论著

文章编号:1000-5404(2014)18-1876-05

5-羟色胺转运体敲除小鼠在高架十字迷宫中下丘脑 CRF mRNA 表达的变化

文 玲[1],邓永兵[1,2],朱小云[1],蒋 雪[1] (400016 重庆,重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室[1];400014 重庆,重庆市急救医疗中心神经外科[2])

[摘要] **目的** 研究5-羟色胺转运体(serotonin transporter,SERT)敲除小鼠在高架十字迷宫(elevated plus maze,EPM)中下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子(corticotrophin-releasing factor, CRF) mRNA 表达的变化。**方法** 将小鼠按基因型($SERT^{+/+}$、$SERT^{+/-}$、$SERT^{-/-}$)分为对照组和EPM组,每组10只,EPM组利用高架十字迷宫作为应激原刺激小鼠。测定各组小鼠下丘脑以及室旁核部位 CRF mRNA 的表达。**结果** 在基础条件下(对照组),SERT 敲除小鼠下丘脑及室旁核的 CRF mRNA 表达降低($P<0.05$);EPM 刺激下(EPM 组),$SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠在下丘脑及室旁核的 CRF mRNA 表达显著高于 $SERT^{+/+}$($P<0.01$);构建的 CRF mRNA 探针反义链在下丘脑 PVN 部位检测到高密度的 CRF mRNA,而正义链却不能探测到 CRF mRNA;EPM 组 hnRNA $SERT^{-/-}$ 小鼠表达较对照组明显增高($P<0.01$)。**结论** 应激能明显促进下丘脑 CRF mRNA 的表达。SERT 敲除小鼠的异常应激与 CRF mRNA 的表达升高有关。

[关键词] 5-羟色胺转运体;高架十字迷宫;下丘脑;室旁核;肾上腺皮质激素释放激素

[中图法分类号] R338.27;R363.27;R394.3 [文献标志码] A

Alteration of CRF mRNA expression in hypothalamus of SERT-knockout mice exposed to elevated plus maze

Wen Ling[1], Deng Yongbing[1,2], Zhu Xiaoyun[1], Jiang Xue[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurosurgery, Emergent Medical Center, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] Objective To determine the expression alteration of corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA in the hypothalamus of serotonin transporter (SERT)-knockout mice exposed to elevated plus maze (EPM). Methods Mice were divided into 2 groups, a control group and an EPM group, according their genotypes ($SERT^{+/+}$, $SERT^{+/-}$, and $SERT^{-/-}$), with 10 mice in each group. EPM was used as a stressor to stimulate the mice. Then anxious like behavior was observed, and the CRF mRNA expression in the hypothalamus and nucleus paraventricularis (PVN) were measured. Results The non-stress expression of CRF mRNA in the hypothalamus and PVN were lower in both $SERT^{+/-}$ and $SERT^{-/-}$ mice than in $SERT^{+/+}$ mice ($P<0.05$). Exposure to the EPM significantly increased CFR mRNA in the hypothalamus and PVN of $SERT^{+/-}$ and $SERT^{-/-}$ mice ($P<0.05$), higher than that of the $SERT^{+/+}$ mice. CRF mRNA antisense probes in the PVN detected high density of CRF mRNA, but CRF sense mRNA did not. With exposure to the EPM, the expression of hnRNA in $SERT^{-/-}$ mice was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$). Conclusion Stress from exposure to EPM significantly increases CRF mRNA expression in the PVN and hypothalamus of $SERT^{+/-}$ and $SERT^{-/-}$ mice. The abnormal stress reaction of SERT-knockout mice is associated with the increased CRF mRNA expression.

[**Key words**] serotonin transporter; elevated plus maze; hypothalamus; nucleus paraventricularis; corticotrophin-releasing factor

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81001017), the Science and Technology Foundation of Chongqing Commission of Education (2010-5) and the Science and Technology Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-2-254). Corresponding author: Jiang Xue, E-mail: jiangxue868@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81001017);重庆市教育委员会科技基金(渝教科文2010-5);重庆市卫生局科技基金(渝教科文2012-2-254)

[通信作者] 蒋 雪,E-mail: jiangxue868@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1457.023.html(2014-18-21)

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)是一种重要的神经递质,其同摄食、睡眠、运动、认知等多种生理功能有关,而且对患有焦虑、抑郁等情感性精神障碍的患者发挥重要作用。5-羟色胺转运体(serotonin transporter,SERT)是一种重要的神经递质转运蛋白家族的成员,主要分布在5-HT神经元细胞轴突和树突的核周体及末梢。SERT是调节5-HT的一个重要信号通路,它可以将5-HT再摄取回5-HT神经元内进行降解或再循环利用,从递质的量和递质与受体的作用时间上对信息传递进行调控。因此,SERT不仅控制着5-HT的浓度,而且控制着5-HT与其受体的作用。有研究显示表达或功能异常的SERT有助于对焦虑和抑郁等情感性精神性障碍病因学的研究[1]。SERT基因的多态性和情感性精神障碍有关[1]。大量研究证实:SERT敲除小鼠在行为学方面和人类情感性精神障碍的一样,在应激条件下更容易产生焦虑等症状,并且采用SERT敲除小鼠作为研究情感性精神障碍的模型[1-3]。

下丘脑-垂体-肾上腺皮质(hypothalamic-pituitary-adrenal cortex,HPA)轴是重要的神经内分泌循环通路,其主要通过分泌肾上腺皮质激素激活一系列信号转导通路来帮助机体对抗应激。促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin-releasing factor,CRF)对HPA轴的活性调节发挥重要作用,它控制着HPA轴的活性水平。CRF广泛分布于中枢神经系统,但以下丘脑含量最高。下丘脑及下丘脑室旁核等部位的CRF神经元及神经元数量对应对外来应激都有重要关系。有研究表明,中枢神经系统的CRF可直接调节患有抑郁和焦虑的精神病患者,而且患有抑郁等精神病患者的脑脊液中CRF的浓度增高。我们推测CRF与情感性精神障碍有密切关系。Fox等[4]的研究表明:CRF及其相关蛋白可能通过改变5-HT神经元的活性调节抑郁、受压等情感性精神病患者的情绪、情感及行为。在我们的前期研究中,已经证实本实验建立的SERT敲除小鼠可作为研究情感性精神障碍的模型,高架十字迷宫(elevated plus maze,EPM)可作为应激反应的稳定刺激源并且也发现SERT敲除小鼠在EPM实验的刺激下出现焦虑类似行为[3]。Bale等[5]的研究报道:EPM作为应激的小鼠模型对抗焦虑药物非常敏感而且被认为是检测镇静和抗焦虑药物最佳应激刺激之一。也有研究表明,EPM刺激下的SERT敲除小鼠有焦虑类似性行为[1,5-6]。我们前期研究也发现:EPM刺激下,ACTH以及皮质酮分泌较野生型小鼠明显升高,表明SERT敲除小鼠的HPA轴对应激的反应更加敏感[3]。但是,导致SERT敲除小鼠的HPA轴对应激的反应更加敏感分子机制仍然不清。所以本实验利用已建立的SERT敲除小鼠应激模型,对SERT敲除小鼠CRF mRNA的表达进行系统的研究,由于CRF在中枢神经系统中下丘脑的含量最高,而室旁核(paraventricular nucleus, PVN)是CRF合成的起始部位,所以本实验检测了下丘脑及PVN两个部位的CRF mRNA的表达,旨在为研究SERT敲除小鼠HPA轴对应激敏感性增加的分子机制提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

基因型为$SERT^{+/-}$小鼠购自Taconic farm公司,雌雄小鼠进行交配,产下子代小鼠的基因型通过基因型PCR进行鉴定[3]。用于实验的60只小鼠为2~5个月龄、体质量为20~25 g,由重庆医科大学提供。

1.2 仪器和试剂

高架十字迷宫:San Diego公司;PCR仪、微量离心机:Bio-Rad公司;冰箱等常用仪器:重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心实验室。^{35}S-UTP:Amersham公司;体外转录试剂盒:Fermentas公司;7500 fast Real-time PCR System试剂盒:Applied Biosystems公司;ProbQuant G-50 micro column:Pharmacia公司;大肠杆菌*E. coli* DH10B.、PCRⅡ-TOPO TA克隆载体和PCR试剂盒:Invitrogen公司;常规试剂:Sigma公司。

1.3 动物实验方法

将小鼠按3个基因型($SERT^{+/+}$、$SERT^{+/-}$、$SERT^{-/-}$)分为对照组和EPM组,每组10只。EPM组按照文献[6-7]进行EPM刺激:小鼠被放置在十字高架的中心区域,面对开放的手臂,自由活动5 min,然后立即处死小鼠。对照组小鼠在拿出笼子后立即被处死。

1.4 下丘脑CRF mRNA的测定

处死小鼠后立即取出大脑组织放置于冰上,将下丘脑部分从大脑中取出,用TRIzol法提取总RNA,实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测CRF mRNA表达量,TATA盒结合蛋白(TBP)mRNA作为内参照[8]。CRF mRNA上游引物序列:5′-CACCTACCAAGGGAGGAGAA-3′;下游引物序列:5′-CAGAGCCACCAGCAGCAT-3′。内参TBP mRNA上游引物序列:5′-GGCCTCTCAGAAGCATCACTA-3′;下游引物序列:5′-GCCAAGCCCTGAGCATAA-3′。反应条件为:50 ℃,2 min;95 ℃,10 min;然后95 ℃,0.15 min;60 ℃,1 min,50个循环。

1.5 ^{35}S标记的CRF hnRNA和mRNA探针制备

用分子探针的引物对目的基因的片段进行PCR扩增,CRF mRNA上游引物序列:5′-CTCTGCAGAGGCAGCAGTG-3′,下游引物序列:5′-GCTAACTGCTCTGCCCGG-3′,产物长度221 bp;CRF hnRNA上游引物序列:5′-CTCTGCAGAGGCAGCAGTG-3′,下游引物序列:5′-CTCAGCTGGAAGGTGCAG-3′[6]。反应条件:95 ℃,5 min;94 ℃,30 s;56 ℃,30 s退火;72 ℃,30 s延伸,共35个循环,72 ℃延伸10 min。2%琼脂糖凝胶电泳,目的片段回收纯化,克隆于PCR Ⅱ-TOPO TA克隆载体上,筛选阳性克隆。含有正确目的片段的质粒用下述的限制性核酸内切酶消化(表1)、纯化、浓缩。体外转录:37 ℃孵育至少1 h后去除

DNA 模板,终止反应。分离^{35}S-UTP 标记分子探针和游离^{35}S-UTP,纯化并测定探针的放射性。探针的放射性要求应该在$(2\sim6)\times10^6$ cpm/μL。

表1 CRF hnRNA 和 mRNA 探针制备限制性核酸内切酶

核糖核酸探针		内切酶	核糖核酸聚合酶
CRF mRNA	正义链	*Hind*Ⅲ	T7
	反义链	*Not*Ⅰ	SP6
CRF hnRNA	正义链	*Not*Ⅰ	SP6
	反义链	*Hind*Ⅲ	T7

1.6 组织切片制备和原位杂交

在低温切片机内将冰冻的大脑按其冠状面切成 15 μm 厚的组织切片,脑组织切片区域包括从下丘脑直到海马[7]。为了控制由于玻片之间的不同造成的改变,每张玻片上都含有 3 个基因型小鼠的组织各 3 张。选取下丘脑部位的组织切片,依次用4% 多聚甲醛溶液和含有 0.25% 醋酸酐的 0.1 mol/L 三乙醇胺溶液进行预处理处理,以降低分子探针的非特异性杂交背景。组织切片脱水,室温干燥。根据需要杂交的玻片数目配制杂交溶液,取 120 μL 杂交溶液放在组织切片上,覆上盖玻片,置于 54 ℃的潮湿环境,孵育 16 h。反复洗涤,常规脱水,室温干燥后,按照一定顺序把玻片放入显影盒,覆上 Kodak Biomax MR 胶片,密封放入 -80 ℃冰箱。大约 10 d 后取出胶片进行显影和定影,采用 Research Image 公司提供的 MCID 图像分析程序进行分析。

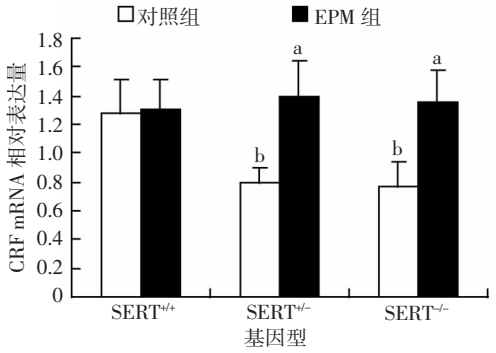
1.7 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较经方差齐性检验方差齐,再进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 EPM 对下丘脑 CRF mRNA 表达的影响

在基础条件下(对照组),与 SERT$^{+/+}$小鼠相比,SERT$^{+/-}$和 SERT$^{-/-}$小鼠下丘脑 CRF mRNA 表达明显降低($P<0.05$,图 1)。5 min EPM 刺激(EPM 组)虽然没有改变 SERT$^{+/+}$小鼠 CRF mRNA 的表达,但是 SERT$^{+/-}$和 SERT$^{-/-}$小鼠的 CRF mRNA 在下丘脑的表达却显著升高($P<0.01$,图 1)。

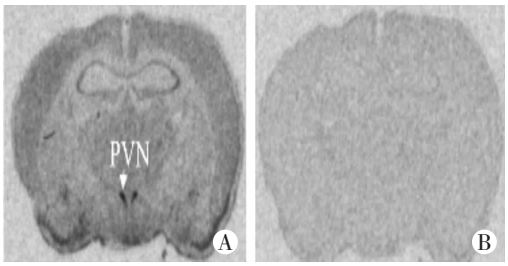


a: $P<0.01$, 与对照组比较;b: $P<0.05$, 与 SERT$^{+/+}$小鼠比较

图1 各组小鼠下丘脑 CRF mRNA 表达的变化

2.2 EPM 对 PVN 部位 CRF mRNA 及 CRF hnRNA 表达的影响

构建的 CRF mRNA 探针反义链在下丘脑 PVN 部位检测到高密度的 CRF mRNA,而正义链却不能探测到 CRF mRNA(图 2)。这说明本研究构建的探针有很高的特异性。



A:反义链;B:正义链

图2 ^{35}S 标记的 CRF mRNA 探针在 PVN 部位的原位杂交结果

在基础条件下(对照组),与 SERT$^{+/+}$小鼠相比,SERT$^{+/-}$和$^{-/-}$小鼠 PVN 的 CRF mRNA 表达显著降低,而 CRF hnRNA 却显著升高($P<0.01$)。EPM 组中,虽然 5 min EPM 刺激没有改变 SERT$^{+/+}$小鼠 CRF mRNA 的表达,但是 SERT$^{+/-}$和 SERT$^{-/-}$小鼠 CRF mRNA 在 PVN 的表达均明显升高($P<0.01$)。所有基因型小鼠 PVN 的 CRF hnRNA 表达在 5 min EPM 刺激后均升高,但只有 SERT$^{+/+}$和 SERT$^{-/-}$小鼠的升高显著($P<0.01$)。从原位杂交测得的下丘脑 PVN 部位的 CRF mRNA 和 CRF hnRNA 的表达情况,我们可以看到 EPM 组的 SERT$^{+/-}$和 SERT$^{-/-}$小鼠 CRF mRNA 表达较对照组明显升高,EPM 组的 SERT$^{-/-}$小鼠 CRF hnRNA 表达较对照组明显升高($P<0.01$,图 3~6)。

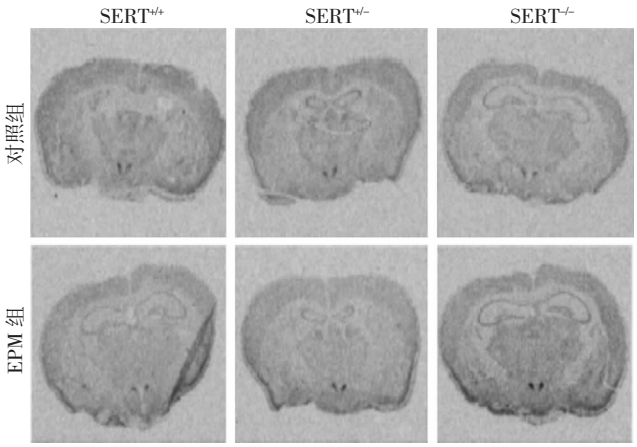
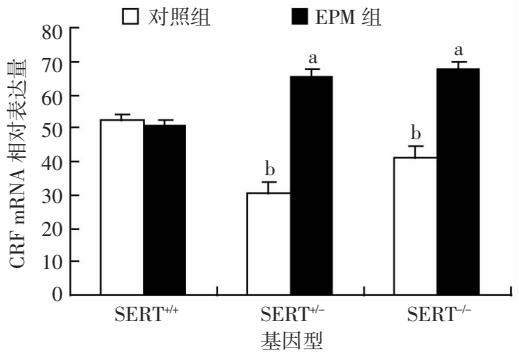


图3 各组小鼠 PVN 部位原位杂交 CRF mRNA 表达的变化



a: $P<0.01$, 与对照组比较; b: $P<0.05$, 与 SERT$^{+/+}$小鼠比较

图4 各组小鼠 PVN 部位 CRF mRNA 表达变化的定量分析

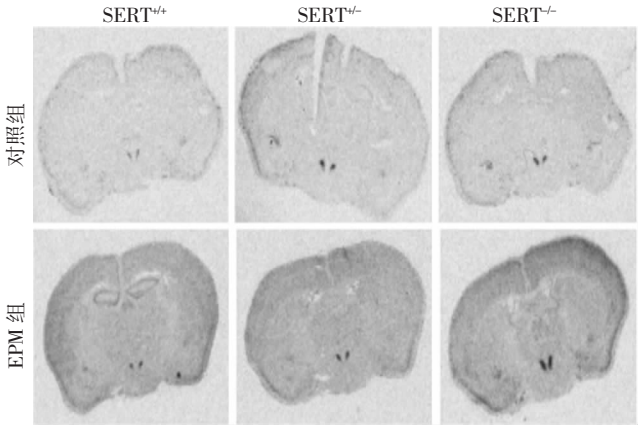
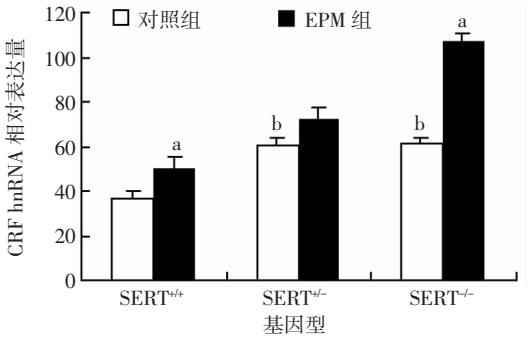


图5 各组小鼠 PVN 部位原位杂交 CRF hnRNA 表达的变化



a: $P<0.01$, 与对照组比较;b: $P<0.01$, 与 $SERT^{+/+}$ 小鼠比较

图6 各组小鼠 PVN 部位 CRF hnRNA 表达变化的定量分析

3 讨论

CRF 是由41个氨基酸组成的神经递质,经垂体门静脉系统流到垂体,与其受体结合后直接作用于腺垂体的促肾上腺皮质分泌细胞,促进 ACTH 的分泌[9-10]。研究表明,CRF 在许多物质代谢、神经分泌及调节适应外界刺激等方面都发挥着重要作用[11]。在受到应激刺激时,PVN 通过增加 CRF 的分泌来适应外界刺激,从而维持各组织器官的平衡和 ACTH 的分泌。CRF 分泌增加被认为是 HPA 轴活动性增加的基本原因,并且也被认为和焦虑、情感性精神障碍等疾病的病理生理学及病因学有关[12]。在临床研究中发现,抑郁、焦虑或自杀倾向等精神障碍的患者下丘脑的 CRF 神经元数量要明显高于正常人[13]。前期的研究已经证明在受到应激刺激时 ACTH 以及皮质酮分泌较野生型小鼠明显升高,表明 SERT 敲除小鼠的 HPA 轴对应激的反应更加敏感[3]。但是,导致 SERT 敲除小鼠的 HPA 轴对应激的反应更加敏感分子的机制仍然不清楚。所以,本实验通过对 CRF mRNA 的测定来更清楚地了解 HPA 轴对应激反应更加敏感的分子机制。

PVN 是 HPA 轴活动的起始部位,在受到刺激时,PVN 的 CRF 神经元分泌 CRF,通过调节一系列的信号通路,进而动员机体对抗应激反应。本研究从下丘脑和 PVN 两个部位进行研究,我们分别对 $SERT^{+/+}$、$SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠在基础和刺激条件下,从基因表达方面进行了研究。用 qPCR 检测 CRF mRNA 表达量,结果显示,在基础条件下与 $SERT^{+/+}$ 小鼠相比,$SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠下丘脑部位的 CRF mRNA 表达明显降低($P<0.05$),表明 SERT 敲除小鼠 HPA 轴的基础活性全面减弱。5 min EPM 刺激后,与对照组相比,虽然没有改变 $SERT^{+/+}$ 小鼠 CRF mRNA 的表达,但是 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠的 CRF mRNA 在下丘脑的表达却显著升高($P<0.01$)。结合前期研究,基础条件下 ACTH 的变化并不明显,5 min EPM 刺激后 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠 ACHT 明显增加,说明 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠对应激反应的敏感性增加[3]。我们从基础条件下和 EPM 刺激条件下分别进行分析:在基础条件下 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠下丘脑的 CRF mRNA 表达明显降低($P<0.05$),而 ACTH 的变化并不明显。造成这种差异的原因是:基础条件下 CRF mRNA 表达的改变,并不意味着 CRF 神经元能在5 min 内会有显著变化,只有下丘脑释放的 CRF 明显变化时,HPA 轴才会表现出对应激的敏感性差异。所以基础条件下 CRF mRNA 明显降低而 ACTH 却并没有明显改变。也就是说在没有外来刺激的情况下,$SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠并没有异常的敏感反应。对小鼠进行5 min EPM 刺激后 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠 CRF mRNA 和 ACTH 的表达都增高,同样的 5 min,EPM 条件下 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠的 CRF mRNA 和 ACTH 都升高,也就是说 5 min 刺激加速了 CRF mRNA 生成到 ACTH 分泌的过程,正说明了 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠对应激反应的敏感性增加。本研究结果与文献[14]报道结果相一致。所以我们推测是由于 EPM 的刺激引起 CRF mRNA 的增高进而引起 CRF 表达升高,CRF 促进了 ACTH 分泌增加。由于 PVN 在 HPA 轴活动的重要作用,因此我们用原位杂交进行了进一步的验证。原位杂交中测得 CFR mRNA 的表达也增加。如图2所示,构建的 CRF mRNA 探针反义链在下丘脑 PVN 检测到高密度 CRF mRNA,而正义链没有检测到 CRF mRNA。这表明我们构建的探针具有很高的特异性。原位杂交后测得 PVN 部位 EPM 组的 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠 CRF mRNA 表达明显比对照组增高。其结果与 qPCR 检测 CRF mRNA 表达结果一致。这进一步表明 SERT 敲除小鼠的 HPA 轴对应激条件的活性被明显加强,也提示我们 CRF mRNA 表达的增加和小鼠在应激状态下的异常反应有关。由于只在 PVN 检测到 CRF mRNA探针加上下丘脑和 PVN 测得的 CRF mRNA 含量基本相一致,也说明 CRF mRNA 主要存在于 PVN。综合以上结果,我们

可以推测,当小鼠在受到 EPM 刺激时,刺激 PVN 使 CRF mRNA 表达增加,进而引起 CRF 表达增加,CRF 作用于腺垂体引起 ACTH 的升高,从而导致了异常的应激反应。其分子机制需要进一步研究。

mRNA 在发挥生物作用前有个成熟的过程,hnRNA 即为 mRNA 的前体。所以为了确定 EPM 的刺激到底作用于转录过程中哪一部分,我们进一步检测了 hnRNA 的表达。结果显示所有基因型小鼠 PVN CRF hnRNA 表达在 5 min EPM 刺激后升高,但只有 $SERT^{+/+}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠明显升高($P<0.01$)。与此对应的 CRF mRNA 的表达:$SERT^{+/+}$ 组 CRF mRNA 的升高却并不显著。这是由于大脑内转录、翻译等调节至少需要 1 h 才能完成,而且文献[15]也报道 CRF hnRNA 比 CRF mRNA 更容易检测。文献[12]表明,mRNA 水平的改变出现在应激反应开始 30 min 以后,对于 5 min 刺激后不足以使 mRNA 表达有显著变化,而 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠的 CRF mRNA 表达却有显著差异,更进一步证明了 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠对应激敏感性增加,同时也表明了 EPM 对 CRF mRNA 的刺激作用至少在转录初期,但具体的作用机制仍需要进一步的研究。

有研究表明,与 $SERT^{-/-}$ 小鼠相比,$SERT^{+/-}$ 小鼠与情感性精神障碍者在许多方面都表现出更多的相似性[3]。还有研究显示,就神经细胞凋亡方面来说,$SERT^{-/-}$ 小鼠比 $SERT^{+/-}$ 小鼠损失更明显,进而影响大脑的多种机制,并且 $SERT^{+/-}$ 小鼠对受体和应激的敏感性比 $SERT^{-/-}$ 要高[15]。对于研究人类情感精神性障碍,$SERT^{+/-}$ 更能把各种可能的干扰因素降到最低,能清楚地反映 HPA 轴反应机制及其药理学作用[15]。本研究结果显示,$SERT^{+/-}$ 与 $SERT^{-/-}$ 相比,CRF hnRNA 的表达无统计学差异,但 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠与 $SERT^{+/+}$ 基因型小鼠的 CRF mRNA 相比都与有统计学差异,所以两种基因小鼠对情感性精神障碍疾病的研究都具有代表意义。

综上所述,SERT 敲除小鼠在 EPM 刺激下,CRF mRNA 的表达增高很可能与小鼠对应激反应异常有关,而 CRF hnRNA 表达量的增高表明 EPM 对 CRF mRNA 的刺激作用在至少在转录初期。这为 SERT 敲除小鼠 HPA 轴对应激反应更加敏感提供了更进一步的依据。

由于 $SERT^{+/-}$ 小鼠与情感性精神障碍患者非常相似,因此利用 $SERT^{+/-}$ 小鼠研究清楚导致其 HPA 轴应激反应更敏感的机制将为研究人类情感性精神障碍的发病机制提供证据,并且为这些疾病的治疗提供更好的途径。

参考文献:

[1] Holmes A, Yang R J, Lesch K P, *et al*. Mice Lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT(1A) receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior[J]. Neuropsychopharmacology, 2003, 28(12): 2077-2088.

[2] Holmes A, Murphy D L, Crawley J N. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression[J]. Biol Psychiatry, 2003, 54(10): 953-959.

[3] 蒋雪, 邓永兵, 安娜, 等. 5-羟色胺转运体敲除小鼠在应激下焦虑行为和 HPA 轴的改变[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(1): 58-61.

[4] Fox J H, Lowry C A. Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior[J]. Front Neurosci, 2013, 7: 169.

[5] Bale T L, Picetti R, Contarino A, *et al*. Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior[J]. J Neurosci, 2002, 22(1): 193-199.

[6] Thakur P, Rana A C. Effect of Cissampelos Pareira Leaves on Anxiety-like Behavior in Experimental Animals[J]. J Tradit Complement Med, 2014, 3(3): 188-193.

[7] Holmes A, Parmigiani S, Ferrari P F, *et al*. Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety[J]. Physiol Behav, 2000, 71(5): 509-516.

[8] Pattyn F, Speleman F, De-Paepe A, *et al*. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(1): 122-123.

[9] Lee B, Shim I, Lee H, *et al*. Effect of ginsenoside Re on despression- and anxiety-like behavions and cognition memory deficit induced by repeated immobilization in rats[J]. J Microbiol Biotechnol, 2012, 22(5): 708-720.

[10] Flandreau E I, Bourke C H, Ressler K J, *et al*. Escitalopram alters gene expression and HPA axis reactivity in rats following chromic overexpression of corticotrophin-releasing factor from the central amygdale[J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38(8): 1349-1361.

[11] Gutman D A, Owens M J, Thrivikraman K V, *et al*. Persistent anxiolytic affects after chronic administration of the CRF1 receptor antagonist R121919 in rats[J]. Neuropharmacology, 2011, 60(7/8): 1135-1141.

[12] Wang H, Spiess J, Wong P T, *et al*. Blockade of CRF1 and CCK2 receptors attenuated the elevated anxiety-like behavior induced by immobilization stress[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2011, 98(3): 362-368.

[13] Bethea C L, Lima F B, Centeno M L, *et al*. Effects of citaupram on serotonin and CRF systems in the midbrain of primates with differences in stress sensitivity[J]. J Chem Neuroanat, 2011, 41(4): 200-218.

[14] Fan J M, Chen X Q, Jin H, *et al*. Gestational hypoxia alone or combined with restraint sensitizes the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and induces anxiety-like behavior in adult male rat offspring[J]. Neuroscience, 2009, 159(4): 1363-1373.

[15] Kalueff A V, Ren-Patterson R F, Murphy D L. The developing use of heterozygous mutant mouse models in brain monoamine transporter research[J]. Trends Pharmacol Sci, 2007, 28(3): 122-127.

(收稿:2014-03-07;修回:2014-05-25)

(编辑 郭建秀)