

肥胖与抑郁共病小鼠模型建立及在雷公藤红素药效药理研究中的应用

池宏宇^{1,2}, 姚雪敏², 张国鑫², 田聪敏², 梁婷钧², 李佳豪², 杨俊², 朱春燕^{2*}, 林娜^{1,2*}

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510405;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的:拟建立一种基于神经炎症的肥胖合并抑郁(COM)小鼠模型,并观察雷公藤红素对COM小鼠的药效作用及初步药理机制。方法:C57BL/6J小鼠随机分为正常组(Chow)、肥胖组(DIO)、肥胖抑郁共病组(COM),COM组采用高脂饮食喂养和潮湿垫料慢性应激12周,建立小鼠肥胖抑郁共病模型。C57BL/6J小鼠随机分为Chow组、COM组、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)敲低组,TNF- α 敲低组通过脑立体定位在杏仁核注射TNF- α shRNA腺相关病毒,下调杏仁核中TNF- α 表达量。C57BL/6J小鼠随机分为Chow组、DIO组、肥胖+雷公藤红素低剂量组(DIO-0.5 mg·kg⁻¹)、肥胖+雷公藤红素高剂量组(DIO-1.0 mg·kg⁻¹)、COM组、共病+雷公藤红素低剂量组(COM-0.5 mg·kg⁻¹)、共病+雷公藤红素高剂量组(COM-1.0 mg·kg⁻¹)。记录体质量、进食量、葡萄糖耐量、白/棕脂率、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高/低密度脂蛋白胆固醇(HDL-C、LDL-C)含量,评估各组小鼠肥胖程度;强迫游泳实验(FST)、悬尾实验(TST)和旷场实验,评估各组小鼠抑郁程度;免疫荧光检测小鼠各个脑神经核团神经肽Y、色氨酸羟化酶2(TPH2)、脑源性神经营养因子(BDNF)等蛋白表达含量;相关性分析检测各组小鼠肥胖和抑郁指标相关性。**结果:**与Chow和DIO组比较,COM小鼠表现为肥胖和抑郁;肥胖表现为体质量和食物摄入明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),中央杏仁核中NPY表达明显增加;抑郁表现为FST和TST中的不动时间显著增加($P<0.01$)、中缝背核(DRN)和杏仁核基底外侧核(BLA)中TPH2阳性5-羟色胺能神经元数量明显减少。COM小鼠BLA中TNF- α 蛋白的下调能减少FST和TST中的不动时间($P<0.05$, $P<0.01$),明显增加BLA中TPH2/BDNF阳性神经元,肥胖表现没有显著变化。在DIO小鼠中,0.5 mg·kg⁻¹雷公藤红素给药9 d显著降低葡萄糖耐量60 min血糖($P<0.01$)、摄食量($P<0.05$);而COM小鼠中,1.0 mg·kg⁻¹雷公藤红素需给药14 d以显著降低葡萄糖耐量30 min血糖($P<0.01$)、摄食量($P<0.05$)和悬尾不动时间($P<0.01$),以及能使BLA和DRN中TPH2-BDNF双标细胞数量增加,TMEM119染色的细胞体面积显著减少。**结论:**在能量环境双重压迫条件下可以成功建立肥胖合并抑郁的小鼠模型;雷公藤红素能有效干预肥胖-抑郁共病,其机制可能与抑制中枢神经炎症有关。

【关键词】 动物模型; 肥胖; 抑郁; 共病; 小胶质细胞; 杏仁核; 雷公藤红素

【中图分类号】 R2-0;R33;R285;R246.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2022)14-0081-11

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20221341

【网络出版地址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220527.1028.001.html>

【网络出版日期】 2022-05-27 17:29

Establishment of A Mouse Model of Obesity and Depression Comorbidity and Its Application in Pharmacological Study of Tripterine

CHI Hongyu^{1,2}, YAO Xuemin², ZHANG Guoxin², TIAN Congmin², LIANG Tingjun²,

LI Jiahao², YANG Jun², ZHU Chunyan^{2*}, LIN Na^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510405, China;

【收稿日期】 2022-03-18

【基金项目】 北京市自然科学基金项目(72121185);中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人才(创新类)培养专项(ZZ13-YQ-051)

【第一作者】 池宏宇,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:15735641375@163.com

【通信作者】 *朱春燕,博士,助理研究员,从事中药药理学研究,E-mail:xijiangyue3013@163.com;

*林娜,博士,研究员,从事中药药理学研究,E-mail:linna888@163.com

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a neuroinflammation-based obesity and depression comorbidity (COM) model in mice and explore the pharmacodynamics and preliminary pharmacological mechanism of tripterine on COM mice. **Method:** C57BL/6J mice were randomly divided into a normal group (Chow), a diet-induced obesity group (DIO), and a COM group. The mice in the COM group were fed on a high-fat diet and chronically stressed with moist litter for 12 weeks to establish the COM model. C57BL/6J mice were randomly divided into a Chow group, a COM group, and a tumor necrosis factor- α (TNF- α) knock-down group. In the TNF- α knock-down group, TNF- α shRNA adeno-associated virus was injected into the amygdala through brain stereotaxis, and the expression of TNF- α in the amygdala was down-regulated. C57BL/6J mice were randomly divided into a Chow group, a DIO group, a DIO + low-dose tripterine group ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), a DIO + high-dose tripterine group ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), a COM group, a COM + low-dose tripterine group ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and a COM + high-dose tripterine group ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The body weight, food intake, glucose tolerance, white/brown fat ratio, serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and high-/low-density lipoprotein cholesterol (HDL-C and LDL-C) content were recorded, and obesity of mice in each group was evaluated. Forced swimming test (FST), tail suspension test (TST), and open field test were used to evaluate the degree of depression of mice in each group. Immunofluorescence staining was used to detect the protein expression levels of neuropeptide Y, tryptophan hydroxylase 2 (TPH2), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in various brain nuclei of mice. Correlation analysis was used to detect the correlation of obesity and depression indexes. **Result:** The comparison of the Chow group and the DIO group indicated that COM mice showed obesity and depression. To be specific, obesity was manifested as increased body weight and food intake ($P < 0.05$, $P < 0.01$), as well as increased NPY expression in the central amygdala, and depression was manifested as prolonged immobility time in FST and TST ($P < 0.01$), and reduced TPH2-positive 5-hydroxytryptamine neurons in the dorsal raphe nucleus (DRN) and basolateral nucleus of the amygdala (BLA). The down-regulation of TNF- α protein in BLA of COM mice shortened the immobility time in FST and TST ($P < 0.05$, $P < 0.01$), increased TPH2/BDNF-positive neurons in BLA, and showed no significant changes in obesity. In DIO mice, the administration of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tripterine for 9 days significantly decreased the 60 min blood glucose in glucose tolerance ($P < 0.01$) and food intake ($P < 0.05$). In COM mice, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tripterine was administered for 14 days to significantly decrease 30 min blood glucose in glucose tolerance ($P < 0.01$), and food intake ($P < 0.05$), and immobility time in TST ($P < 0.01$), increase TPH2-BDNF double-labeled cells in BLA and DRN, and reduce the area of TMEM119-stained cells. **Conclusion:** The model of obesity and depression comorbidity can be properly induced in mice under the condition of dual stress of energy environment. Tripterine can effectively interfere with obesity-depression comorbidity, and its mechanism may be related to the inhibition of central nervous system inflammation.

[Keywords] animal model; obesity; depression; comorbidity; microglia; amygdala; tripterine

肥胖和抑郁已成为世界性的健康问题,具有发病率高、并发症多等特点^[1]。临床研究表明,患有抑郁症的成年人有43%是肥胖的,患有精神疾病的成年人比那些心理健康的人更有可能肥胖^[2];与非超重个体比较,肥胖个体患一些精神疾病(如抑郁症)的风险更大^[3]。且越来越多的流行病学研究证实,肥胖和抑郁之间存在相互恶化的关系^[4]。现有药物

通常用于单一肥胖或抑郁,难以兼顾二者。因此,肥胖和抑郁的共病成为了近年来的研究热点。国内外研究单一肥胖或抑郁的动物模型较多,而尚未见肥胖-抑郁共病模型的研究。现阶段研究认为,肥胖通常与轻度炎症有关,在肥胖状态下,外周的巨噬细胞和其他免疫细胞浸润白色脂肪细胞产生促炎细胞因子,再通过体液、神经和细胞途径引发中

枢神经炎症^[5]。在应激情况下,机体适应性地产生促炎性细胞因子,诱导氧化应激性脑损伤和中枢神经炎症,导致5-羟色胺(5-HT)系统损伤,从而造成抑郁^[6]。肥胖和抑郁具有部分共同的生物学机制,其中多认为中枢神经炎症可能是共病的关键^[7]。

雷公藤红素是中药雷公藤的主要活性成分之一,现代药理学研究表明其具有减肥、抗炎等多种生物活性^[8],近年研究也显示其能分别缓解肥胖^[9-12]和抑郁^[13-14],对中枢神经炎症也有一定的干预作用^[15-16],但对肥胖-抑郁共病的作用如何,则尚未见研究报道。本研究拟以神经炎症角度建立肥胖与抑郁共病的小鼠模型,并利用这一模型进一步观察雷公藤红素对肥胖合并抑郁的干预作用及初步机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性C57BL/6J小鼠,3周龄,体质量6~8 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0010。饲养于中国中医科学院中药研究所动物房,使用许可证号SYXK(京)2019-0003,昼夜节律,维持(25±2)℃恒温。本课题获得中国中医科学院中药研究所动物福利伦理委员会批准,审批号2021B087。

1.2 药品与试剂 雷公藤红素(纯度>97.0%,中国食品药品检定研究所,批号111946-201501);兔抗色氨酸羟化酶2(TPH2)抗体、兔抗跨膜蛋白119(TMEMP119)抗体、羊抗脑源性神经营养因子(BDNF)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab184505、ab209064、ab75040);兔抗神经肽Y(NPY)抗体(美国CST公司,批号11976X);小鼠抗肿瘤坏死因子-α(TNF-α)抗体(西班牙Santa Cruz Biotechnology公司,批号sc-52746);荧光二抗羊抗兔488、荧光二抗羊抗兔594、荧光二抗羊抗兔488、荧光二抗羊抗鼠594、荧光二抗兔抗羊594(北京凯瑞力枫生物科技有限公司,批号分别为E032220-01、E032210-01、E032420-01、E032410-01、E032430-01);TNF-α shRNA腺相关病毒(美国Vigene Biosciences公司,批号20201110012);高脂饲料[(美国Research Diet公司,批号D12492,5.24 kcal·g⁻¹(1 cal≈4.2 J),成分配比为60%脂肪、20%碳水化合物、20%蛋白质)];普通饲料(北京科澳协力饲料有限公司,批号20073221,3.40 kcal·g⁻¹);葡萄糖(广西梧州制药集团股份有限公司,批号101115);总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒

(中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为182041、187951、180721、191291)。

1.3 仪器 GU00450763型血糖仪及2103178型试纸(德国Roche公司),1210B1210型冰冻切片机(美国Thermo Scientific公司),BX41型正置荧光显微镜(日本Olympus公司),TBA-120FR型全自动生化检测仪(日本Toshiba公司),68505型脑室立体定位仪、62004型套管(深圳瑞沃德生命科技有限公司);悬尾箱和旷场箱为中国中医科学院中药研究所自制。

2 方法

2.1 肥胖-抑郁共病模型建立及动物分组 60只3周龄雄性C57BL/6J小鼠随机分为3组($n=20$),分别为正常组(Chow组)、肥胖组(DIO组)、肥胖抑郁共病组(COM组)。Chow组小鼠给予普通饲料,DIO组和COM组小鼠给予高脂饲料。Chow组和DIO组小鼠每3 d更换一次垫料,COM组前4周不更换垫料,后8周每2周更换一次垫料,更换时使用50%新垫料+50%旧垫料,并使用纯净水每3 d喷湿所有垫料1次。

2.2 脑立体定位注射及动物分组 将27只3周龄雄性C57BL/6J小鼠随机分为3组($n=9$),分别为Chow组、COM组、TNF-α敲低组。其中Chow组小鼠给予普通饲料,COM和TNF-α敲低组小鼠给予高脂饲料和潮湿垫料慢性应激。饲养4周后,将编码non-shRNA-GFP的腺相关病毒注射到Chow和COM组小鼠脑内,将编码TNF-α-shRNA-GFP的腺相关病毒注射到共病小鼠脑内,注射位置选取相对于小鼠的囟门和硬脑膜表面,前后:-1.2 mm,左右:±2.8 mm,深度:-3.9 mm。术后继续喂养观察6周,检测小鼠肥胖和抑郁各相关指标。

2.3 雷公藤红素缓解共病的动物分组及给药 56只3周龄雄性C57BL/6J小鼠随机分为7组($n=8$),分别为Chow组、DIO组、肥胖+雷公藤红素低剂量组(DIO-0.5 mg·kg⁻¹)、肥胖+雷公藤红素高剂量组(DIO-1.0 mg·kg⁻¹)、COM组、共病+雷公藤红素低剂量组(COM-0.5 mg·kg⁻¹)、共病-雷公藤红素高剂量组(COM-1.0 mg·kg⁻¹)。造模8周后,雷公藤红素低、高剂量分别为0.5、1.0 mg·kg⁻¹,1次/d,DIO-0.5 mg·kg⁻¹组、DIO-1.0 mg·kg⁻¹组连续灌胃给药9 d,COM-0.5 mg·kg⁻¹组、COM-1.0 mg·kg⁻¹组连续灌胃给药14 d,Chow组、DIO组及COM组灌胃等体积蒸馏水。

2.4 葡萄糖耐量试验检测血糖变化 小鼠禁食6 h

后,尾尖取血,检测空腹血糖值,腹腔注射50%葡萄糖溶液($2.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),使用血糖仪检测记录0、15、30、60、120 min血糖值,绘制时间-血糖曲线,计算血糖曲线下面积(AUC)。

2.5 强迫游泳实验(FST)检测小鼠抑郁情绪 在2 000 mL圆形玻璃烧杯(高19 cm,直径14 cm)中加入25 °C纯净水1 000 mL,将小鼠放入水中6 min,前2 min为适应时间,记录后4 min累计不动时间(s)。

2.6 悬尾实验(TST)检测小鼠抑郁情绪 悬尾箱(高55 cm,宽60 cm,深11 cm)使用隔板隔离为3个20 cm宽的隔间,置于地面保持稳定。使用15 cm的胶带缠绕小鼠尾尖1 cm处,头朝下倒挂于悬尾箱顶部1/3处6 min,前2 min为适应时间,记录后4 min累计停止挣扎时间(s)。

2.7 旷场实验(OFT)检测小鼠焦虑情绪 100 cm×100 cm×50 cm的旷场箱中心有一块30 cm×30 cm的中心区域,将小鼠头朝箱壁的角落位置放入旷场箱,自由活动,记录4 min内小鼠在中心区域的累计停留时间(s),以头部进入为标准。每只小鼠测试完后,以75%乙醇喷洒,清除排泄物,防止气味残留。

2.8 动物取材及组织处理 小鼠以异氟烷诱导进行气体麻醉,用多聚甲醛固定后剥取脑组织后,置于4%多聚甲醛溶液中继续固定24 h,再用15%和30%蔗糖溶液梯度脱水。将脱水后的小鼠脑组织用OCT包埋剂包埋后,用冰冻切片机沿冠状面切为厚度为18 μm的脑片,置于冻存液中。

2.9 血液生化检测检测血脂含量 小鼠眼眶取血,静置分层后,常温3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径15.7 cm),分离血清,全自动生化仪检测血清中TC、TG、HDL-C、LDL-C含量。

2.10 免疫荧光检测 TNF- α 、TMEM119、NPY、BDNF、TPH2 表达水平 脑组织梯度脱水后,对全脑以冠状面冰冻切片。使用漂片法进行免疫荧光

染色,全程避光。PBS中洗3次,洗去冻存液,0.5%BSAT封闭30 min,一抗(TNF- α 1:40, TMEM119 1:400, NPY 1:400, BDNF 1:150, TPH2 1:400)孵育,置于4 °C冰箱过夜。次日PBST清洗,二抗(1:400)孵育1 h, DAPI染核5 min,贴片并封片,光学显微镜拍摄。

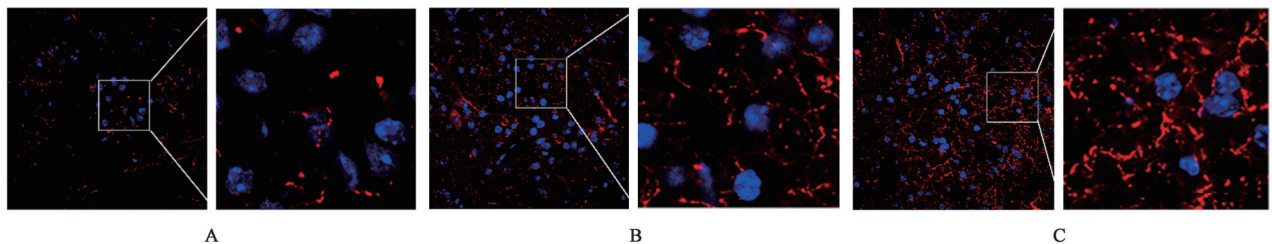
2.11 生理数据记录 所有小鼠均为每周记录体质量,分析最后1周小鼠的体质量情况。每周称量每笼小鼠的摄入饲料质量(g),分析最后1周小鼠的摄食情况,其中,摄食量(kcal)=普通饲料摄入质量(g)×3.40(kcal·g⁻¹)或高脂饲料摄入质量(g)×5.24(kcal·g⁻¹)。分批次进行葡萄糖耐量实验、强迫游泳实验、悬尾实验、旷场实验;取材时称取小鼠白色脂肪与棕色脂肪质量,以公式脂肪率=脂肪质量(g)/体质量(g)×100%计算白脂率和棕脂率。

2.12 统计学分析 采用Image J软件对图片进行分析;采用GraphPad Prism 8软件对数据进行统计学分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,对肥胖和抑郁的数据进行相关性分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 肥胖与抑郁共病小鼠模型的建立及评价

3.1.1 模型构建对小鼠肥胖的影响 与Chow及DIO组比较,COM组小鼠第12周体质量($P<0.05$, $P<0.01$)、进食量($P<0.01$)均明显升高。与Chow组比较,COM组小鼠AUC、白脂率、TC、TG、HDL-C、LDL-C含量均显著升高($P<0.01$),棕脂率显著下降($P<0.01$),DIO组和COM组间比较差异无统计学意义。免疫荧光结果显示,与Chow组比较,DIO组小鼠杏仁核中央核(CeA)的NPY表达量明显增加,COM组小鼠CeA的NPY表达量较DIO组进一步增加,这与小鼠进食量及体质量的变化相一致。上述结果表明,COM组为病理性肥胖。见图1、表1和表2。



注:A. Chow组;B. DIO组;C. COM组(图2、图3、图5同);蓝色为DAPI;红色为NPY

图1 模型构建对各组小鼠CeA中NPY表达水平的影响(免疫荧光,×600)

Fig. 1 Effect of model construction on expression level of NPY in CeA of mice in each group (IF, ×600)

3.1.2 模型构建对小鼠抑郁的影响 与Chow及DIO组比较,COM组小鼠FST不动时间、TST停止

挣扎时间显著增加($P<0.01$)。与Chow组比较,DIO及COM组小鼠OFT中心场停留时间明显降低($P<$

表1 模型构建对各组小鼠体质量、摄食量和AUC的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of model construction on body weight, food intake and AUC of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

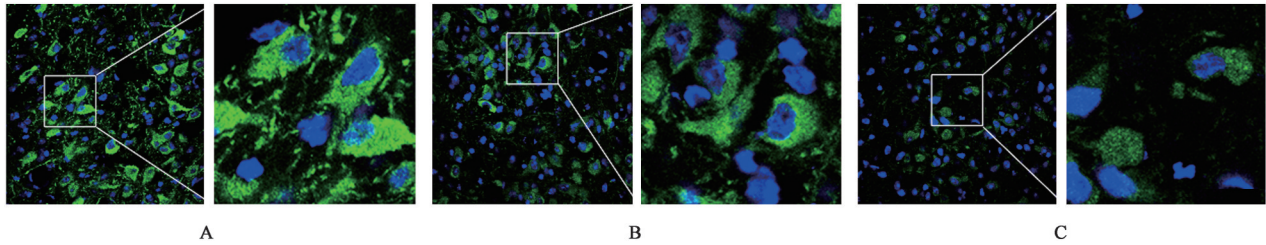
组别	体质量/g(n=20)	摄食量/kcal(n=4)	AUC(n=10)
Chow组	27.83±0.35	73.64±3.71	126.03±3.36
DIO组	34.92±0.54 ¹⁾	84.40±2.10 ¹⁾	204.51±11.33 ¹⁾
COM组	36.67±0.51 ^{1,2)}	108.80±7.59 ^{1,2)}	215.11±5.95 ¹⁾

注:与Chow组比较¹⁾P<0.01;与DIO组比较²⁾P<0.05(表2同)

表2 模型构建对各组小鼠脂肪率及血脂的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of model construction on fat percentage and blood lipids of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	白脂率/%	棕脂率/%	TC /mmol·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	LDL /mmol·L ⁻¹	HDL /mmol·L ⁻¹
Chow组	3.00±0.21	0.52±0.03	2.72±0.11	0.69±0.03	0.24±0.02	1.99±0.04
DIO组	6.54±0.40 ¹⁾	0.32±0.02 ¹⁾	5.04±0.24 ¹⁾	2.04±0.14 ¹⁾	0.54±0.03 ¹⁾	2.93±0.08 ¹⁾
COM组	7.23±0.80 ¹⁾	0.35±0.02 ¹⁾	5.28±0.26 ¹⁾	1.81±0.11 ¹⁾	0.53±0.03 ¹⁾	2.64±0.13 ¹⁾



注:蓝色为DAPI;绿色为TPH2(图3同)

图2 模型构建对各组小鼠DRN中TPH2表达水平的影响(免疫荧光,×600)

Fig. 2 Effect of model construction on expression level of TPH2 in DRN of mice in each group (IF, ×600)

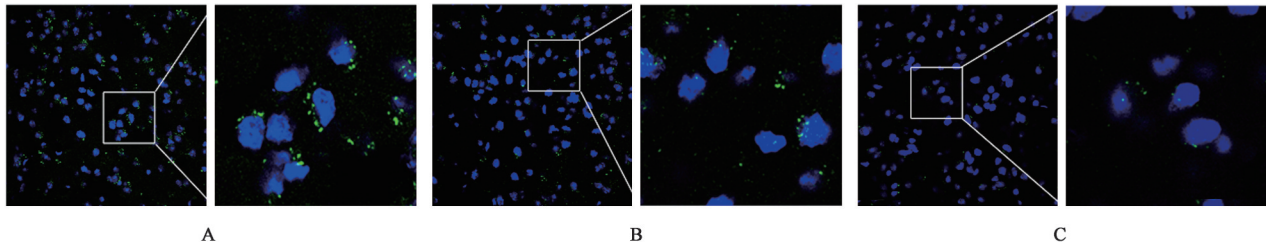


图3 模型构建对各组小鼠BLA中TPH2表达水平的影响(免疫荧光,×600)

Fig. 3 Effect of model construction on expression level of TPH2 in BLA of mice in each group (IF, ×600)

表3 模型构建对各组小鼠抑郁相关行为的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of model construction on depression-related behaviors of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	不动时间/s	停止挣扎时间/s	中央场停留 时间/s
Chow组	73.20±6.50	84.60±12.11	20.20±4.40
DIO组	55.70±6.50	95.03±11.19	9.20±1.38 ¹⁾
COM组	123.01±11.80 ^{2,3)}	148.64±7.28 ^{2,3)}	8.20±1.20 ¹⁾

注:与Chow组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与DIO组比较³⁾P<0.01

3.1.3 肥胖与抑郁的相关性 将肥胖与抑郁的结果进行相关性分析。结果显示,强迫游泳不动时间与体质量($r^2=0.3210$)、TC($r^2=0.1501$)呈正相关;悬尾

0.05),DIO组和COM组间比较差异无统计学意义。免疫荧光结果显示,与Chow组比较,COM组小鼠中缝背核(DRN)和基底外侧杏仁核(BLA)的TPH2表达明显降低,COM组与DIO组比较差异无统计学意义,但有下降的趋势,这与行为学实验的结果相一致。结果说明COM小鼠具有抑郁的病理特征。见图2和图3、表3。

停止挣扎时间与体质量($r^2=0.2856$)、30 min 血糖($r^2=0.1337$)、TC($r^2=0.2073$)呈正相关;旷场中心场停留时间与白脂率($r^2=0.2423$)呈正相关,与体质量($r^2=0.1931$)、30 min 血糖($r^2=0.2657$)、TC($r^2=0.2249$)、TG($r^2=0.2842$)、HDL-C($r^2=0.1577$)、LDL-C($r^2=0.2351$)呈负相关。结果说明COM小鼠的肥胖与抑郁具有相关性,存在相互协同的关系。见图4。

3.2 COM小鼠肥胖与抑郁共病可能性的生物机制探究

3.2.1 模型构建对杏仁核小胶质细胞炎症激活的影响 免疫荧光结果显示,与Chow组比较,COM

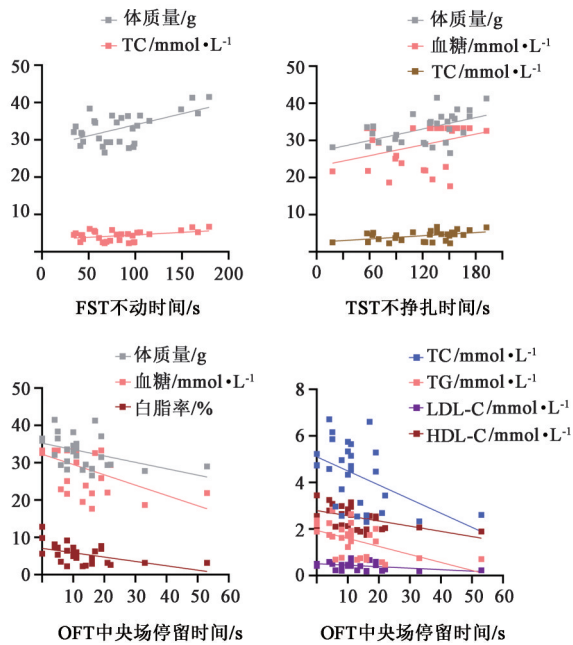


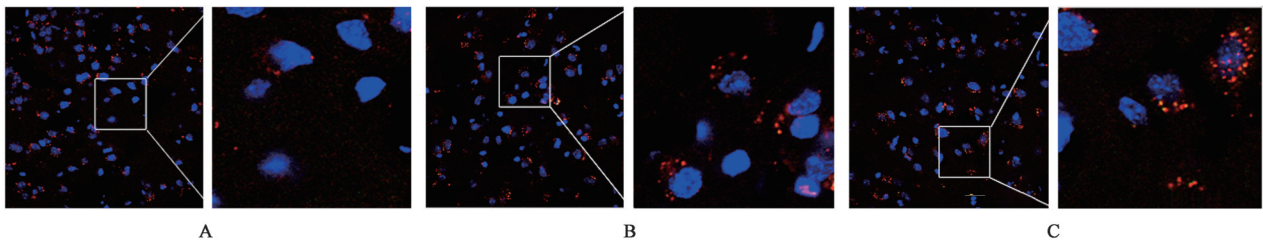
图4 肥胖与抑郁的相关性
Fig. 4 Correlation analysis between obesity and depression

组小鼠BLA的TNF- α 表达显著增加,与DIO组比较,COM组小鼠BLA中TNF- α 表达量差异无统计

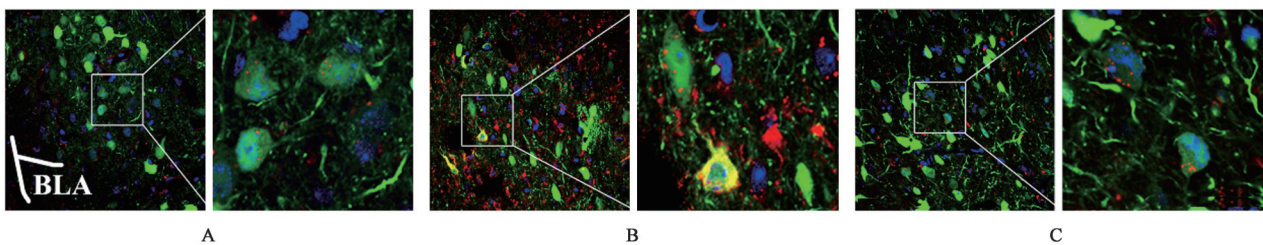
学意义。提示COM组小鼠肥胖与抑郁的共病机制可能与杏仁核小胶质细胞的炎症激活有关。见图5。

3.2.2 杏仁核 TNF- α 表达下调对共病小鼠肥胖和抑郁的影响 与COM组小鼠比较,TNF- α 敲低组小鼠的TNF- α 蛋白表达量和小胶质细胞标记物TMEM119染色的细胞体面积明显降低,见图6和图7。与COM组小鼠比较,TNF- α 敲低小鼠的体质量、摄食量、血糖以及白脂率和棕脂率均未发现显著变化;在COM组和TNF- α 敲低组之间,CeA中NPY表达量的差异无统计学意义,见表4和表5、图8。

与COM组比较,TNF- α 敲低组强迫游泳和悬尾实验中的不动时间明显减少($P<0.05, P<0.01$),表明BLA中TNF- α 的下调与COM组小鼠抑郁的缓解之间存在关联。免疫荧光染色结果显示,与COM组比较,TNF- α 敲低组中BDNF和TPH2的表达量明显增加。结果表明,BLA中TNF- α 的下调被证明可能与抑郁症缓解有关,但不能缓解COM小鼠的肥胖。见图9和图10、表6。



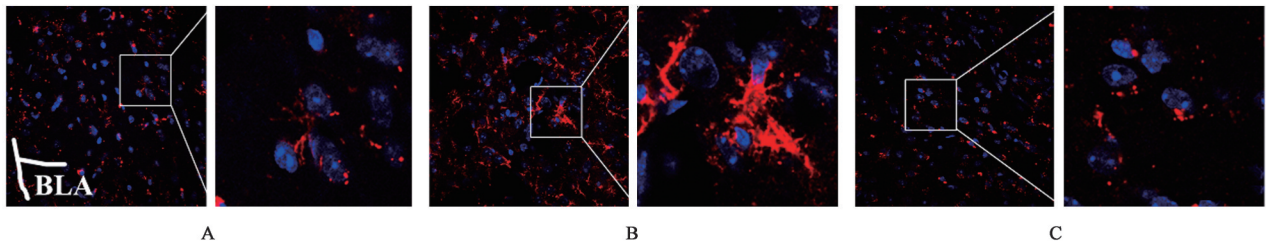
注:蓝色为DAPI;红色为TNF- α
图5 模型构建对各组小鼠BLA中TNF- α 表达水平的影响(免疫荧光,×600)
Fig. 5 Effect of model construction on expression level of TNF- α in BLA of mice in each group (IF,×600)



注:A. Chow组;B. COM组;C. TNF- α 敲低组(图7-图10同);蓝色为DAPI;绿色为AAV;红色为TNF- α
图6 杏仁核TNF- α 表达下调对各组小鼠BLA中TNF- α 表达水平的影响(免疫荧光,×600)
Fig. 6 Effect of down-regulated expression of TNF- α in amygdala on expression level of TNF- α in BLA of mice in each group (IF,×600)

3.3 雷公藤红素对COM小鼠肥胖和抑郁的影响 葡萄糖耐量结果表明,在给药9 d后,与DIO组比较,DIO-0.5 mg·kg⁻¹组和DIO-1.0 mg·kg⁻¹组的小鼠60 min血糖均显著降低($P<0.01$);给药14 d后,与COM组比较,COM-1.0 mg·kg⁻¹组的30 min血糖显著降低($P<0.01$)。摄食量结果表明,给药期间,与

DIO组比较,DIO-0.5 mg·kg⁻¹组和DIO-1.0 mg·kg⁻¹组明显降低($P<0.05, P<0.01$);与COM组比较,COM-1.0 mg·kg⁻¹组明显降低($P<0.05$)。悬尾实验结果表明,给药前后DIO各组之间均差异无统计学意义。给药前,COM组悬尾不动时间显著高于Chow组($P<0.01$);给药后,COM-0.5 mg·kg⁻¹和



注:蓝色为DAPI;红色为TMEM119

图7 杏仁核TNF- α 表达下调对各组小鼠BLA中TMEM119标志的小胶质细胞胞体面积的影响(免疫荧光, $\times 600$)

Fig. 7 Effect of down-regulated expression of TNF- α in amygdala on area of microglia marked by TMEM119 in BLA of mice in each group (IF, $\times 600$)

表4 杏仁核TNF- α 表达下调对各组小鼠体质量、血糖、白/棕脂率的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 4 Effect of down-regulated expression of TNF- α in amygdala on body weight, blood sugar and white/brown fat ratio of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	AAV	体质量/g	AUC	白脂率/%	棕脂率/%
Chow组	non-shRNA	25.89 \pm 0.43	121.74 \pm 3.63	1.68 \pm 0.04	0.45 \pm 0.01
COM组	non-shRNA	37.29 \pm 0.80 ²⁾	189.92 \pm 7.29 ²⁾	8.11 \pm 0.35 ²⁾	0.44 \pm 0.01 ²⁾
TNF- α 敲低组	TNF- α -shRNA	35.47 \pm 0.84 ²⁾	200.48 \pm 7.69 ²⁾	7.78 \pm 0.27 ²⁾	0.44 \pm 0.01 ²⁾

注:与Chow组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表5同)

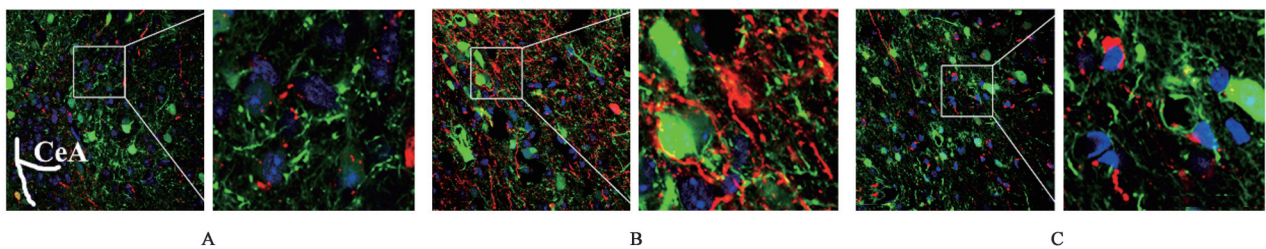
表5 杏仁核TNF- α 表达下调对各组小鼠摄食量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of down-regulated expression of TNF- α in amygdala on food intake of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	AAV	摄食量/kcal
Chow组	non-shRNA	77.25 \pm 2.08
COM组	non-shRNA	93.17 \pm 4.16 ¹⁾
TNF- α 敲低组	TNF- α -shRNA	94.27 \pm 5.51 ¹⁾

明显降低($P<0.05, P<0.01$)。除了生理指标以外, BLA和DRN中的免疫荧光结果均表明,与Chow组比较,COM组TPH2-BDNF双标细胞数量明显减少, TMEM119染色的细胞体面积明显增加;与COM组比较,COM-高剂量组TPH2-BDNF双标细胞数量明显增加, TMEM119染色的细胞体面积明显减少。在生理和生化层面上均初步说明雷公藤红素能缓解COM小鼠的肥胖及抑郁症状,并暗示

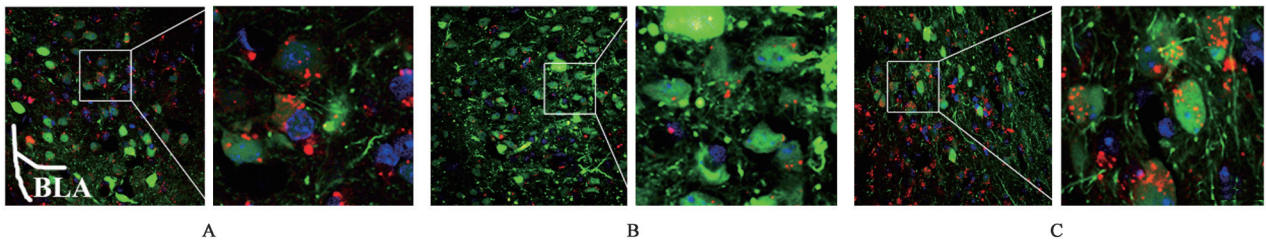
COM-1.0 mg \cdot kg⁻¹组与COM组比较,悬尾不动时间



注:蓝色为DAPI;绿色为AAV;红色为NPY

图8 杏仁核TNF- α 表达下调对各组小鼠CeA中NPY表达水平的影响(免疫荧光, $\times 600$)

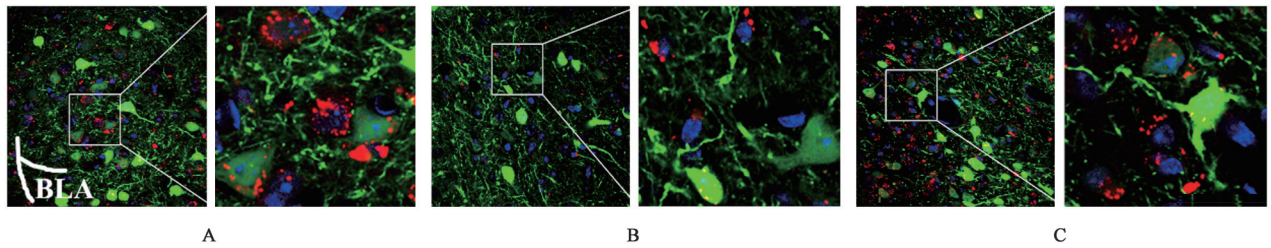
Fig. 8 Effect of down-regulated expression of TNF- α in amygdala on expression level of NPY in CeA of mice in each group (IF, $\times 600$)



注:蓝色为DAPI;绿色为AAV;红色为BDNF

图9 杏仁核TNF- α 表达下调对各组小鼠BLA中BDNF表达水平的影响(免疫荧光, $\times 600$)

Fig. 9 Effect of down-regulated expression of TNF- α in amygdala on expression level of BDNF in BLA of mice in each group (IF, $\times 600$)



注:蓝色为DAPI;绿色为AAV;红色为TPH2

图10 杏仁核TNF-α表达下调对各组小鼠BLA中TPH2表达水平的影响(免疫荧光,×600)

Fig. 10 Effect of down-regulated expression of TNF-α in amygdala on expression level of TPH2 in BLA of mice in each group (IF,×600)

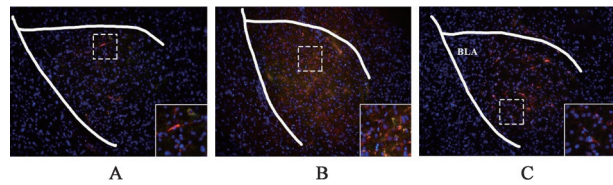
表6 杏仁核TNF-α表达下调对各组小鼠抑郁相关指标的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 6 Effect of down-regulated expression of TNF-α in amygdala on depression-related indicators in mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	AAV	不动时间/s	停止挣扎时间/s	中央场停留时间/s
Chow组	non-shRNA	131.93±7.42	75.33±3.78	42.33±2.39
COM组	non-shRNA	191.12±4.42 ²⁾	134.76±10.75 ²⁾	30.67±4.12 ¹⁾
TNF-α敲低组	TNF-α-shRNA	149.90±5.98 ⁴⁾	102.73±6.15 ³⁾	23.67±1.58 ²⁾

注:与Chow组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与DIO组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

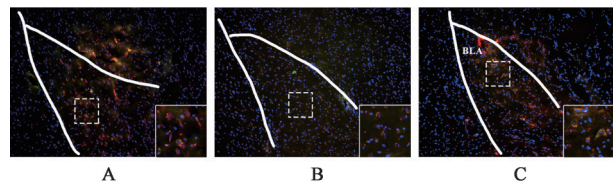
其机制可能与缓解中枢神经炎症有关。见图11-图14、表7和表8。



注:A. Chow组;B. COM组;C. COM-1.0 mg·kg⁻¹组(图12-图14同);蓝色为DAPI;绿色为TNF-α;红色为TMEM119(图13同)

图11 雷公藤红素对各组小鼠BLA中TNF-α-TMEM119表达水平的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 11 Effect of celastrol on expression level of TNF-α-TMEM119 in BLA of mice in each group (IF,×200)



注:蓝色为DAPI;绿色为BDNF;红色为TPH2(图14同)

图12 雷公藤红素对各组小鼠BLA中TPH2-BDNF表达水平的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 12 Effect of triptolide on expression level of TPH2-BDNF in BLA of mice in each group (IF,×200)

4 讨论

肥胖是一种脂肪过度蓄积导致的慢性代谢疾病,根据世界卫生组织的估计,到2050年,全球将有五分之一的肥胖人口^[17]。除糖尿病、心脏病、阿尔茨海默症和癌症外,抑郁也是肥胖的主要并发症,肥胖患者中并发抑郁的比例达33%^[18]。目前临床

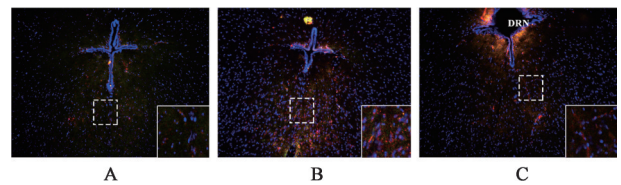


图13 雷公藤红素对各组小鼠DRN中TNF-α-TMEM119表达水平的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 13 Effect of celastrol on expression level of TNF-α-TMEM119 in DRN of mice in each group (IF,×200)

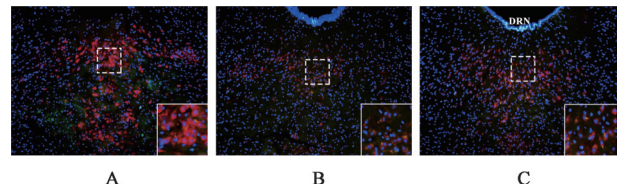


图14 雷公藤红素对各组小鼠BLA中TPH2-BDNF表达水平的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 14 Effect of triptolide on expression level of TPH2-BDNF in BLA of mice in each group (IF,×200)

缺少共病的治疗方法和药物,并且许多患者在治疗一种疾病的过程中会恶化另一种疾病,因此,亟需构建一个肥胖抑郁共病的动物模型来展开相关的疾病和药物研究。根据文献报道,比较FVB/N小鼠,幼年的C57BL/6J小鼠有更好的肥胖可塑性^[19];由于雌激素可以调节糖皮质激素代谢的紊乱,DIO模型的雄性小鼠的肥胖特征比较雌性小鼠更加显著^[20]。因此,本研究选择3周龄的雄性C57BL/6J小鼠,以中枢免疫炎症为切入点,在对应激方法进行多次筛选后,发现潮湿垫料可以在不减轻小鼠体质量的情况下与肥胖协同,实现肥胖和抑郁的共病。

表7 雷公藤红素对各组小鼠给药后的60、30 min血糖和摄食量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Effect of celastrol on blood glucose and food intake 60 and 30 minutes after administration of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	60 min		30 min	
		血糖/mmol·kg ⁻¹ (n=8)	摄食量/kcal(n=3)	血糖/mmol·kg ⁻¹ (n=8)	摄食量/kcal(n=3)
Chow组		13.43±0.26	55.99±1.08	21.16±0.43	55.19±0.89
DIO组		19.10±0.79	103.32±9.07	26.98±1.22	116.80±14.96
DIO-0.5 mg·kg ⁻¹ 组	0.5	12.93±0.51 ²⁾	77.92±2.73 ¹⁾	25.49±0.64	84.76±7.18
DIO-1.0 mg·kg ⁻¹ 组	1.0	11.99±1.18 ²⁾	62.74±4.63 ²⁾	20.39±0.30 ²⁾	67.06±6.07 ¹⁾

注:与DIO组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表8同)

表8 雷公藤红素对各组小鼠给药前后的悬尾停止挣扎时间的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

Table 8 Effect of celastrol on time to stop struggling of tail suspension before and after administration of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	停止挣扎时间/s	
		给药前	给药后
Chow组		86.88±1.20	64.13±4.90
DIO组		124.32±2.67	143.41±6.74
DIO-0.5 mg·kg ⁻¹ 组	0.5	119.44±3.79	95.03±2.68
DIO-1.0 mg·kg ⁻¹ 组	1.0	123.63±1.99	72.63±3.60
COM组		67.88±4.39 ¹⁾	62.13±5.87 ¹⁾
COM-0.5 mg·kg ⁻¹ 组	0.5	86.13±2.40 ¹⁾	62.38±3.79 ²⁾
COM-1.0 mg·kg ⁻¹ 组	1.0	83.13±2.27 ¹⁾	94.38±9.23 ³⁾

注:与Chow组比较¹⁾P<0.01;与DIO组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01

DIO模型和慢性不可预知应激(CUMS)是肥胖和抑郁常用的小鼠模型,这两种模型真实地模拟了人类患者的发病病因,都具有一定程度的中枢免疫炎症状态。但DIO模型无法模拟人类肥胖症患者在社会中所面临的精神压力,抑郁发病率不够稳定,程度较轻,无显著的中枢病理改变;CUMS模型的部分应激方法如禁食、束缚、冰水游泳,会导致小鼠体质量骤减^[21],难以并发肥胖。本实验所构建的共病模型,比较细致地模拟了临床患者的肥胖和抑郁并存甚至恶化的现状,在行为学实验中表现出显著抑郁状态的同时,体质量、进食量等部分代谢指标显著优于DIO模型,未出现显著劣于DIO模型的指标,结合相关性分析的结果,共病模型表现出了肥胖与抑郁相互并存、恶化的特点。比较需要约10种应激方法每日随机进行的CUMS模型,本实验的模型构建方法更为简易,仅有潮湿垫料一种,减轻了实验人员的负担,并提供了合适的应激强度。

在模型构建的第12周,本研究对小鼠的基础代谢及情绪相关指标进行检测。在肥胖方面,COM小鼠具有体质量超标、进食增加、胰岛素抵抗、白脂率

升高、棕脂率降低、血脂升高的基础代谢特征,其中在葡萄糖耐量试验中,AUC的增加提示肥胖对糖代谢的损伤;中枢神经中与食欲相关的NPY表达升高从生化层面验证了肥胖症状,NPY神经元的异常激活,被认为与肥胖小鼠食欲的增加密切相关^[22]。在抑郁的行为学实验中,FST和TST都是抑郁情绪的评价方法,不动时间和停止挣扎时间的增加体现了小鼠“行为绝望”的抑郁表现,而OFT利用的是小鼠对空旷场地探索和恐惧的矛盾心理,在中心场停留时间的减少体现了焦虑表现,COM小鼠均表现出了显著的抑郁和焦虑症状;中枢神经合成5-羟色胺的初始及限速酶TPH2由DRN发出,投射至杏仁核及其他核团,它的减少将影响5-羟色胺的合成,导致抑郁症的发生,其表达降低从生化层面验证了抑郁症状。相关性分析的结果显示,COM小鼠的肥胖和抑郁的严重程度呈正相关,说明二者存在协同关系。值得一提的是,在旷场实验中,DIO小鼠也表现出了严重的焦虑症状,这与文献报道一致^[23-24],提示肥胖和焦虑之间可能有更为密切的联系。杏仁核具有控制情绪、记忆、学习、摄食等功能^[17],小胶质细胞由炎症激活后会获得吞噬功能,可能造成杏仁核神经元损伤,影响其功能的正常运转。课题组前期通过Luminex分析研究发现,与DIO组比较,COM组小鼠BLA中TNF-α受体-TNFR I/II的表达量显著增加。现通过免疫荧光染色发现,COM小鼠的BLA小胶质细胞分泌的TNF-α表达量较Chow组显著升高,提示共病的机制可能与杏仁核小胶质细胞的过度激活有关。为进一步探索共病可能的机制,笔者通过脑内注射AAV编码TNF-α shRNA下调了杏仁核小胶质细胞的TNF-α表达量并改善了杏仁核小胶质细胞的异常激活,且发现TNF-α敲低组小鼠的肥胖相关指标和食欲相关的NPY表达量并没有得到改善,BDNF在认知和情感功能中起着至关重要的作用,有研究表明,中枢神经系统中BDNF水平的降低是情绪障碍发生的一种机制^[25],

而TNF- α 敲低组小鼠的抑郁相关指标与脑源性神经生长因子BDNF和中枢神经合成5-羟色胺的初始及限速酶TPH2表达量得到显著改善,说明在杏仁核中,TNF- α 与COM小鼠的抑郁密切相关。

早在2015年,哈佛大学医学院附属波士顿儿童医院内分泌学家LIU等^[10]首次报道雷公藤红素可抑制肥胖小鼠的食物摄取并于3周内减轻约一半体质量,这使得雷公藤红素作为一种潜在高效的肥胖治疗药物进入大众视野,但尚未见雷公藤红素对于肥胖抑郁共病的应用。为探究肥胖与抑郁共病小鼠模型在雷公藤红素药效药理研究中的应用,本研究对各组小鼠肥胖和抑郁相关指标进行了检测,结果发现0.5 mg·kg⁻¹雷公藤红素给药9 d显著降低葡萄糖耐量60 min血糖、摄食量;而COM小鼠中,1.0 mg·kg⁻¹雷公藤红素需给药14 d才可显著降低葡萄糖耐量30 min血糖、摄食量,说明对于COM小鼠需要更高剂量、更长时间的雷公藤红素干预;并且通过行为学与免疫荧光染色结果显示,雷公藤红素可能改善了COM小鼠的抑郁行为与BLA和DRN中小胶质细胞过度激活。这初步探究了雷公藤红素对肥胖抑郁共病具有缓解作用,其机制可能与缓解中枢神经炎症有关。

综上所述,本研究通过采用高脂饮食结合潮湿垫料的模拟应激环境的方法,诱发小鼠中枢神经免疫炎症激活,从而建立了一种稳定的肥胖与抑郁共病的小鼠模型,并从生理生化层面评价模型,探索病理机制,发现肥胖-抑郁的共病机制可能与杏仁核小胶质细胞的炎症激活有关,并初步探究了肥胖与抑郁共病小鼠模型在雷公藤红素药效药理研究中的应用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] KINLEN D, CODY D, O'SHEA D. Complications of obesity[J]. QJM, 2018, 111(7):437-433.
- [2] PRATT L, BRODY D. Depression and obesity in the U. S. adult household population, 2005-2010 [J]. NCHS Data Brief, 2014, 167: 1-7.
- [3] MCPHEE J, KHLAVICH F E, EICHER J, et al. Suicidal ideation and behaviours among adolescents receiving bariatric surgery: A case-control study [J]. Eur Eat Disord Rev, 2015, 23(6):517-523.
- [4] LUPPINO F, DE WIT L, BOUVY P, et al. Overweight, obesity, and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies [J].

Arch Gen Psychiatry, 2010, 67(3):220-229.

- [5] GUILLEMOT-LEGRIS O, MUCCIOLI G. Obesity-induced neuroinflammation: Beyond the hypothalamus [J]. Trends Neurosci, 2017, 40(4):237-253.
- [6] NUSSLOCK R, MILLER G. Early-life adversity and physical and emotional health across the lifespan: A neuroimmune network hypothesis [J]. Biol Psychiatry, 2016, 80(1):23-32.
- [7] MILANESCHI Y, SIMMONS W, VAN ROSSUM E, et al. Depression and obesity: Evidence of shared biological mechanisms [J]. Mol Psychiatry, 2019, 24(1):18-33.
- [8] 胡凯, 葛卫红. 雷公藤红素药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8(11):179-181.
- [9] 胡维岳. 雷公藤红素对大鼠肥胖的治疗作用及机制研究 [D]. 南京:南京医科大学, 2018.
- [10] LIU J, LEE J, SALAZAR HERNANDEZ M, et al. Treatment of obesity with celastrol [J]. Cell, 2015, 161(5):999-1011.
- [11] SELL H, POITOU C, HABICH C, et al. Heat shock protein 60 in obesity: Effect of bariatric surgery and its relation to inflammation and cardiovascular risk [J]. Obesity, 2017, 25(12):2108-2114.
- [12] FARZANEGI P, DANA A, EBRAHIMPOOR Z, et al. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation [J]. Eur J Sport Sci, 2019, 19(7):994-1003.
- [13] 吴红艳, 师钰琪, 李佳豪, 等. 雷公藤红素对神经病理性疼痛模型小鼠的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13):97-103.
- [14] HU X, DONG Y, JIN X, et al. The novel and potent anti-depressive action of triptolide and its influences on hippocampal neuroinflammation in a rat model of depression comorbidity of chronic pain [J]. Brain Behav Immu, 2017, 64:180-194.
- [15] CHEN Q, LEI Y, LIU J, et al. Triptolide improves neurobehavioral functions, inflammation, and oxidative stress in rats under deep hypothermic circulatory arrest [J]. Aging, 2021, 13(2):3031-3044.
- [16] WANG Q, MENG J, DONG A, et al. The pharmacological effects and mechanism of tripterygium wilfordii hook f in central nervous system autoimmunity [J]. J Altern Complement Med, 2016, 22(7):496-502.
- [17] HARDAWAY J, HALLADAY L, MAZZONE C, et al. Central amygdala prepronociceptin-expressing neurons mediate palatable food consumption and reward [J].

- Neuron, 2019, 102(5):1037-1052.
- [18] CHAUVET-GELINIER J, ROUSSOT A, COTTENET J, et al. Depression and obesity, data from a national administrative database study: Geographic evidence for an epidemiological overlap [J]. PLoS One, 2019, 14(1):e0210507.
- [19] KIM D, GUTIERREZ-AGUILAR R, KIM H, et al. Increased adipose tissue hypoxia and capacity for angiogenesis and inflammation in young diet-sensitive C57 mice compared with diet-resistant FVB mice [J]. Int J Obes, 2013, 37(6):853-860.
- [20] DAKIN R, WALKER B, SECKL J, et al. Estrogens protect male mice from obesity complications and influence glucocorticoid metabolism [J]. Int J Obes, 2015, 39(10):1539-1547.
- [21] 罕园园, 代解杰. 抑郁症动物模型与其发病机制研究的进展 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3):321-326.
- [22] DUARTE-NEVES J, GONÇALVES N, CUNHA-SANTOS J, et al. Neuropeptide Y mitigates neuropathology and motor deficits in mouse models of Machado-Joseph disease [J]. HMG, 2015, 24(19):5451-5463.
- [23] AMIRI S, BEHNEZHAD S. Obesity and anxiety symptoms: A systematic review and meta-analysis [J]. Neuropsychiatrie, 2019, 33(2):72-89.
- [24] FOURRIER C, BOSCH-BOUJU C, BOURSERAU R, et al. Brain tumor necrosis factor- α mediates anxiety-like behavior in a mouse model of severe obesity [J]. Brain Behav Immun, 2019, doi: 10.1016/j.bbi.2018.11.316.
- [25] LESNIAK A, POZNAŃSKI P, RELIGA P, et al. Loss of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) resulting from congenital-or mild traumatic brain injury-induced blood-brain barrier disruption correlates with depressive-like behaviour [J]. Neuroscience, 2021, 458:1-10.

[责任编辑 孙丛丛]