·实验研究·

瑞替加滨对慢性应激所致的大鼠抑郁样症状的改善作用及机制研究

冯楚钰[1],任建辉[2],祝曙光[3],覃翠颖[1],郭继全[4],臧林泉[1]

(1 广东药科大学药学院药理系,广州 511436;2 广州市花都区妇幼保健院,广州 510800;
3 广东药科大学附属第一医院,广州 510080;4 广东省人民医院,广州 510020)

[摘要] **目的**:研究瑞替加滨(retigabine, RTG)对慢性应激诱导的大鼠抑郁样症状的改善作用,并初步探究可能的分子机制。**方法**:将32只SD大鼠随机分为正常组、模型组、RTG高剂量组(4 mg·kg^{-1})和RTG低剂量组(2 mg·kg^{-1})。采用长期反复低温水浸束缚方法,建立大鼠慢性应激模型。利用旷场实验、强迫游泳实验和糖水偏好实验评估大鼠的抑郁样症状;通过HE染色法和尼氏(Nissl)染色法检测大鼠海马的组织病理形态变化;采用Western Blot法检测大鼠海马中脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、突触素(synaptophysin, SYP)、葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)、C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)和半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的蛋白水平。**结果**:在慢性应激大鼠模型中,RTG给药显著上调旷场实验中的总运动距离、平均运动速度以及在中央区域停留的时间,升高大鼠的糖水偏好程度和缩短强迫游泳静止不动时间;明显改善海马组织病理性损伤;显著增加BDNF,SYP,GRP78和Bcl-2的蛋白表达,并减少CHOP,Bax和Caspase-3的蛋白表达。**结论**:RTG对长期反复低温水浸束缚诱导的大鼠抑郁样症状及海马结构病理学损伤均具有保护作用,该作用与缓解海马神经细胞内质网应激、减少细胞凋亡和改善神经可塑性有关。

[关键词] 瑞替加滨;慢性应激;抑郁症;内质网应激;细胞凋亡;神经可塑性

[中图分类号] R965 [文献标志码] A [文章编号] 1003-3734(2021)15-1407-06

The ameliorating effect of retigabine on chronic stress-induced depression-like symptoms in rats and its mechanism

FENG Chu-yu[1], REN Jian-hui[2], ZHU Shu-guang[3], QIN Cui-ying[1], GUO Ji-quan[4], ZANG Lin-quan[1]

(1 *Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou* 511436, *China*; 2 *Huadu Maternal and Child Health Care Center, Guangzhou* 510800, *China*; 3 *The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou* 510080, *China*; 4 *Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou* 510020, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study the ameliorating effect of retigabine (RTG) on chronic stress-induced depression-like symptoms in rats, and to explore the possible molecular mechanism. **Methods**: 32 SD rats were randomly divided into control group, model group, RTG high dose (4 mg·kg^{-1}) and RTG low dose (2 mg·kg^{-1}) groups. Long-term repeated low-temperature water immersion restraint method was used to establish the rat chronic stress model. Open field test, forced swimming test and sucrose preference test were conducted to evaluate the

[基金项目] 2018年广东省研究生示范课程建设资助项目(2018SFKC25);广东药科大学创新强校其他类资助项目(2017QTLXXM27)

[作者简介] 冯楚钰,女,硕士,主要从事药理学研究。联系电话:(020)39352128,E-mail:fengcy0@163.com。

[通讯作者] 臧林泉,男,教授,主要从事分子药理学研究。联系电话:(020)39352128,E-mail:zanglq@163.com。

degree of depression-like symptoms of rats. The histopathological changes in hippocampus of rats were detected by HE staining and Nissl staining. The levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF), synaptophysin (SYP), glucose regulated protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and Caspase-3 protein in hippocampus were determined by using Western Blot analysis. **Results**: In the chronic stress rat model, RTG markedly increased the total distance of movement, average movement speed, and stationary time in the central area in the open field experiment. RTG significantly increased the sucrose consumption ratio of rats and shortened the immobility time of forced swimming. In addition, RTG effectively improved the tissue lesion of hippocampus, markedly increased the protein expression of BDNF, SYP, GRP78 and Bcl-2 and decreased that of CHOP, Bax and Caspase-3. **Conclusion**: RTG has protective effect on depression-like symptoms and hippocampal structural pathological damage in rats induced by long-term repeated low-temperature water immersion. Its mechanism may be attributed to alleviating the endoplasmic reticulum stress of hippocampal nerve cells, reducing cell apoptosis, and improving neuroplasticity.

[**Key words**] retigabine;chronic stress;depression;endoplasmic reticulum stress;cell apoptosis;neuroplasticity

应激反应是机体在外界环境刺激下(如饥饿、寒冷、缺氧)或自身情绪改变(如沮丧、恐惧)时出现的一种全身性反应。适度的应激能促使机体进行稳态的调整,增强应对应激源的抵抗力。然而,应激源长期存在的慢性应激会逆转应激早期带来的益处,不仅会产生焦虑等不良情绪,身体各组织器官也会出现不同程度的损伤,进而导致心血管疾病、代谢性疾病、神经精神疾病等[1-2]。

抑郁症属于神经精神疾病的一种,其症状主要表现为持续的心境低落、思维迟缓、无快感体验及认知功能障碍等,具有发病率高、自杀率高和复发率高的特征。据世界卫生组织预测,至 2030 年抑郁症将超过恶性肿瘤和心脏病等疾病成为第一大致残疾病。抑郁症的发病机制复杂,目前临床上常用的抗抑郁药物大部分是依据单胺递质假说,但用该学说难以解释药物起效延迟的特点。因此,神经内分泌紊乱假说、免疫系统功能失衡机制假说、神经营养因子缺乏假说等一系列新学说不断出现,这些假说都直接或间接涉及到神经可塑性的变化。神经可塑性是指中枢神经系统对内外各种刺激产生的与功能和结构相关的适应性改变。近年来,大量研究表明抑郁症的发生与神经可塑性功能异常有密切关联,提示了神经可塑性机制在应激和抑郁的神经生物学中的重要作用[3-4]。

瑞替加滨(retigabine, RTG)是一种作用于中枢神经系统的钾离子通道开放剂,其特异性作用于电压门控钾离子通道 KCNQ2-5(Kv7.2-7.5),可通过增加通道的开放频率及开放持续时间,提供持续的超极化影响,使过度兴奋细胞恢复静息状态,目前作为癫痫发作的辅助药物被美国 FDA 批准上市[5]。研究发现创伤性脑损伤可用 RTG 进行预防;RTG 可通过抑制线粒体介导的细胞凋亡减轻局灶性脑缺血损伤[6-7]。此外,RTG 能够改善急性应激所导致的空间记忆障碍,以及可抑制苯丙胺和氯氮䓬诱导的多动症模型的运动亢进,对双向情感障碍具有潜在治疗作用[8-9]。既往研究表明 RTG 具有明显的神经保护作用。此外,Kv7 通道也存在于树突和轴突上,提示 Kv7 通道也可能影响树突整合和神经元传递。

本研究采用长期反复低温水浸束缚方法建立大鼠慢性应激模型,通过观察 RTG 对慢性应激抑郁样大鼠和正常成年大鼠的行为学及海马组织病理形态变化的影响,以评价 RTG 的抗抑郁症状的有效性,并初步探究 RTG 的抗应激保护机制,为临床应用 RTG 抗应激/抗抑郁提供实验依据和理论支持。

材料与方法

1 药物和试剂

瑞替加滨(上海麦克林生化科技有限公司,批号:R823985,规格:250 mg,纯度:98%);脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)抗体(万类生物公司,批号:WL0168);突触素(synaptophysin, SYP)抗体(万类生物公司,批号:WL03058);葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)抗体(批号:11587-1-AP)、C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)抗体(批号:115204-1-AP)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,

Bcl-2)抗体(批号:26593-1-AP)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl2 associated X protein, Bax)抗体(批号:50599-2-Ig)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(批号:19677-1-AP)、β-微管蛋白(β-Tubulin)抗体(批号:10094-1-AP)均购自 Proteintech 公司。

2 仪器

SuperMaze + 高通量动物行为实验分析软件(上海欣软信息科技有限公司);SuperFst 高通量强迫游泳实验软件(上海欣软信息科技有限公司)。

3 动物分组与给药方法

成年雌性 SD 大鼠 32 只,35 ~ 42 d,体质量 180 ~ 220 g,购自广东省实验动物中心,合格证号:SCXK(粤)2018-0002。所有动物实验均符合《用于科学目的的动物保护欧共体条例(2010/63/EU)》,并获得广东药科大学动物研究伦理委员会的批准。实验动物饲养于专用的动物房,饲养环境恒定温度为 23 ℃、湿度为 60%,保持光照/黑暗 12 h 恒定循环,自由饮水和摄食。SD 大鼠随机分为正常组、模型组、RTG 高剂量组(4 $mg\cdot kg^{-1}$)和 RTG 低剂量组(2 $mg\cdot kg^{-1}$),每组 8 只,适应性饲养 1 周后开始实验。RTG 用含 1% 吐温 80 的生理盐水配成浓度为 0.8 $mg\cdot mL^{-1}$的溶剂进行腹腔注射。

4 慢性应激模型建立

使用自制大鼠固定器,固定大鼠于狭小空间中,限制其自由活动。正常组大鼠腹腔注射生理盐水但不给予应激刺激;RTG 处理组大鼠于每天应激前 1 h 腹腔注射药物,随后与模型组大鼠一起束缚合并冷水浸泡应激,持续 8 h,连续 21 d。应激结束后,烘干回笼。每天应激刺激时间统一在 9:00 ~ 17:00。

5 行为学检测

5.1 旷场实验 将大鼠放置于敞箱中心格内(敞箱大小 100 cm × 100 cm × 40 cm,敞箱内壁为黑色,底面平均分为 25 格),大鼠在敞箱内自由活动 5 min,录像记录下运动轨迹,分析其总运动距离,平均运动速度以及在中央区域停留的时间。每只大鼠结束测量后,均用 75% 乙醇彻底清洁敞箱。

5.2 强迫游泳实验 将大鼠单独放入玻璃水缸中(直径 25 cm、高 45 cm、水深 30 cm),水温为(25 ± 1) ℃,游泳 5 min,记录大鼠静止不动时间(大鼠停止挣扎,仅靠四肢轻微活动漂浮在水上的时间)。

5.3 糖水偏好实验 实验分 3 d 进行,d 1 给予每组大鼠 2 瓶相同的 1% 蔗糖溶液,自由饮用。d 2 替换成 1 瓶 1% 蔗糖溶液和 1 瓶纯水,自由饮用。禁水禁食 12 h 后,将大鼠单笼放置,给予 1% 蔗糖溶液、纯水各 1 瓶,中途互换位置 1 次,4 h 后测量计算糖水偏好度:糖水偏好度 =(蔗糖水消耗量)/(蔗糖消耗量 + 纯水消耗量) × 100%。

6 海马组织病理学检查

行为学测量完毕后,脱颈椎处死大鼠,冰上迅速分离大鼠海马组织,一部分固定于 4% 多聚甲醛,其余液氮速冻,-80 ℃低温保存备用。取固定于多聚甲醛溶液中的海马组织,常规制作石蜡切片,用于 HE 染色和尼氏(Nissl)染色检测海马 CA1 和 CA3 区病理变化。

7 Western Blot 实验

取大鼠海马组织,提取蛋白质。运用蛋白定量(BCA)法测量蛋白质浓度。电泳分离蛋白质,湿转法转移蛋白质至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别孵育 BDNF(1∶500),SYP(1∶1 000),GRP78(1∶5 000),CHOP(1∶2 000),Bax(1∶5 000),Bcl-2(1∶1 000),Caspase-3(1∶1 000)和 β-Tubulin(1∶10 000),4 ℃孵育过夜,加入二抗孵育 1.5 h,加入 ECL 显色液,在全自动化学发光仪显影分析。

8 统计学分析

所有数据用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,多组间数据比较运用单因素方差分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,图表用 Graphpad Prism 5.0 绘制展示,组间比较,$P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

结 果

1 行为学测试结果

在旷场实验中,相对于正常组,模型组大鼠活动总路程、平均运动速度以及中央区域停留时间明显下降;与模型组相比,RTG 干预后大鼠活动总路程、平均运动速度以及中央区域停留时间均显著上升,抑郁样症状得到改善。在强迫游泳实验中,模型组大鼠较正常组在强迫游泳中不动的时间显著延长,且具有统计学差异;与模型组比较,RTG 处理组均明显缩短大鼠不动时间,表明抑郁症状得到缓解。在糖水偏好实验中,与正常组相比,模型组大鼠对糖水的偏爱程度显著降低;与模型组比较,RTG 干预后,大鼠糖水偏好程度增加,具有统计学差异,结果见表 1。表明 RTG 能改善慢性应激引起的快感缺失大鼠的抑郁样状态。

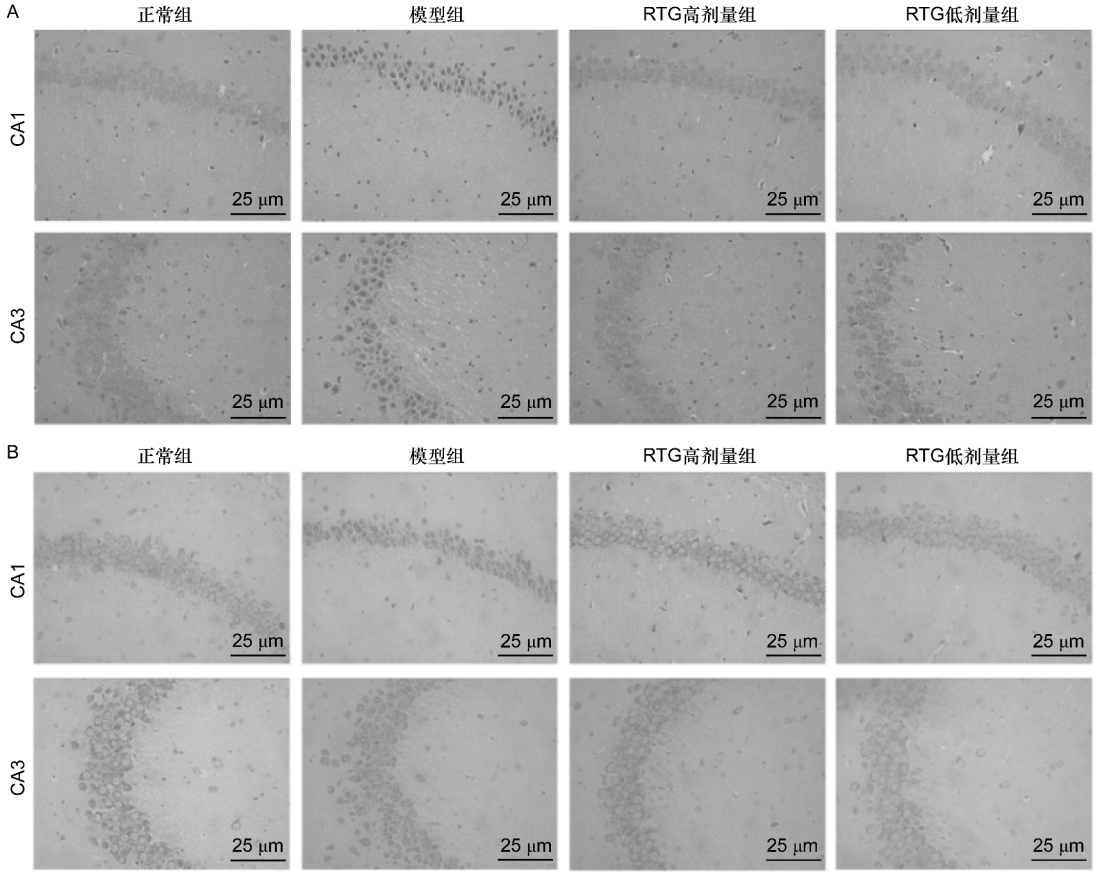
表 1 RTG 对慢性应激诱导的大鼠抑郁样症状的作用 $\bar{x} \pm s, n = 5$

组别	总运动距离/mm	平均速度/mm·s^{-1}	中央区域停留时间/s	强迫游泳不动时间/s	糖水偏好度/%
正常组	34 194.90 ± 3 104.68	121.82 ± 11.99	26.04 ± 3.35	80.17 ± 12.33	89.34 ± 5.18
模型组	21 684.75 ± 3 836.07[b]	71.86 ± 7.84[b]	14.70 ± 2.21[a]	189.09 ± 6.70[b]	74.71 ± 1.64[a]
RTG 高剂量组	30 406.90 ± 4 328.28[d]	109.75 ± 7.85[e]	24.18 ± 4.31[c]	116.48 ± 19.81[e]	88.95 ± 9.74[d]
RTG 低剂量组	30 164.83 ± 1 149.68[d]	101.48 ± 3.86[e]	22.75 ± 3.09[c]	166.64 ± 16.26[c]	88.09 ± 5.40[d]

与正常组相比，a：$P < 0.01$，b：$P < 0.001$；与模型组相比，c：$P < 0.05$，d：$P < 0.01$，e：$P < 0.001$

2 海马病理测试结果

2.1 海马 HE 染色结果 HE 染色结果显示正常组大鼠神经元细胞排列整齐、紧密，细胞核清晰、胞质饱满；模型组大鼠海马区出现明显结构破坏，神经元细胞周围间隙增大，排列紊乱，细胞大量变性，有核固缩现象，核膜不完整且胞质红染；与模型组相比，RTG 低剂量组大鼠神经元细胞损伤程度较轻，细胞形态较规则，排列略有改善；RTG 高剂量组大鼠神经元排列恢复整齐，细胞状态较好，有明显的保护作用，见图 1A。



A：HE 染色（×200）；B：Nissl 染色（×200）

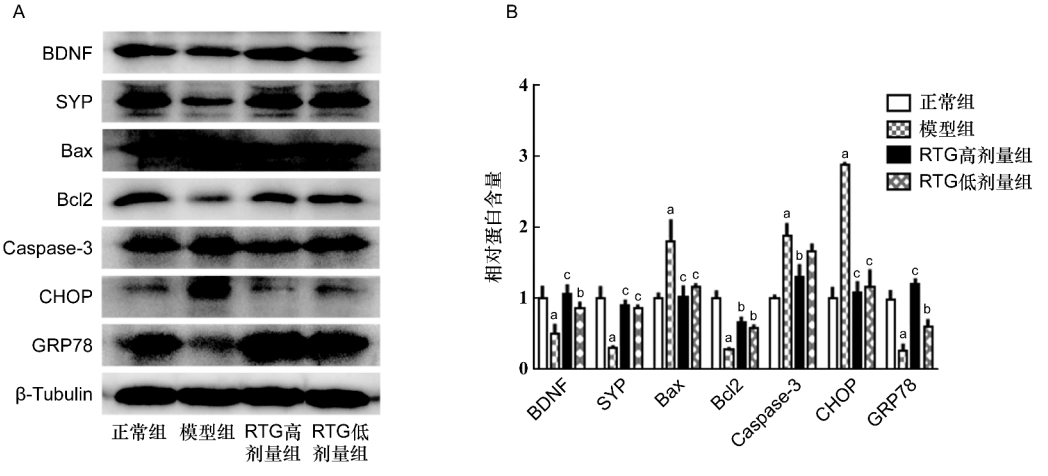
图 1 瑞替加滨对慢性应激大鼠海马病理学检查结果

2.2 海马 Nissl 染色结果 Nissl 染色结果显示正常组大鼠海马组织结构完整、层次分明，神经元细胞胞核完整，胞质透明，胞质内可见大量的尼氏小体，轮廓清晰；模型组大鼠脑组织结构疏松、胞体肿胀、胞质深染，胞质内尼氏体少且散在分布、轮廓模糊，有明显神经元变性现象；RTG 处理后大鼠组织形态结构基本恢复到与正常组接近，见图 1B。

3 RTG 的抗应激保护机制研究

为进一步确认 RTG 抗应激作用的分子机制，检测了大鼠海马中神经可塑性标志蛋白（BDNF，SYP）、

内质网应激标志蛋白(CHOP,GRP78)及凋亡相关蛋白(Bax,Bcl-2,Caspase-3)的表达水平。与正常组相比,模型组大鼠海马 BDNF,SYP,GRP78 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低,CHOP,Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著升高,而 RTG 干预可逆转上述蛋白的表达变化。结果表明 RTG 可通过缓解大鼠海马神经细胞内质网应激,减少细胞凋亡,改善神经可塑性,见图 2。



与正常组比较,a:$P<0.01$;与模型组比较,b:$P<0.05$,c:$P<0.01$

图 2 各相关蛋白的表达(A)和蛋白表达的半定量分析(B)

讨 论

社会高速发展,人们所面对的应激源日益加剧(生活节奏加快、社交压力加大、社会竞争越发激烈以及不可预期的自然灾害等),慢性应激已经成为各类慢性疾病及神经精神疾病的病因之一。低温水浸束缚是一种成熟的慢性应激模型,模拟人们在日常生活中受到的环境压力与心理压力。在本研究中,通过旷场实验、强迫游泳实验和糖水偏好实验评估大鼠抑郁样症状,行为学实验结果显示,RTG 能够显著改善慢性应激诱导的抑郁样症状,表明 RTG 具有抗应激/抑郁作用。

Sunwoo 等[10]研究发现,慢性应激可激活蓝斑-交感神经系统,增加儿茶酚胺类神经递质如肾上腺素和去甲肾上腺素的分泌,过度兴奋神经元,影响神经元蛋白质合成。错误折叠的蛋白质积累在内质网,导致内质网功能失调,引发内质网应激,从而通过 Caspase-3 通路诱发细胞凋亡,最终导致大脑神经元丢失,组织结构受损,脑功能失调,损伤行为、情绪、记忆等功能,引发神经性疾病。Western Blot 结果显示,模型组大鼠海马组织中 CHOP,Caspase-3 和 Bax 蛋白表达增加,GRP78 和 Bcl-2 蛋白表达降低,而 RTG 干预可逆转上述蛋白的表达变化。结果提示 RTG 的神经保护作用与缓解神经细胞内质网应激,减少细胞凋亡的出现,促进神经功能修复有关。

此外,慢性应激还可激活下丘脑-垂体-肾上腺轴,刺激糖皮质激素的分泌,升高的糖皮质激素与相关受体结合后,激活立早基因,通过 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binging protein,CREB)信号通路抑制 BDNF 的生成,降低神经可塑性,引发抑郁症[11-12]。BDNF 是脑内分布最广、可塑性研究最受关注的神经营养因子,对促进神经元细胞的生长、分化和存活,提高神经系统的发育,调节突触可塑性等生物学效应起着巨大作用。SYP 是一种广泛分布在神经突触前膜囊膜中的钙结合糖蛋白,参与突触小泡的胞吐和再循环以及长时程增强效应(long-term potentiation, LTP)的诱导和表达,其表达水平间接反映突触的密度和功能状态,被认为是突触前末端的特异性标志蛋白。研究发现,慢性束缚应激下调海马中 BDNF 的表达水平,损害海马 LTP,影响大鼠空间学习和记忆能力;慢性不可预见性温和应激可诱发抑郁样行为,下调 BDNF 和 SYP 的蛋白表达,损伤杏仁核外侧的突触结构可塑性[12-13]。本研究结果显示慢性应激显著降低 BDNF 和 SYP 的蛋白表达,RTG 干预后可恢复到正常水平。这些神经可塑性相关蛋白的变化可能是慢性应激抑郁样行为相关的功能和结构可塑性变化的基础,RTG 可通过激活 BDNF 信号传导途径,促进

神经元增殖、分化等神经可塑性改变,发挥抗抑郁作用。

综上所述,本研究采用低温水浸束缚方法建立大鼠慢性应激模型,诱导大鼠抑郁样症状并损伤海马结构及其可塑性。一定剂量的 RTG 能有效防治应激性抑郁样症状,并改善海马组织结构的病理学变化。进一步的实验结果提示,RTG 可通过缓解海马神经细胞内质网应激、减少细胞凋亡、保护神经组织而起到抗应激作用。

[参 考 文 献]

[1] NOBUTAKA I. Stress and atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2014, 21(5):391 – 401.

[2] GHOSAL S, HARE BD, DUMAN RS. Prefrontal cortex GABAergic deficits and circuit dysfunction in the pathophysiology and treatment of chronic stress and depression[J]. *Curr Opin Behav Sci*, 2017, 14:1 – 8.

[3] CASTREN E, HEN R. Neuronal plasticity and antidepressant actions[J]. *Trends Neurosci*, 2013, 36(5):259 – 267.

[4] DUMAN RS, AGHAJANIAN GK. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets[J]. *Science*, 2012, 338(6103):68 – 72.

[5] GUNTHORPE MJ, LARGE CH, SANKAR R. The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K^+ channel opener for the treatment of epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2012, 53(3):412 – 424.

[6] VIGIL FA, BOZDEMIR E, BUGAY V, *et al*. Prevention of brain damage after traumatic brain injury by pharmacological enhancement of KCNQ (Kv7, "M-type") K^+ currents in neurons [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(6):1256 – 1273.

[7] LI GB, LIU JY, FENG XM, *et al*. Retigabine attenuates focal cerebral ischemic injury through inhibiting mitochondria-dependent apoptotic pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(15):5018 – 5023.

[8] LI C, ZHANG J, XU HW, *et al*. Retigabine ameliorates acute stress-induced impairment of spatial memory retrieval through regulating USP2 signaling pathways in hippocampal CA1 area[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 135:151 – 162.

[9] DENCKER D, DIAS R, PEDERSEN ML, *et al*. Effect of the new antiepileptic drug retigabine in a rodent model of mania[J]. *Epilepsy Behav*, 2008, 12(1):49 – 53.

[10] SUNWOO SH, LEE JS, BAE SJ, *et al*. Chronic and acute stress monitoring by electrophysiological signals from adrenal gland[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(4):1146 – 1151.

[11] 钟淑娟,郑思超,丘秀玉,等. 丹参素钠对慢性不可预知温和应激模型小鼠的抗抑郁作用[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(23):103 – 108.

[12] LIN L, LIU GL, YANG LN. Crocin improves cognitive behavior in rats with Alzheimer's disease by regulating endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019:9454913.

[13] ORTIZ JB, MATHEWSON CM, HOFFMAN AN, *et al*. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor mediated recovery from chronic stress-induced spatial reference memory deficits[J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 40(9):3351 – 3362.

[14] ZHANG L, LUO JX, ZHANG MH, *et al*. Effects of curcumin on chronic, unpredictable, mild, stress-induced depressive-like behaviour and structural plasticity in the lateral amygdala of rats [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014, 17(5):793 – 806.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 – 04 – 19