

基于代谢组学技术应激抑郁动物模型的评价

郑兴宇^{1,2}, 高晓霞¹, 刘晓节^{1,2}, 孙海峰^{1,2}, 秦雪梅^{1*}

1 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006;

2 山西大学 化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要 **目的:** 利用 NMR 的代谢组学方法比较慢性轻度不可预知应激抑郁模型 (CUMS) 与慢性束缚应激抑郁模型 (CRS), 为抗抑郁中药新药的研究提供模型参考。**方法:** 选用 SD 雄性大鼠制作 CUMS 模型与 CRS 模型, 以大鼠旷场行为、体重以及糖水偏爱作为常规指标, 并采用代谢组学技术对实验 21 d 大鼠尿液进行 NMR 数据采集, 运用 SPSS, MatLab7.5, SIMCA-P 软件对数据进行分析。**结果:** 行为学显示, 与正常组相比, CUMS 组除水平运动外, 各种常规指标差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), CRS 组大鼠水平穿越格数、竖立次数和理毛次数等指标直观上都减少, 中央格停留时间延长, 粪便粒数增加, 但是无统计意义 ($P > 0.05$); NMR 代谢组学分析结果显示, 散点图中 CUMS 组与正常组各样品散点比较集中, CRS 组点较分散, 介于正常与 CUMS 组之间。CUMS 模型和 CRS 模型共有的标志物有缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、酪氨酸、肌酸, CUMS 模型特有标志物为脯氨酸, CRS 模型特有标志物为天冬酰胺及精氨酸。**结论:** 行为学及代谢组学均显示 CUMS 组造模比较成功, CRS 组在行为学指标上较差, 但运用代谢组学技术显示造模成功, 说明代谢组学方法比行为学更灵敏, 由于代谢组学技术比常规方法具有灵敏、整体、直观性的优点, 因此可用于抑郁模型的筛选。

关键词 抑郁症; CUMS; CRS; 代谢组学; NMR

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 03-0175-05

Evaluation on stress animal models of depression based on metabonomics

ZHENG Xing-yu^{1,2}, GAO Xiao-xia¹, LIU Xiao-jie^{1,2}, SUN Hai-feng^{1,2}, QIN Xue-mei^{1*}

1 Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2 College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract **Objective:** To evaluate the chronic unpredictable mild stress (CUMS) model and chronic restraint stress (CRS) model based on metabonomics using NMR. **Methods:** A total of 18 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into the control group, CUMS group, and CRS group. Taking open-field test, body weight, and sucrose preference test as general indexes during the experimental period, the 21d urine samples were analyzed by NMR. Moreover the data were processed by the SPSS, SIMCA-P, and MATLAB software. **Results:** The results of behavior changes showed that compared with those of rats in control group, there was significant difference in CUMS group except crossing scores, while those of rats in the CRS group showed a significant difference in dwell time, sucrose preference and consumption. Scores plot of PCA for urine showed that the scatter points of three groups were separated well among groups. Points of CUMS and control group were clustered within groups, while the CRS group scatter points were far away from each other. The shared biomarkers of CUMS model and CRS model have valine, leucine, isoleucine, glycine, tyrosine, creatine, and CUMS model specific biomarker is proline while CRS model specific bioimarkers are aspartic acid and arginine. **Conclusion:** The behavior changes and metabonomic results show that the CRS model is bad in behavior changes but well in metabonomics, while the CUMS model is successful in each index, which suggests that metabonomics could be more sensitive than behavior test, and has the advantage of sensitive, ensemble, and intuitive, so it can be used for depression model screening.

Key Words depression; chronic unpredictable mild stress (CUMS); chronic restraint stress (CRS); metabonomics; NMR

收稿日期: 2010-02-28

基金项目: 科技部国际合作项目 (2008DFA30430); 国家自然科学基金项目 (300772759); 山西省中医药代谢组学国际合作研究联合实验室建设 (2008081043)

作者简介: 郑兴宇, 男, 硕士研究生, E-mail: 200822905006@mail.sxu.cn

* 通讯作者 秦雪梅, 教授, 主要研究方向: 中药质量控制与活性成分研究、中医药代谢组学研究, Tel: 0351-7011202, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

动物模型是疾病病理、药物筛选及药理机制研究的基础,随着社会竞争的加剧,抑郁症的发病率呈逐年上升的趋势,而抑郁症发病机制复杂,诱因多,病理机制的研究尚不完全清楚^[1],对该病的中药新药研究非常重要,有些研究工作必须依靠抑郁动物模型完成,而动物模型模拟人类疾病状态的程度直接影响新药研究结果的价值。应激抑郁模型的造模手段与临床抑郁症患者的病因相似,所以成为最常用的抑郁动物模型,主要的应激抑郁模型有慢性轻度不可预知应激抑郁模型(CUMS)与慢性束缚应激抑郁模型(CRS),目前对它们的研究多从行为学及单胺类神经递质进行^[2-6],不能全面反映模型大鼠整体代谢物的变化,而代谢组学方法具有灵敏、整体、直观等特点,因此本研究通过建立慢性不可预知模型和慢性束缚模型,并从行为学及代谢组学两个方面对其进行评价,为抗抑郁中药新药的研究提供模型参考。

1 材料

1.1 动物与分组

雄性成年SD大鼠20只,体质量180~200 g。由中国药品生物制品鉴定所实验动物中心提供。将大鼠置于昼夜节律光照条件下,自由进食进水,饲养3 d以适应环境,每日触摸动物以适应实验人员的操作。大鼠适应环境后采用Open-Field法进行行为学评分。选择评分相近的18只大鼠随机分为正常对照组、CUMS组和CRS组。

1.2 仪器与试剂

代谢笼(苏州实验动物笼具厂);YSD-4药理生理实验多用仪(蚌埠医学院无线电二厂);LD500-1电子天平(沈阳龙腾电子有限公司);101系列恒温干燥箱(北京和同创业科技有限责任公司);SPSS 11.5统计分析软件(Chicago, USA);DRX300核磁仪(Bruker);MestReC 4996核磁数据处理软件;SIMCA-P主成分分析软件(Umetrics);氘代水(NORell)PBS(Phosphate Buffer Solution)磷酸缓冲溶液;蔗糖(北京美味先食品有限公司)。

2 方法

2.1 动物造模

2.1.1 CUMS模型的建立

参照文献^[4]的方法,以慢性不可预见性的温和刺激,配合孤养,10种应激因子按随机方法在21 d内应用:①潮湿垫料和倾斜45°;②禁食(24 h);

③禁水(24 h);④45℃环境(5 min);⑤夹尾(1 min);⑥4℃冰水游泳(5 min);⑦电击足底(电压为50 mV,每隔30 s刺激1次,每次持续10 s,共15次);⑧束缚应激(4 h);⑨陌生异常物品(如塑料杯、木勺、碎布片等);⑩噪音刺激(60 Hz,1 h)。每日给予一种刺激,每种刺激累计使用2~3次,顺序随机,使动物不能预料刺激的发生,持续3周。正常组3只/笼,CUMS组1只/笼饲养。

2.1.2 CRS模型的建立

参照陈家旭^[6,7]慢性束缚模型,用矿泉水瓶特制的束缚筒。管状,长约21 cm,筒口外径6 cm,内径5.8 cm,其瓶口为通气口(距离筒口5 cm左右),后端为可控制长短。大鼠头向通气口置入后,可通过调节2个塑料筒结合处来控制大鼠活动空间。大鼠适应3 d后开始造模,持续3周。造模期间,每次束缚时,使大鼠钻进束缚筒,时间为6 h。整个束缚过程中动物在同一环境中,不予进食水。正常组3只/笼,CRS组3只/笼饲养。

2.2 大鼠旷场行为、体重、糖水消耗及糖水偏爱实验

2.2.1 旷场实验

在实验前1 d及实验第22天,用旷场法观察各组大鼠行为的变化。观察中央格停留时间、水平穿越格数、竖立次数、理毛次数及粪便粒数。结果见表1。

2.2.2 体重变化

在实验前1 d及实验第7、14、22天,分别称取各组大鼠的体重。结果见表2。

2.2.3 糖水消耗实验

在实验前1 d及实验第22天,进行糖水消耗实验。在进行糖水消耗实验时所有大鼠均单笼饲养,每只大鼠加1%蔗糖溶液100 mL,同时所有大鼠进行禁食,计算大鼠4 h饮用1%蔗糖溶液的量。结果见图1。

2.2.4 糖水偏爱实验

实验前2 d,应进行老鼠饮用蔗糖水的适应性训练,接着禁食水24 h,通过测饮水瓶的总量来计算24 h糖水消耗量和自来水消耗量。计算糖水偏爱率。公式:糖水偏爱率=糖水消耗量/糖水消耗量+自来水消耗量。结果见图2。

2.2.5 行为学数据

运用SPSS11.5软件,采用独立样本 t 检验进行统计处理,以表示。

2.3 NMR 代谢组学分析

2.3.1 样品采集与制备^[8,9]

尿样采集与储存: 所有大鼠于第 21 天晚上 18:00 至第二天早上 8:00 放入代谢笼冰上收集尿液, 12 000 r/min 离心, 取上清液, 储存于 -80℃ 冰箱中。

样品前处理: 解冻样品, 摇匀, 在 4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 取尿液 0.4 mL, 置于核磁管, 加 pH 值为 7.0 的 PBS 0.2 mL, 再加入 D₂O 0.1 mL, 放置 10 min, 进行核磁测定。

2.3.2 核磁条件

温度 25℃, 300 MHz, 扫描 128 次; 脉冲角度: 40℃; 采集时间: 2 s; 驰豫时间: 3 s (允许有自旋晶格驰豫 T₁); 水峰抑制方法: 门控双照射法 (a gated secondary irradiation field)。

2.3.3 积分处理

采用 MestReC 4996 核磁图谱专业处理软件积分图谱, 进行傅立叶转换并进行基线调整, 将各样本 0~4.2×10⁻⁶ 的氢谱图分别按照 0.04×10⁻⁶ 为单位进行分割, 进一步按各化学位移值段分别进行积分, 由于 4.2×10⁻⁶~6.0×10⁻⁶ 为残留水峰和尿素峰应该去除, 6.0×10⁻⁶~10.0×10⁻⁶ 峰非常少且比较低, 基线向上漂移, 积分结果不准确, 而 0~4.2×10⁻⁶ 能反应大部分尿液信息, 故本实验只对 0~4.2×10⁻⁶ 进行分析。

2.3.4 归一化及滤噪预处理

采用 MatLab 7.5 软件编写归一化程序对每一个样品数据进行面归一化, 以消除样品浓度等干扰因素影响。滤噪技术分为 2 个阶段: 第一, 归一化数据后, 通过 MatLab 7.5 软件编程对样品数据进行方差、均值、标准差分析; 第二, 应用正交信号校正技术 (Orthogonal Signal Correction, OSC) 消除多余的干扰因素的影响。

2.3.5 NMR 数据

将各样品积分数据进行中心化和规格化 (centering and scaling), 将上述得到的数据文件利用 SIMCA P11.0 软件包 (瑞典, Umetrics AB, Umea) 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discriminate analysis, PLS-DA)。PCA 侧重在分析不同样品的变量差异, PLS-DA 侧重于分析不同组间差异成分^[10-15]。

3 结果

3.1 对旷场实验、体重、糖水消耗及糖水偏爱的影

响

详细研究结果本实验室已报道^[16], 实验前 1 d, 各组大鼠体重、旷场行为、糖水消耗量、纯水消耗和糖水偏爱的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验第 22 天, 与对照组相比, CUMS 组大鼠除水平运动外, 其余各项指标均有显著性差异 ($P < 0.05$)。CRS 组大鼠水平运动、竖立次数和理毛次数等指标直观上都减少, 粪便粒数增加, 但是无统计意义 ($P > 0.05$), 体重增加缓慢、中央格停留时间延长, 糖水消耗及糖水偏爱降低, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。与对照组比较才能显示模型的优劣, 各种指标综合下来, CUMS 的造模要比 CRS 成功。

3.2 NMR 代谢组学分析

3.2.1 尿液 NMR 代谢物轮廓

本实验中得到的典型正常组大鼠尿液 0~4.2×10⁻⁶ 的代谢物轮廓见图 1, 通过查阅文献^[17-20] 和已有对照品的对照分析, 指认出其中 22 个化合物, 结果见表 1。

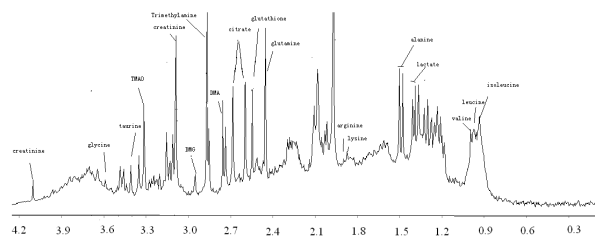


图 1 对照组大鼠尿液 NMR 代谢物轮廓图

Fig.1 Urine metabolin profile of normal rats

3.2.2 PCA 分析

模型第 21 天 CUMS 组、正常组、CRS 组散点图 (图 2) 分离效果较好。可见, PC2、PC3 是主要区分 CUMS 与正常和 CRS 对照之间的差异的关键因素。CUMS 组呈现较好的团聚性, 说明 CUMS 组在 PC2、PC3 的得分图中具有很好相似性, 正常组次之。3 种模型一起对比分析显示 CRS 要比 CUMS 分离效果差, 点较分散, 介于正常与 CUMS 组之间。

3.2.3 PLS-DA 分析

1) CUMS 与 NS 组比较

由图 3 可见 CUMS 与 NS 基本以黑线分开。从载荷图 (图 4) 结合原始图谱可以看出, 与对照组相比, CUMS 组样本中缬氨酸 (1.04、3.56)、亮氨酸 (0.96)、异亮氨酸 (0.99、1.27)、甘氨酸 (3.52) 和脯氨酸 (3.44) 的量升高; 而酪氨酸 (3.07) 和肌

酸 (3.04) 的量降低。

2) NS 与 CRS 比较

造模第 21 天 CRS 和 NS 组的大鼠散点图基本能分开(图 5)。从载荷图(图 6)结合原始图谱可以看出,与对照组相比,CUMS 组样本中缬氨酸(1.04、3.56)、亮氨酸(0.96)、异亮氨酸(0.99、1.27)、甘氨酸(3.52)、苏氨酸(3.48)、天冬酰胺(2.92)和精氨酸(3.24)的量升高;而酪氨酸(3.07)和肌酸(3.04)的量降低。

表 1 正常大鼠尿液 NMR 代谢物
Table.1 urine metabolats of normal rats

序号	英文名	中文名	化学位移/($\times 10^{-6}$)
1	Leucine	亮氨酸	0.96
2	Isoleucine	异亮氨酸	0.99、1.27
3	Valine	缬氨酸	1.04
4	Lactate	乳酸盐	1.32
5	Alanine	丙氨酸	1.48
6	Citrate	柠檬酸盐	2.67、2.56
7	DMA	二甲基精氨酸	2.75
8	Creatine	肌酸	3.04
9	Creatinine	肌酸酐	3.06、4.10
10	TMAO	N-氧基-三甲胺	3.3
11	DMG	二甲基甘氨酸	2.75、3.3
12	Glycine	甘氨酸	3.52
13	Lysine	赖氨酸	1.9
14	Arginine	精氨酸	3.24
15	Proline	脯氨酸	3.44
16	Tyrosine	酪氨酸	3.07
17	Asparagine	天冬酰胺	2.92
18	Glutamine	谷氨酰胺	2.44、2.15、3.77
19	Glu	糖类	3.4-4.1
20	Taurine	牛磺酸	3.40、3.26
21	Glutathione	谷胱苷肽	2.54
22	Trimethylamine	三甲胺	2.90

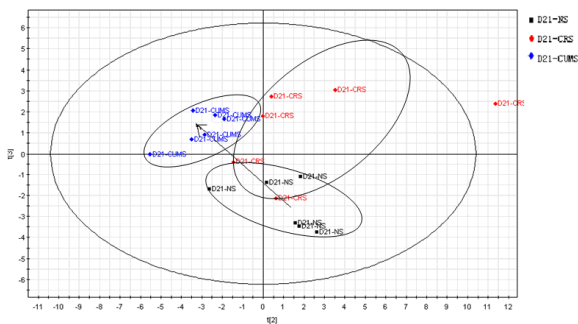


图 2 第 21 天 3 组主成分散点图
Fig.2 Scores plot of PCA in 21th day

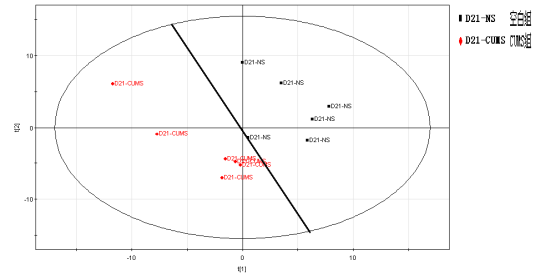


图 3 CUMS、NS 组 PLS-DA 散点图
Fig.3 CUMS and NS groups scores plot of PLS-DA

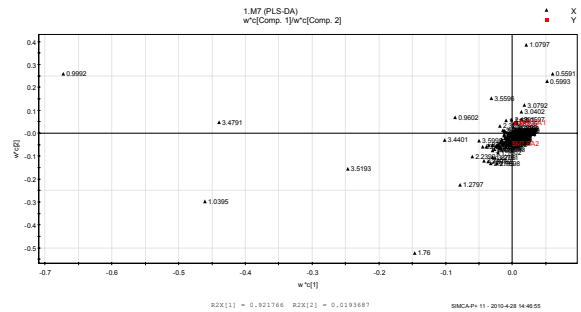


图 4 第 21 天 CUMS、NS 组 PLS-DA 载荷图
Fig.4 Loading plot for CUMS and NS groups in 21th day

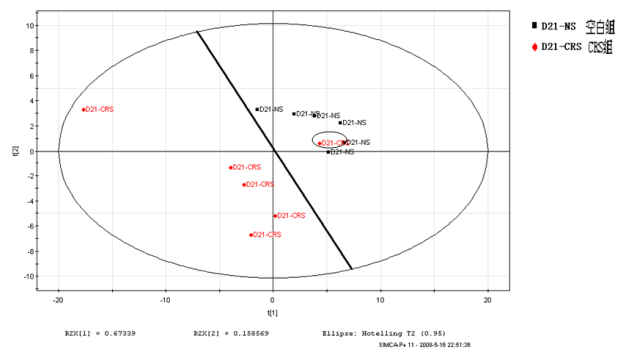


图 5 第 21 天 CRS、NS 组 PLS-DA 散点图
Fig.5 Scores plot of PLS-DA for CUMS and NS groups in 21th day

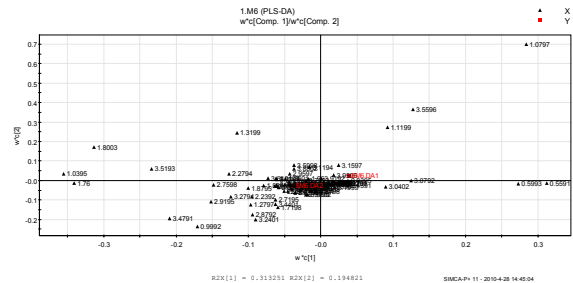


图 6 第 21 天 CRS、NS 组 PLS-DA 载荷图
Fig.6 Loading plot of PLS-DA for CUMS and NS groups in 21th day

4 结论与讨论

4.1 行为学结果显示,实验第 21 天,与正常组相比,

CUMS 模型组大鼠除水平运动外, 其余各项指标均具有统计学意义。而 CRS 模型除中央停留时间、蔗糖消耗量和糖水偏爱率与正常组相比具有统计学意义, 其他各行为学指标和体重均无统计学意义。

4.2 代谢组学结果显示, CUMS 组与正常组各样品散点比较集中, CRS 组点较分散, 介于正常与 CUMS 组之间, 结果与行为学一致。说明 CUMS 组造模比较成功, CRS 虽然也显示有部分样品(与 CUMS 组接近的样品)造模成功, 但 CRS 组比较分散, 显示 CRS 组造模不如 CUMS 组成功。代谢组学研究表明 2 种模型组与对照组都达到了较好的分离效果, 证明 2 种造模方式均明显影响大鼠体内代谢物的变化。行为学结果显示 CRS 造模不成功, 而运用代谢组学的方法显示 CRS 模型与正常组在代谢产物上有明显区别, 说明代谢组学方法比常规实验更灵敏。由于代谢组学方法与常规方法相比具有灵敏、整体、直观等特点, 因此可采用代谢组学方法对抑郁应激模型进行筛选。

4.3 本研究建立的 CUMS 模型是综合运用应激和孤养 2 种经典方法, 利用长期不可预见性的中等强度应激, 造成分养动物抑郁状态, CRS 模型是运用单一束缚应激, 模拟人类身心性疾病的致病过程造成。结果显示 CUMS 模型无论在行为学还是代谢组学方面都优于 CRS 模型, 说明 CUMS 模型的复制稳定、准确。而动物模型的稳定与准确是中药新药研究成功的前提, 因此 CUMS 模型将用于本实验室进一步的药效学及抗抑郁中药新药的筛选研究。

参考文献:

[1] 刘顺发. 我国抑郁症患病情况的流行病学研究现状[J]. 医学文选, 2006, 7, 25(4): 861-862.
[2] 李晓秋, 许晶. 抑郁动物模型的研究进展[J]. 中华精神科杂志, 2002, 35(3): 184-186.
[3] 彭贵军, 胡随瑜, 王哲, 等. 白松片对慢性应激抑郁模型大鼠行为学改变的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2004, 3(28): 231-233.
[4] 孙华, 张有志, 韩鑫, 等. 电针对慢性应激抑郁模型大鼠大脑皮层 5-HT₁ 和 5-HT₂ 受体数量和结合活性的影响[J]. 中国针灸, 2003, 9(35): 553-555.
[5] 宋炜熙, 胡随瑜, 黄川原, 等. 白松片对应激大鼠行为

及大脑皮质 NE, DA 的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2005, 30(5): 574-575.
[6] 李伟, 陈家旭. 慢性束缚应激模型大鼠海马脑啡肽 mRNA 和前强啡肽 mRNA 的表达及中药复方的影响[J]. 中华中医药杂志, 2006, 4(21): 209-212.
[7] 李伟, 陈家旭. 三种不同治疗方法对慢性束缚性应激大鼠行为学和免疫功能的影响[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(1): 33-37.
[8] 赵剑宇, 颜贤忠, 彭双清. 关木通肾毒性的代谢组学研究[J]. 中草药, 2006, 5: 725-730.
[9] 彭双清, 廖明阳, 颜贤忠. 代谢组学方法的建立及其在药物安全评价中的应用[J]. 卫生毒理学杂志, 2004, 3: 185-188.
[10] 王喜军, 孙文军, 孙晖, 等. CCl₄ 诱导大鼠肝损伤模型的代谢组学及茵陈蒿汤的干预作用研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化科技论坛, 2006, 6: 101-105.
[11] 许国旺, 杨军. 代谢组学及其研究进展[J]. 色谱, 2003, 4: 316-320.
[12] 朱勇飞, 张天宝. 代谢组学在毒理学研究中的应用[J]. 2005, 3: 156-157.
[13] 聂磊, 胡震, 罗国安, 等. 一种对照指纹图谱生成的新方法: 主成分分析[J]. 中成药, 2005, 6: 621-625.
[14] 赵宇, 谢培山, 梁逸曾, 等. 中药枳壳 HPLC 指纹图谱分析及化学模式识别分类研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 11: 812-815.
[15] 梁逸曾, 谢培山. 指纹图谱的化学模式识别分析[J]. 世界科学技术—中药现代化思路与方法, 2002, 5: 47-51.
[16] 王海涛, 薛黎明, 秦雪梅, 等. 慢性不可预知和慢性束缚抑郁模型大鼠行为学研究[J]. 山西大学学报, 2010, 33(1): 157-160.
[17] Lenz E M, Bright J, Wilson I D, et al. A ¹H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33(5): 1103-1115.
[18] Martin F P, Dumas M E. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model [J]. *Mol Syst Biol*, 2007, 3: 112.
[19] Bylesjo M, Rantalainen M, Cloarec O, et al. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification [J]. *J Chemometrics*, 2006, 20: 341-351.
[20] Constantinou M A, Papakonstantinou E, Benaki D, et al. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with principal component analysis in detecting inborn errors of metabolism using blood spots: a metabonomic approach [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 511(2): 303-312.