

网络出版时间:2022-8-16 14:48 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220816.0832.011.html

慢性间歇性缺氧调控 mTOR-自噬信号致小鼠焦虑和抑郁样行为机制研究

赵振涛¹,程玉洁²,梅金玉¹,陈 明²

摘要 目的 研究慢性间歇性缺氧(CIH)对小鼠焦虑和抑郁样行为的影响及可能机制。方法 14只8周龄C57BL/6雄性小鼠随机分为对照组(Ctrl组)和CIH组。通过悬尾实验评价小鼠抑郁状态,通过旷场实验评价小鼠基本运动功能和焦虑状态。Western blot检测小鼠海马区中mTOR、p-mTOR、Atg7、p62、NLRP3、NLRP1等自噬相关蛋白及神经炎症水平。结果 与Ctrl组比较,CIH组小鼠在旷场实验中运动距离($t=6.377, P<0.001$)、运动速度($t=6.362, P<0.001$)、穿线次数($t=6.131, P<0.001$)、中央区域时间降低($t=9.295, P<0.001$),而悬尾实验中不动时间增加($t=4.684, P<0.001$),海马区NLRP3($t=15.320, P<0.001$)、p-mTOR蛋白($t=5.076, P<0.05$)表达水平增加,Atg7蛋白

($t=3.511, P<0.05$)表达水平降低,而前额叶皮层中上述蛋白均无变化。结论 CIH通过激活小鼠海马区mTOR信号,引起海马区自噬水平降低、NLRP3炎症小体累积,最终导致小鼠出现焦虑和抑郁样行为。

关键词 慢性间歇性缺氧;焦虑和抑郁样行为;自噬;mTOR; NLRP3炎症小体

中图分类号 R 749.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1413-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.014

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea hyponea syndrome, OSAHS)是目前世界主要的公共卫生难题之一,被认为是心脑血管疾病、神经系统损伤、机体代谢功能损伤的独立危险因素^[1],其神经精神症状主要表现为焦虑、抑郁以及阿尔兹海默症^[2-3]。慢性间歇性缺氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)是OSAHS的主要临床特征之一^[4],海马及前额叶皮层作为情感的结构基础,易受到缺氧刺激的影响^[5]。该课题组前期预实验结

2021-12-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81801064)

作者单位:¹ 安徽医科大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科,合肥 230601

² 安徽医科大学基础医学院药理学教研室,合肥 230032

作者简介:赵振涛,男,硕士研究生;

梅金玉,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: meijinyu@ahmu.edu.cn

and bonding durability of zirconia ceramics. **Methods** 180 pieces of zirconia ceramic(Y-TZP) were randomly divided into 5 groups ($n=36$). Group A: blank group; Group B: sandblast group; Group C: nitrogen(N_2) plasma group; Group D: oxygen(O_2) plasma group; Group E: argon(Ar) plasma group. The surface hydrophilicity and microstructure of zirconia ceramics were observed, and the changes of surface elements and functional groups were detected. Each group of bonded specimens was randomly divided into two subgroups ($n=15$). After receiving 0 and 10 000 cycles of heat and cold, the shear strength was measured. The measured results were statistically analyzed and the fracture mode was analyzed. **Results** The surface contact angles of groups B, C, D and E were significantly lower than those of group A, with statistically significant differences ($P<0.001$). Compared with group A, the surface morphology of group C, D and E did not significantly change, while that of group B significantly changed. XPS showed that the surface carbon decreased, oxygen increased and carbon/oxygen ratio decreased after plasma treatment. SBS results showed that the immediate shear bonding strength of group A was lower than that of the other four groups ($P<0.001$), and there was no significant difference in the immediate shear bonding strength of groups B, C, D and E ($P>0.05$); After artificial aging, the shear bonding strength of group A was significantly lower than that of the other four groups, and the difference of shear bonding strength between groups A and B before and after artificial aging was statistically significant ($P<0.001$). **Conclusion** The zirconia ceramics achieves better bonding strength and durability with resin cement through three kinds of low temperature plasmas, without changing the surface morphology.

Key words zirconia; low temperature plasma; surface morphology; shear bond strength; durability

果提示 CIH 可导致小鼠出现焦虑及抑郁样行为,由此推测小鼠出现焦虑和抑郁样行为可能与其海马或前额叶皮层的分子机制改变以及结构损伤有关。但是关于 OSAHS 患者经过治疗后,其焦虑和抑郁症状的改善情况报道较少。因此,该研究拟通过 CIH 模拟 OSAHS 对小鼠焦虑和抑郁样行为的影响,并探索其机制,为防治 OSAHS 患者出现焦虑和抑郁样行为提供一定程度上的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6 小鼠,雄性,体质量(20 ± 1)g,购自杭州子源实验动物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0004。

1.1.2 试剂 Western blot 一抗 NLRP1(1:1 000, 美国 Abcam 公司)、NLRP3(1:800, 美国 Abcam 公司)、Atg7(1:1 000, 美国 CST 公司)、p62(1:1 000, 美国 Affinity 公司)、mTOR(1:1 000, 美国 Affinity 公司)、p-mTOR(1:1 000, 美国 Affinity 公司)、 β -actin(1:5 000, 美国 Affinity 公司),二抗(1:10 000, 美国 Affinity 公司),BCA 蛋白浓度检测试剂盒(美国 Rockford Biotechnology Company 公司)。

1.1.3 主要仪器 全自动样品冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司)、水平摇床(天津欧诺仪器股份有限公司)、电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)、电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)、KDC-120HR 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)、Chemi Doc TMMP Imaging System(美国 Bio-Rad 公司)、TST-100 悬尾视频分析系统(成都泰盟软件有限公司)、旷场图像采集及分析系统(上海欣软信息科技有限公司)。

1.2 分组与动物模型建立 小鼠常规适应性饲养 1 周后随机分为对照组(Ctrl 组)和 CIH 组,每组 7 只。参照 Zhang et al^[6] 的 CIH 造模方法,并根据本研究实际情况对造模方法进行适当调整。Ctrl 组在正常空气环境中常规饲养。CIH 组每天 8:00—16:00 将小鼠置于动物间歇低氧舱中,舱内氧浓度维持在 6%~21%(舱内氧气浓度 30 s 内由 21%降低至 6%并维持 30 s,然后在 12 s 内升高至 21%并维持 18 s,每个循环 90 s),持续 8 周,CIH 组间歇性缺氧过程自由进食水。

1.3 小鼠行为评价试验

1.3.1 小鼠运动功能和焦虑状态评价 使用旷场实验进行小鼠焦虑状态评价。测试箱(96 cm × 96

cm × 50 cm)分成 9 个相等的正方形。首先,将小鼠放置于测试箱中央区域,自由活动适应 2 min 后,拍摄 3 min 内小鼠在实验箱内的活动情况,分析运动轨迹,计算运动距离、平均速度、进入中央区域时间、穿线次数。每只小鼠实验后,清洁测试箱的四周和底壁,以消除嗅觉信号,并擦干测试箱,以消除嗅觉信号。

1.3.2 小鼠抑郁状态评价 应用悬尾实验评价小鼠抑郁状态。实验时,从每组随机选取 3~4 只小鼠,用夹子夹住尾尖 1 cm 处,随后将小鼠倒立悬吊于实验舱内,小鼠腹部正对摄像机,测试时间为 6 min,由监控系统拍摄记录小鼠实验后 4 min 内的活动情况,计算累积不动时间。

1.4 Western blot 检测小鼠海马及前额叶皮层的炎性小体、自噬相关蛋白 行为测试结束后,先麻醉两组小鼠,然后断头处死动物,解剖脑组织,冰上取出海马及前额叶皮层组织。根据 BCA 蛋白质浓度检测试剂盒操作说明测定海马及前额叶皮层总蛋白浓度。根据总蛋白浓度确定上样量,10% SDS-PAGE 用于分离样品。经过上样、电泳(75 V, 45 min;120 V, 1 h)、转膜(200 mA, 1 h;300 mA, 30 min)、封闭(5%脱脂奶粉)、一抗 4℃过夜、TBST 洗膜、二抗孵育、TBST 洗膜,最后加入显影液,使用 Chemi Doc TMMP 成像系统及专业分析软件进行分析。以 β -actin 为内参。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 23.0、GraphPad Prism8.0.2 进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIH 对小鼠旷场实验中行为的影响 与 Ctrl 组比较,CIH 组小鼠在旷场实验中的运动距离、穿线次数、平均运动速度降低($t = 6.377, 6.131, 6.362$, 均 $P < 0.001$),表明 CIH 可以一定程度上影响小鼠的运动功能;此外,与 Ctrl 组比较,CIH 组小鼠在旷场实验中的中央区域时间减少($t = 9.295, P < 0.001$),表明 CIH 可导致小鼠出现焦虑样行为。见图 1。

2.2 CIH 对小鼠悬尾不动时间的影响 在悬尾实验中,与 Ctrl 组比较,CIH 组小鼠的不动时间增加,差异有统计学意义[(68.59 ± 35.75) s vs (161.93 ± 38.76) s, $t = 4.684, P < 0.001$],提示经过 8 周的 CIH,小鼠出现抑郁样行为。见图 2。

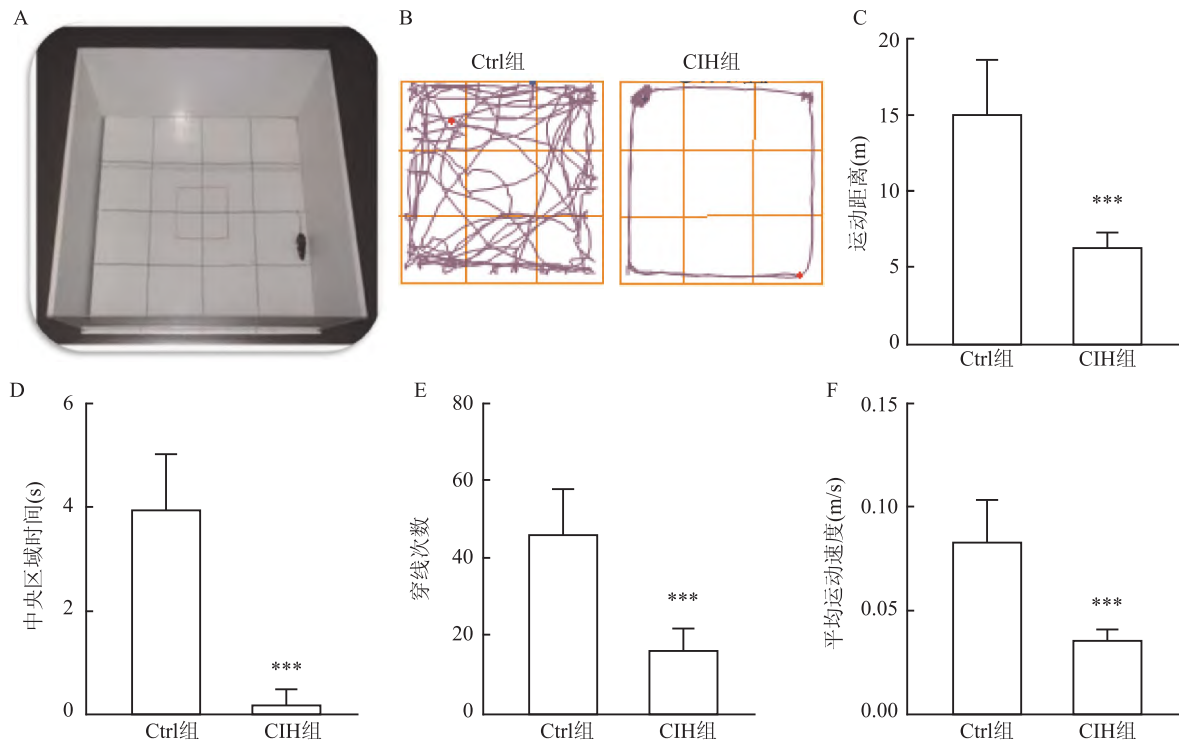


图1 旷场实验

A: 旷场实验示意图; B: 旷场实验 Ctrl 组与 CIH 组小鼠运动轨迹图; C ~ F: 旷场实验结果, 依次为运动距离、中央区域时间、穿线次数、平均运动速度; 与 Ctrl 组比较: *** $P < 0.001$

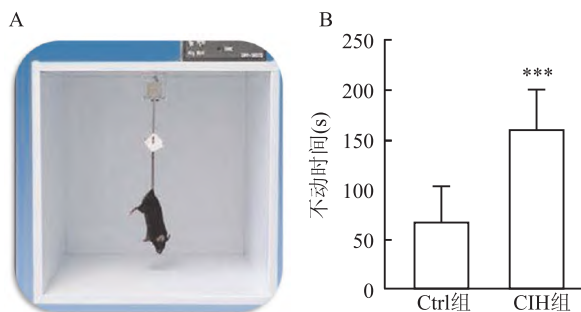


图2 悬尾实验

A: 悬尾实验示意图; B: 悬尾实验结果; 与 Ctrl 组比较: *** $P < 0.001$

2.3 CIH 对小鼠海马区神经炎症的影响 采用 Western blot 方法检测两组小鼠海马及前额叶皮层组织中炎性小体含量, 发现 CIH 组小鼠海马中的 NLRP3 ($t = 15.320, P < 0.001$) 水平上调, 而 NLRP1 ($t = 1.159, P > 0.05$) 保持不变; CIH 组小鼠前额叶皮层中 NLRP3 ($t = 0.04915, P > 0.05$)、NLRP1 ($t = 1.656, P > 0.05$) 均无明显改变, 表明 CIH 可诱导小鼠海马区发生神经炎症。见图 3。

2.4 CIH 对小鼠海马区自噬水平的影响 通过 Western blot 检测了 CIH 后小鼠海马及前额叶皮层

组织中自噬相关蛋白的水平, 发现 CIH 组小鼠海马组织中 Atg7 水平下降 ($t = 3.511, P < 0.05$), 而 p62 ($t = 2.059, P > 0.05$) 水平无明显改变; 前额叶皮层中 Atg7 ($t = 0.1703, P > 0.05$)、p62 ($t = 0.8133, P > 0.05$) 水平均无明显改变, 提示 CIH 可降低小鼠海马区自噬水平。见图 4。

2.5 CIH 对小鼠海马区 mTOR 信号的影响 同时, AMPK 促进自噬启动, m-TOR 是自噬途径的负调节因子。AMPK 通过直接磷酸化和抑制 m-TOR 磷酸化来激活细胞自噬, m-TOR 磷酸化水平增加可抑制机体自噬水平。为了探讨 CIH 是否通过 m-TOR 途径影响自噬, 本研究同时检测了 CIH 后小鼠海马区及前额叶皮层中 m-TOR 途径相关蛋白的水平, 发现小鼠海马组织中 p-mTOR 水平上调 (p-mTOR/ β -actin、p-mTOR/mTOR 的 t 值分别是 4.709、5.076, 均 $P < 0.05$), 而前额叶皮层中 mTOR ($t = 0.172, P > 0.05$) 及 p-mTOR (p-mTOR/ β -actin、p-mTOR/mTOR 的 t 值分别是 0.6233、0.9077, $P > 0.05$) 水平均无明显改变, 表明 CIH 可通过激活 mTOR 磷酸化, 产生过量 p-mTOR, 从而推测 p-mTOR 抑制上述小鼠海马区的自噬水平。见图 5。

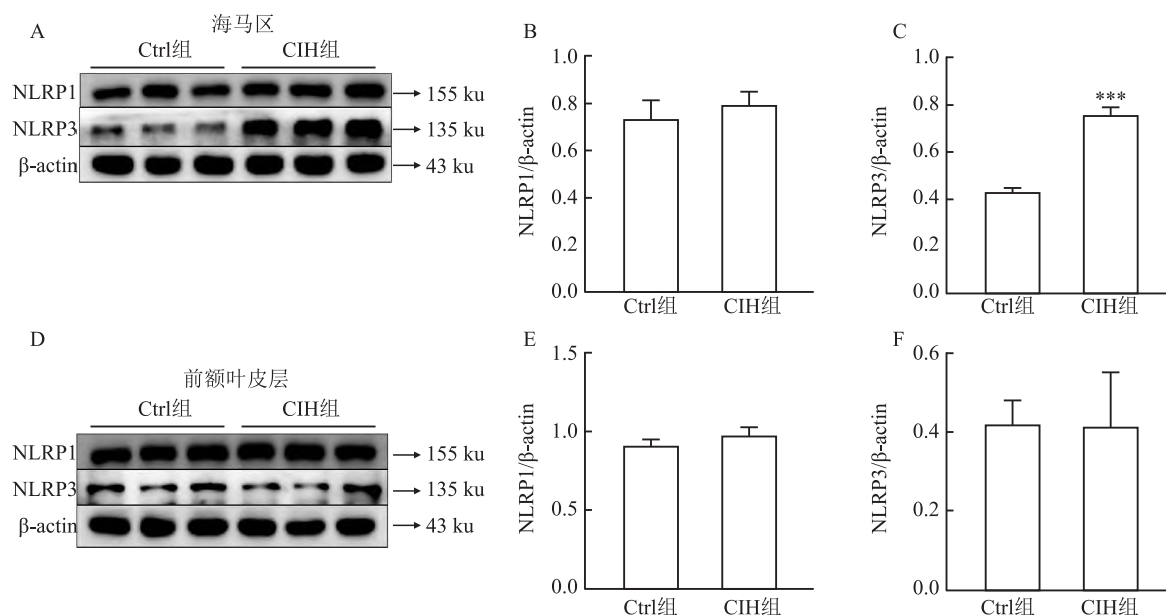


图3 CIH对炎症小体水平的影响

A:海马区的 Western blot 蛋白条带;B、C:海马区的 NLRP1/β-actin、NLRP3/β-actin 水平;D:前额叶皮层的 Western blot 蛋白条带;E、F:前额叶皮层的 NLRP1/β-actin、NLRP3/β-actin 水平;与 Ctrl 组比较:*** $P < 0.001$

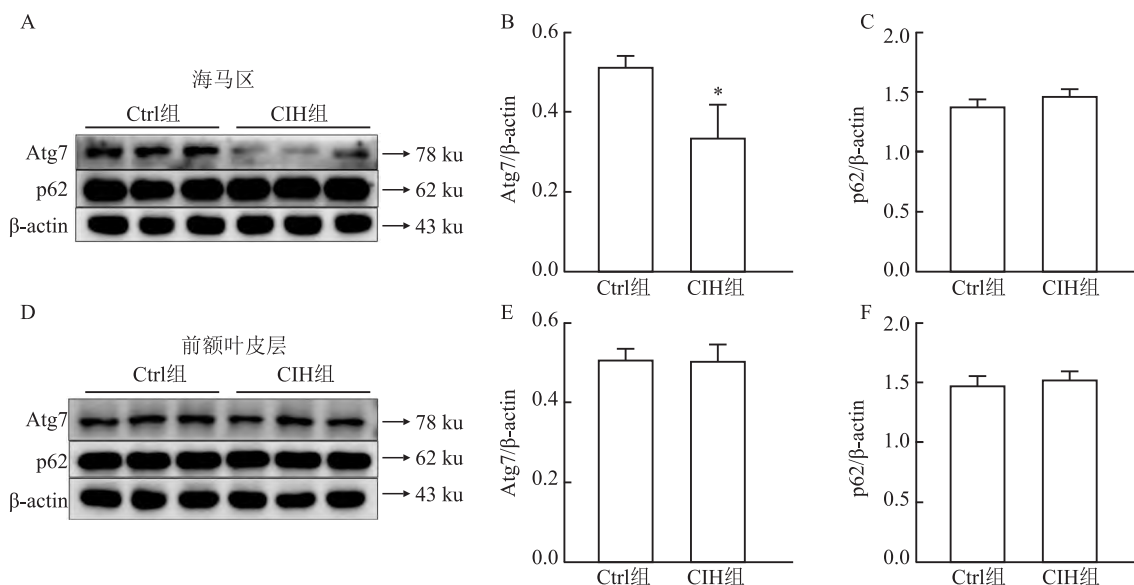


图4 CIH对自噬水平的影响

A:海马区的 Western blot 蛋白条带;B、C:海马区的 Atg7/β-actin、p62/β-actin 水平;D:前额叶皮层的 Western blot 蛋白条带;E、F:前额叶皮层的 Atg7/β-actin、p62/β-actin 水平;与 Ctrl 组比较:* $P < 0.05$

3 讨论

本研究发现,CIH 8 周后,小鼠出现焦虑抑郁样行为。Western blot 结果提示 CIH 组小鼠海马区 NLRP3、p-mTOR 增加,Atg7 降低,由此推测,CIH 通过激活 mTOR 磷酸化,从而抑制自噬水平,导致 NLRP3 累积增加,最终引起海马区损伤,出现焦虑抑郁样行为。这可能在一定程度上解释 OSAHS 患者罹

患焦虑抑郁症的机制,为临床防治提供基础研究理论。

抑郁症是一种以心境低落为核心的情感障碍,可有焦虑、精力减退等多方面表现。研究^[7]表明,OSAHS 患者的焦虑抑郁症状患病率远高于非 OSAHS 人群,长期焦虑抑郁会导致睡眠质量不佳等,加重 OSAHS 症状,形成恶性循环。

目前焦虑、抑郁的发病机制假说主要包括炎症

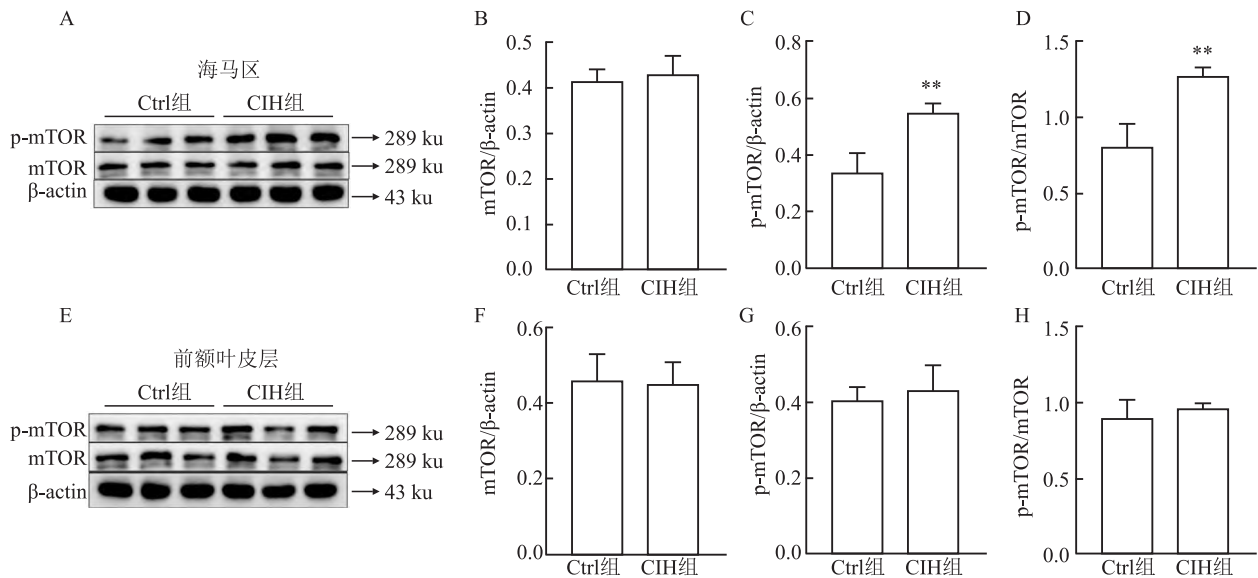


图5 CIH对mTOR-自噬途径蛋白水平的影响

A: 海马区 Western blot 蛋白条带; B~D: 海马区的 mTOR/β-actin、p-mTOR/β-actin、p-mTOR/mTOR 水平; E: 前额叶皮层的 Western blot 蛋白条带; F~H: 前额叶皮层的 mTOR/β-actin、p-mTOR/β-actin、p-mTOR/mTOR 水平; 与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$

假说、细胞自噬假说等。炎症假说指出过度激活的炎症反应在抑郁症的发生发展中具有重要作用^[8]。神经炎症是对组织损伤的一种先天免疫反应,在许多中枢神经系统疾病中发挥重要作用,其特点是小胶质细胞的激活,伴炎症因子和趋化因子水平的升高^[9]。炎性小体是先天免疫反应的重要组成部分,参与炎症相关神经疾病的发生与发展^[10],而 NLRP3 作为一种目前研究比较深入的炎性小体,由 NLRP3 蛋白、凋亡相关斑点样蛋白和 Caspase-1 组成,可被多种外源性及内源性刺激激活,如感染、损伤、代谢产物等。应激状态下,免疫细胞被激活,凋亡相关斑点样蛋白由胞核移位到胞浆,招募并活化 Caspase-1 前体蛋白,活化的 Caspase-1 能够促进 pro-IL-1β、pro-IL-18 的成熟活化并释放到胞外,引发炎症反应^[11]。炎症反应的发生又会进一步激活 NLRP3,如此循环反复,进一步加重炎症反应,最终引起组织损伤,诱发疾病。另外,研究^[12]表明,抑郁状态下海马区 NLRP3 水平呈过度激活状态,而敲除 NLRP3 基因的小鼠,在慢性刺激下不会出现抑郁样行为。本研究中,小鼠在 CIH 8 周后出现明显的焦虑和抑郁样行为,Western blot 结果提示 CIH 组小鼠海马区 NLRP3 显著升高。这可能是由于 CIH 作为一种损害信号,能够激活 NLRP3,最终驱动炎症反应的发生。而中枢神经系统中 NLRP3 主要表达于小胶质细胞^[13],其过度激活,诱导产生神经炎症,最终引起海马区损伤。

自噬是真核细胞通过溶酶体途径降解和再利用细胞质成分的过程,是细胞自我保护的重要机制。自噬受多种信号分子的调控,mTOR 是最重要的信号分子之一,是自噬的负调节因子,在正常生理条件下,磷酸化 mTOR 能够抑制细胞自噬^[14]。机体处于稳态时,自噬处于低水平状态,但是在神经元中自噬处于活跃状态,有利于维持神经元的结构、功能、存活。有研究^[15]表明,抑制神经元自噬水平,其存活率下降。本研究中,Western blot 结果提示 CIH 8 周后,小鼠海马区 p-mTOR 水平增加,Atg7 水平降低,提示 CIH 可通过激活 mTOR,诱导其磷酸化,产生 p-mTOR,最终抑制海马区自噬水平,从而引起海马区神经元的损伤。

本研究结果表明,CIH 8 周后,小鼠海马区 NLRP3、p-mTOR 水平增加,Atg7 水平降低,可能是由于 CIH 激活 mTOR,抑制小鼠海马区自噬水平,导致神经炎症介质累积,NLRP3 水平升高,引起海马区损伤。

综上所述,CIH 通过激活 mTOR 抑制海马区自噬水平并累积过量的 NLRP3,最终引起海马区损伤,出现焦虑和抑郁样行为。因此,提高海马区自噬水平及降低海马区 NLRP3 水平可能成为防治 OS-AHS 患者出现焦虑及抑郁症状的新靶点。

参考文献

- [1] Bibbins-Domingo K, Grossman D C, Curry S J, et al. Screening for obstructive sleep apnea in adults: US preventive services task

- force recommendation statement[J]. *JAMA*,2017,317(4): 407 – 14.
- [2] Rosenzweig I, Glasser M, Polsek D, et al. Sleep apnoea and the brain: a complex relationship[J]. *Lancet Respir Med*,2015,3(5): 404 – 14.
- [3] Khazaie H, Veronese M, Noori K, et al. Functional reorganization in obstructive sleep apnoea and insomnia: a systematic review of the resting-state fmri[J]. *Neurosci Biobehav Rev*,2017,77: 219 – 31.
- [4] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会全科医学分会,等. 成人阻塞性睡眠呼吸暂停基层诊疗指南(2018年)[J]. 中华全科医师杂志,2019,18(1):21 – 9.
- [5] Belleau E L, Treadway M T, Pizzagalli D A. The impact of stress and major depressive disorder on hippocampal and medial prefrontal cortex morphology[J]. *Biol Psychiatry*,2019,85(6): 443 – 53.
- [6] Zhang Y, Cao H, Qiu X, et al. Neuroprotective effects of adenosine A1 receptor signaling on cognitive impairment induced by chronic intermittent hypoxia in mice[J]. *Front Cell Neurosci*, 2020,14: 202.
- [7] Beiske K K, Stavem K. Health status in subjects with suspected obstructive sleep apnea and comparison with a general population [J]. *Sci Rep*,2018,8(1): 5579.
- [8] Wittenberg G M, Stylianou A, Zhang Y, et al. Effects of immunomodulatory drugs on depressive symptoms: a mega-analysis of randomized, placebo-controlled clinical trials in inflammatory disorders[J]. *Mol Psychiatry*,2020,25(6): 1275 – 85.
- [9] Morganti-Kossmann M C, Sempere B D, Hellewell S C, et al. The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments [J]. *Acta Neuropathol*,2019,137(5): 731 – 55.
- [10] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Trends Biochem Sci*,2016,41(12): 1012 – 21.
- [11] Mangan M S J, Olhava E J, Roush W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2018,17(9): 688.
- [12] 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.
- [13] Arioz B I, Tastan B, Tarakcioglu E, et al. Melatonin attenuates lps-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway [J]. *Front Immunol*,2019,10: 1511.
- [14] 王月涵,黄颖. HDAC3 负性调控 mTOR 促进低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(10):1575 – 9.
- [15] Goldsmith J, Holzbaur E L F. Proteomic profiling shows mitochondrial nucleoids are autophagy cargo in neurons: implications for neuron maintenance and neurodegenerative disease [J]. *Autophagy*,2022,29:1 – 3.

Chronic intermittent hypoxia leads to depressive and anxiety-like behaviors in mice *via* regulating mTOR-autophagy signaling

Zhao Zhentao¹, Cheng Yujie², Mei Jinyu¹, Chen Ming²

(¹*Dept of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;* ²*School of Pharmacology, College of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To investigate the effects of chronic intermittent hypoxia (CIH) on depressive and anxiety-like behaviors in CIH mice model and the possible mechanisms. **Methods** Fourteen 8-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into control group (Ctrl group) and CIH group. The depressive-like behavior was evaluated by the tail suspension test; while the basic motor function and anxiety-like behavior were evaluated by the open field test. Western blot was performed to quantitatively detect the expression of mTOR, p-mTOR, Atg7, p62, NLRP3 and NLRP1 in the hippocampus and prefrontal cortex of mice. **Results** Compared with the Ctrl group, CIH group mice showed reduced moving distance ($t = 6.377$, $P < 0.001$), moving speed ($t = 6.362$, $P < 0.001$), line crossing ($t = 6.131$, $P < 0.001$) and central time ($t = 9.295$, $P < 0.001$) in open field test. Besides, the immobility time ($t = 4.684$, $P < 0.001$) in tail suspension test was increased in CIH mice. In addition, Western blot results showed an increased NLRP3 ($t = 15.320$, $P < 0.001$), p-mTOR ($t = 5.076$, $P < 0.05$) and a decreased Atg7 ($t = 3.511$, $P < 0.05$) protein levels in hippocampus, leaving unchanged in prefrontal cortex. **Conclusion** CIH can lead to depressive and anxiety-like behaviors in mice through activating mTOR to inhibit autophagy and increasing NLRP3 inflammasome protein level.

Key words chronic intermittent hypoxia; anxiety and depression-like behavior; autophagy; mTOR; NLRP3 inflammatory corpuscle