145:37—48.

[11] Liang X, Tang J, Chao FL, et al. Exercise improves depressive symptoms by increasing the number of excitatory synapses in the hippocampus of CUS-Induced depression model rats[J]. Behavioural Brain Research, 2019, 374:112115.

[12] Uchida S, Yamagata H, Seki T, et al. Epigenetic mechanisms of major depression: Targeting neuronal plasticity[J]. Psychiatry and Clinical Neurosciences,2018,72(4):212—227.

[13] Kuhn M, Höger N, Feige B, et al. Fear extinction as a model for synaptic plasticity in major depressive disorder [J]. PloS One, 2014, 9(12):e115280.

[14] Alkadhi KA. Cellular and molecular differences between area CA1 and the dentate gyrus of the hippocampus[J]. Molecular Neurobiology, 2019, 56(9):6566—6580.

[15] Bothwell M. Recent advances in understanding context-dependent mechanisms controlling neurotrophin signaling and function[J]. F1000 Research, 2019, 8.

[16] Jiang C, Lin WJ, Salton SR. Role of a VGF/BDNF/TrkB autoregulatory feedback loop in rapid-acting antidepressant efficacy[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2019, 68(3):504—509.

[17] Phillips C. Brain-derived neurotrophic factor, depression, and physical activity: making the neuroplastic connection [J]. Neural Plasticity, 2017, 2017:7260130.

[18] Seong HH, Park JM, Kim YJ. Antidepressive effects of environmental enrichment in chronic stress-induced depression in rats[J]. Biological Research for Nursing, 2018, 20(1):40—48.