

TSPO 配体 YL-IPA08 对脂多糖诱导的小鼠抑郁和焦虑样行为的缓解作用及其抗炎机制

崔林雨¹, 王婧雅², 段婧瑶³, 李云峰², 代威^{3*}, 郭文治^{4*}

¹山西医科大学麻醉学院, 山西太原 030001; ²军事科学院军事医学研究院军事认知与脑科学研究所, 北京 100850;

³军事科学院军事医学研究院, 北京 100850; ⁴解放军总医院第七医学中心麻醉科, 北京 100010

[中图分类号] R749.4 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0458.2024.0830

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 崔林雨, 王婧雅, 段婧瑶, 等. TSPO 配体 YL-IPA08 对脂多糖诱导的小鼠抑郁和焦虑样行为的缓解作用及其抗炎机制[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(12): 1417-1425.

[收稿日期] 2024-04-09

[录用日期] 2024-05-27

[上线日期] 2024-08-30

[摘要] 目的 探究 18 kD 转运蛋白(TSPO)配体 YL-IPA08 对脂多糖(LPS)诱导的小鼠抑郁、焦虑样行为和认知功能障碍的缓解作用及相关抗炎机制。方法 (1)50 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 5 组: 对照组、LPS 模型组、LPS+1.0 mg/kg YL-IPA08 组、LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08 组和 3.0 mg/kg YL-IPA08 组, 每组 10 只。LPS 模型组、LPS+1.0 mg/kg YL-IPA08 组及 LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08 组小鼠在第 1 天和第 8 天各经腹腔注射 1 次 LPS(0.5 mg/kg); LPS+1.0 mg/kg YL-IPA08 组、LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08 组和 3.0 mg/kg YL-IPA08 组小鼠连续 13 d 灌胃给予相应浓度的 YL-IPA08(1.0 或 3.0 mg/kg), 1 次/d。第 9~12 天依次采用开场实验、悬尾实验、强迫游泳实验、新物体识别实验和高架十字迷宫实验评估各组小鼠的抑郁、焦虑样行为及认知功能。Western blotting 检测小鼠前额叶皮质突触后致密蛋白 95(PSD95)和脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平。(2)BV2 小鼠小胶质细胞随机分为 5 组: 对照组(磷酸盐缓冲液孵育 1 h)、LPS 模型组(1 mg/L LPS 孵育 6 h)、LPS+0.5 μ mol/L YL-IPA08 组(0.5 μ mol/L YL-IPA08 孵育 1 h 后, 1 mg/L LPS 孵育 6 h)、LPS+1.0 μ mol/L YL-IPA08 组(1.0 μ mol/L YL-IPA08 孵育 1 h 后, 1 mg/L LPS 孵育 6 h)和 YL-IPA08 组(1.0 μ mol/L YL-IPA08 孵育 1 h)。ELISA 法检测炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、 γ 干扰素(IFN- γ)、IL-4、IL-10 和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)的表达水平, Western blotting 检测细胞中介导 TGF- β 信号转导的 Smad 蛋白家族成员 2、3(Smad2、Smad3)的表达水平。结果 (1)行为学实验结果显示, 开场实验中各组小鼠运动总距离比较差异无统计学意义($P>0.05$); 而与对照组比较, LPS 模型组小鼠进入中心区次数和停留时间明显减少, 在悬尾和强迫游泳实验中绝望时间延长, 在新物体识别实验中识别指数明显降低, 在高架十字迷宫实验中进入开放臂次数百分比和开臂停留时间百分比明显降低, 前额叶皮质 PSD95 及 BDNF 表达明显降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 LPS 模型组比较, LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08 组小鼠上述行为和蛋白表达变化均明显逆转($P<0.05$)。(2)与对照组比较, LPS 模型组 BV2 细胞促炎因子 IL-1 β 和 IFN- γ 表达水平明显升高($P<0.05$), 抗炎因子 IL-4、IL-10 和 TGF- β_1 表达水平明显降低($P<0.05$), Smad2 和 Smad3 表达水平明显降低($P<0.05$)。与 LPS 模型组比较, LPS+0.5 μ mol/L YL-IPA08 组 BV2 细胞 IFN- γ 表达水平明显降低($P<0.05$), IL-4 和 TGF- β_1 表达水平明显升高($P<0.05$); 而 LPS+1.0 μ mol/L YL-IPA08 组 BV2 细胞上述变化均明显逆转($P<0.05$)。结论 YL-IPA08 可明显缓解 LPS 诱导的小鼠抑郁、焦虑样行为, 缓解其认知功能下降, 其机制可能与改善神经炎症和调节 TGF- β /Smad 通路有关。

[关键词] YL-IPA08; 抑郁; 焦虑; 认知功能; 炎症

Improvement effect of TSPO ligand YL-IPA08 on lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behavior in mice and its anti-inflammatory mechanism

Cui Lin-Yu¹, Wang Jing-Ya², Duan Jing-Yao³, Li Yun-Feng², Dai Wei^{3*}, Guo Wen-Zhi^{4*}

¹College of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

[基金项目] 国家自然科学基金(82204358)

[作者简介] 崔林雨, 硕士研究生, 主要从事麻醉药理学方面的研究

[通信作者] 代威, E-mail: twotou3@126.com; 郭文治, E-mail: elite2005gg@163.com

²Institute of Military Cognitive and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China

³Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China

⁴Department of Anesthesiology, the Seventh Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100010, China

*Corresponding author. Dai Wei, E-mail: twotou3@126.com; Guo Wen-Zhi, E-mail: elite2005gg@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82204358)

[Abstract] Objective To investigate the improvement effect of 18kD translocator protein (TSPO) ligand YL-IPA08 on lipopolysaccharide (LPS)-induced depressive, anxiety-like behaviors and cognitive dysfunction in mice and the related anti-inflammatory mechanism. **Methods** (1) 50 male C57BL/6J mice were randomly divided into control group, LPS model group, LPS+YL-IPA08 (1.0 or 3.0 mg/kg) group and YL-IPA08 (3.0 mg/kg) group, with 10 mice in each group. Mice in LPS model group were intraperitoneally injected with LPS (0.5 mg/kg) once on day 1 and day 8. Mice in LPS+YL-IPA08 (1 or 3 mg/kg) and YL-IPA08 (3.0 mg/kg) groups were intragastrically administered YL-IPA08 (1.0 or 3.0 mg/kg) for 13 consecutive days, once a day. From the 9th to 12th day, the open field test, tail suspension test, forced swimming test, novel object recognition test and elevated-plus maze test were used to evaluate the depressive, anxiety-like behaviors and cognitive function of mice. Western blotting was used to detect the expression levels of postsynaptic density protein 95 (PSD95) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the prefrontal cortex of mice. (2) BV2 mouse microglia cells were divided into control group (phosphate buffered saline incubation for 1 h), LPS model group (incubated with 1.0 mg/L LPS for 6 h), LPS+YL-IPA08 (0.5 or 1.0 $\mu\text{mol/L}$) group (incubated with 0.5 or 1.0 $\mu\text{mol/L}$ YL-IPA08 for 1 h and then incubated with 1 mg/L LPS for 6 h), and YL-IPA08 group (incubated with 1.0 $\mu\text{mol/L}$ YL-IPA08 for 1 h). ELISA was used to detect the expression levels of inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ), IL-4, IL-10 and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). Western blotting was used to detect the expression levels of the members of Smad protein family (Smad2, Smad3) mediating signal transduction of TGF- β . **Results** (1) The results of behavioral experiments showed that there was no significant difference in the total movement distance of mice in each group in the open field test ($P>0.05$). Compared with the control group, the number of entries and duration time in the central area of mice in LPS model group were significantly decreased ($P<0.05$); the immobility time in the tail suspension test and the forced swimming test was significantly prolonged ($P<0.05$); the recognition index in the novel object recognition test, the percentage of entries into the open arms and the percentage of duration time in the open arm in the elevated-plus maze test were significantly decreased ($P<0.05$), and the expression levels of PSD95 and BDNF in the prefrontal cortex were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with LPS model group, above behavioral and expression changes in LPS+YL-IPA08 (3.0 mg/kg) group were significantly reversed ($P<0.05$). (2) Compared with control group, the expression levels of pro-inflammatory factors IL-1 β and IFN- γ in BV2 cells in LPS model group were significantly increased ($P<0.05$), and the expressions of anti-inflammatory factors IL-4, IL-10 and TGF- β_1 were significantly decreased ($P<0.05$), and the expression levels of Smad2 and Smad3 were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with LPS model group, the expression level of IFN- γ in BV2 cells in LPS+YL-IPA08 (0.5 $\mu\text{mol/L}$) group was significantly decreased, and the expression levels of IL-4 and TGF- β_1 were significantly increased ($P<0.05$); the above changes were significantly reversed in LPS+YL-IPA08 (1.0 $\mu\text{mol/L}$) group ($P<0.05$). **Conclusion** YL-IPA08 can significantly attenuate LPS-induced depressive and anxiety-like behaviors in mice and alleviate the decline in cognitive dysfunction, which mechanism may be related to improving neuroinflammation and regulating the TGF- β /Smad pathway.

[Key words] YL-IPA08; depression; anxiety; cognitive function; inflammation

抑郁症和焦虑症均为常见的精神障碍，给患者家庭和社会造成了沉重负担。抑郁症和焦虑症之间存在着广泛的共病现象，一线抗抑郁药也多为一线抗焦虑药^[1]。但目前以氟西汀、舍曲林等5-羟色胺重摄取抑制剂为代表的临床一线抗抑郁、抗焦虑药多存在有效率不高和损害认知功能等缺陷^[2]。因此，研发高效、不良反应少的新型抗抑郁、抗焦虑药物意义重大。研究显示，抑郁症和焦虑症的发病与炎症发生和突触可塑性障碍密切相关^[3]。作为中枢神经系统常驻的免疫细胞，小胶质细胞可在机体损伤或感染时激活并转化为不同表型(如M1型和M2型)^[4-5]。

M1型小胶质细胞可产生促炎介质，参与中枢炎症的进展；M2型小胶质细胞可分泌多种细胞因子，发挥抗炎和组织修复作用，并参与突触可塑性的调节。18 kD转运蛋白(18 kD translocator protein, TSPO)是一种跨膜蛋白，在中枢神经系统中主要表达于小胶质细胞的线粒体外膜，与类固醇生成和炎症反应有关，并可调节小胶质细胞极化^[6]。TSPO配体在啮齿类动物中可能有抗抑郁和抗焦虑作用。YL-IPA08作为本课题组自主研发的抗焦虑候选新药，是TSPO的高亲和力配体。前期研究显示，YL-IPA08在大鼠产后抑郁模型和慢性不可预测应激模型中具有快速抗抑

郁、抗焦虑的作用^[7-8]，但其是否通过调节炎症反应发挥抗抑郁、抗焦虑和促认知效应及其可能的机制仍然未知。本研究采用革兰阴性菌细胞壁成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠模型探究YL-IPA08对抑郁、焦虑样行为和认知功能障碍的缓解作用及其可能的抗炎机制，并在LPS诱导的小胶质细胞炎症模型中观察了YL-IPA08对炎症因子及下游通路蛋白表达的影响，旨在为相关药物的开发提供依据。

1 材料与方法

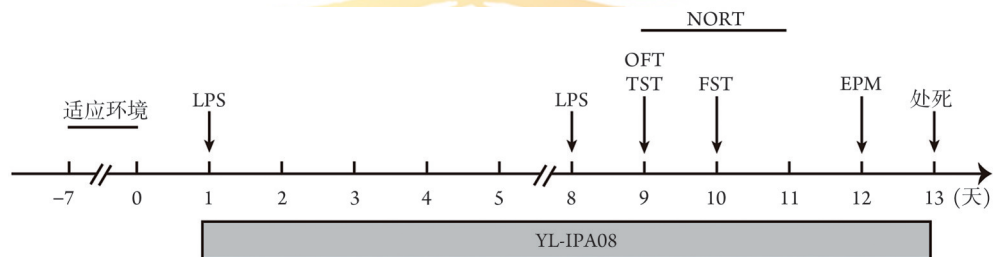
1.1 药品、主要仪器和设备 YL-IPA08(2019112203, 纯度>99.9%, 由军事医学研究院毒物药物研究所提供); LPS(L2880, 纯度>99%, 美国Sigma公司); 兔抗突触后致密蛋白95(postsynaptic density protein 95, PSD95)、Smad家族成员2(member 2 of small mothers against decapentaplegic protein family, Smad2)多克隆抗体(20665-1-AP, 12570-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司); 兔抗脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)单克隆抗体(ab108319, 英国Abcam公司); 兔抗Smad3(9523)、 β -肌动蛋白单克隆抗体(4967, 美国Cell Signaling Technology公司); 胎牛血清(FND500, 中国Excell Bio公司); 小鼠白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、IL-4和IL-10 ELISA检测试剂盒(SEA563Mu, SEA049Mu, SEA077Mu, SEA056Mu, 武汉云克隆科

技股份有限公司); 小鼠转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)ELISA检测试剂盒(QS42871, 北京奇松生物科技有限公司)。Mini-Protean Tetra Cell小型垂直电泳系统(美国Bio-Rad公司); OSA-0358型Odyssey双色红外荧光成像系统(美国LI-COR公司); BB 150细胞培养箱(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 实验动物 10周龄雄性SPF级C57BL/6J小鼠50只, 初始体重23~25 g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(京)2019-0010]。小鼠饲养于SPF级环境, 温度22~24 $^{\circ}$ C, 相对湿度40%~60%, 12 h/12 h昼夜交替, 自由摄食饮水。本研究获军事医学研究院实验动物福利伦理委员会批准(IACUC-DWZX-2022-605)。

1.3 LPS诱导小鼠抑郁样和焦虑样行为及认知功能障碍实验

1.3.1 实验动物分组与实验流程 小鼠适应性饲养7 d后随机分为5组: 对照组、LPS模型组、LPS+1.0 mg/kg YL-IPA08组、LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08组和3.0 mg/kg YL-IPA08组, 每组10只。LPS模型组、LPS+1.0 mg/kg YL-IPA08组和LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08组小鼠在第1天和第8天分别腹腔注射给予LPS(0.5 mg/kg); 第1~13天, 对照组小鼠灌胃给予生理盐水(10 mg/kg), 1次/d; LPS+1.0 mg/kg YL-IPA08组、LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08组和3.0 mg/kg YL-IPA08组小鼠灌胃给予YL-IPA08, 1次/d。实验流程见图1。



LPS. 脂多糖; OFT. 开场实验; TST. 悬尾实验; FST. 强迫游泳实验; NORT. 新物体识别实验; EPM. 高架十字迷宫实验; YL-IPA08. N-乙基-N-(2-吡啶甲基)-2-(3,4-二氯苯基)-7-甲基咪唑并[1,2-a]吡啶-3-乙酰胺盐酸盐

图1 小鼠抑郁和焦虑样行为研究实验流程

Fig.1 Flowchart of the animal experiment on the depressive and anxiety-like behavior in mice

1.3.2 行为学实验观察小鼠抑郁、焦虑样行为及认知功能 第9~12天依次进行开场实验、悬尾实验、强迫游泳实验、新物体识别实验和高架十字迷宫实验, 每次实验前将小鼠转移至实验房间适应2 h。

1.3.3 开场实验观察小鼠运动总距离、中心区进入次数及停留时间 采用小鼠开场箱(40 cm \times 40 cm \times 40 cm), 周壁及箱底为灰色有机玻璃材质, 箱底被均分为16小格, 中央4格为中心区。实验时, 将每只小鼠置于开场箱内固定一角, 自由活动5 min, 使

用SMART视频采集系统记录小鼠自发活动总距离、进入中心区的次数和停留时间并进行分析, 评估小鼠的自发活动能力和抑郁样行为。

1.3.4 悬尾实验和强迫游泳实验观察小鼠绝望时间 在距小鼠尾端1 cm处粘贴白色胶条, 用胶条使小鼠倒悬在悬尾箱(20 cm \times 30 cm \times 40 cm)顶端, 记录小鼠6 min内的倒悬挣扎状态, 统计后4 min小鼠的绝望行为持续时间。将小鼠置于强迫游泳缸(圆柱体容器, 透明亚克力材质, 底面半径6.9 cm, 高

19.5 cm), 缸内水深 16 cm, 水温 22~24 °C, 筒壁光滑不易攀爬, 记录 6 min 内小鼠在水中的运动过程, 统计后 4 min 小鼠的绝望行为持续时间。绝望行为指小鼠放弃挣扎, 躯体无活动, 呈现静止状态或只有轻微运动, 用于评估小鼠的抑郁样行为。

1.3.5 新物体识别实验观察小鼠识别指数 第 1 天将小鼠置于开场实验箱(40 cm×40 cm×40 cm)内适应环境 5 min; 第 2 天实验场地内两角各放置 1 个物体, 两个物体大小、形状、颜色完全相同, 将小鼠置于实验箱内自由探索 5 min; 第 3 天将其中 1 个物体更换为大小、形状、颜色完全不同的另一物体后再将小鼠放进场地, 用 SMART 视频采集系统记录 5 min 内小鼠分别对新、旧物体的探索时间(探索行为指小鼠用鼻子或嘴靠近物体, 且与物体间距≤2 cm), 计算识别指数, 以反映小鼠的认知与记忆能力。识别指数(%)=新物体探索时间/(新物体探索时间+旧物体探索时间)×100%。

1.3.6 高架十字迷宫实验观察小鼠进入开放臂的次数和时间占比 迷宫装置距离地面 50 cm, 整体材质为灰色不透明有机玻璃。将小鼠置于高架十字迷宫中央区域(5 cm×5 cm), 使之面对两个开放臂(30 cm×5 cm×1 cm)和两个闭合臂(30 cm×5 cm×15 cm), 使用 SMART 视频采集系统记录 5 min 内小鼠的活动轨迹, 统计小鼠进入开放臂的次数和停留时间。计算小鼠进入开放臂的次数和停留时间的占比, 评估小鼠的焦虑样行为。

1.3.7 Western blotting 检测小鼠前额叶皮质 PSD95 和 BDNF 蛋白的表达水平 实验第 13 天给药后处死小鼠, 于冰上取大脑前额叶皮质组织, 于液氮短暂冻存后移至 -80 °C 保存备用。称重各小鼠前额叶皮质组织, 每 1 mg 加 10 μl RIPA 裂解液、0.2 μl 蛋白酶抑制剂和 0.2 μl 磷酸酶抑制剂, 于 4 °C 条件下研磨 3 次, 每次 60 Hz、60 s, 静置 40 min 后 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。使用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度定量。每个样品取 40 μg 蛋白于聚丙烯酰胺凝胶中, 电压 80 V 电泳 100 min, 使用“三明治”法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉 25 °C 封闭 2 h, TBST 洗膜 1 次, 加入兔抗 PSD95、BDNF、β-肌动蛋白一抗(1:1000), 4 °C 孵育 12 h。TBST 洗膜 3 次, 加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:500), 25 °C 孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次, 将 PVDF 膜置于 Odyssey 双色红外荧光显影仪中进行曝光显影, 使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值作为其相对表达水平。

1.4 LPS 诱导 BV2 小鼠小胶质细胞炎症模型实验

1.4.1 细胞培养 BV2 细胞购自中国协和医学院细胞资源中心, 用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 DMEM

完全培养基培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱。当细胞密度达到 80% 时进行传代, 取对数生长期细胞进行实验。

1.4.2 细胞分组与药物处理 将 BV2 细胞接种到 6 孔板, 每孔 7×10⁵ 个细胞, 随机分为对照组、LPS 模型组、LPS+0.5 μmol/L YL-IPA08 组、LPS+1.0 μmol/L YL-IPA08 组和 1.0 μmol/L YL-IPA08 组。对照组细胞使用磷酸盐缓冲液孵育 1 h, LPS+0.5 μmol/L YL-IPA08 组、LPS+1.0 μmol/L YL-IPA08 组和 1.0 μmol/L YL-IPA08 组细胞使用相应浓度的 YL-IPA08 孵育 1 h; 更换培养基, LPS 组、LPS+0.5 μmol/L YL-IPA08 组和 LPS+1.0 μmol/L YL-IPA08 组使用 1.0 mg/L LPS 培养 6 h。

1.4.3 ELISA 检测细胞裂解液炎症因子 IL-1β、IFN-γ、IL-4、IL-10 和 TGF-β₁ 的浓度 细胞分组及药物处理同 1.4.2, 每组设 6 个复孔。弃培养基, 收集细胞, 加入 PBS 反复冻融 3 次裂解细胞, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。按照 ELISA 试剂盒步骤检测各组细胞内 IL-1β、IFN-γ、IL-4、IL-10 和 TGF-β₁ 蛋白浓度。

1.4.4 Western blotting 检测细胞裂解液 Smad2、Smad3 蛋白相对表达水平 细胞分组及药物处理同 1.4.2, 每组设 4 个复孔。弃培养基, 6 孔板各孔加入 200 μl 的 RIPA 裂解液, 冰上静置 5 min 后使用细胞刮刀收集细胞裂解液, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。Western blotting 实验操作步骤同 1.3.7。一抗(兔抗 Smad2 或 Smad3)稀释倍数为 1:500。

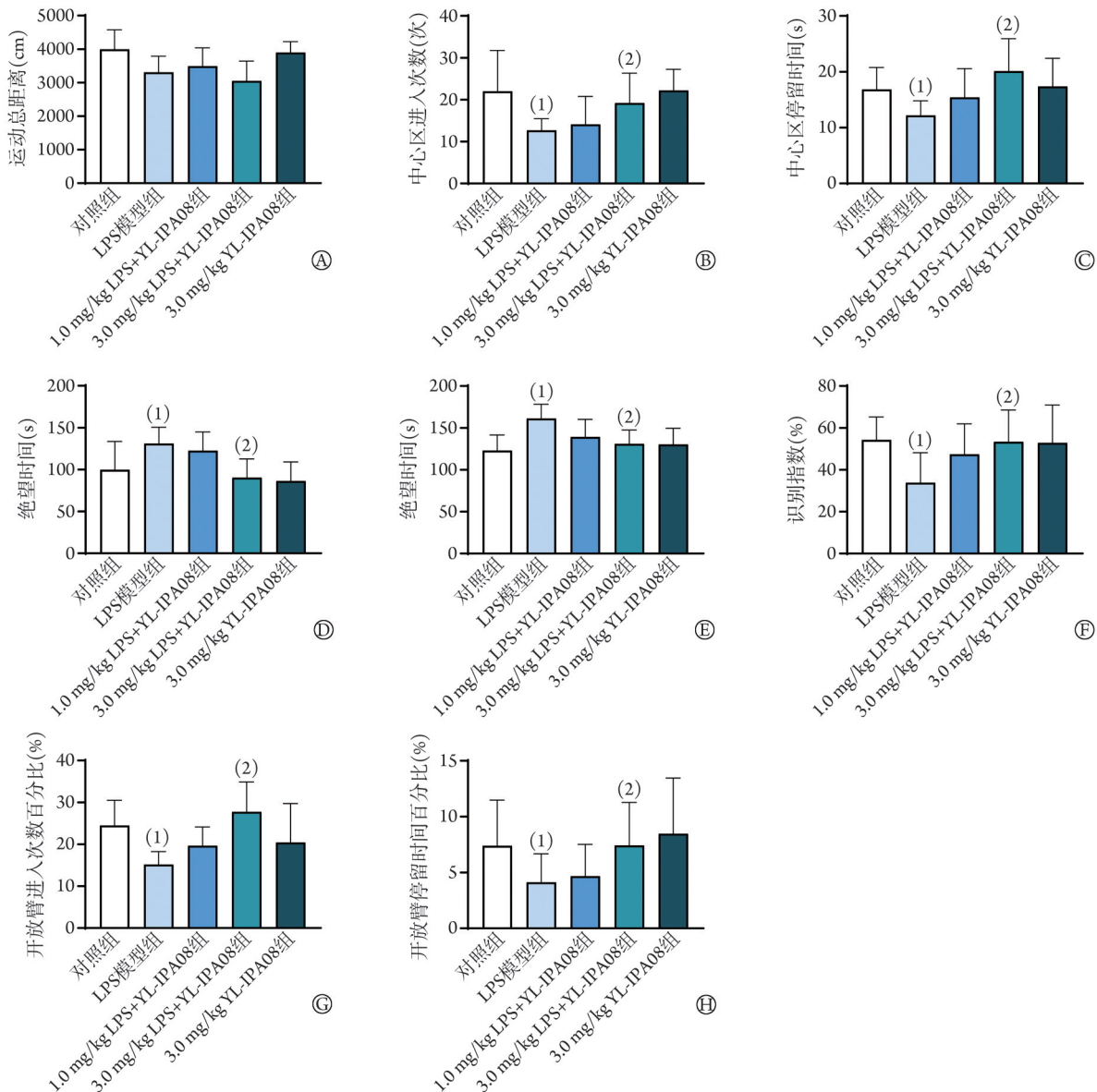
1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对 LPS 诱导小鼠抑郁样和焦虑样行为及认知功能障碍的影响 行为学实验结果显示, 各组小鼠开场实验运动总距离比较差异无统计学意义(*P*>0.05, 图 2A)。与对照组比较, LPS 模型组小鼠在开场实验中进入中心区的次数和停留时间减少(*P*<0.05, 图 2B、C), 在悬尾实验和强迫游泳实验中绝望时间延长(*P*<0.05, 图 2D、E), 在新物体识别实验中识别指数降低(*P*<0.05, 图 2F), 在高架十字迷宫实验中开放臂进入次数百分比和停留时间百分比降低(*P*<0.05, 图 2G、H)。3.0 mg/kg YL-IPA08 组小鼠各项指标与对照组比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。与 LPS 模型组比较, LPS+1.0 mg/kg YL-IPA08 组小鼠仅在强迫游泳实验中绝望时间减少(*P*<0.05), 其他行为学指标差异

无统计学意义 ($P>0.05$), 而 LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08 组小鼠上述行为学指标均明显逆转 ($P<0.05$, 图 2)。

根据以上实验结果, 后续实验选择 LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08 组小鼠脑组织进行 Western blotting 检测。



LPS. 脂多糖; YL-IPA08. N-乙基-N(2-吡啶甲基)-2-(3,4-二氯苯基)-7-甲基咪唑并[1,2-a]吡啶-3-乙酰酸盐; A. 开场实验小鼠运动总距离; B. 开场实验小鼠中心区进入次数; C. 开场实验小鼠中心区停留时间; D. 悬尾实验小鼠绝望时间; E. 强迫游泳实验小鼠绝望时间; F. 新物体识别实验小鼠识别指数; G. 高架十字迷宫实验小鼠开放臂进入次数百分比; H. 高架十字迷宫实验小鼠开放臂停留时间百分比; 与对照组相比, (1) $P<0.05$; 与LPS模型组相比, (2) $P<0.05$

图2 YL-IPA08对LPS诱导小鼠抑郁样和焦虑样行为及认知功能障碍的改善作用($n=10$)

Fig.2 Effect of YL-IPA08 on depressive-like and anxiety-like behaviors and cognitive dysfunction in LPS-treated mice ($n=10$)

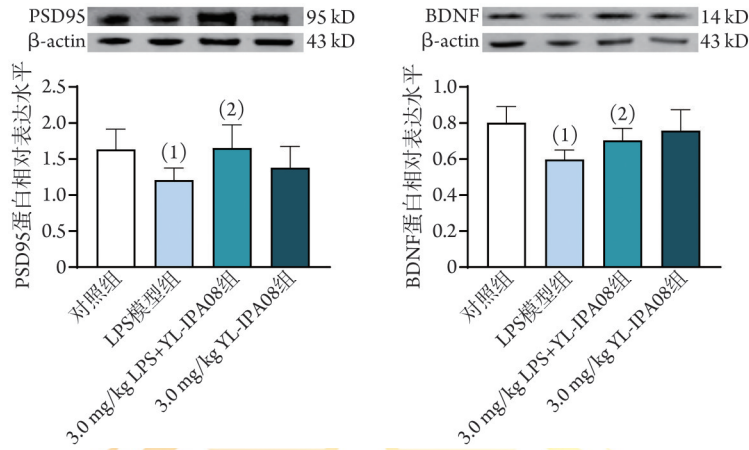
2.2 对LPS诱导小鼠前额叶皮质 PSD95 和 BDNF 蛋白表达的影响 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, LPS 模型组小鼠前额叶皮质 PSD95 和 BDNF 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$), 而 3.0 mg/kg YL-IPA08 组小鼠 PSD95 和 BDNF 蛋白表达水平无明显变化 ($P>0.05$)。与 LPS 模型组比较, LPS+3.0 mg/kg YL-IPA08 组小鼠 PSD95 和 BDNF 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$) (图 3)。

2.3 对LPS诱导BV2小胶质细胞炎症因子浓度的影响

ELISA 检测结果显示, 与对照组比较, LPS 模型组 BV2 细胞促炎因子 IL-1 β 和 IFN- γ 水平明显升高 ($P<0.05$), 抑炎因子 IL-4、IL-10 和 TGF- β_1 水平明显降低 ($P<0.05$); 0.5 $\mu\text{mol/L}$ YL-IPA08 组上述炎症相关因子与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 LPS 模型组比较, LPS+0.5 $\mu\text{mol/L}$ YL-IPA08 组 BV2 细胞 IFN- γ 水平明显降低 ($P<0.05$), IL-4 和 TGF- β_1 水平明显升高 ($P<0.05$), 而 IL-1 β 和 IL-10 水平无明显变化 ($P>0.05$); LPS+1.0 $\mu\text{mol/L}$ YL-IPA08 组 BV2 细胞 IL-1 β

和IFN- γ 水平明显降低($P<0.05$), L-4、IL-10和TGF- β_1 浓度明显升高($P<0.05$)(图4)。根据以上实验结果,

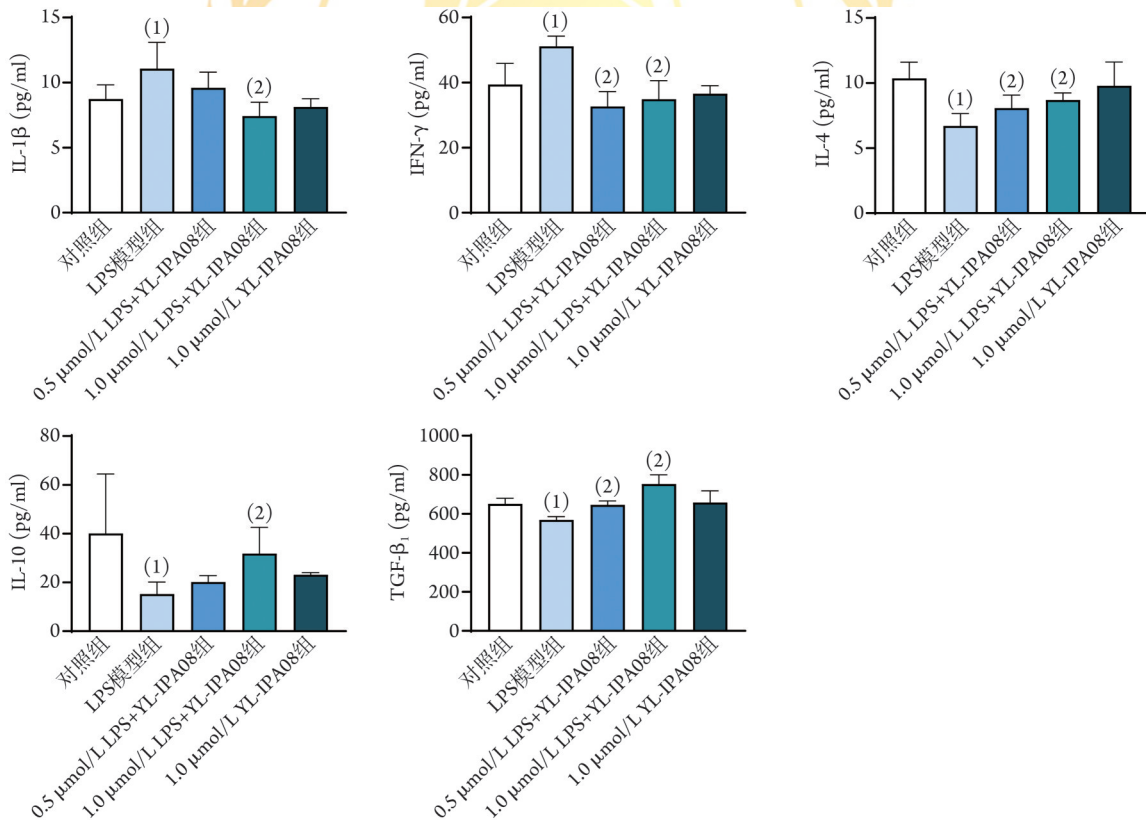
后续实验选择LPS+1.0 $\mu\text{mol/L}$ YL-IPA08组BV2细胞进行Western blotting检测。



PSD95. 突触后致密蛋白95; BDNF. 脑源性神经营养因子; β -actin. β -肌动蛋白; 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与LPS组比较, (2) $P<0.05$

图3 YL-IPA08对LPS诱导小鼠前额叶皮质PSD95和BDNF相对表达水平的影响(Western blotting, $n=4$)

Fig.3 Effect of YL-IPA08 on protein expression levels of PSD95 and BDNF in prefrontal cortex of LPS-treated mice (Western blotting, $n=4$)



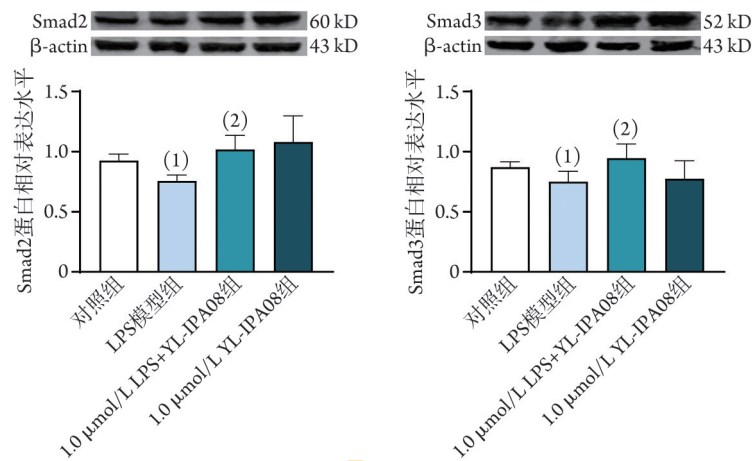
IL-1 β . 白细胞介素1 β ; IFN- γ . γ 干扰素; IL-4. 白细胞介素4; IL-10. 白细胞介素10; TGF- β_1 . 转化生长因子 β_1 ; 与对照组相比, (1) $P<0.05$; 与LPS组相比, (2) $P<0.05$

图4 YL-IPA08对LPS诱导BV2细胞炎症因子IL-1 β 、IFN- γ 、IL-4、IL-10和TGF- β_1 水平的影响(ELLISA, $n=6$)

Fig.4 Effect of YL-IPA08 on expression levels of cytokines IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-10 and TGF- β_1 , in LPS-treated BV2 cells (ELLISA, $n=6$)

2.4 对LPS诱导BV2小胶质细胞Smad2和Smad3蛋白表达水平的影响 Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, LPS模型组BV2细胞Smad2和Smad3蛋白相对表达水平明显降低($P<0.05$), 而1.0 $\mu\text{mol/L}$ YL-

IPA08组BV2细胞Smad2和Smad3蛋白相对表达水平无明显变化($P>0.05$)。与LPS模型组比较, LPS+1.0 $\mu\text{mol/L}$ YL-IPA08组BV2细胞Smad2和Smad3蛋白相对表达水平明显升高($P<0.05$)(图5)。



Smad2. Smad蛋白家族成员2; Smad3. Smad蛋白家族成员3; β-actin. β-肌动蛋白; 与对照组相比, (1) $P < 0.05$; 与LPS组相比, (2) $P < 0.05$

图5 YL-IPA08对LPS诱导BV2小胶质细胞TGF- β_1 下游通路蛋白Smad2和Smad3相对表达水平的影响($n=4$)

Fig.5 Effect of YL-IPA08 on expression levels of Smad2 and Smad3 in LPS-treated BV2 cell by Western blotting ($n=4$)

3 讨 论

自1991年提出细胞因子假说以来,越来越多的证据显示,抑郁症发病与炎症关系密切^[9],如有研究发现重度抑郁症患者血清和脑脊液中炎症因子IL-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 水平明显升高^[10]。免疫炎症通路的激活特别是促炎细胞因子的释放会引发神经内分泌改变和神经炎症,从而导致抑郁症的发生^[11-12],而抑郁症状可通过某些抗炎治疗得到改善^[13],如艾司氯胺酮(esketamine)可通过抗炎作用缓解小鼠的抑郁样行为^[14]。本课题组前期研究显示,在大鼠慢性不可预测应激和产后抑郁等模型中,YL-IPA08(0.1、0.3、1.0和3.0 mg/kg)慢性灌胃给药可发挥抗抑郁样和抗焦虑作用^[7,15],但YL-IPA08的抗炎作用尚未见报道。因此,本研究从抗炎作用的角度探究YL-IPA08的抗抑郁、抗焦虑及促认知效应及其可能机制,剂量根据课题组前期研究结果确定^[15]。

LPS作为实验中常用的炎症刺激因子,可引起急、慢性炎症反应,影响免疫细胞的发育、分布和激活^[16-20]。给予LPS可导致啮齿类动物体内炎症水平增高^[21],悬尾实验和强迫游泳实验中绝望时间延长,导致抑郁样行为产生^[22]。目前,单次腹腔注射给予LPS被广泛用于诱导啮齿类动物抑郁样行为^[23-25]。文献报道腹腔注射给予0.5 mg/kg LPS刺激后6 h,小鼠前额叶皮质和海马中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等炎症因子表达水平升高,提示促炎细胞因子可透过血脑屏障进入大脑^[26],激活小胶质细胞,诱导中枢炎症。有研究发现在LPS(0.5或0.83 mg/kg)腹腔注射后约2 h,小鼠血液中促炎细胞因子的释放达到峰值,出现发热、厌食、运动和社会互动减少等行为;24 h后,小鼠表现出抑郁样行为^[24-25,27]。参考本课题组前

期研究^[28],本研究沿用两次腹腔注射给予0.5 mg/kg LPS的模型,在不影响自发活动的前提下诱导小鼠产生稳定的抑郁样行为。

突触蛋白表达增加和突触可塑性增强与抗抑郁作用关系密切^[8],包括选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(如氟西汀)在内的多种抗抑郁药可通过增强突触可塑性发挥抗抑郁作用^[29-30]。PSD95是突触可塑性相关标志物之一,负责运输N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)和 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPA)到突触后膜,调节突触成熟^[31]。BDNF是突触可塑性的关键调节因子,可通过激活原肌球蛋白相关激酶受体B(tropomyosin-related kinase receptor B, TrkB)信号通路启动下游多条信号通路,增加皮质树突棘密度,影响树突棘形态^[32-34]。LPS处理已被证实可导致啮齿类动物PSD95和BDNF水平降低,神经元突触可塑性受损^[35]。研究显示,依鲁替尼和氟西汀可逆转LPS诱导的小鼠PSD95、BDNF蛋白表达水平降低,改善突触的缺失,缓解抑郁症状^[36-37]。Liu等^[38]发现,PSD95和BDNF蛋白水平升高可增加突触数量和密度,改善认知功能。本研究的结果与上述研究一致。此外,多种类型的细胞(包括小胶质细胞)可分泌BDNF。YL-IPA08作为TSPO配体,可能通过作用于小胶质细胞影响BDNF的分泌和突触蛋白合成而发挥作用,这与Wang等^[39]对TSPO配体的研究结果相一致。近期研究显示,小胶质细胞分泌的BDNF可促进突触可塑性,并调节与学习记忆功能有关的突触形成^[40]。

小胶质细胞是大脑的免疫细胞,在不同情况可分化为M1型或M2型。在抑郁症中,小胶质细胞被激活并向M1型分化,表现为细胞体增大、细胞分枝减少和突起粗大^[41]。M1型小胶质细胞合成和分泌IL-1 β 、TNF- α 和IL-6等促炎细胞因子,M2型则表达

IL-10、IL-4和TGF- β 等抗炎细胞因子^[42]，两者共同调控中枢炎症水平^[43-44]。在LPS刺激下，小胶质细胞的激活和促炎细胞因子的表达更加明显^[45]。研究显示，依鲁替尼可抑制LPS诱导的小胶质细胞激活和炎症因子释放，缓解小鼠抑郁样行为^[37]。IL-4、IL-10和TGF- β_1 可通过下调IL-6、TNF- α 的表达及抑制一氧化氮的产生，在体内外抑制LPS诱导的神经元损伤^[43,46-48]。本研究通过预孵育YL-IPA08(0.5或1.0 $\mu\text{mol/L}$) 1 h观察其是否能减轻LPS诱导的BV2小胶质细胞神经炎症并发挥抗炎作用，结果提示，YL-IPA08可能通过促使小胶质细胞向M2型分化而发挥抗炎作用。

研究发现，TGF- β_1 在R-氯胺酮(R-ketamine)的快速抗抑郁起效中发挥关键作用^[49]。TGF- β /Smad信号通路在大鼠原代小胶质细胞中发挥抗炎作用，影响核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB)进入细胞核，抑制LPS引起的炎症反应^[50]。此外，在小鼠慢性社交挫败应激模型(chronic social defeat stress, CSDS)中，脑室内注射重组TGF- β_1 和鼻内给予TGF- β_1 均可产生快速且持续的抗抑郁样作用^[49,51]。本研究对TGF- β_1 及Smad2和Smad3蛋白表达的检测结果显示，YL-IPA08可能通过小胶质细胞激活TGF- β /Smad通路发挥抗炎作用。

综上所述，YL-IPA08可明显改善LPS诱导的小鼠抑郁样和焦虑样行为及认知功能障碍，调节BV2细胞炎症因子的表达水平，促进PSD95和BDNF蛋白表达，增强突触可塑性，并可能通过激活小胶质细胞TGF- β /Smad通路发挥抗炎作用。但本研究并未考察YL-IPA08是通过影响神经元还是胶质细胞促进PSD95和BDNF表达；未在动物水平进行多脑区实验进一步验证和探究YL-IPA08的抗炎作用；TGF- β /Smad通路是否介导YL-IPA08的抗抑郁、抗焦虑和促认知效应仍需进一步探索。因此，后续实验将从多脑区和多种细胞类型角度出发，进一步探讨YL-IPA08增强突触可塑性的精细调控机制，并在动物水平探究TGF- β /Smad通路在YL-IPA08起效中的作用。

【参考文献】

- [1] 王素红, 于洋洋, 郭田荣, 等. 高功能团体治疗模式在女性抑郁患者中的应用效果[J]. 新乡医学院学报, 2023, 40(12): 1167-1171.
- [2] 谭东明, 尹红英, 邓祥敏, 等. 鼠尾草酸对慢性不可预见性轻度应激诱导的抑郁大鼠的抗抑郁作用及其SIRT1/ERS调控机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2023, 49(2): 360-368.
- [3] Hu P, Lu Y, Pan B X, et al. New insights into the pivotal role of the amygdala in inflammation-related depression and anxiety disorder[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11076.
- [4] Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 1181-1194.
- [5] 李明星, 应苗法, 顾胜龙, 等. CysLT₂受体拮抗剂HAMI3379对大鼠脑缺血损伤的保护作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(12): 1395-1402.
- [6] Jin GL, Liu HP, Huang YX, et al. Koumine regulates macrophage M1/M2 polarization via TSPO, alleviating sepsis-associated liver injury in mice[J]. Phytomedicine, 2022, 107: 154484.
- [7] Ren P, Ma L, Wang J Y, et al. Anxiolytic and anti-depressive like effects of translocator protein (18 kDa) ligand YL-IPA08 in a rat model of postpartum depression[J]. Neurochem Res, 2020, 45(8): 1746-1757.
- [8] Zhang LM, Wang YL, Liu YQ, et al. Antidepressant-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa) in chronically stressed rats[J]. Neuropharmacology, 2017, 113(Pt A): 567-575.
- [9] Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression[J]. Nature, 2008, 455(7215): 894-902.
- [10] Zhang Y, Wang J, Ye Y, et al. Peripheral cytokine levels across psychiatric disorders: A systematic review and network meta-analysis[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2023, 125: 110740.
- [11] Shelton RC, Claiborne J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, et al. Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression[J]. Mol Psychiatry, 2011, 16(7): 751-762.
- [12] Maes M, Song C, Lin A, et al. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety[J]. Cytokine, 1998, 10(4): 313-318.
- [13] Yirmiya R, Pollak Y, Barak O, et al. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents[J]. Neuropsychopharmacology, 2001, 24(5): 531-544.
- [14] Wang T, Weng H, Zhou H, et al. Esketamine alleviates postoperative depression-like behavior through anti-inflammatory actions in mouse prefrontal cortex[J]. J Affect Disord, 2022, 307: 97-107.
- [15] Zhang LM, Zhao N, Guo WZ, et al. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa) [J]. Neuropharmacology, 2014, 81: 116-125.
- [16] Mello BS, Monte AS, McIntyre RS, et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration[J]. J Psychiatr Res, 2013, 47(10): 1521-1529.
- [17] Jiang H, Wang Z, Wang Y, et al. Antidepressant-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: involvement of its anti-inflammatory action[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2013, 47: 33-39.
- [18] Fan K, Wu X, Fan B, et al. Up-regulation of microglial cathepsin C expression and activity in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 96.
- [19] 雍朝英, 焦阳, 戚迪, 等. 法舒地尔减轻脂多糖诱导急性肺损伤的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(1): 27-33.
- [20] 胡志宽, 何思琦, 蒋维杰, 等. 脂多糖对小鼠视网膜Müller细胞和小胶质细胞共培养体系中炎症因子水平的影响及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2023, 49(5): 1140-1146.

- [21] Ali T, Rahman SU, Hao Q, *et al.* Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation[J]. *J Pineal Res*, 2020, 69(2): e12667.
- [22] Dantzer R, O'connor JC, Freund GG, *et al.* From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(1): 46-56.
- [23] O'connor JC, Lawson MA, André C, *et al.* Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice[J]. *Mol Psychiatry*, 2009, 14(5): 511-522.
- [24] Custódio CS, Mello BS, Cordeiro RC, *et al.* Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 713(1-3): 31-38.
- [25] Wang Z, Zhang Q, Yuan L, *et al.* The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration[J]. *Behav Brain Res*, 2014, 274: 282-290.
- [26] Zhao X, Cao F, Liu Q, *et al.* Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 364: 494-502.
- [27] Ohgi Y, Futamura T, Kikuchi T, *et al.* Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 103(4): 853-859.
- [28] Lai ZK, Yin YY, Yan JZ, *et al.* Inulin-type oligosaccharides of *Morinda officinalis* exerted antidepressant effects by reducing hippocampal inflammation[J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38(6): 2065-2075.
- [29] Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, *et al.* Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder[J]. *Nat Med*, 2012, 18(9): 1413-1417.
- [30] Takei N, Nawa H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development[J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7: 28.
- [31] Han K, Kim E. Synaptic adhesion molecules and PSD-95[J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 84(3): 263-283.
- [32] Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(4): 299-309.
- [33] Chakravarthy S, Saiepour MH, Bence M, *et al.* Postsynaptic TrkB signaling has distinct roles in spine maintenance in adult visual cortex and hippocampus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(4): 1071-1076.
- [34] Gilman SR, Iossifov I, Levy D, *et al.* Rare *de novo* variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses[J]. *Neuron*, 2011, 70(5): 898-907.
- [35] Jangra A, Lukhi MM, Sulakhiya K, *et al.* Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 337-345.
- [36] Li W, Ali T, Zheng C, *et al.* Fluoxetine regulates eEF2 activity (phosphorylation) via HDAC1 inhibitory mechanism in an LPS-induced mouse model of depression[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 38.
- [37] Li W, Ali T, He K, *et al.* Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression[J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 92: 10-24.
- [38] Liu B, Kou J, Li F, *et al.* Lemon essential oil ameliorates age-associated cognitive dysfunction via modulating hippocampal synaptic density and inhibiting acetylcholinesterase[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(9): 8622-8639.
- [39] Wang DS, Han J, Li S, *et al.* Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of ZBD-2, a novel ligand for the translocator protein (18 kDa)[J]. *Neuromolecular Med*, 2017, 19(1): 57-68.
- [40] Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1596-1609.
- [41] Walker FR, Nilsson M, Jones K. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(11): 1262-1276.
- [42] Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes[J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1): 42.
- [43] Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, *et al.* Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 29(3): 381-393.
- [44] Zhou X, Spittau B, Kriegstein K. TGF- β signalling plays an important role in IL-4-induced alternative activation of microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 210.
- [45] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 649-665.
- [46] Ledebor A, Brevé JJ, Poole S, *et al.* Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells[J]. *Glia*, 2000, 30(2): 134-142.
- [47] Zhao W, Xie W, Xiao Q, *et al.* Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia[J]. *J Neurochem*, 2006, 99(4): 1176-1187.
- [48] Park KW, Lee DY, Joe EH, *et al.* Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4[J]. *J Neurosci Res*, 2005, 81(3): 397-402.
- [49] Zhang K, Yang C, Chang L, *et al.* Essential role of microglial transforming growth factor- β 1 in antidepressant actions of (R)-ketamine and the novel antidepressant TGF- β ₁[J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 32.
- [50] Islam A, Choudhury ME, Kigami Y, *et al.* Sustained anti-inflammatory effects of TGF- β 1 on microglia/macrophages[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(3): 721-734.
- [51] Wei Y, Chang L, Hashimoto K. Molecular mechanisms underlying the antidepressant actions of arketamine: beyond the NMDA receptor[J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(1): 559-573.

(责任编辑: 蒋铭敏)