

● 基础与实验研究 ●

doi: 10.16252/j.cnki.issn1004-0501-2019.08.005

论著

艾氯胺酮对抑郁大鼠的作用效果及对 cAMP-PKA-CREB 信号通路的影响

陈 宁, 黄 燕[△]

(四川省医学科学院·四川省人民医院, 四川 成都 610072)

【摘要】 目的 探讨艾氯胺酮对抑郁大鼠的效用及其作用机制。方法 将 30 只健康 SD 大鼠随机分为 3 组,空白组不做处理,其余两组均采用孤独结合慢性应激的方法诱导造抑郁大鼠模型,造模成功后的第 2 天起,治疗组静脉注射 0.2mg/kg 艾氯胺酮、空白组和模型组注射同等剂量的生理盐水,连续 21d,采用旷场试验、糖水实验、体质量来评价模型大鼠实验前后行为学改变情况,处死大鼠,采集血样及组织,采用 HE 染色考察前额叶皮质组织病理学变化;ELISA 检测血清 IL-1、IL-6、TNF- α 及皮质醇(CORT)水平;WB 及 RT-PCR 检测前额叶皮质 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 的蛋白及 mRNA 表达。结果 艾氯胺酮组较模型组大鼠行为学明显改善,差异有统计学意义($P<0.05$);艾氯胺酮组可减轻抑郁大鼠前额叶皮质组织病理损伤;通过艾氯胺酮干预,血清 TNF- α 、IL-1、IL-6、CORT 含量较模型组均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),cAMP、PKA、CREB、p-CREB 蛋白及 mRNA 表达升高。结论 艾氯胺酮对抑郁大鼠的作用效果明显,影响 cAMP-PKA-CREB 信号通路,明显改善炎症指标,发挥对抑郁大鼠的治疗作用。

【关键词】 大鼠; 抑郁症; 艾氯胺酮; 信号通路

【中图分类号】 R-332

【文献标志码】 A

【文章编号】 1004-0501(2019)08-0785-05

Effect of Esketamine on Depressed Rats and Its Effect on cAMP-PKA-CREB Signaling Pathway. Chen Ning, Huang Yan[△]. Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu, Sichuan 610072, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of esketamine drug therapy on depressed rats. **Methods** Thirty healthy SD rats were randomly divided into 3 groups, the blank group was not treated, the other two groups were induced to form a depression model by using solitary stress combined with chronic stress. On the 2nd day after successful modeling, the treatment group received intravenous injection of 0.2 mg/kg esketamine, the blank group and the model group were injected with the same dose of normal saline for 21 days. The open field test, syrup experiment and body mass were used to evaluate the behavioral changes of the model rats before and after the experiment, the rats were sacrificed and blood samples and tissues were collected. HE staining was used to investigate the pathological changes of the prefrontal cortex, serum IL1, IL6, TNF- α and cortisol (CORT) levels were measured by ELISA; the protein and mRNA expressions of cAMP, PKA, CREB and p-CREB in the prefrontal cortex were detected by WB and RT-PCR. **Results** The behavior of esketamine group was significantly improved compared with the model group ($P<0.05$); the esketamine group can alleviate the pathological damage of the prefrontal cortex in depressed rats; the levels of serum TNF- α , IL-1, IL-6 and CORT were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$) and the expressions of cAMP, PKA, CREB, p-CREB protein and mRNA were increased by esketamine intervention. **Conclusion** Esketamine can affect the cAMP-PKA-CREB signaling pathway and significantly improve the inflammatory index, it has obvious nursing effect on depressed rats and exerts its therapeutic effect on depressed rats.

【Key words】 rat; depression; esketamine; signaling pathway

抑郁症是一种心理精神障碍性疾病,其发病机制尚不明确,目前研究认为社会、环境、心理等诸多因素参与抑郁症的发生发展过程^[1]。报道指出抑郁症具有

极高自杀率、发病率及复发率等特点,目前抑郁症发病人数已占全球总人数的 4.3%,且呈持续上升趋势,据世界卫生组织(WHO)报告,在 2020 年抑郁症可能成

[△] 通信作者

为严重危害人类身心健康的第二大疾病,严重影响人们的日常生活、学习、工作及身心健康^[2-3]。目前临床上常以药物控制为主,艾氯胺酮(Esketamine)以其显著的疗效逐渐将成为抑郁症患者的首选药物之一,其在Ⅲ期临床中展现出针对难治性抑郁的显著疗效^[4]。本研究选择孤养结合慢性刺激抑郁动物模型,观察在艾氯胺酮对抑郁大鼠的作用效果及对 cAMP-PKA-CREB 信号通路的影响,以期探明艾氯胺酮治疗抑郁大鼠的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物及分组:健康 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,体质量(180±10)g,购于成都达硕实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(川)2015-030,使用许可证号:SYXK(川)2014-489,试验动物随机分为空白组、模型组、艾氯胺酮组共 3 组,每组 10 只,清洁级实验室饲养。

1.2 大鼠抑郁模型构建:大鼠抑郁症模型采用孤养结合慢性应激的方法构建。大鼠适应性饲养 1 周后共接受 21 天各种不可预见的慢性应激刺激,包括:断水、断食、夜间光照 12h、潮湿垫料、束缚、震荡、夹尾、电击足底、冰水(4℃,5 min)游泳、合笼、热应激、昼夜颠倒、制动等刺激,实验过程中同种刺激不能连续出现,使动物不能预料刺激的发生,每种刺激平均 3 次。

1.3 试验方法:大鼠造模成功后第 2 天开始给药治疗。艾氯胺酮组静脉注射 0.2mg/kg 艾氯胺酮(杨森公司)治疗,空白组和模型组注射同等剂量的生理盐水,连续给药 21d。

1.4 样本采集:血样采集:剪开大鼠腹腔,腹主动脉取血 4mL,3000r/min 低温离心 15min,分离血清,-80℃冰箱保存。前额叶皮质组织采集:大鼠断头取脑,冰上分离前额叶皮质,用预冷的生理盐水迅速冲净,分成两份,一份于 4%多聚甲醛固定,另一份于-80℃低温保存。

1.5 检测项目

1.5.1 行为学观察:①旷场试验:于造模前 1 天和试验结束后各进行 1 次记录。记录在室内安静状态下进行,将大鼠放置于敞箱(规格:80cm×80cm×40cm)底面的中心方格内,然后开始记录在 3 min 内大鼠的活动。

水平穿越格数为大鼠穿越底面块数;竖立次数为两前肢离开地面直立次数。②糖水实验:于造模前 1 天和试验结束后各进行 1 次记录。在实验前 48h,先进行 5%蔗糖水的适应性训练,后断水 12h,不断食,测下午(14:00-15:00)1h 内的糖水消耗量。③体质量:于造模前 1 天和试验结束后各进行 1 次体质量测量。

1.5.2 病理组织学检测:将固定的前额叶皮质组织按常规方法制备石蜡切片,HE 染色,镜检观察。

1.5.3 ELISA 检测血清炎症因子:按照试剂盒说明操作,采用 ELISA 试剂盒(上海茁彩)检测血清 IL-1、IL-6、TNF- α 及皮质醇(CORT)水平。

1.5.4 Western blot 检测前额叶皮质 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 水平:采用 RIPA 裂解液低温提取总蛋白,BCA 法测定总蛋白量。经制胶、电泳、转膜、封闭后,一抗孵育过夜,二抗孵育。取出聚偏氟乙烯膜,化学发光法获得胶片后进行图像采集,目标条带 A 值采用 Quantity One 凝胶图像软件分析,以目标条带与 β -actin 条带 A 值的比值作为活性 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 相对表达量。

1.5.5 RT-PCR 检测前额叶皮质 cAMP、PKA、CREB、p-CREB mRNA 表达水平:采用 RNA 提取试剂盒(In-vitrogen)提取结肠黏膜总 RNA,测定 A260 和 A280 吸光度值,电泳确定 RNA 的完整性后,依据 mRNA 反转录试剂盒说明,合成 cDNA,RT-PCR 检测 mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学方法:采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差统计分析,试验数据均以($\bar{x}\pm s$)表示,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 行为学观察:实验前空白组、模型组、艾氯胺酮组大鼠竖立次数、糖水消耗量、体质量及水平穿越格数差异无统计学意义($P>0.05$)。实验后模型组大鼠竖立次数、糖水消耗量、体质量及水平穿越格数较空白组均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),通过艾氯胺酮干预,大鼠竖立次数、糖水消耗量、体质量及水平穿越格数较模型组均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 大鼠行为学比较($\bar{x}\pm s$)

组别(n=10)	竖立次数(次)		糖水消耗量(ml)		体质量(g)		水平穿越格数(格)	
	实验前	实验后	实验前	实验后	实验前	实验后	实验前	实验后
空白组	7.67±2.08	11.67±1.53	21.33±2.08	21.67±2.52	265.00±3.00	386.00±4.58	37.67±5.51	42.33±3.51
模型组	7.33±1.53	3.67±0.58	19.67±1.53	10.00±1.00	262.00±4.58	337.33±7.23	37.67±11.59	18.00±3.00
艾氯胺酮组	7.67±1.53	6.33±0.58	20.67±2.08	15.00±1.00	260.00±2.00	365.33±3.79	40.67±6.03	31.00±4.58
F	0.037	49.778	0.758	45.842	0.353	61.247	0.134	31.520
P	0.964	<0.001	0.509	<0.001	0.716	<0.001	0.877	0.001

2.2 组织病理学观察: 空白组: 前额叶皮质组织完整, 结构清晰, 组织形态未见异常。模型组: 前额叶皮质组织周围间隙增宽成脑水肿、神经轻度增殖、部分神经细

胞有嗜神经现象、血管扩张充血、脑神经细胞水肿。艾氯胺酮组: 神经细胞增殖、水肿程度减轻, 组织形态异常明显改变, 见图 1。

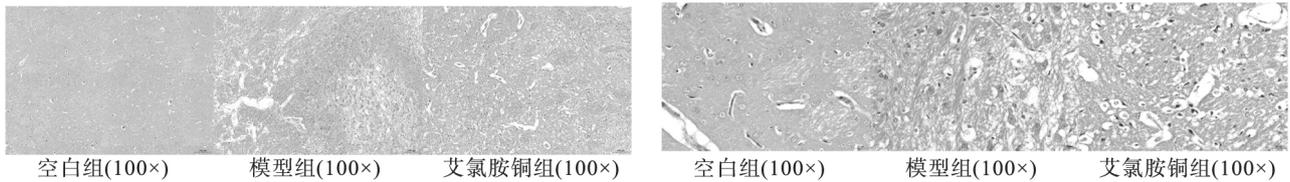


图 1 大鼠前额叶皮质病理组织学变化

2.3 血清中 TNF- α 、IL-1、IL-6、CORT 的表达: 造模成功后, 模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-1、IL-6、CORT 含量较空白组均明显增加($P<0.05$)。通过艾氯胺酮干预,

TNF- α 、IL-1、IL-6、CORT 含量较模型组均明显降低($P<0.05$), 见表 2。

表 2 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1、IL-6、CORT 含量($\bar{x}\pm s$)

组别(n=10)	TNF- α (pg/mL)	IL-1(ng/mL)	IL-6(pg/mL)	CORT(ng/mL)
空白组	186.94±4.07	51.85±0.33	40.75±2.31	44.32±1.53
模型组	194.39±1.99	54.66±1.20	47.78±2.29	50.08±1.85
艾氯胺酮组	188.03±2.69	52.82±0.95	43.34±1.07	43.65±1.43
F	5.253	7.517	9.723	14.509
P	0.048	0.023	0.013	0.005

2.4 前额叶皮质 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 蛋白水平: 造模成功后, 模型组较空白组前额叶皮质 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 蛋白表达均明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。经艾氯胺酮干预, 与模型组相比 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 蛋白表达增加, 仅 PKA 明显增加, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 2。

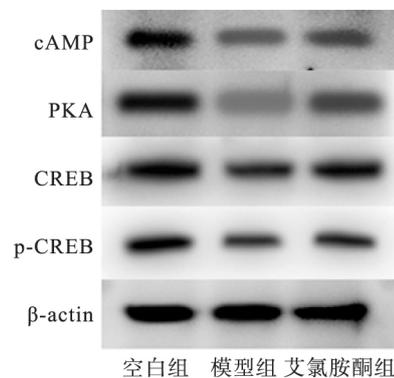
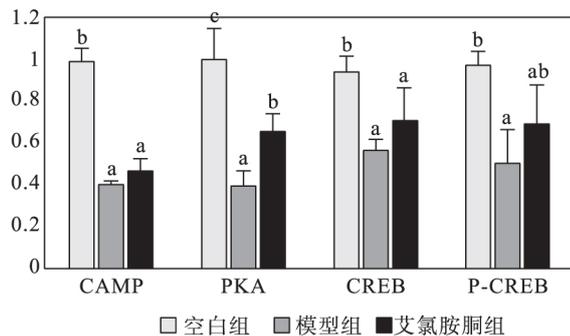


图 2 大鼠前额叶皮质 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 表达

注: a、b、c 表示不同处理组同一指标 $P<0.05$

2.5 前额叶皮质 cAMP、PKA、CREB、p-CREB mRNA 表达: 造模成功后, 模型组较空白组的前额叶皮质 cAMP、PKA、CREB、p-CREB mRNA 表达均明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。经艾氯胺酮干预, 与模

型组相比 cAMP、PKA、CREB、p-CREB mRNA 表达均明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$) ,见表 3。

表 3 大鼠前额叶皮质 cAMP、PKA、CREB、p-CREB mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别(n=10)	cAMP	PKA	CREB	p-CREB
空白组	1.10±0.16	1.00±0.05	1.02±0.22	1.01±0.18
模型组	0.46±0.03	0.52±0.09	0.58±0.07	0.62±0.07
艾氯胺酮组	0.70±0.05	0.81±0.06	0.91±0.11	0.91±0.10
F	23.013	37.672	7.166	7.662
P	0.002	<0.001	0.026	0.022

3 讨论

全球疾病负担研究结果显示抑郁症是导致死亡的第五大原因,其造成的伤残占精神疾病的 40.5% ,是导致非致命性疾病的首要原因^[5]。临床上以持续性对各种事物兴趣丧失、心境低落、反应速度迟缓、伴有较大的负罪感、自我价值感低、食欲不振、注意力不集中、睡眠紊乱、疲倦等为主要特点,常表现为没有明显的身体病因^[6]。目前,治疗抑郁症的主要方法是药物及心理干预。本试验以抑郁症大鼠为模型,采用艾氯胺酮治疗,首先从组织病理角度考察结果表明,空白组前额叶皮质组织完整,结构清晰,组织形态未见异常。模型组前额叶皮质组织充血、脑神经细胞水肿、周围间隙增宽成脑水肿。艾氯胺酮组神经细胞增殖程度减轻,神经细胞水肿程度较轻,说明艾氯胺酮可明显减轻抑郁大鼠前额叶皮质组织病理损伤,效果明显。

旷场实验主要反映动物对新异环境的行为及情绪,其中垂直竖立次数主要反映动物对新异环境不稳定性的探究情绪,水平穿越格数主要体现动物是否对新异环境具有兴奋性、自主性^[7]。本实验结果显示,模型组大鼠水平穿越格数及竖立次数较空白组明显降低,经艾氯胺酮干预,大鼠水平穿越格数及竖立次数呈明显上升。糖水实验主要反映动物快感的缺失程度,而快感缺乏是抑郁症的核心症状,以糖水摄入量来体现^[8]。本实验结果表明,模型组大鼠糖水摄入量较空白组明显降低,艾氯胺酮组大鼠糖水摄入量较模型组明显升高。体质量反映的是动物整体情况,研究显示抑郁症患者往往具有临床体质量减轻的现象,体质量也成为评价抑郁症的典型指标之一^[9]。本实验结果显

示模型组大鼠体质量较空白组明显降低,经艾氯胺酮干预后大鼠体质量较模型组明显上升。提示经艾氯胺酮干预,大鼠对事物的兴趣、摄食量增加,从而影响大鼠体质量的增长,干预治疗有效。

研究显示 cAMP-PKA-CREB 信号通路与免疫反应、神经递质的传递、激素调节、细胞增殖及分化均密切相关^[10]。cAMP 可通过激活 PKA 系统从而实现细胞的调节作用,而 cAMP 的反应元件 CREB 可与 CRE 结合,在一定程度上增加其下游基因的转录活性,当 cAMP 激活之后可进一步促使 cAMP-PKA-CREB 信号通路下游蛋白分子长期表达,主要通过 CREB 的调节机制而发挥作用^[11]。本实验结果显示,模型组大鼠前额叶皮质 cAMP、CREB、P-CREB 蛋白及 mRNA 表达均明显降低,经艾氯胺酮干预,cAMP、CREB、P-CREB mRNA 表达较模型组均明显增加。PKA 是广泛分布于神经系统中的分子,PKA 活化之后将进一步激活下游通路相关因子的转录反应^[12]。研究表明,cAMP、PKA 活性在自杀死亡的抑郁症患者前额叶皮层中及大鼠海马、额叶皮层中均呈现降低趋势^[13-15]。本实验结果显示,模型组大鼠前额叶皮质 PKA 蛋白及 mRNA 表达均明显降低,经艾氯胺酮干预,PKA 蛋白及 mRNA 表达较模型组均明显增加。提示孤养结合慢性应激刺激对 cAMP-PKA-CREB 信号通路因子水平有明显影响,艾氯胺酮可促进 cAMP-PKA-CREB 信号通路的激活。

细胞因子在正常生理状态下处于合成和分泌自我调控的一种平衡状态^[16]。研究表明抑郁症与细胞因子异常密切相关,认为抑郁症的发病机制中免疫系统的过度激活发挥尤为重要的作用^[17]。IL-1、IL-6 可以介导炎症反应,由淋巴细胞及非淋巴细胞释放,而由单核巨噬细胞、淋巴细胞、神经细胞等释放的 TNF- α 在细胞的生长死亡、免疫和应激反应等方面都具有重要的作用^[18-19]。研究发现抑郁症患者外周和中枢的炎性细胞因子增多会导致抑郁症患者的免疫病理损害加强,血清中 IL-1、IL-6 和 TNF- α 的水平与抑郁症患者汉密尔顿抑郁量表总分、焦虑躯体化及绝望因子均有显著正相关^[20]。本实验结果显示,模型组较空白组可明显增加大鼠血清内 IL-1、IL-6、TNF- α 含量,艾氯胺酮干预能明显降低模型大鼠血清中 IL-1、IL-6、TNF- α 含量,表

明大鼠在接受慢性应激刺激时诱导了免疫应答,进而促使 IL-1、IL-6、TNF- α 分泌增加,提示抑郁状态下炎症因子与免疫系统的过度激活相关。CORT 可反映抑郁症患者的应激情况,其持续分泌增多可导致海马神经元萎缩、凋亡等一系列可塑性损伤^[21]。本实验结果显示,模型组较空白组可明显增加大鼠血清内 CORT 含量,艾氯胺酮干预能明显降低模型大鼠血清中 CORT 含量,提示艾氯胺酮干预可缓解抑郁症患者的应激。

综上,艾氯胺酮可影响 cAMP-PKA-CREB 信号通路,并可抑制炎症因子干预免疫系统,发挥抗抑郁作用。

参考文献:

- [1] 郑清炼, 楚世峰, 任倩, 等. 趋化因子与抑郁症关系的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2019(05): 615-619.
- [2] 刘旺林, 鄢骏, 黄常荣. 抑郁症患者采取低频重复经颅磁刺激联合帕罗西汀治疗的疗效观察 [J]. 当代医学, 2019(09): 126-127.
- [3] Wang PS, Simon G, Kessler RC. The economic burden of depression and the cost-effectiveness of treatment [J]. International journal of methods in psychiatric research, 2003, 12(1): 22-33.
- [4] 王欢, 王彦明, 李微, 等. 治疗抑郁症的新药——esketamine [J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(7): 34-36+57.
- [5] Köhler CA, Freitas TH, Maes M, et al. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies [J]. Acta Psychiatrica Scandinavica, 2017, 135(5): 373-387.
- [6] Zhang JC, Yao W, Dong C, et al. Prophylactic effects of sulforaphane on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2017, 39: 134-144.
- [7] 吴晓玲, 张贵锋, 柴胡疏肝散对抑郁症大鼠行为学及旷场实验的影响 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(2): 90-92.
- [8] 侯金良, 魏盛, 杜希扬, 等. 抑郁情绪大鼠模型中糖水偏好实验数据的聚合分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(3): 182-185.
- [9] 齐文耀, 汤义平, 陈倩倩, 等. 舒肝解郁胶囊对抑郁症患者糖脂代谢与睡眠及体质量的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2017, 37(2): 84-86.
- [10] Cheng Y, Gao XH, Li XJ, et al. Depression promotes prostate cancer invasion and metastasis via a sympathetic-cAMP-FAK signaling pathway [J]. Oncogene, 2018, 37(22): 2953-2966.
- [11] 孙健, 刘健华, 王谦, 等. 电针对抑郁症大鼠海马组织 AC-cAMP-PKA 信号通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(24): 3672-3674.
- [12] Wang C, Guo J, Guo R. Effect of XingPiJieYu decoction on spatial learning and memory and cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in rat model of depression through chronic unpredictable stress [J]. BMC Complementary & Alternative Medicine, 2017, 17(1): 73.
- [13] Liao L, Zhang XD, Li J, et al. Pioglitazone attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors, modulates NF- κ B/IL-6/STAT3, CREB/BDNF pathways and central serotonergic neurotransmission in mice [J]. International Immunopharmacology, 2017, 49: 178-186.
- [14] Ye YL, Zhong K, Liu DD, et al. Huanglian-Jie-Du-Tang Extract Ameliorates Depression-Like Behaviors through BDNF-TrkB-CREB Pathway in Rats with Chronic Unpredictable Stress [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 2017(4): 1-13.
- [15] Chellian R, Pandey V, Mohamed Z. Alpha-asarone attenuates depression-like behavior in nicotine-withdrawn mice: Evidence for the modulation of hippocampal pCREB levels during nicotine-withdrawal [J]. European Journal of Pharmacology, 2017: 10-16.
- [16] 许二平, 苗明三, 尚立芝. 基于抑郁症细胞因子、神经-内分泌发病机制的中医药治疗新进展 [J]. 河南中医, 2017, 37(2): 233-237.
- [17] 金齐颖, 吴红芳, 马源源, 等. 抑郁症中细胞因子作用机制及其治疗进展 [J]. 现代医药卫生, 2018(1): 44-46.
- [18] Ng A, Tam WW, Zhang MW, et al. IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 12050.
- [19] Bahramabadi R, Fathollahi MS, Hashemi SM, et al. Serum Levels of IL-6, IL-8, TNF- α , and TGF- β in Chronic HBV-Infected Patients: Effect of Depression and Anxiety [J]. Laboratory Medicine, 2017, 49(1): 41-46.
- [20] 王贵锋, 庞妩燕, 王丽, 等. 氟西汀对糖尿病合并抑郁症患者血浆 TNF- α 、IL-6 及 BDNF 水平的影响 [J]. 国际精神病学杂志, 2017(5): 826-828.
- [21] 喻云平, 余红岚, 费樱, 等. 抑郁症患者外周血 BDNF、IDO、CORT 水平及 Treg 细胞的研究 [J]. 贵阳医学院学报, 2015(8): 852-855.

(收稿时间: 2019-04-28)