

GSK650394 对慢性应激 抑郁症模型大鼠行为及海马神经营养的调节作用

刘丹¹, 蔺晓源³, 杨蕙³, 刘彤彤², 刘平安³, 孟盼^{2*}

(湖南中医药大学第一附属医院 1. 风湿科; 3. 医学实验中心, 湖南长沙 410007;

2. 湖南中医药大学 科技创新中心, 湖南长沙 410208)

摘要:目的 探讨血清和糖皮质激素调节蛋白激酶 1(SGK1)抑制剂 GSK650394 对抑郁症模型大鼠抑郁样行为及海马神经营养的调节作用。方法 将 SD 大鼠随机分为对照组、抑郁模型(慢性温和不可预见性应激加孤养)组、GSK650394 (2.8 g/L,按 1 mL/kg 腹腔注射)干预组;采用强迫游泳、糖水消耗、Morris 水迷宫实验观察模型动物的情绪行为变化;用 ELISA 检测大鼠海马血浆和血清中皮质酮(CORT)、5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)含量;用 Western blot 检测海马中脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养素 3(NT-3)、神经生长因子(NGF)的表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠蔗糖糖水偏食度显著降低、游泳不动时间增加($P<0.01$)、逃避潜伏期(EL)、目标象限的潜伏时间(Lat. T)均显著延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$);血浆 CORT 显著升高($P<0.01$)、血清 5-HT、NE 和海马 NT-3、BDNF、NGF 表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,GSK650394 可显著增加蔗糖水偏食度、降低游泳不动时间($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、缩短 EL、Lat. T($P<0.05$)、降低血浆 CORT 的含量($P<0.01$)、增加血清 5-HT、NE 的含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$);促进海马 NT-3、BDNF、NGF 的表达($P<0.05$)。结论 SGK1 抑制剂 GSK650394 可显著改善抑郁样行为,其机制可能与促进海马神经营养有关。

关键词: 抑郁症;糖皮质激素调节蛋白激酶 1(SGK1);GSK650394;海马;神经营养素

中图分类号:R749.4 文献标志码:A

Regulating effects of GSK650394 on behavior and hippocampal neurotropy in chronic stress model of depression in rats

LIU Dan¹, LIN Xiao-yuan³, YANG Hui³, LIU Tong-tong², LIU Ping-an³, MENG Pan^{2*}

(1. Department of Rheumatology; 3. Center for Medical Research, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007; 2. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of serum and glucocorticoid-regulated kinase 1(SGK1) inhibitor GSK650394 on depression-like behaviors and hippocampus neurotropy in depressive model rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, depression model group and GSK650394 group. Depression model was established by chronic mild unpredictable stress. The behavioral changes of the SD rats were observed by forced swimming, 1% sugar consumption test and Morris water maze. The changes of corticosterone(CORT) and monoamine neurotransmitters in plasma and serum were observed by ELISA. The changes of BDNF, NT-3 and NGF

收稿日期:2020-09-11 修回日期:2021-07-02

基金项目:湖南省自然科学基金优秀青年项目(2020JJ3027);湖南省科技创新人才计划优秀博士后创新人才项目(2020RC2060);长沙市杰出创新青年培养计划(kq2009018);湖南省科技厅创新引导项目(2017SK50306);湖南省中医药科研计划项目重点课题(202019)

*通信作者(corresponding author):mengpan0822@163.com

in hippocampus were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the model group showed that sucrose preference decreased and swimming immobility time increased significantly ($P < 0.01$). Escape latency (EL) and latency time (Lat.T) prolonged significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and the content of CORT in plasma increased significantly ($P < 0.01$). The content of 5-HT, NE in serum and the expression of BDNF, NT-3, NGF in hippocampus significant increased in the model group. Compared with model group, GSK650394 significantly increased sucrose preference, decreased immobility time ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), shortened EL and Lat.T ($P < 0.05$), decreased the content of CORT in plasma ($P < 0.01$) and enhanced the level of 5-HT and NE in serum ($P < 0.01$) and also promoted the expression of NT-3, BDNF and NGF in hippocampus. **Conclusions** SGK1 inhibitor GSK650394 can significantly relieve depression like behavior potentially through improving the nutrition profile of neurotrophin in hippocampus.

Key words: depression; glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1); GSK650394; hippocampus; neurotrophin

据世界卫生组织估计,全球约有 3.5 亿人患有抑郁症,高达 40% 的患者对抗抑郁药物反应不充分^[1]。在过去的 30 年里,临床上多数抗抑郁药物均通过增加脑内单胺神经递质起效,有效率仅为 60% 至 65%,缓解率为 30%,尽管这些药物在给药后数小时内会影响神经递质系统,但症状的改善通常需要治疗数周(4 至 6 周)后才显现^[2]。故而,亟待从新的角度和视野研发更为有效的抗抑郁药物。血清和糖皮质激素调节蛋白激酶 1 (serum and glucocorticoid-regulated kinase 1, SGK1) 是多种抑郁症相关信号传导通路和细胞磷酸化级联反应的交汇点^[3]。多项研究表明,SGK1 表达或功能的增加与抑郁症的致病性应激假说有关,其机制主要包括两方面,其一 SGK1 是介导下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) 轴失调的关键介质,其二 SGK1 可负调控脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 等神经营养素家族成员,从而抑制神经发生^[4]。GSK650394 是一个新颖的 SGK1 抑制剂,研究表明, GSK650394 可抵消 HPC03A/07 人海马祖细胞中皮质醇诱导的神经再生的减少及 Hedgehog 信号通路的改变^[5]。GSK650394 具有良好的抗抑郁功效,然其机制尚不清楚。基于此,本实验拟通过 SGK1 抑制剂,初步探明 SGK1 在抑郁症大鼠抑郁样情绪行为中发挥的保护作用及其对神经营养的调节机制,以期为基于 SGK1 激酶的现代抗抑郁药物提供依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 220~

240 g, 35 只,购自湖南斯莱科景达动物中心,动物合格证号:43004700015235。

1.1.2 药物与试剂:GSK650394 (Sigma-Aldrich 公司);BDNF 一抗 (Ambion 试剂公司);羊抗兔 IgG 二抗 (Vector 公司产品);ECL 化学发光试剂盒、组织蛋白抽提试剂盒 (北京中衫金桥有限公司);Protein Marker (MBI Fermentas 公司产品);聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) (Merck 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠的分组及处理:将大鼠分为对照组、抑郁模型组、GSK650394 组。取 GSK650394 药物粉末,溶解于 2 μ L 的 DMSO 中,采用蒸馏水配成终浓度为 2.8 g/L 的溶液,现用现配。按照 1 mL/kg 腹腔注射,每周注射 1 次。空白组注射等体积的蒸馏水,模型组注射等体积的配药溶剂。

各组单笼孤养,每天随机给予不同刺激,共 21 d,包括:倾笼 45°、潮湿垫料 (24 h)、禁食 (24 h)、夹尾 (4 min)、禁水 (24 h)、昼夜颠倒 (24 h)、4 $^{\circ}$ C 冰水浴 (5 min)、噪音 (1 h),每天随机实施 1 种刺激且每种刺激 5 d 之内不重复。21 d 后,各组大鼠分别进行行为学检测。空白组每笼 5 只饲养,不给予任何刺激。

1.2.2 行为学检测

1.2.2.1 糖水偏好实验^[6]:禁水 12 h,测试期间给予每只大鼠一瓶 1% 蔗糖水和一瓶蒸馏水,分别测定大鼠 1 h 摄入 1% 蔗糖水、蒸馏水的重量,并计算糖水偏好度。计算公式为:糖水偏好度 = 糖水消耗/总消耗 \times 100%。

1.2.2.2 强迫游泳实验:将大鼠置于玻璃圆柱体的水缸中 (高、直径分别为 50 cm、20 cm),水深约

40 cm。实验开始后适应 1 min,采用小动物行为分析系统(西班牙 Panlab, Smart3.0)记录 4 min 内大鼠的游泳不动时间。

1.2.2.3 Morris 水迷宫测试:实验第 19 天开始对大鼠进行训练,若 1 min 内未找到平台,则将其牵引至平台处停留 20 s,学习持续 4 d。第 23 天将大鼠从平台正对的象限处面向池壁放入,采用小动物行为分析系统记录其爬上平台的时间,即逃避潜伏期(escape latency, EL);于第 23 天撤除平台,由同一入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠穿越目标象限的次数(target quadrant)和目标象限的潜伏时间(latency time, Lat. T)。

1.2.3 血液及脑组织样本的采集:腹主动脉取血,每组一半数量的大鼠血液采用抗凝管收集,另一半大鼠血液采用常规采血管放置直至凝血,3 000 r/min 离心 10 min,分别取上清-0 ℃冰箱保存。冰上取海马组织后,立即放入液氮中速冻,再转移至-80 ℃冰箱备用。

1.2.4 ELISA 检测血液中 CORT、5-HT、NE 的含量:根据试剂盒说明书,采用 ELISA 测定各组大鼠血浆中皮质酮(corticosterone, CORT)及血清中 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)的含量。

1.2.5 Western blot 检测海马中蛋白的表达:冻存的海马中加入 RIPA 裂解液冰上匀浆,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液,测定蛋白质含量,保存待用。配置 15%浓缩胶与 10%分离胶,上样、电泳、转膜、封闭,4 ℃过夜,加入相应的一抗,孵育,以 GAPDH 为内参。采用近红外双色激光成像系统测量吸光度值,计算各组目标蛋白的相对表达量,进行统计分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析,

实验数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用单因素方差分析(One-way Anova),多重比较方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用 Tambane's T^2 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠糖水偏好度和强迫游泳不动时间的比较

与对照组比较,抑郁模型组大鼠蔗糖水偏爱度显著降低,游泳不动时间增加($P<0.01$);与模型组比较,GSK650394 组大鼠蔗糖偏爱度升高,不动时间显著下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)(表 1)。

表 1 GSK650394 对抑郁大鼠糖水偏好和不动时间的影响

Table 1 Effect of GSK650394 on sugar water preference and immovable time of depressive rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

group	sugar water preference/%	immovable time/s
control	87.2±11.2	11.6±3.8
model	45.6±9.4*	78.5±12.1*
GSK650394	76.7±10.1 [#]	30.4±15.3 ^{##}

* $P<0.01$ compared with control group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ compared with model group.

2.2 各组大鼠 Morris 水迷宫测试结果比较

与对照组比较,模型组大鼠 EL、Lat. T 均显著延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,GSK650394 组大鼠的 EL、Lat. T 均显著缩短($P<0.05$)(表 2)。

2.3 各组大鼠血浆 CORT 含量的变化

与对照组比较,模型组的血浆 CORT 明显增高($P<0.01$)。与模型组比较,GSK650394 组可降低血浆 CORT 的含量($P<0.05$)(表 3)。

表 2 GSK650394 对各组大鼠水迷宫学习记忆的影响

Table 2 Effect of GSK650394 on learning and memory in water maze test on rats in each group($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

group	Morris water maze			
	EL/s	crossing target	Lat. T/s	D%
control	22.1±6.7	15.7±3.8	6.1±2.2	19.4±3.9
model	47.7±7.5*	2.7±0.8**	19.6±3.6*	8.9±3.3*
GSK650394	30.1±5.2 [#]	8.8±1.9	9.7±4.5 [#]	12.7±2.6

D. distance; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control; [#] $P<0.05$ compared with model.

表3 GSK650394对血浆CORT含量的影响

Table 3 Effect of GSK650394 on the content of CORT in plasma ($\bar{x}\pm s, n=10$)

group	CORT/(pg/mL)
control	20.2±3.6
model	41.4±9.7*
GSK650394	26.7±4.3 [#]

* $P<0.01$ compared with control; [#] $P<0.05$ compared with model.

2.4 各组大鼠血清5-HT、NE、BDNF的变化

与对照组比较,模型组的血清5-HT、NE、BDNF显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,GSK650394组可增加血清5-HT、NE、BDNF的含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(表4)。

表4 GSK650394对血清5-HT、NE和BDNF含量的影响

Table 4 Effect of GSK650394 on the content of 5-HT, NE and BDNF in serum ($\bar{x}\pm s, n=10$)

group	5-HT/(pg/mL)	NE/(pg/mL)	BDNF/(ng/mL)
control	282.1±38.1	162.1±19.5	60.8±17.2
model	75.7±14.2**	54.1±12.3**	34.3±12.4*
GSK650394	225.3±23.4 [#]	122.3±17.6 [#]	56.4±16.5 [#]

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control; [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$ compared with model.

2.5 各组大鼠海马BDNF、NT-3、NGF表达的影响

与对照组比较,模型组海马NT-3、BDNF、NGF表达明显减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与模型组比较,GSK650394组大鼠海马NT-3、BDNF、NGF表达明显增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$)(图1,表5)。

表5 GSK650394对海马BDNF、NT-3、NGF表达的影响

Table 5 Effect of GSK650394 on the expression of BDNF, NT-3, NGF hippocampus ($\bar{x}\pm s, n=8$)

group	BDNF	NT-3	NGF
control	0.87±0.09	0.84±0.11	0.81±0.05
model	0.31±0.06**	0.34±0.07*	0.29±0.15**
GSK650394	0.75±0.14 [#]	0.72±0.08 [#]	0.67±0.10 [#]

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control; [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$ compared with model.

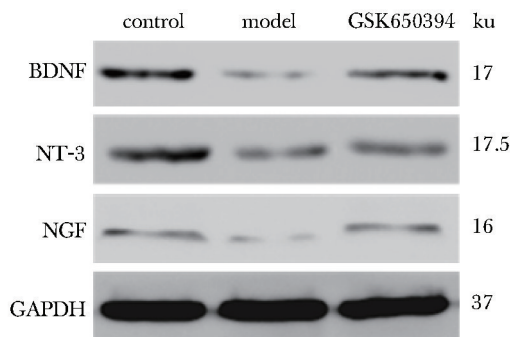


图1 GSK650394对海马BDNF、NT-3、NGF表达的影响
Fig 1 Effect of GSK650394 on the expression of BDNF, NT-3, NGF in hippocampus

3 结论

目前,抑郁症是最常见的精神疾病,且全球每年80万自杀者中约有50%发生在抑郁症患者中,与普通人群相比,进行性肌营养不良症(major depressive disorder, MDD)患者死于自杀的风险高出20倍^[7]。其特征是显著且持续的情绪低落、兴趣丧失、自尊低下、认知障碍、意志力下降和学习记忆能力减退等^[8]。本研究结果表明,SGK1抑制剂GSK650394可显著增加蔗糖水偏食度、降低游泳不动时间,缩短EL、Lat. T,说明SGK1抑制剂能显著改善抑郁样情绪行为。

应激所调控的糖皮质激素信号和抑郁症存在复杂的交互关系已得到了广泛的证实,即糖皮质激素与其受体结合后以二聚体形式转位入核,通过结合糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)反应元件促进SGK1基因的转录表达^[9]。SGK1不仅是CORT信号系统的下游靶点,而且能在无糖皮质激素的条件下潜在维持GR的活性,增强CORT的负面效应^[10]。本研究结果表明,SGK1抑制剂能显著降低血浆CORT的水平,提示GSK650394可有效阻断机体HPA轴的高亢状态。抑郁症发生时,CORT水平升高以及HPA轴功能亢进是比较典型的病理学特征。应激引起的高水平CORT与GR结合后可活化肝脏酪氨酸氨基转移酶和色氨酸吡咯化酶,降低血液中5-HT和NE前体的数量,继而减少5-HT和NE的合成,加剧抑郁症的发生发展^[11-12]。本研究结果表明,SGK1抑制剂能显著增加血清5-HT、NE的含量,提示GSK650394具有良好的抗抑郁功效,其发挥抗抑郁的功效可能与阻断机体的持续应

激高亢状态,导致单胺递质水平增加有关。

神经营养障碍是神经可塑性受损的关键基础,且越来越多的证据表明抗抑郁治疗可能通过增强神经营养保护神经元细胞的结构和功能并对突触可塑性发挥有益作用。BDNF、NGF、NT-3 被认为是神经营养素家族中的重要成员,其中 BDNF 已成为公认的抑郁症诊断的生物标志物,在神经元的维持和存活、促进神经再生、加快突触生长和突触可塑性中均起到重要作用^[13-14]。NGF 可参与受损神经元的修复,并对病理状态下海马可塑性起到了重要的调节作用^[15]。NT-3 可调节神经干细胞的增殖和分化,并能促进神

经祖细胞增殖分化为功能成熟的神经元^[16]。研究表明,神经营养信号可直接或间接受到 SGK1 的调控^[17],SGK1 可能通过影响 BDNF 等神经营养因子而发挥神经保护的作用。本实验结果表明,GSK650394 可上调海马 BDNF、NT-3、NGF 的表达,说明 SGK1 抑制剂可能通过维持海马神经元的增生和存活、促进神经干细胞的增殖和分化、加强神经营养的突触可塑性等不同角度,共同发挥营养神经的功效。

综上所述,SGK1 抑制剂具有显著的缓解抑郁样行为及抑制 HPA 轴高亢的功效,其发挥抗抑郁的机制可能与促进海马神经营养相关。

参考文献:

- [1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990—2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2018,392:1789-1858.
- [2] Shadrina M, Bondarenko EA, Slominsky PA. Genetics factors in major depression disease[J]. *Front Psychiatry*, 2018,9:334. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00334.
- [3] Cattaneo A, Riva MA. Stress-induced mechanisms in mental illness: a role for glucocorticoid signalling[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016,160:169-174.
- [4] Dattilo V, Amato R, Perrotti N, *et al.* The emerging role of SGK1 (serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1) in major depressive disorder: hypothesis and mechanisms [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 826. doi: 10.3389/fgene.2020.00826.
- [5] Anacker C, Cattaneo A, Musaelyan K, *et al.* Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013,110:8708-8713.
- [6] 韩远山, 王宇红, 孟盼, 等. 百事乐胶囊对抑郁模型大鼠海马神经元显微结构及凋亡的影响[J]. *时珍国医国药*, 2015,26:44-47.
- [7] Sowa-Kućma M, Pańcyszyn-Trzewik P, Misztak P, *et al.* Vortioxetine: a review of the pharmacology and clinical profile of the novel antidepressant [J]. *Pharmacol Rep*, 2017,69:595-601.
- [8] Luscher B, Fuchs T. GABAergic control of depression-related brain states[J]. *Adv Pharmacol*, 2015,73:97-144.
- [9] Meng P, Zhu Q, Yang H, *et al.* Leonurine promotes neurite outgrowth and neurotrophic activity by modulating the GR/SGK1 signaling pathway in cultured PC12 cells [J]. *Neuroreport*, 2019,30:247-254.
- [10] Anacker C, Cattaneo A, Luoni A, *et al.* Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38:872-883.
- [11] 于莹, 张功, 韩涛, 等. 中成药辅助治疗肝郁脾虚型抑郁症的网状 Meta 分析[J]. *中国中药杂志*, 2019,44: 5217-5224.
- [12] 刘效巍, 许晶, 李晓秋, 等. 慢性应激抑郁模型大鼠脑内 5HT_(1A) 和 5-HT_(2A) 受体的变化[J]. *基础医学与临床*, 2004:174-178.
- [13] Wang X, Xie Y, Zhang T, *et al.* Resveratrol reverses chronic restraint stress-induced depression-like behaviour: Involvement of BDNF level, ERK phosphorylation and expression of Bcl-2 and Bax in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2016,125:134-143.
- [14] 王涵, 李娜, 文威, 等. 慢性应激致大鼠抑郁行为涉及海马形态变化和 BDNF 表达降低[J]. *基础医学与临床*, 2011,31:565-569.
- [15] Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, *et al.* Nerve growth factor: a focus on neuroscience and therapy [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2015,13:294-303.
- [16] Yang Z, Zhang A, Duan H, *et al.* NT3-chitosan elicits robust endogenous neurogenesis to enable functional recovery after spinal cord injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015,112:13354-13359.
- [17] Schniepp R, Kohler K, Ladewig T, *et al.* Retinal colocalization and *in vitro* interaction of the glutamate transporter EAAT3 and the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 [correction] [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004,45:1442-1449.