

## · 抑郁症专题 ·

## 帕罗西汀对抑郁模型大鼠前额叶皮质鞘磷脂和神经酰胺的影响

聂佩 薛姗姗 喻理晟 周翠红 刘军昌

710032 西安,空军军医大学西京医院心身科(聂佩、薛姗姗、周翠红、刘军昌); 710021 西安医学院(喻理晟)

通信作者:刘军昌, Email: ljc\_xjyy@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.02.003

**【摘要】目的** 观察帕罗西汀对慢性不可预见应激(CUS)模型大鼠前额叶皮质(PFC)中鞘磷脂(SM)和神经酰胺(Cer)水平的影响。**方法** 按照随机数字表法将21只SD大鼠随机分为对照组(Sham组)、模型组(CUS组)和帕罗西汀组(Par组),每组7只。CUS组和Par组均接受CUS造模,并且在造模后每天腹腔注射生理盐水(1 ml/kg)或帕罗西汀(10 mg/kg),连续7 d; Sham组在同一时间段每天腹腔注射生理盐水。随后处死大鼠,取PFC进行质谱分析,比较各处理组SM和Cer以及其组成小分子相对丰度的差异。**结果** CUS组的SM相对丰度倍数为(0.73 ± 0.16),显著低于Sham组的(1.02 ± 0.08)和Par组的(0.89 ± 0.05)(均  $P < 0.05$ ); CUS组的Cer相对丰度倍数为(1.35 ± 0.18),显著高于Sham组的(1.05 ± 0.10)和Par组的(1.14 ± 0.11)(均  $P < 0.05$ ); Sham组和Par组的SM和Cer相对丰度比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与Sham组相比, CUS组的5个SM和2个Cer小分子相对丰度降低,1个SM和5个Cer小分子相对丰度升高(均  $P < 0.05$ ); 与Par组相比, CUS组的2个SM小分子相对丰度降低,8个Cer小分子相对丰度升高(均  $P < 0.05$ ); Sham组的1个SM和2个Cer小分子相对丰度降低,1个SM和6个Cer小分子相对丰度升高(均  $P < 0.05$ )。**结论** CUS模型大鼠前额叶皮质的SM水平降低而Cer水平升高,帕罗西汀干预可以改善这一现象。

**【关键词】** 鞘磷脂; 神经酰胺; 慢性不可预见应激; 前额叶皮质; 帕罗西汀

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81904280)

**Impact of paroxetine on the levels of sphingomyelin and ceramide in the prefrontal cortex of rats with chronic unpredictable stress** Nie Pei, Xue Shanshan, Yu Lisheng, Zhou Cuihong, Liu Junchang

Department of Psychosomatic Medicine, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China (Nie P, Xue SS, Zhou CH, Liu JC); Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China (Yu LS)

Corresponding author: Liu Junchang, Email: ljc\_xjyy@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the impact of paroxetine (Par) on the compositions of sphingomyelin (SM) and ceramide (Cer) in prefrontal cortex (PFC) of rats with chronic unpredictable stress (CUS). **Methods** A total of 21 SD rats were randomly divided into control group (Sham), model group (CUS) and paroxetine group (Par), with 7 rats in each group. CUS group and Par group received CUS and then received intraperitoneal injection of normal saline (1 ml/kg) or paroxetine (10 mg/kg) for 7 consecutive days; rats in Sham group only received intraperitoneal injection of normal saline at the same time. Then rats were killed and the PFC was isolated for lipomics analysis. The relative concentrations of total SM and Cer as well as the different small molecules in the PFC of each group were compared. **Results** The relative abundance multiple of SM in CUS group was (0.73 ± 0.16), which was significantly lower than that in Sham group (1.02 ± 0.08) and Par group (0.89 ± 0.05) (all  $P < 0.05$ ); the relative abundance multiple of Cer in CUS group was (1.35 ± 0.18), which was significantly higher than that in Sham group (1.05 ± 0.10) and Par group (1.14 ± 0.11) (all  $P < 0.05$ ); there was no significant difference in the relative abundance of SM and Cer between Sham and Par group ( $P > 0.05$ ). Compared with Sham group, the relative abundances of 5 SM and 2 Cer molecules in CUS group were decreased, while the relative abundances of 1 SM and 5 Cer molecules were increased (all  $P < 0.05$ ). Compared with Par group, the relative abundances of 2 SM molecules were decreased and 8 Cer molecules were increased in CUS group (all  $P < 0.05$ ). The relative abundances of 1 SM and 2 Cer molecules were decreased and the relative abundances of 1 SM and 6 Cer molecules were increased in Sham group (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusions** The level of SM was decreased while the level of Cer was increased in prefrontal cortex of CUS model rats, which can be improved by paroxetine intervention.

**【Key words】** Sphingomyelin; Ceramide; Chronic unpredictable stress; Prefrontal cortex; Paroxetine

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81904280)

抑郁症是最严重的慢性精神疾病之一,新近的流行病学研究发现,我国抑郁症的终生患病率约为7%,年患病率为3.6%<sup>[1]</sup>。研究表明,神经酰胺(ceramide, Cer)和鞘磷脂(sphingomyelin, SM)的水平变化与抑郁症的多种病理生理机制有关,包括调节突触可塑性和炎症反应等<sup>[2]</sup>,被认为是抑郁症的新治疗靶点<sup>[3-4]</sup>。还有研究发现,前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)是慢性应激条件下脂质分子变化程度最高的脑区,而且其鞘脂代谢受到严重影响,表现为Cer水平增加,SM水平降低<sup>[5]</sup>。然而,抑郁症模型中PFC的SM和Cer的组成特点以及抗抑郁药物对其的调节作用还有待进一步阐明。帕罗西汀是临床常用的抗抑郁药物之一,已被证实可以有效改善慢性不可预见应激(chronic unpredictable stress, CUS)模型大鼠的抑郁样行为<sup>[6]</sup>。因此,本研究以CUS抑郁大鼠为模型,观察帕罗西汀对该模型大鼠PFC中SM和Cer组成特点的变化,为进一步揭示帕罗西汀抗抑郁作用的分子生物学机制提供新思路。

### 一、材料与方法

1. 材料: (1) 实验动物。选择清洁级雄性8周龄左右的SD大鼠,体重(200 ± 20)g,由空军军医大学动物实验中心提供。本实验经空军军医大学动物研究伦理委员会批准,实验过程遵循神经科学和行为学实验中关于哺乳动物的饲养和使用规定(动物伦理号: KY20193307-2)。(2) 主要试剂和仪器。Q-Exactive Plus质谱仪(Thermo Scientific, 美国);UHPLC Nexera LC-30A超高效液相色谱仪(SHIMADZU, 日本);低温高速离心机(Eppendorf 5430R, 德国);色谱柱(Waters, 美国);乙腈(Thermo Fisher, TS-20062, 德国);异丙醇(Thermo Fisher, FCMA464-4, 德国);甲醇(Thermo Fisher, FCMA454-4, 德国);甲酸铵(Sigma, 70221, 美国)。

2. 实验分组及步骤: 大鼠适应性饲养7 d, 饲养环境为恒温恒湿, 室温(23 ± 1)°C, 湿度50% ~ 55%, 自由摄食和饮水, 12 h/12 h(8:00—20:00)明暗控制。随后, 按照随机数字表法将大鼠随机分为对照组(Sham组)、模型组(CUS组)和帕罗西汀组(Par组), 每组7只。CUS组和Par组大鼠经CUS造模后, 每天腹腔注射生理盐水(1 ml/kg)或帕罗西汀(10 mg/kg)<sup>[7]</sup>,

连续7 d; Sham组不进行CUS造模, 但在相同时间段注射生理盐水。各组处理腹腔注射生理盐水或者帕罗西汀的时间均为上午9:00—10:00。随后处死大鼠, 通过脂质组学分析, 观察大鼠前额叶皮质内SM和Cer水平变化。

3. CUS模型构建: 参照于欢等<sup>[8]</sup>的造模方式, 采用以下不同的应激处理方法对CUS组和Par组大鼠进行构建CUS模型。CUS持续21 d, 大鼠每天接受2种刺激, 刺激方式按照随机数字表法选取, 使实验动物不能预测应激刺激的发生, 刺激方式如下。(1) 昼夜节律颠倒和光照性质改变(闪光刺激、昼夜颠倒、间断光照); (2) 食物和饮水供应的改变(禁食、禁水); (3) 居住环境的改变(单笼饲养、鼠笼倾斜、潮湿垫料); (4) 短时间内足底电击; (5) 强迫游泳; (6) 束缚应激; (7) 高温环境; (8) 噪音干扰; (9) 陌生气味; (10) 陌生异常物品(塑料杯、木勺、碎布片等)。

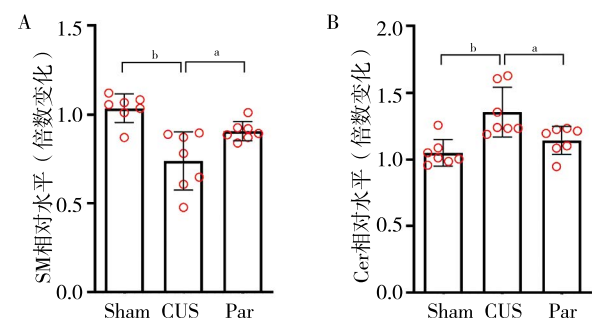
4. 色谱-质谱分析: (1) 样本制备。取各组大鼠脑组织样本, 加入200 μl纯水, 匀浆, 加入240 μl预冷甲醇, 涡旋混合, 加入800 μl甲基叔丁基醚(methyl tert-butyl ether, MTBE), 涡旋混合, 室温放置20 min, 8 000 × g 10°C, 离心半径为5 cm, 离心15 min, 取上层有机相, 氮气吹干, 质谱分析时加入400 μl异丙醇溶液复溶, 涡旋, 14 000 × g 10°C离心15 min, 取上清进样分析。(2) 色谱条件。样品采用UHPLC Nexera LC-30A超高效液相色谱系统进行分离和梯度洗脱, 采用随机顺序进行样品的连续分析。(3) 质谱条件。分别采用电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)的正离子和负离子模式进行检测。样品经UHPLC分离后采用Q Exactive plus质谱仪进行质谱分析。国际脂质分类和命名委员会将脂类化合物分为8大类型, 每个类型又可以根据极性头基的不同分为不同的亚类, 每一亚类根据碳链不饱和度、长度、缩醛等的差异分为不同的分子种属, 构成脂类化合物的三级分类。SM是由Ceramide和磷酸胆碱(PhosphoCholine)组成, 而Cer是脂肪酸与鞘氨醇的-NH<sub>2</sub>以酰胺键相连形成物质, 是鞘脂类化合物的结构单位。如Cer(d17: 0+pO/25: 0), 括号中的d17: 0+pO表示鞘氨醇骨架为17个C, 无不饱和双键; pO表示该骨架多了1个氧分子, 但是无法确

定其准确位置; 25 : 0表示酰胺键上结合了25 : 0的脂肪酸。

5. 统计学方法: 采用LipidSearch™软件进行峰识别、脂质鉴定(二级鉴定)、峰提取、峰对齐、定量等处理。对于LipidSearch提取得到的数据, 删除组内缺失值>50%的脂质分子, 对数据进行总峰面积归一化。应用软件SIMCA-P 14.1(Umetrics, Umea, Sweden)进行模式识别, 随后使用Pareto-scaling进行预处理。SM和Cer的相对丰度值经与Sham组均数比较后取倍数, 总的SM和Cer采用单因素方差分析, 多重比较采用Tukey检验。组间SM和Cer小分子比较采用t检验(双侧检验), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. 各组大鼠PFC总的SM和Cer相对水平比较: 经单因素方差分析, 3组间的SM( $F_{2, 18}=12.85, P=0.0003$ )和Cer( $F_{2, 18}=9.179, P=0.0018$ )相对水平差异均有统计学意义。两两比较显示, 与Sham组比较, CUS组的SM相对丰度显著减低( $P < 0.01$ ), 而Cer则显著升高( $P < 0.01$ ); Sham组和Par组的SM和Cer相对丰度比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图1。



注: A SM相对水平倍数变化的比较; B Cer相对倍数变化的比较; \* $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; Sham为对照组, CUS模型组, Par帕罗西汀组; SM鞘磷脂; Cer神经酰胺

图1 3组大鼠前额叶皮质SM和Cer相对水平的比较

2. 各处理组SM组成小分子之间的差异: 与Sham组相比, CUS组的SM(d42 : 3)+HCOO、SM(d22 : 1/16 : 0)+HCOO、SM(d41 : 1)+HCOO、SM(d41 : 1)+H、SM(d42 : 3)+H相对丰度降低, 而SM(d38 : 0+pO)+HCOO相对丰度升高(均 $P < 0.05$ )。见图2A(见本期封三)。与Par组相比, CUS组的SM(d20 : 0+pO/16 : 0)+HCOO和SM(d41 : 1)+H相对丰度降低。见图2B(见本期封三)。Sham组的SM(d16 : 1/18 : 0)+HCOO相对丰度降低, 而SM(d22 : 1/16 : 0)+HCOO相对丰度升高(均 $P < 0.05$ )。见图2C(见本期封三)。

3. 各处理组Cer组成小分子之间的差异: 与Sham组相比, CUS组的Cer(d20 : 2/18 : 0)+HCOO和Cer(d18 : 1/25 : 0)+H相对丰度降低, 而Cer(d18 : 1/26 : 0)+H、Cer(d18 : 2/18 : 0)+H、Cer(d18 : 1/19 : 0)+H、Cer(d16 : 1/25 : 1)+HCOO和Cer(d17 : 0+pO/23 : 0)+HCOO相对丰度升高(均 $P < 0.05$ )。见图3A(见本期封三)。与CUS组相比, Par组的Cer(d18 : 1/25 : 1)+H、Cer(d18 : 2/18 : 0)+HCOO、Cer(d16 : 1/25 : 1)+HCOO、Cer(d18 : 1/23 : 0)+HCOO、Cer(d18 : 1/26 : 1)+H、Cer(d18 : 1/23 : 1)+H、Cer(d18 : 1/24 : 2)+H和Cer(d17 : 0+pO/23 : 0)+HCOO相对丰度降低(均 $P < 0.05$ )。见图3B(见本期封三)。与Par组相比, Sham组的Cer(d18 : 1/23 : 0)+HCOO、Cer(d18 : 0+pO/20 : 0)+H、Cer(d18 : 1/25 : 0)+H、Cer(d18 : 2/18 : 0)+HCOO、Cer(d18 : 2/24 : 0+O)+H和Cer(d18 : 1/25 : 1)+H相对丰度升高, 而Cer(d18 : 1/24 : 1)+HCOO和Cer(d17 : 0+pO/25 : 0)+HCOO相对丰度降低(均 $P < 0.05$ )。见图3C(见本期封三)。

讨论 鞘脂是膜脂的主要组成成分之一, 在细胞内和细胞外间隙之间构建物理屏障<sup>[9]</sup>, 并在调节细胞信号传导中发挥关键作用<sup>[10]</sup>。SM是细胞内鞘脂的主要成分, 可被酸性鞘磷脂酶(acid sphingomyelinase, ASM)水解为Cer。越来越多的证据表明, ASM活性的增加使得SM被水解为Cer的程度升高, 从而引起免疫系统介导炎症和氧化应激调节失调<sup>[11]</sup>。临床研究发现, 血浆Cer水平与抑郁症状相关<sup>[12]</sup>, 抑郁症患者外周单核细胞中ASM活性增加<sup>[13]</sup>。基础研究亦证实, 大多数抗抑郁药都能通过诱导酶的部分降解抑制ASM的活性<sup>[14]</sup>。长期帕罗西汀干预可以降低前额叶皮质和海马中的Cer水平, 并且抑制ASM编码基因SMPD1的mRNA水平<sup>[15]</sup>; 过表达ASM的转基因小鼠表现出明显的抑郁样行为, 而ASM基因敲除小鼠海马中Cer水平降低, 表现出更少的抑郁样行为<sup>[16]</sup>。因此, 对SM和Cer的调节可能是帕罗西汀作用的潜在抗抑郁靶点之一。

PFC是重要的情绪和行为调控中枢, 也是抑郁症病理改变的重要脑区之一, 大量的研究报道了抑郁症状与PFC的结构和功能异常的关系。临床研究发现, 抑郁症患者PFC细胞凋亡增加, 体积减小<sup>[17]</sup>, 血流动力学反应下降而且背侧PFC功能减退<sup>[18-19]</sup>。基础研究也发现, 抗抑郁药物可以通过作用于PFC促进其对情绪加工和认知调控的能力<sup>[20]</sup>。此外, PFC与海马、杏仁核等边缘系统组成的情绪加工神经

环路异常已被证实是抑郁症发生的主要病理机制之一<sup>[21]</sup>。本研究发现, CUS 组的 SM 水平显著低于对照组, 而 Cer 水平则显著高于对照组, 帕罗西汀干预可以逆转这一变化, 该结果与既往研究相一致<sup>[22]</sup>, 提示前额叶皮质的 SM/Cer 在抑郁症的发生和转归中发挥重要作用。此外, 本研究还发现, CUS 可导致 PFC 多种 SM 和 Cer 小分子相对丰度的改变, 帕罗西汀干预则逆转了其对 SM(d41 : 1)+H、Cer(d16 : 1/25 : 1)+HCOO 和 Cer(d17 : 0+pO/23 : 0)+HCOO 的影响, 提示这 3 个分子可能是帕罗西汀作用的关键分子。

综上所述, CUS 模型大鼠前额叶皮质 SM 和 Cer 的相对丰度和组成发生改变, 而帕罗西汀则对此有调节作用, 这为抗抑郁药物作用机制提供了新的思路。但本研究未观察帕罗西汀对 SM 和 Cer 水平调节的时间和计量效应, 亦未观察对 ASM 的调节作用, 且帕罗西汀对 PFC 的 SM 和 Cer 调节作用是否是其抗抑郁作用中的关键分子靶点还有待进一步验证。

**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** 研究的构思与设计为刘军昌、周翠红, 数据收集、整理为聂佩、薛姗姗、喻理晟, 数据分析、论文撰写为聂佩、薛姗姗, 论文审校为周翠红、刘军昌

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Huang Y, Wang Y, Wang H, et al. Prevalence of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study[ J ]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(3): 211-224. DOI: 10.1016/S2215-0366(18)30511-X.
- [ 2 ] Bieberich E. It's a lipid's world: bioactive lipid metabolism and signaling in neural stem cell differentiation[ J ]. *Neurochem Res*, 2012, 37(6): 1208-1229. DOI: 10.1007/s11064-011-0698-5.
- [ 3 ] Kornhuber J, Muller CP, Becker KA, et al. The ceramide system as a novel antidepressant target[ J ]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(6): 293-304. DOI: 10.1016/j.tips.2014.04.003.
- [ 4 ] Gulbins E, Walter S, Becker KA, et al. A central role for the acid sphingomyelinase/ceramide system in neurogenesis and major depression[ J ]. *J Neurochem*, 2015, 134(2): 183-192. DOI: 10.1111/jnc.13145.
- [ 5 ] Oliveira TG, Chan RB, Bravo FV, et al. The impact of chronic stress on the rat brain lipidome[ J ]. *Mol Psychiatry*, 2016, 21(1): 80-88. DOI: 10.1038/mp.2015.14.
- [ 6 ] Qiu HM, Yang JX, Wu XH, et al. Antidepressive effect of paroxetine in a rat model: upregulating expression of serotonin and norepinephrine transporter[ J ]. *Neuroreport*, 2013, 24(10): 520-525. DOI: 10.1097/WNR.0b013e328362066d.
- [ 7 ] Seo MK, Choi CM, McIntyre RS, et al. Effects of escitalopram and paroxetine on mTORC1 signaling in the rat hippocampus under chronic restraint stress[ J ]. *BMC Neurosci*, 2017, 18(1): 39. DOI: 10.1186/s12868-017-0357-0.
- [ 8 ] 于欢, 薛姗姗, 周翠红, 等. 氟西汀对慢性不可预见应激模型大鼠前额叶皮质磷脂酰乙醇胺的影响[ J ]. *神经疾病与精神卫生*, 2020, 20(8): 548-553. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2020.08.004.
- [ 9 ] Yu H, Xue SS, Zhou CH, et al. Impact of fluoxetine on phosphatidylethanolamine in prefrontal cortex of rats with chronic unpredictable stress[ J ]. *Journal of Neuroscience and Mental Health*, 2020, 20(8): 548-553.
- [ 10 ] Muallem S, Chung W, Jha A, et al. Lipids at membrane contact sites: cell signaling and ion transport[ J ]. *EMBO Rep*, 2017, 18(11): 1893-1904. DOI: 10.15252/embr.201744331.
- [ 11 ] Nadler A, Yushchenko DA, Muller R, et al. Exclusive photorelease of signalling lipids at the plasma membrane[ J ]. *Nat Commun*, 2015, 6: 10056. DOI: 10.1038/ncomms10056.
- [ 12 ] Kurz J, Parnham MJ, Geisslinger G, et al. Ceramides as novel disease biomarkers[ J ]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(1): 20-32. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.10.009.
- [ 13 ] Brunkhorst-Kanaan N, Klatt-Schreiner K, Hackel J, et al. Targeted lipidomics reveal derangement of ceramides in major depression and bipolar disorder[ J ]. *Metabolism*, 2019, 95: 65-76. DOI: 10.1016/j.metabol.2019.04.002.
- [ 14 ] Kornhuber J, Medlin A, Bleich S, et al. High activity of acid sphingomyelinase in major depression[ J ]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2005, 112(11): 1583-1590. DOI: 10.1007/s00702-005-0374-5.
- [ 15 ] Kolzer M, Werth N, Sandhoff K. Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine[ J ]. *FEBS Lett*, 2004, 559(1/3): 96-98. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00033-X.
- [ 16 ] Jaddoa E, Masania J, Masiero E, et al. Effect of antidepressant drugs on the brain sphingolipid system[ J ]. *J Psychopharmacol*, 2020, 34(7): 716-725. DOI: 10.1177/0269881120915412.
- [ 17 ] Gulbins E, Palmada M, Reichel M, et al. Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs[ J ]. *Nat Med*, 2013, 19(7): 934-938. DOI: 10.1038/nm.3214.
- [ 18 ] Duman RS, Aghajanian GK. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets[ J ]. *Science*, 2012, 338(6103): 68-72. DOI: 10.1126/science.1222939.
- [ 19 ] Koenigs M, Grafman J. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex[ J ]. *Behav Brain Res*, 2009, 201(2): 239-243. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.03.004.
- [ 20 ] Tsujii N, Mikawa W, Tsujimoto E, et al. Relationship between prefrontal hemodynamic responses and quality of life differs between melancholia and non-melancholic depression[ J ]. *Psychiatry Res Neuroimaging*, 2016, 253: 26-35. DOI: 10.1016/j.pscychresns.2016.04.015.
- [ 21 ] Disner SG, Beevers CG, Haigh EA, et al. Neural mechanisms of the cognitive model of depression[ J ]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(8): 467-477. DOI: 10.1038/nrn3027.
- [ 22 ] Treadway MT, Waskom ML, Dillon DG, et al. Illness progression, recent stress, and morphometry of hippocampal subfields and medial prefrontal cortex in major depression[ J ]. *Biol Psychiatry*, 2015, 77(3): 285-294. DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.06.018.
- [ 23 ] Xue SS, Zhou CH, Xue F, et al. The impact of repetitive transcranial magnetic stimulation and fluoxetine on the brain lipidome in a rat model of chronic unpredictable stress[ J ]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2020, 102: 109946. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2020.109946.

(收稿日期: 2021-01-20)

(本文编辑: 赵金鑫)