

大麻二酚上调 BDNF、突触蛋白发挥抗抑郁作用

杨 艳¹, 马滕滕¹, 边宇婧¹, 顾江娜¹, 孙毓媛¹, 温朕勇¹, 谢建平², 袁 云¹, 郭 英¹

摘要 目的 研究大麻二酚(CBD)对抑郁样小鼠的快速抗抑郁作用及可能的作用机制。方法 采用慢性束缚建立小鼠抑郁模型。将供试小鼠分为5组:正常对照组、模型组、阳性对照组、CBD低剂量组(25 mg/kg)、CBD高剂量组(50 mg/kg)。在行为学实验前1 h对每组小鼠灌胃给药。行为学实验结束后,收集海马和前额皮层样本,采用ELISA测定脑源神经营养因子(BDNF)、突触后密度-95蛋白(PSD-95)、突触素(SYP)、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)。结果 与模型组相比,CBD低剂量组旷场实验中央区域活动路程百分比、中央区域活动时间百分比和总路程均增加。与模型组相比,CBD低剂量组强迫游泳实验不动时间百分比降低。ELISA检测结果显示,CBD能快速上调前额皮层中BDNF、PSD-95浓度,快速上调海马和前额皮层中SYP、mTOR浓度。结论 CBD能快速改善抑郁样小鼠的行为学表现,快速上调海马或前额皮层中的BDNF、突触蛋白水平。

关键词 大麻二酚;抗抑郁作用;前额皮质;海马

中图分类号 R 964

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1206-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.006

抑郁症表现为长期心理和生理的低迷状态。全球范围内有3.22亿人患有抑郁症,约占世界人口的4.4%^[1]。大麻二酚(cannabidiol,CBD)是药用大麻的主要化学成分之一,无致幻和成瘾性,具有改善疼痛、失眠、成瘾和焦虑等症状的药理作用^[2],但其医用价值尚未被完全开发。CBD可通过调节多种与抑郁症相关的神经递质系统发挥抗抑郁作用^[3],但具体调节哪些与抑郁症治疗相关因子发挥作用,已

成为研究者新的关注点。该研究以慢性束缚复制小鼠抑郁模型,通过观察小鼠行为学表现,检测血清中脑源神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、突触后密度-95蛋白(postsynaptic density protein 95, PSD-95)、突触素(synaptophysin, SYP)、雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, mTOR)的变化,探究CBD缓解小鼠抑郁症状的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 大麻二酚(衡水昊业化工科技有限公司,批号:20191019);舍曲林(大连辉瑞制药有限公司,批号:H10980141);吐温-80(德国Bio-Froxx公司,批号:20190422);小鼠BDNF、PSD-95、SYP、mTOR酶联免疫吸附测定试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:20201222-20520A、20201222-22168A、20201222-22084A、20201222-21729A)。多功能酶标仪、低温高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific);高速匀浆仪(武汉塞维尔生物科技有限公司)。

1.2 实验动物 4周龄SPF级ICR小鼠45只,雄性,体质量20~25 g,购于昆明医科大学实验动物学部,生产许可证号:SCXK(滇)K2020-0004。使用正常小鼠饲料饲养,饲料购于昆明医科大学实验动物学部;所有实验动物均饲养于(23±2)℃的恒温恒湿室内,整个实验期间室内通风条件良好,12 h明暗交替。

1.3 方法

1.3.1 抑郁样小鼠模型的建立及分组 45只小鼠适应性饲养5 d,旷场实验后,分为5组,每组9只,正常对照组正常进食进水。其余各组以慢性束缚应激复制抑郁模型,具体方法如下:将小鼠置于前后开口的50 ml离心管,前端有12个直径0.5 mm的小孔,水平放置后禁锢12 h(21:00-次日9:00),保证通风良好,连续7 d,禁锢时小鼠在同一环境中,不予进食进水。

分组及灌胃处理情况如下:正常对照组和模型组给予2%的吐温-80水溶液,阳性对照组给予10

2022-04-25 接收

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(编号:82060650、31760297);云南省科技计划项目基础研究专项面上项目(编号:202001AT070137);云南省基础研究计划项目[编号:2018FE001(-189)]

作者单位:¹昆明医科大学基础医学院,昆明 650000

²云南民族大学图书馆,昆明 650000

作者简介:杨 艳,女,硕士研究生;

袁 云,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yunyuankm@126.com;

郭 英,女,副教授,责任作者,E-mail: guoying@kmmu.edu.cn

mg/kg 舍曲林, CBD 低剂量组给予 25 mg/kg CBD, CBD 高剂量组给予 50 mg/kg CBD, 溶剂均为 2% 的吐温-80 水溶液。按 10 ml/kg 体积进行灌胃, 在每只小鼠行为学实验前 1 h 进行。

1.3.2 行为学实验

1.3.2.1 旷场实验 将小鼠放在 50 cm × 50 cm 的旷场内进行自由活动和探索。SMART 3.0 软件观察记录小鼠在旷场内 6 min 的活动总路程, 同时记录小鼠在旷场中央 30 cm × 30 cm 区域中活动的路程和时间, 并分析占旷场的总路程、总时间的百分比。

1.3.2.2 强迫游泳实验 将小鼠放在直径 18 cm、水温 (25 ± 2) °C、深 20 cm 的玻璃缸中强迫游泳, 观察 8 min, SMART 3.0 软件记录小鼠后 6 min 不动时间, 并分析小鼠的不动时间占总时间的百分比。

1.3.3 生化指标检测

1.3.3.1 样本采集及制备 行为学实验结束后, 各组小鼠心尖取血, 处死小鼠取脑置于冰上, 迅速取出海马和前额皮层, 放入离心管中置于 -80 °C 保存备用。以质量比 1 : 9 的比例加入 PBS 溶液, 用匀浆机将标本匀浆充分, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 4 °C 保存备用。

1.3.3.2 ELISA 方法进行相关指标测定 设置两组标准品孔和空白对照孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μl。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μl, 然后再加待测样品 10 μl, 每孔加入酶标试剂 100 μl, 空白孔除外。用封板膜封板后置 37 °C 温育 60 min。洗涤液洗涤 5 次后拍干。

每孔先后加入显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μl, 37 °C 避光显色 15 min, 加入终止液 50 μl。以 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (optical density, OD)。以标准物的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘出标准曲线。标准曲线方程式分别为: $y_{BDNF} = 0.0034x + 0.1095$ ($R^2 = 0.9982$)、 $y_{PSD-95} = 0.117x + 0.0956$ ($R^2 = 0.9989$)、 $y_{SYP} = 0.0652x + 0.0865$ ($R^2 = 0.9976$)、 $y_{mTOR} = 0.0553x + 0.0833$ ($R^2 = 0.9998$)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件处理数据, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以单因素方差分析进行组间差异比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CBD 对抑郁样小鼠旷场实验的影响 由表 1 可知, 与正常对照组对比, 模型组在中央区域活动路程百分比、中央区域活动时间百分比和总路程均明显降低 ($F = 3.522, 2.841, 2.110, P < 0.05$)。与模型组相比, CBD 低剂量组在中央区域活动路程百分比、中央区域活动时间百分比和总路程均明显升高 ($P < 0.05$)。各组小鼠旷场实验活动轨迹见图 1。以上结果表明 CBD 对应激小鼠有明显的抗焦虑作用, 并且使小鼠的自发行为也明显增加。

2.2 CBD 对抑郁样小鼠强迫游泳实验的影响 由表 2 可知, 与正常对照组相比, 模型组小鼠的不动时间百分比明显增大 ($F = 3.772, P < 0.01$)。与模型组相比, CBD 低剂量组和阳性对照组不动时间百分比均降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明 CBD 对抑郁样小鼠有明显的抗抑郁作用。

表 1 CBD 对抑郁样小鼠旷场实验的影响 ($n = 9, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	中央区域活动路程百分比 (%)	中央区域活动时间百分比 (%)	总路程 (cm)
正常对照	-	13.42 ± 8.57	5.39 ± 4.51	3 784.30 ± 1 623.81
模型	-	4.39 ± 1.90 [#]	1.47 ± 0.60 [#]	2 450.76 ± 984.80 [#]
CBD 低剂量	25	11.18 ± 5.33 [*]	5.62 ± 4.14 [*]	4 017.31 ± 1 096.6 [*]
CBD 高剂量	50	5.60 ± 5.83	2.34 ± 2.92	3 038.95 ± 1 475.17
阳性对照	10	6.01 ± 5.68	2.35 ± 2.44	3 571.57 ± 28.86

与正常对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

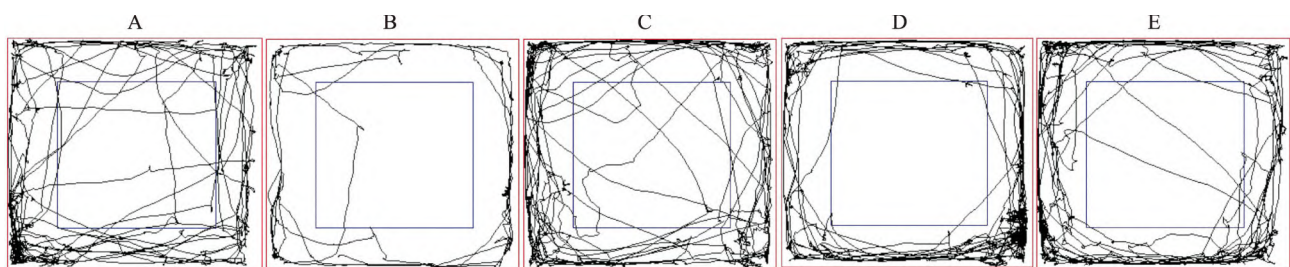


图 1 CBD 对抑郁样小鼠旷场实验活动轨迹的影响

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CBD 低剂量组; D: CBD 高剂量组; E: 阳性对照组

表2 CBD对抑郁样小鼠强迫游泳实验的影响($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	不动时间百分比 (%)
正常对照	-	23.39 ± 13.88
模型	-	53.55 ± 15.48 ^{##}
CBD 低剂量	25	33.43 ± 17.49 [*]
CBD 高剂量	50	47.17 ± 18.61
阳性对照	10	29.11 ± 24.57 [*]

与正常对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

2.3 CBD对抑郁样小鼠海马和前额皮层中BDNF浓度的影响 由图2可知,在前额皮层,与正常对照组相比,模型组BDNF浓度明显下降($F = 2.805, P < 0.05$)。与模型组相比,CBD低剂量组BDNF浓度明显增高($P < 0.01$)。在海马组织中,各组之间BDNF浓度均无明显差异。以上结果表明CBD能增加抑郁样小鼠前额皮层BDNF的浓度。

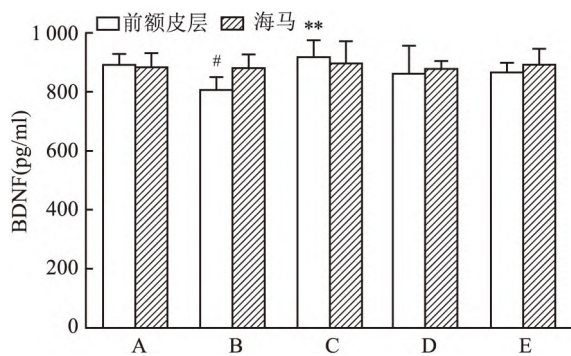


图2 CBD对抑郁样小鼠海马和前额皮层中BDNF浓度的影响

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CBD低剂量组; D: CBD高剂量组; E: 阳性对照组; 与正常对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

2.4 CBD对抑郁样小鼠海马和前额皮层中PSD-95浓度的影响 由图3可知,在前额皮层,与正常对照组相比,模型组PSD-95浓度明显下降($F = 8.401, P < 0.01$)。与模型组相比,CBD低剂量组($P < 0.05$)和阳性对照组($P < 0.01$)PSD-95浓度均明显增高,而CBD高剂量组PSD-95浓度有增高趋势($P = 0.075$)。在海马组织中,各组之间PSD-95浓度均无明显差异。以上结果表明CBD能增加抑郁样小鼠前额皮层PSD-95的浓度。

2.5 CBD对抑郁样小鼠海马和前额皮层中SYP浓度的影响 由图4可知,与正常对照组相比,模型组SYP浓度在海马中明显下降($F = 9.523, P < 0.01$)。与模型组相比,CBD低剂量组、CBD高剂量组和阳性对照组在海马中SYP浓度均明显增高($P < 0.01$)。前额皮层中,与模型组相比,CBD低剂量组SYP浓度增高($F = 7.824, P < 0.05$)。以上结果表明CBD能增加抑郁样小鼠海马和前额皮层SYP

的浓度。

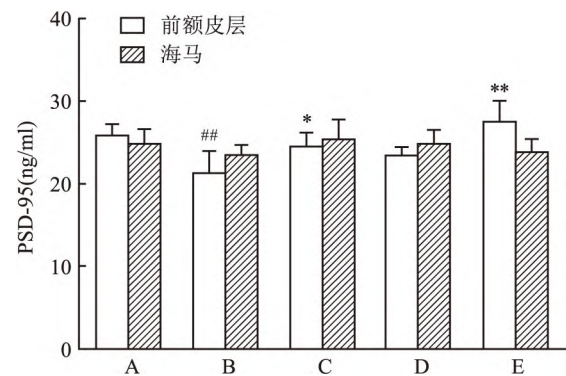


图3 CBD对抑郁样小鼠海马和前额皮层中PSD-95浓度的影响

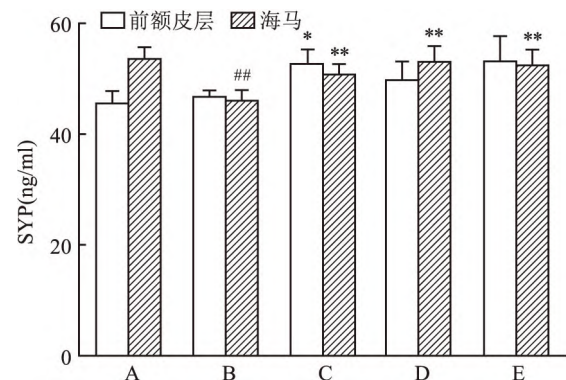
A: 正常对照组; B: 模型组; C: CBD低剂量组; D: CBD高剂量组; E: 阳性对照组; 与正常对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 

图4 CBD对抑郁样小鼠海马和前额皮层中SYP浓度的影响

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CBD低剂量组; D: CBD高剂量组; E: 阳性对照组; 与正常对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2.6 CBD对抑郁样小鼠海马和前额皮层中mTOR浓度的影响 由图5可知,在海马区域,与正常对照组相比,模型组mTOR浓度明显下降($F = 13.013$,

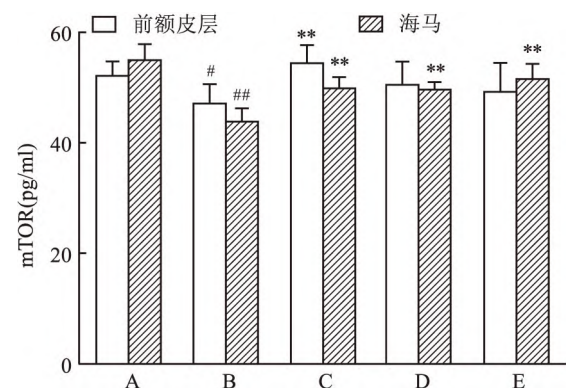


图5 CBD对抑郁样小鼠海马和前额皮层中mTOR浓度的影响

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CBD低剂量组; D: CBD高剂量组; E: 阳性对照组; 与正常对照组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

$P < 0.01$)。与模型组相比,CBD 低剂量组、高剂量组和阳性对照组 mTOR 浓度均明显上升($P < 0.01$)。在前额皮层区域,与正常对照组相比,模型组 mTOR 浓度降低($F = 2.888, P < 0.05$)。与模型组相比,CBD 低剂量组 mTOR 明显增高($P < 0.01$)。以上结果表明 CBD 能增加抑郁样小鼠海马和前额皮层 mTOR 的浓度。

3 讨论

抑郁症是遗传、生理、环境等诸多因素参与的精神疾病,发病机制尚不清楚。神经营养缺乏假说认为,抑郁状态下,前额叶皮层和边缘系统萎缩,神经营养因子含量明显减少。CBD 作为大麻中不具有精神活性和药物依赖性的成分,安全性相对高,已有较多在神经疾病,如癫痫、阿尔兹海默症、帕金森、焦虑症等方面的研究,但在抗抑郁作用及机制的研究还较少。

本实验使用舍曲林这一抗抑郁药物作为阳性对照,它已被证明可提高突触蛋白水平并促进海马神经元的树突生长^[4]。BDNF 参与神经可塑性和对应激性神经损伤的修复,其水平的调节已被证明在抑郁症的发病、治疗中发挥重要作用^[5]。PSD-95 和 SYP 是突触的特异性标志物。本实验结果表明:① CBD 能快速改善抑郁样小鼠的行为学表现;② CBD 能快速上调抑郁样小鼠前额皮层中 BDNF、PSD-95 水平,及前额皮层与海马中 SYP、mTOR 水平表达。可见,CBD 作用于抑郁样小鼠的积极作用与突触可塑性变化有关^[6]。抑郁调控与 mTOR 信号通路联系密切。有研究^[7]发现,慢性不可预测性应激可诱导大鼠抑郁样行为,降低海马中 mTOR 信号活性。CBD 可通过背侧海马中 BDNF-TrkB-mTOR 通路的激活从而发挥抗抑郁作用^[8],同时抑郁样小鼠内侧

前额皮质的突触可塑性改变也与此有关^[9]。本实验仍有局限之处,出于给药时间和剂量的考虑,本实验未进行小鼠脑的形态学检测。但可以明确的是,CBD 可快速改善应激小鼠的抑郁样行为,且此作用与海马或前额皮层中 BDNF、突触蛋白水平上调有关。

参考文献

- [1] World Health Organization. Depression and other common mental disorders: global health estimates[R]. Geneva: World Health Organization, 2017.
- [2] 宁 康,董林林,李孟芝,等. 非精神活性药用大麻的应用及开发[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 228-40.
- [3] Silote G P, Sartim A, Sales A, et al. Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms[J]. J Chem Neuroanat, 2019, 98:104-16.
- [4] Seo M K, Lee C H, Cho H Y, et al. Effects of antidepressant drugs on synaptic protein levels and dendritic outgrowth in hippocampal neuronal cultures[J]. Neuropharmacology, 2014, 79: 222-33.
- [5] 刘 晶,吴 敏,孟凡涛,等. 雌激素对雌鼠抑郁样行为和海马 BDNF 表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(9): 1400-4.
- [6] Campos A C, Fogaça M V, Scarante F F, et al. Plastic and neuroprotective mechanisms involved in the therapeutic effects of cannabidiol in psychiatric disorders[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 269.
- [7] Zhong P, Wang W, Pan B, et al. Monoacylglycerol lipase inhibition blocks chronic stress-induced depressive-like behaviors via activation of mTOR signaling[J]. Neuropsychopharmacology, 2014, 39(7):1763-76.
- [8] Sartim A G, Sales A J, Guimarães F S, et al. Hippocampal mammalian target of rapamycin is implicated in stress-coping behavior induced by cannabidiol in the forced swim test[J]. J Psychopharmacol, 2018, 32(8): 922-31.
- [9] Sales A J, Fogaça M V, Sartim A G, et al. Cannabidiol induces rapid and sustained antidepressant-like effects through increased BDNF signaling and synaptogenesis in the prefrontal cortex[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(2):1070-81.

Cannabidiol up-regulates BDNF and synaptic protein to exert antidepressant effects

Yang Yan¹, Ma Tengting¹, Bian Yujing¹, Gu Jiangna¹, Sun Yuyuan¹,

Wen Zhenyong¹, Xie Jianping², Yuan Yun¹, Guo Ying¹

(¹School of Basic Medical Sciences, Kunming Medical University, Kunming 650000,

²Library, Yunnan Minzu University, Kunming 650000)

Abstract Objective To study the rapid antidepressant effects of cannabidiol (CBD) on depression-like mice and its possible mechanism. **Methods** Chronic restraint was used to establish a mouse depression model. The test mice were divided into 5 groups: normal control group, model group, positive control group, CBD low-dose group

慢性子代应激改善妊娠期慢性应激诱导的子代雄鼠抑郁

陶 龙^{1,2}, 刘 锐¹, 徐家雯¹, 张 阔¹, 姚余有^{1,2}

摘要 目的 探讨妊娠期慢性应激(CSDP)联合慢性子代应激(COS)在诱导子代雄性小鼠抑郁的作用和机制。方法 将 C57/BL6J 孕鼠分为正常处理组和慢性应激组,子鼠出生后选取雄性子鼠,分为妊娠期正常对照 + 子代正常对照组(NC + NC 组)、妊娠期正常对照 + 子代慢性应激组(NC + COS 组)、妊娠期慢性应激 + 子代正常对照组(CSDP + NC 组)、妊娠期慢性应激 + 子代慢性应激组(CSDP + COS 组)。通过强迫游泳实验和高架十字迷宫实验检测子鼠的抑郁程度;运用高尔基染色法观察海马 CA3 区神经元树突损伤;使用 TUNEL 染色观察海马 CA3 区神经元凋亡情况;采用 Western blot 技术测定海马组织 mTOR 和 p-mTOR(Ser2448)蛋白含量,计算 mTOR 蛋白活性。结果 妊娠期慢性应激引起子代雄鼠抑郁样行为,导致海马 CA3 区神经元树突损伤和神经元凋亡,mTOR 蛋白活性降低。当子鼠再经历慢性应激后,可改善妊娠期慢性应激诱导的雄性子代小鼠抑郁样行为,降低海马 CA3 区神经元凋亡指数,减轻 CA3 区神经元树突损伤,同时提高了 mTOR 蛋白活性。结论 妊娠期慢性应激可致雄性子代小鼠出现抑郁样行为,慢性子代应激可以改善由妊娠期慢性应激所诱导的雄性子代小鼠的抑郁样行为和海马 CA3 区的神经元树突损伤和凋亡,慢性子代应激可

能通过调节 mTOR 信号通路来改善由妊娠期慢性应激引起的子代抑郁样行为。

关键词 抑郁;海马;慢性子代应激;妊娠期慢性应激;mTOR
中图分类号 R 749.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1210-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.007

抑郁症作为一种全球性的精神疾病,其特点是消极和动机减少,严重危害人们的身心健康^[1],是全球总体疾病负担的主要原因^[2]。目前,抑郁症的发病机制尚未阐明,有研究^[3]显示暴露于慢性应激事件可以增加人类患抑郁症的风险。同时,动物研究^[4-5]发现,孕鼠在怀孕期间遭受慢性应激会诱导其后代出现抑郁样行为,且雄性子代更易出现。当今社会竞争激烈,孕妇和其子代都有可能暴露于慢性应激环境中,但很少有研究关注慢性子代应激对妊娠期慢性应激的子代抑郁有何影响。因此,该文拟通过观察妊娠期慢性应激和慢性子代应激联合作用对子鼠抑郁样行为的影响,研究慢性子代应激对妊娠期慢性应激的子代抑郁有何作用,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60 只 7 周龄 C57/BL6J 小鼠(40 只雌性、20 只雄性)购自江苏集萃药康生物科技公司,体质量 17~20 g。在标准实验室条件下[室温

2022-05-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81773452)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院¹ 卫生检验与检疫学系、² 人口健康与优生安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介:陶 龙,男,本科;

姚余有,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yaoan-qy71@aliyun.com

(25 mg/kg) and CBD high-dose group (50 mg/kg). The mice in each group were given intragastric administration one hour before the behavioral experiment. After the behavioral experiment, the hippocampus and prefrontal cortex specimens were collected, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), postsynaptic density protein 95 (PSD-95), synaptophysin (SYP) and target of rapamycin (mTOR) were tested by ELISA. **Results** Compared with the model group, the central area activity distance percentage, the central area activity time percentage and total distance increased in the open field experiment in the CBD low-dose group. Compared with the model group, the percentage of immobility in the forced swimming experiment in the low-dose CBD group decreased. The ELISA test results showed that CBD could rapidly increase the concentration of BDNF and PSD-95 in the prefrontal cortex, as well as the concentration of SYP and mTOR in the hippocampus and prefrontal cortex. **Conclusion** CBD can rapidly improve the behavioral performance of depression-like mice, and rapidly up-regulate the level of BDNF and synaptic protein in the hippocampus or prefrontal cortex.

Key words cannabidiol; antidepressant effects; prefrontal cortex; hippocampus