

• 论 著 •

# 皮质酮对原代培养海马神经元中 IDO 和 5-HTT 的调控作用\*

谭 瑞<sup>1</sup>, 刘 任<sup>2</sup>, 彭晓凤<sup>3△</sup>

1. 重庆市巴南区人民医院药剂科, 重庆 401320; 2. 重庆医科大学药学院药理教研室/重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016; 3. 重庆市合川区人民医院药剂科, 重庆 401520

**摘 要:**目的 探讨皮质酮对原代培养海马神经元的吲哚胺 2,3-双加氧酶(IDO)和 5-HT 转运体(5-HTT)的调控作用。方法 取怀孕 18 d 的 SD 大鼠分离的胎鼠海马神经元进行原代培养。采用 MTT 比色法检测海马神经元存活率;采用实时荧光定量 PCR(qPCR)和 Western blot 分别检测 IDO、5-HTT 和脑源性神经营养因子(BDNF)mRNA 及蛋白的表达水平。**结果** 皮质酮呈时间和浓度依赖性地降低海马神经元存活率,5  $\mu\text{mol/L}$  作用 24 h 引起海马神经元明显损伤( $P<0.05$ )。同时,IDO mRNA 和蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ ),BDNF mRNA 和蛋白的表达水平则显著降低( $P<0.05$ )。皮质酮的作用可以被其受体拮抗剂米非司酮(Ru-486)逆转( $P<0.05$ ),而对 5-HTT mRNA 和蛋白的表达均没有明显作用( $P>0.05$ )。**结论** 皮质酮通过激动皮质酮受体,上调 IDO,降低 BDNF 表达水平,从而损伤海马神经元;皮质酮的作用可能不是通过 5-HTT 介导产生的。

**关键词:**皮质酮; 吲哚胺 2,3-双加氧酶; 5-HT 转运体; 脑源性神经营养因子; 海马神经元

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.17.007 **中图法分类号:**R952.6

**文章编号:**1673-4130(2021)17-2076-04 **文献标志码:**A

## Regulation of IDO and 5-HTT in primary cultured hippocampal neurons by corticosterone\*

TAN Rui<sup>1</sup>, LIU Ren<sup>2</sup>, PENG Xiaofeng<sup>3△</sup>

1. Department of Pharmacy, People's Hospital of Chongqing Banan District, Chongqing 401320, China;  
2. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology/  
Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;  
3. Department of Pharmacy, Chongqing Hechuan District People's Hospital, Chongqing 401520, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of corticosterone on the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and 5-HT transporter (5-HTT) in primary cultured hippocampal neurons. **Methods** Primary culture of hippocampal neurons from fetal rats of the SD rat on the 18th day of pregnancy were performed. MTT colorimetric method was used to detect the survival rate of hippocampal neurons; the mRNA and protein expression of IDO, 5-HTT and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and Western blot, respectively. **Results** Corticosterone decreased the survival rate of hippocampal neurons in a time- and concentration-dependent manner. The treatment with 5  $\mu\text{mol/L}$  corticosterone for 24 h caused significant damage to hippocampal neurons ( $P<0.05$ ). At the same time, IDO mRNA and protein expression increased significantly ( $P<0.05$ ), while the expression of BDNF decreased significantly ( $P<0.05$ ). The effect of corticosterone could be reversed by its receptor antagonist Ru-486 ( $P<0.05$ ), while corticosterone had no significant effect on 5-HTT mRNA and protein expression ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Corticosterone can stimulate the corticosterone receptor, up-regulates IDO, and reduces the expression of BDNF, thereby damage hippocampal neurons; the effect of corticosterone may not be mediated by 5-HTT.

**Key words:** corticosterone; indoleamine 2,3-dioxygenase; 5-HT transporter; brain-derived neurotrophic factor; hippocampal neurons

\* 基金项目: 重庆市自然科学基金项目(cstc2017jcyjAX0211)。

作者简介: 谭瑞, 女, 主管药师, 主要从事药理学、临床药学的相关研究。△ 通信作者, E-mail: penny415413@qq.com。

本文引用格式: 谭瑞, 刘任, 彭晓凤. 皮质酮对原代培养海马神经元中 IDO 和 5-HTT 的调控作用[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(17):

抑郁症是一个严重的心理健康问题,也是一个世界性的公共卫生问题。抑郁症的发生与多种机制有关。下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能失调<sup>[1]</sup>、突触间隙 5-羟色胺(5-HT)水平下降<sup>[2]</sup>、脑源性神经营养因子(BDNF)表达下调<sup>[3-5]</sup>均是抑郁症发病的重要机制。但目前对于 HPA 轴与 5-HT 和 BDNF 之间的关系在抑郁症发生、发展中的作用研究较少。脑内神经递质水平与其合成和转运密切相关。5-HT 由色氨酸经色氨酸羟化酶(TPH)代谢合成。但是,色氨酸-TPH 代谢途径合成 5-HT 减少时,其另一条代谢途径,即色氨酸-犬尿氨酸(KYN)合成代偿性增加,色氨酸-KYN 途径的限速酶吡哆胺 2,3-双加氧酶(IDO)被激活<sup>[6]</sup>。此外,5-HT 的消除方式主要为 5-HT 转运体(5-HTT)的再摄取。5-HTT 已经成为常用抗抑郁药的作用靶点。但 IDO 活性增加是否介导了 HPA 轴亢进引起的抑郁症,目前研究较少。本研究拟以皮质酮刺激原代海马神经元,模拟 HPA 轴亢进条件,并给予皮质酮受体拮抗剂米非司酮(Ru-486)处理,初步确定 IDO、BDNF 及 5-HTT 在 HPA 亢进所致抑郁症中的作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物 SPF 级 SD 孕鼠,怀孕 18 d,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 DMEM-F12、B27、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;5'-BrdU、多聚赖氨酸、胰蛋白酶、皮质酮、MTT 检测试剂盒均为北京鼎国生物技术有限公司产品;Ru-486 为武汉胜天宇生物科技有限公司产品;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏省碧云天生物技术有限公司;Trizol、反转录试剂盒、SYBR Green Supermix 和 PCR 引物购自 Takara 生物试剂公司;兔抗大鼠 5-HTT、BDNF、IDO 多克隆抗体购自博奥森生物科技公司;兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo

公司。其余试剂为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 原代海马神经元培养与鉴定 取怀孕 18 d 的 SD 大鼠,处死后迅速剪开腹腔取出胎鼠,分离海马组织,用 0.125% 的胰蛋白酶消化,800 r/min 离心 10 min,按  $2 \times 10^6$  个/孔的密度接种,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。4 h 后神经元贴壁,更换培养液,以后每 48 h 半量更换培养液。于第 7 天经 NeuN 抗体(1:100)的免疫细胞化学染色鉴定,纯度可达 95 % 以上,符合实验要求。

1.3.2 MTT 比色法检测不同浓度皮质酮作用不同时间对海马神经元细胞存活率的影响 神经元细胞按照密度为  $2 \times 10^6$  个/孔接种于 96 孔板中,每孔的培养液为 100 μL。于培养第 7 天加入不同浓度的皮质酮(1、5、10、50 μmol/L)分别作用 2、24、48 h 后,每孔加入 10 μL MTT,避光,37 ℃孵育 4 h。吸出培养液,加入 200 μL DMSO,摇床震荡 10 min,至结晶物充分溶解,于酶标仪在 490 nm 波长检测吸光度值。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次,通过吸光度值计算得到细胞存活率。

1.3.3 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 mRNA 的表达 海马神经元培养第 7 天,加入皮质酮(5 μmol/L),或同时加入 Ru-486(1 μmol/L),继续孵育 24 h,按照 RNAiso Plus Total RNA 提取试剂说明书的操作程序提取总 RNA。参照 GenBank 中大鼠基因序列,由重庆医科大学生物化学与分子药理学重点实验室设计引物,经 Takara 生物技术公司合成并验证,引物序列见表 1。按照 Takara Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书操作,逆转录合成 cDNA。反应条件为 95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 40 s,共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参,对荧光强度达到阈值时的循环数(即 Ct 值)进行统计。根据相对定量公式进行计算,分析结果。每组重复 3 次。

表 1 引物序列

| 基因    | 正向引物序列(5'-3')          | 反向引物序列(5'-3')          |
|-------|------------------------|------------------------|
| IDO   | GACACCTTTTCCACGTTCTTC  | TCACCAACGTCATGCTTTATTC |
| 5-HTT | GAGCCTAGCCAAATATCCAATG | CAGGAGGAAATCCATCTTCTTG |
| BDNF  | TTTTGGTGCTTTTCTGGTTTT  | GACACCTTTTCCACGTTCTTC  |
| GAPDH | AGACAGCCGCATCTTCTTGT   | CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT   |

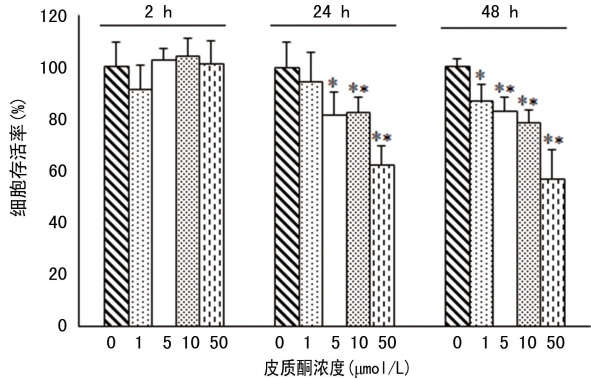
1.3.4 Western blot 检测蛋白表达 海马神经元细胞经皮质酮或皮质酮+Ru-486 共孵育 24 h 后,加入 RIPA 裂解缓冲液,冰浴条件下超声破碎细胞,12 000×g 4 ℃离心 15 min,取上清液,用 BCA 法检测蛋白浓度。取 30 μg 蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后进行转膜,封闭后加入一抗 GAPDH(1:1

000 稀释)、IDO(1:1 000 稀释)、5-HTT(1:1 000 稀释)、BDNF(1:1 000 稀释),4 ℃过夜;洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000 稀释),再次洗膜后用 ECL 发光试剂显影,用 Image Lab 软件进行图像分析。以目标蛋白与 β-actin 条带的灰度比值表示蛋白表达的相对水平。每组重复 3 次。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 Excel 和 GraphPad Prism 5.01 等软件作图。多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

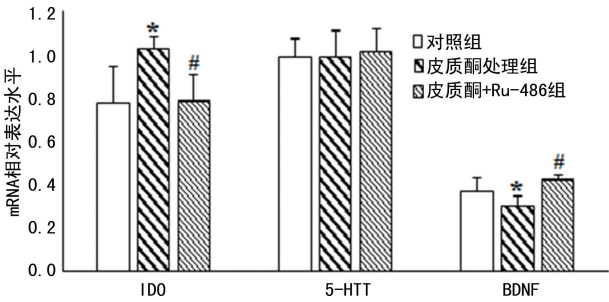
**2.1 不同浓度皮质酮作用不同时间对海马神经元细胞增殖的影响** MTT 比色法检测显示,不同浓度皮质酮处理海马神经元细胞 2 h,细胞存活率无明显变化( $P > 0.05$ );处理 24 h 和 48 h,皮质酮均浓度依赖性地降低细胞存活率。皮质酮 5  $\mu\text{mol/L}$  处理海马神经元细胞 24 h 可明显降低细胞存活率( $P < 0.05$ ),故以 5  $\mu\text{mol/L}$  处理 24 h 进行后续实验。见图 1。



注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 不同浓度皮质酮处理不同时间对海马神经元细胞存活率的影响

**2.2 皮质酮对海马神经元 IDO、5-HTT 和 BDNF mRNA 表达的影响** 皮质酮 5  $\mu\text{mol/L}$  处理细胞 24 h 后,海马神经元 IDO mRNA 表达明显增加( $P < 0.05$ ),而 BDNF mRNA 表达明显减少( $P < 0.05$ ),但 5-HTT mRNA 的表达没有明显变化( $P > 0.05$ )。Ru-486 1  $\mu\text{mol/L}$  可逆转皮质酮的作用,下调 IDO mRNA 表达( $P < 0.05$ ),上调 BDNF mRNA 的表达( $P < 0.05$ )。Ru-486 处理对 5-HTT 的表达也没有明显影响( $P > 0.05$ )。见图 2。

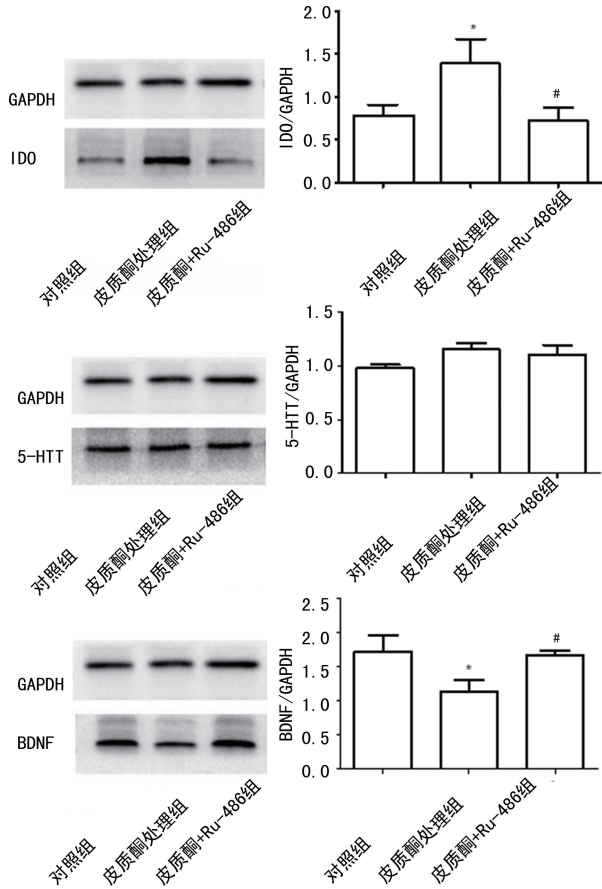


注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ;与皮质酮处理组比较,#  $P < 0.05$ 。

图 2 皮质酮对海马神经元 IDO、5-HTT 及 BDNF mRNA 表达的影响

**2.3 皮质酮对海马神经元 IDO、5-HTT 和 BDNF 蛋白表达的影响** 与对 mRNA 表达的影响类似,皮质

酮上调 IDO 蛋白表达( $P < 0.05$ ),下调 BDNF 蛋白表达( $P < 0.05$ ),但对 5-HTT 蛋白的表达没有明显影响( $P > 0.05$ );给予 Ru-486 处理后,皮质酮对 IDO 和 BDNF 蛋白表达的作用明显被逆转( $P < 0.05$ )。Ru-486 对 5-HTT 蛋白的表达也没有明显影响( $P > 0.05$ )。见图 3。



注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ;与皮质酮处理组比较,#  $P < 0.05$ 。

图 3 皮质酮对海马神经元 IDO、5-HTT 及 BDNF 蛋白表达的影响

**3 讨 论**

内分泌系统功能异常在抑郁症的发生中有重要作用<sup>[7-8]</sup>。HPA 轴学说认为,当机体受到外界刺激时,下丘脑室旁核神经元分泌促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),使垂体释放促肾上腺皮质激素(ACTH),ACTH 作用于肾上腺皮质,释放糖皮质激素(皮质酮/皮质酮)。而后,糖皮质激素作用于糖皮质激素受体,反馈性地调节 CRH、ACTH 的释放,阻断其兴奋效应<sup>[9]</sup>。而在抑郁发生时,由于持续的应激反应,机体产生过多糖皮质激素,与海马糖皮质激素受体结合,损伤海马结构和功能,对 HPA 轴的负反馈抑制作用减弱,机体生成更多糖皮质激素,HPA 轴功能表现亢进<sup>[10]</sup>。海马是情绪调节和学习记忆的重要脑区,HPA 轴亢进损伤海马神经元结构和功能,故抑郁患者出现情绪和认知障碍<sup>[11]</sup>。现常以皮质酮损伤海马神经元细胞模型研究 HPA 轴亢进与抑郁的相关

性<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,皮质酮呈浓度依赖性和时间依赖性损伤神经元。皮质酮 5  $\mu\text{mol/L}$  作用 24 h,海马神经元即出现明显损伤。

单胺学说是抑郁症发生的重要学说之一。临床目前使用的抗抑郁药大多以该学说为基础。目前研究发现,抑郁患者和动物模型体内普遍 HPA 轴亢进,血清皮质酮/皮质酮水平较正常组明显升高<sup>[13]</sup>,同时伴随 5-HT 水平下降<sup>[14]</sup>。但对于 HPA 轴亢进是否能引起 5-HT 减少,以及通过何种途径使 5-HT 作用下降,目前未见报道。本研究结果显示,给予皮质酮刺激后,海马神经元 IDO mRNA 和蛋白表达均下调,且糖皮质激素受体拮抗剂 Ru-486 可逆转皮质酮的作用,提示皮质酮作用于海马神经元糖皮质激素受体,激活 IDO,使色氨酸-KYN 途径增强,而色氨酸-TPH 途径减弱,5-HT 合成减少。但皮质酮对 5-HTT 的表达没有影响,提示 HPA 轴亢进并不是通过增强 5-HTT 的作用增加 5-HT 再摄取来减少 5-HT 水平。

已有研究证明 BDNF 下降与抑郁发生有明显相关性。抑郁症患者 5-HT<sub>2</sub> 受体超敏,激活“Gq 蛋白-磷脂酶 C(PLC)-三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)-Ca<sup>2+</sup> 通道”,抑制 BDNF 合成,损伤神经保护机制和突触可塑性,使抑郁患者工作记忆功能受损<sup>[15]</sup>。本研究显示,皮质酮作用可使海马神经元 BDNF 表达下调,该作用可被 Ru-486 逆转,提示 HPA 轴亢进,使 5-HT 合成减少后,可能通过下调 BDNF 表达,导致抑郁发生。

综上所述,本研究结果提示皮质酮可能通过激活海马神经元细胞内糖皮质激素受体,上调 IDO 表达,减少 BDNF 表达,诱导抑郁症发生;值得注意的是,皮质酮并未直接影响 5-HTT 的表达。

## 参考文献

- [1] CERUSO A, MARTINEZ-CENGOTITABENGOA M, PETERS-CORBETT A, et al. Alterations of the HPA axis observed in patients with major depressive disorder and their relation to early life stress: a systematic review [J]. *Neuropsychobiology*, 2020, 79(6): 417-427.
- [2] DUBEY V K, ANSARI F, VOHORA D, et al. Possible involvement of corticosterone and serotonin in antidepressant and anxiolytic effects of chromium picolinate in chronic unpredictable mild stress induced depression and anxiety in rats[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2015, 29: 222-226.
- [3] LIN C C, HUANG T L. Brain-derived neurotrophic factor and mental disorders[J]. *Biomed J*, 2020, 43(2): 134-142.
- [4] LUAN S, ZHOU B, WU Q, et al. Brain-derived neurotrophic factor blood levels after electroconvulsive therapy in patients with major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis[J]. *Asian J Psychiatr*, 2020, 51: 101983.
- [5] PHILLIPS C. Brain-derived neurotrophic factor, depression, and physical activity: making the neuroplastic connection[J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 7260130.
- [6] MURAKAMI Y, ISHIBASHI T, TOMITA E, et al. Depressive symptoms as a side effect of interferon- $\alpha$  therapy induced by induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29920.
- [7] BAO A M, SWAAB D F. The stress systems in depression: a postmortem study[J]. *Eur J Psychotraumatol*, 2014, 5: 26521.
- [8] MICALE V, DRAGO F. Endocannabinoid system, stress and HPA axis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 834: 230-239.
- [9] 沈渔邨. 精神病学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [10] HOWLAND R H. Mifepristone as a therapeutic agent in psychiatry[J]. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*, 2013, 1(6): 11-14.
- [11] MAHAR I, BAMBICO F R, MECHAWAR N, et al. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014, 38: 173-192.
- [12] LIU Y, ZOU G J, TU B X, et al. Corticosterone induced the increase of proBDNF in primary hippocampal neurons via endoplasmic reticulum stress[J]. *Neurotox Res*, 2020, 38(2): 370-384.
- [13] CUI X Y, YANG G, CUI S Y, et al. Sleep patterns deteriorate over time in chronic corticosterone-treated rats[J]. *Neurosci Lett*, 2018, 682: 74-78.
- [14] PYTKA K, GLUCH-LUTWIN M, KOTANSKA M, et al. Single administration of HBK-15-a Triple 5-HT(1A), 5-HT(7), and 5-HT(3) receptor antagonist-reverses depressive-like behaviors in mouse model of depression induced by corticosterone[J]. *Mol neurobiol*, 2018, 55(5): 3931-3945.
- [15] LEVY M J F, BOULLE F, STEINBUSCH H W, et al. Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression[J]. *Psychopharmacology(Berl)*, 2018, 235(8): 2195-2220.

(收稿日期: 2020-11-28 修回日期: 2021-05-12)