

· 论著 ·

慢性不可预见性温和应激致抑郁对大鼠肝脏转运多肽 mRNA 和蛋白表达的影响

刘萃萃¹, 肖志军¹, 陆赛花², 徐峰² (1. 上海健康医学院附属第六人民医院南院, 上海 201499; 2. 上海交通大学附属第六人民医院南院, 上海 201499)

[摘要] 目的 研究慢性不可预见性温和应激(chronic unpredicted mild stress, CUMS)致抑郁对大鼠肝脏有机阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptides, Oatps)mRNA 和蛋白表达的影响。方法 24 只雄性 SD 大鼠随机分为抑郁模型组和对照组, 模型组连续 8 周给予 CUMS, 对照组正常饲养。分别于造模前后称量体重、进行糖水偏好实验和旷场实验, 并测定大鼠血浆去甲肾上腺素和皮质酮水平以验证抑郁模型的建立。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)和蛋白质印迹法(Western blotting)分别检测大鼠肝脏 Oatp1a1、Oatp1a4 和 Oatp1b2 mRNA 和蛋白表达。结果 与对照组相比, 模型组大鼠体重减轻, 糖水偏好百分比下降, 垂直运动得分和水平运动得分减少, 血浆去甲肾上腺素和皮质酮水平升高, 肝脏 Oatp1a1、Oatp1a4 和 Oatp1b2 mRNA 和蛋白表达下降。结论 CUMS 致抑郁下调大鼠肝脏 Oatps mRNA 和蛋白表达。

[关键词] 慢性不可预见性温和应激; 抑郁; 有机阴离子转运多肽

[中图分类号] R966 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)02-0121-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.005

Effects of chronic unpredicted mild stress induced depression on mRNA and protein expression of liver organic anion transporting polypeptides in rats

LIU Cuicui¹, XIAO Zhijun¹, LU Saihua², XU Feng² (1. Shanghai University of Medicine & Health Sciences Affiliated Sixth People's Hospital South Campus, Shanghai 201499, China; 2. Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital South Campus, Shanghai 201499, China)

[Abstract] **Objective** To explore the impact of chronic unpredicted mild stress (CUMS) induced depression on mRNA and protein expression of liver organic anion transporting polypeptides (Oatps) in rats. **Methods** Twenty-four male SD rats were divided into depression group and control group. Rats in depression group were exposed CUMS for 8 weeks consecutively. Weight, open-field test, sucrose preference, plasma concentration of noradrenaline and corticosterone were assayed before and after model establishment to evaluate the depression. The mRNA and protein expression of liver Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2 were measured by RT-qPCR and Western blotting, respectively. **Results** In CUMS induced depression group, weight, sucrose consumption, vertical score and horizontal score were decreased while levels of corticosterone and norepinephrine were increased compared with control group. The mRNA and protein expression of liver Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2 were reduced compared with control group. **Conclusion** The mRNA and protein expression of liver Oatps in rats were regulated down by CUMS induced depression.

[Key words] chronic unpredicted mild stress; depression; organic anion transporting polypeptides

有机阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptides, 人类: OATPs, 啮齿类: Oatps)属溶质载体超家族, 是动物和人体内重要的跨膜转运

蛋白。OATPs/Oatps 调节细胞的多种内、外源性物质的摄取和转运, 其中内源性物质包括甲状腺激素、胆酸盐、类前列腺素等, 外源性物质包括临床常用的他汀类降脂药、格列奈类降糖药以及抗肿瘤药紫杉醇等^[1]。OATPs/Oatps 广泛分布于肠道、肝脏、肾脏、脑等组织, 其中人肝脏主要有 OATP1B1, OATP1B3 和 OATP2B1, 大鼠肝脏主要有 Oatp1a1, Oatp1a4, 和 Oatp1b2^[2]。

课题组前期研究发现, 与正常大鼠相比, 慢性不可预见性温和应激(chronic unpredicted mild stress, CUMS)致抑郁大鼠多种药物药动学水平发

[基金项目] 上海健康医学院种子基金项目(HMSF-16-22-023, SFP-18-20-15-002); 上海奉贤区科委科学技术发展基金(20161008); 上海市卫计委科研课题(20154Y0123)

[作者简介] 刘萃萃, 硕士, 研究方向: 分子药理学, Email: cuicliu@163.com

[通讯作者] 徐峰, 主任药师, 研究方向: 临床药理学, Tel: (021) 57422032, Email: andrewfxu@sina.com

生变化,同时伴随药物代谢酶(Cyp3a、Cyp2d6和Cyp2b1/2)和药物转运体(Ugt1a1和Ugt2b)mRNA和蛋白表达水平的改变^[3-5]。

为进一步阐明抑郁影响药物代谢的机制,本研究拟采用SD大鼠建立CUMS大鼠抑郁模型,研究CUMS致抑郁对大鼠肝脏转运体Oatp1a1、Oatp1a4和Oatp1b2 mRNA和蛋白表达影响。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体重(200±20)g,购于上海杰思捷实验动物有限公司,实验动物许可证:SCXK(沪)2013-0006。大鼠随机分为CUMS组和对照组,每组12只,在造模前饲养1周适应环境,室温(25±2)℃,相对湿度40%~70%,自由进食。所有动物实验过程均符合实验动物伦理学要求。

1.2 仪器与试剂

动物行为轨迹分析系统(北京众实迪创科技有限公司);皮质酮检测试剂盒、去甲肾上腺素检测试剂盒(CUSABIO公司);RNA抽提试剂盒、反转录试剂盒、SYBR定量试剂盒(Takara公司);Oatp1a4、Oatp1b2、GAPDH一抗(Santa Cruz Biotechnology公司);Oatp1a1一抗(Abcam公司);BCA蛋白定量试剂盒、5×SDS蛋白上样缓冲液、预染蛋白质分子量标准液、二抗(碧云天生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 建立CUMS致抑郁大鼠模型

参考文献^[5]方法并加以改进。抑郁模型组大鼠单笼饲养,连续8周给予以下随机应激:①热水应激(45℃,5min);②冷水应激(4℃,5min);③束缚1h;④笼子倾斜(45°,24h);⑤夹尾(距尾根1cm,1min);⑥噪音10min;⑦昼夜颠倒24h;⑧潮湿垫料24h;⑨水平摇晃10min。每天给予一种应激,每种应激至少被采用5次,同种应激不连续出现,使动物不可预见下一次应激的种类。应激过程中,模型组大鼠移到另一饲养间内单独应激(两房间环境基本一致),应激完成后送回原饲养间。对照组大鼠正常单笼饲养,不接受任何应激。造模前后称量每只大鼠体重。

2.2 旷场实验

旷场实验装置为高40cm,长和宽均为100cm的动物运动轨迹视频分析系统,通过分析软件将可运动的区域分为16宫格(25cm×25cm)。实验开始前,将大鼠置于中心方格内,记录大鼠5min内穿

过的格数为水平运动得分,站立或攀附箱壁次数为垂直运动得分,测定完毕后彻底清洁敞箱再进行下一只大鼠的实验。分别于造模前后进行旷场实验。

2.3 糖水偏好实验

分别于造模前后进行糖水偏好实验:第1天给予大鼠两瓶1%蔗糖水;第2天给予大鼠一瓶纯净水,一瓶1%蔗糖水;第3天大鼠禁食24h;第4天给予大鼠一瓶纯净水,一瓶1%蔗糖水,测量1h内饮用的液体量。

糖水偏好百分比(%)=糖水消耗量/(糖水消耗量+纯净水消耗量)×100%。

2.4 血浆去甲肾上腺素和皮质酮含量测定

造模前后,每只SD大鼠眼底静脉丛采血1.0ml,置于肝素钠浸泡过的1.5mlEP管中,3000×g转速离心5min后取上清血浆于-80℃保存备用。采用酶联免疫吸附法测定去甲肾上腺素和皮质酮含量。

2.5 RT-qPCR检测大鼠肝脏Oatp1a1、Oatp1a4和Oatp1b2 mRNA表达

大鼠断头处死后立即解剖,取出肝脏,用0.9%氯化钠溶液洗涤。依据说明书的操作步骤,利用Trizol试剂盒提取大鼠肝脏总RNA。用紫外分光光度法在260nm处测定RNA浓度。取1μg总RNA,利用逆转录试剂盒,按说明书操作步骤,得到逆转录产物cDNA。以上述逆转录反应得到的cDNA为模板,进行RT-qPCR反应。条件为:95℃5min,95℃15s,60℃32s,共40个循环,每组设3个复孔。mRNA表达量以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算得到。RT-qPCR引物采用软件Primer 5设计,由上海桑尼生物科技有限公司合成,其序列见表1。

2.6 Western blotting检测大鼠肝脏Oatp1a1、Oatp1a4和Oatp1b2蛋白表达

取大鼠肝脏组织,剪碎,加入RIPA裂解液,获得总蛋白提取物,BCA法进行蛋白定量。取50μg蛋白上样进行SDS-PAGE凝胶电泳,分离后转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶封闭2h,加入一抗4℃孵育过夜,TBST洗涤后加入二抗孵育1h,再次TBST洗涤后加入ECL发光液反应2~3min,置于暗室曝光。

2.7 统计分析

采用SPSS 18.0统计软件进行统计学分析,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析检验差异的显著性。结果以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CUMS 对大鼠体重和糖水消耗的影响

如图 1 所示,造模开始时,模型组和对照组大鼠

体重及糖水偏好百分比比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);经 8 周 CUMS 后,与对照组相比,模型组大鼠体重增长减缓,糖水偏好百分比降低,差异均有统计学意义 ($P<0.001$)。

表 1 RT-qPCR 引物序列及扩增片段大小

基因名	GenBank 检索号	引物序列	产物大小(bp)
Oatp1a1	NM_017111.1	F:GTGACCCCCACACTACACTT R:GACATATGGAGACATCCTGAACA	248
Oatp1a4	NM_131906.1	F:CCTAGGCATAGGCATTTGGA R:TCAACCAAAGCACAAAGCAG	159
Oatp1b2	NM_001270586.1	F:TGGGCATTGGGAGCATTTT R:TTAACCCCTTTTCACAACCTTTCT	180
GAPDH	XM_017593963.1	F:TCCTGCACCACCAACTGCTTAGC R:GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG	125

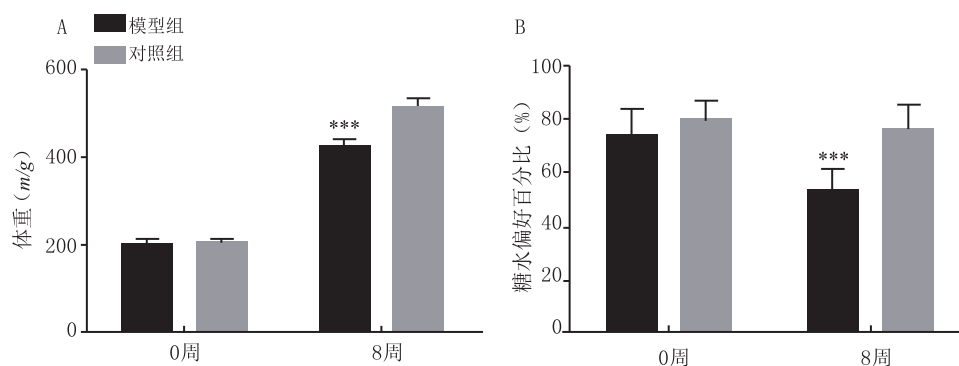


图 1 CUMS 对大鼠体重(A)和糖水偏好百分比(B)的影响

*** $P<0.001$,与对照组比较($n=12, \bar{x} \pm s$)

3.2 CUMS 对大鼠垂直和水平运动得分的影响

如图 2 所示,造模开始时,模型组和对照组大鼠垂直和水平运动得分差异无统计学意义 ($P>0.05$);经 8 周 CUMS 后,与对照组相比,模型组大鼠垂直和水平运动得分均降低,差异均有统计学意义 ($P<0.001$)。

3.3 CUMS 对大鼠血浆去甲肾上腺素及皮质酮含量的影响

如图 3 所示,造模开始时,模型组和对照组大鼠血浆去甲肾上腺素及皮质酮含量差异无统计学意义 ($P>0.05$);经 8 周 CUMS 后,与对照组相比,模型

组大鼠血浆去甲肾上腺素及皮质酮含量均升高,差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。

3.4 CUMS 对大鼠肝脏 Oatp1a1、Oatp1a4 和 Oatp1b2 mRNA 和蛋白表达的影响

经 8 周 CUMS 后,与对照组相比,模型组大鼠肝脏 Oatp1a1、Oatp1a4 和 Oatp1b2 mRNA 表达水平均显著降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 4)。Western 结果表明,与对照组相比,抑郁模型组大鼠肝脏 Oatp1a1、Oatp1a4 和 Oatp1b2 蛋白表达均减少,差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 5)。

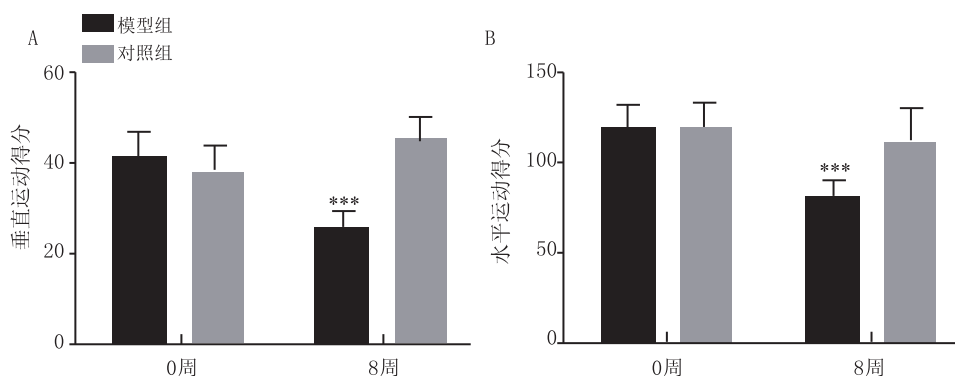


图 2 CUMS 对大鼠垂直运动得分(A)和水平运动得分(B)的影响

*** $P<0.001$,与对照组比较($n=12, \bar{x} \pm s$)

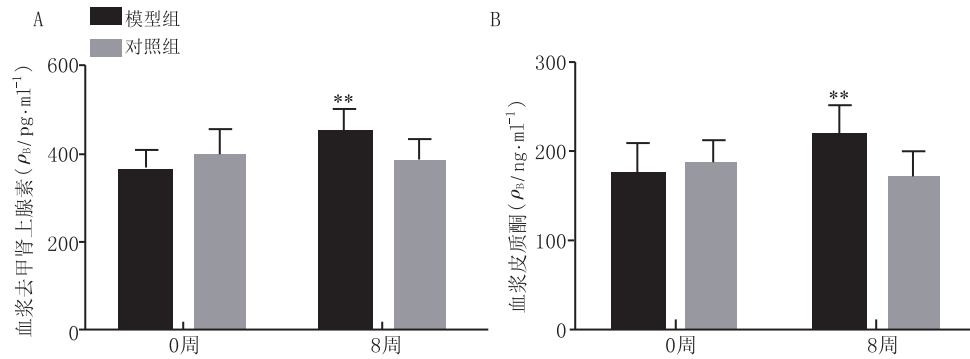


图3 CUMS对大鼠血浆去甲肾上腺素(A)和皮质酮(B)的影响

** $P < 0.01$, 与对照组比较($n=12, \bar{x} \pm s$)

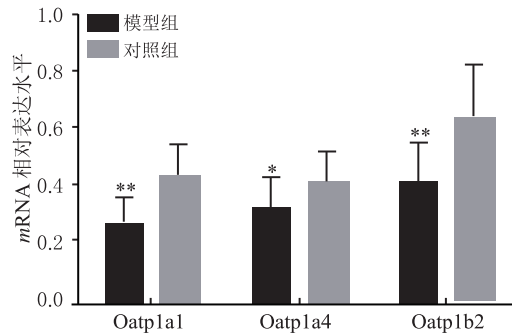


图4 CUMS对大鼠肝脏 Oatps mRNA 表达的影响

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较($n=12, \bar{x} \pm s$)

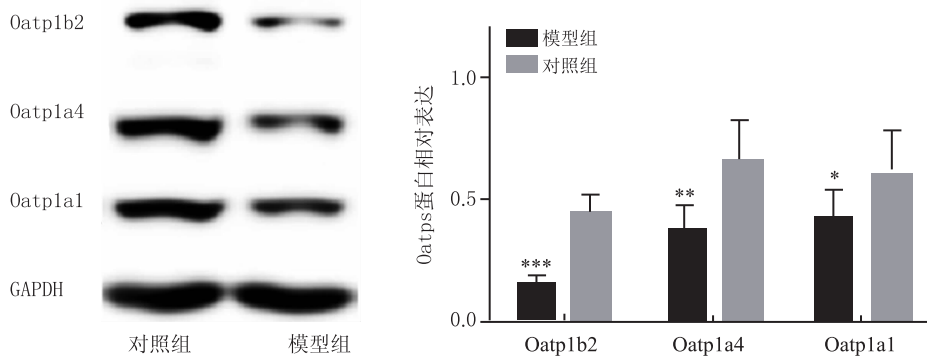


图5 CUMS对大鼠肝脏 Oatps 蛋白表达的影响

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

4 讨论

应激是机体在各种环境、社会及心理因素刺激时发生的重要生物学反应,是目前广泛被认同的引起抑郁的主要因素之一。通过不同方式的应激方式可诱导出模仿人类抑郁症状的动物模型,包括行为绝望模型、习得性无助模型、社会失败应激模型、慢性束缚应激模型及 CUMS 模型等^[6]。其中 CUMS 模型能较好的模拟人类抑郁症的核心症状——快感缺失,因此常被用于抑郁症发病机制和抗抑郁药的作用机制研究。本研究采用 CUMS 建立大鼠抑郁模型,结果显示,模型组大鼠体重及糖水偏好百分比

下降,提示大鼠出现明显的快感缺失。此外,模型组大鼠垂直运动得分和水平运动得分降低,表明大鼠自主活动和探究活动减少。

下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis,HPA轴)是神经内分泌系统的重要组成部分,在应激过程中协调各系统的作用,使机体更好的适应环境。HPA轴功能亢进被认为是抑郁症的发病机制之一,同时也是临床抑郁症患者常见的神经生物学异常表现之一。本研究中模型组大鼠经8周CUMS后,血清皮质酮含量升高,表明大鼠HPA轴亢进,与以往研究报道的结果相似^[7]。此外,HPA轴应激反应与下丘脑去甲肾上腺素的释放

密切相关。研究表明,不同的应激强度和时间的对大鼠 NA 分泌的影响有差异性^[8]。本研究选择不同温度和应激刺激大鼠,结果大鼠血清 NA 浓度升高,提示大鼠肾上腺能信号通路的激活,以对应激所致机体内环境的变化。

本研究在成功建立 CUMS 致大鼠抑郁模型的基础上,采用 RT-qPCR 和 Western blotting 分别检测了大鼠肝脏 Oatp1a1、Oatp1a4 和 Oatp1b2 mRNA 和蛋白表达。结果显示,与对照组相比,模型组大鼠肝脏 Oatp1a1、Oatp1a4 和 Oatp1b2 mRNA 和蛋白表达均降低。不同活性 OATPs 能够影响药物疗效,研究表明,人 OATPs 基因多态性能影响药物吸收、分布和排泄,导致药代动力学参数的改变,最终影响药物的疗效和毒副作用^[9]。大鼠肝脏 Oatps 与人肝脏 OATPs 功能类似^[10],因此,本研究结果提示抑郁患者肝脏 OATPs 可能表达下调,从而影响其底物药物的吸收、分布和排泄,最终产生临床疗效的差异。

促炎性细胞因子(proinflammatory cytokines, PCs)对 Oatps 的表达有重要调节作用。小鼠分别注射 IL-1 β , IL-6, TNF- α 及这 3 种细胞因子的混合物,结果 IL-6 或 IL-1 β 能降低 Oatp1a1 和 Oatp1a4 mRNA 表达水平 20%~60%,且降低水平随细胞因子剂量的增加而提高;而 TNF- α 能降低 Oatp1a4 mRNA 表达水平^[11]。此外,PCs 在抑郁症的发病过程中有重要作用。抑郁症患者外周血中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等细胞因子水平升高,重度抑郁症患者血清 IL-6 水平明显高于轻中度患者^[12]。长期慢性轻度应激使大鼠外周及中枢各脑区内 IL-1 β 、TNF α 和 IL-6 mRNA 水平不同程度地升高^[13]。本研究的局限性在于未测定大鼠 PCs 水平。但基于研究结果和文献调研,我们认为 CUMS 可致大鼠 PCs 水平升高,而 PCs 可下调大鼠肝脏 Oatps 基因和蛋白表达降低,因此 CUMS 下调 Oatps mRNA 和蛋白的表达可能经由 PCs 介导。在后续的研究中,我们将对抑郁-PCs-Oatps 三者之间的关联及其涉及的分子机制进行探讨。

综上所述,本研究利用 CUMS 建立的大鼠抑郁模型肝脏 Oatp1a1、Oatp1a4 和 Oatp1b2 mRNA 和蛋白表达均降低,提示抑郁症患者使用的药物为 OATPs 的底物时,药代动力学可能发生变化,需密切关注临床疗效。

【参考文献】

- [1] KOVACSICS D, PATIK I, ÖZVEGY-LACZKA C. The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017, 13(4): 409-424.
- [2] HAGENBUCH B, MEIER P J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties[J]. Pflugers Arch, 2004, 447(5): 653-665.
- [3] WEI H, ZHOU T, TAN B, et al. Impact of chronic unpredicted mild stress-induced depression on repaglinide fate via glucocorticoid signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(27): 44351-44365.
- [4] XIA Z, WEI H, DUAN J, et al. Chronic unpredicted mild stress-induced depression alter saxagliptin pharmacokinetics and CYP450 activity in GK rats[J]. PeerJ, 2016, 4: e1611.
- [5] ZENG Y, XIE X, DUAN J, et al. Perturbation of mitiglinide metabolism by chronic unpredicted mild stress in rats[J]. Sci Rep, 2014, 4: 3794.
- [6] YANG L, ZHAO Y, WANG Y, et al. The Effects of psychological stress on depression[J]. Curr Neuropharmacol, 2015, 13(4): 494-504.
- [7] WU G F, REN S, TANG R Y, et al. Antidepressant effect of taurine in chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 4989.
- [8] WANG B, WANG Y, WU Q, et al. Effects of α 2A Adrenoceptors on Norepinephrine Secretion from the Locus Coeruleus during Chronic Stress-Induced Depression[J]. Front Neurosci, 2017, 11: 243.
- [9] GONG I Y, KIM R B. Impact of genetic variation in OATP transporters to drug disposition and response[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2013, 28(1): 4-18.
- [10] HAGENBUCH B, STIEGER B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2-3): 396-412.
- [11] HARTMANN G, CHEUNG A K, PIQUETTE-MILLER M. Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 303(1): 273-281.
- [12] HAYLEY S. Toward an anti-inflammatory strategy for depression[J]. Front Behav Neurosci, 2011, 5: 19.
- [13] YOU Z, LUO C, ZHANG W, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression [J]. Behav Brain Res, 2011, 225(1): 135-141.

【收稿日期】 2018-06-11 【修回日期】 2018-10-15

【本文编辑】 陈盛新