

· 学术交流 ·

文拉法辛对小鼠抑郁样行为及前额叶皮层中髓鞘损伤和Nrg1 III -ErbB2表达的影响

张甜 马欣旭 薛珊珊 石青青 彭正午 王化宁

710069 西安,西北大学生命科学学院(张甜); 710032 西安,空军军医大学第一附属医院心身科(张甜、马欣旭、薛珊珊、石青青、彭正午、王化宁)

通信作者:王化宁, Email: 13609161341@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2023.02.007

【摘要】目的 探讨文拉法辛对双环己酮草酰二胺(CPZ)所致的小鼠抑郁样行为及前额叶皮层(PFC)中环腺苷酸-磷酸二酯酶(CNPase)、髓鞘碱性蛋白(MBP)以及Nrg1 III -ErbB2表达的影响。**方法** 将32只8周龄C57BL/6雄性小鼠随机分为对照组、文拉法辛组、CPZ组和文拉法辛+CPZ组。CPZ组和CPZ+文拉法辛组均饲喂含0.2%的CPZ饲料5周以构建CPZ模型,文拉法辛组及文拉法辛+CPZ组经由灌胃接受20 mg/(kg·d)的文拉法辛治疗5周,对照组和CPZ组在同一时间段每天灌胃生理盐水200 μ l。5周干预结束后进行旷场实验、糖水偏好实验、悬尾实验,随后立即处死每组的5只小鼠,收集PFC组织于液氮中,采用Western blot法检测PFC中的CNPase、MBP表达变化,采用反转录-聚合酶链反应检测Nrg1 III -ErbB2 mRNA信号的表达水平。每组剩余3只小鼠灌注多聚甲醛固定液后通过免疫荧光染色CNPase观察少突胶质细胞的数量变化。**结果** CPZ组小鼠的旷场运动总距离和中心运动距离比低于对照组[(12.50 \pm 4.73)m比(25.63 \pm 5.64)m、(5.92 \pm 1.98)%比(11.78 \pm 4.17)%],悬尾不动时间长于对照组[(153.75 \pm 26.4)s比(71.62 \pm 20.95)s],糖水偏好指数低于对照组[(79.16 \pm 6.53)%比(92.67 \pm 2.97)%],PFC中的CNPase和MBP蛋白表达低于对照组[(0.56 \pm 0.08)比(0.85 \pm 0.13)、(0.37 \pm 0.05)比(1.01 \pm 0.08)],Nrg1 III 和ErbB2的mRNA表达低于对照组[(1.06 \pm 0.16)比(0.38 \pm 0.27)、(1.01 \pm 0.01)比(0.42 \pm 0.41)],差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。CPZ+文拉法辛组小鼠的旷场运动总距离和中心运动距离比高于CPZ组[(22.64 \pm 6.59)m比(12.50 \pm 4.73)m、(10.6 \pm 2.85)%比(5.92 \pm 1.98)%],悬尾不动时间少于CPZ组[(109.25 \pm 35.69)s比(153.75 \pm 26.4)s],糖水偏好指数高于CPZ组[(91.63 \pm 2.98)%比(79.16 \pm 6.53)%],PFC中的CNPase和MBP蛋白表达高于CPZ组[(0.84 \pm 0.09)比(0.56 \pm 0.08)、(0.71 \pm 0.13)比(0.37 \pm 0.05)],Nrg1 III 和ErbB2的mRNA表达高于CPZ组[(0.70 \pm 0.33)比(0.38 \pm 0.27)、(0.80 \pm 0.25)比(0.42 \pm 0.41)],差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。CNPase免疫荧光染色结果显示,CPZ组小鼠PFC中的CNPase少突胶质细胞少于对照组和CPZ+文拉法辛组。**结论** 文拉法辛能够上调CPZ小鼠PFC中的CNPase、MBP蛋白表达水平以及Nrg1 III 和ErbB2的mRNA表达水平,增加少突胶质细胞数量,缓解其抑郁样行为。

【关键词】 文拉法辛; 前额叶皮层; 髓鞘损伤; 抑郁样行为; 小鼠**基金项目:** 国家自然科学基金(81974215)

Effects of venlafaxine on depression-like behavior and myelin damage and expression of Nrg1 III -ErbB2 of prefrontal cortex in cuprizone-treated mice Zhang Tian, Ma Xinxu, Xue Shanshan, Shi Qingqing, Peng Zhengwu, Wang Huaning

The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China (Zhang T); Department of Psychosology, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China (Zhang T, Ma XX, Xue SS, Shi QQ, Peng ZW, Wang HN)

Corresponding author: Wang Huaning, Email: 13609161341@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of venlafaxine on the depression-like behavior, and the expression of CNPase, MBP and Nrg1 III -ErbB2 expression in prefrontal cortex (PFC) of cuprizone (CPZ)

treated mice. **Methods** A total of 32 C57BL/6 male mice aged 8-weeks were randomly divided into control group, venlafaxine (Ven) group, model (CPZ) group and CPZ+Ven group. Mice in CPZ and CPZ+Ven groups were fed with diet containing 0.2% CPZ for 5 weeks to establish CPZ model. Ven and CPZ+Ven groups received 20 mg/(kg·d) venlafaxine by gavage for 5 weeks. Control group and CPZ group were gavaged with 200 μ l saline every day during the same time period. Open field experiment, sugar-water preference experiment and tail suspension experiment were carried out after 5-week intervention, and then 5 mice in each group were killed immediately. PFC was collected in liquid nitrogen. The protein levels of CNPase and MBP in PFC were detected by Western blot, and the level of Nrg1 III -ErbB2 mRNA was detected by RT-PCR. The remaining mice ($n=3$) were perfused and fixed with 4% PFA, and then the morphological changes of oligodendrocytes were observed by immunofluorescence staining for CNPase. **Results** The total distance traveled in open field and distance of central movement of CPZ group were shorter than those of the control group [(12.50 \pm 4.73) m vs (25.63 \pm 5.64) m, (5.92 \pm 1.98) % vs (11.78 \pm 4.17) %]. The immobility time of suspended tail test was longer than that of the control group [(153.75 \pm 26.4) s vs (71.62 \pm 20.95) s]. Sugar preference index was lower than that of the control group [(79.16 \pm 6.53) % vs (92.67 \pm 2.97) %]. The protein expression levels of CNPase and MBP in PFC were lower than those of the control group [(0.56 \pm 0.08) vs (0.85 \pm 0.13), (0.37 \pm 0.05) vs (1.01 \pm 0.08)]. The mRNA levels of Nrg1 III and ErbB2 were lower than those of the control group [(0.38 \pm 0.27) vs (1.06 \pm 0.16), (0.42 \pm 0.41) vs (1.01 \pm 0.01)]. The differences of all the above were statistically significant ($P < 0.05$). The total distance traveled in open field and distance of central movement of CPZ+Ven group were longer than those of the CPZ group [(22.64 \pm 6.59) m vs (12.50 \pm 4.73) m, (10.6 \pm 2.85) % vs (5.92 \pm 1.98) %]. The immobility time of suspended tail test was longer than that of the CPZ group [(109.25 \pm 35.69) s vs (153.75 \pm 26.4) s]. Sugar preference index was lower than that of the CPZ group [(91.63 \pm 2.98) % vs (79.16 \pm 6.53) %]. The protein expression levels of CNPase and MBP in PFC were lower than those of the CPZ group [(0.84 \pm 0.09) vs (0.56 \pm 0.08), (0.71 \pm 0.13) vs (0.37 \pm 0.05)]. The mRNA levels of Nrg1 III and ErbB2 were lower than those of the CPZ group [(0.70 \pm 0.33) vs (0.38 \pm 0.27), (0.80 \pm 0.25) vs (0.42 \pm 0.41)]. The differences of all the above were statistically significant ($P < 0.05$). CNPase immunofluorescence staining showed that there were fewer CNPase oligodendrocytes in the PFC of mice in the CPZ group than in the control group and the CPZ+Ven group. **Conclusions** Venlafaxine can up-regulate the levels of CNPase and MBP protein and the mRNA levels of Nrg1 III and ErbB2 in the PFC of CPZ mice, increase the number of oligodendrocytes, and alleviate depression-like behaviors.

【Key words】 Venlafaxine; Prefrontal cortex; Myelin damage; Depression-like behavior; Mice

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81974215)

重度抑郁症(major depressive disorder, MDD)是常见的重性精神疾病之一,主要以情绪低落和快感缺乏为基本症状,严重影响患者及其家属的生活质量^[1-2]。目前, MDD 的治疗以药物为主,文拉法辛是常用的 5-HT 和去甲肾上腺素再摄取抑制剂,是临床中抗抑郁、焦虑障碍的重要药物^[3-4]。相关研究显示,文拉法辛能够改善小鼠抑郁样行为,缓解髓鞘脱失现象^[5]。文拉法辛的抗抑郁作用在临床和动物模型中均已得到证实,但其保护髓鞘的具体机制仍待探索。MDD 病理特征存在脑部髓鞘缺失和神经信号改变,因此缓解髓鞘或调节神经信号成为治疗 MDD 的对应策略^[6-7]。神经调节蛋白(neuregulin, NRG)是重要的神经调节信号, NRGs 能活化膜相关的 ErbB2, 促进少突胶质细胞再生和髓鞘修复^[8-9]。研究表明,抗抑郁药物通过修复内侧前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)的损伤恢复正常的大脑功能^[10]。因此,文拉法辛可能通过 PFC 中的 Nrg1 III -ErbB2 通路影响少突胶质细胞和髓鞘,发挥抗抑郁作用。本研究通过在小鼠饮食中添加 0.2%

双环己酮草酰二胺(cuprizone, CPZ)的方式构建抑郁症模型,分析文拉法辛对该模型小鼠抑郁样行为、PFC 中髓鞘损伤、Nrg1 III -ErbB2 通路的影响,探索文拉法辛治疗抑郁症的分子生物学机制。

一、材料与方法

1. 实验材料: 成年雄性 C57BL/6(体重 18 ~ 22 g) 小鼠 32 只, 8 周龄, 购自空军军医大学动物实验中心, 饲养在 12 h/12 h 明暗循环、温度为 (22.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 的动物设施中, 自由进食和饮水。本研究已获得空军军医大学实验动物中心福利与伦理委员会审核批准(动物伦理号: 20220516), 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。

2. 实验分组及干预方法: 小鼠适应环境 1 周后, 随机将小鼠分为对照组、CPZ 组、文拉法辛组和 CPZ+ 文拉法辛组。对 CPZ 组和 CPZ+ 文拉法辛组小鼠饲喂含 0.2% CPZ 饲料 5 周以构建抑郁症模型, 同时将文拉法辛(辉瑞公司, 加拿大)溶解在生理盐水中, 文拉法辛组和 CPZ+ 文拉法辛组每天早晨 9 : 00 经灌胃接受 20 mg/(kg·d) 的文拉法辛治疗 5 周^[5],

对照组和CPZ组其他条件不变接受生理盐水灌胃 200 μ l。每间隔2 d测量1次体重,最后一次灌胃24 h后进行行为测试以评估4组小鼠抑郁样行为并检测PFC中分子表达。

3. 抑郁症模型构建:以0.2%(w/w)的终浓度混合CPZ(Sigma-Aldrich, 美国),将其加入研磨后的啮齿动物实验室饮食饲料中。小鼠正常饮食5周后大脑多处出现脱髓鞘现象,表明该模型能够造成小鼠脑部髓鞘缺失,且该模型较为成熟和稳定^[11-12]。

4. 行为测试实验:(1)旷场实验。将100 cm \times 100 cm \times 40 cm的敞箱分为4个50 cm \times 50 cm \times 40 cm的小敞箱,调整白色底板以适用于黑色小鼠。清洁敞箱后,提起小鼠尾根部1/3处,将其放入敞箱正中央,使其自由活动5 min,同时摄像和计时^[13]。使用TOP-SCAN跟踪系统软件对实验数据进行量化,观察小鼠的运动总距离和中心运动距离比,以评价小鼠自发运动能力和探索能力。(2)糖水偏好实验。对小鼠进行1%蔗糖水适应性训练48 h,首先让小鼠适应2瓶1%蔗糖溶液24 h,随后将其中1瓶1%蔗糖溶液更换为纯水继续适应24 h。适应性训练结束后禁食禁水24 h。正式实验开始后,将所有小鼠单独置于鼠笼中,给予每只小鼠1瓶1%蔗糖溶液,1瓶纯水;测试时间的中点交换水瓶的位置。1 h后称量糖水和纯水的消耗量,计算糖水偏好指数,计算公式为糖水偏好指数=(蔗糖摄入量/总摄入量) \times 100%^[13]。(3)悬尾实验。小鼠适应环境后,用胶带固定住小鼠尾巴,悬挂于测试架上(距离地面40 cm)。使用EV录屏软件录像追踪小鼠活动6 min,实验结束后动物归笼,轻柔地取下胶带避免小鼠感到疼痛^[14]。采用Top Scan行为学分析软件分析后5 min的小鼠不动时间。正式开始所有行为学实验前,均将小鼠提前放入实验环境适应30 min。

5. 组织学和免疫荧光染色:在最后一次行为测试24 h后,每组取5只小鼠腹腔注射200 μ l三溴乙醇麻醉,取出小鼠大脑并用磷酸缓冲盐溶液冲洗,随后在解剖显微镜下分离出PFC组织^[15]。PFC样品储存于液氮中,后续用于提取蛋白质和RNA。每组余下3只小鼠在三溴乙醇麻醉后,用生理盐水向心脏内灌注20 ml,再灌注4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定液20 ml。等待30 min后取出大脑浸泡于4% PFA固定4 h,随后进行20%、25%蔗糖梯度脱水。脱水完成后进行冰冻切片(LeicaCM1900-V5),切片厚度为14 μ m。环腺苷酸-磷酸二酯酶(CNPase)免疫荧光染色观察少突胶

质细胞,将脑切片先用磷酸缓冲盐溶液润洗,然后室温下在1%牛血清白蛋白溶液中孵育2 h;随后将切片与山羊抗鼠CNPase 抗体(MAB326R, 1:500, Millipore, 美国)一起孵育4 $^{\circ}$ C过夜,之后在室温下与抗鼠荧光二抗(A21202, 1:2 000, Invotrogen, 美国)孵育2 h。彻底洗净后滴加抗荧光淬灭剂进行封片,在荧光显微镜下采集图片并进行数据分析。

6. Western blot检测:收集各组小鼠PFC组织于裂解缓冲液中进行匀浆裂解并提取蛋白,随后使用牛血清白蛋白蛋白质定量试剂盒测定各组样品的蛋白质浓度。每个样本蛋白上样量20 μ g,分别于5%浓缩胶(80 V, 20 min)及10%分离胶(120 V, 45 min)进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,后转至硝酸纤维素膜上,1 A半干电转19 min;5%脱脂奶粉液封闭2 h后,将膜分别与以下一抗孵育过夜(4 $^{\circ}$ C, 12 h),包括髓鞘碱性蛋白(MBP)(MAB386, 1:500, Millipore, 美国)、CNPase抗体(MAB326R, 1:3000, Millipore, 美国)和 β -actin antibodies(ab8227, 1:5 000, Abcam, 英国)。次日, TBST漂洗3次,每次10 min。随后孵育一抗相对应的二抗,室温孵育2 h,包括山羊抗兔IgG(orb229657, 1:10 000, biorbyt, 英国)、山羊抗大鼠IgG(SA00001-15, 1:10 000, Proteintech, 英国)。最后使用Super Signal West Pico化学发光液(34077, Thermo Fisher Scientific, Inc, 美国)显示目的蛋白条带并采用Bio-Rad QuantityOne1-D软件(1709600; Bio-Rad Laboratories, Inc, 美国)分析表达情况。

7. 反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测:采用Trizol试剂盒(DP419, TIANGEN BIOTECH)提取各组小鼠PFC组织中的总RNA并进行逆转录(KR116),随后进行实时定量PCR(FP205)反应,检测Nrg1 III、ErbB2基因以及内参基因3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的mRNA表达情况。RT-PCR引物由艾科瑞AG公司合成,各引物的序列见表1。根据标准曲线将各样品测得的Ct值换算成拷贝数,随后分析各检测样本中目的基因拷贝数相对于阳性定量参考样品的基因拷贝数,采用amount of target= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析。

8. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计学软件进行分析,Western blot检测结果用Image J和GraphPad Prism 8.0软件进行处理。计数资料采用频数表示。采用W检验法对计量资料进行正态性检验,符合正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

表1 反转录-聚合酶链反应引物序列

基因	正向引物	反向引物
Nrg1	5'-CTGGGACCAGCCATCTCATA-3'	5'-AAGCACTCGCCTCCATTCA-3'
ErbB2	5'-CTCATTACCGCAACACCC-3'	5'-CCAAGCCTCAAGACCACAT-3'
GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	5'-TGCTGAAGACGCCACTGGA-3'

组内前后比较采用配对 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 4组小鼠实验前后体重比较: 对照组与文拉法辛组小鼠实验后的体重高于实验前, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而 CPZ 组和 CPZ+ 文拉法辛组小鼠实验后的体重与实验前比较, 差异无统计意义 ($P > 0.05$), 证明 CPZ 造模成功^[16], 见表 2。

表2 4组小鼠实验前后的体重比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	实验前	实验后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	8	21.60 ± 0.56	24.30 ± 0.88	8.541	0.001
文拉法辛组	8	21.00 ± 1.08	23.60 ± 2.11	6.471	<0.001
CPZ 组	8	21.50 ± 1.28	21.20 ± 2.33	0.571	0.583
CPZ+ 文拉法辛组	8	22.10 ± 0.76	21.50 ± 2.24	0.701	0.507
<i>F</i> 值		0.592	3.557		
<i>P</i> 值		0.705	0.008		

注: CPZ 双环己酮草酰二胺

2. 4组小鼠行为学实验结果比较: CPZ 造模 5 周后, CPZ 组小鼠在旷场中的运动总距离短于对照组和 CPZ+ 文拉法辛组, 中心运动距离比低于对照组和 CPZ+ 文拉法辛组, 悬尾不动时间长于对照组和 CPZ+ 文拉法辛组, 糖水偏好指数低于对照组和 CPZ+ 文拉法辛组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。文拉法辛组小鼠在旷场中的运动总距离、中心运动距离、糖水偏好指数以及悬尾不动时间与对照组比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。见表 3。

3. 4组小鼠 PFC 中 CNPase、MBP 表达水平比较:

CNPase 免疫荧光染色结果显示, CPZ 组小鼠 PFC 中的 CNPase 少突胶质细胞数量少于对照组; CPZ+ 文拉法辛组的 CNPase 少突胶质细胞数量多于 CPZ 组, 能够恢复至对照组水平, 且单独的药物治疗不会对 PFC 中的 CNPase 表达产生影响, 见图 1。Western blot 检测结果显示, CPZ 组 PFC 中的 CNPase 和 MBP 表达含量低于对照组和 CPZ+ 文拉法辛组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4、图 2。

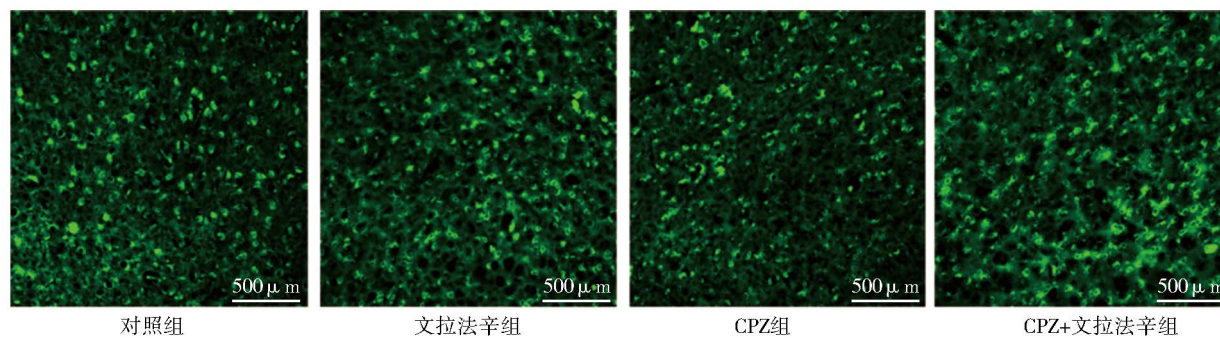
4. 4组小鼠 PFC 中 Nrg1 III、ErbB2 的 mRNA 表达水平比较: CPZ 组小鼠 PFC 中的 Nrg1 III 及其受体 ErbB2 mRNA 的表达低于对照组和 CPZ+ 文拉法辛组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 5。

讨论 文拉法辛在既往研究中均发挥出良好的抗抑郁效果。相关实验发现, 一定剂量的文拉法辛对抑郁症状有着较为可靠的疗效, 10 mg/(kg·d) 的文拉法辛治疗能够逆转慢性不可预见性温和应激诱导的体重、运动活性和蔗糖消耗量下降, 改善抑郁样行为^[17]。给予小鼠 5、20 mg/(kg·d) 2 种剂量的文拉法辛均能减少小鼠的强迫游泳不动时间以及 Y 迷宫中进入手臂的次数^[5]。相关研究表明, 文拉法辛处理后的小鼠表现出更长的游泳时间, 也增加了小鼠在旷场实验中的探索距离^[18]。皮层是情绪调控的重要部位之一, 皮层损伤则会引起严重的情绪障碍, 抗抑郁药物可以通过修复内侧 PFC 的损伤恢复正常的大脑功能^[19]。既往研究显示, 降低 PFC 抑制系统的过度活跃能够发挥抗抑郁作用^[20]。基础研究也显示, 文拉法辛对皮层的结构和功能有着调节作用, 能够激活内侧 PFC 中的 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体 (AMPA), 增加大鼠的糖水

表3 4组小鼠干预5周后行为测试实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	运动总距离(m)	中心运动距离比(%)	糖水偏好指数(%)	悬尾不动时间(s)
对照组	8	25.63 ± 5.64	11.78 ± 4.17	92.67 ± 2.97	71.62 ± 20.95
文拉法辛组	8	18.14 ± 4.00	8.27 ± 2.61	90.95 ± 7.50	94.75 ± 16.52
CPZ 组	8	12.50 ± 4.73 ^a	5.92 ± 1.98 ^a	79.16 ± 6.53 ^a	153.75 ± 26.40 ^a
CPZ+ 文拉法辛组	8	22.64 ± 6.59 ^b	10.60 ± 2.85 ^b	91.63 ± 2.98 ^b	109.25 ± 35.69 ^b
<i>F</i> 值		8.046	5.196	9.640	12.496
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: CPZ 双环己酮草酰二胺; ^a与对照组比较, $P < 0.01$; ^b与 CPZ 组比较, $P < 0.05$



注: PFC 前额叶皮层; CNPase 环腺苷酸-磷酸二酯酶; CPZ 双环己酮草酰二胺

图1 4组小鼠PFC中CNPase少突胶质细胞数量(×20倍)

表4 4组小鼠PFC中的CNPase、MBP蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

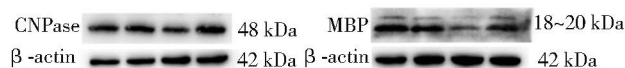
组别	只数	CNPase	MBP
对照组	5	0.85 ± 0.13	1.01 ± 0.08
文拉法辛组	5	0.84 ± 0.15	1.00 ± 0.03
CPZ组	5	0.56 ± 0.08 ^a	0.37 ± 0.05 ^a
CPZ+文拉法辛组	5	0.84 ± 0.09 ^b	0.71 ± 0.13 ^b
F值		2.606	25.040
P值		0.124	< 0.001

注: PFC 前额叶皮层; CPZ 双环己酮草酰二胺; CNPase 环腺苷酸-磷酸二酯酶; MBP 髓鞘碱性蛋白; ^a与对照组比较, $P < 0.05$; ^b与CPZ组比较, $P < 0.05$

表5 4组小鼠PFC中Nrg1 III、ErbB2的mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	相对Nrg1 III mRNA水平	相对ErbB2 mRNA水平
对照组	5	1.06 ± 0.16	1.01 ± 0.01
文拉法辛组	5	0.89 ± 0.15	1.05 ± 0.20
CPZ组	5	0.38 ± 0.27 ^a	0.42 ± 0.41 ^a
CPZ+文拉法辛组	5	0.70 ± 0.33 ^b	0.80 ± 0.25 ^b
F值		50.510	29.820
P值		< 0.001	< 0.001

注: CPZ 双环己酮草酰二胺; ^a与对照组比较, $P < 0.01$; ^b与CPZ组比较, $P < 0.05$



注: 从左到右分别为对照组、文拉法辛组、CPZ组、CPZ+文拉法辛组的CNPase、MBP蛋白条带; PFC 前额叶皮层; CNPase 环腺苷酸-磷酸二酯酶; MBP 髓鞘碱性蛋白

图2 4组小鼠PFC中的CNPase、MBP蛋白印迹图

摄入量,减少强迫游泳不动时间等抑郁样行为^[21]。因此,文拉法辛能够通过PFC发挥抗抑郁效果,但其具体作用机制尚不明确。

CPZ是一种铜离子螯合剂,能够特异性地作用于中枢神经系统的少突胶质细胞并导致其死亡^[22],引起胼胝体、皮层和海马体等部位广泛脱髓鞘并表现出明显的情绪障碍。因此,制作的抑郁症模型主要从脱髓鞘和抑郁样行为对MDD进行模拟,且制作过程较简单,稳定性高,可以作为研究MDD的理想模型之一^[23-24]。一方面,CPZ可以引发中枢神经系统中少突胶质细胞丢失和髓鞘脱失^[25],这类似于神经影像学检测到的MDD患者大脑的白质异常。同时,经CPZ处理的小鼠出现了自主意识降低、空间探索能力下降等抑郁样行为^[26]。另一方面,临床用于治疗MDD的药物可以改善CPZ诱导的髓鞘损伤和行

为缺陷^[27]。本研究以CPZ脱髓鞘小鼠为模型,发现20 mg/(kg·d)的文拉法辛治疗增加了小鼠在旷场实验中的运动总距离、中心运动距离比及糖水偏好指数,并使悬尾不动时间减少。这一结果与既往研究中文拉法辛改善小鼠抑郁样行为结果相似,进一步证实文拉法辛可以有效缓解小鼠的抑郁样行为。

髓鞘主要是由少突胶质细胞包绕在神经元轴突外面的一层髓磷脂膜结构形成,在神经传导中起着关键作用^[28]。髓鞘的结构组成成分之一是MBP,CNPase则是少突胶质细胞的标志物,两者都与少突胶质细胞生成密切相关;而MDD患者的PFC等部位在发生神经元密度下降的同时少突胶质细胞数目降低,MBP含量在背外侧前额叶深部降低^[29]。因此,MDD患者临床表现与其髓鞘损伤密切相关^[30]。Zhang等^[5]的研究表明,免疫组化MBP染色结果显示CPZ小鼠PFC中的MBP蛋白表达下降,证明了CPZ小鼠中出现明显的髓鞘损伤。本研究结果显示,CPZ组小鼠PFC中的CNPase少突胶质细胞数量少于对照组和CPZ+文拉法辛组。分子水平检测则进一步验证PFC中CNPase及其构成的MBP水平变化,

结果显示少突胶质细胞变化与髓鞘保持一致,即文拉法辛能够部分扭转CPZ模型带来的髓鞘损伤以及少突胶质细胞数量减少,这与先前的研究结果相似。

脱髓鞘疾病的特征一方面是轴突继发性损伤的扩展,另一方面是快速髓鞘再生的能力受限。其中与髓鞘再生形成密切相关的是一些神经元性的信号分子如离子、神经递质等^[31],其能够促进少突胶质细胞的增殖及分化。在控制少突胶质细胞增殖分化的分子机制中,神经调节蛋白Nrg1是重要的调节因素,其活化膜相关的ErbB2受体酪氨酸激酶与少突胶质细胞分化密切相关,ErbB2敲除后少突胶质细胞不能进行终末分化和髓鞘化,从而进一步影响髓鞘构成^[31-32]。因此,本研究检测了Nrg1 III -ErbB2通路分子在PFC中的mRNA表达,结果显示,CPZ组小鼠PFC中的Nrg1 III和其受体ErbB2 mRNA表达低于对照组和CPZ+文拉法辛组;且Nrg1 III -ErbB2通路分子变化与少突胶质细胞变化保持高度一致,强烈提示Nrg1 III和ErbB2信号分子是文拉法辛发挥抗抑郁作用的关键机制之一。但文拉法辛如何通过Nrg1 III -ErbB2发挥抗抑郁作用需要后续持续深入研究。

本研究结果表明,文拉法辛能够缓解小鼠抑郁样行为以及改善抑郁症模型导致的髓鞘相关分子表达降低以及少突胶质细胞减少。但本研究将作用部位聚焦于PFC,强调了PFC是文拉法辛药物发挥抗抑郁作用的重要部位。本研究结果显示,与髓鞘再生密切相关的Nrg1 III -ErbB2通路的mRNA表达水平发生相应变化,表明文拉法辛可能通过Nrg1 III -ErbB2通路避免少突胶质细胞减少和髓鞘损伤,进而发挥抗抑郁作用。但仅用Nrg1 III -ErbB2通路的mRNA表达水平变化这一数据说服力较弱,此为本文研究的不足之一,后续需要围绕Nrg1 III -ErbB2通路深入研究文拉法辛的抗抑郁机制。

综上所述,文拉法辛能够缓解小鼠PFC中的髓鞘和少突胶质细胞的损失,改善小鼠抑郁样行为,并且能够上调PFC中神经调节信号通路Nrg1 III -ErbB2的表达,表明文拉法辛可通过Nrg1 III -ErbB2通路缓解少突胶质细胞减少和髓鞘损伤,进而发挥抗抑郁作用。

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 实验操作与数据解释为张甜,数据收集与整理为马欣旭,实验指导与论文撰写为薛姗姗、石青青,实验构思与论文修订为彭正午,王化宁审校

参 考 文 献

- [1] 黄良峰,陈洋洋,赵炳功,等.抑郁症的成因及其新药治疗研究进展[J].现代生物医学进展,2018,18(1):180-185. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.039.
Huang LF, Chen YY, Zhao BG, et al. Research progress on the causes of depression and for its new drug treatments[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2018, 18(1): 180-185.
- [2] GBD 2015 Maternal Mortality Collaborators. Global, regional, and national levels of maternal mortality, 1990—2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. Lancet, 2016, 388(10053): 1775-1812. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31470-2.
- [3] Arakawa R, Stenkrona P, Takano A, et al. Venlafaxine ER blocks the norepinephrine transporter in the brain of patients with major depressive disorder: a PET study using [¹⁸F]FMeNER-D2 [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2019, 22(4): 278-285. DOI: 10.1093/ijnp/pyz003.
- [4] Gibbons RD, Brown CH, Hur K, et al. Suicidal thoughts and behavior with antidepressant treatment: reanalysis of the randomized placebo-controlled studies of fluoxetine and venlafaxine[J]. Arch Gen Psychiatry, 2012, 69(6): 580-587. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.2048.
- [5] Zhang Y, Bi X, Adebisi O, et al. Venlafaxine improves the cognitive impairment and depression-like behaviors in a cuprizone mouse model by alleviating demyelination and neuroinflammation in the brain[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 332. DOI: 10.3389/fphar.2019.00332.
- [6] Morris G, Reiche E, Murru A, et al. Multiple immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress pathways explain the frequent presence of depression in multiple sclerosis[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(8): 6282-6306. DOI: 10.1007/s12035-017-0843-5.
- [7] Serafini G, Pompili M, Borgwardt S, et al. The role of white matter abnormalities in treatment-resistant depression: a systematic review[J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(10): 1337-1346. DOI: 10.2174/1381612820666140929094531.
- [8] Prasad A, Teh D, Blasiak A, et al. Static magnetic field stimulation enhances oligodendrocyte differentiation and secretion of neurotrophic factors[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6743. DOI: 10.1038/s41598-017-06331-8.
- [9] Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, et al. Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair[J]. Front Cell Dev Biol, 2016, 4: 71. DOI: 10.3389/fcell.2016.00071.
- [10] Papp M, Gruca P, Lason M, et al. Insufficiency of ventral hippocampus to medial prefrontal cortex transmission explains antidepressant non-response[J]. J Psychopharmacol, 2021, 35(10): 1253-1264. DOI: 10.1177/02698811211048281.
- [11] Vega-Riquer JM, Mendez-Victoriano G, Morales-Luckie RA, et al. Five decades of cuprizone, an updated model to replicate demyelinating diseases[J]. Curr Neuropharmacol, 2019, 17(2): 129-141. DOI: 10.2174/1570159X15666170717120343.
- [12] Zhou C, Cai M, Wang Y, et al. The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on cognitive impairment and the brain lipidome in a cuprizone-induced mouse model of demyelination[J]. Front Neurosci, 2021, 15: 706786. DOI: 10.3389/fnins.2021.706786.

- [13] 薛姗姗,周翠红,于欢,等.氟西汀对CUS大鼠抑郁样行为及海马内源性大麻素相关基因表达的调节作用[J].现代生物医学进展,2020,20(7):1224-1229,1252. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.005.
Xue SS, Zhou CH, Yu H, et al. The influence of fluoxetine on the depressive-like behavior and the expression of endocannabinoid-related genes in the hippocampus of CUS rats[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2020, 20(7): 1224-1229, 1252.
- [14] Locci A, Pinna G. Stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α by N-palmitoylethanolamine engages allopregnanolone biosynthesis to modulate emotional behavior[J]. Biol Psychiatry, 2019, 85(12): 1036-1045. DOI: 10.1016/j.biopsych.2019.02.006.
- [15] 李莉,华再东,任红艳,等.三溴乙醇对小鼠麻醉效果的研究[J].湖北农业科学,2015,54(24):6328-6329. DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2015.24.060.
Li L, Hua ZD, Ren HY, et al. Anesthetic Effects of Tribromoethanol on Mice[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(24): 6328-6329.
- [16] Toomey LM, Papini M, Lins B, et al. Cuprizone feed formulation influences the extent of demyelinating disease pathology[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 22594. DOI: 10.1038/s41598-021-01963-3.
- [17] Wang CH, Gu JY, Zhang XL, et al. Venlafaxine ameliorates the depression-like behaviors and hippocampal S100B expression in a rat depression model[J]. Behav Brain Funct, 2016, 12(1): 34. DOI: 10.1186/s12993-016-0116-x.
- [18] Lapmanee S, Charoenphandhu J, Teerapornpantakit J, et al. Agomelatine, venlafaxine, and running exercise effectively prevent anxiety- and depression-like behaviors and memory impairment in restraint stressed rats[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0187671. DOI: 10.1371/journal.pone.0187671.
- [19] Papp M, Gruca P, Lason M, et al. Insufficiency of ventral hippocampus to medial prefrontal cortex transmission explains antidepressant non-response[J]. J Psychopharmacol, 2021, 35(10): 1253-1264. DOI: 10.1177/02698811211048281.
- [20] Light SN, Heller AS, Johnstone T, et al. Reduced right ventrolateral prefrontal cortex activity while inhibiting positive affect is associated with improvement in hedonic capacity after 8 weeks of antidepressant treatment in major depressive disorder[J]. Biol Psychiatry, 2011, 70(10): 962-968. DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.06.031.
- [21] Papp M, Gruca P, Lason M, et al. AMPA receptors mediate the pro-cognitive effects of electrical and optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex in antidepressant non-responsive Wistar-Kyoto rats[J]. J Psychopharmacol, 2020, 34(12): 1418-1430. DOI: 10.1177/0269881120967857.
- [22] Zhen W, Liu A, Lu J, et al. An alternative cuprizone-induced demyelination and remyelination mouse model[J]. ASN Neuro, 2017, 9(4): 1759091417725174. DOI: 10.1177/1759091417725174.
- [23] Tobin JE, Xie M, Le TQ, et al. Reduced axonopathy and enhanced remyelination after chronic demyelination in fibroblast growth factor 2 (Fgf2)-null mice: differential detection with diffusion tensor imaging[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2011, 70(2): 157-165. DOI: 10.1097/NEN.0b013e31820937e4.
- [24] Zhan J, Mann T, Joost S, et al. The cuprizone model: dos and do nots[J]. Cells, 2020, 9: 2073-4409. DOI: 10.3390/cells9040843.
- [25] Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, et al. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned[J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 73. DOI: 10.3389/fncel.2014.00073.
- [26] Sun Z, Jiang T, Wu Y, et al. Low field magnetic stimulation ameliorates schizophrenia-like behavior and up-regulates neuregulin-1 expression in a mouse model of cuprizone-induced demyelination[J]. Front Psychiatry, 2018, 9: 675. DOI: 10.3389/fpsy.2018.00675.
- [27] Mihai DP, Ungurianu A, Ciotu CI, et al. Effects of venlafaxine, risperidone and februxostat on cuprizone-induced demyelination, behavioral deficits and oxidative stress[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 7183. DOI: 10.3390/ijms22137183.
- [28] Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: myelination and axonal support[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 8(1): a020479. DOI: 10.1101/cshperspect.a020479.
- [29] Zhou B, Zhu Z, Ransom BR, et al. Oligodendrocyte lineage cells and depression[J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(1): 103-117. DOI: 10.1038/s41380-020-00930-0.
- [30] Bruno A, Dolcetti E, Rizzo FR, et al. Inflammation-associated synaptic alterations as shared threads in depression and multiple sclerosis[J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 169. DOI: 10.3389/fncel.2020.00169.
- [31] Almeida RG, Lyons DA. On myelinated axon plasticity and neuronal circuit formation and function[J]. J Neurosci, 2017, 37(42): 10023-10034. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3185-16.2017.
- [32] Prasad A, Teh D, Blasiak A, et al. Static magnetic field stimulation enhances oligodendrocyte differentiation and secretion of neurotrophic factors[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6743. DOI: 10.1038/s41598-017-06331-8.

(收稿日期: 2022-07-14)

(本文编辑: 赵金鑫)