

NF- κ B/NLRP3 信号通路在急性睡眠剥夺致小鼠焦虑抑郁样行为中的调控作用

潘芸¹, 王洁¹, 张文平², 张英英¹

1. 山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室, 山西 太原 030001; 2. 煤炭环境致病与防治教育部重点实验室

摘要:目的 探讨 NF- κ B/NLRP3 信号通路在急性睡眠剥夺致小鼠焦虑抑郁样行为中的调控作用。方法 选取 48 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠, 随机分为 4 组: 对照组 (CON)、抑制剂组 (lithium chlo-ride, LiCl)、睡眠剥夺组 (sleep deprivation, SD) 和睡眠剥夺 + 抑制剂组 (SD + LiCl), 每组 12 只。采用多平台水环境改良法 (modified multiple platform method, MMPM) 构建小鼠急性睡眠剥夺模型, 利用高架十字迷宫实验、旷场实验、悬尾实验和强迫游泳实验评估小鼠焦虑抑郁样行为学改变, HE 染色观察小鼠海马组织病理学改变, RT-PCR 法检测小鼠核因子 κ B (Nuclear factor kappa B, NF- κ B)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein3, NLRP3) 的 mRNA 表达。结果 与 CON 组相比, SD 组小鼠体重、海马重量、海马脏器系数均显著降低 ($F=0.452, P=0.006; F=6.553, P=0.009; F=1.428, P=0.001$)。在旷场实验中, 与 CON 组相比, LiCl 组进入中心区域次数无统计学差异 ($F=5.084, P=0.744$), SD 组显著减少 ($F=0.028, P=0.017$)。在高架十字迷宫实验中, 与 CON 组相比, LiCl 组进入开放臂时间无统计学意义 ($F=0.09, P=0.113$), SD 组显著减少 ($F=0.085, P=0.011$)。强迫游泳实验结果显示, 与 CON 组相比, LiCl 组小鼠不动时间无统计学差异 ($F=3.422, P=0.260$)。悬尾实验表明, 与 CON 组相比, SD 组悬尾不动时间显著增加 ($F=11.218, P=0.005$)。HE 染色结果显示, 与 CON 组相比, SD 组以及 SD + LiCl 组小鼠海马组织均出现显著病理学改变。RT-PCR 结果表明, 与 CON 组相比, LiCl 组 NF- κ B 和 NLRP3 的 mRNA 表达无统计学差异 ($F=4.629, P=0.147; F=15.555, P=0.107$), 而 SD 组均显著增高 ($F=6.969, P<0.001; F=15.833, P=0.017$)。结论 NF- κ B/NLRP3 通路可能在 SD 致小鼠焦虑抑郁样行为的发生过程中发挥调控作用。

关键词:急性睡眠剥夺; 焦虑样行为; 抑郁样行为; NF- κ B/NLRP3 通路; 氯化锂

中图分类号: R749.72; R749.4 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2024)10-1852-09

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202311003

Effects of NF- κ B/NLRP3 signaling pathway in acute sleep deprivation-induced anxiety- and depression-like behaviors of mice

PAN Yun*, WANG Jie, ZHANG Wen-ping, ZHANG Ying-ying

* Department of epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Abstract: Objective To explore the regulatory role of the NF- κ B/NLRP3 signaling pathway in the anxiety and depressive-like behavior induced by acute sleep deprivation in mice. **Methods** Forty eight C57BL/6J mice aged 8 weeks were randomly divided into four groups: control group (CON), inhibitor group (LiCl), sleep deprivation group (SD), and inhibitor + sleep deprivation group (SD + LiCl), with 12 mice in each group. The model of acute sleep deprivation in mice was established by modified multiple platform method (modified multiple platform method, MMPM), Elevated Plus Maze (EPM), Open Field Test (OFT), Forced Swim Test (FST) and Tail Suspension Test (TST) were used to evaluate the behavior of mice. HE staining was used to observe the pathological changes of hippocampal neurons. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of NF- κ B and NLRP3 in hippocampal tissues. **Results** Compared with the CON group, the body weight, hippocampal weight, and hippocampal organ coefficient of the SD group mice were significantly reduced ($F=0.452, P=0.006; F=6.553, P=0.009; F=1.428, P=0.001$). In OFT, Compared with the CON group, the LiCl group had no significant difference in the number of visits to the center ($F=5.084, P=0.744$), and the SD group significantly decreased ($F=0.028, P=0.017$). In EPM, the time of entering the open arm in the LiCl group was not significantly shorter than that in the CON group ($F=0.09, P=0.113$),

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82103938); 山西省高等学校科技创新项目 (2020L0176); 山西省基础研究计划青年项目 (20210302124038); 校级博士启动基金项目 (XD1916); 深圳市瑞普逊干细胞再生医学研究院科技计划项目 (JCYJ202003010103)

作者简介: 潘芸 (1998—), 女, 硕士在读, 研究方向: 分子流行病学

通信作者: 张英英, E-mail: zhangyingying@sxmu.edu.cn

but the SD group was significantly shorter ($F = 0.085, P = 0.011$). In FST, there was no significant difference in the immobility time between the LiCl group and the CON group ($F = 3.422, P = 0.260$). In TST, compared with the CON group, the immobility time of the suspension tail increased in the SD group ($F = 11.218, P = 0.005$). HE staining results showed, compared with CON group, pathological changes were found in hippocampus of SD group and SD + LiCl group. RT-PCR showed that compared with CON group, the mRNA expression of NF- κ B and NLRP3 in LiCl group were not significantly different ($F = 4.629, P = 0.147, F = 15.555, P = 0.107$). However, the SD group were significantly increased ($F = 6.969, P < 0.001, F = 15.833, P = 0.017$). **Conclusion** NF- κ B/NLRP3 pathway may play a regulatory role in the development of SD-induced anxiety-depression-like behavior in mice.

Keywords: Acute sleep deprivation; Anxiety-like behaviors; Depression-like behaviors; NF- κ B/NLRP3 pathway; Lithium chloride

1 前言

睡眠不足是全球范围内普遍存在的公共卫生问题,被美国疾病控制和预防中心(2015)称作“公共卫生流行病”^[1]。调查显示,美洲、欧洲和亚洲三分之一或更多成年人每天睡眠时间少于公共卫生当局为健康维护建议的每晚 7 小时^[2],并且呈现逐渐年轻化趋势^[3]。睡眠是生命所必需的生理需求,对身体、心理和情绪健康起着根本性的作用^[4]。众多流行病学和实验研究发现,睡眠不足不仅与高血压、心血管疾病、中风、糖尿病和肥胖等疾病显著相关,还会增加抑郁、焦虑等神经系统疾病、炎症性疾病和传染病的风险,并对全因死亡率有贡献^[5]。

急性睡眠剥夺(SD)是指没有睡眠或总睡眠时间减少,通常持续 1~2 天,清醒时间超过典型 16~18 小时^[4]。研究表明,睡眠不足往往伴随有神经炎症的发生,NF- κ B/NLRP3 信号通路发挥关键调控作用。NLRP3 炎症小体是先天免疫反应的关键组成部分^[6],是特征最明确的炎症小体之一^[7],NF- κ B 信号转导参与启动 NLRP3 进行激活,是炎症反应中的关键调控途径^[8]。抑郁患者和抑郁动物模型均发现,NF- κ B/NLRP3 信号通路被激活^[8-10]。在应激性焦虑的啮齿动物模型中,海马和皮质脑区域均有 NLRP3 的激活^[11]。然而,NF- κ B/NLRP3 信号通路在睡眠不足诱发的焦虑抑郁样行为发生过程中的调控作用尚不明确。

锂盐是治疗抑郁-躁狂的重要药物,其神经保护作用受到广泛关注,实验表明锂对多种原因引起神经细胞的凋亡具有保护作用。本文通过构建小鼠急性睡眠剥夺模型,同时利用 LiCl 进行干预,研究急性睡眠剥夺对于小鼠焦虑抑郁样行为的影响,考察 LiCl 对小鼠焦虑抑郁样行为的改善作用,并探讨 NF- κ B/NLRP3 信号通路在上述过程中的调控作用,为解释日益显著的睡眠障碍问题以及干预治疗提供科学依据。

2 材料

2.1 实验动物 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠

48 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号码:SCXK(京)2021-0006],12h/12h 光照黑暗周期的标准条件下饲养,自由饮水和进食,室温(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 5)%,适应 1 周后开始实验。本研究已经过山西医科大学实验动物伦理委员会审批(伦理审批号:2020GLL042)。

2.2 主要仪器和试剂 悬尾箱(深圳瑞沃德公司),ASP300S 型组织脱水机和 RM2235 型切片机(德国 leica 公司),ES300 型石蜡包埋机(中国华速公司),高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司),化学发光凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。开放旷场实验装置(深圳瑞沃德公司),高架十字迷宫实验装置(深圳瑞沃德公司),Smart 3.0 软件录像分析系统(西班牙 Panlab 公司),电子天平(美国 SARTORIUS),Bio-Rad CFX PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国),移液器(Eppendorf),超纯水仪(美国 Millipore 公司),全自动样品研磨仪(中国上海净信公司),LiCl(上海生工生物工程有限公司),苏木素-伊红试剂盒(武汉博士德公司),Trizol 试剂(北京全式金生物),反转录试剂盒(北京全式金生物),荧光定量 PCR 试剂(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

3 方法

3.1 分组 小鼠按体重用随机数字表法分组为 4 组,每组 12 只:对照组(CON)、抑制剂组(LiCl)、睡眠剥夺组(SD 组)、睡眠剥夺+抑制剂组(SD+LiCl 组),SD 组和 SD+LiCl 组用 MMPM 小平台急性睡眠剥夺 72h,CON 组和 LiCl 组置于大平台,LiCl 组和 SD+LiCl 组腹腔注射 LiCl(20 mg/kg)溶液,CON 组和 SD 组注射等量生理盐水,实验前后记录小鼠体重变化。睡眠剥夺结束后断头处死,冰上迅速分离海马组织,每组随机选取 3 只做 HE 染色,部分做行为学检测,部分取组织做 RT-PCR 检测。

3.2 MMPM 构建小鼠 SD 模型^[12] 使用 MMPM 睡眠剥夺箱构建小鼠 SD 模型^[12]。MMPM 为 40 cm \times 30 cm \times 30 cm 的长方形箱体,内部设置 12 个直径为 3

cm, 高 20 cm 的圆柱形小平台, 小鼠可在平台间随意移动, 箱内加水至平台下 1 cm 处, 实验期间四组均可自由获得水和食物。MMPM 建模原理: 小鼠进入睡眠状态后肌肉松弛, 容易掉入水中, 导致突然惊醒, 因小鼠在水里不能安睡, 迫使小鼠睡眠被人为干预剥夺。在实验开始前两天, 每天将小鼠放入与正式实验相同条件下进行环境适应性训练 2 h, 避免由于应激影响实验结果准确性。实验期间, 将每组 12 只同时放置于平台, 急性睡眠剥夺 12 h, 箱内水温保持(24 ± 11), 每天更换一次水保持清洁。

3.3 HE 染色 小鼠断头处死后, 置于冰上快速分离海马组织, 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 脱水石蜡包埋, 二甲苯常规脱蜡, 梯度乙醇水化, 苏木素染色 5 min, 1% 盐酸酒精分化 3 s, 伊红染色 20 s, 冲洗, 脱水, 透明, 封片, 置于倒置显微镜下观察海马病理学改变并采图。

3.4 旷场实验 (Open Field Test, OFT) 旷场实验主要是评估小鼠在陌生环境中自主行为, 探究行为与紧张度的一种方法, 敞箱规格为 40 cm × 40 cm × 40 cm, 底部中心 4 格被定义为中央格其余为外周格, 小鼠放置中间格子使其自由探索, 时间为 5 min, 采用 Smart 3.0 视频追踪系统记录并分析 5 min 内小鼠进入中心区域次数, 中心区域停留时间。每次实验结束后用 75% 酒精擦拭实验箱, 清理小鼠遗留气味以及排泄物, 待自然干燥后进行下一只小鼠实验。

3.5 高架十字迷宫实验 (Elevated Plus Maze, EPM)

高架十字迷宫实验主要用于评估实验小鼠的焦虑样行为, 高架十字迷宫主要是由两个开放臂和闭合臂交叉而成的结构, 臂长 35 cm, 迷宫距离地面高 50 cm, 交叉形成区域为中央区域, 闭合臂为不透明高臂, 顶部开放。将实验小鼠面向一侧开放臂放置, 用行为学软件记录 5 min 内小鼠的运动轨迹, 观察小鼠身体中心部分进入开放臂和闭合臂次数以及在开放臂和闭合臂各自停留时间。每只小鼠测试结束后用 75% 的酒精擦拭十字迷宫, 消除前一只小鼠留下的气味线索, 减少影响。

3.6 强迫游泳实验 (Forced swim test, FST) 强迫游泳实验是主要用来评估啮齿类动物抑郁样水平的行为学实验, 将小鼠放入装有清水的透明圆柱形玻璃缸中(水温 24℃, 水深 > 30 cm), 让其自由游泳, 近处使用摄像机记录小鼠游泳行为, 研究人员通过行为学软件记录分析每只小鼠后 5 min 的视频图像, 其放弃挣扎表现为典型的漂浮不动状态, 即行为绝望。每只小鼠完成实验后, 应立即吹干毛发, 放入笼中。

3.7 悬尾实验 (Tail suspension test, TST) 悬尾实验是比较小鼠被倒置悬挂后的绝对不动时间, 可在一

定程度上反映小鼠的抑郁状态, 用医用胶带将小鼠尾部 1/3 固定, 使其头部朝向地面, 悬挂于悬尾箱内, 头部距离地面 20 cm, 小鼠为克服不正常体位而挣扎活动, 但在活动一段时间后出现间断性不动, 表现出绝望状态, 以小鼠头部向下, 四肢自然下垂, 无明显挣扎行为作为悬尾不动的标准, 观察并记录小鼠在 5 min 中内不动时间。

3.8 情绪 Z-Score 计算^[13] 26-score 又称标准分数 (standard score, standardized variable), 是实测值与平均数的差再除以标准差。X 为观察参数的单个数据, μ 为平均值, σ 为对照组的标准差。

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

焦虑抑郁评分具体计算参考 Guilloux 等^[13]。通过评估焦虑抑郁水平的各项实验得出 Z 分数来计算个体焦虑抑郁总得分, 从而避免一个实验引起的潜在偏差, 调整分数的方向性, 使分数的增加反映出情绪性的增加。公式如下所示:

$$\text{① 焦虑情绪总得分} = \frac{Z_{\text{OFT}} + Z_{\text{EPM}}}{\text{实验次数}(2)}$$

$$\text{② 焦虑情绪总得分} = \frac{Z_{\text{FST}} + Z_{\text{TST}}}{\text{实验次数}(2)}$$

3.9 实时荧光定量 PCR 使用 Trizol reagent 试剂盒从小鼠海马中提取总 RNA, 分离出 RNA 使用全式金反转录试剂盒合成反转, 以反转完成的 cDNA 为模板做定量 PCR 分析, 热循环条件为 95℃ 预变性 30s, 95℃ 变性 15s, 60℃ 退火/延伸 30s, 40 循环数, 每个基因使用 3 个平行样, 统计各基因的 CT 值, 并用内参基因 GAPDH 的 CT 值标准化。使用 2 - ΔΔCT 计算表达量相对变化, 本实验所用引物见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The Primer of PCR

基因	方向	序列 (5' - 3')
NF-κB	Forward	AGCAACCAAAACAGAGGGGA
	Reverse	TGCAAATTTTGACCTGTGGGT
NLRP3	Forward	TCTGCACCCGGACTGTAAC
	Reverse	CATTGTTGCCAGGTTACAGC
GAPDH	Forward	AGTCCGCTGTGAACGGATTTC
	Reverse	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

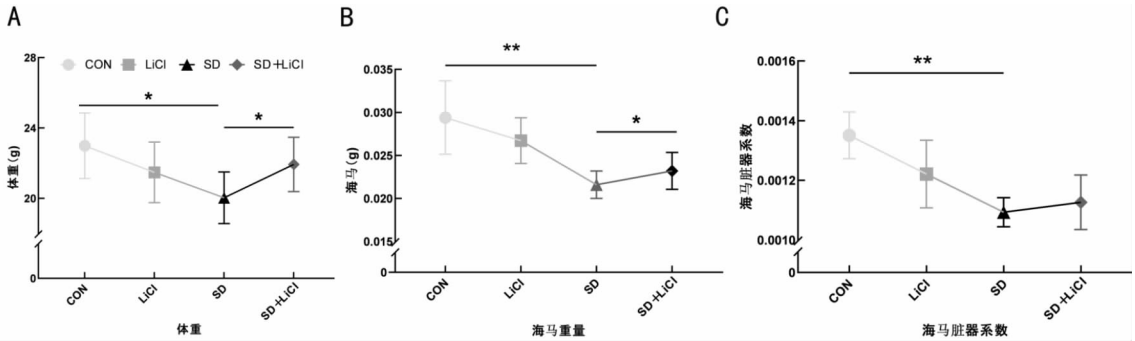
4 统计方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 数据表示为均数 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间采用单因素方差分析, 两组间采用 t 检验分析, 并在 GraphPad Prism 9 中绘制图形, 所有检验水准 α = 0.05。

5 结果

5.1 急性睡眠剥夺对小鼠体重及海马脏器系数的影响 体重及海马脏器系数结果显示,各组间差异有统计学意义 ($F = 3.837, P = 0.022$),与 CON 组相比,

LiCl 组无统计学意义 ($F = 0.050, P = 0.141; F = 0.023, P = 0.138; F = 0.286, P = 0.135$),SD 组体重、海马重量以及海马脏器系数均显著降低 ($F = 0.452, P = 0.006; F = 6.553, P = 0.009; F = 1.428, P = 0.001$),见图 1。



注:A:体重,B:海马重量,C:海马脏器系数,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图 1 各组小鼠海马脏器系数比较

Fig. 1 Comparison of hippocampal organ coefficients among different groups of mice

5.2 急性睡眠剥夺对小鼠海马组织病理学形态的影响 HE 染色结果显示,CON 组 CA1、CA3 区域海马组织结构完整清晰,各区域锥体细胞层细胞排列整

齐、致密,细胞数量正常,胞核清晰,SD 组以及 SD + LiCl 组均出现不同程度的细胞排列散乱,细胞间距显著增宽,且轮廓较 CON 组模糊不清,见图 2。

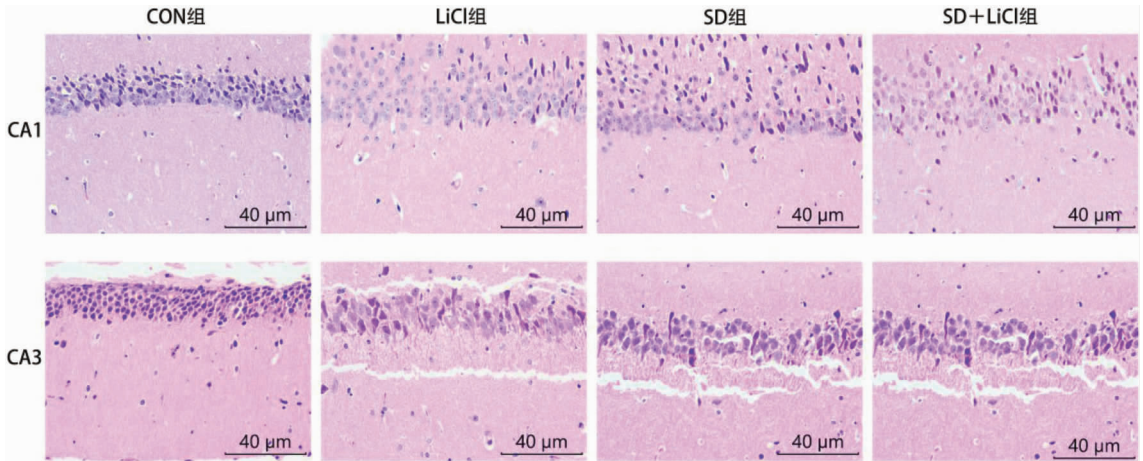


图 2 海马组织病理学形态(HE 染色,400 ×)

Fig. 2 Pathological morphology of hippocampal tissue

5.3 急性睡眠剥夺对小鼠焦虑样行为的影响

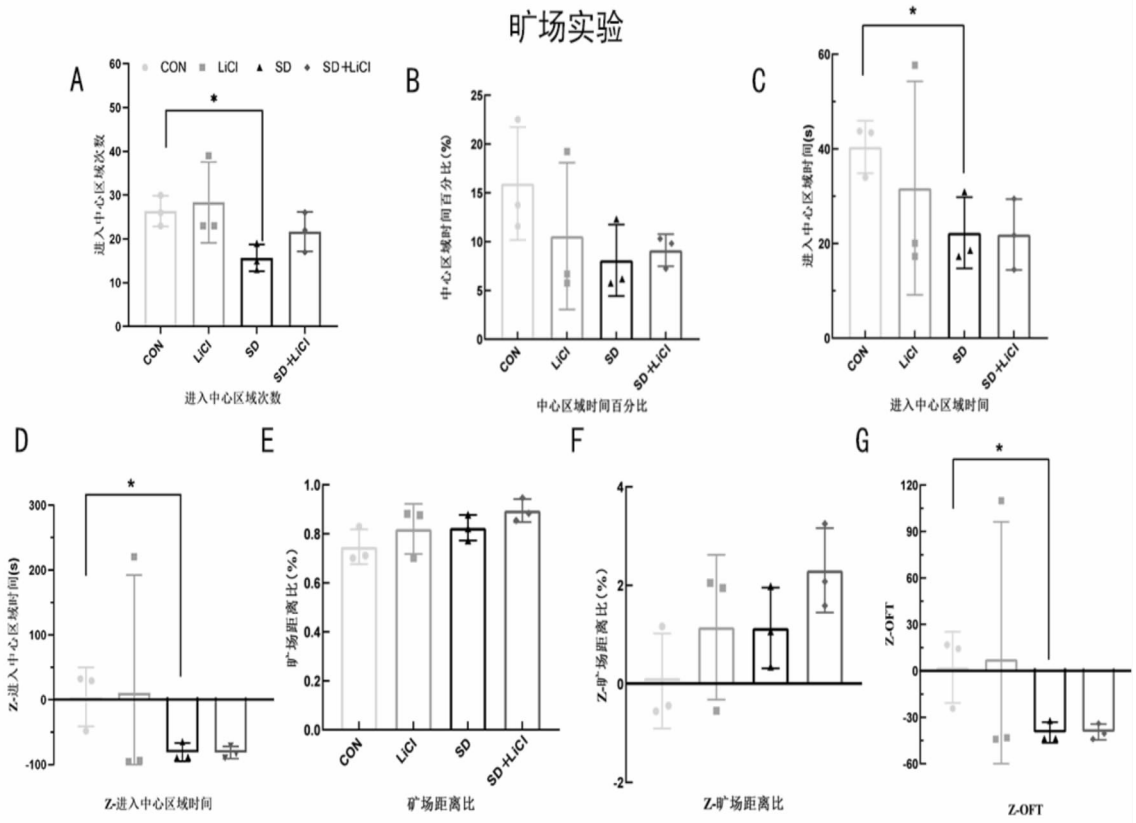
5.3.1 旷场实验结果 图 3 为旷场实验各组小鼠运动轨迹示意图,由图可见,CON 组与 LiCl 组小鼠在旷场中心区运动轨迹较密集且进入次数较多,SD 组和 SD + LiCl 组明显减少。进一步的统计结果显示,与 CON 组相比,LiCl 组进入中心区域次数无统计学差异 ($F = 5.084, P = 0.744$),SD 组小鼠进入中心区域次数、进入中心区域时间均显著减少 ($F = 0.028, P = 0.017; F = 0.683, P = 0.028$) (图 3A、C),表明 SD 小

鼠出现焦虑样行为。对进入中心区域时间和旷场距离比进行归一化(图 3D、F),并取平均值以获得 Z_{OFT} ,结果表明,与 CON 组相比,LiCl 组旷场实验得分无统计学差异 ($F = 8.211, P = 0.929$),SD 组显著降低 ($F = 7.261, P = 0.038$) (图 3G)。

5.3.2 高架十字迷宫实验结果 高架十字迷宫结果显示,与 CON 组相比,LiCl 组进入开放臂时间无统计学意义 ($F = 0.09, P = 0.113$),SD 组显著减少 ($F = 0.085, P = 0.011$),与 SD 组相比,SD + LiCl 组开放臂

停留时间增加 ($F = 13.128, P = 0.019$) (图 4A、B), 表明 SD 小鼠出现焦虑样行为。Z_{EPM} 结果表明, 与 CON

组相比, SD 组高架十字迷宫实验得分明显降低, 见图 4E。



注:A:进入中心区域次数,B:中心区域时间百分比,C:进入中心区域时间,D:Z归一化后进入中心区域时间,E:旷场距离比,F:Z归一化后旷场距离比,G:旷场实验得分,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图3 旷场实验结果

Fig.3 Results of open filed test

5.4 急性睡眠剥夺对小鼠抑郁样行为的影响

5.4.1 强迫游泳实验结果 强迫游泳实验结果显示,与 CON 组相比,LiCl 组小鼠强迫游泳不动时间无统计学差异 ($F = 3.422, P = 0.260$) (图 5A)。对强迫游泳不动时间进行归一化处理 (图 5B),取归一化后的数据平均值以获得每只小鼠 Z_{FST} (图 5C)。

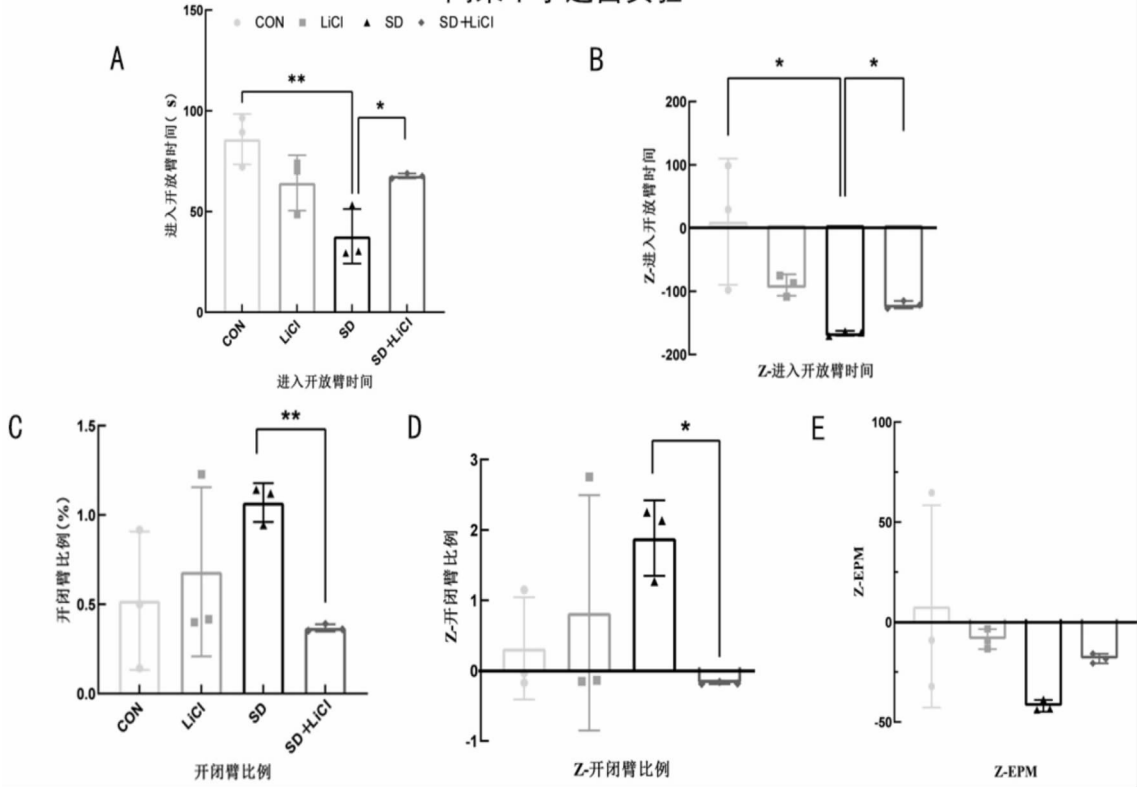
5.4.2 悬尾实验结果 悬尾实验结果显示,与 CON 组相比,LiCl 组小鼠悬尾不动时间无统计学差异 ($F = 12.748, P = 0.052$),SD 组增加 ($F = 11.218, P = 0.005$) (图 5D),表明 SD 小鼠出现抑郁样行为。同理获得 Z_{TST},结果表明,与 CON 组相比,LiCl 组悬尾实验得分无统计学差异 ($F = 11.846, P = 0.976$),SD 组增加 ($F = 0.806, P = 0.002$),SD + LiCl 组较 SD 组有所减少 (图 5F)。

为了避免 OFT 和 EPM 运动中任何加权影响,取两种行为测试 Z_{OFT} 和 Z_{EPM} 平均值,获得每只小鼠焦虑情绪总得分。结果表明,与 CON 组相比, LiCl 组焦虑情绪总得分无统计学差异 ($F = 4.399, P = 0.427$),SD

组显著增加 ($F = 8.943, P = 0.018$),SD + LiCl 组较 SD 组焦虑样行为有所缓解 ($F = 2.044, P = 0.012$) (图 6A)。接着,对 Z_{FST} 和 Z_{TST} 进行平均,以获得每只小鼠抑郁情绪总得分。结果表明,与 CON 组相比, LiCl 组小鼠抑郁情绪总得分无统计学差异 ($F = 1.341, P = 0.275$),SD 组出现抑郁行为 ($F = 1.328, P = 0.02$)。SD + LiCl 组较之 SD 组抑郁样行为有所缓解 ($F = 1.871, P = 0.017$) (图 6B)。

5.5 急性睡眠剥夺对小鼠海马组织 NF- κ B/NLRP3 信号通路的影响 小鼠海马组织中 NF- κ B 和 NLRP3 的 RT-PCR 结果表明,与 CON 组相比, LiCl 组 NF- κ B 和 NLRP3 的 mRNA 表达水平无统计学差异 ($F = 4.629, P = 0.147; F = 15.555, P = 0.107$),而 SD 组小鼠 NF- κ B 和 NLRP3 的 mRNA 水平均显著增高 ($F = 6.969, P < 0.001; F = 15.833, P = 0.017$),与 SD 组相比,SD + LiCl 组 NF- κ B 和 NLRP3 的 mRNA 水平降低 ($F = 2.148, P = 0.013; F = 15.325, P = 0.017$) (图 7)。

高架十字迷宫实验

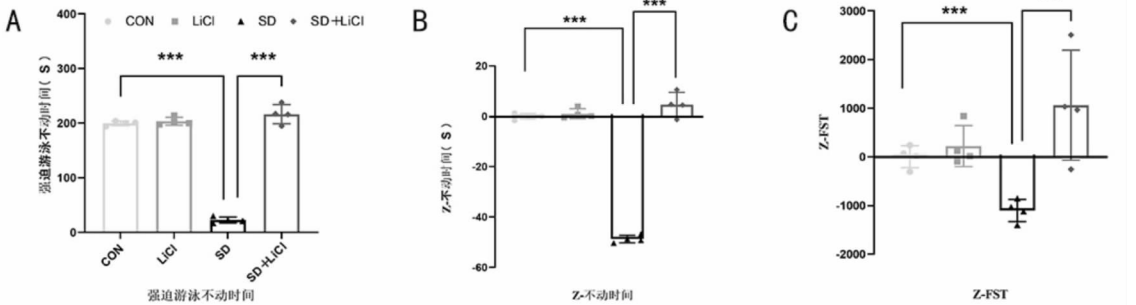


注:A:进入开放臂时间,B:Z 归一化后进入开放臂时间,C:开闭臂比例,D:Z 归一化后开闭臂比例,E:高架十字迷宫实验得分,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

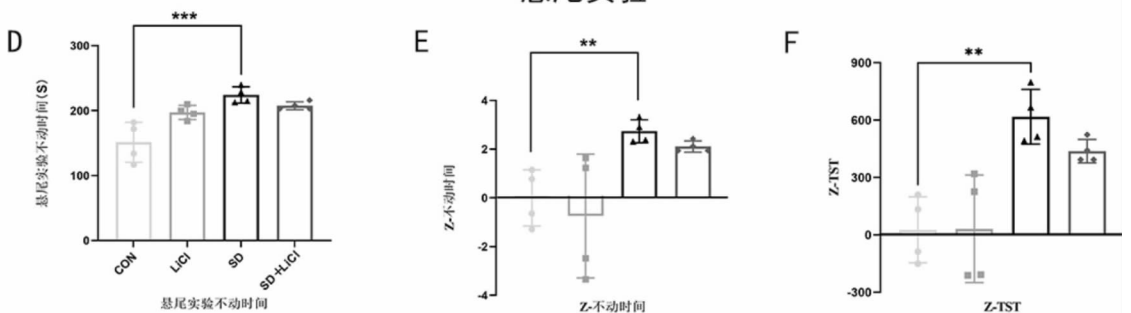
图 4 高架十字迷宫实验结果

Fig. 4 Results of elevated plus maze test

强迫游泳实验



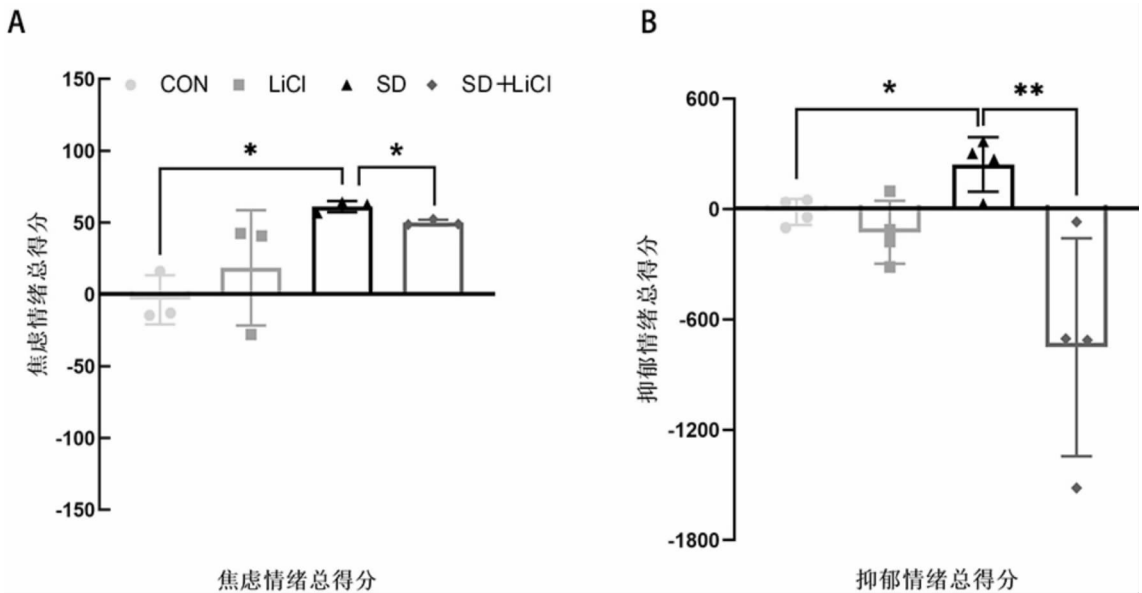
悬尾实验



注:A:强迫游泳不动时间,B:Z 归一化后强迫游泳不动时间,C:强迫游泳实验得分,D:悬尾不动时间,E:Z 归一化后悬尾不动时间,F:悬尾实验得分,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图 5 悬尾实验和强迫游泳实验结果

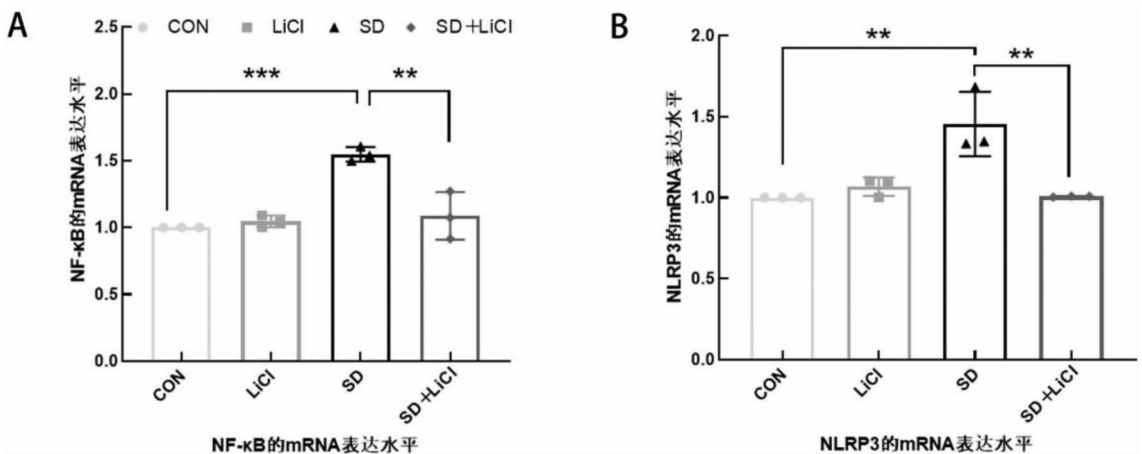
Fig. 5 Results of forced swim test and tail suspension test



注:A:焦虑情绪总得分,B:抑郁情绪总得分,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图6 情绪总得分

Fig. 6 Total score for anxiety emotion



注:A:NF-κB的mRNA表达水平,B:NLRP3的mRNA表达水平,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图7 NF-κB/NLRP3的mRNA表达水平

Fig. 7 mRNA expression levels of NF-κB/NLRP3

6 讨论

随着社会现代化和老龄化发展,睡眠障碍发病率迅速升高,以睡眠-觉醒障碍为例,全球发病率为27%,而我国高达38.2%。根据我国睡眠研究会2021年3月发布的《2021年运动与睡眠白皮书》显示,我国有3亿多人面临睡眠障碍及相关问题^[14]。研究表明,MPPM破坏了小鼠90%~95%的快速眼动睡眠^[15]。本研究通过MPPM方法成功构建小鼠SD模型,发现小鼠有焦虑抑郁样行为,LiCl有改善作用,且NF-κB/NLRP3信号通路可能参与调控。

抑郁即长期情绪低落,对几乎所有活动缺乏积极

情绪,丧失目标。焦虑症是指在日常生活中人们会感到恐惧或者过度担忧,从而干扰正常的日常功能,两者均会导致严重的自我损伤^[16-17]。研究表明重度抑郁症和焦虑症破坏性强且高度普遍,是全球致残的主要原因之一^[17]。自我描述的睡眠障碍是焦虑抑郁的常见特征,研究表明,睡眠和情绪障碍之间存在双向关系^[15]。先前的一项动物研究显示,睡眠剥夺小鼠在高架十字迷宫的开臂时间中没有观察到焦虑样行为,且相较对照组焦虑缓解^[18]。而另一项研究通过旷场试验、高架十字迷宫实验、明暗箱试验等表明,MPPM构建的6h睡眠剥夺模型强烈诱导小鼠焦虑样行为^[12]。小鼠的行为是多模式的、完全可量化的情

绪评估(包括焦虑抑郁的行为),动物之间的可变性和不同的实验测试条件,以及小鼠可能在短时间内处于不同的情绪状态,都会导致难以解释的实验结果。之前的研究大多是通过行为学实验单个评估小鼠情绪变化,例如旷场实验中进入中心区域时间或高架十字迷宫中进入开臂时间和次数,而没有跨范式的综合分析,因此 2011 年 Guilloux 等提出通过 Z 评分整合在多个行为测试中获得的行为参数,更加全面分析小鼠焦虑和抑郁样状态^[13]。本研究中,小鼠急性睡眠剥夺 72h 后,在单个评估抑郁水平的强迫游泳实验中小鼠没有出现抑郁行为且实验结果为相反趋势,但是基于悬尾实验和强迫游泳实验综合评估小鼠抑郁样行为的结果表明 SD 组小鼠抑郁水平较 CON 组上升,出现抑郁样行为。因此,在评估焦虑抑郁时候,应该多种行为学实验综合评估,减少某一种实验的加权比重。并且本实验表明 SD 小鼠经 LiCl 干预后,焦虑抑郁有所缓解,这与之前研究结果显示 LiCl 在慢性睡眠剥夺中缓解小鼠焦虑抑郁行为相一致^[19]。

研究发现,SD 与全身炎症的诱发有关^[20]。临床研究证明 NLRP3 炎症小体在重度抑郁症患者的血细胞中被激活,促炎因子的增加与贝克抑郁量表评分呈正相关,表明 NLRP3 可能在介导抑郁的过程中发挥关键作用。动物实验研究显示,慢性轻度应激抑郁模型大鼠增强前额叶皮层中 IL-1、NLRP3、ASC、TLR2、NF- κ B、p- $\text{IKK}\alpha$ 和 $\text{IKK}\beta$ 的水平,而氟西汀则逆转这些改变,并且海马小胶质细胞中 P2X7R 和 NLRP3 炎症小体相关蛋白的激活介导抑郁样行为^[21]。因此,NLRP3 炎症小体可能是抑郁症等情绪障碍的潜在治疗靶点,NF- κ B 作为 NLRP3 炎症小体激活所需的启动信号的关键介质,响应各种细胞因子和模式识别受体 (PRR) 配体触发 NLRP3 的转录表达^[22]。本研究表明,72h 急性睡眠剥夺后炎症小体 NLRP3 的 mRNA 表达水平显著升高,NF- κ B 作为转录因子在本次研究中也显示其 mRNA 表达水平明显提高。

综上所述,本研究发现,72h 急性睡眠剥夺可以导致小鼠焦虑抑郁样行为的发生,其海马组织中 NF- κ B/NLRP3 信号通路可能发挥调控作用。但是,值得进一步探讨的是,该信号通路的激活如何导致焦虑抑郁样行为的改变,以及神经炎性是否在其中发挥调控作用。本研究的结果为睡眠障碍患者情绪变化的机制研究提供了一些新的证据,并为诊断和治疗神经精神障碍提供了可能的方向。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Faber NS, Häusser JA, Kerr NL. Sleep deprivation impairs and

caffeine enhances my performance, but not always our performance [J]. *Personality and Social Psychology Review*, 2017, 21(1): 3-28.

[2] Chaput JP, Mchill AW, Cox RC, et al. The role of insufficient sleep and circadian misalignment in obesity [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2023, 19(2): 82-97.

[3] Gariépy G, Danna S, Gobiņa I, et al. How are adolescents sleeping? adolescent sleep patterns and sociodemographic differences in 24 European and North American countries [J]. *Journal of Adolescent Health*, 2020, 66(6S): S81-S88.

[4] Garbarino S, Lanteri P, Bragazzi NL, et al. Role of sleep deprivation in immune-related disease risk and outcomes [J]. *Communications Biology*, 2021, 4(1): 1304.

[5] Irwin MR. Sleep and inflammation: partners in sickness and in health [J]. *Nature Reviews. Immunology*, 2019, 19(11): 702-715.

[6] Amini M, Yousefi Z, Ghafori SS, et al. Sleep deprivation and NLRP3 inflammasome: Is there a causal relationship? [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2022, 16: 1018628.

[7] Wang L, Hauenstein AV. The NLRP3 inflammasome: Mechanism of action, role in disease and therapies [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2020, 76: 100889.

[8] Li YX, Huang H, Liu B, et al. Inflammasomes as therapeutic targets in human diseases [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 247.

[9] Komleva YK, Lopatina OL, Gorina IV, et al. NLRP3 deficiency-induced hippocampal dysfunction and anxiety-like behavior in mice [J]. *Brain Research*, 2021, 1752: 147220.

[10] Xia CY, Guo YX, Lian WW, et al. The NLRP3 inflammasome in depression: Potential mechanisms and therapies [J]. *Pharmacological Research*, 2023, 187: 106625.

[11] Smith C, Trageser KJ, Wu H, et al. Anxiolytic effects of NLRP3 inflammasome inhibition in a model of chronic sleep deprivation [J]. *Translational Psychiatry*, 2021, 11(1): 52.

[12] Liu HY, Huang X, Li YH, et al. TNF signaling pathway-mediated microglial activation in the PFC underlies acute paradoxical sleep deprivation-induced anxiety-like behaviors in mice [J]. *Brain Behavior and Immunity*, 2022, 100: 254-266.

[13] Guilloux JP, Seney M, Edgar N, et al. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2011, 197(1): 21-31.

[14] 黄鑫, 李苏宁, 尹军祥, 等. 我国睡眠障碍防控研究现状及建议 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2023, 54(2): 226-230.

Huang X, Li S, Yin JX, et al. Research status of and recommendations for prevention and control of sleep disorders in China [J]. *Journal of Sichuan University: Medical Edition*, 2023, 54(2): 226-230.

[15] Cunningham TJ, Kishore D, Guo M, et al. The effect of obstructive sleep apnea on sleep-dependent emotional memory consolidation [J]. *Annals of the American Thoracic Society*, 2023, 20(2): 296-306.

(下转第 1871 页)

- [28] Allodi I, Comley L, Nichterwitz S, et al. Differential neuronal vulnerability identifies IGF-2 as a protective factor in ALS[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 25960.
- [29] Xin P, Xu XY, Deng CJ, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases [J]. International Immunopharmacology, 2020, 80: 106210.
- [30] Xiao SN, Zhang Y, Liu ZH, et al. Alpinetin inhibits neuroinflammation and neuronal apoptosis via targeting the JAK2/STAT3 signaling pathway in spinal cord injury [J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2023, 29(4): 1094-1108.
- [31] Zhang ZH, Yu LJ, Hui XC, et al. Hydroxy-safflor yellow A attenuates AB_{1-42} -induced inflammation by modulating the JAK2/STAT3/NF- κ B pathway [J]. Brain Research, 2014, 1563: 72-80.
- [32] Fan LL, Du R, Liu JS, et al. Loss of RTN3 phenocopies chronic kidney disease and results in activation of the IGF2-JAK2 pathway in proximal tubular epithelial cells[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2022, 54(5): 653-661.

收稿日期:2023-11-24

(上接第 1859 页)

- [16] Demyttenaere K, Heirman E. The blurred line between anxiety and depression: hesitations on comorbidity, thresholds and hierarchy [J]. International Review of Psychiatry, 2020, 32(5-6): 455-465.
- [17] Kouba BR, Camargo A, Gil-Mohapel J, et al. Molecular basis underlying the therapeutic potential of vitamin D for the treatment of depression and anxiety [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(13): 7077.
- [18] Pires GN, Bezerra AG, Tufik S, et al. Effects of experimental sleep deprivation on anxiety-like behavior in animal research: Systematic review and meta-analysis [J]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2016, 68: 575-589.
- [19] 张文平,王静,张楠,等. GSK-3 β / β -catenin 信号通路在慢性睡眠剥夺小鼠焦虑抑郁样行为中的作用[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2021,30(10):880-886.
- Zhang WP, Wang J, Zhang N, et al. Effects of GSK-3 β / β -catenin signaling pathway in chronic sleep deprivation-induced anxiety- and depression-like behavior of mice [J]. Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science, 2021, 30(10): 880-886.
- [20] Wang Z, Chen WH, Li SX, et al. Gut microbiota modulates the inflammatory response and cognitive impairment induced by sleep deprivation[J]. Molecular Psychiatry, 2021, 26(11): 6277-6292.
- [21] Wang HX, He Y, Sun ZL, et al. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression [J]. Journal of Neuroinflammation, 2022, 19(1): 132.
- [22] Redondo-Castro E, Faust D, Fox S, et al. Development of a characterised tool kit for the interrogation of NLRP3 inflammasome-dependent responses [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 5667.

收稿日期:2023-11-01

读者·作者·编者

本刊对统计学符号的要求

按照 GB/T 3358.1~3-2009 《统计学术语》的有关规定,统计学符号一律采用斜体排印。常用:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} 或 mean (中位数英文叙述中用 M 或 median); (2)标准差用英文小写 s 或大写 SD (限英文文献中); (3)标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$ 或大写 SE (限英文文献中); (4) t 检验用英文小写 t ; (5) F 检验用英文大写 F ; (6) 卡方检验用希腊小写 χ^2 ; (7) 相关系数用英文小写 r ; (8) 自由度用希腊小写 ν 或 df (限英文文献中); (9) 概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值,如 t 值、 χ^2 值、 q 值等)。