

本文引用:刘丹,蔺晓源,文诗仪,刘彤彤,孟盼. 磷酸二酯酶4抑制剂咯利普兰对慢性应激抑郁模型大鼠学习记忆及海马突触可塑性的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2021,41(3): 359-363.

磷酸二酯酶4抑制剂咯利普兰对慢性应激抑郁模型大鼠学习记忆及海马突触可塑性的影响

刘丹¹,蔺晓源¹,文诗仪²,刘彤彤³,孟盼^{3*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007;2.湖南中医药大学医学院,湖南长沙410208;
3.湖南中医药大学科技创新中心,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 探讨磷酸二酯酶4(phosphodiesterase 4, PDE4)抑制剂咯利普兰对慢性应激抑郁模型大鼠行为活动、学习记忆及海马突触可塑性的影响。**方法** 采用慢性温和不可预见性应激的方式建立抑郁模型,将SD大鼠随机分为4组,即空白组、抑郁模型组、氟西汀组、咯利普兰组。造模的同时,氟西汀组灌胃氟西汀(5.4 mg/kg),咯利普兰在实验的第1、7、14、21天腹腔注射给药,均按1.25 mg/kg给药,模型组腹腔注射等量生理盐水,观察咯利普兰对抑郁模型大鼠旷场、水迷宫的影响,ELISA检测血浆和海马组织中cAMP水平的变化,免疫组化观察各组大鼠海马突触素(synaptophysin, SYN)的表达,Western blot检测PI3K、p-CREB、BDNF的表达情况。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠活动量下降($P<0.01$),目标象限的穿越次数下降($P<0.05$)、潜伏时间增加($P<0.01$),血浆、海马组织中cAMP含量下降($P<0.01$),海马SYN、BDNF、PI3K、p-CREB的表达下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,咯利普兰能显著增加抑郁模型大鼠的活动量($P<0.01$),增加穿越目标象限的次数($P<0.05$),降低目标象限的潜伏时间($P<0.05$),增加血浆、海马组织中cAMP的含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并能显著促进模型大鼠海马SYN、BDNF、PI3K、p-CREB的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 咯利普兰能显著改善抑郁模型大鼠的学习记忆能力并能促进海马突触可塑性,其机制可能与调节海马BDNF-PI3K信号通路的相互作用紧密相关。

[关键词] 抑郁症;咯利普兰;磷酸二酯酶4;海马;突触可塑性;学习记忆

[中图分类号]R969;R2 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.03.007

Effects of Phosphodiesterase 4 Inhibitor Rolipram on Learning, Memory and Synaptic Plasticity of Hippocampus in Rats of Chronic Unpredicted Mild Stress Model

LIU Dan¹, LIN Xiaoyuan¹, WEN Shiyi², LIU Tongtong³, MENG Pan^{3*}

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Medical College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the molecular mechanism of phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor rolipram on behavioral activity, memory and hippocampal synaptic plasticity in chronic unpredicted mild stress (CUMS) rats. **Methods** The depressed rats were established by CUMS. SD rats were randomly divided into 4 groups: blank control group, depression model group, fluoxetine group and rolipram group. At the same time of modeling, fluoxetine group was given fluoxetine (5.4 mg/kg) by gavage, and rolipram group was given intraperitoneally at 1.25 mg/kg on day 1, 7, 14 and 21 of the experiment. Model group was injected intraperitoneally with the same amount of normal saline. The effects of rolipram on open field test and water maze test

[收稿日期]2020-08-28

[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)。

[作者简介]刘丹,女,博士,主治医师,研究方向:中医方剂学。

[通讯作者]*孟盼,女,博士,副研究员,E-mail:mengpan0822@163.com。

of depression model rats were observed. The changes of cAMP level in plasma and hippocampus were detected by ELISA. Synaptophysin (SYN) in hippocampus of rats was observed by immunohistochemistry, and PI3K, p-CREB, BDNF were detected by Western blot. **Results** Compared with normal group, the activity of rats in model group decreased ($P<0.01$), the number of crossing target quadrant decreased ($P<0.05$), the latency time increased ($P<0.01$), the content of cAMP in plasma and hippocampus decreased ($P<0.01$), and the expressions of SYN, BDNF, PI3K and p-CREB in hippocampus were down-regulated ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, rolipram could significantly increase the scores of activities of the depressed model rats ($P<0.01$), significantly promote the times of crossing the target quadrant ($P<0.05$), reduce the latency time of the target quadrant ($P<0.05$) and increase the content of cAMP in plasma, hippocampal tissue ($P<0.05$ or $P<0.01$), and can significantly promote the model of rat hippocampal SYN, BDNF, PI3K, and P-CREB ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Rolipram can significantly improve the learning and memory ability of CUMS rats and promote synaptic plasticity of hippocampus, which may be closely related to the interaction between BDNF-PI3K signal pathway of hippocampal.

[**Keywords**] depression; rolipram; phosphodiesterase 4; hippocampus; synaptic plasticity; learning and memory

磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)是第二信使环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的特异性水解酶,对细胞内环核苷酸信号具有重要的调控作用。咯利普兰是磷酸二酯酶4(phosphodiesterase 4, PDE4)高效选择性抑制剂,动物实验及临床试验证明其具有改善认知及调控神经元凋亡等多种功能^[1]。cAMP/环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)是目前抑郁症中阐述最为清晰的一条通路,即G蛋白偶联受体作用于下游的PDE,通过下调第二信使cAMP的水平,降低cAMP依赖的蛋白激酶A的活性进而减少CREB的Ser133位磷酸化,最终抑制海马可塑性相关基因的诱导和调控^[2]。PDE4能够特异性地将cAMP降解为AMP,而PDE4特异性抑制剂咯利普兰能够逆转上述反应,以达到抗抑郁的功效^[3],然其机制尚不清晰。本研究旨在观察咯利普兰对抑郁模型大鼠行为学及学习记忆的影响,并初步分析其调节海马神经可塑性的分子机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠,SPF级,220~240 g,由湖南斯莱科景达实验动物有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(湘)2009-0004,动物合格证号:HNASLKJ20170829。在光/暗周期为12 h/12 h的条件下饲养于笼中,自由获得饲料和饮水。

1.2 药物

咯利普兰(货号:R6520,规格:25 mg,美国Sigma-aldrich公司);盐酸氟西汀胶囊(20 mg/粒,法国礼来苏州制药有限公司生产,批号:0722A)购自湖南中医药大学第一附属医院。

1.3 主要试剂

多聚赖氨酸(北京中杉金桥生物技术有限公司,ZLI9005);cAMP ELISA检测试剂盒(武汉伊莱瑞特

生物科技股份有限公司);GAPDH(BA2913)、SYN一抗(BA1421)、BDNF一抗(BA5260)、PI3K一抗(BA5260)、p-CREB一抗(BA5260)均购自英国Abcam公司;PVDF膜(密理博中国有限公司)。

1.4 主要仪器

近红外双色激光成像系统(美国LI-COR公司);凝胶成像仪(美国Bio-rad公司);生物组织切片机(德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 分组与造模

大鼠适应环境3 d后根据自主活动的数量随机分为4组,每组10只,即空白组、慢性应激抑郁模型组、氟西汀组、咯利普兰组。空白组每笼5只饲养,不给予任何刺激,其余各组每天随机给予不同刺激用以复制慢性应激抑郁模型,包括倾笼45℃、夹尾(1 min)、禁食(24 h)、昼夜颠倒(24 h)、4℃冰浴(15 min)、潮湿垫料(24 h)、噪音(4 h),每天随机安排1种,3 d内的刺激方法不重复^[4]。

2.2 给药

除空白组外,咯利普兰组造模同时腹腔注射给药,给药时间为实验第1、7、14、21天,给药剂量为1.25 mg/kg,同时灌胃一定体积的蒸馏水;氟西汀组灌胃给药,给药剂量为5.4 mg/kg,同时腹腔注射一定体积的生理盐水。模型组在造模的同时灌胃等体积的蒸馏水和注射一定体积的生理盐水。

2.3 行为学测定

2.3.1 旷场试验 黑色正方形敞箱(40 cm×80 cm×80 cm),将底面平均划分为面积相等的方格,将大鼠面向箱壁从统一固定点放入敞箱中,以穿越底面方格数为水平得分,以直立次数为垂直活动得分,记录大鼠在4 min内的活动次数(水平得分+垂直得分)。

2.3.2 水迷宫测试 将大鼠面向池壁放入水中,60 s

内未爬上平台的则将其牵引至平台处,并停留 20 s,连续训练 4 d,每天 1 次。正式试验时,将大鼠从第二象限处面向池壁放入水中,观察并记录大鼠寻找并爬上平台(第四象限)的逃避潜伏期(escape latency, EL)。撤除平台后,由同一水点将大鼠面向池壁放入水中,记录 4 min 内穿越目标象限的次数。

2.3.3 脑标本的采集 大鼠腹腔注射 4%戊巴比妥钠(100 mg/kg),呈深度麻醉后,仰位暴露心脏,经心尖部插入灌注生理盐水 250 mL 左右,再灌注 4 ℃ 4%多聚甲醛 200 mL,后剥离脑组织标本,进行固定、脱水、包埋、切片,留待备用。

2.3.4 ELISA 检测 严格按照 cAMP 的 ELISA 试剂盒说明书检测血浆、海马组织匀浆液中的 cAMP 含量。

2.3.5 免疫组化检测 切片常规脱蜡,3% H₂O₂ 灭活内源性酶,热抗原修复,冷却后洗涤,5% BSA 封闭,室温 20 min,加入兔抗大鼠 SYN 抗体(1:500 稀释),4 ℃ 过夜,滴加羊抗兔二抗于 37 ℃ 孵育 20 min,洗涤,DAB 显色,苏木素复染,封片。

2.3.6 Western blot 检测 取海马组织,按每 1 mg 组织加入 5 μL RIPA 裂解液的比例,冰上匀浆,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液制备组织蛋白提取液,BCA 法测定其蛋白含量,保存待用。制备分离胶与浓缩胶,SDS-PAGE 电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,后加入 PI3K(1:500)、p-CREB(1:800)、BDNF(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)一抗于 4 ℃ 冰箱孵育过夜,洗膜后加入二抗(1:2 000)并于室温下孵育 2 h,化学发光法显影,应用 ImageJ 图像处理软件对条带进行扫描,计算各组目的蛋白的相对表达量。

2.3.7 数据收集 利用 MoticB 5 图像分析软件进行图像采集和处理。对照大鼠脑立体定位图谱,各组每只大鼠选取大致相同部位的 3 张切片,每张切片分别在海马的 CA3 区选取 5 个互不重叠的视野,在 400 倍光镜下分别测量各个视野 SYN 阳性细胞的光密度值,取其平均值作为此切片的平均灰度值。

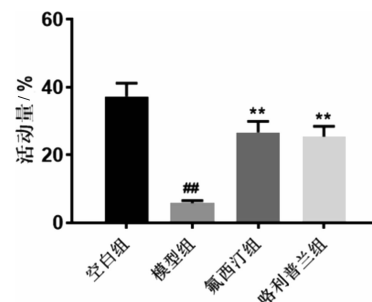
2.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。满足正态性和方差齐性时使用单因素方差分析比较各组间差异,否则使用 *H* 检验进行组间比较。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 咯利普兰对慢性应激抑郁模型大鼠行为学指标的影响

3.1.1 对开野实验的影响 与空白组比较,模型组大鼠 4 min 内活动量显著降低,差异具有统计学意义(*P*<0.01);与模型组比较,咯利普兰和氟西汀可显著提升模型大鼠的活动量(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。见图 1。



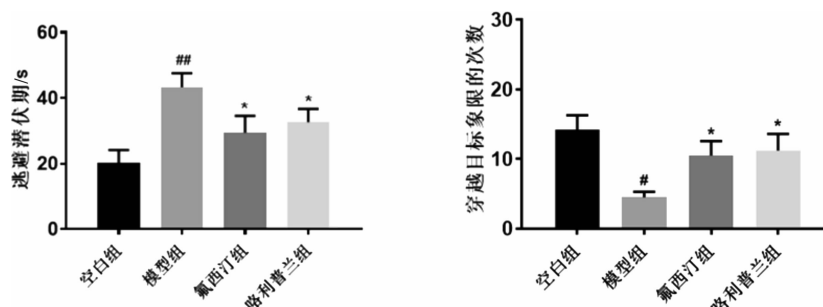
注:与空白组比较,##*P*<0.01;与模型组比较,***P*<0.01

图 1 各组大鼠活动量的比较

3.1.2 对慢性应激抑郁模型大鼠学习记忆的影响 与空白组比较,模型大鼠爬上平台的 EL 增加,穿越目标象限的次数减少,差异有统计学意义(*P*<0.05);与模型组比较,氟西汀、咯利普兰能显著降低模型大鼠爬上平台的潜伏期,升高模型大鼠穿越目标象限的次数,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。见图 2。

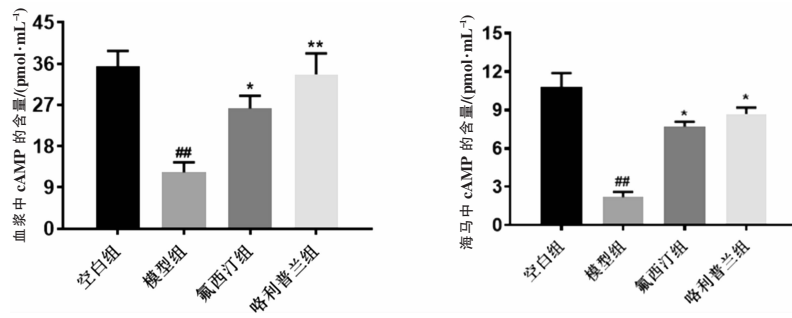
3.2 血浆、海马组织中 cAMP 水平的变化

与空白对照组比较,模型组大鼠血浆和海马组织中 cAMP 的水平显著降低(*P*<0.01);与模型组比较,盐酸氟西汀、咯利普兰均能不同程度地上调模型大鼠血浆和海马组织中 cAMP 的含量,差异有统计学意义(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。见图 3。



注:与空白组比较,**P*<0.05;与模型组比较,**P*<0.05

图 2 各组大鼠学习记忆力的比较

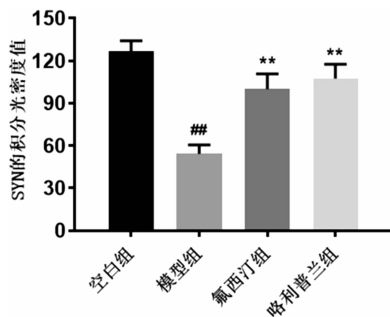


注:与空白组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

图3 各组大鼠血浆、海马组织中 cAMP 水平的比较

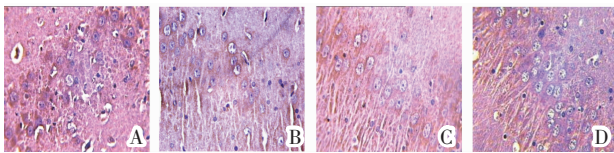
3.3 免疫组化检测模型大鼠海马 CA3 区 SYN 的表达

与空白组比较,模型组大鼠海马 CA3 区 SYN 的积分光密度值显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,氟西汀、咯利普兰能显著增加模型大鼠海马 SYN 的积分光密度值,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 4、图 5。



注:与空白组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$

图4 各组大鼠海马 CA3 区 SYN 的平均光密度值比较



注:A.空白组;B.抑郁模型组;C.氟西汀组;D.咯利普兰组

图5 免疫组化检测各组大鼠海马 CA3 区 SYN 的表达(10×40)

3.4 Western blot 检测模型大鼠海马 PI3K、BDNF、p-CREB 表达的情况

与空白组比较,模型组大鼠海马 PI3K、BDNF、p-CREB 的平均密度值显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,氟西汀、咯利普兰能显著增加模型大鼠海马 PI3K、BDNF、p-CREB 的表达,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。见表 1、图 6。

表 1 各组大鼠海马组织 PI3K、BDNF、p-CREB 的平均密度值

组别	剂量	PI3K	BDNF	p-CREB
空白组	-	0.95±0.11	0.97±0.08	0.91±0.09
模型组	-	0.34±0.05 [#]	0.24±0.07 ^{##}	0.25±0.08 ^{##}
氟西汀组	5.4 mg/kg	0.78±0.07 [*]	0.78±0.11 [*]	0.85±0.13 ^{**}
咯利普兰组	1.25 mg/kg	0.81±0.09 [*]	0.82±0.09 ^{**}	0.87±0.15 ^{**}

注:与空白组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

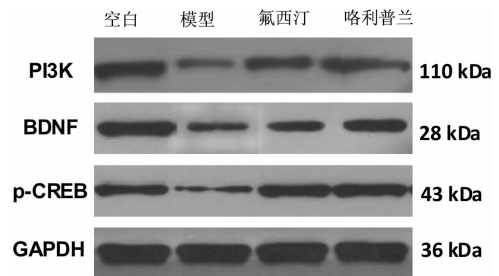


图6 各组大鼠海马组织中蛋白表达的 Western blot 条带图

4 讨论

慢性温和不可预见性应激是抑郁症的一个主要促发因素,故而本实验采用经典的慢性轻度不可预见性应激的方式建立抑郁模型。建模 21 d 后,模型组大鼠自主活动量下降, Morris 水迷宫中定位航行潜伏期延长,空间搜索时在目标象限的穿越次数减少,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示模型复制成功。

cAMP-CREB-BDNF 是抗抑郁药物起效的重要途径和作用靶点^[5],同时,该通路亦是调节抑郁症海马神经可塑性的关键信号通路之一^[6]。cAMP 作为一种重要的转录因子,其含量增加可促进大鼠学习记忆活动的加强。PDE4 能够特异性催化 cAMP 的水解并减少细胞内 cAMP 的浓度,进而通过抑制 CREB/BDNF 通路降低对学习记忆及海马神经可塑性的促进效应^[7]。研究表明,PDE4 基因的缺失可使小鼠在悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间缩短,显示

出明显抗抑郁功效^[8]。在本实验的行为学方面,PDE4抑制剂咯利普兰能显著增加抑郁模型大鼠的活动量,并能明显升高模型大鼠穿越目标象限的次数,缩短目标象限的潜伏期,提示咯利普兰能显著改善抑郁模型动物的抑郁样行为并能有效促进模型的学习记忆能力。

CREB第133位的丝氨酸残基被磷酸化后可与cAMP反应元件CRE结合,调节下游靶基因的转录。研究表明,重复经颅磁刺激能通过缺血侧海马区细胞核内CREB的磷酸化促进SYN的表达^[9]。SYN是位于突触前膜的特异性标志蛋白,因其参与神经元的突触形成而被认为是突触可塑性的标志物^[10]。本研究发现,PDE4抑制剂咯利普兰能显著增加血浆和海马组织中cAMP的含量,并能增加海马磷酸化CREB和SYN的表达,提示咯利普兰可能通过cAMP-CREB信号增强抑郁模型海马神经元可塑性而达到抗抑郁的功效。

BDNF作为细胞内多条信号通路的关键节点对学习记忆的维持及海马突触可塑性具有重要调节作用^[11]。BDNF可通过与PI3K信号相互影响调节海马的突触可塑性,即PI3K能使CREB磷酸化进而介导BDNF基因的表达,同时,BDNF激活后作用于其受体可进一步触发PI3K信号^[12]。研究表明,PI3K通过调控突触可塑性与抑郁症的发生紧密相关^[13]。乙酰左旋肉碱可通过PI3K信号介导的BDNF增加达到快速抗抑郁的功效,而其抗抑郁功效可被PI3K抑制剂阻断^[14]。本实验发现,咯利普兰能显著提升海马组织中PI3K、BDNF的表达,同时p-CREB的表达亦增加,提示咯利普兰可能通过调节BDNF与PI3K信号的相互作用而促进慢性应激抑郁模型大鼠的海马突触可塑性。

综上,咯利普兰能有效改善抑郁模型大鼠的抑郁样行为并能增加模型大鼠的学习记忆能力,其机制可能是通过增加血浆和海马组织中cAMP的含量,启动cAMP-CREB信号并进一步调节BDNF-PI3K信号的相互作用而促进慢性应激抑郁模型大鼠的海马突触可塑性。

参考文献

[1] NATURA M, CATHERINE L C, SHEINA E, et al. Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling[J]. *Nature Medicine*, 2016, 22(1): 46-53.

[2] WANG X L, GAO J, WANG X Y, et al. Treatment with Shuyu

capsule increases 5-HT1AR level and activation of cAMP-PKA-CREB pathway in hippocampal neurons treated with serum from a rat model of depression[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(3): 3575-3582.

- [3] FUJITA M, RICHARDS E M, NICIU M J, et al. cAMP signaling in brain is decreased in unmedicated depressed patients and increased by treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor[J]. *Molecular Psychiatry*, 2017, 22(5): 754-759.
- [4] 孟盼,柳卓,朱青,等.百事乐胶囊对抑郁模型大鼠海马隔颞轴BDNF、NT-3、NGF表达的影响[J].*中国临床药理学与治疗学*, 2017,(4):418-423.
- [5] WANG H Y, ZHANG Y Q, QIAO M Q. Mechanisms of extracellular signal-regulated kinase/cAMP response element-binding protein/brain-derived neurotrophic factor signal transduction pathway in depressive disorder[J]. *Neural Regeneration Research*, 2013, 8(9): 843-852.
- [6] ZHANG M Q, LI R, WANG Y Q, et al. Neural plasticity is involved in physiological sleep, depressive sleep disturbances, and antidepressant treatments[J]. *Neural Plasticity*, 2017, 2017: 5870735.
- [7] TARAI S, MUKHERJEE R, GUPTA S, et al. Influence of pharmacological and epigenetic factors to suppress neurotrophic factors and enhance neural plasticity in stress and mood disorders[J]. *Cognitive Neurodynamics*, 2019, 13(3): 219-237.
- [8] KANG H J, PARK Y, YOO K H, et al. Sex differences in the genetic architecture of depression[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 9927.
- [9] MENG J, CHEN Y, BI F, et al. Pterostilbene attenuates amyloid- β induced neurotoxicity with regulating PDE4A-CREB-BDNF pathway[J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(10): 6356-6369.
- [10] ZAK N, MOBERGET T, B?en E, et al. Longitudinal and cross-sectional investigations of long-term potentiation-like cortical plasticity in bipolar disorder type II and healthy individuals[J]. *Translational Psychiatry*, 2018, 8(1): 103.
- [11] SEN T, GUPTA R, KAISER H, et al. Activation of PERK elicits memory impairment through inactivation of CREB and downregulation of PSD95 after traumatic brain injury[J]. *Journal of Neuroscience*, 2017, 37(24): 5900-5911.
- [12] ZHANG G X, ZHANG T, LI N, et al. Tetramethylpyrazine nitronone activates the BDNF/Akt/CREB pathway to promote post-ischaemic neuroregeneration and recovery of neurological functions in rats[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175(3): 517-531.
- [13] YAN T X, HE B S, WAN S T, et al. Antidepressant-like effects and cognitive enhancement of Schisandra chinensis in chronic unpredictable mild stress mice and its related mechanism[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6903.
- [14] WANG W, LU Y, XUE Z, et al. Rapid-acting antidepressant-like effects of acetyl-L-carnitine mediated by PI3K / AKT / BDNF / VGF signaling pathway in mice[J]. *Neuroscience*, 2015, 285(5): 285-289.