

## SB-399885 阻断 5-羟色胺 6 受体 / 雷帕霉素靶蛋白途径对精神分裂症大鼠认知和记忆障碍的改善作用

易善志 刘汉东

441000 襄阳市安定医院质控办(易善志); 441000 襄阳市中心医院神经外科(刘汉东)

通信作者: 刘汉东, Email: liuhden@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2020.04.005

**【摘要】** 目的 研究 5-羟色胺 6 受体(HTR6)拮抗剂 SB-399885 通过阻断 HTR6 / 雷帕霉素靶蛋白(mTOR)途径对精神分裂症大鼠认知和记忆障碍的作用。方法 将 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 空白对照组、精神分裂症模型组(SZ 组)、SZ+SB-399885 组(10 mg/kg)、阳性对照组(SZ+利培酮, 0.1 mg/kg), 每组各 10 只大鼠。采用 MK-801 建立 SZ 大鼠模型。新物体辨别实验检测大鼠视觉识别记忆, Morris 水迷宫实验检测大鼠认知能力, 被动回避实验检测大鼠学习记忆能力, 乙酰胆碱酯酶(AChE)活性测定试剂盒检测大鼠海马和大脑皮质 AChE 活性, TUNEL 染色法检测大鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡情况, Western blot 检测大鼠海马 HTR6 / mTOR 途径相关蛋白的表达。结果 5-HT6 受体拮抗剂 SB-399885 和利培酮均能显著改善 SZ 大鼠视觉识别记忆障碍、认知障碍和学习记忆障碍(均  $P < 0.05$ )。与 SZ 组比较, SZ+SB-399885 组大鼠海马 AChE 活性[ $(0.008 \pm 0.001) \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ], 神经细胞凋亡率[ $(21.75 \pm 4.45)\%$ ], HTR6 蛋白表达[ $(0.56 \pm 0.10)$ ]和 mTOR 活性[ $(0.41 \pm 0.05)$ ]均显著降低(均  $P < 0.05$ ); 阳性对照组大鼠海马和大脑皮质 AChE 活性显著降低(均  $P < 0.05$ ), 大鼠海马神经细胞凋亡率[ $(19.28 \pm 5.22)\%$ ], HTR6 蛋白表达[ $(0.40 \pm 0.10)$ ]和 mTOR 活性[ $(0.33 \pm 0.05)$ ]均显著降低(均  $P < 0.05$ )。结论 5-HT6 受体拮抗剂 SB-399885 可能通过阻断 HTR6 / mTOR 途径改善精神分裂症大鼠认知和记忆障碍。

**【关键词】** 精神分裂症; 5-羟色胺 6 受体; 认知障碍; 记忆障碍; 雷帕霉素靶蛋白

- [19] Chao H, Liu Y, Lin C, et al. Activation of bradykinin B2 receptor induced the inflammatory responses of cytosolic phospholipase A(2) after the early traumatic brain injury[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(9 Pt B): 2957-2971. DOI: 10.1016/j.bbdis.2018.06.006.
- [20] Simonsen CZ, Schmitz ML, Madsen MH, et al. Early neurological deterioration after thrombolysis: Clinical and imaging predictors[J]. *Int J Stroke*, 2016, 11(7): 776-782. DOI: 10.1177/1747493016650454.
- [21] 崔颖, 佟旭, 王伊龙, 等. 急性缺血性卒中患者阿替普酶静脉溶栓后发生早期神经功能恶化的危险因素分析[J]. *中华神经科杂志*, 2016, 49(12): 925-931. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2016.12.004.
- [22] Cui Y, Tong X, Wang YL, et al. Factors associated with early neurological deterioration after intravenous thrombolysis with alteplase in patients with acute ischemic stroke[J]. *Chin J Neurol*, 2016, 49(12): 925-931.
- [23] 秦保健, 李琳. 急性缺血性卒中患者阿替普酶静脉溶栓后发生早期神经功能恶化的危险因素分析[J]. *国际医药卫生导报*, 2019, 25(1): 66-68. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-1245.2019.01.019.
- [24] Qin BJ, Li L. Risk factors of early neurological deterioration after intravenous thrombolysis by alteplase for patients with acute ischemic stroke[J]. *International Medicine and Health Guidance News*, 2019, 25(1): 66-68.
- [25] Fischer U, Arnold M, Nedelchev K, et al. NIHSS score and arteriographic findings in acute ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2005, 36(10): 2121-2125. DOI: 10.1161/01.STR.0000182099.04994.fc.
- [26] Scheitz JF, Abdul-Rahim AH, MacIsaac RL, et al. Clinical selection strategies to identify ischemic stroke patients with large anterior vessel occlusion: results from SITS-ISTR (Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke International Stroke Thrombolysis Registry) [J]. *Stroke*, 2017, 48(2): 290-297. DOI: 10.1161/strokeaha.116.014431.

(收稿日期: 2020-03-01)

(本文编辑: 赵金鑫)

## SB-399885 blocks HTR6/mTOR pathway to improve cognitive and memory impairment in rats with schizophrenia Yi Shanzhi, Liu Handong

Quality Control Office, Xiangyang Anding Hospital, Xiangyang 441000, China (Yi SZ); Department of Neurosurgery, Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441000, China (Liu HD)

Corresponding author: Liu Handong, Email: liuhdcn@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-399885 on cognitive and memory impairment in rats with schizophrenia by blocking the HTR6/mTOR pathway. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into 4 groups: blank control group, schizophrenia model group (SZ group), SZ+SB-399885 group (10 mg/kg), positive control group (SZ + risperidone, 0.1 mg/kg), with 10 rats in each group. The SZ rat model was established using MK-801. The new object discrimination experiment was used to detect the visual recognition memory of rats. The Morris water maze test was used to detect the cognitive ability of rats. The passive avoidance test was used to detect the learning and memory ability of rats. The AChE activity assay kit was used to detect the activity of AChE in hippocampus and cerebral cortex of rats. TUNEL staining method was used to detect the neuronal apoptosis in the hippocampal CA1 region of rats. Western blot was used to detect the expression of HTR6/mTOR pathway-related proteins in rat hippocampus. **Results** Both 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists SB-399885 and risperidone could significantly improve visual recognition and memory impairment, cognitive impairment and learning and memory impairment in SZ rats ( $P < 0.05$ ). Compared with SZ group, the hippocampal AChE activity [ $(0.008 \pm 0.001) \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ], the neuronal apoptosis rate ( $21.75 \pm 4.45$ )%, HTR6 protein expression ( $0.56 \pm 0.10$ ) and mTOR activity ( $0.41 \pm 0.05$ ) in the SZ + SB-399885 group was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The AChE activity in hippocampus and cerebral cortex of positive control group rats was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The neuronal apoptosis rate ( $19.28 \pm 5.22$ )%, HTR6 protein expression ( $0.40 \pm 0.10$ ), and mTOR activity ( $0.33 \pm 0.05$ ) were significant decreased ( $P < 0.05$ ) in positive control group. **Conclusions** The 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-399885 may improve cognitive and memory impairment in schizophrenic rats by blocking the HTR6 / mTOR pathway.

**【Key words】** Schizophrenia; 5-HT<sub>6</sub> receptor; Cognitive impairment; Memory impairment; HTR6/mTOR pathway

精神分裂症是一个严重的公共卫生问题,全球约0.7%的人受到精神分裂症的困扰<sup>[1]</sup>。精神分裂症的症状主要有3个方面:阳性(妄想和幻觉)、阴性(尤其是动机障碍,自发性言语减少和社交退缩)和认知症状(特定的执行功能障碍等)<sup>[2]</sup>。它还具有病程延长和残障率高的特点,给家庭、医疗系统、经济和整个社会带来沉重负担。多年来,精神分裂症药物治疗的主要靶标是多巴胺受体的拮抗作用。尽管D2拮抗剂已被证明可治疗精神分裂症特定症状,尤其是阳性症状,但它们通常对治疗其他症状,如认知障碍无效<sup>[3]</sup>。因此,开发效果更为全面的精神分裂症药物对精神分裂症的治疗具有重要意义。

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是中枢和周围神经系统中重要的神经递质。5-HT受体家族介导5-HT调节各种生理过程,如认知、情绪、知觉、疼痛和进食行为<sup>[4-5]</sup>。除5-HT<sub>3</sub>受体通过配体依赖性离子通道传递信号外,其余5-HT受体都属于G蛋白偶联受体超家族<sup>[4]</sup>。5-羟色胺6受体(5-hydroxytryptamine 6 receptor, HTR6)仅在大脑中表达,特别是在额叶皮质和海马等与学习和记忆有关的区域<sup>[6]</sup>。据报道,哺乳动物中HTR6与雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)途

径的几种靶标蛋白,如mTOR相互作用。HTR6的激活会增强mTOR信号传导<sup>[7]</sup>。SB-399885是一种有效的脑渗透性5-HT<sub>6</sub>受体拮抗剂,对大鼠受体具有高亲和力( $pK_i=8.81$ ),起效迅速(30 min),大鼠口服后具有长效作用(15 h)<sup>[4]</sup>。通过动物行为学实验,例如新物体辨别实验、社交识别实验和Morris水迷宫实验检测发现,5-HT<sub>6</sub>受体拮抗剂SB-399885可增强动物的学习和记忆力<sup>[8-9]</sup>。苯环利定、地佐西平(MK-801)和氯胺酮之类的N-甲基-D天冬氨酸受体拮抗剂可在健康个体中诱发精神病综合征,并加剧精神分裂症患者的症状<sup>[10-13]</sup>。本研究采用MK-801建立精神分裂症大鼠模型,以探究5-HT<sub>6</sub>受体拮抗剂SB-399885通过HTR6/mTOR途径对精神分裂症大鼠认知和记忆障碍的作用,以期为抗精神分裂症药物的开发提供新的基础研究参考。

### 一、材料与方法

1.材料:40只成年雄性SD大鼠[( $250 \pm 20$ )g]购自北京健康河实验动物技术有限公司[动物许可证号:SCXK(Beijing)2012-0001]。双辛酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Western blotting电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)法检测试剂盒、乙

酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性测定试剂盒、4%多聚甲醛和高效RIPA裂解液购自北京索莱宝科技有限公司; TUNEL检测试剂盒购自Roche公司; 兔抗HTR6抗体购自Invitrogen; 兔抗磷酸化核糖体40S小亚基S6蛋白激酶(phosphorylation of p70 S6 kinase, p-S6K)、核糖体40S小亚基S6蛋白激酶(p70 S6 kinase, S6K)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体购自Cell Signaling Technology公司; MK-801购自美国Selleck生物技术有限公司; SB-399885购自美国MedChemExpress公司; 利培酮购自西安杨森制药有限公司。

2. 实验动物及分组: 成年雄性SD大鼠40只, 体重(250 ± 20)g, 饲养于鼠房, 温度(23 ± 2)℃, 相对湿度40% ~ 70%, 鼠房保持通风换气, 定期清洁, 使用普通鼠饲料喂养。待大鼠适应环境1周后, 将其随机分为4组: 空白对照组、SZ(精神分裂症)组、SZ+SB-399885组和阳性对照(SZ+利培酮)组, 每组各10只。各组大鼠在相同条件下正常饲养。

3. 给药处理: 参考文献[13], 本实验选用MK-801建立精神分裂症大鼠模型。按照分组, SZ组、SZ+SB-399885组和阳性对照组大鼠腹腔注射MK-801(0.1 mg/kg), 空白对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水。MK-801连续注射大鼠14 d, 进行造模。造模成功后, 对SZ+SB-399885组腹腔注射SB-399885(10 mg/kg)<sup>[4]</sup>, 阳性对照组腹腔注射利培酮(0.1 mg/kg)<sup>[14]</sup>, 空白对照组和SZ组腹腔注射等量生理盐水, 每天给药1次, 持续注射6 d。

4. 新物体辨别实验: 实验于长40 cm、宽40 cm、高40 cm的箱子内进行。准备2块相同、直径约为5 cm的木棒, 1块直径约为5 cm的石块, 编号分别为A、B、C。在进行训练或测试前24 h, 将大鼠放于箱内适应测试环境。训练时, 将A、B物体分别置于箱子一侧壁的左右两端。大鼠背朝两物体放入箱内, 大鼠鼻尖与两物体的距离一致。大鼠放入5 min后, 开启录像设备, 记录大鼠在5 min内与A、B物体的接触情况, 包括嗅、探、舔、咀嚼和鼻子指向物体并与其距离 ≤ 1 cm范围内的探索时间, 训练结束后, 将大鼠放回鼠笼, 待大鼠休息2 h后再进行测试。测试时, 将箱内的B物体换为C物体, 大鼠背对A、C物体放入箱内, 要求大鼠鼻尖距离两物体的长度一致。大鼠放入5 min后, 开启录像设备, 记录大鼠在5 min内与A、C物体的接触情况。在测试期间, 与熟悉物体相比, 在新物体上花费的时间采用独立样本 $t$ 检验后, 统计学上的显著增加( $P < 0.05$ )表示新物体

被成功识别<sup>[15]</sup>, 鉴别指数(discrimination index, DI)作为每只动物的识别记忆指数, 其计算公式为:  $DI = (T_{Nov} - T_{Fam}) / T_{Tot}$ 。其中,  $T_{Nov}$ 为新物体探索时间;  $T_{Fam}$ 为熟悉物体探索时间;  $T_{Tot}$ 为 $T_{Nov}$ 与 $T_{Fam}$ 的探索时间总和。

5. Morris水迷宫实验: 分别在大鼠首次注射MK-801后、药物治疗(SB-399885和利培酮)2 d和6 d后进行Morris水迷宫实验, 每天进行4次实验, 每次实验相隔2 h。实验装置主要由圆形的水池和圆形平台组成, 水池直径200 cm、高60 cm, 池内注入(26 ± 2)℃的水, 水深45 cm。将直径为16 cm、高5 cm的圆形平台固定于水面下1 cm处。水迷宫图像自动采集系统由上海新软信息科技有限公司提供。将大鼠面向池壁放入水池中, 记录大鼠从下水到找到水池中的平台并站立于其上所需时间, 记录为逃跑潜伏期<sup>[16]</sup>。

6. 被动回避实验: 被动回避实验在药物治疗结束后进行。避暗箱(长20.3 cm、宽15.9 cm、高21.3 cm)由左右两个大小相同的隔室组成。其中一个隔室用黑色布套包裹, 为暗箱。两隔室间被闸门隔开。首先进行保留实验, 将大鼠放在有照明的隔室中, 待大鼠适应30 s后, 将闸门开关设置为自动, 大鼠因喜暗恶光, 会主动进入暗室。大鼠进入暗室后, 给予一次低强度的脚底电击(0.8 mA、3 s)。红外传感器记录大鼠从暗室到明室的转移时间, 记录为转移潜伏期(transfer latency time, TLT), 以s为单位。保留实验结束后, 将大鼠移出避暗箱, 放回鼠笼。获得实验在保留实验结束后24 h, 按照以上操作进行。与获得实验相比, 保留实验中的TLT显著升高表明动物学习记忆功能正常<sup>[17]</sup>。

7. 解剖取材: TUNEL染色: 待各组大鼠行为学实验检测完毕后, 采用心脏灌注的方法进行解剖取材, 操作前一晚大鼠正常进食饮水。操作流程: (1)0.3%戊巴比妥钠(1 ml/100 g)麻醉大鼠; (2)打开胸腔, 暴露心脏; (3)大鼠左心室进针, 右心耳处开一小口; (4)生理盐水冲洗; (5)4%多聚甲醛(约150 ml)灌注固定; (6)收集大鼠的脑组织, 冰上剥离海马和大脑皮质; (7)-80℃条件下保存或直接脱水, 包埋、切片处理。

AChE活性测定和Western blot: 待各组大鼠行为学实验检测完毕后, 采用断头法处死大鼠, 操作前一晚大鼠正常进食饮水。大鼠死后, 迅速取出大脑, 镊子分离两脑半球, 脱去脑半球表面的脑膜, 分离海马和大脑皮质, 整个过程均在冰上进行。

8. AChE活性测定: 收集大脑皮质和海马样品。AChE活性测定试剂盒检测组织AChE活性, AChE

活性单位为  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

9. TUNEL染色法:对大鼠进行解剖,分离大鼠海马CA1区组织,4%多聚甲醛固定24 h。梯度酒精脱水,常规石蜡包埋、切片。Image J软件计算神经细胞总数及凋亡数,神经细胞凋亡数占总细胞数的百分比(%)记为神经细胞凋亡率。

10. Western blot:海马取样,加入含蛋白酶抑制剂(PMSF)的RIPA裂解液(1 ml/100 mg),冰上裂解30 min,4℃、12 000 r/min离心20 min(离心半径13.5 cm),收集上清液。BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。取20  $\mu\text{g}$ 样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳,随后将目的蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。10%脱脂奶粉室温封闭1.5 h,分别加入抗体HTR-6(1:1 000)、p-S6K(1:1 000)、S6K(1:1 000)、GAPDH(1:2 000),4℃条件下孵育8 h或室温孵育3 h, TBST洗5次,3 min/次。二抗室温孵育1 h, TBST洗5次,3 min/次。ECL化学发光法检测试剂盒检测蛋白条带并拍照。

11. 统计学方法:采用SPSS 21.0统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间样本比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间样本比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 二、结果

1. SB-399885对精神分裂症大鼠认知和记忆障碍的影响:新物体辨别实验结果显示,空白对照组、SZ+SB-399885组和阳性对照组大鼠在测试期间,与熟悉物体相比,新物体的探索时间均显著增加(图1A,  $t$ 值分别为6.32、5.13、7.84,均 $P<0.05$ ),成功识别新物体;SZ组大鼠在测试期间,熟悉物体和新物体的探索时间差异无统计学意义( $t=0.31$ ,  $P>0.05$ ),未识别新物体。4组大鼠的DI差异有统计学意义( $F=13.56$ ,  $P<0.05$ );与空白对照组( $0.34\pm 0.04$ )比较, SZ组大鼠的DI( $0.10\pm 0.01$ )显著降低( $P<0.05$ );与SZ组比较, SZ+SB-399885组( $0.33\pm 0.03$ )和阳性对照组( $0.36\pm 0.04$ )大鼠的DI均显著升高(均 $P<0.05$ )。见图1B。

Morris水迷宫实验结果显示,4组大鼠逃跑潜伏期差异有统计学意义( $F=45.32$ ,  $P<0.05$ );与空白对照组比较, SZ组大鼠逃跑潜伏期显著增加( $P<0.05$ );与SZ组比较, SZ+SB-399885组和阳性对照组大鼠在给药2 d和6 d后逃跑潜伏期均显著降低(均 $P<0.05$ )。见图1C。

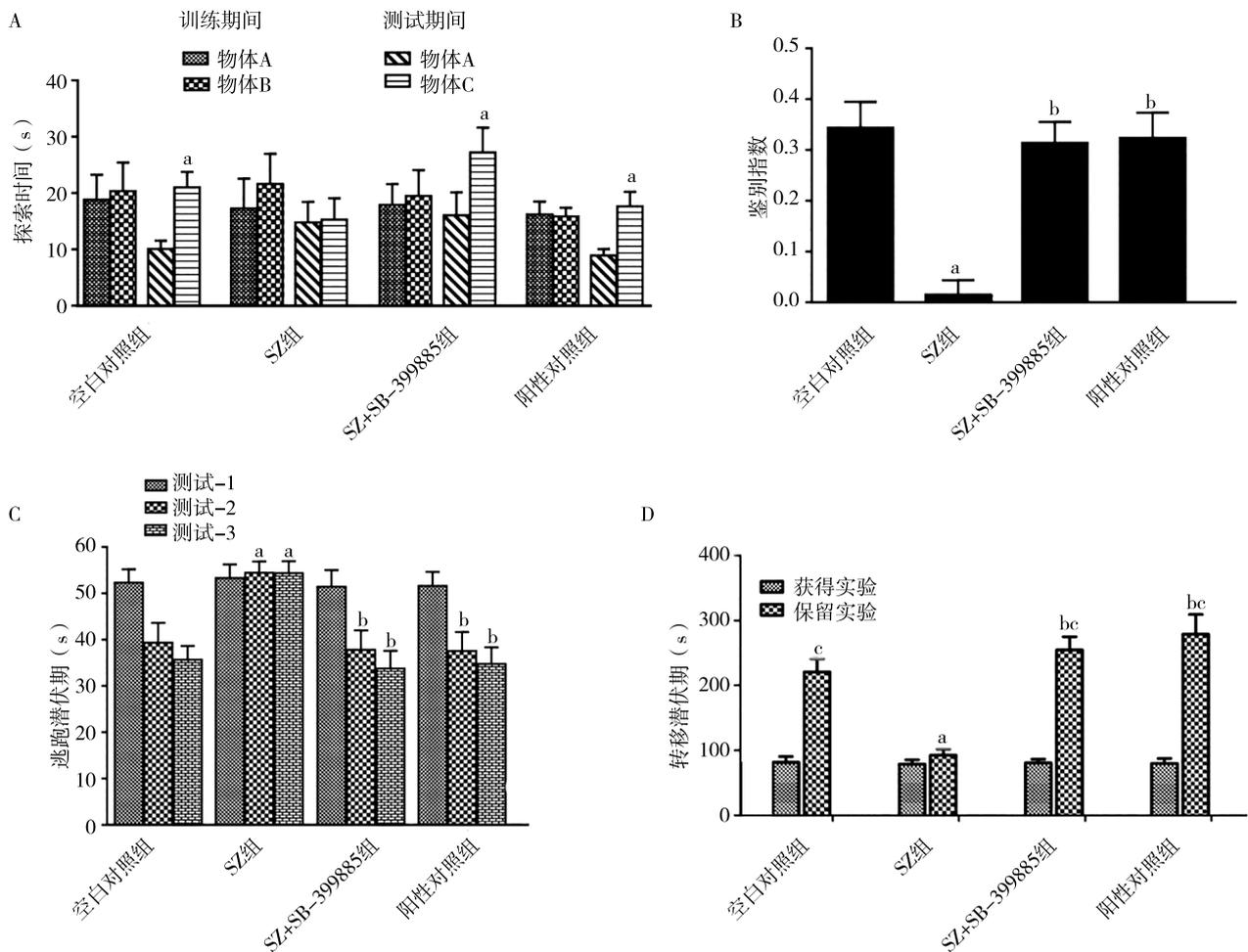
被动回避实验结果显示,4组大鼠在保留实

验中的TLT差异有统计学意义( $F=172.56$ ,  $P<0.05$ );与空白对照组[( $235.42\pm 19.58$ )s]比较, SZ组[( $97.21\pm 10.23$ )s]大鼠在保留实验中的TLT显著降低( $P<0.05$ );与SZ组比较, SZ+SB-399885组[( $264.96\pm 30.64$ )s]和阳性对照组[( $284.72\pm 35.68$ )s]大鼠在保留实验中的TLT均显著升高(均 $P<0.05$ )。SZ组大鼠在获得实验中的TLT与保留实验中的TLT差异无统计学意义( $P>0.05$ );SZ+SB-399885组和阳性对照组保留实验中的TLT与获得实验中的TLT比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。见图1D。

2. SB-399885对精神分裂症大鼠神经传导的影响: AChE活性测定试剂盒检测AChE酶活性,实验结果显示,4种大鼠大脑皮质与海马AChE活性差异均有统计学意义( $F$ 值分别为84.62、112.54,均 $P<0.05$ )。与空白对照组大鼠大脑皮质[( $0.006\pm 0.001$ ) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]和海马AChE活性[( $0.007\pm 0.001$ ) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]比较, SZ组大鼠AChE活性[分别为( $0.009\pm 0.002$ )、( $0.014\pm 0.003$ ) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]均显著升高(均 $P<0.05$ );与SZ组比较, SZ+SB-399885组大鼠海马AChE活性[( $0.008\pm 0.001$ ) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]显著降低( $P<0.05$ ),大脑皮质AChE活性[( $0.009\pm 0.001$ ) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]差异无统计学意义( $P>0.05$ ),阳性对照组大鼠大脑皮质[( $0.006\pm 0.001$ ) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]和海马[( $0.007\pm 0.001$ ) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]中AChE活性均显著降低(均 $P<0.05$ )。

3. SB-399885对精神分裂症大鼠海马神经细胞凋亡的影响: TUNEL染色法检测大鼠海马神经细胞凋亡情况,结果显示,4组大鼠海马神经细胞凋亡率差异有统计学意义( $F=213.42$ ,  $P<0.05$ )。与空白对照组[( $2.56\pm 0.15$ )%]比较, SZ组大鼠海马神经细胞凋亡率[( $39.83\pm 5.74$ )%]显著升高( $P<0.05$ );与SZ组比较, SZ+SB-399885组和阳性对照组大鼠海马神经细胞凋亡率[分别为( $21.75\pm 4.45$ )%、( $19.28\pm 5.22$ )%]显著降低(均 $P<0.05$ )。见图2(见本期封三)。

4. SB-399885对精神分裂症大鼠HTR6/mTOR途径的影响: Western blot检测HTR6/mTOR途径相关蛋白HTR6、p-S6K和S6K的表达水平,结果显示,4组大鼠海马HTR6蛋白和mTOR的活性(p-S6K/S6K)差异均有统计学意义( $F$ 值分别为57.69、69.48,均 $P<0.05$ )。与空白对照组大鼠海马HTR6蛋白( $0.19\pm 0.06$ )、mTOR的活性( $0.15\pm 0.02$ )比较, SZ组大鼠海马HTR6蛋白的表达( $0.94\pm 0.17$ )和mTOR



注: SB-399885 5-羟色胺6受体拮抗剂; SZ组精神分裂症模型大鼠组; SZ+SB-399885组造模成功后腹腔注射SB-399885(10 mg/kg); 阳性对照组造模成功后腹腔注射利培酮(0.1 mg/kg); 空白对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水; A 新物体辨别实验中各组大鼠在训练和测试期间的探索时间比较,与对物体A的探索时间比较, \* $P < 0.05$ ; B 新物体辨别实验中各组大鼠的鉴别指数比较,与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ,与SZ组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; C Morris水迷宫实验中各组大鼠逃跑潜伏期比较,与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ,与SZ组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ,测试-1为小鼠首次注射MK-801后,测试-2为药物治疗(SB-399885和利培酮)2 d后,测试-3为药物治疗6 d后; D 被动回避实验中各组大鼠的转移潜伏期比较,保留实验中,与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ,与SZ组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ,与组内获得实验比较, \* $P < 0.05$

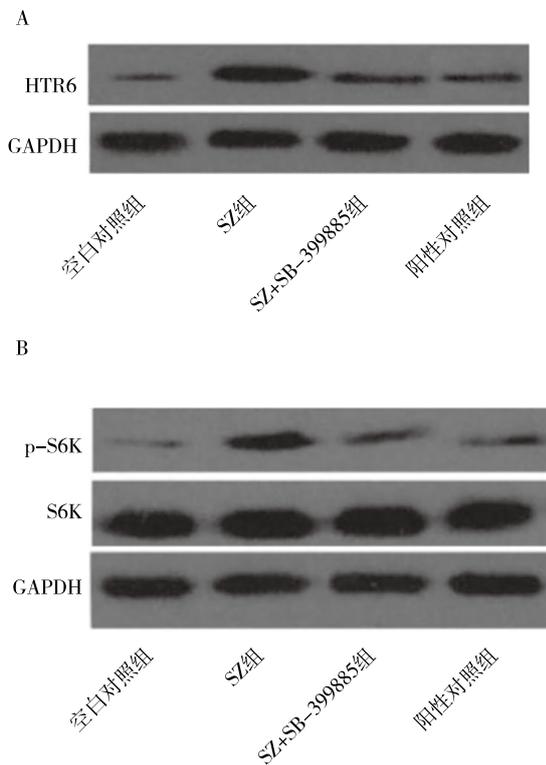
图1 SB-399885对精神分裂症模型大鼠认知和记忆障碍的影响

的活性( $0.84 \pm 0.11$ )均显著升高(均 $P < 0.05$ );与SZ组比较, SZ+SB-399885组[分别为( $0.56 \pm 0.10$ )、( $0.41 \pm 0.05$ )]和阳性对照组[分别为( $0.40 \pm 0.10$ )、( $0.33 \pm 0.05$ )]HTR6蛋白表达和mTOR活性均显著降低(均 $P < 0.05$ )。见图3。

**讨论** 精神分裂症是一种慢性和重度精神疾病,对个人和社会都具有灾难性影响。精神分裂症症状包括:阳性、阴性和认知症状,并且可能与神经发育和神经退行性病理生理过程有关<sup>[2]</sup>。遗传和生活环境都是导致精神分裂症的重要因素,但其发病机制仍不清楚<sup>[1, 18]</sup>。5-HT是中枢和周围神经系统中重要的神经递质。5-HT受体家族介导5-HT调节各种生理过程,如认知、情绪、知觉、疼痛和进食行为<sup>[4-5]</sup>。最近的一些研究表明, HTR6可能参与

mTOR的调节,而mTOR是HTR6信号传导途径的潜在下游成分, HTR6的激活会增强mTOR信号传导<sup>[7]</sup>。SB-399885是一种有效的、选择性的脑渗透性HTR6拮抗剂,其对HTR6的选择性是所有其他受体的200倍以上,并且对人重组和天然HTR6具有高亲和力<sup>[4]</sup>。本研究采用MK-801建立精神分裂症大鼠模型,旨在探究HTR6受体拮抗剂SB-399885是否通过阻断HTR6/mTOR途径改善精神分裂症大鼠认知和记忆障碍。

研究表明,通过动物行为学实验,例如新物体辨别实验、社交识别实验和Morris水迷宫实验检测发现5-HT6受体拮抗剂SB-399885可增强动物的学习和记忆力<sup>[8-9]</sup>。调节5-HT6受体功能对失忆症啮齿动物模型的学习和记忆具有改善作用。受体拮



注: HTR6 5-羟色胺6受体; mTOR 雷帕霉素靶蛋白; SB-399885 5-羟色胺6受体拮抗剂; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; S6K 核糖体40S小亚基S6蛋白激酶; p-S6K 磷酸化核糖体40S小亚基S6蛋白激酶; SZ组精神分裂症模型大鼠组; SZ+SB-399885组造模成功后腹腔注射SB-399885(10 mg/kg); 阳性对照组造模成功后腹腔注射利培酮(0.1 mg/kg); 空白对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水; A HTR6蛋白表达; B mTOR活性

图3 Western blot检测HTR6/mTOR途径相关蛋白的表达

抗剂SB-271046和其他5-HT<sub>6</sub>受体拮抗剂预防了MK-801诱导的记忆障碍<sup>[19-20]</sup>。5-HT<sub>6</sub>受体拮抗剂idalopirdine改善了多奈哌齐治疗的中度阿尔茨海默病患者的认知功能<sup>[21]</sup>。本研究应用MK-801建立精神分裂症大鼠模型,随后腹腔注射SB-399885和利培酮,新物体辨别实验检测大鼠视觉识别记忆能力, Morris水迷宫实验检测大鼠认知能力,被动回避实验检测大鼠学习记忆能力,实验结果显示,与SZ组比较, SZ+SB-399885组和阳性对照组大鼠新物体的探索时间与熟悉物体相比显著增加,成功识别新物体, DI显著升高; Morris水迷宫实验结果显示,与SZ组比较, SZ+SB-399885组和阳性对照组大鼠逃跑潜伏期均显著降低; 被动回避实验结果显示,与SZ组比较, SZ+SB-399885组和阳性对照组大鼠在保留实验中的TLT显著升高; SZ+SB-399885组和阳性对照组保留实验中的TLT与获得实验中的TLT相比呈显著差异。以上实验结果说明, SB-399885能明显改善MK-801诱导的SZ大鼠视觉识别记忆障碍、认知

障碍和学习记忆障碍。

最近的一些研究表明, HTR6可能参与mTOR的调节, 而mTOR是HTR6信号传导途径的潜在下游成分<sup>[7]</sup>。mTOR是进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶, 属于磷酸肌醇3激酶相关激酶家族, 在细胞的生长、存活、增殖、凋亡、血管生成和自噬等方面起着重要作用<sup>[22]</sup>。研究表明, 白藜芦醇通过抑制蛛网膜下腔出血大鼠中Akt/mTOR通路磷酸化, 导致自噬表达增加以及凋亡表达减少, 发挥对蛛网膜下腔出血大鼠早期脑损伤的神经保护作用<sup>[23]</sup>。二甲双胍在脊髓损伤后通过促进自噬和通过调节mTOR/P70S6K信号通路抑制神经细胞凋亡而发挥神经保护作用<sup>[24]</sup>。HTR6配体, 尤其是HTR6选择性拮抗剂, 研究表明, 其对某些神经系统疾病的改善作用, 它们对神经元可塑性和神经递质(如胆碱能和谷氨酸能系统)的功能具有正向调控作用<sup>[25]</sup>。本研究应用Western blot检测HTR6/mTOR信号通路相关蛋白HTR6、p-S6K和S6K的表达, 应用AChE活性测定试剂盒检测大鼠海马及大脑皮质AChE酶活性, TUNEL染色法检测大鼠海马神经细胞凋亡情况, 结果显示, 与空白对照组比较, SZ组大鼠HTR6蛋白的表达和mTOR的活性均显著升高, 大脑皮质和海马AChE活性均显著升高, 海马神经细胞凋亡率显著升高; 与SZ组比较, SZ+SB-399885组和阳性对照组大鼠HTR6蛋白的表达和mTOR的活性均显著降低, 海马AChE活性显著降低, 海马神经细胞凋亡率显著降低。以上实验结果说明, SB-399885通过阻断精神分裂症大鼠海马中HTR6/mTOR途径, 促进脑神经递质的产生, 抑制海马神经细胞凋亡。

综上所述, SB-399885通过阻断精神分裂症大鼠海马中HTR6/mTOR途径, 改善精神分裂症大鼠视觉识别记忆能力、认知能力和学习记忆能力。认知和记忆障碍。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 实验设计为易善志、刘汉东, 实验实施、论文撰写为易善志, 实验评估、论文审校为刘汉东

## 参 考 文 献

- [1] McGrath J, Saha S, Chant D, et al. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality [J]. *Epidemiol Rev*, 2008, 30: 67-76. DOI: 10.1093/epirev/mxn001.
  - [2] 王碧馨, 袁念, 袁廉, 等. 首发精神分裂症神经软体征与认知功能的相关性 [J]. *神经疾病与精神卫生*, 2019, 19(3): 244-248. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2019.03.007.
- Wang BX, Yuan N, Yuan L, et al. Relationship between neurological soft signs and cognition function in first-episode

- schizophrenia[J]. *Journal of Neuroscience and Mental Health*, 2019, 19(3): 244-248.
- [ 3 ] Wang X, Ding S, Lu Y, et al. Effects of sodium nitroprusside in the acute dizocilpine (MK-801) animal model of schizophrenia[J]. *Brain Res Bull*, 2019, 147: 140-147. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.02.008.
- [ 4 ] Bokare AM, Bhonde M, Goel R, et al. 5-HT6 receptor agonist and antagonist modulates ICV-STZ-induced memory impairment in rats[J]. *Psychopharmacology*, 2018, 235(5): 1557-1570. DOI: 10.1007/s00213-018-4866-z.
- [ 5 ] Meneses A. Serotonin, neural markers, and memory[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 143. DOI: 10.3389/fphar.2015.00143.
- [ 6 ] de Assis Brasil ES, Furini CRG, da Silva Rodrigues F, et al. The blockade of the serotonergic receptors 5-HT5A, 5-HT6 and 5-HT7 in the basolateral amygdala, but not in the hippocampus facilitate the extinction of fear memory[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 372: 112055. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112055.
- [ 7 ] Teng LL, Lu GL, Chiou LC, et al. Serotonin receptor HTR6-mediated mTORC1 signaling regulates dietary restriction - induced memory enhancement[J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(3): e2007097. DOI: 10.1371/journal.pbio.2007097.
- [ 8 ] Aparicio-Nava L, Tellez R, Gonzalez R, et al. Intrahippocampal administration of 5-HT6 receptor drugs on memory consolidation and amnesia protocols[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 359: 378-385. DOI: 10.1016/j.bbr.2018.11.021.
- [ 9 ] Nirogi R, Abraham R, Benade V, et al. SUVN-502, a novel, potent, pure, and orally active 5-HT6 receptor antagonist: pharmacological, behavioral, and neurochemical characterization[J]. *Behav Pharmacol*, 2019, 30(1): 16-35. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000414.
- [ 10 ] Bryant JE, Frölich M, Tran S, et al. Ketamine induced changes in regional cerebral blood flow, interregional connectivity patterns, and glutamate metabolism[J]. *J Psychiatr Res*, 2019, 117: 108-115. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2019.07.008.
- [ 11 ] Hansen H. Substance-induced psychosis: clinical-racial subjectivities and capital in diagnostic apartheid[J]. *Ethos*, 2019, 47(1): 73-88. DOI: 0.1111/etho.12223.
- [ 12 ] Maia-de-Oliveira JP, Lobão-Soares B, Ramalho T, et al. Nitroprusside single-dose prevents the psychosis-like behavior induced by ketamine in rats for up to one week[J]. *Schizophr Res*, 2015, 162(1/3): 211-215. DOI: 10.1016/j.schres.2014.12.035.
- [ 13 ] Ravandi SG, Shabani M, Bashiri H, et al. Ameliorating effects of berberine on MK-801-induced cognitive and motor impairments in a neonatal rat model of schizophrenia[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 706: 151-157. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.05.029.
- [ 14 ] Li YX, Ye ZH, Chen T, et al. The effects of donepezil on phencyclidine-induced cognitive deficits in a mouse model of schizophrenia[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2018, 175: 69-76. DOI: 10.1016/j.pbb.2018.09.006.
- [ 15 ] RogóZ Z, Wąsik A, Lorenc-Koci E. Combined treatment with aripiprazole and antidepressants reversed some MK-801-induced schizophrenia-like symptoms in mice[J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(4): 623-630. DOI: 10.1016/j.pharep.2018.02.022.
- [ 16 ] Unal G, Aricioglu F. A-582941, cholinergic alpha 7 nicotinic receptor agonist, improved cognitive and negative symptoms of the sub-chronic MK-801 model of schizophrenia in rats[J]. *Psychiat Clin Psych*, 2018, 28(1): 4-13. DOI: 10.1080/24750573.2017.1379716.
- [ 17 ] Yadav M, Parle M, Sharma N, et al. Protective effects of Spinacia oleracea seeds extract in an experimental model of schizophrenia: Possible behavior, biochemical, neurochemical and cellular alterations[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 1015-1025. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.06.043.
- [ 18 ] Torrey EF, Yolken RH. Schizophrenia as a pseudogenetic disease: a call for more gene-environmental studies[J]. *Psychiat Res*, 2019, 278: 146-150. DOI: 10.1016/j.psychres.2019.06.006.
- [ 19 ] Rychtyk J, Partyka A, Gdula-Argasińska J, et al. 5-HT6 receptor agonist and antagonist improve memory impairments and hippocampal BDNF signaling alterations induced by MK-801 [J]. *Brain Res*, 2019, 1722: 146375. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.146375.
- [ 20 ] Cadinu D, Grayson B, Podda G, et al. NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 142: 41-62. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.045.
- [ 21 ] Wilkinson D, Windfeld K, Colding-Jørgensen E. Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT6 receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial[J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(11): 1092-1099. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70198-X.
- [ 22 ] 宋晓红, 刘明明, 仇红刚. mTOR 信号通路及相关疾病的研究进展[J]. *微循环学杂志*, 2018, 28(3): 64-70. DOI: 10.3969/j.issn.1005-1740.2018.03.013.
- Song XH, Liu MM, Zhang HG. Research progress on mTOR signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Microcirculation*, 2018, 28(3): 64-70.
- [ 23 ] Guo D, Xie JT, Zhao JJ, et al. Resveratrol protects early brain injury after subarachnoid hemorrhage by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the Akt/mTOR pathway[J]. *Neuroreport*, 2018, 29(5): 368-379. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000975.
- [ 24 ] Guo Y, Wang F, Li HP, et al. Metformin protects against spinal cord injury by regulating autophagy via the mTOR signaling pathway[J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(5): 1111-1117. DOI: 10.1007/s11064-018-2525-8.
- [ 25 ] Chaumont-Dubel S, Dupuy V, Bockaert J, et al. The 5-HT6 receptor interactome: new insight in receptor signaling and its impact on brain physiology and pathologies[J]. *Neuropharmacology*, 2019: 107839. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107839.

(收稿日期: 2019-11-18)

(本文编辑: 赵金鑫)