

慢性应激诱导的抑郁大鼠纹状体 par-4 基因的表达*

朱熊兆 彭素芳 张 晟 张 逸 蔡 琳

(中南大学湘雅二医院心理学研究所, 长沙 410011)

摘 要 为研究慢性温和应激诱导的抑郁大鼠纹状体内前列腺凋亡反应蛋白(prostate apoptosis response-4, par-4)的表达, 及甲基化是否参与 par-4 基因表达的调控, 将 10 周龄大鼠随机分为实验组和对照组, 实验组接受慢性温和应激, 对照组不接受实验性处理。于大鼠 13 周龄时, 采用强迫游泳、糖水偏爱测验测定大鼠的抑郁水平, 以实时定量 PCR 检测纹状体 par-4 及多巴胺 D2 受体(Dopamine receptor D2, DRD2) mRNA 表达水平, 免疫印迹法检测纹状体 par-4 蛋白质表达水平, 用亚硫酸盐测序法检测 par-4 基因启动子区甲基化水平。结果发现, 与对照组大鼠相比, 实验组大鼠漂浮时间延长, 糖水偏爱率降低, 脑纹状体 par-4、DRD2 mRNA 及 par-4 蛋白质表达水平均降低, par-4 基因启动子区甲基化水平两组差异不显著。提示慢性温和应激诱导大鼠产生了抑郁样行为, 并能抑制纹状体 par-4 基因的表达, 而基因甲基化可能并不参与其调控机制。

关键词 慢性温和应激; 抑郁样行为; 纹状体; 前列腺凋亡反应蛋白; 基因甲基化

分类号 B845

1 前言

慢性心理应激能引发抑郁已得到公认, 但其机制尚不确定。一般认为应激可能是通过影响单胺递质系统的代谢引发抑郁(江开达和周东丰, 2005)。多巴胺是脑内重要的单胺类神经递质。研究表明, 多巴胺系统可能参与抑郁症的发生(Dunlop & Nemeroff, 2007), 如对死于自杀的抑郁症患者的尸检发现, 在其脑脊液以及与情绪、动机相关的脑区内, 多巴胺代谢产物浓度降低, 杏仁核多巴胺转运蛋白(Dopamine transporter, DAT)的表达降低(Klimek, Schenck, Han, Stockmeier, & Ordway, 2002)。动物研究发现, 多巴胺的释放能引起个体的愉快体验(Heinz, Schäfer, Higley, Krystal, & Goldman, 2003; Tupala & Tiihonen, 2004)。多巴胺代谢产物的浓度降低能导致个体的肢体活动减少、动机水平下降以及情绪低落(Brown & Gershon, 1993)。在多种抑郁症动物模型的研究中, 发现动物伏隔核多巴胺浓度降低, 且降低水平与动物的抑郁样行为相关联(Salamone, Aberman, Sokolowski, &

Cousins, 1999; Neill, Fenton, & Justice, 2002)。

脑内多巴胺能神经元主要分布于中脑和间脑, 在纹状体内分布较为密集(Stahl, 2008)。有关抑郁症的研究发现, 纹状体在抑郁症病人中有明显的病理改变。fMRI 研究表明, 重症抑郁患者的纹状体体积减小(Lorenzetti, Allen, Fornito, & Yücel, 2009), 重症抑郁患者的精神运动迟滞症状和纹状体血流量异常有关(Hickie et al., 2007)。人类和动物的研究也表明, 背侧纹状体和认知功能密切相关(Balleine & O'Doherty, 2010), 包括动机行为、决策和选择, 而这些都是和抑郁症的临床症状密切相关的。

调节脑内多巴胺表达的基因很多, 其中 DRD2 是一个重要的调节基因。我们的前期研究发现, 由早期应激引发出肢体活动度降低等抑郁样行为的大鼠, 其相关脑区 DRD2 的表达降低(朱熊兆, 李婷, 马秀玲, 彭素芳, 章晨晨, 2009; Zhu et al., 2010), 且这种表达的改变与行为学改变密切相关。par-4 是 DRD2 的关键配体, Park 等的研究发现, par-4 通过与钙调节蛋白竞争性地与 DRD2 结合而调节 DRD2 功能, 并在小鼠纹状体内观察到 par-4 与

收稿日期: 2010-07-17

* 国家自然科学基金资助(No. 81071097)。

通讯作者: 朱熊兆, E-mail: xiongzhaozhu@163.com

DRD2 共表达; 进一步研究发现, 敲除 par-4 的小鼠表现出抑郁样行为, 他提出: par-4 可能是 DRD2 与抑郁症的联接点(Park et al., 2005)。而相关脑区的 par-4/DRD2 基因表达的具体调控机制尚不清楚。

近年来, 很多学者开始采用环境与基因交互作用模式对应激相关疾病进行研究, 结果发现, 个体在生存环境中所遭遇到的应激, 如慢性心理应激能影响相关基因的表达(Meyer, van Kampen, Isovich, Flügge, & Fuchs, 2001), 表观遗传修饰方式可能是基因与环境交互作用的机制之一。表观遗传指 DNA 序列不发生变化但基因表达发生了可遗传的改变(Bird, 2007), 主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑及非编码 RNA 调控四大修饰方式(Feinberg, Ohlsson, & Henikoff, 2006), 其中, DNA 甲基化是表观遗传学中进展最为迅速的研究领域之一。在精神疾病易感性的研究中, 有越来越多的证据表明, DNA 甲基化参与了个体生活经历对其对环境的行为反应调控的过程(Macri & Laviola, 2004), 如: 恶劣的环境(包括个体的生存条件、饮食习惯等)通过一定的信号传导途径使染色体凝缩、DNA 高甲基化, 从而抑制转录因子、RNA 多聚酶和转录复合体与相应的 DNA 位点结合, 抑制转录; 而良好的环境可使染色体结构松弛、DNA 低甲基化, 促进转录(Meaney & Szyf, 2005; Szyf, Weaver, & Meaney, 2007)。

在应激导致抑郁症发病的过程中, DNA 甲基化是否在其中起着调控作用? 本研究拟采用慢性温和应激的方法建立抑郁症动物模型, 观察大鼠在应激后的行为改变及纹状体内 par-4、DRD2 基因表达的改变, 并采用亚硫酸盐修饰基因组 DNA, PCR 产物克隆测序的方法探索 DNA 甲基化是否参与 par-4 基因表达的调控, 研究应激所致抑郁的表观遗传学机制。

2 材料与方 法

2.1 实验动物

动物 Sprague-Dawley (SD) 孕鼠购自中科院上海实验动物中心, 在中南大学湘雅二医院实验动物中心繁殖, 新生大鼠按窝随机分成实验组(17 只)和对照组(17 只)。大鼠成长至 3 周龄时按性别分笼(雌雄比例为 10:7), 同组同性别的大鼠 3~5 只一笼, 实验组大鼠 10 周龄时开始接受慢性温和应激, 对照组则不接受实验性处理。行为学实验结束后取雄性大鼠脑组织进行生物学实验。实验期间, 动物自由

摄食、饮水, 室温控制在 21~23℃, 湿度控制在 50%~55%, 12h 昼/12h 夜明暗控制(8:00~20:00)。

2.2 试剂及仪器

逆转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司; SYBR Green 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; RIPA 裂解液及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天公司; par-4 单克隆一抗购自美国 Santa cruz 公司; 辣根酶标记二抗购自美国 Jakson 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; ECL 检测试剂购自美国 Pierce 公司; Taq 酶购自美国 Promega 公司; DNA 甲基化试剂盒购自德国 Qiagen 公司。

2.3 慢性温和应激动物模型的建立

参照李亚、孔宏、宋倩和蔡景霞(2010)的方法并根据预实验结果加以改进, 使实验方案更适合本次实验的大鼠。在大鼠 10 周龄时开始接受为期 3 周的慢性应激。每天 9:00~12:00 之间, 随机给予大鼠以下应激方法中的一种: (1)足底电击, 将大鼠放入足底电击箱, 电击电流大小为 800mA, 每次电击的电流持续时间为 1s, 随机给予电击, 平均间隔时间为 10s, 持续时间为 30min; (2)冰水游泳: 将大鼠放入直径 30cm, 桶高 40cm 的塑料桶, 水深 30cm, 水温 4℃, 持续时间为 5min; (3)禁水: 时间为 24h; (4)禁食: 时间为 24h; (5)高台应激: 将大鼠放置于钢制高台(10cm × 10cm × 160cm)之上, 持续时间为 2h; (6)束缚应激: 将大鼠放入自制的应激筒中, 筒身透明, 通风良好, 保证大鼠不受压但活动受限, 限制时间为 2h。每种应激给予 3~4 次, 同种应激不连续出现, 使大鼠不能预料刺激的发生。

2.4 行为学观察

2.4.1 强迫游泳 强迫游泳实验用于评定动物的行为绝望水平。参照 Weaver 等(2005)的方法, 实验装置为直径 30cm, 高 40cm 的圆形透明钢化玻璃桶。第一天将两组大鼠依次置于强迫游泳桶中(水深 30cm, 水温 25℃±1℃)适应 15min 后将老鼠捞出, 擦干身体, 在 32℃环境下烘干并放回笼内。第二天同一时间, 将两组大鼠依次置于强迫游泳桶中(水温及水深与前一天相同), 观察 5min 内大鼠静止不动时间(大鼠被动漂浮, 即: 仅有尾巴和前爪轻微摆动以维持身体平衡并使头露出水面)作为指标(Perona et al., 2008; Weaver et al., 2005)。每次实验后冲洗水缸、换水, 避免对下一只测试鼠产生影响。

2.4.2 糖水偏爱实验 糖水偏爱测验用于评定大鼠兴趣减退水平。参照江雪华、张敏、陆大祥、韦佳和戚仁斌(2010)的方法, 大鼠单笼喂养, 在安静

的房间内,每笼同时放置 2 个水瓶。第一个 24h,两瓶均装有 1%蔗糖水,随后的 24h,一个瓶装 1%蔗糖水,一个瓶装纯水。接下来,23h 的禁食禁水后,进行糖水消耗实验,同时给予每只大鼠事先定量好的两瓶水:一瓶 1%蔗糖水,一瓶纯水。1h 后,取走两瓶并称重。计算动物的糖水偏爱率作为糖水偏爱测验指标(糖水偏爱率=糖水消耗量/总液体消耗量)。

2.5 par-4 及 DRD2 mRNA 表达水平检测

采用实时定量 PCR (Real-Time PCR)检测各组大鼠纹状体 par-4 及 DRD2 的 mRNA 相对表达量。具体步骤如下:行为学实验结束后,取雄性 SD 大鼠,将动物快速断头处死,冰上取出大脑,迅速剥离出纹状体,转移至液氮中保存。破碎标本,Trizol 消化,提取总 RNA,经紫外分光光度计测 RNA 浓度。按逆转录试剂盒步骤操作,取 2 μ g RNA 进行逆转录,获得的 cDNA 用于 PCR 扩增。Par-4 mRNA 上游引物为 5'-gataccagtgcgctgtaac-3',下游引物为 5'-cagcctcgtaagtcgaaggtt-3'。DRD2 上游引物为 5'-ggccacactgtaatgccctgg-3',下游引物为 5'-tgctgatggcacacaggttcagg-3'。内参 β -actin 的上游引物为 5'-cacgatggagggccggactc-3',下游引物为 5'-taaagacctctatgccaacacagt-3'。Real-Time PCR 扩增程序:(1)预变性:50 $^{\circ}$ C 孵化 2min,95 $^{\circ}$ C 预变性 8min;(2)PCR 反应:95 $^{\circ}$ C 变性 15s~60 $^{\circ}$ C 退火 1min,40 个循环(par-4、DRD2 及 β -actin 的退火温度分别为 60 $^{\circ}$ C,56 $^{\circ}$ C,55 $^{\circ}$ C);(3)溶解曲线生成:95 $^{\circ}$ C 预变性 1min,55 $^{\circ}$ C 退火 1min,55 $^{\circ}$ C 退火 10s 并以每循环增加 0.5 $^{\circ}$ C 的温度进行 80 个循环。仪器自动记录每个循环最后 10%时间的平均荧光值,以表示该循环中 PCR 产物的量。反应完成后,软件自动计算出每个标本的循环阈值(Cycle threshold, Ct 值)。每一次反应均设阴性对照,实验重复 3 次,取平均值作为该样本的 Ct 值。按照 Schmittgen 和 Livak 的描述 (Schmittgen & Livak, 2008),采用 Δ Ct 法计算实验结果,2^{- Δ Ct} 为 mRNA 的相对浓度,实验组与对照组 mRNA 相对浓度的比值为实验组 mRNA 表达相对于对照组的倍数。

2.6 par-4 蛋白质表达水平检测

采用免疫印迹法 (Western Blot)检测各组大鼠纹状体 par-4 蛋白质相对表达量。具体步骤如下:使用 RIPA 裂解液,冰上裂解纹状体组织,提取总蛋白;采用 BCA 法测定蛋白浓度;取 30 μ g 蛋白质经 SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜;然后用 PBST

(135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM K₂HPO₄, 含 0.1% Triton)配置的 5%脱脂牛奶室温封闭 1h;加入 par-4 单克隆抗体(1:100 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBST 洗 3 次,每次 10min;加入辣根酶标记的二抗(1:4000 稀释),室温孵育 1h;PBST 洗 3 次,每次 10min;用 ECL 发光试剂盒孵育 5min,并在暗室中显影。显影后的 PVDF 膜用洗膜液(600 mM NaCl, 3%纯乙酸)洗三次,每次 10min;用 PBST 配置的 5%脱脂牛奶室温封闭 1h;加入 β -actin 单克隆抗体(1:4000 稀释),室温下孵育 1h;PBST 洗 3 次,每次 10min;加入辣根酶标记的二抗(1:4000 稀释),室温孵育 1h;PBST 洗 3 次,每次 10min;用 ECL 发光试剂盒孵育 5min,并再次于暗室中显影。图像以 Bio-Rad 图像分析系统分析,用目的蛋白条带的平均灰度值与 β -actin 条带的平均灰度值的比值表示 par-4 蛋白表达的相对强度。

2.7 par-4 基因甲基化水平检测

采用亚硫酸盐测序(bisulfite DNA sequencing)方法检测两组大鼠纹状体 par-4 基因(基因库中序列号 NM_033485)启动子区的 DNA 甲基化水平。具体步骤如下:破碎标本后采用蛋白酶 K 消化,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀提取基因组 DNA。经紫外分光光度计测浓度,取 1 μ g DNA 进行重亚硫酸钠修饰,获得处理后的 DNA 用于巢式 PCR 扩增。第一轮 PCR 上游引物为 5'-ttatttttagttgtaggattttttt-3',下游引物为 5'-ctaccacctatatacacaactcccc-3';反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 1min,56 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5min。第一轮 PCR 产物经 1:1 稀释后作为第二轮 PCR 的反应模板;第二轮 PCR 上游引物为 5'-agtttttttggttttagggatt-3',下游引物为 5'-ctaccacctatatacacaactcccc-3',反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 1min,60 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 5min。PCR 产物含 414 个 bp,51 个 CpG 位点。对 PCR 产物进行纯化后克隆测序分析,获得 DNA 甲基化图谱。

2.8 数据处理

测定值用均数 \pm 标准差($M \pm SD$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件分析。实验数据组间比较均采用独立样本 t 检验, $p < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 行为学实验结果

如图 1 所示,强迫游泳实验中,实验组大鼠($n =$

17)漂浮时间(191.29 ± 90.48 s)长于对照组大鼠($n = 17$)漂浮时间(63.80 ± 80.55 s), 差异具有统计学意义($t = 4.01, p < 0.05$)。糖水偏爱实验中, 实验组大

鼠糖水偏爱率(0.40 ± 0.30)低于对照组大鼠糖水偏爱率(0.69 ± 0.25), 差异具有统计学意义($t = -2.93, p < 0.05$)。

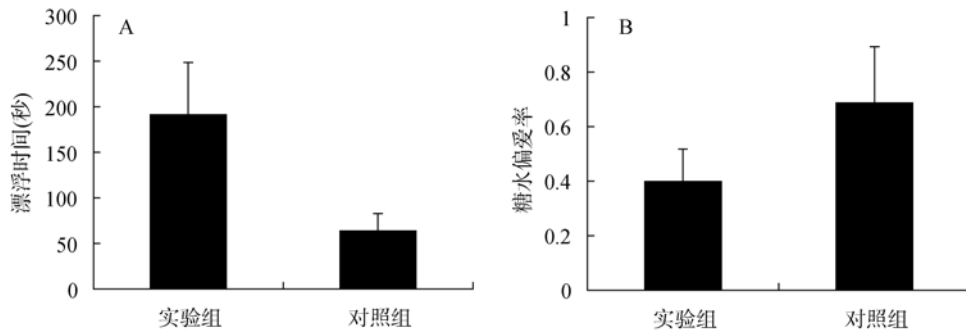


图1 两组大鼠漂浮时间及糖水偏爱率比较

A图: 强迫游泳实验结果, 实验组大鼠漂浮时间长于对照组; B图: 糖水偏爱实验, 实验组大鼠糖水偏爱率低于对照组 (* $p < 0.05$)。

3.2 纹状体 par-4 及 DRD2 mRNA 表达

如图2所示, 实验组大鼠($n = 7$)纹状体内 par-4 mRNA 表达量(0.01 ± 0.01)低于对照组($n = 7$) par-4 mRNA 表达量(0.04 ± 0.02)差异具有统计学意义($t = -3.56, p < 0.05$); DRD2 mRNA 表达量(0.11 ± 0.09)也低于对照组 mRNA 表达量(0.32 ± 0.21), 差异具有统计学意义($t = -2.51, p < 0.05$)。用 ΔCt 法计算实验结果, 发现实验组大鼠纹状体 par-4 mRNA 表达量是对照组的 0.33 倍, DRD2 mRNA 表达量是对照组的 0.33 倍。

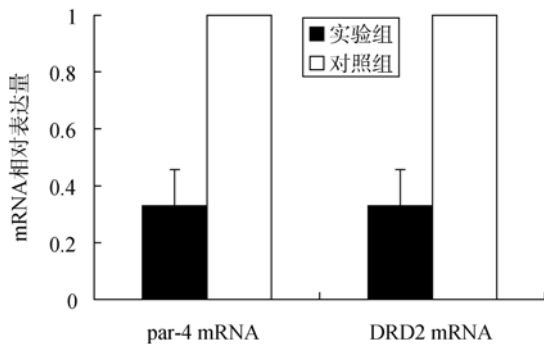


图2 两组大鼠纹状体内 par-4 及 DRD2 mRNA 相对表达量 (* $p < 0.05$)

3.3 纹状体 par-4 蛋白质表达

如图3所示, 实验组大鼠($n = 7$)纹状体内 par-4 蛋白质表达量(0.15 ± 0.02)低于对照组大鼠($n = 7$) par-4 蛋白质表达量(0.48 ± 0.16), 差异具有统计学意义($t = -4.92, p < 0.05$)。

3.4 par-4 启动子区甲基化水平

实验组大鼠($n = 7$) par-4 基因启动子区甲基化水平(0.13 ± 0.11)与对照组大鼠($n = 7$)基因甲基化水平(0.15 ± 0.15)相比, 差异不具统计学意义($t = -0.26, p > 0.05$) (图4)。对 par-4 基因启动子区 51 个 CG 位点进行分析, 发现实验组在第 8 个 CG 位点的甲基化水平(0.06 ± 0.15)低于对照组基因甲基化水平(0.54 ± 0.47), 实验组在第 9 个 CG 位点的基因甲基化水平(0.34 ± 0.34)高于对照组大鼠基因甲基化水平(0.03 ± 0.07), 差异具有统计学意义(t 值分别为 -2.592 和 $2.382, p < 0.05$) (图5)。

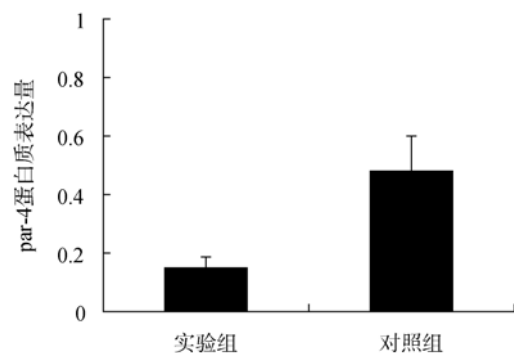


图3 两组大鼠纹状体内 par-4 蛋白质表达比较 (* $p < 0.05$)

4 讨论

强迫游泳实验最早由 Porsolt, Pichon 和 Jalfre (1977)提出, 已被广泛用于啮齿类动物对抗抑郁药

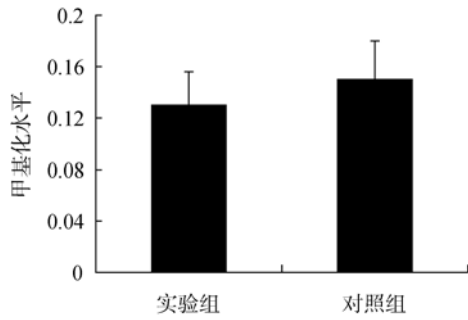


图4 两组大鼠 par-4 基因启动子区总体甲基化水平比较 (* $p < 0.05$)

物反应性的药理学实验,它评价的是抑郁症的“行为绝望”和“自杀”等症状(Bielajew et al., 2003)。糖水偏爱实验被用于评价啮齿类动物的兴趣减退水平,这是人类抑郁症的核心症状,在动物模型上表现为对

糖水的偏爱降低,被定义为对奖赏的反应性降低(Szyf et al., 2007)。本研究结果显示,慢性应激组大鼠与对照组大鼠相比,漂浮时间延长,糖水消耗比例降低,表明本研究所采用的慢性温和应激使大鼠产生了行为绝望、兴趣减退的抑郁样行为。慢性温和应激模型是目前最好的抑郁症模型之一,已被证明具有良好的表面效度、结构效度及预测效度(Willner, 1997)。既往已有大量的研究证明慢性温和应激能引起动物产生多种抑郁样行为,包括快感缺失、行为绝望、体重增长缓慢等(Szyf et al., 2007; Willner, 1997; Fujisaki, et al., 2003; Willner, 2005)。本研究中接受慢性应激的大鼠出现了与前人研究结果一致的抑郁样行为,说明本研究的慢性温和应激模型是成功的。

par-4 是 DRD2 的关键配体,它能与钙调节蛋白竞争性的结合 DRD2,影响 DRD2 对 cAMP 的调

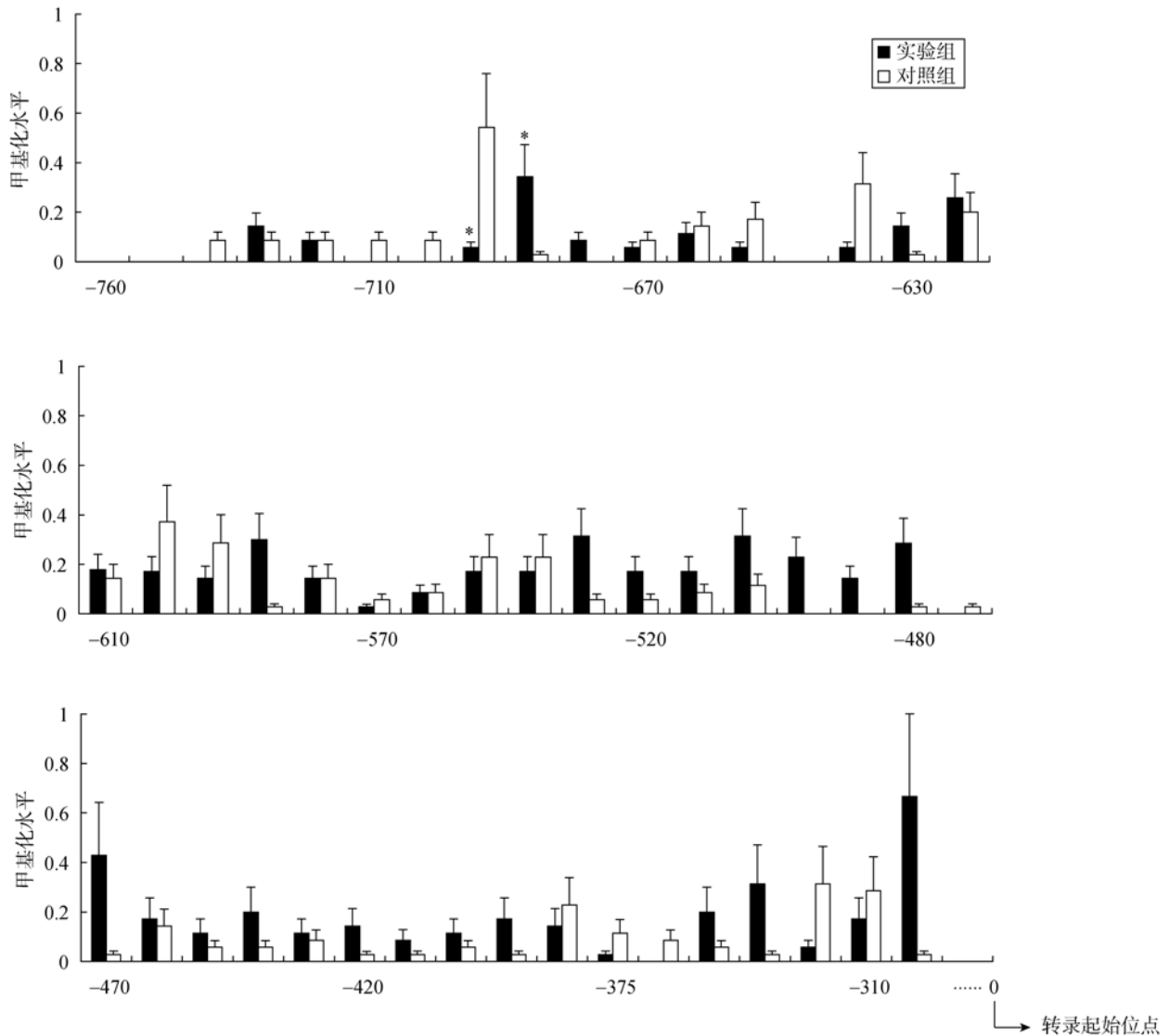


图5 两组大鼠 par-4 基因启动子区甲基化水平比较(* $p < 0.05$)

节作用, 进一步影响 DA-cAMP-CREB 信号通路的功能(Park et al., 2005; Bibb, 2005)。Park 等(2005)的研究发现, 当采用基因敲除的方法敲除 par-4 的羧基端亮氨酸拉链结构(leucine zipper, LZ), 或用基因沉默的方法使 par-4 的表达被抑制时, 也可出现 cAMP 活性增加, DA-cAMP-CREB 信号通路增强, 并可使小鼠在行为学实验中表现出抑郁样行为, 提示 par-4 是抑郁症发病的关键环节, 可能是抑郁症与 DRD2 的连接点。Glantz 等(2010)对重症抑郁患者的死后尸检研究也发现其相关脑区 par-4 表达量下降了 67%。本研究实验组大鼠纹状体内 par-4 mRNA 及蛋白质的表达水平均降低, 这与前人的研究结果一致地证明 par-4 在抑郁症发病过程中扮演了重要的角色。为验证 par-4 是否是通过与 DRD2 的相互作用而导致抑郁的产生, 本研究还检测了纹状体内 DRD2 mRNA 的表达, 结果表明, 实验组大鼠纹状体内 DRD2 mRNA 表达水平也降低, 提示 par-4 可能是通过影响 DRD2 来调节多巴胺系统功能, 进而引发抑郁症状的。

DNA 甲基化是表观遗传学领域中的一种重要的基因表达调控方式, 一般认为启动子区高甲基化抑制基因表达, 而去甲基化则能促进基因表达(Robertson, 2005)。本研究试图探索慢性温和应激是否通过基因甲基化的方式来调节 par-4 的表达并进一步引发抑郁症状, 结果表明两组大鼠总体的基因甲基化水平没有显著差异; 对具体的 CG 位点进行比较, 发现慢性应激组大鼠有一个 CG 位点甲基化水平低于对照组大鼠, 并有一个 CG 位点甲基化水平高于对照组大鼠。本实验结果不能直接证明 par-4 基因启动子区甲基化修饰是慢性应激导致 par-4 表达降低的调节机制, 而本研究中发现的在 par-4 基因启动子区的不同位点表现出甲基化水平的不同改变, 其意义有待进一步的研究。有关 par-4 基因甲基化的研究较少, Pruitt 等人(2005)应用大鼠卵巢细胞进行研究, 发现 Ras 是通过基因甲基化的方式使 par-4 的表达减少, 从而影响细胞信号通路的, 说明 par-4 基因可以发生甲基化。但本研究未能证明基因甲基化在慢性温和应激抑制 par-4 的表达并进一步引发抑郁症状这一过程中发挥调控作用, 可能存在其他调控方式。基因的表达受多种机制的调节, 在最能反映环境和基因交互作用的表观遗传学领域, 也已发现有 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑及非编码 RNA 调控(Wolffe et al., 1999; Feinberg et al., 2006)等多种基因表达调控机

制。Tsankova 等(2006)利用小鼠慢性社会挫败应激抑郁模型对海马区脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)启动子区染色质重塑情况进行研究, 发现应激组小鼠 BDNF 的启动子区产生了持久的抑制性的组蛋白修饰——H3-K27 的二甲基化, 并且 BDNF 的表达持续下调。持续丙咪嗪给药则在 BDNF 启动子区产生 H3 乙酰化, 以及 H3-K4 甲基化(激活性修饰)从而逆转了 BDNF 基因表达的抑制。单胺氧化酶抑制剂在体外实验中也能增加 H3-K4 甲基化水平, 导致某些基因的转录抑制。par-4 在慢性应激引发的抑郁症个体中表达的改变是否也存在其他的调控机制, 还有待进一步研究。

参 考 文 献

- Balleine, B. W., & O'Doherty, J. P. (2010). Human and rodent homologies in action control: Corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology*, 35, 48–69.
- Bibb, J. A. (2005). Decoding dopamine signaling. *Cell*, 122, 153–155.
- Bielajew, C., Konk, A. T. M., Kentner, A. C., Baker, S. L., Stewart, A., Hutchins, A. A., et al. (2003). Strain and gender specific effects in the forced swim test: Effects of previous stress exposure. *Stress*, 6, 269–280.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, 396–398.
- Brown, A. S., & Gershon, S. (1993). Dopamine and depression. *Journal of Neural Transmission. General section*, 91, 75–109.
- Dunlop, B. W., & Nemeroff, C. B. (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Archives of General Psychiatry*, 64, 327–337.
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., & Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, 7, 21–33.
- Fujisaki, C., Utsuyama, M., Kuroda, Y., Watanabe, A., Seidler, H., Watanabe, S., et al. (2003). An immunosuppressive drug, cyclosporine-A acts like anti-depressant for rats under unpredictable chronic stress. *Journal of Medicine and Dental Science*, 50, 93–100.
- Glantz, L. A., Gilmore, J. H., Overstreet, D. H., Salimi, K., Lieberman, J. A., et al. (2010). Pro-apoptotic Par-4 and dopamine D2 receptor in temporal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Schizophrenia Research*, 118, 292–299.
- Heinz, A., Schäfer, M., Higley, J. D., Krystal, J. H., & Goldman, D. (2003). Neurobiological correlates of the disposition and maintenance of alcoholism. *Pharmacopsychiatry*, 36, S255–S258.
- Hickie, I. B., Naismith, S. L., Ward, P. B., Little, C. L., Pearson, M., Scott, E. M., et al. (2007). Psychomotor slowing in older patients with major depression: Relationships with blood flow in the caudate nucleus and white matter lesions. *Psychiatry Research*, 155, 211–220.
- Jiang, K. D., & Zhou, D. F. (2005). *Psychiatry*. Beijing: People's Medical Publishing House.

- [江开达, 周东丰. (2005). *精神病学*. 北京: 人民卫生出版社.]
- Jiang, X. H., Zhang, M., Lu, D. X., Wei, J., & Qi, R. B. (2010). Depression-like behavior and change in hippocampus BDNF mRNA expression induced by early deprivation in rats. *Acta Psychologica Sinica*, 42, 695–703.
- [江雪华, 张敏, 陆大祥, 韦佳, 戚仁斌. (2010). 早期剥夺所致大鼠抑郁样行为与海马 BDNF mRNA 表达变化. *心理学报*, 42, 695–703.]
- Klimek, V., Schenck, J. E., Han, H., Stockmeier, C. A., & Ordway, G. A. (2002). Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: A postmortem study. *Biologic Psychiatry*, 52, 740–748.
- Lee, M. G., Wynder, C., Schmidt, D. M., McCafferty, D. G., & Shiekhata, R. (2006). Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chemistry & Biology*, 13, 563–567.
- Li, Y., Kong, H., Song, Q., & Cai, J. X. (2010). Chronic stress impairs learning and memory and changes frontal and hippocampal synaptosomal membrane fluidity in rats. *Acta Psychologica Sinica*, 42, 235–240.
- [李亚, 孔宏, 宋倩, 蔡景霞. (2010). 慢性应激对大鼠空间学习记忆及海马和前脑皮层突触体膜流动性的影响. *心理学报*, 42, 235–240.]
- Lorenzetti, V., Allen, N. B., Fornito, A., & Yücel, M. (2009). Structural brain abnormalities in major depressive disorder: A selective review of recent MRI studies. *Journal of Affective Disorders*, 117, 1–17.
- Macri, S., & Laviola, G. (2004). Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: Interaction with cannabinoid exposure during adolescence. *Behavioural Brain Research*, 154, 231–238.
- Meaney, M. J., & Szyf, M. (2005). Environmental programming of stress responses through DNA methylation: Life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 7, 103–123.
- Meyer, U., van Kampen, M., Isovich, E., Flügge, G., & Fuchs, E. (2001). Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews. *Hippocampus*, 11, 329–336.
- Neill, D. B., Fenton, H., & Justice, J. B., Jr. (2002). Increase in accumbal dopaminergic transmission correlates with response cost not reward of hypothalamic stimulation. *Behavioural Brain Research*, 137, 129–138.
- Park, S. K., Nguyen, M. D., Fischer, A., Luke, M. P. S., Affar, el. B., Dieffenbach, P. B., et al. (2005). Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell*, 122, 275–287.
- Perona, M. T. G., Waters, S., Hall, F. S., Sora, I., Lesch, K. P., Murphy, D. L., et al. (2008). Animal models of depression in dopamine, serotonin and norepinephrine transporter knockout mice: Prominent effects of dopamine transporter deletions. *Behavioural Pharmacology*, 19, 566–574
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730–742.
- Pruitt, K., Ulkū, A. S., Frantz, K., Rojas, R. J., Muniz-Medina, V. M., Rangnekar, V. M., et al. (2005). Ras-mediated loss of the pro-apoptotic response protein Par-4 is mediated by DNA hypermethylation through Raf-independent and Raf-dependent signaling cascades in epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 23363–23370.
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6, 597–610.
- Salamone, J. D., Aberman, J. E., Sokolowski, J. D., & Cousins, M. S. (1999). Nucleus accumbens dopamine and rate of responding: Neurochemical and behavioral studies. *Psychobiology*, 27, 236–247.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nature Protocols*, 3, 1101–1108.
- Stahl, S. M. (2008). *Essential psychopharmacology: Neuroscientific basis and practical applications*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Szyf, M., Weaver, I., & Meaney, M. (2007). Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior. *Reproductive Toxicology*, 24, 9–19.
- Tsankova, N. M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R. L., & Nestler, E. J. (2006). Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nature Neuroscience*, 9, 519–525.
- Tupala, E., & Tiihonen, J. (2004). Dopamine and alcoholism: Neurobiological basis of ethanol abuse. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biologic Psychiatry*, 28, 1221–1247.
- Weaver, I. C. G., Champagne, F. A., Brown, S. E., Dymov, S., Sharma, S., Meaney, M. J., et al. (2005). Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: Altering epigenetic marking later in life. *The Journal of Neuroscience*, 25, 11045–11054.
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134, 319–329.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52, 90–110.
- Wolffe, A. P., Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: Regulation through repression. *Science*, 286, 481–486.
- Zhu, X. Z., Li, T., Ma, X. L., Peng, S. F., & Zhang, C. C. (2009). The effect of maternal deprivation on the expression of dopamine receptor2 in adult rats. *Chinese Journal of Psychiatry*, 42, 110–113.
- [朱熊兆, 李婷, 马秀玲, 彭素芳, 章晨晨. (2009). 母爱剥夺对成年大鼠行为及多巴胺受体 2 基因表达的影响. *中华精神科杂志*, 42, 110–113.]
- Zhu, X. Z., Li, T., Peng, S. F., Ma, X. L., Chen, X. G., & Zhang, X. W. (2010). Maternal deprivation-caused behavioral abnormalities in adult rats relate to a non-methylation-regulated D2 receptor levels in the nucleus accumbens. *Behavioural Brain Research*, 209, 281–288.

The Expression of Prostate Apoptosis Response-4 in Striatum of A Rat Model of Depression Induced by Chronic Stress

ZHU Xiong-Zhao; PENG Su-Fang; ZHANG Sheng; ZHANG Yi; CAI Lin

(Medical Psychological Institute, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410011, China)

Abstract

Chronic stress may induce depression, but the mechanism is unclear. Previous studies suggested that dopamine system, especially dopamine receptor D2 (DRD2) may be involved in, and prostate apoptosis response-4 (par-4) may be the link point between DRD2 and depression. The aims of this research are to detect the expression of par-4 in striatum of a rat model of depression induced by chronic stress, and to explore whether DNA methylation is involved in the regulatory mechanism of par-4 expression.

Newborn rats were randomly divided into two groups, when they grew up to ten weeks, the experimental group rats ($n = 17$) accepted chronic mild stress for 3 weeks, while the control group rats ($n = 17$) received no experimental handle. Their depressive level was assessed with forced swimming test and sucrose consumption test; the mRNA expression of par-4 and DRD2 in rats' striatum was detected by Real-Time PCR; the protein expression of par-4 was detected by western blot; and the DNA methylation level of par-4 was investigated by bisulfated DNA sequencing.

The result showed that the float time of experimental rats was longer than the control rats ($t = 4.01, p < 0.05$), and the sucrose preference rate of experimental rats was reduced compare with the control rats ($t = -2.93, p < 0.05$). The par-4 and DRD2 mRNA expression of experimental rats were lower than the control rats (t values were -3.56 and -2.507 respectively, $p < 0.05$), and the fold changes of par-4 and DRD2 mRNA expression in experimental rats compared to control rats were 0.33 and 0.33 respectively. The par-4 protein expression of experimental rats was decreased compared with the control rats ($t = -4.92, p < 0.05$). However, there was no significant difference between two groups in methylation level of par-4 promoter region ($t = -0.26, p > 0.05$).

These results suggest that chronic mild stress could induce the depressive behaviors of rats and suppress the expression of par-4, but DNA methylation seems to be not involved in the regulatory mechanism.

Key words Chronic mild stress; Depressive behaviors; Striatum; Prostate apoptosis response-4; Methylation