

氨磺必利通过 TLR/NLR 通路对慢性应激抑郁大鼠的改善作用研究

邵国艳¹, 黄业晟¹, 祝梦娅¹, 张樟进²

1. 许昌市建安医院, 河南 许昌 461000

2. 香港大学深圳医院, 广东 深圳 518020

摘要: 目的 观察氨磺必利对抑郁症大鼠行为的影响, 并探究其对大鼠海马组织 Toll 样受体 (TLR)/NOD 样受体 (NLR) 通路相关蛋白表达的影响。方法 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组及低、中、高剂量 (0.3、1.2、4.8 g/kg) 氨磺必利组, 每组 10 只, 除对照组外, 其他各组大鼠给予 8 周慢性温和不可预知应激 (CUMS) 刺激制备抑郁症大鼠模型, 于造模第 7~8 周, 低、中、高剂量氨磺必利组分别 ig 给予 0.3、1.2、4.8 g/kg 氨磺必利溶液, 对照组、模型组 ig 等量生理盐水, 给药体积 10 mL/kg, 分别于造模后 (CUMS 6 周)、给药后 (CUMS 8 周) 采用糖水偏好、强迫游泳、悬尾及旷场实验评估大鼠行为; 实验结束后, 取各组大鼠海马组织, Western blotting 法检测 TLR2、NLRP1、NLRP3、ASC、TLR4 及 Caspase-1 蛋白表达情况, ELISA 法检测白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 、IL-18 水平。结果 造模后, 相较于对照组, 模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠体质量、糖水偏好指数、旷场中活动距离及站立次数降低, 强迫游泳及悬尾静止时间延长 ($P<0.05$)。相较于造模后, 给药后模型组大鼠体质量、糖水偏好指数、旷场中活动距离及站立次数降低, 强迫游泳及悬尾静止时间延长 ($P<0.05$); 低、中、高剂量氨磺必利组大鼠体质量、糖水偏好指数、旷场中活动距离及站立次数增加, 强迫游泳及悬尾静止时间缩短 ($P<0.05$)。给药后, 相较于对照组, 模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠体质量、糖水偏好指数、旷场中活动距离及站立次数降低 ($P<0.05$), 强迫游泳及悬尾静止时间延长 ($P<0.05$), 海马中 TLR2、TLR4、NLRP1、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达及 IL-6、IL-1 β 、IL-18 水平均增高 ($P<0.05$); 相较于模型组, 低、中、高剂量氨磺必利组大鼠体质量、糖水偏好指数、旷场中活动距离及站立次数增加, 且低、中剂量组依次增加, 均高于高剂量氨磺必利组 ($P<0.05$), 强迫游泳及悬尾静止时间缩短, 且低、中剂量组依次缩短, 均短于高剂量氨磺必利组 ($P<0.05$), 海马中 TLR2、TLR4、NLRP1、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达及 IL-6、IL-1 β 、IL-18 水平均降低, 且低、中剂量组依次降低, 均低于高剂量氨磺必利组 ($P<0.05$)。结论 低剂量氨磺必利可降低抑郁模型大鼠海马中 TLR/NLR 通路相关蛋白表达量, 抑制下游炎症因子释放, 从而改善 CUMS 诱导的大鼠抑郁样行为。

关键词: 氨磺必利; 慢性温和不可预知应激; 抑郁样行为; Toll 样受体; NOD 样受体; 白细胞介素

中图分类号: R964 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)01-0009-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.01.002

Improvement of amisulpride on chronic stress-depression in rats by TLR/NLR pathway

SHAO Guo-yan¹, HUANG Ye-sheng¹, ZHU Meng-ya¹, ZHANG Zhang-jin²

1. Xuchang Jian'an Hospital, Xuchang 461000, China

2. Shenzhen Hospital, University of Hong Kong, Shenzhen 518020, China

Abstract: Objective To observe the effect of amisulpride on the behavior of depression rats, and to explore the effect of amisulpride on the expression of Toll like receptor (TLR)/NOD like receptor (NLR) pathway related proteins in the hippocampus of rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, and low, medium and high dose (0.3, 1.2, 4.8 g/kg) amisulpride groups, except the control group, rats in the other group were given chronic unpredictable mild stress (CUMS) for 8 weeks to prepare depression rats model. At 7th—8th weeks, rats in the low, medium and high dose amisulpride groups were administrated with 0.3, 1.2, 4.8 g/kg amisulpride solutions by ig respectively, rats in the control group and model group were administrated with normal saline by ig, with volume of 10 mL/d. Sugar preference, forced swimming, tail suspension and open field experiments were used to evaluate the

收稿日期: 2020-06-17

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点 (联合合作) 专项 (2018YFC1705801)

作者简介: 邵国艳 (1974—), 女, 副主任医师, 研究方向为精神病学。E-mail: sy6063421@163.com

behavior of rats after modeling (6 weeks after CUMS) and after administration (8 weeks after CUMS); at the end of the above experiments, the hippocampus of rats were taken, and the expressions of TLR2, NLRP1, NLRP3, ASC, TLR4 and Caspase-1 proteins were detected by Western blotting, and the levels of IL-6, IL-1 β and IL-18 were detected by ELISA. **Results** After molding, compared with those in the control group, the body weight, sugar preference index, open field activity distance and standing times of rats in model group, the low, medium and high dose amisulpride groups were lower, forced swimming time and tail suspension time were longer ($P < 0.05$). Compared with those after molding, body weight, sugar preference index, activity distance and standing times in open field of rats in model group after administration were lower, forced swimming and tail suspension time were longer ($P < 0.05$); body weight, sugar preference index, activity distance and standing times in open field of rats in the low, middle and high dose amisulpride groups after administration were higher, forced swimming and tail suspension time were shorter ($P < 0.05$). After administration, compared with those in the control group, body weight, sugar preference index, open field activity distance and standing times of rats in model group and low, medium and high dose amisulpride groups were lower ($P < 0.05$), forced swimming and tail suspension time were longer ($P < 0.05$), the expressions of TLR2, TLR4, NLRP1, NLRP3, ASC, Caspase-1 proteins and the levels of IL-6, IL-1 β , IL-18 in hippocampus were all higher ($P < 0.05$); compared with those in the model group, the body weight, sugar preference index, open field activity distance and standing times of rats in the low, middle and high dose group were higher, and those in the low and middle dose groups increased in turn, which were higher than those in the high dose group ($P < 0.05$), the time of forced swimming and tail suspension were shortened, and those in the low and middle dose groups were shorter than those in the high dose group ($P < 0.05$), the expressions of TLR2, TLR4, NLRP1, NLRP3, ASC, Caspase-1 and the levels of IL-6, IL-1 β , IL-18 in hippocampus were all lower, and those in the low and middle dose groups were lower than those in the high dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** Low dose of sulfabiride can reduce the expression of TLR/NLR pathway related protein in hippocampus, inhibit the release of downstream inflammatory factors, and improve the depression like behavior of rats induced by CUMS.

Key words: amisulpride; chronic unpredictable mild stress; depression-like behavior; Toll like receptor; NOD like receptor; interleukin

抑郁症为临床常见精神疾病, 患者多伴随反应迟钝、心境低落、认知功能障碍等病症, 严重者有自杀倾向, 给患者及家庭造成沉重负担^[1]。近年来, 抑郁症因高发病率逐渐成为世界公共卫生问题, 据世界卫生组织预测, 到 2030 年抑郁症将成为全球经济负担最重的疾病^[2]。过往研究认为, 抑郁症与脑源性神经营养因子紊乱、神经递质失调等有关, 近年研究发现, 脑内免疫炎症状态与抑郁症发生有关^[3-4], 其中 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)/NOD 样受体(NOD like receptor, NLR) 通路和先天性免疫和炎症反应密切相关^[5]。Xu 等^[6]发现, 雌激素缺乏可导致 TLR2 及 TLR4 过表达, 激活海马中 NLR 蛋白 3 (NLR protein 3, NLRP3) 炎症小体并增加白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18 等炎症因子释放, 与抑郁焦虑样行为有关, 提示 NLRP3 炎症小体可能是雌激素缺乏所致抑郁的治疗靶标。氨磺必利为临床用于治疗精神分裂症的常用药物^[7], 近年国内外研究发现, 低剂量的氨磺必利可有效改善抑郁焦虑症状^[8-9], 然而其作用机制不清楚。本研究通过建立慢性不可预知温和应激(CUMS) 抑郁症大鼠模型, 观察氨磺必利对 CUMS 大鼠抑郁样行为的改善作用及其对海马组织 TLR/NLR 通路相关蛋白表达的影响, 以探究其治疗抑郁症的作用机制, 为临床治

疗提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

雄性健康 5 周龄 SD 大鼠 50 只, 体质量 150~160 g, 购自广东省医学实验动物中心, 许可证号: SCXK(粤)2018-0002。均于本院动物房中进行饲养, 温度为 21~23 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 40%~60%, 光照为 12 h/12 h, 本实验方案经本院动物伦理委员会批准, 操作符合动物保护 3R 原则。

1.2 主要药品、试剂和仪器

氨磺必利片(规格: 50 mg/片, 批号 180620), 购自山东齐鲁制药有限公司; TLR4 兔源抗体(货号: sc-13591)、半胱氨酸酶 Caspase-1、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)小鼠源抗体(货号: sc-271054、sc-398715) 购自美国 Santa Cruz 公司; TLR2、NLRP3、NLRP1 兔源抗体(货号: ab213676、ab214185、ab98181) 购自美国 Abcam 公司; β -actin 小鼠源抗体、羊抗兔、马抗小鼠 IgG 抗体(货号: 3700S、7074S、7076S) 购自美国 CST 公司; 大鼠 IL-6、IL-1 β 、IL-18 ELISA 试剂盒(货号: D731010、D731007、D731079) 购自生工生物工程股份(上海)有限公司; PR4100 酶标仪、1658001 凝胶电泳仪、1703853 转印记录系

统均购自美国 Bio Rad 公司。

2 方法

2.1 大鼠分组及模型制备

造模前大鼠均毛色正常有光泽,无抑郁样行为。将大鼠按照随机数字表法分为:对照组,模型组及氨磺必利低、中、高剂量(0.3、1.2、4.8 g/kg)组,每组 10 只。对照组于动物房常规饲养且不予任何外界刺激,其余各组均于饲养期间采用 CUMS 法制备抑郁症大鼠模型^[10-11],具体刺激包括鼠笼倾斜 45°(12 h)、闪光灯照射(4 h)、打湿垫料(24 h)、活动限制(2 h)、禁食(12 h)、4℃冰水游泳(5 min)、禁水(12 h)、夹尾尖(3 min,距尾根 1 cm)、60 V 电压电击足底(2 次,每隔 10 s 电击 1 次,每次维持 5 s)、噪音(3 h)、昼夜颠倒(24 h)、水平震荡鼠笼(10 min)、45℃热水游泳(5 min),每天随机给予 1 种刺激,每种刺激累计最多 3 次,以保证不可预见性。第 6 周结束,模型组及氨磺必利各组大鼠毛发发黄无光泽,活动减少,体质量降低,悬尾及强迫游泳静止时间缩短,表明出现抑郁样行为,造模成功。于第 7~8 周造模的同时氨磺必利各组分别 ig 氨磺必利溶液(生理盐水溶剂)0.3、1.2、4.8 g/kg,给药体积 10 mL/kg,给药剂量根据体表面积法计算确定^[8-9],对照组及模型组给予等剂量生理盐水。

2.2 糖水偏好实验

分别于造模 6 周(造模后)、8 周(给药后)称量并记录各组大鼠体质量后,将大鼠置于安静环境中,第 1~2 天每个鼠笼放置 2 杯纯水和 1%蔗糖水溶液(各 200 mL),每隔半天将两者位置互换,以消除位置偏好的影响,第 3 天禁水禁食,第 4 天放置 200 mL 纯水和 1%蔗糖水溶液,并称取质量,自由饮水 12 h 后将两者位置互换,24 h 后取出并称取 2 杯剩余液体质量,计算糖水偏好指数。

糖水偏好指数 = 蔗糖水消耗量 / (蔗糖水消耗量 + 纯水消耗量)

2.3 强迫游泳及悬尾静止时间检测

强迫游泳实验参考 Liu 等^[12]方法并稍加改动,大鼠被迫游泳 6 min,水温为 25℃,统计后 4 min 静止时间。静止标准:四肢不进行大幅摆动,头部浮出水面或四肢有微幅摆动保持不沉入水底的状态。

悬尾实验参考 Liu 等^[12]方法,将大鼠尾部悬于塑料杆上,使其头部离地约 50 cm,保持 6 min,统计后 4 min 静止时间。静止标准:四肢完全不动或

微幅活动。

2.4 旷场实验检测大鼠自主活动情况

采用 60 cm×60 cm×100 cm 白色箱体作为旷场,将大鼠轻放于中心位置,自由活动 5 min,采用 Any-maze 动物行为分析系统分析大鼠后 3 min 行为,以大鼠在旷场中总运动距离和站立次数反映其自主活动情况。

2.5 Western blotting 法检测大鼠海马组织中 TLR/NLR 通路相关蛋白表达

行为学实验结束后,各组大鼠均 ip 30 mg/kg 戊巴比妥钠进行麻醉,迅速断头分离脑组织,置于冰上分离海马组织,生理盐水洗净后切碎装入冻存管,液氮中速冻 1 d 后于-80℃冰箱保存。采用液氮研磨法粉碎海马组织,加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,提取海马组织中蛋白质。采用 BCA 法测定蛋白质量浓度,分别取 20 μg 蛋白与 5×SDS 上样缓冲液混匀后煮沸,依次进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜,采用 Tris 缓冲液洗膜、质量分数 5%牛奶封闭后,加入 TLR2、NLRP1、NLRP3、ASC、TLR4 及 Caspase-1 一抗(1:1 000)孵育过夜(4℃冰箱),洗膜后加入二抗(1:2 000)孵育 1.5 h(室温),洗膜后加入增强化学发光液,于 TANON 成像系统拍照并分析。

2.6 ELISA 法检测海马组织中 IL-6、IL-1β、IL-18 水平

取“2.5”项制备的中大鼠海马蛋白样品,根据说明书依次加入工作液、终止液后,迅速于 450 nm 处检测各孔吸光度(A)值,对照标准曲线计算各样品中 IL-6、IL-1β、IL-18 水平。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 25.00 进行统计学分析,计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠体质量变化

造模后,与对照组比较,模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠体质量显著降低(*P* < 0.05);模型组与氨磺必利各组间差异无统计学意义。相较于造模后,给药后模型组大鼠体质量继续降低,低、中、高剂量氨磺必利组大鼠体质量增加(*P* < 0.05)。给药后,相较于对照组,模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠体质量降低(*P* < 0.05);相较于模

型组,低、中、高剂量氨磺必利组大鼠体质量增加,且低、中剂量组依次增加,均高于高剂量氨磺必利组 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠体质量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Comparison on body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g	
		造模后	给药后
对照	—	275.62 ± 2.38	354.09 ± 5.62*
模型	—	184.71 ± 3.24*	159.13 ± 4.21* [•]
氨磺必利	0.3	187.34 ± 2.91*	206.27 ± 4.35* [•]
	1.2	188.62 ± 3.13*	231.36 ± 5.23* [•] [▲]
	4.8	186.45 ± 3.09*	192.46 ± 4.53* [•] [▲] [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [•] $P<0.05$; 与氨磺必利 0.3 g·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P<0.05$; 与氨磺必利 1.2 g·kg⁻¹ 组比较: [△] $P<0.05$; 与同组造模后比较: [•] $P<0.05$, 下表同

* $P < 0.05$ vs control group; [•] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs 0.3 g·kg⁻¹ amisulpride group; [△] $P < 0.05$ vs 1.2 g·kg⁻¹ amisulpride group; [•] $P < 0.05$ vs the same group after modeling, same as below

3.2 氨磺必利对大鼠抑郁样行为的影响

造模后,相较于对照组,模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠糖水偏好指数降低,强迫游泳及悬尾静止时间延长 ($P<0.05$); 模型组与氨磺必利各组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。相较于造模后,给药后模型组大鼠糖水偏好指数降低,强迫游泳及悬尾静止时间缩短 ($P<0.05$)。给药后,相较于对照组,模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠糖水偏好指数降低,强迫游泳及悬尾静止时间延长 ($P<0.05$); 相较于模型组,低、中、高剂量氨磺必利组大鼠糖水偏好指数增加,且低、中剂量组依次增高,均高于高剂量氨磺必利组 ($P<0.05$),强迫游泳及悬尾静止时间缩短,且低、中剂量组依次缩短,均短于高剂量氨磺必利组 ($P<0.05$)。见表 2。

3.3 氨磺必利对大鼠自主活动的影响

造模后,相较于对照组,模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠在旷场中活动的运动距离及

表 2 各组大鼠抑郁样行为比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison on depression-like behaviors of rats in each groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	糖水偏好指数/%		强迫游泳静止时间/s		悬尾静止时间/s	
		造模后	给药后	造模后	给药后	造模后	给药后
对照	—	65.49 ± 3.67	67.01 ± 4.53	25.68 ± 3.02	24.06 ± 2.95	36.52 ± 3.12	34.17 ± 3.58
模型	—	41.63 ± 4.35*	36.24 ± 3.31* [•]	58.27 ± 3.65*	68.92 ± 2.96* [•]	76.18 ± 2.94*	95.26 ± 4.19* [•]
氨磺必利	0.3	41.24 ± 3.91*	50.36 ± 5.09* [•]	59.06 ± 3.37*	51.45 ± 3.78* [•]	76.32 ± 2.74*	68.31 ± 4.67* [•]
	1.2	39.53 ± 4.15*	56.71 ± 4.14* [•] [▲]	58.94 ± 2.95*	47.67 ± 2.84* [•] [▲]	75.91 ± 3.09*	53.74 ± 3.75* [•] [▲]
	4.8	39.61 ± 4.09*	44.82 ± 3.78* [•] [▲] [△]	59.43 ± 3.14*	55.82 ± 3.02* [•] [▲] [△]	78.83 ± 3.08*	73.59 ± 4.23* [•] [▲] [△]

站立次数均减少 ($P<0.05$); 模型组与氨磺必利各组间差异无统计学意义。相较于造模后,给药后模型组大鼠在旷场中活动的运动距离及站立次数均减少,低、中、高剂量氨磺必利组大鼠在旷场中活动的运动距离及站立次数均增多 ($P<0.05$)。给药后,相较于对照组,模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠在旷场中活动的运动距离及站立次数均减少 ($P<0.05$); 相较于模型组,低、中、高剂量氨磺必利组大鼠在旷场中活动的运动距离及站立次数均增多 ($P<0.05$),且低、中剂量组依次增多,均多于高剂量氨磺必利组 ($P<0.05$)。见表 3。

3.4 氨磺必利对大鼠海马组织 TLR/NLR 通路相关蛋白表达的影响

给药后,相较于对照组,模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠海马中 TLR2、TLR4、NLRP1、NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白表达均增加 ($P<0.05$); 相较于模型组,低、中、高剂量氨磺必利组大鼠海马中 TLR2、TLR4、NLRP1、NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$),且低、中剂量组依次降低,均低于高剂量氨磺必利组 ($P<0.05$)。见图 1 和表 4。

3.5 氨磺必利对大鼠海马组织炎症水平的影响

给药后,相较于对照组,模型组及低、中、高

表 3 各组大鼠自主活动比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Comparison of autonomous activities in 5 groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	运动距离/m		站立次数/次	
		造模后	给药后	造模后	给药后
对照	—	139.37 ± 5.26	140.81 ± 4.03	20.68 ± 1.02	21.06 ± 1.95
模型	—	105.46 ± 4.01*	94.84 ± 3.42*•	8.27 ± 1.61*	5.02 ± 0.96*•
氨磺必利	0.3	106.71 ± 3.67*	114.93 ± 3.18*#•	8.06 ± 0.87*	13.45 ± 1.78*#•
	1.2	105.82 ± 2.49*	122.74 ± 4.26*#▲•	8.51 ± 0.95*	16.67 ± 1.84*#▲•
	4.8	105.94 ± 3.32*	110.23 ± 2.15*#▲△•	7.94 ± 1.13*	10.82 ± 1.25*#▲△•

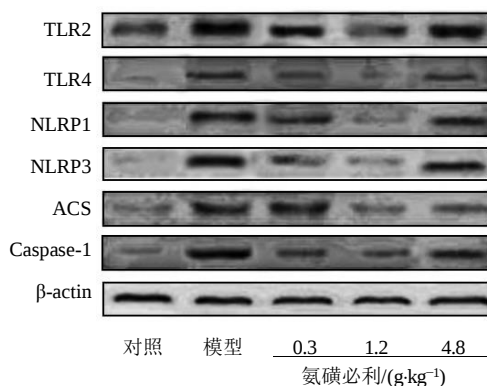


图 1 各组大鼠海马组织 TLR/NLR 通路相关蛋白表达 Western blotting 结果

Fig. 1 Western blotting results of TLR/NLR pathway related proteins expression in hippocampus of rats in each group

剂量氨磺必利组大鼠海马中 IL-6、IL-1 β 、IL-18 水平增高 ($P < 0.05$)；相较于模型组，低、中、高剂量氨磺必利组大鼠海马中 IL-6、IL-1 β 、IL-18 水平降低 ($P < 0.05$)，且低、中剂量组依次降低，均低于高剂量氨磺必利组 ($P < 0.05$)。见表 5。

4 讨论

随着抑郁症发病率逐年增高，抗抑郁药物的研发也更多被关注，然而新药研发周期较长，且需经过严格临床试验才可应用于临床，因此对现有药物的挖掘成为临床研究的热点之一^[13]。临床研究发现，低剂量（50~200 mg/d）氨磺必利可优先阻滞突触前多巴胺自身受体，使多巴胺脱抑制性释放，增加多巴胺含量，进而减轻抑郁症状^[14]。CUMS 模

表 4 各组大鼠海马组织 TLR/NLR 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Comparison on TLR/NLR pathway related protein expression in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量					
		TLR2	TLR4	NLRP1	NLRP3	ASC	Caspase-1
对照	—	0.89 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.02
模型	—	2.21 ± 0.05*	0.61 ± 0.02*	1.06 ± 0.03*	1.22 ± 0.04*	0.93 ± 0.01*	1.20 ± 0.04*
氨磺必利	0.3	1.15 ± 0.05*#	0.35 ± 0.01*#	0.57 ± 0.02*#	0.48 ± 0.01*#	0.69 ± 0.05*#	0.46 ± 0.03*#
	1.2	1.07 ± 0.04*#▲	0.18 ± 0.01*#▲	0.19 ± 0.01*#▲	0.21 ± 0.03*#▲	0.26 ± 0.03*#▲	0.35 ± 0.02*#▲
	4.8	1.28 ± 0.02*#▲△	0.49 ± 0.02*#▲△	0.95 ± 0.03*#▲△	0.96 ± 0.04*#▲△	0.74 ± 0.02*#▲△	0.89 ± 0.04*#▲△

表 5 各组大鼠海马组织炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Comparison on levels of inflammatory factors in hippocampus tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	IL-18/(ng·L ⁻¹)
对照	—	81.42 ± 7.21	133.14 ± 9.64	96.24 ± 9.48
模型	—	136.35 ± 8.34*	241.42 ± 12.58*	221.45 ± 12.09*
氨磺必利	0.3	113.26 ± 9.71*#	207.16 ± 9.76*#	186.62 ± 10.25*#
	1.2	97.54 ± 9.36*#▲	155.31 ± 10.18*#▲	152.50 ± 12.32*#▲
	4.8	125.41 ± 8.13*#▲△	220.19 ± 9.69*#▲△	203.68 ± 11.43*#▲△

型动物可表现出糖分摄入减少、体质量增加缓慢、自主探索能力减退等类似于人类抑郁症患者症状,常被用来研究抑郁症潜在机制^[11]。本研究通过每日对大鼠随机进行闪光灯照射、夹尾等不可预见的外界刺激,以模拟慢性应激性抑郁症的诱发过程,结果发现给予 6 周刺激后,大鼠活动减少,体质量及糖水偏好指数降低,悬尾及强迫游泳静止时间延长,旷场运动距离及站立次数减少。其中体质量可直接反映动物进食和消化等生理变化,对糖水喜好程度是体现动物快感及对奖赏敏感程度的重要指标,悬尾及强迫游泳实验中动物静止不动的时间可用于评价动物的抑郁程度,旷场实验中动物自主活动情况则可反映其自主探索能力^[11-12],表明经 CUMS 刺激后,大鼠快感及自主探索能力缺失、抑郁样行为明显,提示模型制备成功。于第 7~8 周连续给予氨磺必利,结果发现,氨磺必利各组大鼠体质量、糖水偏好指数、旷场运动距离及站立次数增加,悬尾及强迫游泳静止时间缩短,表明氨磺必利可减轻 CUMS 大鼠抑郁样行为。本研究还发现,低、中剂量即 0.3、1.2 g/kg 氨磺必利的改善效果优于高剂量(4.8 g/kg),与临床发现一致^[8-9],提示低、中剂量氨磺必利可有效改善 CUMS 大鼠抑郁症状。

TLR 和 NLR 受体可与病原物识别,二者启动的 TLR/NLR 通路及机体中炎症密切相关,其中 TLR 可同时识别细胞外和细胞内刺激,NLR 可识别胞浆内刺激。TLR 主要包括 TLR2、TLR4,可通过促进核转录因子 κB (NF- κB) 核移位,启动 IL-6、IL-1 β 等炎症因子合成及分泌,也可通过激活 NLRP1 及 NLRP3 炎症小体,促进炎症性 Caspase-1 活化,促进 IL-18、IL-1 β 等细胞因子释放。研究发现,环境刺激可导致 IL-1 β 、IL-6 细胞因子分泌、NLRP3 炎症小体活化等炎症过程,神经系统改变及重度抑郁症发生^[15-16]。临床及动物实验均发现抑郁症与 IL-1 β 、IL-18 水平升高及 NLRP3 炎症小体激活有关^[17-18]。与以上研究一致,本研究中模型组及低、中、高剂量氨磺必利组大鼠海马中 TLR2、TLR4、NLRP1、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白及 IL-6、IL-1 β 、IL-18 水平均较对照组显著升高,进一步表明模型诱导抑郁症大鼠海马组织中 TLR/NLR 通路被激活,且下游炎症因子水平升高。研究发现,敲除神经肽 3 基因可通过抑制 NLRP3 与 ASC 蛋白连接,降低 Caspase-1 表达,抑制炎症因子释放,逆转 CUMS 诱导的小鼠抑郁样行为^[19]。Su 等^[20]进一步证实,

敲除 NLRP3 基因小鼠经 CUMS 刺激后未表现出抑郁样行为。Wang 等^[21]通过转录组分析发现,针刺和氟西汀可通过逆转海马中炎症反应相关(包括 TLR 及 NLR 受体信号通路)基因的上调,实现对抑郁症大鼠的改善作用。以上研究提示 TLR 及 NLR 受体信号通路可能为治疗抑郁症的靶标。本研究中发现,给予氨磺必利治疗后,大鼠海马组织中 TLR2、TLR4、NLRP1、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白及 IL-6、IL-1 β 、IL-18 水平均降低,推测氨磺必利对 CUMS 大鼠抑郁样行为的改善作用与抑制 TLR/NLR 通路激活,减少炎症因子释放有关,且低、中剂量氨磺必利对抑郁症大鼠海马组织炎症反应的抑制作用优于高剂量氨磺必利。

本研究结果表明低剂量氨磺必利可降低 CUMS 大鼠海马中 TLR/NLR 通路蛋白表达,抑制下游炎症因子释放,改善 CUMS 诱导的大鼠抑郁样行为。然而由于氨磺必利的特殊性,其治疗抑郁症的最佳作用剂量需临床医师结合经验进行判断,可优先采用低剂量,并根据症状改善情况进行调整,以达到最优治疗效果。另外,本研究不足之处是未采用其他抗抑郁药物作为阳性对照进行药效对比分析,以后需要进行更多的动物实验及临床研究来探讨氨磺必利对抑郁症的治疗作用及其可能涉及的其他机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Park C, Rosenblatt J D, Brietzke E, et al. Stress, epigenetics and depression: A systematic review [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 102: 139-152.
- [2] Kupfer D J, Frank E, Phillips M L. Major depressive disorder: New clinical, neurobiological, and treatment perspectives [J]. *Focus (Am Psychiatr Publ)*, 2016, 14(2): 266-276.
- [3] Dean J, Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view [J]. *Asian J Psychiatr*, 2017, 27: 101-111.
- [4] Leonard B E. Inflammation and depression: A causal or coincidental link to the pathophysiology? [J]. *Acta Neuropsychiatr*, 2018, 30(1): 1-16.
- [5] Henderson J, Bhattacharyya S, Varga J, et al. Targeting TLRs and the inflammasome in systemic sclerosis [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 192: 163-169.
- [6] Xu Y, Sheng H, Bao Q, et al. NLRP3 inflammasome activation mediates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behavior and hippocampal inflammation

- in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 56: 175-186.
- [7] 李 静, 袁 捷, 周雪丽, 等. 氨磺必利与氯氮平治疗阴性症状为主的精神分裂症的疗效及安全性比较 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(5): 691-695.
- [8] 范思海, 苏艳南, 原红莲. 小剂量氨磺必利抗抑郁作用的研究 [J]. 中国药物与临床, 2019, 19(6): 927-929.
- [9] Rittmannsberger H. Amisulpride as an augmentation agent in treatment resistant depression: A case series and review of the literature [J]. *Psychiatr Danub*, 2019, 31(2): 148-156.
- [10] 邓海峰, 孙纁利, 吴 琼, 等. 毛蕊花糖苷通过调控 BDNF-TrkB 信号通路改善 CUMS 大鼠的抑郁样行为 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(9): 1633-1637.
- [11] Hao Y, Ge H, Sun M, *et al.* Selecting an appropriate animal model of depression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, doi: 10.3390/ijms20194827.
- [12] Liu S, Xu S, Wang Z, *et al.* Anti-depressant-like effect of sinomenine on chronic unpredictable mild stress-induced depression in a mouse model [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7646-7653.
- [13] Cipriani A, Furukawa T A, Salanti G, *et al.* Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: A systematic review and network meta-analysis [J]. *Focus (Am Psychiatr Publ)*, 2018, 16(4): 420-429.
- [14] Wang S M, Han C, Lee S J, *et al.* Second generation antipsychotics in the treatment of major depressive disorder: An update [J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52(3): 159-172.
- [15] Kohler O, Krogh J, Mors O, *et al.* Inflammation in depression and the potential for anti-inflammatory treatment [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2016, 14(7): 732-742.
- [16] Barnes J, Mondelli V, Pariante C M. Genetic contributions of inflammation to depression [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(1): 81-98.
- [17] Kaufmann F N, Costa A P, Ghisleni G, *et al.* NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 64: 367-383.
- [18] Dang R, Guo Y Y, Zhang K, *et al.* Predictable chronic mild stress promotes recovery from LPS-induced depression [J]. *Mol Brain*, 2019, 12(1): 42.
- [19] Li Z Q, Yan Z Y, Lan F J, *et al.* Suppression of NLRP3 inflammasome attenuates stress-induced depression-like behavior in NLGN3-deficient mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(4): 933-940.
- [20] Su W J, Zhang Y, Chen Y, *et al.* NLRP3 gene knockout blocks NF- κ B and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 322: 1-8.
- [21] Wang Y, Jiang H, Meng H, *et al.* Genome-wide transcriptome analysis of Hippocampus in rats indicated that TLR/NLR signaling pathway was involved in the pathogenesis of depressive disorder induced by chronic restraint stress [J]. *Brain Res Bull*, 2017, 134: 195-204.

[责任编辑 刘东博]