

บทบาทของเอสโตรเจนต่อระบบสารสื่อประสาทเซโรโทนิน  
ที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกังวลในหนูที่ถูกตัดรังไข่

นางสาว จันทริมา ปิ่นทนนทกะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาชีววิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2904-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ROLES OF ESTROGEN ON THE SEROTONERGIC  
NEUROTRANSMISSION INVOLVED IN THE ANXIETY-LIKE  
BEHAVIORS OF OVARIECTOMIZED RATS**



Miss Jantarima Pandaranandaka

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Physiology  
(Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-53-2904-5

Thesis Title Roles of estrogen on the serotonergic neurotransmission involved in the anxiety-like behaviors of ovariectomized rats.  
By Miss Jantarima Pandaranandaka  
Field of study Physiology  
Thesis Advisor Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong  
Thesis Co-advisor Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti


---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Doctor's Degree


.....Dean of the Graduate School

(Assistant Professor M.R.Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong, D.V.M., Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti, D.V.M., Ph.D.)

.....Member

(Professor Anan Srikiatkachorn, M.D.)

.....Member

(Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Chuthamane Suthisang, Ph.D.)

จันทร์มา ปัทมรณนทกะ : บทบาทของเอสโตรเจนต่อระบบสารสื่อประสาทเซโรโทนินที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกังวลในหนูที่ถูกตัดรังไข่. (ROLES OF ESTROGEN ON THE SEROTONERGIC NEUROTRANSMISSION INVOLVED IN THE ANXIETY-LIKE BEHAVIORS OF OVARECTOMIZED RATS.)


อ. ที่ปรึกษา : ผศ.สพญ.ดร.สฤณี กลั่นทกานนท์ ทองทรง, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.สพญ.ดร.สุทธาสินี ปุญญโชติ 129 หน้า. ISBN 974-53-2904-5.

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการควบคุมความกังวล แต่กลไกที่เกิดขึ้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจน ต่อระบบสารสื่อประสาทเซโรโทนินในสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกังวลในหนูที่ถูกตัดรังไข่ โดยหนูเพศเมียถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ หนูตัดรังไข่ได้รับเอสโตรเจนทดแทนที่ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หนูตัดรังไข่ และหนูที่มีรอบการเป็นสัดอยู่ในช่วงโพเรสตรัส ภายหลังจากตัดรังไข่ 4 สัปดาห์ หนูทั้งหมดได้รับการทดสอบพฤติกรรมกังวลด้วย elevated T-maze และทดสอบพฤติกรรมการเคลื่อนไหวด้วย open field และเพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการทำงานของระบบสารสื่อประสาทเซโรโทนิน ได้ทำการเก็บสมองของหนูทั้ง 3 กลุ่มภายหลังจากการทดสอบพฤติกรรม เพื่อนำมาวิเคราะห์ระดับเซโรโทนิน และ เมตาบอลไลท์ ด้วยวิธี HPLC เทคนิค และวิเคราะห์โปรตีน เอนไซม์ทริปโตเฟนไฮดรอกซีเลส และ เซโรโทนินรีอเพกเททรานสปอตเตอร์ ด้วยวิธี Western blot เทคนิค โดยระดับเซโรโทนิน เมตาบอลไลท์ และ โปรตีนเซโรโทนินรีอเพกเททรานสปอตเตอร์ ทำการวัดที่สมองส่วน frontal cortex, nucleus accumbens, septum, amygdala และ hippocampus สำหรับโปรตีนเอนไซม์ทริปโตเฟนไฮดรอกซีเลส ทำการวัดที่สมองส่วน midbrain นอกจากนี้เพื่อศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อการทำงานของตัวรับ 5-HT<sub>2A/2C</sub> ได้ทำการให้ยาที่มีผลยับยั้งการทำงานของตัวรับเซโรโทนินนี้ต่อหนูอีกชุดหนึ่งจากแต่ละกลุ่มทดลองดังกล่าว ในขนาด 0.3, 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการทดสอบด้วย elevated T-maze

ผลของการทดสอบพฤติกรรมกังวลโดยใช้ elevated T-maze พบว่า หนูตัดรังไข่และได้รับเอสโตรเจนทดแทน ใช้เวลาในการอยู่ในแขนปิดของ maze น้อยกว่าหนูกลุ่มอื่น รวมทั้งพบว่า หนูโพเรสตรัสอยู่บนแขนเปิดนานกว่าหนูกลุ่มอื่นด้วย จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า หนูที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทนมีความกังวลแบบ generalized anxiety disorder ลดลง และหนูที่มีระดับเอสโตรเจนสูงขึ้นตามธรรมชาติมีความกังวลแบบ panic disorder ลดลง สำหรับการทำงานของระบบประสาทเซโรโทนิน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับเซโรโทนิน และเมตาบอลไลท์ เกิดขึ้นในสมองส่วน hippocampus และ nucleus accumbens โดยมีระดับของสัดส่วนของเมตาบอลไลท์ต่อเซโรโทนินเพิ่มขึ้นในหนูตัดรังไข่และได้รับเอสโตรเจนทดแทน สำหรับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเอนไซม์ทริปโตเฟนไฮดรอกซีเลส ที่ midbrain พบว่าลดลงทั้งในหนูที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทน และหนูโพเรสตรัส โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเซโรโทนินรีอเพกเททรานสปอตเตอร์ นอกจากนั้นพบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนน่าจะมีผลต่อการทำงานของตัวรับ 5-HT<sub>2A/2C</sub> โดยยาที่มีผลยับยั้งการทำงานของตัวรับเซโรโทนินมีแนวโน้มที่จะลดความกังวล ในหนูโพเรสตรัสเมื่อทดสอบด้วย elevated T-maze และหนูตัดรังไข่เมื่อทดสอบด้วย open field โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ขนาด 3.0 มิลลิกรัมสุดท้ายไม่พบความแตกต่างของการเคลื่อนไหวของหนูทุกกลุ่มเมื่อทดสอบด้วย open field จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นถึงการทำงานของเอสโตรเจนที่แตกต่างกันในการลดความกังวล ในหนูที่ได้รับฮอร์โมนนี้อย่างต่อเนื่องจากภายนอก และหนูที่มีระดับสูงขึ้นเองชั่วขณะโดยธรรมชาติ โดยผลของการลดความกังวลโดยเอสโตรเจนนี้มีความสัมพันธ์กับการทำงานของระบบสารสื่อประสาทเซโรโทนิน

สาขาวิชา.....สรีรวิทยา (สหสาขาวิชา).....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4589653120 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD : ANXIETY / ELEVATED T-MAZE / ESTROGEN / OVARIECTOMY / SEROTONIN

JANTARIMA PANDARANANDAKA : ROLES OF ESTROGEN ON THE SEROTONERGIC NEUROTRANSMISSION INVOLVED IN THE ANXIETY-LIKE BEHAVIORS OF OVARIECTOMIZED RATS. THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF. SARINEE KALANDAKANOND-THONGSONG, D.V.M., Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSIST.PROF. SUTTHASINEE POONYACHOTI, D.V.M., Ph.D., 129 pp. ISBN 974-53-2904-5.

There are evidences of an important role of estrogen on the regulation of anxiety but the mechanism is not yet clear. The current study aimed to investigate the roles of estrogen on the serotonergic transmission in the brain areas involving the anxiety-like behaviors in ovariectomized rats. Female rats were divided into 3 groups, the ovariectomized rats treated with  $17\beta$ -estradiol ( $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ , s.c.) (Ovx+E<sub>2</sub>) or with vehicle (Ovx) and proestrous rats (Pro). Four weeks after ovariectomy, all rats were tested with the elevated T-maze (ETM) and followed by the open field, in order to measure for anxiety level and locomotor activity, respectively. To study the effects of estrogen on serotonergic neural transmission, the brains were removed immediately after behavioral tests, for measurement of 5-HT and its metabolite (5-HIAA) levels by HPLC technique, and tryptophan hydroxylase (TPH) enzyme and serotonin reuptake transporter (SERT) protein levels by Western blot analysis. The 5-HT, its metabolite, and SERT protein levels were measured in frontal cortex, nucleus accumbens, septum, amygdala, hippocampus, whereas TPH protein levels measured in midbrain. Finally, to examine whether estrogen had an effect on the function of 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor, the 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist (0.3, 1.0, and 3.0 mg/kg, i.p.) was injected to a separate set of animals from each group, 30 min before tested with ETM.

In the ETM test, Oxv+E<sub>2</sub> rats impaired inhibitory avoidance as compared with Oxv rats, indicating chronic estrogen administration has an effect on decreasing conditioned anxiety related to generalized anxiety disorder. In contrast, the Pro rats prolonged escape as compared with both Oxv and Oxv+E<sub>2</sub> rats, indicating natural high level of estrogen has an effect on decreasing unconditioned anxiety related to panic disorder. The measurements of brain 5-HT and its metabolite levels revealed the increased turnover rates (5-HIAA/5-HT ratio) in the hippocampus and the nucleus accumbens of Oxv+E<sub>2</sub> rats than those of Oxv and Pro rats. The TPH protein levels in the midbrain of Oxv+E<sub>2</sub> and Pro rats significantly lower than Oxv rats and no significant different in SERT protein levels in all measured brain areas. Additionally, the function of 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor may also affect by estrogen as the 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist at the dosage of 3.0 mg/kg significantly decreased both avoidance 1 and 2 latencies of ETM in Pro rats. Further, the open field showed that the same dosage of 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist tended to increase time in the inner zone and decrease time in outer zone of Oxv rats. Finally, locomotor activity was not affected by any treatment. In conclusion, the chronic estrogen administration to Oxv rats and the natural high levels of estrogen in Pro rats demonstrated the anxiolytic response in different form of anxiety. Despite the difference, this study has clearly demonstrated that estrogen has an effect on anxiolytic-like behavior in related to the function of serotonergic neural transmission.

Field of study...Physiology (Inter-department)...Student's signature.....  
 Academic year.....2005.....Advisor's signature.....  
 Co-advisor's signature.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my gratitude and appreciation to my kind advisor, Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong, and my co-advisor, Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti, for their excellent instruction, guidance, encouragement and support during the working process, which enable me to carry out this study. Their kindness will be forever remembered.

I would like to express my sincere thanks to the chairman, Associate Professor Prasong Siriviriyakul and my thesis committee, Professor Anan Srikiatkachorn, Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, and Associate Professor Chuthamane Suthisisang, for their valuable comments, suggestions and corrections of this thesis.

I wish to express my sincere thanks to all my teachers in Inter-department of Physiology, Graduate School, Chulalongkorn University for all their loving helps during the time I was studying.

My appreciations are also devoted to my dear family and all of my friends for their love, kindness and support my mind throughout this study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURE REVIEWS.....	4
A. Anxiety.....	4
B. Serotonergic system.....	12
C. Estrogen.....	21
D. Experimental models of anxiety.....	29
III. MATERIALS AND METHODS.....	34
A. Animals.....	34
B. Chemicals.....	34
C. Experimental protocols.....	35
D. Methods.....	37
E. Summary of experimental design.....	47
IV. RESULTS.....	49
1. The effects of estrogen on the anxiety-like behaviors of the ovariectomized rats in the elevated T-maze.....	50
2. The effects of estrogen on the serotonergic neurotransmission after the elevated T-maze test.....	57
3. The effects of estrogen on the postsynaptic serotonin receptor function on the anxiety-like behaviors tested with the ETM.....	65
V. DISCUSSION.....	70
VI. CONCLUSION.....	81
REFERENCES.....	82
APPENDIX.....	105
BIOGRAPHY.....	129

## LIST OF TABLES

	PAGE
Table 1	Efficacy of various classes of drugs in anxiety disorders.....11
Table 2	Estrogen effects on clinically relevant non-reproductive functions..... 25
Table 3	Brain regions affected by estrogens.....26
Table 4	Body weight (BW), daily weight gain (DWG), daily food intake (DFI), uterine weight (UW), and percentage of uterine-to-body weight ratio (% UW/BW) of ovariectomized (Ovx), estrogen treated ovariectomized (Ovx+E <sub>2</sub> ), and proestrous (Pro) rats,.....51
Table 5	The effects of estrogen on inhibitory avoidance and one-way escape tested in the elevated T-maze.....53
Table 6	The effects of estrogen on locomotor activity and anxiety-liked behaviors tested in the open field.....55
Table 7	The 5-HT, 5-HIAA levels, and 5-HIAA/5-HT ratio in frontal cortex (FC), amygdala (A), hippocampus (H), nucleus accumbens (NA), and septum (S) of ovariectomized (Ovx), estrogen treated ovariectomized (Ovx+E <sub>2</sub> ), and proestrous (Pro) rats.....59
Table 8	Correlation between the anxiety-liked behaviors tested with the elevated T-maze and 5-HT, 5-HIAA levels, and 5-HIAA/5-HT ratio in amygdala, hippocampus, and septum of ovariectomized and estrogen treated ovariectomized rats.....61
Table 9	Effect of 5-HT <sub>2A/2C</sub> receptor antagonist (ritanserin) on inhibitory avoidance and one-way escape in the ETM.....68
Table 10	Effect of 5-HT <sub>2A/2C</sub> receptor antagonist (ritanserin) in open field test.....69

ศูนย์วิจัยทางเภสัชวิทยา  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## LIST OF FIGURES

		PAGE
Figure 1	Diagram of direct connections between the central nucleus of the amygdala and a variety of hypothalamic and brainstem target areas that may be involved in different animal tests of fear and anxiety.....	5
Figure 2	Schematic drawing depicting the location of the serotonergic cell body groups in a sagittal section of the rat central nervous system and their major projections.....	13
Figure 3	The biosynthesis and catabolism of 5-HT.....	14
Figure 4	Targets within the 5-HT synapse.....	19
Figure 5	The biosynthetic pathway for the estrogens.....	23
Figure 6	Diagram of the experimental protocol 1.....	35
Figure 7	Diagram of the experimental protocol 3.....	36
Figure 8	The ETM consists of three arms of equal dimension (50 × 10 cm) elevated 50 cm from the floor. One of these arms was enclosed by lateral walls (40 cm high) and was positioned perpendicularly to the two opposed open arms.....	39
Figure 9	(A) The open field apparatus was a wooden box (76 cm long × 57 cm wide × 35 cm high) with a 48-square grid floor (6 × 8 squares, 9.5 cm per side). (B) Floor of the maze was divided into 2 zones, 24 peripheral squares considered as outer zone (gray area) and remaining 24 inner squares as inner zone (white area).....	40
Figure 10	Diagrammatic representation of brain cutting block illustrating orientation of brain and placement of razor blades to obtain coronal brain sections.....	42
Figure 11	Diagrammatic representation of coronal brain sections from which brain regions are dissected.....	42
Figure 12	The chromatogram represents peaks of standard 5-HT and 5-HIAA measured by HPLC-EC.....	44
Figure 13	Histograms illustrate mean latency time (seconds ± S.E.M) of ovariectomized, estrogen treated ovariectomized, and proestrous rats on (A) inhibitory avoidance task and (B) one-way escape task of the elevated T-maze.....	54

- Figure 14 Histograms illustrate (A) mean numbers of total crosses ( $\pm$  S.E.M) and (B) mean time in seconds ( $\pm$  S.E.M) in outer and inner zone of ovariectomized, estrogen treated ovariectomized, and proestrous rats in open field test.....56
- Figure 15 The chromatograms represent 5-HT and 5-HIAA levels in hippocampus of (A) ovariectomized, (B) estrogen treated ovariectomized, and (C) proestrous rats measured by HPLC.....58
- Figure 16 Histograms illustrate (A) mean ( $\pm$  S.E.M) 5-HT, (B) 5-HIAA contents and (C) 5-HIAA/5-HT ratio in frontal cortex, amygdala, hippocampus, nucleus accumbens, and septum of estrogen treated ovariectomized, ovariectomized, and proestrous rats.....60
- Figure 17 Regression analysis of (A) 5-HT levels and (B) 5-HIAA/5-HT ratio in the amygdala and the avoidance 2 latency time in the elevated T-maze test of ovariectomized and estrogen treated ovariectomized rats.....62
- Figure 18 Regression analysis of 5-HT levels in the hippocampus and the avoidance 2 latency time in the elevated T-maze test of ovariectomized and estrogen treated ovariectomized rats.....63
- Figure 19 Regression analysis of (A) 5-HT levels and (B) 5-HIAA levels and (C) 5-HIAA/5-HT ratio in the septum and the avoidance 2 latency time in the elevated T-maze test of ovariectomized and estrogen treated ovariectomized rats.....64
- Figure 20 (A) Photograph represents the example of immunoreactive bands in Western blot probed with specific antibody to TPH enzyme and  $\beta$ -actin. (B) Histogram illustrates mean ( $\pm$  S.E.M) of TPH/ $\beta$ -actin protein levels of ovariectomized, estrogen treated ovariectomized, and proestrous rats in midbrain.....66
- Figure 21 (A) Photograph represents the example of immunoreactive bands in Western blot probed with specific antibody to SERT and  $\beta$ -actin in amygdala. (B) Histogram illustrates mean ( $\pm$  S.E.M) of SERT/ $\beta$ -actin protein levels in frontal cortex, amygdala, hippocampus, nucleus accumbens, and septum of ovariectomized, estrogen treated ovariectomized, and proestrous rats.....67

## LIST OF ABBREVIATIONS

5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid
5-HT	serotonin
5-HTP	5-hydroxytryptophan
A	amygdala
AADC	aromatic L-amino acid decarboxylase
ACh	acetylcholine
BDZs	benzodiazepines
BW	body weight
DA	dopamine
DHBA	3,4-dihydroxy-benzyl-amine hydrobromide
DSM	diagnostic and statistical manual
DWG	daily weight gain
E <sub>2</sub>	17 $\beta$ -estradiol
EPM	elevated plus-maze
ER	estrogen receptor
ERT	estrogen replacement therapy
ETM	elevated T-maze
FC	frontal cortex
GABA	gamma-aminobutyric acid
GAD	generalized anxiety disorder
H	hippocampus
HPA	hypothalamic-pituitary-axis
HPLC	high-performance liquid chromatography
i.p.	intraperitoneal injection
MAOIs	monoamine oxidase inhibitors
MDMA	3,4-methylenedioxymethamphetamine
min	minute
NA	nucleus accumbens
NE	norepinephrine
OCD	obsessive-compulsive disorder
Ovx	ovariectomized

PAG	periaqueductal gray matter
PCA	parachloroamphetamine
PD	panic disorder
Pro	proestrous
PTSD	posttraumatic stress disorder
s	second
S	septum
s.c.	subcutaneous injection
SAD	social anxiety disorder
SDS	sodium dodecyl sulfate
SERT	serotonin reuptake transporter
SSRIs	selective serotonin reuptake inhibitors
TCAs	tricyclic antidepressants
TPH	tryptophan hydroxylase
UW	uterine weight
Veh	vehicle



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย