

慢性不可预知应激所致抑郁小鼠性行为受损及 VTA 脑区 BDNF 的表达下降

王丹,邱长云,孟凡涛,赵娣,刘翠兰,刘晶,李晨,王文涛

摘要 **目的** 研究慢性不可预知应激(CUS)对小鼠性行为的影响及其可能分子机制。**方法** 将20只雄性C57BL/6J小鼠随机均分为Control组和CUS组,并平衡两组间小鼠的体质量,对照组3~5只/笼,正常喂养;CUS组给予21 d CUS结合单笼饲养,建立抑郁模型。21 d后,进行糖水偏好实验和强迫游泳实验验证CUS的效果。通过嗅觉偏好测试和雌鼠尿液嗅实验检测小鼠的性行为,检测小鼠腹侧被盖区(VTA)脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白和mRNA的表达。**结果** CUS导致小鼠糖水偏好降低($P < 0.05$),强迫游泳不动时间增加($P < 0.05$)等抑郁样行为,小鼠嗅觉偏好测试中在雌鼠垫料一侧的时间与在雄鼠垫料一侧的时间无差异,雌鼠尿液嗅实验中闻嗅雌鼠尿液的时间减少($P < 0.05$)等性行为受损,且CUS小鼠VTA脑区BDNF的蛋白表达降低,BDNF总mRNA和Exon I、Exon II mRNA表达量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** CUS致抑郁小鼠性行为受损和VTA脑区BDNF表达下降,表明BDNF信号通路可能参与CUS致小鼠性行为受损的调控。

关键词 慢性不可预知应激;抑郁;性行为;腹侧被盖区;脑源性神经营养因子

中图分类号 R 749

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0455-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.022

性爱行为对于物种延续是必不可少的,嗅觉运动发生在行为交互中,并引导性行为的发生^[1]。啮齿类动物中,嗅觉帮助动物发现配偶,决定它们的行为输出^[2],对动物嗅觉行为的检验可作为评价小鼠性相关行为的指标^[3]。腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)是调控性奖赏行为的主要脑区。

2021-12-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81601189);山东省自然科学基金(编号:ZR2019P);山东省医药卫生科技发展计划(编号:2019WS329);滨州医学院科研计划(编号:BY2018KJ21)

作者单位:滨州医学院附属医院代谢与神经精神疾病研究所,滨州256603

作者简介:王丹,女,主管技师;

王文涛,男,助教,责任作者, E-mail: wangwentao1897@163.com;

李晨,男,讲师,责任作者, E-mail: lc_0625@163.com

VTA-多巴胺环路系统处理动机以及与社会奖赏相关的需求^[4-6]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是大脑中含量最丰富、分布最广的一种神经营养因子,研究报道BDNF能够调控动机行为和影响性行为^[7-9],性行为也能影响VTA脑区BDNF的表达^[10]。但是,慢性不可预知应激(chronic unpredictable stress, CUS)致小鼠抑郁后,小鼠性行为表现及VTA脑区BDNF的表达尚未报道。该研究利用CUS小鼠抑郁模型,结合性相关行为测定方法及综合运用免疫荧光、Western blot、荧光定量PCR的方法检测VTA脑区BDNF的变化,为研究抑郁降低小鼠性相关行为提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20只C57BL/6J雄鼠,从美国Jackson实验室购买,并在SPF级动物房进行繁殖饲养,小鼠3~5只/笼,自由饮水和饮食,环境温度19~22℃,相对湿度40%~60%,维持12 h光照/12 h黑暗的昼夜节律。小鼠饲养到8周后开始进行实验,实验动物许可证:SYXK(鲁)2018 022,所有行为学实验均于滨州医学院附属医院动物行为学实验室进行。

1.1.2 主要试剂与仪器 兔抗BDNF单克隆抗体(英国Abcam公司);鼠抗 β -actin单克隆抗体(美国Cell signaling公司);鼠抗TH抗体(美国immunostar公司);羊抗兔二抗IR Dye800CW,驴抗鼠二抗IR Dye680LT,ALexa fluor 488山羊抗兔荧光二抗、ALexa fluor 546驴抗鼠荧光二抗(美国Thermo Fisher公司)。双红外激光成像系统Odyssey Sa(美国LiCOR公司)。共聚焦显微镜购自日本奥林巴斯有限公司(FV1200)。总RNA提取试剂盒(美国Omega公司);RNA反转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司);RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);Real-time PCR仪(StepOnePlus)(美国麻省ABI公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验步骤 小鼠随机分为 Control 组和 CUS 组, 每组 10 只。CUS 组单笼饲养, 方法参照文献^[11], 对照组 3~5 只/笼, 不给予任何干预, 放置在另一房间。CUS 结束后, 小鼠进行糖水偏好实验和强迫游泳实验检测 CUS 的效果; 通过嗅觉偏好测试和雌鼠尿液嗅实验检测 CUS 对小鼠性行为的影响。小鼠进行自主活动实验检测小鼠的活动能力。最后小鼠断头取脑, 提取小鼠 VTA 脑区组织, 检测 BDNF 蛋白及 mRNA 的水平。

1.2.2 CUS 抑郁模型的建立 CUS 抑郁模型参考文献的方法^[11], CUS 组给予 21 d CUS 结合单笼饲养: 第 1、8、15 天束缚 2 h, 第 2、9、16 天给与 24 h 光照, 第 3、10、17 天电击 10 min (0.3 mA 电击 2 s, 间歇 16 s, 共 10 min), 第 4、11、18 天夹尾 15 min, 第 5、12、19 天高台 30 min, 第 6、13、20 天给与 24 h 湿盒并倾斜 45°, 第 7、14、21 天冷水游泳 (8 °C)。整个应激在尽力减少小鼠不舒适性的前提下让刺激达到最大的不可预知性, 应激结束后经抑郁样行为实验评判模型是否成功。

1.2.3 糖水偏好实验 小鼠在进行糖水偏好实验前先适应双瓶水 1 周。然后小鼠在居住笼中进行测试, 测试前小鼠剥夺饮水 5 h, 然后小鼠笼中一侧放平时用的饮水, 另一侧放置饮水配置的 1% 的蔗糖水, 测试夜间 12 h 内小鼠摄取的饮水量和糖水量, 然后计算糖水偏好指数 (糖水偏好指数 = 糖水消耗/总液体消耗 × 100%), 糖水偏好指数反映小鼠快感缺乏程度。

1.2.4 强迫游泳实验 小鼠在测试房间适应 2~3 h 后开始进行强迫游泳实验, 实验装置为一个高度 25 cm、直径 10 cm 的透明树脂圆筒, 实验时注入深度为 15 cm、温度为 24 °C 的自来水, 将小鼠放置进水中, 放置小鼠时要避免小鼠头部入水, 用摄像头记录小鼠 6 min 的行为视频, 其中前 2 min 为小鼠适应阶段, 分析小鼠后 4 min 的静止不动时间。以小鼠在绝望环境中试图逃脱又无法逃脱的状态评判小鼠的抑郁程度, 每只小鼠都需更换新水。

1.2.5 自主活动实验 小鼠在测试房间适应 2~3 h 后开始进行自主活动测试。小鼠放置在 40 cm × 40 cm × 40 cm 的旷场装置中自由探索 30 min, 通过装置上方摄像头跟踪记录小鼠的运动, 然后通过 Anymaze 软件对小鼠运动的距离进行分析。

1.2.6 嗅觉偏好测试 参照文献^[12]的方法测试前先要进行适应 1 d, 小鼠放置于装置中自由探索 15 min, 允许它们能够自由探索整个装置, 以便排除对一侧有偏好的小鼠。接下来的 2 d, 测试小鼠在此装

置中对发情期雌鼠污染过的垫料或者雄鼠污染过的垫料以及干净垫料的偏好 (垫料的顺序需要在小鼠之间进行平衡)。10 min 适应之后, 30 ml 干净的垫料放置于一侧的塑料杯中, 另一侧放置相同量的污染过的垫料, 两个塑料杯分别放在 2 个箱室的一个角落。小鼠自由探索 5 min。记录小鼠分别与两个杯子交互的时间和在两侧箱室的时间, 通过 Anymaze 软件对小鼠运动的轨迹进行记录。

1.2.7 雌鼠尿液嗅实验 实验开始前, 小鼠单笼适应 2~3 h。然后笼子中放入一个灭菌的棉签适应 1 h。整个实验都要在灯光昏暗的房间进行, 亮度为 3 lux。实验开始后小鼠笼中放置蘸有水的棉签测试 3 min, 测试蘸有水的棉签 45 min 后, 小鼠笼中放置蘸有来自发情期雌鼠的尿液的棉签测试 3 min。3 min 测试期间记录小鼠嗅闻棉签的时间。实验中需要排除在笼中不动, 不闻嗅棉签的小鼠。

1.2.8 Western blot CUS 结束后, 小鼠断头, 并在冰上迅速分离海马, 置液氮中速冻, -80 °C 保存备用。取出海马用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液进行裂解, 然后加入 5 × 上样染料, 沸水煮 10 min, 然后用 12% 或 15% 的 SDS-PAGE 胶进行分离, 并转到 PVDF 膜上, 膜用 TBST buffer (20 μmmol/L TRIS-HCl, pH7.4, 150 μmmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 配制的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 然后经过一抗 (兔抗 BDNF 1 : 500, 鼠抗 β-actin 1 : 1 000) 过夜孵育, 加荧光二抗 (羊抗兔 1 : 5 000, 驴抗鼠 1 : 5 000) 室温孵育 1 h, 经 Odyssey Sa 双红外激光成像系统成像并进行灰度识别分析。

1.2.9 免疫荧光 脑片制备 C57BL/6 小鼠, 4% 水合氯醛深度麻醉后, 4% 多聚甲醛固定, 取脑组织, 经 30% 蔗糖水脱水进行冰冻切片, 厚度 40 μm。免疫荧光染色: 取 VTA 脑区的脑片经封闭液封闭后, 加入稀释后的一抗 (兔抗 BDNF 1 : 200, 鼠抗 TH 1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, 加入二抗混合液 (ALexa fluor 488 山羊抗兔荧光二抗 1 : 400, ALexa fluor 546 驴抗鼠荧光二抗 1 : 400) 室温避光孵育 4 h, 抗猝灭封片剂封片, 最后用共聚焦观察并拍照。

1.2.10 RNA 提取、cDNA 合成及 Q-PCR 按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取 VTA 总 RNA, 然后利用 RNA 反转录试剂盒将 RNA 反转录合成 cDNA, 最后用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行 Q-PCR 检测相关基因表达水平。反应体系及计算基因相对表达量方法参考文献^[11]。

1.3 统计学处理 行为实验数据采用 Graphpad

Prism 8.0 统计软件分析并作图。利用 Shapiro-Wilk 检验验证各组数据的正态分布情况。各组数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 unpaired-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CUS 后小鼠表现出抑郁样行为 小鼠进行 21 d 的 CUS 后,通过糖水偏好实验,强迫游泳实验检测 CUS 后小鼠的表型,测试示意图见图 1A。结果显示 CUS 组糖水偏好降低,差异有统计学意义 ($t = 2.336, P < 0.05$),见图 1B。强迫游泳结果显示 CUS 组小鼠不动时间长于 Control 组,差异有统计学意义 ($t = 4.273, P < 0.05$),见图 1C。小鼠自主活动结果显示 CUS 组小鼠与 Control 组小鼠比较,差异无统计学意义,见图 1D、E。Shapiro-Wilk 检验各组数据均符合正态分布。

2.2 CUS 损害小鼠的性行为 上述结果已经证实 CUS 后小鼠表现出抑郁样行为,接下来进一步通过小鼠嗅觉偏好测试实验和雌鼠尿液嗅实验检测抑郁小鼠的性行为表现,小鼠嗅觉偏好测试示意图见图 2A。结果显示,Control 组小鼠在雌鼠垫料一侧的时间和在雄鼠垫料一侧的时间差异有统计学意义 ($t = 1.801, P < 0.05$);而 CUS 组小鼠在雌鼠垫料一侧的时间和在雄鼠垫料一侧的时间无统计学差异 ($t = 0.618, P > 0.05$),见图 2B、C。Control 组小鼠与雌鼠垫料交互的时间和与雄鼠垫料交互的时间差异有统计学意义 ($t = 2.996, P < 0.05$);而 CUS 组小鼠与雌鼠垫料交互的时间和与雄鼠垫料交互的时间差异

无统计学意义 ($t = 0.643, P > 0.05$),见图 2D。雌鼠尿液嗅实验结果显示 Control 组小鼠和 CUS 组小鼠闻嗅沾有水的棉签的时间无差异,CUS 组小鼠对雌鼠尿液闻嗅的时间减少,差异有统计学意义 ($t = 2.579, P < 0.05$),见图 2E;每只小鼠闻嗅沾有水的棉签的时间和沾有雌鼠尿液的时间,Control 组中 2 只小鼠不动,CUS 组 1 只小鼠不动,需要排除,见图 2F。

2.3 CUS 后小鼠 VTA 脑区 BDNF 的表达下降

对 C57 小鼠进行免疫组化测定 VTA 脑区 BDNF 与神经元的共标情况。BDNF 为绿色荧光,TH 为红色荧光,BDNF 和 TH 两种蛋白重合之后呈现黄色,见图 3,结果表明 VTA 脑区 BDNF 基本存在于 TH 神经元中。

行为测定结束后,取小鼠 VTA 脑区组织测定 BDNF 蛋白和 mRNA 的表达,结果显示,与 Control 组比较,CUS 组 BDNF 蛋白表达量降低,见图 4A,数据统计分析结果差异有统计学意义 ($t = 9.387, P < 0.05$),见图 4B。BDNF 总 mRNA 及 Exons mRNA 表达量结果显示,与 Control 组比较,CUS 小鼠 VTA 脑区 BDNF 总 mRNA 表达量下降 ($t = 4.652, P < 0.05$),见图 4C;CUS 组 BDNF Exon I mRNA 表达量下降 ($t = 4.557, P < 0.05$),见图 4D;Exon II mRNA 表达量下降 ($t = 3.092, P < 0.05$),见图 4E;Exon IV mRNA 表达量无变化 ($t = 0.919, P > 0.05$),见图 4F;Exon VI mRNA 表达量无变化 ($t = 0.114, P > 0.05$),见图 4G。Shapiro-Wilk 检验各组数据均符合正态分布。

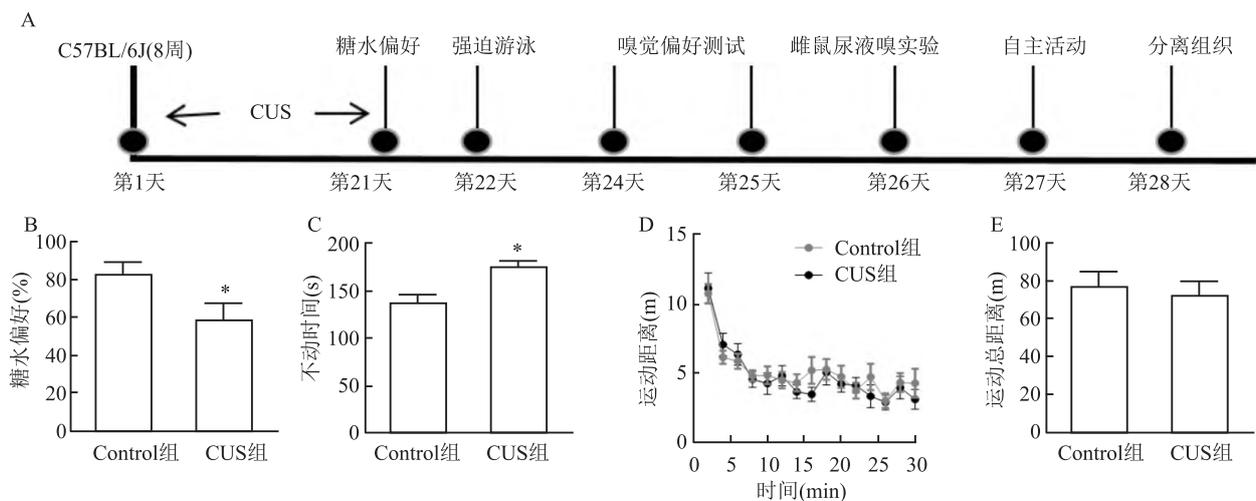


图1 小鼠抑郁样行为测试

A: 实验过程流程图; B: 糖水偏好实验; C: 强迫游泳实验; D、E: 自主活动实验; 与 Control 组比较; * $P < 0.05$

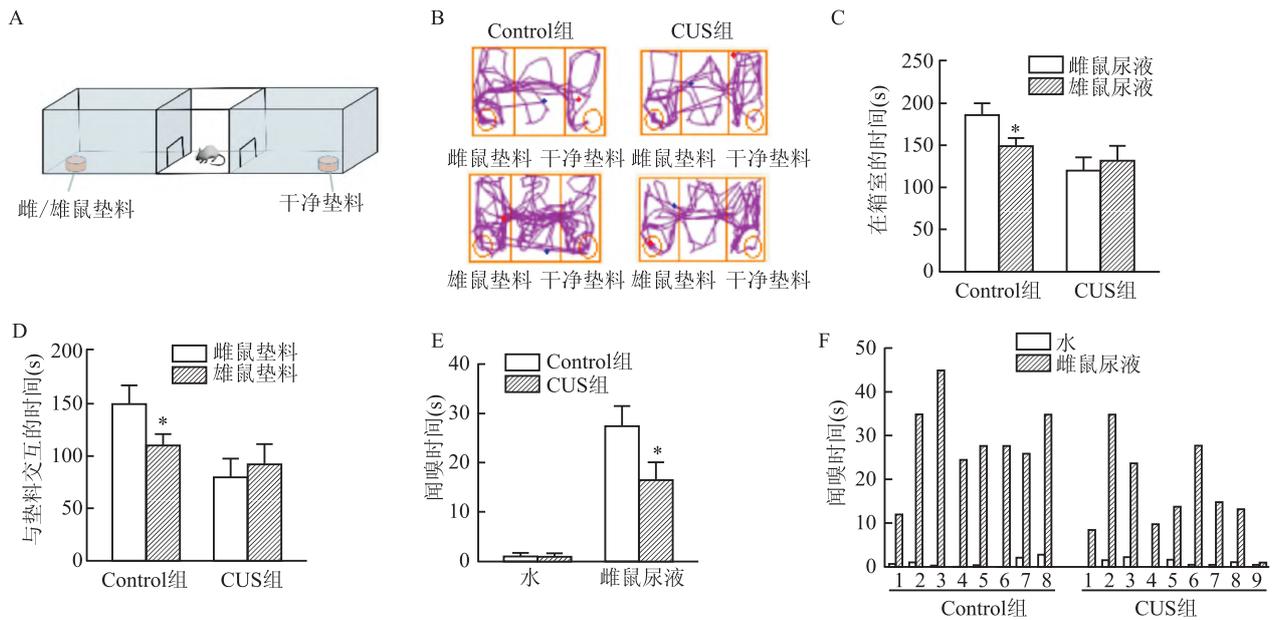


图2 CUS后小鼠性行为测试

A:嗅觉偏好测试装置及测试示意图;B:嗅觉偏好测试小鼠运动轨迹;C:小鼠嗅觉偏好测试实验在每侧垫料箱室的时间;D:小鼠嗅觉偏好测试实验与垫料交互的时间;E:雌鼠尿液嗅实验统计时间;F:雌鼠尿液嗅实验每只小鼠的闻嗅时间;与Control组比较: * P < 0.05

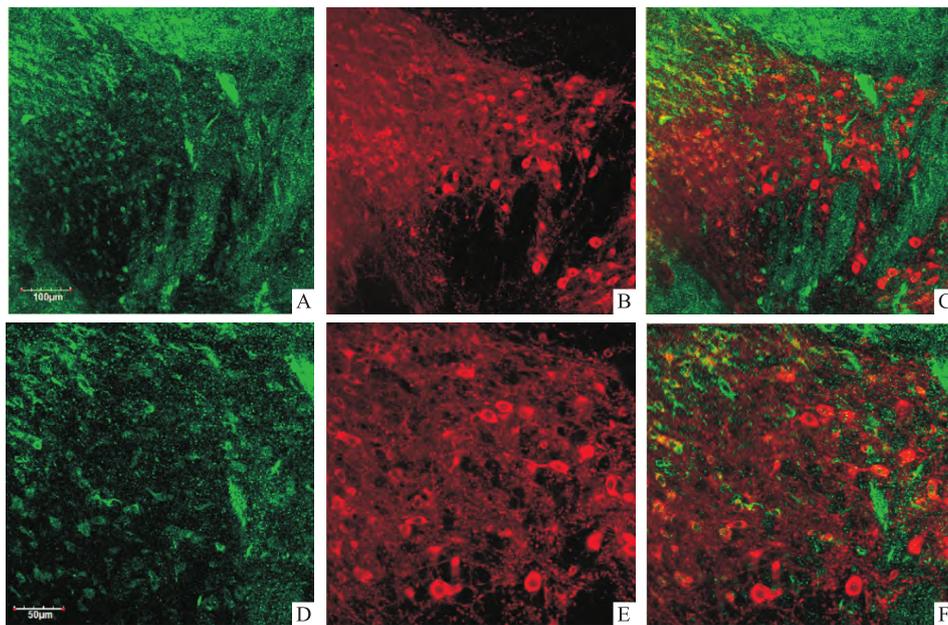


图3 VTA脑区BDNF和TH免疫荧光双标结果

A:BDNF的表达 ×20;B:TH的表达 ×20;C:BDNF和TH重合的结果 ×20;D:BDNF的表达 ×40;E:TH的表达 ×40;F:BDNF和TH重合的结果 ×40

3 讨论

性行为在哺乳动物和其他物种的繁殖中发挥重要的作用。性交过程分为两个阶段,欲望阶段和完成阶段。欲望阶段对于动物选择一个合适的配偶至

关重要。性交行为的两个阶段都需要动物的感官参与。啮齿类动物利用他们的嗅觉来控制性交行为^[1]。本研究中通过对雄性小鼠性行为相关的嗅觉行为的测试,检测CUS致小鼠抑郁对小鼠性行为的影响。雌鼠尿液嗅实验和小鼠嗅觉偏好测试实验

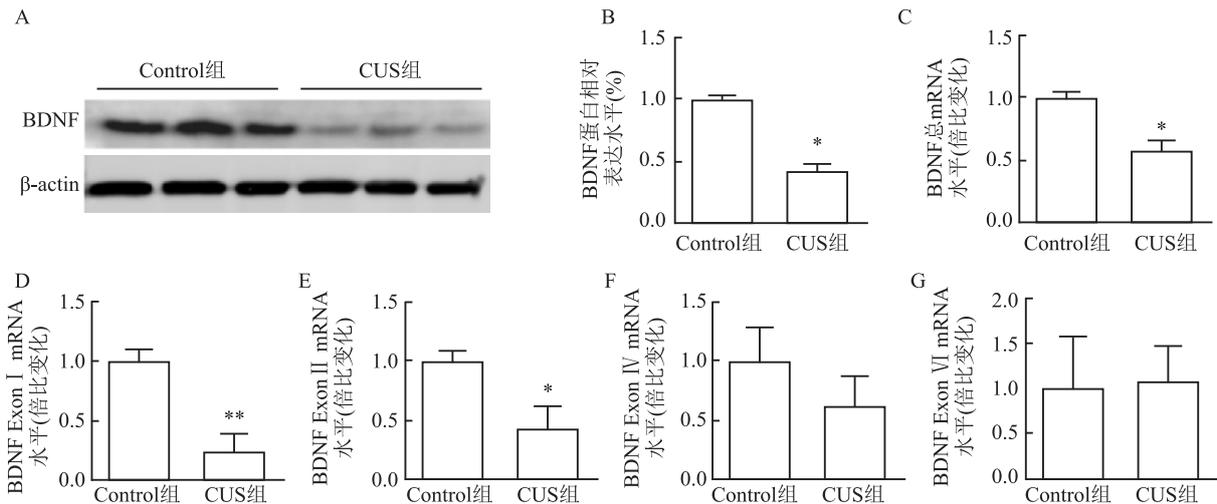


图4 CUS组和Control组VTA脑区BDNF蛋白表达和mRNA表达水平

A: BDNF蛋白水平Western blot图; B: BDNF蛋白水平Western blot统计图; C: BDNF总mRNA表达; D: Exon I mRNA表达; E: Exon II mRNA表达; F: Exon IV mRNA表达; G: Exon VI mRNA表达; 与Control组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

是性爱过程第一阶段欲望阶段的检测,发现CUS致小鼠抑郁后,小鼠的性行为受损。性行为相关的神经肽和神经递质在多个脑区调控性行为,如VTA、伏隔核(NAc)、前额叶皮层(mPFC)等。VTA脑区是调控性奖赏行为的主要脑区。多巴胺是一种受压力应激很大的神经递质,它与感觉运动功能、激励动机、奖赏进程、强化学习等相关^[13]。多巴胺神经元在奖赏的识别和与奖赏相关的动机行为中发挥着关键的作用。VTA-多巴胺环路系统处理情感、动机以及与社会奖赏相关的更多的认知方面的需求。研究^[4]发现在性行为活动的奖赏属性中多巴胺能神经元被激活。慢性应激降低VTA-多巴胺环路的活性,从而导致神经元的退化或局部小胶质细胞的激活^[8]。

BDNF是大脑中含量最丰富、分布最广的一种神经营养因子,不仅在早期发育中,而且在成年大脑中都被认为是神经元突触可塑性、存活和分化的主要调节因子^[5]。研究^[6]报道BDNF在前额叶皮层、海马、VTA及NAc的抑郁症的发生发展和抗抑郁治疗中起重要作用。早期的社会行为能够调控BDNF水平和BDNF甲基化^[14]。文献^[7-8]报道BDNF调控社交行为。在雌鼠特异的社交行为中,BDNF在OXY神经元中调控基因转录和重塑^[15]。性行为影响VTA脑区BDNF的表达^[10]。BDNF能够调控动机行为并影响性行为^[7-9],应激会影响VTA-多巴胺的重塑和连接性^[4]。CUS行为是一种具有预测效果、表面效度、结构效度的抑郁动物模型。本研究证实CUS所致抑郁小鼠性行为受损,VTA脑区BDNF

与标记多巴胺神经元的TH共存,且VTA脑区BDNF蛋白表达和mRNA表达减少,说明VTA脑区BDNF的表达参与了性行为的调节。在后续的研究中会利用BDNF转基因小鼠及DAT-cre转基因小鼠进一步研究VTA脑区多巴胺神经元中BDNF敲除对小鼠性行为的影响。

综上所述,本研究证实CUS所致的抑郁小鼠性行为受损,并且CUS能降低VTA脑区BDNF的表达。提示VTA脑区BDNF参与性行为的调控,但其发挥作用的机制还需进一步的研究。

参考文献

- [1] Hellier V, Brock O, Bakker J. The role of kisspeptin in sexual behavior[J]. Semin Reprod Med, 2019, 37(2): 84-92.
- [2] Carvalho R K, Souza M R, Santos M L, et al. Chronic cannabidiol exposure promotes functional impairment in sexual behavior and fertility of male mice[J]. Reprod Toxicol, 2018, 81: 34-40.
- [3] Dhungel S, Rai D, Terada M, et al. Oxytocin is indispensable for conspecific-odor preference and controls the initiation of female, but not male, sexual behavior in mice[J]. Neurosci Res, 2019, 148: 34-41.
- [4] Douma E H, De Kloet E R. Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2020, 108: 48-77.
- [5] 刘晶,吴敏,孟凡涛,等. 雌激素对雌鼠抑郁样行为和海马BDNF表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(9): 1400-4.
- [6] Guo M, Li C, Lei Y, et al. Role of the adipose PPAR γ -adiponectin axis in susceptibility to stress and depression/anxiety-related behaviors[J]. Mol Psychiatry, 2017, 22(7): 1056-68.
- [7] Sagarkar S, Choudhary A G, Balasubramanian N, et al. LSD1-

- BDNF activity in lateral hypothalamus-medial forebrain bundle area is essential for reward seeking behavior [J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 202: 102048.
- [8] Sanna F, Bratzu J, Serra M P, et al. Altered sexual behavior in dopamine transporter (DAT) knockout male rats: a behavioral, neurochemical and intracerebral microdialysis study[J]. *Front Behav Neurosci*, 2020, 14:58.
- [9] Tikhonova M, Kulikov A V. Antidepressant-like effects of central BDNF administration in mice of antidepressant sensitive catalepsy (ASC) strain[J]. *Chin J Physiol*, 2012, 55(4): 284-93.
- [10] Sanna F, Poddighe L, Serra M P, et al. c-Fos, FosB, BDNF, trkB and Arc expression in the limbic system of male roman high- and low-avoidance rats that show differences in sexual behavior; effect of sexual activity[J]. *Neuroscience*, 2019, 396: 1-23.
- [11] 孟凡涛, 刘晶, 王文涛, 等. 慢性不可预知应激所致抑郁小鼠中缝背核脑区 BDNF 表达的变化[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(12):1918-22.
- [12] Beny Y, Kimchi T. Conditioned odor aversion induces social anxiety towards females in wild-type and TrpC2 knockout male mice [J]. *Genes Brain Behav*, 2016, 15(8): 722-32.
- [13] Cabib S, Puglisi-Allegra S. The mesoaccumbens dopamine in coping with stress[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36(1): 79-89.
- [14] Unternaehrer E, Meyer A H, Burkhardt S C, et al. Childhood maternal care is associated with DNA methylation of the genes for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and oxytocin receptor (OXTR) in peripheral blood cells in adult men and women[J]. *Stress*, 2015, 18(4): 451-61.
- [15] Maynard K R, Hobbs J W, Phan B N, et al. BDNF-TrkB signaling in oxytocin neurons contributes to maternal behavior[J]. *Elife*, 2018, 7:e33676.

Impaired sexual behavior and decreased expression of BDNF in VTA of depressed mice induced by chronic unpredictable stress

Wang Dan, Qiu Changyun, Meng Fantao, Zhao Di, Liu Cuilan, Liu Jing, Li Chen, Wang Wentao

(*Institute for Metabolic and Neuropsychiatric Distors, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603*)

Abstract Objective To study the effect of chronic unpredictable stress (CUS) on the sexual behavior of mice and its possible molecular mechanism. **Methods** 20 male C57BL/6J mice were divided into two groups randomly: control group ($n = 10$) and CUS group ($n = 10$), and the weight of the mice between the two groups was balanced. The control group was 3-5 mice per cage and normal feeding. CUS group was subjected to 21 days CUS combined with single cage fed to establish a depression model. After 21 days, the depressive-like behaviors of the two groups were tested by sucrose preference test and forced swimming test. Then the sexual behavior was detected by olfactory preference test and female urine sniffing test, and the protein and mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in ventral tegmental area (VTA) were detected. **Results** CUS could significantly decrease sucrose preference ($P < 0.05$) and increase the immobility time in the forced swim test ($P < 0.05$) compared to control mice, indicating depression-like behavior in mice, and impaired sexual behavior in the olfactory preference test ($P < 0.05$) and female urine sniffing test ($P < 0.05$) in mice, and decreased the expression of BDNF in VTA brain regions. The difference was statistically significant. **Conclusion** The impaired sexual behavior of mice induced by CUS may be related to the decreased expression of BDNF in VTA brain regions. The BDNF signaling pathway may be involved in the regulation of impaired sexual behavior of mice induced by CUS.

Key words chronic unpredictable stress; depression; sexual behavior; ventral tegmental area; brain-derived neurotrophic factor