DOI:10.16016/j.2097-0927.202302053

GluN3A 基因缺失影响小鼠抑郁样行为及内侧前额叶皮质与海马 mRNA 转录组的实验研究

张萌萌[1],刘文嵌[1],陈 静[1],孔祥如[2],刘 灿[1],曹佳宁[1],缪 鹏[1],宋鸣睿[1],修 芸[1] 400016 重庆,重庆医科大学:生命科学研究院[1],附属儿童医院小儿肿瘤外科[2]

[摘要] **目的** 探究 GluN3A 基因缺失参与抑郁样行为的潜在分子机制。**方法** 纳入成年雄性 GluN3A 基因敲除(knockout,KO)小鼠 14 只和同窝出生野生型(wild type,WT)小鼠 15 只,糖水偏好实验和强迫游泳实验后收集小鼠(每组 5 只)内侧前额叶皮质(medial prefrontal cortex,mPFC)和海马组织进行 mRNA 转录组测序,以 DESeq2 软件筛选差异表达基因并选取部分基因以 qPCR 进行验证,应用 clusterProfiler 软件对差异基因进行基因本体(Gene Ontology,GO)富集分析,应用 string 在线数据库和 Cytoscape 软件进行蛋白互作网络分析。**结果** 与 WT 小鼠相比,GluN3A KO 小鼠糖水偏好($P<0.05$)和糖水消耗量($P<0.05$)显著下降,强迫游泳不动时间显著增加($P<0.01$);在 GluN3A KO 小鼠 mPFC 和海马组织中分别筛选出 740 个和 666 个差异基因;GO 分析显示,mPFC 中下调差异基因显著富集在血管生成、神经前体细胞的增殖等条目,海马中下调差异基因主要富集在突触组装、轴突发育、树突发育、轴突引导、突触膜等条目,mPFC 和海马中上调差异基因均主要与胞质核糖体和核糖体亚基有关;蛋白互作网络分析显示 mPFC 和海马中核心基因大部分为核糖体蛋白基因。**结论** GluN3A 基因缺失可能通过调控血管生成、神经前体细胞增殖、突触形成及蛋白合成等途径参与抑郁样行为的发生。

[关键词] GluN3A;抑郁;转录组学;内侧前额叶皮质;海马
[中图法分类号] R338.26; R394.1; R749.4 [文献标志码] A

Genetic deletion of GluN3A affects depression-like behaviors and mRNA transcriptome in medial prefrontal cortex and hippocampus in mice

ZHANG Mengmeng[1], LIU Wenqin[1], CHEN Jing[1], KONG Xiangru[2], LIU Can[1], CAO Jianing[1], MIAO Peng[1], SONG Mingrui[1], XIU Yun[1] [1]Institute of Life Science, [2]Department of Pediatric Surgical Oncology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the potential molecular mechanism of GluN3A gene deletion involved in depression-like behaviors. **Methods** Fourteen male adult GluN3A knockout (KO) mice and 15 male wild type (WT) mice were recruited in this study. Sucrose preference test (SPT) and forced swim test (FST) were conducted to measure depression-like behaviors. Then tissue samples of medial prefrontal cortex (mPFC) and hippocampus (HP) were collected from 5 mice in each group for mRNA transcriptome sequencing. Differentially expressed genes (DEGs) were screened using DESeq2 software, and some DEGs were selected and validated by qPCR. Gene Ontology (GO) enrichment analysis was performed using clusterProfiler software. Protein interaction network analysis was performed using string online database together with Cytoscape software. **Results** GluN3A KO mice exhibited decreased sucrose preference ($P<0.05$) and sucrose consumption ($P<0.05$) in FST and prolonged immobile time ($P<0.01$) in FST. There

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81301149)
[通信作者] 修 芸, E-mail:xiuyun123@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

were 740 and 666 DEGs found in the mPFC and the hippocampus of GluN3A KO mice, respectively. GO analysis showed that down-regulated DEGs in the mPFC were enriched in angiogenesis and neural precursor cell proliferation, while down-regulated DEGs in the hippocampus were mainly enriched in synapse assembly, axon development, dendrite development, axon guidance and synaptic membrane. And up-regulated DEGs in both mPFC and hippocampus were mainly associated with cytosolic ribosome and ribosomal subunit. Protein interaction network analysis revealed that most of the core genes in the mPFC and hippocampus were ribosomal protein genes. **Conclusion** GluN3A deletion may be involved in the occurrence of depression-like behaviors by regulating angiogenesis, neural precursor cell proliferation, synapse formation and protein synthesis.

[**Key words**] GluN3A; depression; transcriptomics; medial prefrontal cortex; hippocampus

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81301149). Corresponding author: XIU Yun, E-mail: xiuyun123@cqmu.edu.cn

抑郁症是一种病因未明的常见精神疾病,具有高患病率、高自杀率的特点,是全世界范围内导致残疾的主要原因之一,给全球公共卫生带来了巨大的挑战。传统抗抑郁药物如三环类抗抑郁药、单胺氧化酶抑制剂和选择性 5-HT 再摄取抑制剂等具有起效慢、疗效差、应答率低、副作用多等缺点[1-3]。因此,亟需明确抑郁症的发病机制并开发更为安全、有效、起效快的抗抑郁药。

近年来,研究发现具有 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor,NMDAR)拮抗特性的药物如氯胺酮、MK-801、美金刚均表现出良好的抗抑郁效果[4-6]。然而,NMDAR 在突触可塑性、学习记忆方面发挥重要作用[7],较完全阻断 NMDAR 功能不同,亚基选择性拮抗剂可仅抑制部分区域或环路或某种细胞类型上的 NMDAR 功能,具有更强的“靶向性”,是潜在的抗抑郁药物候选分子。目前已发现 GluN1,GluN2(GluN2A、GluN2B、GluN2C 和 GluN2D)和 GluN3(GluN3A 和 GluN3B)共 7 种 NMDAR 亚基[8]。以往研究发现:GluN2A 选择性拮抗剂 NVP-AAM077 可在不引发其他精神症状的情况下发挥良好的抗抑郁效用[9];给予大鼠 GluN2B 选择性拮抗剂 Ro 25-6981 可产生抗抑郁作用;敲除皮层神经的 GluN2B 亚基后,敲除小鼠表现出抵抗抑郁的行为,氯胺酮介导的抗抑郁作用也同时消失[10-11]。最近,本课题组研究发现抑郁模型 CUMS 大鼠大脑内 GluN2B、GluN3(GluN3A 和 GluN3B)表达下调,提示除 GluN2B 外,GluN3 可能也参与抑郁的发生[12];应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,发现 GluN3A 基因敲除小鼠表现出糖水偏好下降等抑郁样行为[13],进一步提示 GluN3A 可能参与抑郁样行为的发生。此外,以往双相情感障碍患者大脑中 GluN3A 基因 mRNA 水平低于健康对照组的研究发现[14]也支持“GluN3A 下调可能参与抑郁样行为发生”的研究假设。然而,GluN3A 通过什么途径和机制参与抑郁样行为的发生呢? GluN3A 异常还被证实与自闭症[15]、亨廷顿综合症[16]、精神分裂症[17]、阿尔茨海默症[18]等多种精神类疾病的发生相关,其是否通过共同的作用途径和机制参与抑郁等精神类疾病的发生? 本研究将通过转录组测序、生物信息学分析方法等对 GluN3A 敲除后大脑内侧前额叶皮质(medial prefrontal cortex,mPFC)和海马区域的 mRNA 表达变化进行分析,以探究其参与抑郁样行为的潜在分子机制,期望可为 NMDAR 亚基选择性抗抑郁药物的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

GluN3A KO 小鼠的获得按文献[13]的方法,利用 CRISPR/Cas9 技术获得 GluN3A 基因第 2 个外显子敲除的 F0 代 C57BL/6N 小鼠(购自赛业公司);将 F0 代与正常野生型(wild type,WT)小鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供)交配,获得 F1 代杂合子小鼠;再将 F1 代杂合子小鼠杂交,获得 F2 代纯合子 GluN3A 基因敲除小鼠(GluN3A KO)。本实验共纳入 7~8 周龄,体质量为 20~23 g 的雄性 GluN3A KO 小鼠(GluN3A KO 组)14 只和雄性同窝出生 WT 小鼠(WT 组)15 只。饲养条件:12 h/12 h 光暗循环,室温(24±1)℃,每笼 4~5 只小鼠,提供充足的食物及饮水,每周固定时间更换垫料。

1.2 糖水偏好实验

2 组小鼠单笼饲养适应 1 周后,进行糖水偏好测试。实验分预适应阶段和正式实验 2 个阶段。在预适应阶段(48 h),每个笼中各放置 1 瓶 1%蔗糖溶液(质量体积分数)和 1 瓶纯水,24 h 后交换糖水纯水位置。正式实验阶段,所有小鼠禁饮 24 h,随后每个笼中放置 1 瓶 1%蔗糖溶液和 1 瓶纯水,记录每只小鼠 24 h 内的蔗糖溶液消耗量和白水消耗量。

糖水偏好=蔗糖摄入量/总液体摄入量×100%

1.3 强迫游泳实验

实验前将所有动物放入测试房间适应至少 1 h。实验时将小鼠放置在 1 个直径为 20 cm、高为 35 cm 的玻璃圆柱体中,圆柱体中装有 20 cm 深的(24±1)℃温水。每只小鼠测试 6 min,测试结束,以干毛巾擦拭小鼠后将其放回笼盒中。实验由固定的摄像机录像,分析录像后 4 min 内小鼠的不动时间。

1.4 文库构建及转录组测序

采用 TRIzol 试剂提取 mPFC 和海马组织的总 RNA。使用 Agilent 2100 bioanalyzer 检测 RNA 完整性和总量。RNA 样本质量检测合格后,通过 Oligo(dT)磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA,将得到的 mRNA 随机打断,以片段化的 mRNA 为模板合成 cDNA。采用 AMPure XP 系统纯化 cDNA,经末端修复、加 A 尾后将其连接测序接头,筛选 370~420 bp 的 cDNA 进行 PCR 扩增,使用 AMPure XP 珠纯化 PCR 产物,最终获得文库。库检合格后,用 Illumina NovaSeq 6000 进行测序,并产生 150 bp 配对末端读数数据。

1.5 差异基因表达分析及富集分析

采用 Subread 软件中的 FeatureCounts(1.5.0-p3)工具计算映射到每个基因的读数,根据基因的长度计算每个基因的 FPKM,并计算映射到该基因的读数。FPKM 指每百万个碱基对测序的转录本序列片段的每千个碱基片段的预期数量,是当前最常用于估计基因表达水平的指标。应用 DESeq2 软件(1.20.0)进行 WT 组和 GluN3A KO 组之间的差异表达分析(每组 5 个生物学重复),$P<0.05$ 且 $|\log_2(\text{差异倍数})|>0.2$ 被设定为显著差异表达的阈值。GO(Gene Ontology)是描述基因功能的综合性数据库,可分为生物过程(biological process,BP)、细胞组成(cellular component,CC)和分子功能(molecular function,MF)3 个部分。通过 clusterProfiler(3.8.1)软件实现差异表达基因的 GO 功能富集分析,以 $P<0.05$ 作为显著性富集的阈值。

1.6 差异基因的蛋白互作网络分析

String 数据库(http://string-db.org/)用于在线分析蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)信息,将所有差异基因导入 string 数据库,隐藏网络中断开连接的节点,得到蛋白质相互作用网络图。蛋白互作网络图中的每个节点代表 1 个蛋白质,节点的边是连接 2 个节点的线,代表蛋白质与蛋白质之间的相互作用。将蛋白互作网络文件导入 Cytoscape 软件中,使用 Cytohubba 插件对网络进行解析,利用 MCC 算法获得了网络中得分最高的前 20 个基因。

1.7 实时荧光定量 PCR 分析(qPCR)

使用 PrimerScript™ RT 试剂盒将总 RNA 去除基因组 DNA 后逆转录成 cDNA。qPCR 反应体系为 10 μL:cDNA 模板(1 μL),SYBR Green PCR mix(5 μL),上下游引物(各 0.5 μL,终浓度为 1 μmol/L),DEPC 水(3 μL)。反应条件为:95 ℃ 2 min,95 ℃ 10 s,56 ℃ 30 s,第 2、3 步重复 39 个循环。以管家基因 Actin 作为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因相对表达量。本研究中使用的引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物大小/bp
Actin	正向:TGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTC 反向:CGGACTCATCGTACTCCTGCTTGC	107
Rpl17	正向:ATCAAGAGGGTCAAACCTTCGT 反向:CCACCATTATACCGCCGGAA	150
Rps21	正向:GTCCATCCAGATGAACGTGG 反向:CCATCAGCCTTAGCCAATCGG	141
Rps14	正向:TGCCACATCTTTGCATCCTTC 反向:ACTCATCTCGGTCAGCCTTCA	115
Rps5	正向:TGGCAGAGACCCCTGACAT 反向:GGGCAGGTACTTGGCATACT	119
Adgrl1	正向:ACCCTTTCCAGATGGAGAATGT 反向:GGGACACAGTCGTACTGCAC	169
Pclo	正向:AAGAGTTGGATAGTAGTCAGGCT 反向:ACCTAAACGTGTCCGTAGTTCT	108
Shank2	正向:AGAGGCCCCAGCTTATTCCAA 反向:CAGGGGTATAGCTTCCAAGGC	224
Lrrtm3	正向:TAGGCTACTGCGAGGATCAG 反向:CACCTACAACCCTTAGGGCAT	102
Grik3	正向:AGGTCCTAATGTCACTGACTCTC 反向:TGCCATAAAGGGTCCTATCAGAC	107
Bsn	正向:GGAACAGCTTGACAGTGCAG 反向:GGACGCCGTTTCTGGTCTT	177

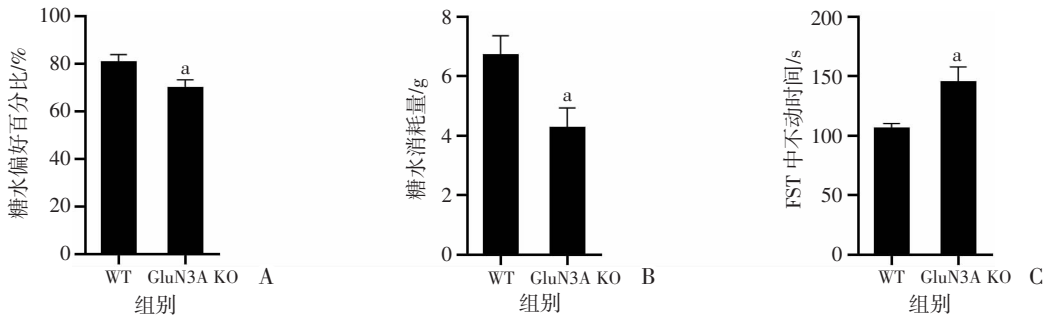
1.8 统计学分析

采用 SPSS 25.0 和 Prism 8.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。若 2 组数据符合正态分布且方差齐,则采用独立样本 t 检验,否则采用 Mann-Whitney U 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GluN3A 基因敲除小鼠表现出抑郁样行为

与 WT 组相比,GluN3A KO 组小鼠的糖水偏好($P<0.05$,图 1A)和糖水消耗量($P<0.05$,图 1B)显著下降;强迫游泳实验中,GluN3A KO 组小鼠的不动时间显著增加($P<0.05$,图 1C)。



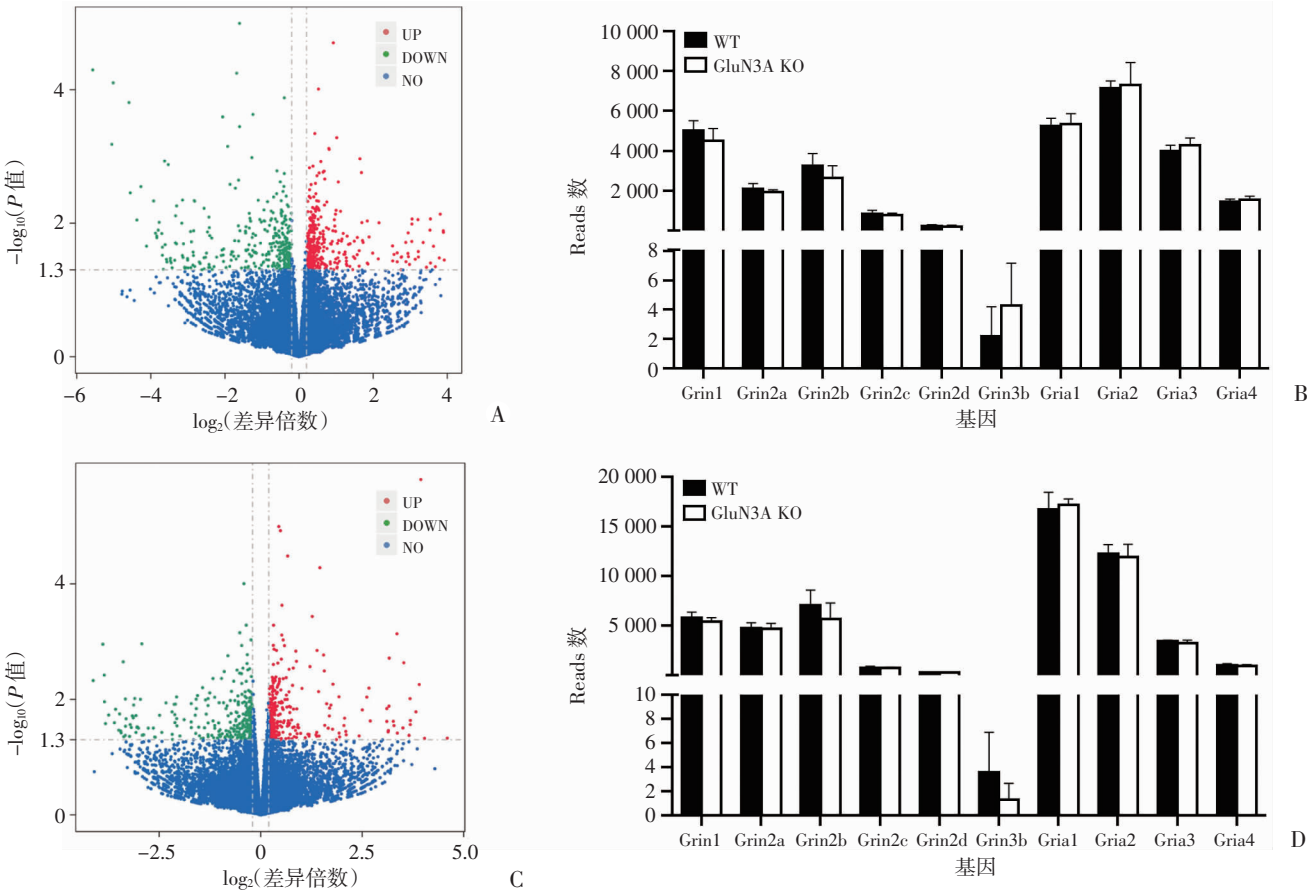
a:$P<0.05$,与 WT 组比较

A:糖水偏好百分比;B:糖水消耗量;C:强迫游泳中不动时间

图 1　GluN3A 基因敲除小鼠表现出抑郁样行为($\bar{x}\pm s$,$n_{WT}=15$, $n_{KO}=14$)

2.2　差异基因表达分析

通过 DESeq2 软件在 mPFC 组织中共筛选出 740 个差异基因,其中 384 个基因表达上调,356 个基因表达下调;在海马组织中共筛选出 666 个差异基因,其中 350 个基因表达上调,316 个基因表达下调。差异基因分布的火山图如图 2A、C 所示。GluN3A 基因敲除对 mPFC 和海马中 NMDAR 其他亚基和 α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR)亚基的 mRNA 表达水平未产生显著影响(图 2B、D)。mPFC 和海马中上调/下调的前 10 个差异表达基因见表 2。



A:mPFC 差异基因火山图　虚线表示差异基因筛选标准的阈值线;B:GluN3A 基因敲除未显著改变 mPFC 中 NMDAR 其他亚基和 AMPAR 亚基的 mRNA 表达水平;C:海马差异基因火山图;D:GluN3A 基因敲除未显著改变海马中 NMDAR 其他亚基和 AMPAR 亚基的 mRNA 表达水平($n_{WT}=5$, $n_{KO}=5$)

图 2　敲除 GluN3A 后对基因 mRNA 表达的影响

表 2 mPFC 和海马中上调/下调的前 10 差异表达基因

上调/下调基因	内侧前额叶皮质			海马		
	基因名称	$\log_2$(差异倍数)	*P* 值	基因名称	$\log_2$(差异倍数)	*P* 值
下调基因	Ccl21b	−7.384 8	<0.000 1	Ccl21b	−6.947 9	<0.000 1
	Gm10591	−7.062 9	<0.000 1	Gm10591	−6.914 0	<0.000 1
	Ccl21c	−5.568 7	<0.000 1	Gm10600	−4.124 5	0.004 7
	Bhmt	−5.053 9	0.000 7	Saa3	−3.823 8	0.026 2
	Gm10600	−4.589 6	0.000 2	Il6	−3.744 0	0.018 6
	Lrrc34	−4.377 3	0.009 0	Crygs	−3.601 9	0.025 3
	Gbx2	−4.268 8	0.002 8	Gm17660	−3.474 0	0.017 9
	Spata18	−4.119 3	0.022 1	Atp6v1e2	−3.436 2	0.037 9
	Gm38255	−3.925 9	0.004 6	Cxcl1	−3.385 4	0.002 2
	Gm37672	−3.874 6	0.014 1	Spp2	−3.332 6	0.009 9
上调基因	Gsx2	3.895 7	0.013 7	Calcr	4.59 7	0.046 9
	Retnla	3.892 9	0.013 0	Alb	4.034 6	0.047 3
	4921534A09Rik	3.809 4	0.007 3	Entpd4b	3.945 5	<0.000 1
	Serpinb5	3.546 8	0.039 5	Gm37407	3.906 8	0.005 5
	Gm13306	3.217 8	0.026 6	Tmem30c	3.687 8	0.023 1
	Il5	3.1349	0.034 7	Gm45041	3.685 7	0.027 3
	Gm44242	3.050 1	0.008 7	Gm11541	3.365 5	0.038 3
	Gm3629	3.045 8	0.010 3	Ppp1r17	3.355 9	0.000 7
	Foxi1	3.042 6	0.018 8	Otp	3.166 8	0.001 9
	Nlrp4f	2.979 9	0.041 5	Cyp2e1	3.145 9	0.034 6

2.3 差异表达基因的 GO 富集分析

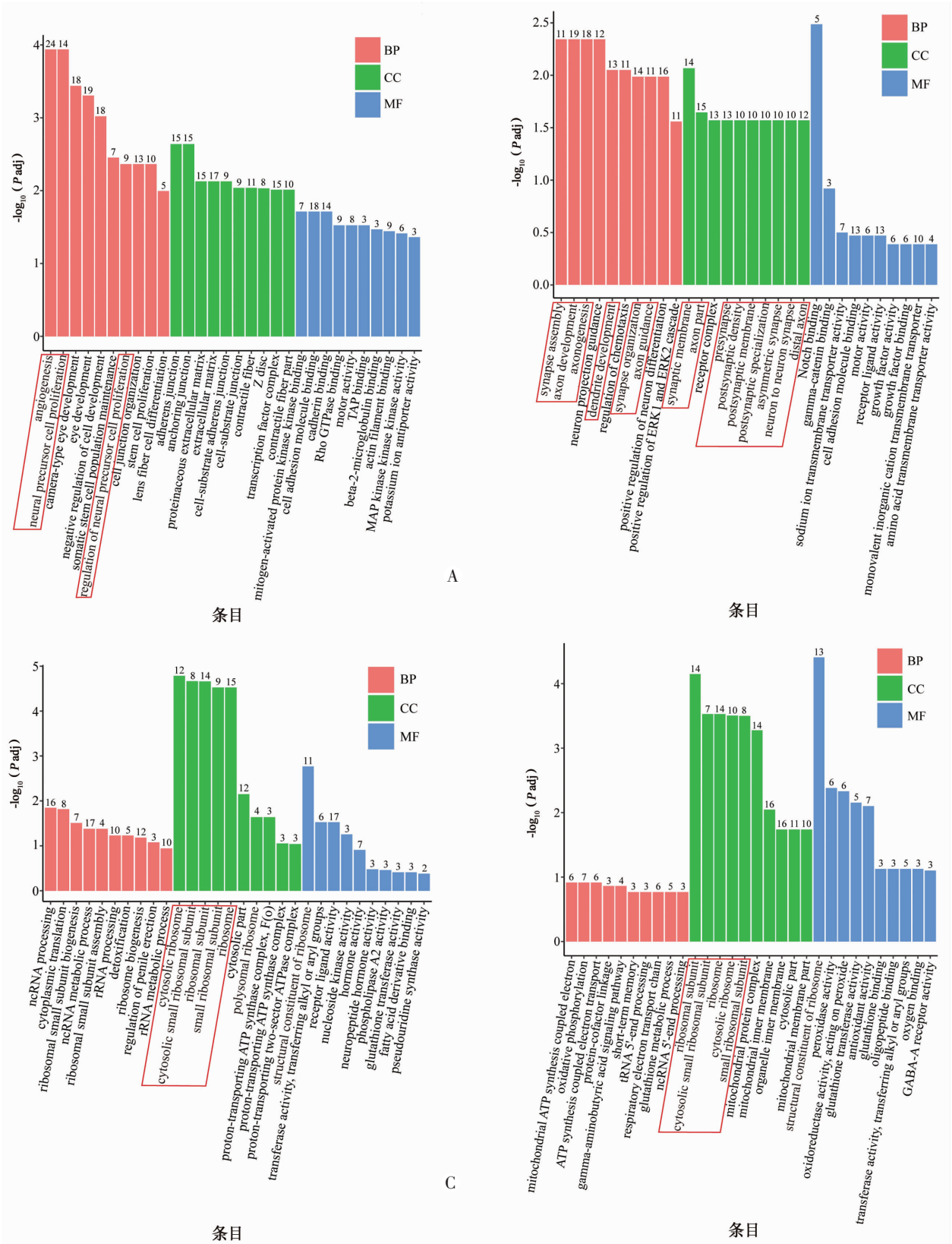
对筛选出的差异基因进行 GO 富集分析,从生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component,CC)、分子功能(molecular function,MF)类别中分别选取了富集显著性最高的前 10 个条目。结果显示:mPFC 中下调基因显著富集在 BP 的血管生成、神经前体细胞的增殖等条目,CC 的黏附连接、锚定连接、细胞外基质等条目,MF 的丝裂原活化蛋白激酶的结合、细胞黏附分子结合等条目(图 3A),海马中下调差异基因主要富集在 BP 的突触组装、轴突发育、树突发育、轴突引导等条目,CC 的突触膜、突触前、突触后致密区等条目,MF 的 Notch 结合条目(图 3B);mPFC 和海马中上调差异表达基因均主要与 CC 的胞质核糖体和核糖体亚基有关(图 3C、D)。

2.4 差异表达基因的 PPI 分析

基于 string 数据库,对差异基因的蛋白互作网络进行了分析。结果显示,mPFC 中 PPI 网络由 568 个节点和 1 139 条边组成(图 4A);海马中 PPI 网络由 531 个节点和 911 条边组成(图 4B)。将得到的 PPI 网络图分别导入 Cytoscape 软件中,利用 Cytohubba 插件进行核心基因的筛选,选取前 20 个核心基因。结果显示,mPFC 和海马中的核心基因均大部分为核糖体蛋白基因(图 4C、D):核糖体蛋白 L17(Rpl17)、核糖体蛋白 S14(Rps14)、核糖体蛋白 S5(Rps5)、核糖体蛋白 S21(Rps21)、核糖体蛋白 S26(Rps26)、核糖体蛋白 S7(Rps7)。

2.5 qPCR 验证

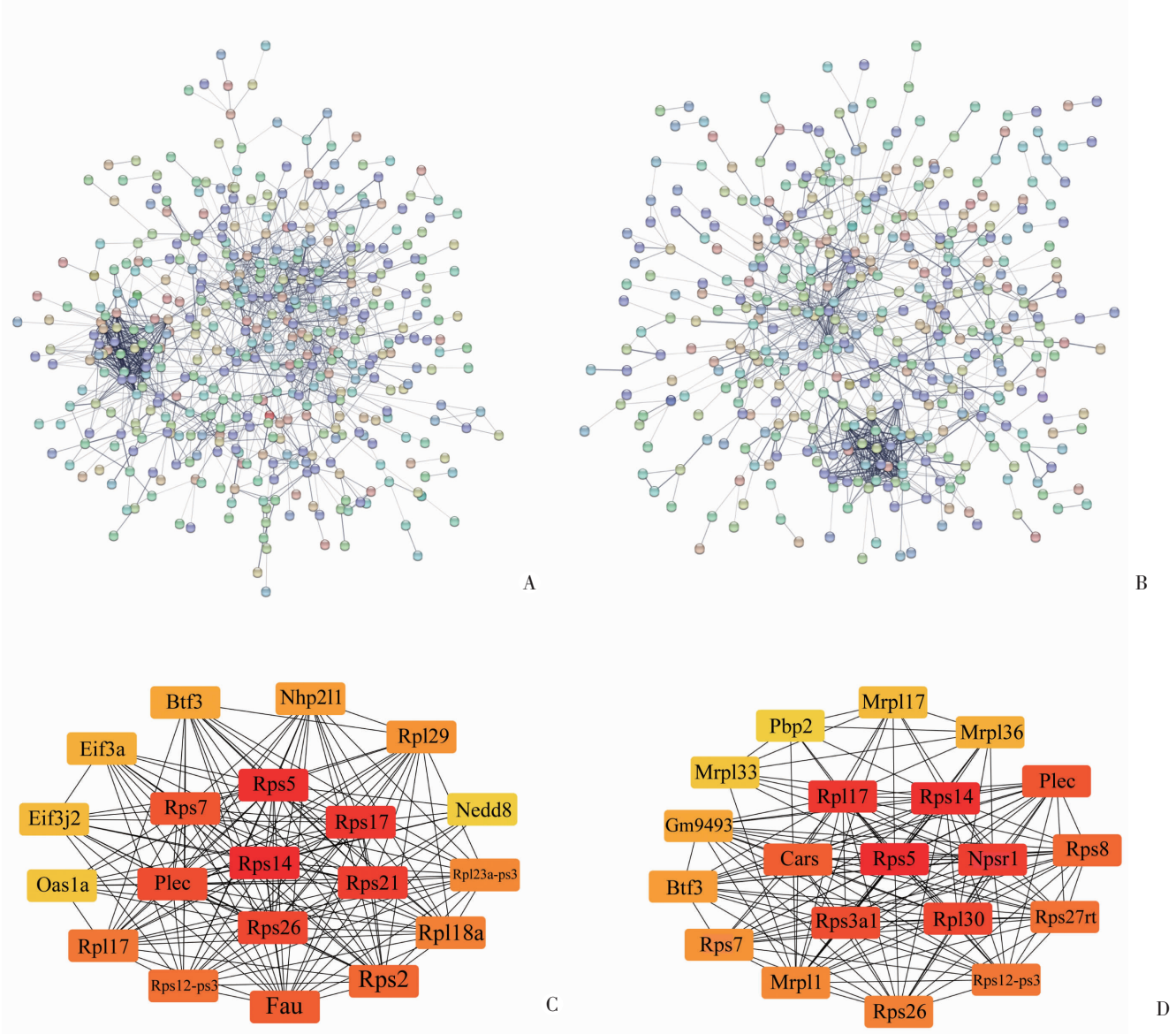
选取 mPFC 中与核糖体相关的部分差异表达基因(图 5A、B)和海马中与突触相关的部分差异表达基因(图 5C、D)进行 qPCR 验证,与核糖体相关的差异基因如 Rpl17、Rps21、Rps14、Rps5 等 mRNA 表达上调,与突触相关的差异基因如 Adgrl1、Pclo、Shank2、Lrrtm3、Grik3、Bsn 等 mRNA 表达下调,这些基因的 qPCR 结果(图 5B、D)和 RNA-Seq 结果(图 5A、C)趋势一致,证明了 RNA-Seq 结果的可靠性。



横坐标为 GO 富集分析排名前 10 的条目,红框表示主要关注的条目;纵坐标为 GO 富集条目的差异的显著性;柱状图上方数字代表该条目所包含的差异基因数目,数值越高越显著

A:mPFC 中下调差异基因;B:海马中下调差异基因;C:mPFC 中上调差异基因;D:海马中上调差异基因

图 3 敲除 GluN3A 后差异表达基因的 GO 富集分析



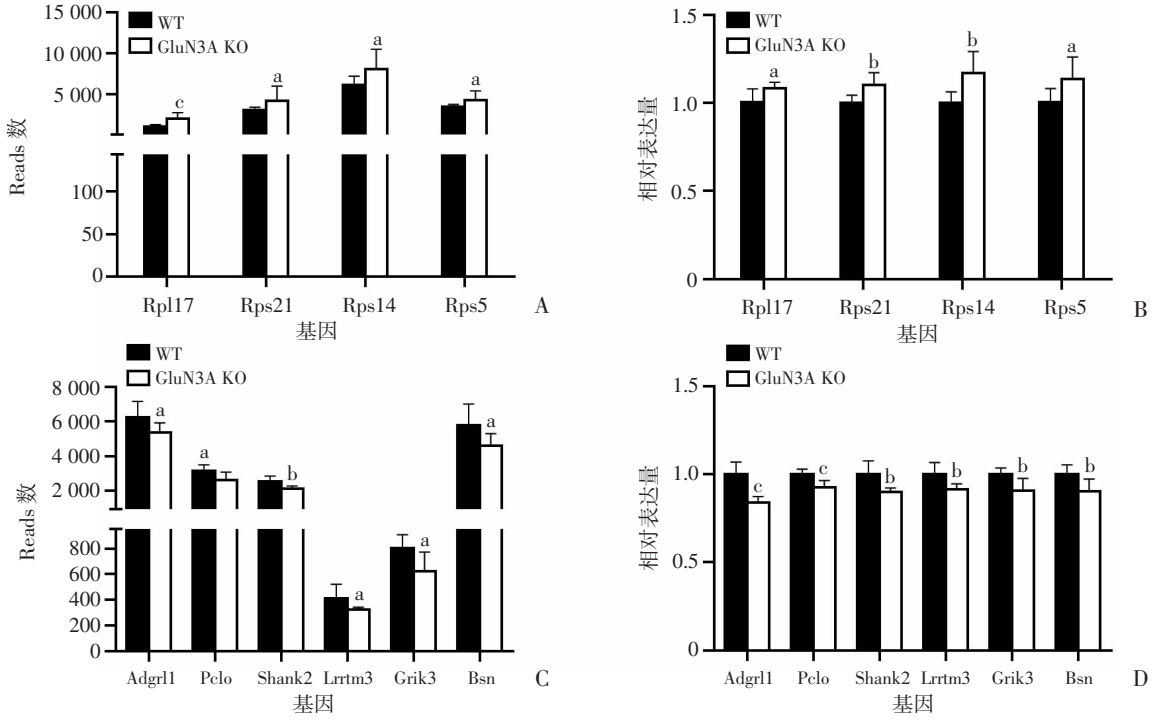
A:mPFC 中蛋白互作网络图;B:海马中蛋白互作网络图;C:mPFC 中 Cytohubba 基因图;D:海马中 Cytohubba 基因图;红色表示该基因得分较高,在蛋白互作网络中发挥更重要的作用;黄色表示该基因得分较低,重要性相对减弱

图 4 敲除 GluN3A 后蛋白互作分析

3 讨论

本研究在前期研究发现——CUMS 抑郁模型大鼠大脑 GluN3A 下调[12]和 GluN3A 敲除小鼠表现出抑郁样行为[13]的基础上展开,结果表明 GluN3A 敲除可引发 C57 小鼠出现糖水偏好下降、强迫游泳不动时间增加等抑郁样行为,再次证实 GluN3A 功能障碍参与抑郁的发生;并进一步对 GluN3A 参与抑郁的可能分子机制进行了探讨。

mPFC 和海马被认为是最易受应激影响的大脑区域,其体积减小、结构畸变与抑郁症的病理生理改变密切相关[19-20]。故本研究中选取这 2 个区域进行 mRNA 转录组生物信息学分析。结果显示,全身敲除 GluN3A 未显著改变 mPFC 和海马区域内 NMDAR 其他亚基 GluN1、GluN2A-D、GluN3B 的表达,但导致 mPFC 区域 740 个基因、海马内 666 个基因的表达出现差异。GO 分析显示,mPFC 和海马区域下调差异基因富集条目有所差异:mPFC 中下调基因主要富集在血管生成、神经前体细胞增殖等条目,而海马中下调基因主要富集在突触组装、轴突发育、树突发育、轴突引导、突触膜等条目,提示二者参与 GluN3A 敲除诱发抑郁样行为的机制有所不同。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与对照组相比

A、B:mPFC 中部分差异基因(主要上调核糖体相关基因 Rpl17、Rps21、Rps14、Rps5)的 qPCR 验证;C、D:海马中部分差异基因(主要是下调突触相关基因 Adgrl1、Pclo、Shank2、Lrrtm3、Grik3、Bsn)的 qPCR 验证(A、C 中 $n_{WT}=5$, $n_{KO}=5$;B、D 中 $n_{WT}=8$, $n_{KO}=8$)

图 5 转录组测序中部分差异基因的 qPCR 验证

突触功能障碍的抑郁症病因假说已被广泛研究和接受:以往研究者发现抑郁症动物模型大脑中突触相关蛋白减少,而抗抑郁药物可以通过逆转突触蛋白的缺失来改善其抑郁样行为[21-25]。本研究结果表明,全身敲除 GluN3A 后引发海马区域内突触相关蛋白表达下调,可能是 GluN3A KO 小鼠出现抑郁表型的原因之一。不过,GluN3A 敲除通过下调海马内突触相关蛋白诱发抑郁样行为的具体途径和机制尚需进一步探讨,因为以往研究表明上调 GluN3A 表达同样会造成海马突触功能障碍,表现为树突棘密度降低、树突棘消融增加[16-17]。mPFC 可能通过血管生成基因下调和神经前体细胞增殖减弱等机制参与 GluN3A KO 诱发的抑郁表征,与以往抑郁与血管生成障碍相关的研究发现相一致:抑郁症患者或抑郁模型动物血管生成相关基因或蛋白表达异常、血管密度降低、血管生成障碍[26-28];重度抑郁症患者海马齿状回细胞的转录组分析也显示抗血管生成基因上调[29];抗抑郁药能够促进慢性应激小鼠的血管生成和神经再生[30],表明促进血管生成与抗抑郁作用的良好反应有关。

GluN3A KO 小鼠大脑内上调差异基因 GO 分析显示,mPFC 和海马上调差异基因均主要富集在胞质核糖体和核糖体亚基等条目;蛋白互作分析筛出的前 20 个核心基因大多是核糖体蛋白基因,如 Rpl17、Rps14、Rps5、Rps26、Rps7、Rps21 等。核糖体基因在蛋白质合成中起主要作用,上述结果提示敲除 GluN3A 基因后存在大脑内蛋白合成增加的现象。尽管这种核糖体基因表达上调究竟是参与抑郁发生还是长期抑郁之后的代偿机制尚无定论,但本研究与以往研究发现相一致:在一项 21 d 的社会失败应激研究[31]中,研究者利用 RNA-seq 分析慢性应激对小鼠大脑核糖体基因表达的影响,结果显示慢性应激小鼠下丘脑中核糖体的主要成分——读取 RNA 的核糖体小亚基(Rps)和连接氨基酸形成多肽链的大亚基(Rpl)表达异常,具体来说,有 33 个核糖体基因表达上调,仅有 3 个表达下调,可以推测慢性应激导致小鼠的抑郁表型与核糖体基因的激活之间存在很强的联系;另一项通过微阵列进行血液基因表达谱分析的研究[32]显示,核糖体基因在抑郁症患者的表达水平显著高于健康对照者,核糖体基因特别是 Rpl17 和 Rpl34 的上调与应激易感性和抑郁症有关,并且抑郁程度与 Rpl17 的表达水平呈显著正相

关。本研究发现核糖体相关基因表达上调与 GluN3A KO 小鼠抑郁表型共存,GluN3A 如何调控核糖体基因表达? 其在抑郁中的作用又是什么? 尚需进一步研究。

综上所述,本研究通过转录组测序分析揭示 GluN3A 基因敲除小鼠 mPFC 和海马组织 mRNA 表达的变化,结果提示 GluN3A 敲除在 mPFC 可能通过血管生成障碍、神经前体细胞增殖减少参与抑郁样行为的发生,在海马可能通过突触形成障碍参与抑郁样行为的发生;mPFC 和海马内核糖体相关基因增加可能是相关蛋白下调后的补偿机制。这些结果为 GluN3A 基因敲除而导致的抑郁样行为提供了解释,为研究 GluN3A 调控的生物学功能提供了新思路。

参考文献:

[1] FRIEDRICH M J. Depression is the leading cause of disability around the world[J]. JAMA, 2017, 317(15): 1517. DOI: 10.1001/jama.2017.3826.

[2] BROWN G K, KARLIN B E, TROCKEL M, *et al*. Effectiveness of cognitive behavioral therapy for veterans with depression and suicidal ideation[J]. Arch Suicide Res, 2016, 20(4): 677-682. DOI: 10.1080/13811118.2016.1162238.

[3] MALHI G S, MANN J J. Depression[J]. Lancet, 2018, 392(10161): 2299-2312. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31948-2.

[4] PHILLIPS J L, NORRIS S, TALBOT J, *et al*. Single and repeated ketamine infusions for reduction of suicidal ideation in treatment-resistant depression[J]. Neuropsychopharmacology, 2020, 45(4): 606-612. DOI: 10.1038/s41386-019-0570-x.

[5] RANA P, BAGEWADI H, BANERJEE B D, *et al*. Attenuation of oxidative stress and neurotoxicity involved in the antidepressant-like effect of the MK-801(dizocilpine) in *Bacillus* Calmette-Guerin-induced depression in mice[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2020, 31(4): 20190016. DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0016.

[6] MISHRA S K, HIDAU M K, RAI S. Memantine treatment exerts an antidepressant-like effect by preventing hippocampal mitochondrial dysfunction and memory impairment *via* upregulation of CREB/BDNF signaling in the rat model of chronic unpredictable stress-induced depression[J]. Neurochem Int, 2021, 142: 104932. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104932.

[7] SERAFINI G, GONDA X, RIHMER Z, *et al*. NMDA receptor antagonists for depression: critical considerations[J]. Ann Clin Psychiatry, 2015, 27(3): 213-220.

[8] PAOLETTI P, BELLONE C, ZHOU Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14(6): 383-400. DOI: 10.1038/nrn3504.

[9] JIMÉNEZ-SÁNCHEZ L, CAMPA L, AUBERSON Y P, *et al*. The role of GluN2A and GluN2B subunits on the effects of NMDA receptor antagonists in modeling schizophrenia and treating refractory depression[J]. Neuropsychopharmacology, 2014, 39(11): 2673-2680. DOI: 10.1038/npp.2014.123.

[10] LIMA-OJEDA J M, VOGT M A, PFEIFFER N, *et al*. Pharmacological blockade of GluN2B-containing NMDA receptors induces antidepressant-like effects lacking psychotomimetic action and neurotoxicity in the perinatal and adult rodent brain[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2013, 45: 28-33. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.04.017.

[11] MILLER O H, YANG L L, WANG C C, *et al*. GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine[J]. Elife, 2014, 3: e03581. DOI: 10.7554/eLife.03581.

[12] CHEN J, LUO Y M, LIANG X, *et al*. Alteration in NMDAR subunits in different brain regions of chronic unpredictable mild stress (CUMS) rat model[J]. Transl Neurosci, 2022, 13(1): 379-389. DOI: 10.1515/tnsci-2022-0255.

[13] 刘文钦, 陈静, 张萌萌, 等. NMDA 受体 3A 亚基基因敲除对小鼠焦虑和抑郁样行为的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2022, 38(4): 403-410. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2022.04.006.
LIU W Q, CHEN J, ZHANG M M, *et al*. GRIN3A knockout affecting anxiety and depression like behaviors in mice[J]. Chin J Neuroanat, 2022, 38(4): 403-410. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2022.04.006.

[14] MUELLER H T, MEADOR-WOODRUFF J H. NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder[J]. Schizophr Res, 2004, 71(2/3): 361-370. DOI: 10.1016/j.schres.2004.02.016.

[15] CRAWLEY O, CONDE-DUSMAN M J, PÉREZ-OTAÑO I. GluN3A NMDA receptor subunits: more enigmatic than ever?[J]. J Physiol, 2022, 600(2): 261-276. DOI: 10.1113/JP280879.

[16] MARCO S, GIRALT A, PETROVIC M M, *et al*. Suppressing aberrant GluN3A expression rescues synaptic and behavioral impairments in Huntington's disease models[J]. Nat Med, 2013, 19(8): 1030-1038. DOI: 10.1038/nm.3246.

[17] ROBERTS A C, DÍEZ-GARCÍA J, RODRIGUIZ R M, *et al*. Downregulation of NR3A-containing NMDARs is

required for synapse maturation and memory consolidation [J]. Neuron, 2009, 63(3): 342-356. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.06.016.

[18] ZHONG W W, WU A, BERGLUND K, *et al*. Pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease by deficiency of NMDA receptor subunit GluN3A[J]. Alzheimer's Dement, 2022, 18(2): 222-239. DOI: 10.1002/alz.12398.

[19] 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): 443-453. DOI: 10.1016/j.biopsych.2018.09.031.

[20] TREADWAY M T, WASKOM M L, DILLON D G, *et al*. Illness progression, recent stress, and morphometry of hippocampal subfields and medial prefrontal cortex in major depression[J]. Biol Psychiatry, 2015, 77(3): 285-294. DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.06.018.

[21] LI N X, LIU R J, DWYER J M, *et al*. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure[J]. Biol Psychiatry, 2011, 69(8): 754-761. DOI: 10.1016/j.biopsych.2010.12.015.

[22] DUMAN R S, AGHAJANIAN G K, SANACORA G, *et al*. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants[J]. Nat Med, 2016, 22(3): 238-249. DOI: 10.1038/nm.4050.

[23] DUMAN R S, AGHAJANIAN G K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets[J]. Science, 2012, 338(6103): 68-72. DOI: 10.1126/science.1222939.

[24] QIAO H, AN S C, REN W, *et al*. Progressive alterations of hippocampal CA3-CA1 synapses in an animal model of depression[J]. Behav Brain Res, 2014, 275: 191-200. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.08.040.

[25] LI W F, ALI T, HE K W, *et al*. Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression[J]. Brain Behav Immun, 2021, 92: 10-24. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.11.008.

[26] PANTAZATOS S P, HUANG Y Y, ROSOKLIJA G B, *et al*. Whole-transcriptome brain expression and exon-usage profiling in major depression and suicide: evidence for altered glial, endothelial and ATPase activity[J]. Mol Psychiatry, 2017, 22(5): 760-773. DOI: 10.1038/mp.2016.130.

[27] LEHMANN M L, POFFENBERGER C N, ELKAHLOUN A G, *et al*. Analysis of cerebrovascular dysfunction caused by chronic social defeat in mice[J]. Brain Behav Immun, 2020, 88: 735-747. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.05.030.

[28] YAMADA M K. Angiogenesis in refractory depression: a possible phenotypic target to avoid the blood brain barrier[J]. Drug Discov Ther, 2016, 10(2): 74-78. DOI: 10.5582/DDT.2016.01003.

[29] MAHAJAN G J, VALLENDER E J, GARRETT M R, *et al*. Altered neuro-inflammatory gene expression in hippocampus in major depressive disorder[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018, 82: 177-186. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.11.017.

[30] ZHANG S, LU Y J, SHI W, *et al*. SIRT1/FOXO1 axis-mediated hippocampal angiogenesis is involved in the antidepressant effect of Chaihu Shugan San[J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 2783-2801. DOI: 10.2147/DDDT.S370825.

[31] SMAGIN D A, KOVALENKO I L, GALYAMINA A G, *et al*. Dysfunction in ribosomal gene expression in the hypothalamus and hippocampus following chronic social defeat stress in male mice as revealed by RNA-seq[J]. Neural Plast, 2016, 2016: 3289187. DOI: 10.1155/2016/3289187.

[32] HORI H, NAKAMURA S, YOSHIDA F, *et al*. Integrated profiling of phenotype and blood transcriptome for stress vulnerability and depression[J]. J Psychiatr Res, 2018, 104: 202-210. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2018.08.010.

(收稿:2023-02-09;修回:2023-03-19)

(编辑 吴培红)