

幼年注射氟西汀诱导制备成年 ICR 小鼠抑郁模型

刘艳芹, 张 晶, 赵 楠, 陈红霞, 张黎明, 张有志, 李云峰
(军事医学科学院毒物药物研究所新药评价研究室, 北京 100850)

摘要: 目的 通过幼年注射氟西汀(Flu)制备成年小鼠抑郁模型,探讨其表观有效性和预测有效性。方法 幼年 ICR 小鼠出生后第 4 到第 21 天连续 ip 给予 Flu $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (幼年诱导模型组),正常饲养至 9 周龄后,分为模型组、ig 给予 Flu $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和氟哌啶醇 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,连续 3 周后开始检测实验,测试期间继续给药,测试完成后小鼠为 12~13 周龄。开场实验检测跨格数,悬尾实验检测不动时间,明暗穿箱实验检测明暗穿箱次数。结果 与正常对照组相比,幼年诱导模型组小鼠成年后,自主活动显著减少(跨格数: 83 ± 30 vs 58 ± 19 ;站立数: 32 ± 10 vs 20 ± 8),悬尾不动时间显著延长[83 ± 46 vs (128 ± 56)s],明暗穿箱次数显著减少(18 ± 5 vs 10 ± 4)。小鼠连续 ig 给予 Flu $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后,自主活动显著增加(跨格数: 58 ± 19 vs 85 ± 41 ;站立数: 20 ± 8 vs 30 ± 12),悬尾不动时间显著缩短[128 ± 56 vs (71 ± 40)s],明暗穿箱次数显著增加(10 ± 4 vs 17 ± 7),各指标均恢复至正常对照组水平;而给予氟哌啶醇 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组小鼠,各指标数据无明显改变,同时表现出镇静作用。结论 幼年小鼠注射 Flu 成年后的表现符合抑郁模型表观有效性和预测有效性特征,有望成为制备更合理的抑郁症动物模型方法。

关键词: 模型, 神经学; 模型, 动物; 氟西汀; 抑郁

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)02-0275-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.025

抑郁症是基因和环境相互作用的结果,然而目前绝大多数抑郁动物模型均采用正常动物,而忽略了内在的基因调节作用。尽管可以较好地评价和预测抗抑郁药的活性,但并不能较好地用于探讨抑郁症的发生和生化改变。因此,本世纪初美国国立卫生研究院将发展更好的抑郁病理模型列为抑郁症研究中优先发展方向之一^[1]。

氟西汀(flouxetine, Flu)属于选择性 5-羟色胺受体(serotonin receptor, 5-HT)重摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI),不仅是临床一线抗抑郁药,而且是一线抗焦虑药。因其不良反应相对较少而被广泛应用。但研究表明,孕妇或青少年服用 Flu 能增加胎儿或青少年成年后自杀或暴力倾向^[2]。幼年服用 Flu 可以使 C57BL/6J 小鼠成年后自发活动性减低,而且 5-HT 转运蛋白(serotonin transporter, 5-HTT)敲除小鼠、大鼠成年

后表现为抑郁、焦虑样行为,且与性别无关^[3]。这些提示幼年注射 Flu 会诱导成年动物抑郁、焦虑样行为改变,并且因其可能诱导动物出现精神行为相关的基因改变成为更符合抑郁症特征的病理性模型。

本研究采用 ICR 小鼠,幼年时长期注射 Flu 待成年后检测抑郁和焦虑样行为,并且研究其成年后慢性给予抗抑郁药 Flu 或临床典型抗精神病药物氟哌啶醇(haloperidol, Hal)干预对幼年注射 Flu 小鼠的行为的影响,在行为学表观有效性(face validity)和预测有效性(predictive validity)两方面研究其作为新的抑郁动物模型的价值。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及仪器

Flu,批号:2007012601,白色粉末,纯度 >99%,常州第四制药厂惠赠。Hal,纯度 >98%,购自美国 Sigma 公司。小鼠明暗箱,正方形敞箱和小鼠高架十字迷宫由本实验室自制。VIDEOMEX-V 图像运动解析仪,为美国 Columbus Instruments 产品等。

1.2 动物及幼年模型诱导

孕 12 d 左右的 ICR 孕鼠,由维通利华实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2007-0001,适应环境待产,小鼠孕期一般为 21 d。饲养

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09J12201-004);国家自然科学基金(81072624);国家自然科学基金(81173036)

作者简介: 刘艳芹(1975-),女,实验师,主要从事军事毒理学与神经精神药理学研究, Tel: 66874616; E-mail: lyqf819@yahoo.com.cn

通讯作者: 李云峰, E-mail: lyf619@yahoo.com.cn, Tel: 66930650

中严格控制饲养条件,自由摄食饮水,室温 22 ~ 25℃,湿度 40% ~ 60%, 8:00 - 20:00 光照。注意保持饲养环境的安静以及合适的温湿度,并保持水料的新鲜。幼鼠出生后第 4 天到第 21 天,每窝随机等比例分为正常对照组(ip 给予生理盐水)和模型诱导组(ip 给予 Flu 10 mg·kg⁻¹),给药体积 10 ml·kg⁻¹,每日 1 次。在此期间正常哺乳,并保持符合标准的饲养环境。停止给药 2 d 后,将母鼠取出,幼鼠分开饲养至成年。

1.3 成年后动物分组给药

幼鼠长至 9 周龄时,将幼年诱导组小鼠随机分为 3 组,每组 13 ~ 15 只:模型组(ig 给予蒸馏水); Flu 10 mg·kg⁻¹组(ig)和 Hal 0.1 mg·kg⁻¹组(ig);给药体积 10 ml·kg⁻¹,每天 1 次,连续 3 周后进行行为检测,测试期间继续给药,测试完成后小鼠为 12 ~ 13 周龄。于当天给药后 1 h 进行各项行为检测。每次行为学实验之间间隔 2 d。药物处理完成后选用的行为实验包括开场活动性检测、悬尾实验和明暗穿箱实验。给药剂量均为公认动物模型有效剂量,并由前期预实验证实该剂量具有显著行为学效应。

1.4 开场活动性检测 5 min 内水平跨格数

参照文献[4]并做适当改动。将直径为 1 m 的圆形立筒的底面平均分成 16 格面积相等的小格将小鼠在安静比较暗的环境下放入立筒后观察小鼠 5 min 内的活动状况,实验时将小鼠放在敞箱正中心,以小鼠 5 min 内水平跨格数(至少 3 爪跨过边界)评价其运动性;以站立次数(两前爪离开地面)评价其探究性。实验测试环境尽量保持安静,每次应从同一位置、方向放入小鼠,每次实验后均需将动物的排泄物清除干净。

1.5 小鼠悬尾实验^[5]检测累计不动时间

将小鼠提前一天放进测试用房,于次日 9:00 - 12:00 am 在安静的环境下进行悬尾测试。实验采用 Steru 等^[5]建立的方法加以改进:悬尾箱为 25 cm × 25 cm × 25 cm,顶板中心绳连一个小夹子,将胶布粘在小鼠尾端 2 cm 处,用夹子夹住胶布,使小鼠呈倒悬体位,头部离悬尾箱底面约 5 cm,观察 6 min 后,记录 4 min 的累计不动时间。判定不动的标准为动物停止挣扎,身体呈垂直倒悬状态,静止不动。

1.6 小鼠明暗穿箱实验^[6]检测穿箱次数

小鼠明暗穿箱实验是利用小鼠喜暗恶光和好探究的特点建立起来的一个焦虑模型。小鼠进入暗箱后便极力想去探究明箱,但又害怕明箱中的强光刺激,如此形成的冲突状态被认为是一种焦虑行为。

参考文献[6]方法略作修改,聚丙烯动物盒(44 cm × 21 cm × 21 cm),明箱占盒的 2/3,暗箱占 1/3。暗箱外壁表面漆成黑色,箱内的黑色带孔(7.5 cm × 7.5 cm)间隔板与明箱分开。明箱上方装有 60 W 白炽灯。将小鼠置于明箱中央,背朝隔室,观察 10 min 内小鼠由暗箱到明箱穿过隔室的次数(穿箱次数)。

1.7 统计学分析

实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 差表示。通过统计软件 Graphpad prism 5.0 中单因素方差分析(ANOVA)并行组间 Dunnett *t* 检验。

2 结果

2.1 幼年给予氟西汀对成年后开场活动的影响

表 1 结果显示,与正常对照组相比,幼年诱导模型组小鼠成年后水平跨格数为 58 ± 19、站立次数为 20 ± 8,均显著减少(*P* < 0.05)。成年后慢性给予 Flu 可显著增加水平跨格数 85 ± 41、站立次数 30 ± 12,达到正常对照组水平,提示成年后慢性给予 Flu 可逆转幼年注射 Flu 小鼠的自主活动性低下,探究兴趣缺失。成年后慢性给与 Hal 对水平跨格次数无影响,但可显著降低小鼠的站立次数,这可能与 Hal 这一典型抗精神病药自身的中枢镇静作用有关。

Tab. 1 Effect of chronic treatment with fluoxetine (Flu) or haloperidol (Hal) on open-field behaviors in neonatal fluoxetine-treated mice

Group	Crossing times	Rear times
Normal control	83 ± 30	32 ± 10
Model	58 ± 19 *	20 ± 8 **
Model + Flu 10 mg·kg ⁻¹	85 ± 41 #	30 ± 12 #
Model + Hal 0.1 mg·kg ⁻¹	48 ± 16 **	11 ± 6 ** #

Neonatal ICR mice were ip given saline or Flu 10 mg·kg⁻¹, as normal control and model group, respectively, for 17 d (from the 4th day to 21st day after birth), then the mice were normally housed till adulthood (9 weeks after birth). The adult mice in model group were ig treated with distilled water, Flu 10 mg·kg⁻¹ or Hal 0.1 mg·kg⁻¹, once daily, for 3 weeks, then the open-field behaviors in mice were measured. In the test period, drugs continued to be administered. $\bar{x} \pm s$, *n* = 13 - 15. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, compared with normal control group; # *P* < 0.05, compared with model group.

2.2 幼年给予氟西汀对成年后悬尾不动时间的影响

表 2 结果显示,与正常对照组比,幼年诱导模型组悬尾不动时间显著延长[83 ± 46 vs (128 ± 56)s],表现为“绝望行为”增加,而成年后慢性给予 Flu 可显著减少幼年注射 Flu 小鼠的悬尾不动时间[128 ± 56 vs (71 ± 40)s],使之恢复至对照组水平,提示慢性给 Flu

可逆转幼年注射 Flu 小鼠成年后的“行为绝望”,而 Hal 对该行为没有影响。

Tab. 2 Effect of chronic treatment with Flu or Hal on the tail suspension test the neonatal fluoxetine-treated mice

Group	Immobility time/s
Normal control	83 ± 46
Model	128 ± 56 *
Model + Flu 10 mg·kg ⁻¹	71 ± 40 [#]
Model + Hal 0.1 mg·kg ⁻¹	131 ± 40 *

See Tab. 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 13 - 15$. * $P < 0.05$, compared with normal control group; [#] $P < 0.01$, compared with model group.

2.3 幼年给予氟西汀对成年后明暗穿箱行为的影响

表 3 结果显示,与正常对照组比,幼年诱导模型组小鼠穿箱次数显著减少(18 ± 5 vs 10 ± 4),表现为“焦虑样”冲突行为。而成年后慢性给予 Flu 可显著增加动物的穿箱次数(10 ± 4 vs 17 ± 7),使之恢复至对照组水平,提示成年后慢性给 Flu 可逆转幼年注射 Flu 小鼠在明暗穿箱实验上的“焦虑样”行为。而给予 Hal 对幼年注射 Flu 小鼠成年后的穿箱次数没有影响。

Tab. 3 Effect of chronic treatment with Flu or Hal on the light-dark transition test in neonatal fluoxetine-treated mice

Group	Times of transition
Normal control	18 ± 5
Model	10 ± 4 **
Model + Flu 10 mg·kg ⁻¹	17 ± 7 [#]
Model + Hal 0.1 mg·kg ⁻¹	9 ± 2 **

See Tab. 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 13 - 15$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; [#] $P < 0.05$, compared with model group.

3 讨论

抑郁症患者约 80% 伴有焦虑症状。与此一致的是,本研究发现幼年注射 Flu 小鼠成年后可诱导同时出现“抑郁样、焦虑样”行为改变,包括开场探究活动减少、绝望行为延长、具有冲突行为等,这与临床上抑郁症患者的行为表现是一致的,至少部分模拟了临床的表现,符合模型表观有效性的特征。而且,幼年注射 Flu 诱导小鼠成年后再给予一线抗抑郁药 Flu 发现,幼年注射 Flu 所诱导的抑郁和焦虑样行为皆可被逆转,而非抗抑郁药 Hal 无此作用,符合模型预测有效性的特征,提示幼年注射 Flu 诱导的成年抑郁样行为可能是有效的抑郁症病理模型。

研究表明,5-HTT 敲除小鼠、大鼠成年后表现为抑郁和焦虑样行为,且与性别无关^[3,7]。本研究幼年给予 SSRI 类抗抑郁药成年后的行为与 5-HTT 敲除动物近似,并且前期研究还发现,去甲肾上腺素重摄取抑制剂类抗抑郁药去甲丙米嗪在该模型上不敏感(数据略),提示幼年注射 Flu 诱导抑郁、焦虑样行为可能与其抑制 5-HTT 表达有关,并且该模型对 5-HT 能抗抑郁、抗焦虑药物更敏感。今后还需要进一步采用不同靶标和机制的抗抑郁药进行更广泛全面的评价,并围绕模型结构有效性(内在生化机制)的进行进一步的深入系统研究。

Ansonge 等^[7]发现,幼年 SWR 小鼠注射 Flu 成年后其在开场实验中活动路程和活动时间均明显减少,在高架十字迷宫等模型中总入臂次数减少等行为改变,与本研究是一致的,同时也提示 ICR 小鼠幼年注射 Flu 同样可诱导精神行为异常。另有文献报道,新生 Long Evants 雄鼠幼年(出生后 8 ~ 21 d)皮下注射西酞普兰(citalopram),成年后自发活动增加,给与丙米嗪可逆转^[8]。这与本研究结果不一致,这可能与动物种属、药物、幼年给药阶段不同有关。

值得一提的是,现有大多数焦虑模型可以较好地评价苯二氮草类抗焦虑药,但不能良好评价预测目前临床一线药物 SSRI 类(包括 Flu)的抗焦虑活性,SSRI 作为一线抗焦虑药的对现有的抗焦虑药评价动物模型均不敏感,这是现有焦虑模型的重要缺憾^[1]。而本研究幼年注射 Flu 诱导成年小鼠模型不仅在明暗穿箱实验中表现出焦虑样行为,并可被 Flu 逆转,提示该模型可较好地预测 SSRI 类药物的抗焦虑活性,这是其作为合理动物病理模型的潜在的重要特点。未来还需要就该特点进行更全面深入的研究。本研究中选用 SSRI 类抗抑郁剂 Hal 10 mg·kg⁻¹和 Flu 0.1 mg·kg⁻¹的剂量对小鼠而言均为公认的动物模型有效剂量,并可达到有效血药浓度,并且前期经过预实验探索发现幼年给予该剂量足以导致成年行为学改变。幼鼠出生后第 4 ~ 21 天相当于人从胚胎时期 6 ~ 9 个月持续到幼年的大脑发育阶段,为临床 SSRI 类药物的合理应用提供了依据。

综上所述,本研究采用 ICR 小鼠,探讨了幼年注射氟西汀诱导成年抑郁动物模型的价值,为这一潜在抑郁病理模型的构建提供了预测有效性和表观有效性的证据,同时,也为结构有效性和药物机制研究提供了实验基础。此外,本研究还为临床上孕妇和幼儿禁服或少服 SSRI 类药物提供了理论和实验依据,为合理用药提供了参考。

参考文献:

- [1] Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, *et al.* Preclinical models: status of basic research in depression [J]. *Biol Psychiatry*, 2002, **52** (6):503-528.
- [2] Owens MJ, Knight DL, Nemeroff CB. Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine [J]. *Biol Psychiatry*, 2001, **50** (5):345-350.
- [3] Karpova NN, Lindholm J, Pruunsild P, Timmusk T, Castrén E. Long-lasting behavioural and molecular alterations induced by early postnatal fluoxetine exposure are restored by chronic fluoxetine treatment in adult mice [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2009, **19** (2):97-108.
- [4] Boronat MA, Olmos G, García-Sevilla JA. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of neurofilament proteins by idazoxan and other I₂-imidazoline ligands [J]. *Br J Pharmacol*, 1998, **125** (1):175-185.
- [5] Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, **85** (3):367-370.
- [6] Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1980, **13** (2):167-170.
- [7] Ansorge MS, Zhou M, Lira A, Hen R, Gingrich JA. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice [J]. *Science*, 2004, **306** (5697):879-881.
- [8] Maciag D, Williams L, Coppinger D, Paul IA. Neonatal citalopram exposure produces lasting changes in behavior which are reversed by adult imipramine treatment [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, **532** (3):265-269.

Adult ICR mice depressive model established by fluoxetine exposure at neonatal stage

LIU Yan-qin, ZHANG Jing, ZHAO Nan, CHEN Hong-xia, ZHANG Li-ming, ZHANG You-zhi, LI Yun-feng
(Department of New Drug Evaluation, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To explore and establish a behavioral and pathological model for depression in ICR mice, and to evaluate its predictive validity and face validity. **METHODS** Neonatal ICR mice were ip given fluoxetine 10 mg·kg⁻¹ for 17 d (from the 4th day to 21st day after birth) and normally housed until they became adults (about 9 weeks after birth). The adult mice were ig treated with fluoxetine (Flu) 10 mg·kg⁻¹ or haloperidol (Hal) 0.1 mg·kg⁻¹ for 3 weeks, and their behavior was measured by open-field test, tail-suspension test and light-dark transition test. **RESULTS** Neonatal exposure to Flu induced a "depression-like or anxiety-like" behavior in the adult mice, as shown by the decreased locomotor activity (crossing times: 83 ± 30 vs 58 ± 19; rear times: 32 ± 10 vs 20 ± 8), decreased light-dark transitions (18 ± 5 vs 10 ± 4) and increased immobility time [83 ± 46 vs (128 ± 56) s] in the open-field test, light-dark transition test and tail-suspension test, respectively. Chronic Flu 10 mg·kg⁻¹ (ig) administration for 3 weeks all normalized "depression-like or anxiety-like" changes in behaviors: locomotor activity (crossing times: 58 ± 19 vs 85 ± 41; rear times: 20 ± 8 vs 30 ± 12) increased, immobility time [128 ± 56 vs (71 ± 40) s] decreased and light-dark transition times (10 ± 4 vs 17 ± 7) increased. However chronic treatment with Hal, a classical antipsychotics without antidepressant potential, had no such effect. **CONCLUSION** Neonatal exposure to Flu induces an adult depression model in ICR mice that exerts good predictive validity and face validity, and is likely very valuable potential behavioral and pathological model for depression.

Key words: model, neurological; model, animals; fluoxetine; depression

Foundation item: The project supported by National Science and Technology Major Project of Original New Drug Research of China (2012ZX09J12201-004); National Natural Science Foundation of China (81072624); National Natural Science Foundation of China (81173036)

Corresponding author: LI Yun-feng, Tel: (010)66930650, E-mail: lyf619@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2012-06-06 接受日期: 2012-08-20)

(本文编辑: 乔虹)