DOI:10.16016/j.2097-0927.202401108

谷胱甘肽改善卒中后抑郁和慢性社会挫败应激小鼠行为及其机制研究

赵 源,林 森,杨清武 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院神经内科

[摘要] **目的** 探究抑郁症的潜在致病机制及谷胱甘肽的改善作用。**方法** 6~8周龄雄性C57BL/6J小鼠分为3组($n=20$):无处理对照(SHAM)组、卒中后抑郁(post-stroke depression,PSD)模型组和慢性社会挫败应激(chronic social defeat depression,CSDS)模型组。通过旷场实验、高架十字实验、悬尾实验、糖水偏好实验等验证模型小鼠是否有抑郁样行为表现,取2种模型小鼠以及对照小鼠内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex, mPFC)进行神经递质靶向代谢组学测序。通过主成分分析(principle component analysis,PCA)、相关性分析等方法探索各组小鼠代谢物表达情况、筛选差异代谢物,利用京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)预测与抑郁模型相关的代谢通路,并对关键差异代谢物谷胱甘肽(glutathione,GSH)的表达以及丙二醛(malondialdehyde,MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)等铁死亡指标进行检测,外源性补充GSH观察模型小鼠抑郁样行为是否改善。**结果** 神经递质靶向代谢组学分析结果显示3组小鼠代谢水平存在明显差异,在mPFC检测到的38种代谢物中,有6种在PSD组中特异性降低,有4种在CSDS组中特异性降低,而GSH、L-天冬酰胺和L-赖氨酸在PSD和CSDS组均表现出明显下降($P<0.05$)。KEGG分析结果显示差异代谢物涉及到的主要通路有谷胱甘肽代谢,β-氨基酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等通路。还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(glutathione/oxidized glutathione, GSH/GSSG)试剂盒检测发现两种抑郁模型小鼠mPFC还原型GSH明显减少($P<0.05$),铁死亡指标检测发现与对照组比较,两种抑郁模型小鼠存在MDA升高并且GPX4阳性细胞比例显著减少的表型($P<0.05$),而对抑郁模型小鼠外源补充GSH可增加小鼠高架十字实验开臂时间和旷场实验中央区时间($P<0.05$),并且降低悬尾实验静止不动时间($P<0.05$),显著改善抑郁样行为表现。**结论** PSD以及CSDS小鼠脑组织存在13种代谢物失调,其中谷胱甘肽代谢异常引发的铁死亡可能在抑郁症发生中具有重要作用,外源性补充谷胱甘肽可以改善小鼠抑郁样行为。

[关键词] 卒中后抑郁;慢性社会挫败应激;代谢组学;谷胱甘肽;铁死亡
[中图法分类号] R749.13;R749.4;R977.6 [文献标志码] A

Mechanism of glutathionein improving depression-like behaviors in post-stroke depressed mice and chronic social defeat stress mice

ZHAO Yuan, LIN Sen, YANG Qingwu Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the potential pathogenesis of depression and the improving effect of glutathione (GSH) in the process. **Methods** Sixty male C57BL/6J mice (6-8 weeks old) were randomly divided into sham operation group (SHAM), post-stroke depression (PSD) group and chronic social defeat depression (CSDS) group, with 20 animals in each group. Open field test, elevated plus maze test, tail suspension test, and sucrose preference test were performed to identify whether they exhibited depressive-like behaviors. After the tissue samples of medial prefrontal cortex (mPFC) were harvested from the 2 models

[基金项目] 重庆市自然科学基金创新群体科学基金(cstc2019jcyj-cxttX0005)
[通信作者] 杨清武,E-mail:yangqwmlys@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

and control mice, neurotransmitter-targeted metabolomics sequencing was carried out. Principal component analysis (PCA) and correlation analysis were performed to explore the expression of metabolites in each group of mice to screen differential metabolites. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis was used to predict the metabolic pathways related to the depression models. The expression of key differential metabolites related to ferroptosis, including glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase 4 (GPX4). The effect of exogenous supplementation of GSH was observed by whether the depressive-like behavior of the model mice was improved. **Results** The results of neurotransmitter-targeted metabolomics analysis showed significant differences in the metabolic levels of the 3 groups of mice. Among the 38 metabolites detected in the mPFC, 6 were specifically decreased in PSD and 4 were specifically decreased in CSDS. GSH, L-tryptophan, and L-lysine were significantly decreased in both PSD and CSDS groups ($P<0.05$). KEGG analysis indicated that the main pathways involved in the differential metabolites included GSH metabolism, beta-amino acid metabolism, and alanine, aspartate and glutamate metabolism. GSH/GSSG assay kit indicated that the ratio of reduced GSH/oxidized GSH (GSH/GSSG) in the mPFC of the 2 depression models was significantlly decreased ($P<0.05$), and the ferroptosis-related index test found that the 2 depression model mice had increased MDA level and significantly reduced GPX4-positive cells compared with the control group ($P<0.05$). Exogenous supplementation of GSH in the depression models extended the open arm time in the elevated plus maze test, increased the central zone time in the open field test ($P<0.05$), and reduced the immobility time in the tail suspension test ($P<0.05$), significantly improving the depressive-like behaviors. **Conclusion** There are 13 metabolite imbalances in the brain tissues of PSD and CSDS mice, and ferroptosis triggered by abnormal GSH metabolism may play an important role in the occurrence of depression. Exogenous supplementation of GSH improves depressive-like behaviors in mice.

[**Key words**] post-stroke depression; chronic social defeat stress; metabolome; glutathione; ferroptosis

Supported by the Innovative Group Science Project of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-cxttX0005). Corresponding author: YANG Qingwu, E-mail: yangqwmlys@hotmail.com

卒中后抑郁(post-stroke depression,PSD)是一种常见的脑卒中并发症,大约三分之一的卒中幸存者患有 PSD,PSD 会造成患者恢复变慢、致残率提高等不良影响[1]。目前临床上 PSD 治疗仍然以三环类抗抑郁药(tricyclic antidepressants,TCAs)和选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitors,SSRIs)为主[2-3],但是由于其发病机制尚不完全清楚,药物治疗需要 4 周才能起效并且仅 50%有效[4]。PSD 和重度抑郁症(major depression disorder, MDD)患者存在一定相似性,症状上都表现为心境低落、情绪不稳、兴趣缺失等,5-羟色胺、多巴胺和去甲肾上腺素减少都是二者重要病理改变[5-7],但是缺乏同时针对 PSD 和 MDD 两种动物模型探索两者脑组织病变特征的研究。探究 PSD 和 MDD 共同的致病机制有助于研究不同情景下抑郁症发病的共性改变,深入了解抑郁症的发病原因,为寻找潜在的治疗靶点提供依据。

内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex, mPFC)是抑郁症研究的核心脑区之一,前期研究提示 α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异唑丙酸受体(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isohmzopropionic acid receptor,AMPAR)、N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor,NMDAR)和前额叶、扣带皮层在内的额边缘回路与 mPFC 和抑郁症的发生潜在相关[8-10]。本研究建立 PSD 小鼠模型[11]和慢性社会挫败应激(chronic social defeat depression, CSDS)小鼠模型[12]模拟 PSD 和 MDD,通过神经递质靶向代谢组学分析各组小鼠 mPFC 脑区的神经递质及氨基酸等代谢物变化,并探索外源性补充关键代谢物谷胱甘肽(glutathione, GSH)是否可以改善小鼠抑郁样行为,为进一步阐明抑郁症的发病机制及开发治疗方法提供新的见解。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究采用的实验动物有:8~10 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,体质量 22~25 g;3~6 月龄雄性 CD-1 小鼠,体质量 45~55 g,均购自重庆莱比特科技公司。所有小鼠在(22±2)℃室温、充足饮食、12 h/12 h 光照/黑暗条件下饲养于陆军军医大学第二附属医院 SPF

级动物房。将实验小鼠逐一编号,然后使用随机数字表法将小鼠随机分为3组,分别为无处理对照(SHAM)组、PSD组和CSDS组,每组20只雄性C57BL/6J小鼠(8~10周),所有动物实验操作遵循《动物实验法》和《陆军军医大学医学动物福利伦理审查指南要求》。

1.2 试剂与仪器

本研究采用的试剂与仪器有:内皮素(endothelin-1,ET-1,英国Abcam公司),GSH(北京索莱宝公司),GSH/GSSG试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司),丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司),兔抗谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)抗体(英国Abcam公司),小鼠抗GFAP抗体(英国Abcam公司),山羊抗CD31抗体(英国Abcam公司),小鼠抗MAP2抗体(英国Abcam公司),山羊抗兔二抗(美国Invitrogen公司),驴抗山羊二抗(美国Invitrogen公司),驴抗兔二抗(美国Invitrogen公司),驴抗小鼠二抗(美国Invitrogen公司);ACQUITY Premier超高效液相色谱仪(美国Waters公司),冰冻切片机(德国Leica公司),共聚焦显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 动物模型建立及给药方式

1.3.1 PSD小鼠模型的建立 采用左侧mPFC注射ET-1的方法,用异氟烷麻醉小鼠后将小鼠剪去头皮毛发并置于立体定位装置固定,用眼科剪剪开头皮后完全暴露颅顶,根据Bregma点和Lambda点调平颅骨平面。颅骨钻磨除颅骨并暴露脑膜,利用玻璃电极吸取ET-1溶液(2 μg/μL),定位mPFC脑区前囟位点1:前囟前2.0 mm,中缝左0.5 mm,颅骨下深度2.4 mm;前囟位点2:前囟前1.5 mm,中缝左0.5 mm,颅骨下深度2.6 mm;均左侧注射。按照100 nL/min的速度将1 μL ET-1溶液注射至左侧mPFC脑区,注射完毕后停针10 min再缓慢退针,缝合完毕后涂抹红霉素眼膏防止感染,所有操作将小鼠放在电热毯上保持体温直至苏醒,恢复2周后对小鼠进行行为学测试。

1.3.2 CSDS小鼠模型的建立 首先选取具有攻击倾向的CD-1小鼠,即在正式实验前将非造模C57BL/6J小鼠放入CD-1小鼠笼中3 d,若CD-1小鼠同时满足以下条件:第1次攻击C57BL/6J小鼠在60 s内、攻击5次以上并且每次攻击行为超过5 s,则将其选做攻击小鼠。正式实验将CD-1攻击小鼠和造模C57BL/6J小鼠饲养在同一鼠笼中10 d,2只小鼠之间用透明隔板隔开,每天将C57BL/6J小鼠放入CD-1小鼠侧接触5 min,随后将C57BL/6J小鼠放回透明隔板另一侧保持感官刺激,10 d后对C57BL/6J小鼠进行行为学检测。

1.3.3 给药方式 将GSH用生理盐水溶解为25 mg/mL的溶液,实验组对PSD和CSDS小鼠按照100 mg/(kg·d)的剂量腹腔注射1周,对照组对PSD和CSDS小鼠每日腹腔注射同剂量生理盐水(Vehicle)。

1.4 行为学检测

1.4.1 旷场实验 在安静的环境中将小鼠放置于旷场箱底中心(箱高30 cm,底边长50 cm,宽50 cm,底面平均分64个方格),同时进行摄像和计时,观察时长为5 min。观察指标为:总路程、平均速度、进入中央区时间、进入周边区域时间、潜伏期、静止时间、总时间等,最后用Super动物行为学软件进行数据分析。

1.4.2 高架十字实验 在安静的环境中将小鼠放入高架十字迷宫中央格,记录小鼠5 min内的活动情况。观察指标为:总路程、进入开放臂次数、开放臂停留时间、闭合臂进入次数、闭合臂停留时间、总时间等。最后用Super动物行为学软件进行数据分析。

1.4.3 悬尾实验 将小鼠尾部距末端2 cm处用夹子固定,倒悬于20 cm×25 cm×25 cm的箱内,小鼠头距箱底部约5 cm。悬挂时间为6 min,前2 min作适应期,观察后4 min小鼠静止不动时间。每天固定时间内进行实验。然后进行数据统计,比较不同组之间的差异。

1.4.4 糖水偏好实验 糖水偏好实验是衡量抑郁小鼠快感缺失的有效指标。将小鼠单独饲养,适应期在鼠笼放2瓶1%蔗糖水24 h,之后将其中1瓶换成纯水放置24 h,适应结束后对小鼠进行水和食物剥夺24 h,最后进行测试,把小鼠放置在有1瓶100 mL 1%蔗糖水和1瓶100 mL纯水的笼子中,期间随机调换水瓶位置避免位置偏好,24 h后记录小鼠对糖水的消耗。糖水消耗计算公式:(糖水消耗量/液体总摄入量)×100%。

1.5 样品收集及神经递质靶向代谢组测序

将3组小鼠用异氟烷麻醉后,经心脏灌注PBS 50 mL,取脑组织后剥离左侧mPFC脑区。每组取9只小鼠,由于单只小鼠mPFC质量太小达不到检测要求,遂每3只小鼠的mPFC混合一起上样进行靶向代谢组检测。代谢物检测使用ACQUITY Premier (Waters),超高效液相色谱仪,通过Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm,1.8 μm)液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱A相为0.1%甲酸与1 mmol/L醋酸铵水溶液,B相为乙腈。柱温箱温度为40 ℃,样品盘设为10 ℃,进样体积为2 μL,以多反应监测模式进行质谱分析。目标化合物数据分析定性定量工作均通过SCIEX Analyst Work Station Software (Version 1.6.3)和DATA DRIVEN FLOW (Version 1.0.1)完成。

1.6 潜在差异代谢物的选择以及通路富集分析

对代谢物检测结果进行主成分分析(principle component analysis,PCA)分析以及相关性分析比较组

间差异,定量分析筛选差异代谢物,其中 $P<0.05$ 为满足条件的差异代谢物,运用京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)数据库对差异代谢物进行代谢通路富集。

1.7 GSH/GSSG、MDA 检测

根据碧云天 GSH/GSSG 和 MDA 检测试剂盒说明书,提取 PSD、CSDS 及 SHAM 组小鼠脑组织 mPFC 样本,制备组织匀浆,通过比色法测定 GSH/GSSG 和 MDA 的浓度。

1.8 GPX4 免疫荧光染色及半定量分析

新鲜脑组织取材后制作冰冻切片,厚度 30 μm,用 PBS 洗涤切片,5%山羊血清加 0.3% Triton×100 在室温下封闭 1 h。一抗(兔抗 GPX4,Abcam,1∶200)在 4 ℃下孵育过夜,于第 2 天用 PBS 洗涤切片,二抗(山羊抗兔,Invitrogen,1∶1 000)在室温下避光孵育 1 h,DAPI 染核 10 min,PBS 再次洗涤后封片并利用共聚焦显微镜观察获得荧光图像。每只小鼠 mPFC 脑区随机选取 3~5 个区域进行观察,利用 Image J 软件插件中的 Cell Counter 对 GPX4 和 DAPI 阳性细胞进行计数,DAPI 数目视为该区域细胞总数,GPX4 数目/DAPI 数目为该区域 GPX4 阳性细胞比例,对每只小鼠 3~5 个随机区域分析结果取平均值作为该小鼠 mPFC 脑区 GPX4 阳性细胞比例。

1.9 统计学分析

运用 GraphPad Prism 8 进行统计分析,计数资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,对数据进行正态分布和方差齐性检验,利用单因素方差分析评估组间差异,若方差不齐则使用非参数检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

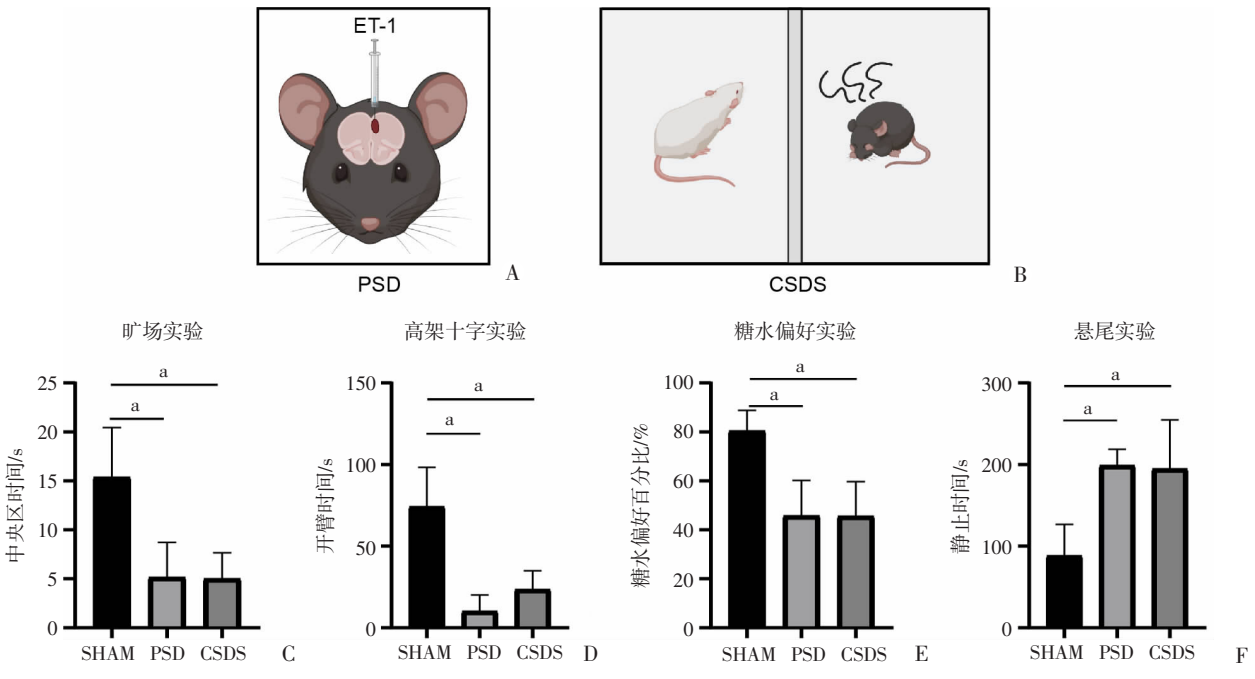
2 结果

2.1 内侧前额叶皮层注射 ET-1 具有与 CSDS 相同的引发小鼠抑郁行为的效果

造模(图 1A、B)后对小鼠进行行为学测试,旷场实验及高架十字实验评价小鼠焦虑水平、糖水偏好实验检测小鼠快感缺乏情况、悬尾实验检测小鼠绝望行为。结果显示:与 SHAM 组比较,PSD、CSDS 小鼠在旷场中央区时间、高架十字开臂时间显著下降($P<0.001$,图 1C、D),糖水偏好比例显著下降($P<0.001$,图 1E),悬尾静止不动时间显著增加($P<0.001$,图 1F)。上述结果表明,局部梗死内侧前额叶皮层和 CSDS 都会引发小鼠焦虑抑郁样行为。

2.2 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 脑区神经递质、氨基酸等代谢物表达呈现下降趋势

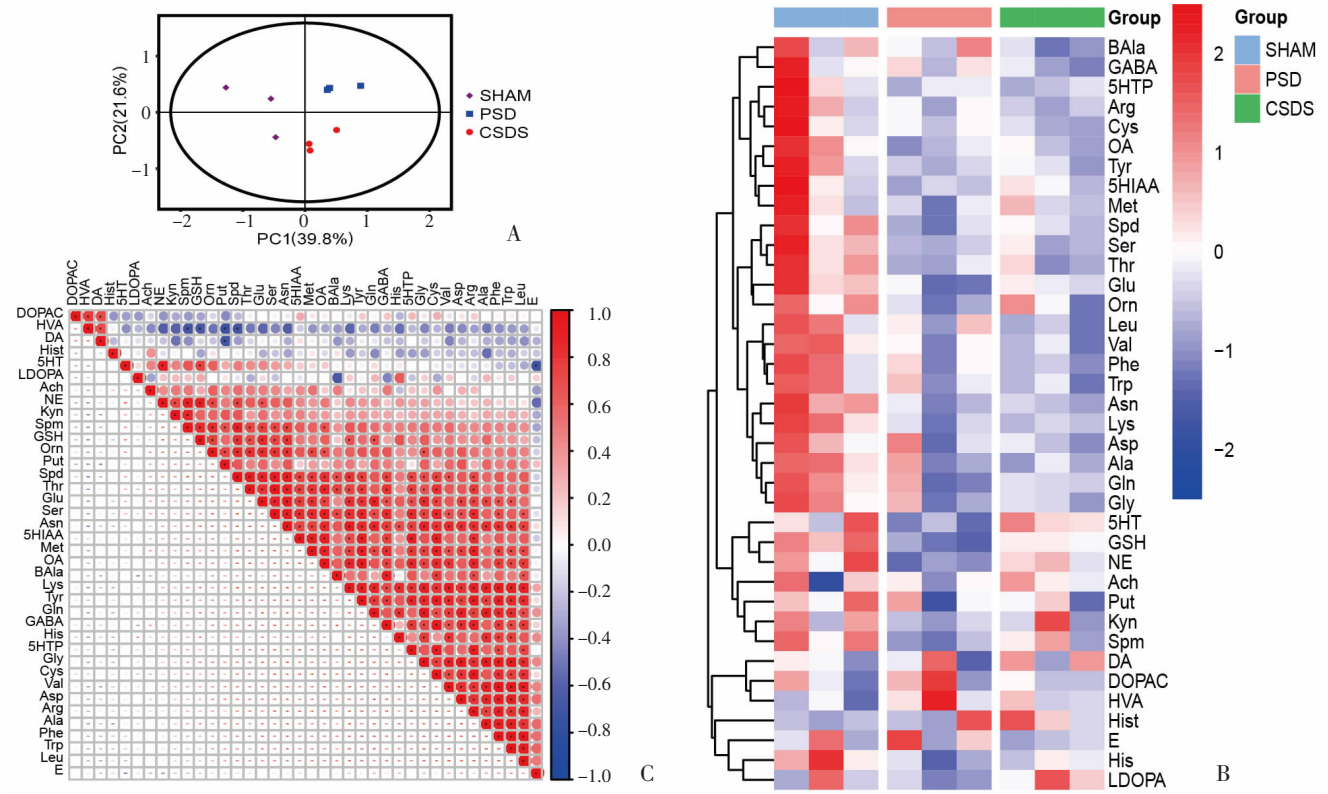
为明确 PSD 和 CSDS 小鼠脑组织代谢物变化,对 3 组小鼠取 mPFC 进行神经递质靶向代谢组学测序。PCA 结果显示:PSD 和 CSDS 组相对 SHAM 组整体代谢物水平表现出明显差异(图 2A)。热图结果显示:去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)、GSH、亚精胺(spermidine,Spd)等多种代谢物表达在两种抑郁小鼠模型中呈现下降趋势(图2B)。相关性分析显示如图



a:$P<0.001$

A:PSD 造模示意图;B:CSDS 造模示意图;C:旷场实验中央区停留时间;D:高架十字开臂停留时间;E:糖水偏好实验;F:悬尾实验

图 1 PSD 和 CSDS 组小鼠抑郁样行为表现测试结果 ($n=8,\bar{x}\pm s$)



A:神经递质靶向代谢组测序 PCA 分析(n=3);B:代谢物表达热图分析;C:代谢物表达相关性分析

图 2 PSD 和 CSDS 抑郁小鼠 mPFC 代谢组测序结果

示从肾上腺素(epinephrine, E)、γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)、GSH 至 3,4-二羟基苯乙酸(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)等代谢物的相关性逐渐减弱(图 2C)。上述结果表明:PSD 和 CSDS 小鼠在神经递质、氨基酸等代谢物水平上与对照小鼠具有明显差别,并且主要表现为降低趋势。

2.3 谷胱甘肽、L-天冬酰胺和 L-赖氨酸在 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 中均明显降低

为了探索单个代谢物变化情况,对代谢组测序结果进行雷达图分析和组间差异分析。雷达图结果显示:GSH、L-天冬酰胺(Asn)、NE、L-赖氨酸(Lys)、L-丝氨酸(serine,Ser)、Spd、精胺(spermine,Spm)和 L-缬氨酸(L-valine,Val)是变化最明显的 8 种代谢物(P<0.05,图 3A)。

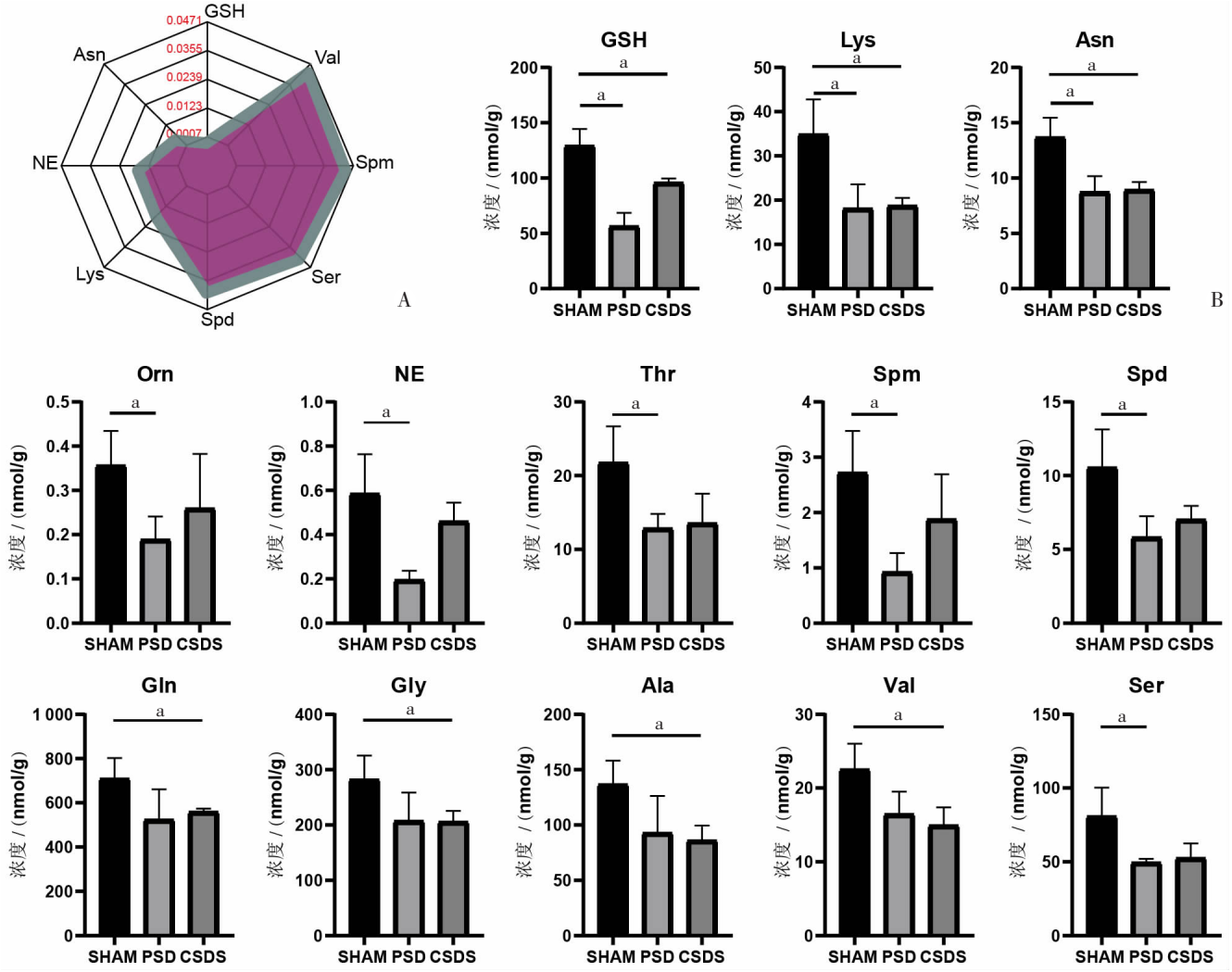
组间差异分析结果显示:GSH、Asn 和 Lys 3 种代谢物在 PSD 组和 CSDS 组均明显降低(P<0.05,图 3B);鸟氨酸(ornithine, Orn)、Ser、Spd、Spm、苏氨酸(threonine, Thr)、NE 6 种代谢物在 PSD 中特异性降低,L-丙氨酸(L-alanine,Ala)、甘氨酸(glycine,Gly)、Val、L-谷氨酰胺(L-glutamine,Gln)4 种代谢物在 CSDS 中特异性降低(P<0.05,图 3C)。结果表明,PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 代谢物改变的相似之处在于 GSH、Asn 和 Lys 的表达明显降低,可能是抑郁症治疗的潜在靶点。

2.4 还原型 GSH 是 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 脑区关键代谢物

为探索两种抑郁模型代谢通路的变化情况,对差异代谢物进行通路富集分析。PSD 组主要富集在谷胱甘肽代谢、β-氨基酸代谢通路(图 4A),CSDS 组主要富集在谷胱甘肽代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路(图 4B),两种模型筛选出的差异代谢物均表现出谷胱甘肽代谢通路的高度富集。利用 GSH/GSSG 试剂盒对各组小鼠 mPFC 脑区的还原型和氧化型 GSH 进行检测,结果显示:PSD 和 CSDS 均表现出还原型 GSH 明显减少(P<0.05,图 4C~E),提示还原型 GSH 缺失是抑郁症的潜在致病因素。

2.5 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 脑区 GSH 减少诱发细胞铁死亡

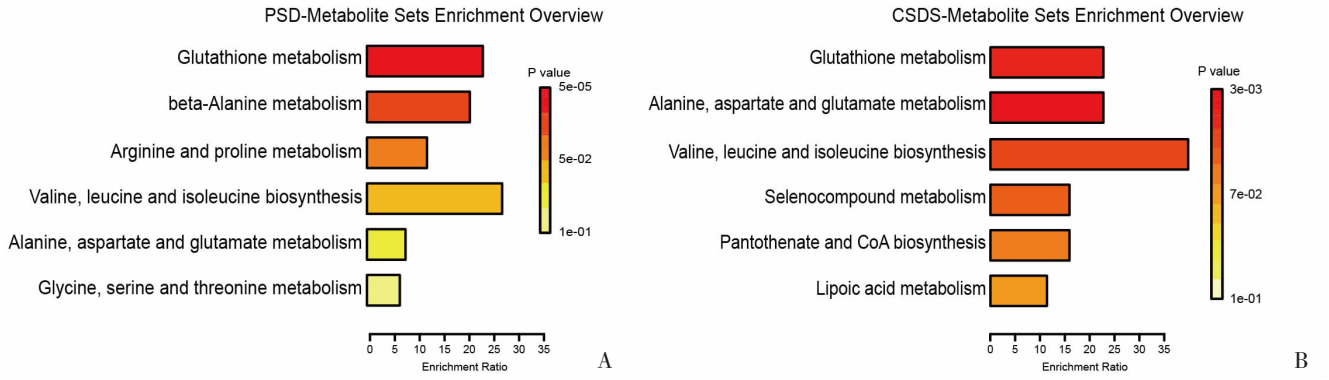
GSH 在细胞中的 1 个重要功能是清除过氧化物抑制铁死亡,采用 MDA 试剂盒和 GPX4 免疫荧光染色对小鼠 mPFC 铁死亡指标进行检测。结果显示:对照组比较,PSD 和 CSDS 小鼠 GPX4 阳性细胞比例减少约 20 百分点(P<0.01,图 5A、B),MDA 含量与对照组比较增加约 1 倍(P<0.01,图 5C),提示 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 脑区发生了细胞铁死亡。



a: $P<0.05$

A:前 8 种显著性差异代谢物雷达图;B:PSD 组和 CSDS 组均降低的 3 种代谢物;C:PSD 组或 CSDS 组中特异性降低的代谢物

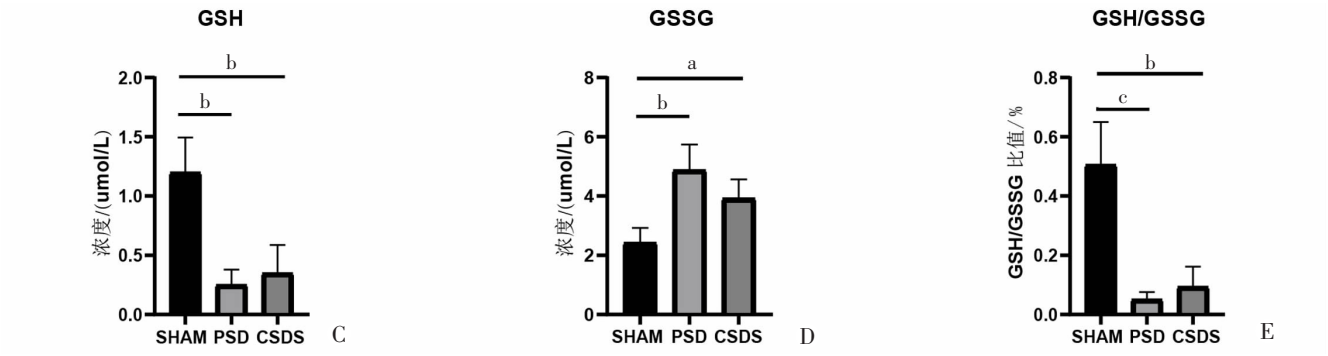
图 3 3 组小鼠组间差异分析显著性差异代谢物筛选结果 ($n=3, \bar{x}\pm s$)



A:PSD 组差异代谢物通路富集分析;B:CSDS 组差异代谢物通路富集分析

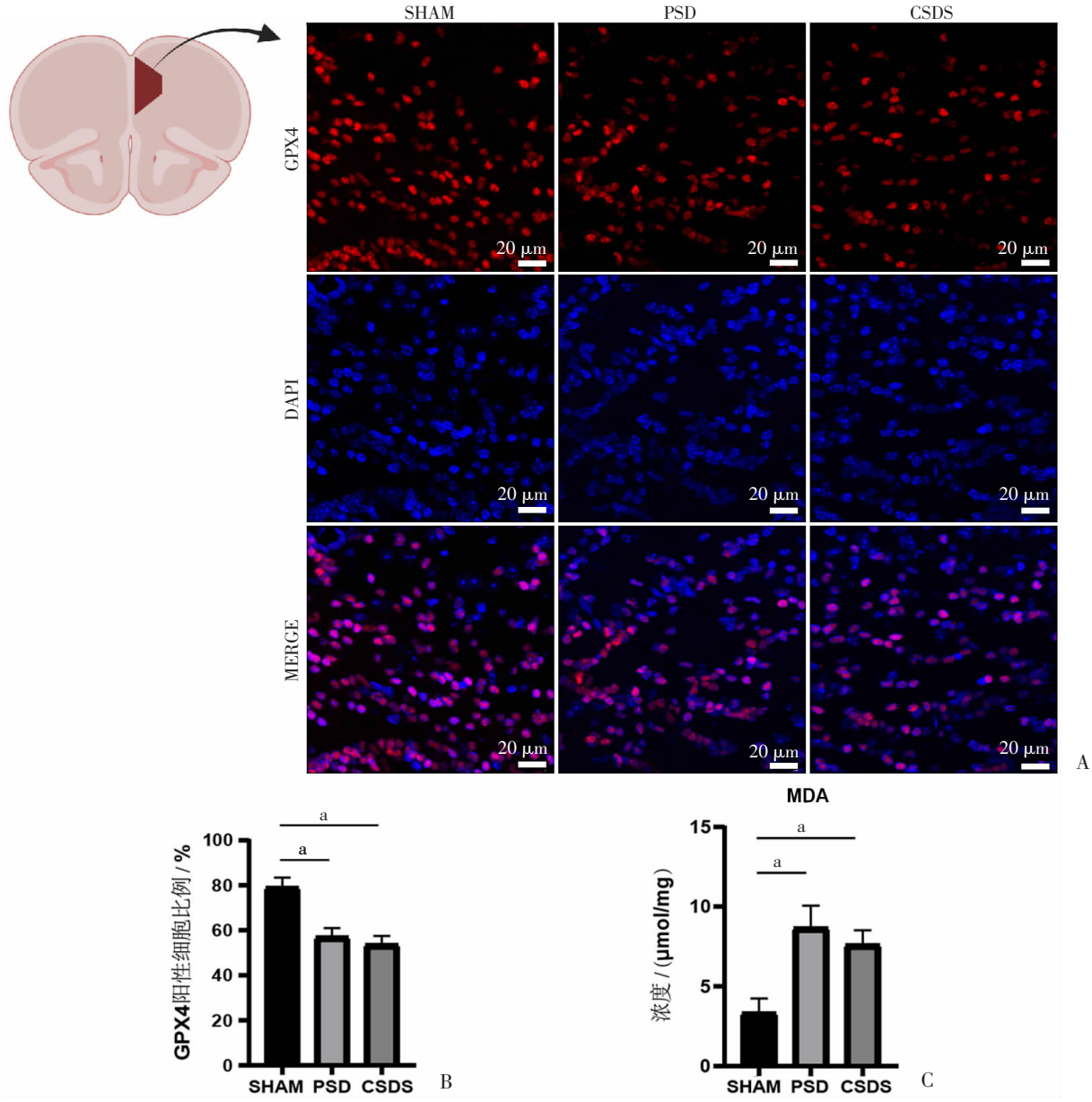
图 4 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 还原型谷胱甘肽检测结果 ($n=4, \bar{x}\pm s$)

(图 4C~E 续下页)



C:各组小鼠 mPFC 脑区 GSH 检测;D:各组小鼠 mPFC 脑区 GSSG 检测;E:各组小鼠 mPFC 脑区 GSH/GSSG 比例　a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$

续图 4　PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 还原型谷胱甘肽检测结果　($n=4, \bar{x}\pm s$)

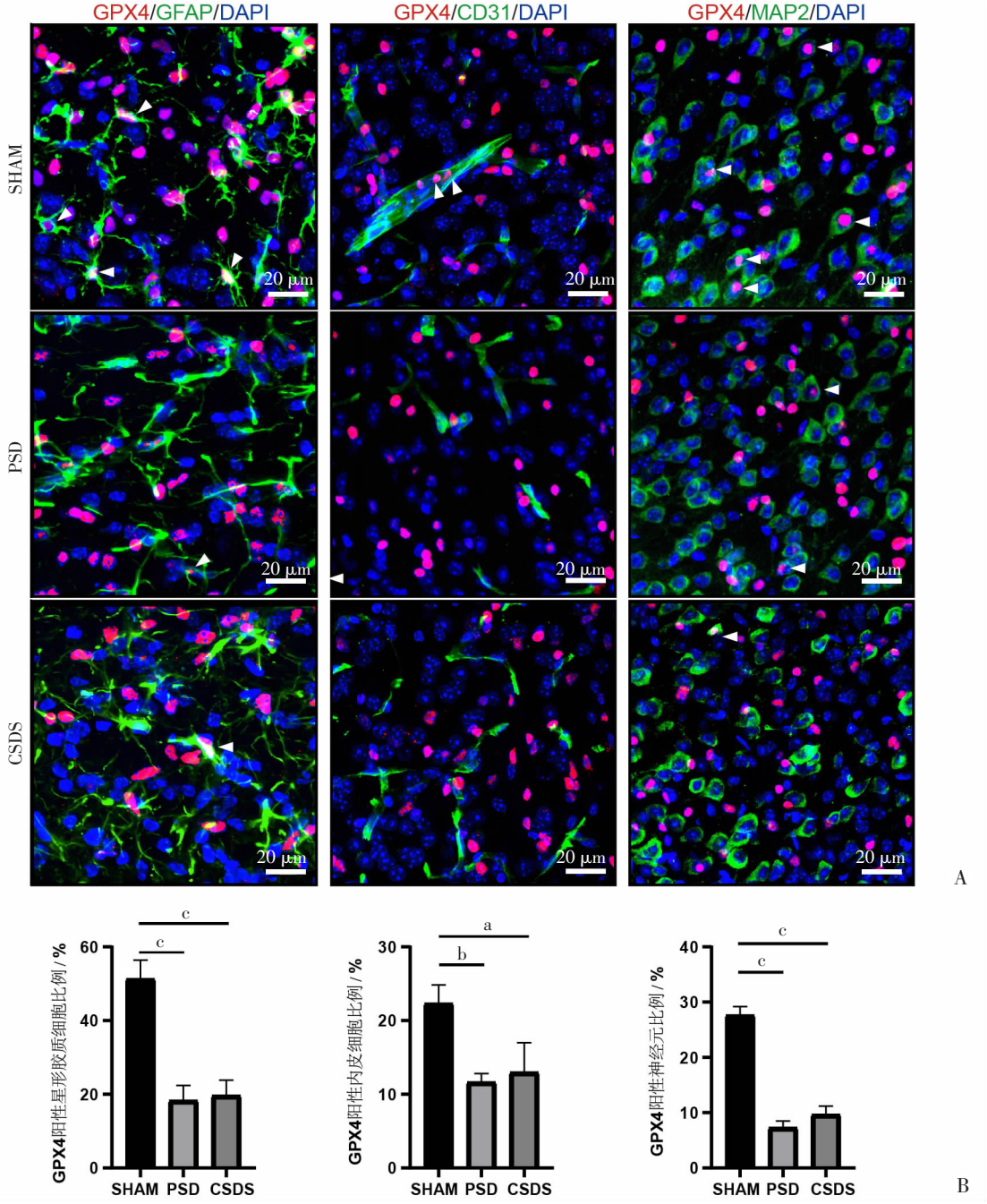


a: $P<0.01$

A:mPFC 脑区 GPX4 免疫荧光染色;B:GPX4 阳性细胞比例;C:mPFC 脑区 MDA 检测

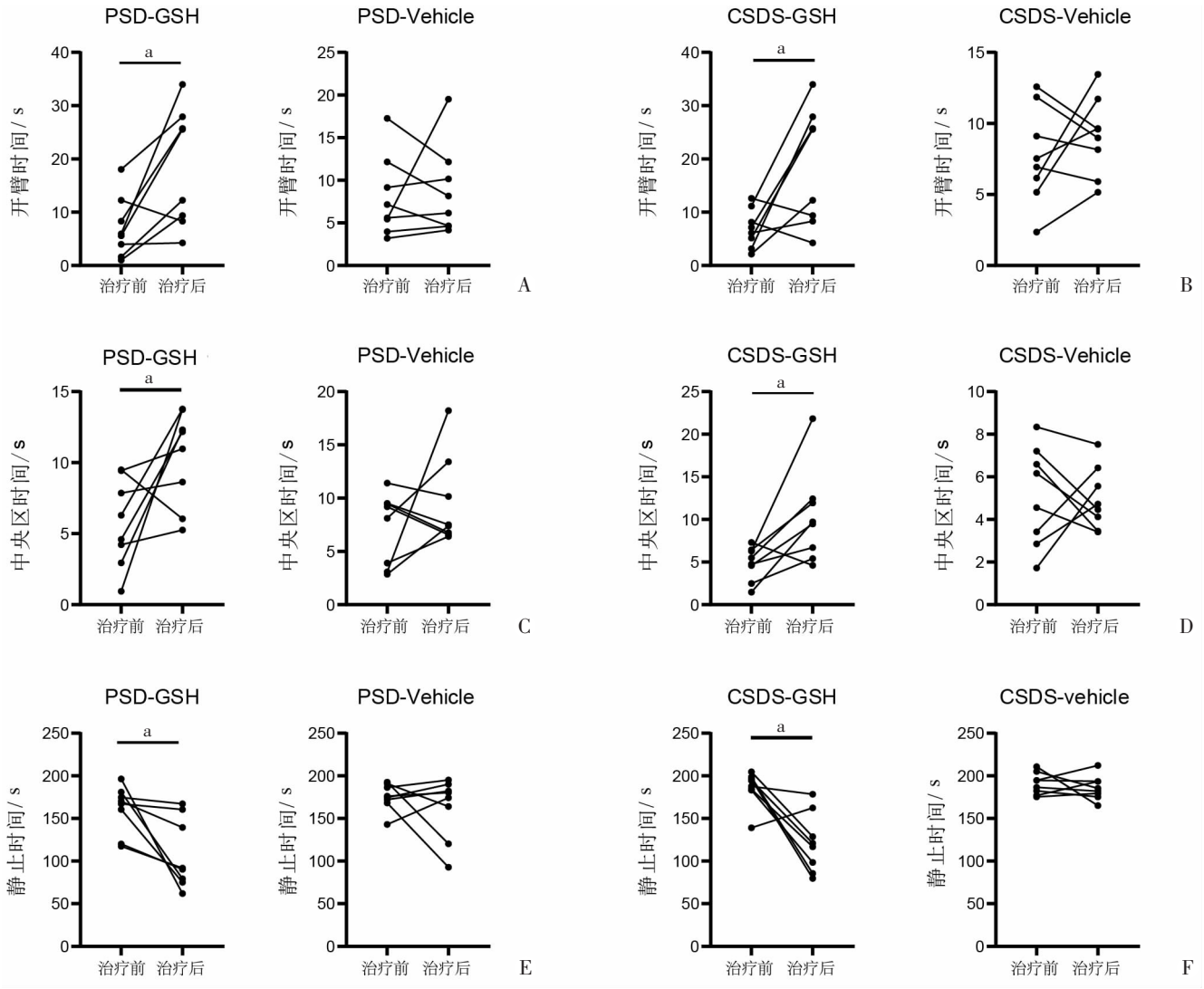
图 5　PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 细胞铁死亡增加　($n=3, \bar{x}\pm s$)

为明确 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 什么类型的细胞发生了铁死亡,将 GPX4 分别和 GFAP(星形胶质细胞标记物)、CD31(内皮细胞标记物)和 MAP2(神经元标记物)进行免疫荧光双标染色。结果显示:与 SHAM 组比较,PSD 组和 CSDS 组小鼠 mPFC 脑区 GPX4 阳性星形胶质细胞、GPX4 阳性内皮细胞和 GPX4 阳性神经元细胞比例均明显减少($P<0.05$,图 6),表明相应细胞在造模后抑制铁死亡的能力减弱。其中星形胶质细胞在造模前 GPX4 阳性率最高 50%~60%,并且在 PSD 和 CSDS 小鼠中 GPX4 阳性星形胶质细胞比例下降幅度最大,提示星形胶质细胞可能是在 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 发生铁死亡的主要细胞类型。



A:mPFC 脑区 GPX4 分别和 GFAP、CD31 和 MAP2 免疫荧光双标染色　白色箭头:示 GPX4 分别与 GFAP、CD31 和 MAP2 共标细胞;B:GPX4 阳性星形胶质细胞、GPX4 阳性内皮细胞和 GPX4 阳性神经元细胞比例　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$

图 6　PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 脑区星形胶质细胞、内皮细胞和神经元铁死亡检测结果　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



a: $P<0.05$

A、B: PSD 和 CSDS 小鼠腹腔注射 GSH 或生理盐水后高架十字开臂时间变化; C、D:PSD 和 CSDS 小鼠腹腔注射 GSH 或生理盐水后旷场实验中央区停留时间变化;E、F:PSD 和 CSDS 小鼠腹腔注射 GSH 或生理盐水后悬尾实验静止不动时间变化

图 7 外源性补充 GHS 可改善 PSD 和 CSDS 小鼠焦虑抑郁样行为表现 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

2.6 外源性补充 GSH 可改善 PSD 和 CSDS 小鼠抑郁样行为

为探索 GSH 是否可以作为抑郁症治疗靶点,本研究对 PSD 和 CSDS 小鼠进行为期 7 d 的 GSH 治疗实验。结果显示:与注射等剂量生理盐水比较,补充 GSH 能够显著增加 PSD 和 CSDS 小鼠高架实验开臂时间和旷场实验中央区时间($P<0.05$,图 7A~D),并且降低悬尾实验静止不动时间($P<0.05$,图 7E、F)。表明补充 GSH 能够有效改善 PSD 和 CSDS 小鼠抑郁样行为。

3 讨论

抑郁症的发病机制存在多种假说,包括单胺假说、下丘脑-垂体-肾上腺轴假说、炎症假说、神经可塑性假说、大脑结构和功能改变假说、基因和环境假说等[6,13],并且已经发现前额叶、海马、杏仁核和伏隔核等参与的神经环路在抑郁症发病中起到了重要作用[14]。mPFC 也是关键核团之一,该核团处理来自皮层及皮层下区域远程信息的输入,处理后投射到几乎所有感觉皮层、运动皮层以及皮层下区域,具有掌控行为、调节认知和情绪等重要作用[15]。本研究采用 mPFC 注射 ET-1 造成局部梗死的小鼠模型来模拟 PSD,该模型具有制作简便成功率高的特点,并采用 CSDS 小鼠模拟 MDD。行为学结果显示,两种模型小鼠均具有抑郁样行为表现,利用两种抑郁小鼠模型研究 PSD 与 MDD 的共性改变,更加深入探索抑郁症的

治疗靶点。

脑组织代谢物可以反映大脑的生理状态,神经递质、脂质、炎症因子等代谢物都对抑郁症的发生具有重要影响[16-17]。现有研究对于各种代谢物在抑郁症中的具体变化尚无统一认识,受到不同疾病状态以及样本的影响,代谢物表达水平可能在不同研究中呈现相反表现[18]。本研究通过对两种抑郁模型小鼠和对照小鼠的关键脑区 mPFC 进行神经递质靶向代谢组测序,获得了 38 种神经递质及氨基酸等代谢物的表达情况,发现 13 种代谢物在 PSD 组和 CSDS 组中表现出明显下降,显著差异代谢物中包括 NE 这种抑郁症研究的经典神经递质,也包含 GSH 和 Gly 等在细胞活动中起到重要作用的氨基酸。通路富集分析发现 PSD 和 CSDS 2 组差异代谢物均在谷胱甘肽代谢途径显著富集,进一步检测结果显示 PSD 和 CSDS 小鼠都存在还原型谷胱甘肽明显减少的表型,提示 GSH 代谢异常在抑郁发病中起到了重要作用,针对谷胱甘肽减少这个共性改变研究可能有助于解析抑郁症基本的致病原因。

GSH 在体内分布广泛,具有抗氧化、清除氧自由基[19]和维持免疫系统[20]等重要作用。近几年来 GSH 清除胞内过氧化物、抑制铁死亡的作用越来越受到重视,细胞铁死亡是由 GSH 耗竭,谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)活性下降,脂质氧化物不能通过 GPX4 催化的反应代谢清除,活性氧堆积而引发[21]。本研究发现 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 脑区 GSH 显著减少,提示抑郁症的发生可能和 mPFC 脑区的细胞氧化应激、铁死亡有关。前期研究发现抗抑郁药物可通过抑制铁死亡改善小鼠抑郁样行为,DANG 等[22]的研究发现依达拉奉可以通过 Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 轴缓解 CSDS 小鼠抑郁样行为表现,YANG 等[23]研究发现地黄阴子可以通过 P53/SLC7A11/GPX4 途径抑制 PSD 大鼠额叶细胞铁死亡。本研究对铁死亡标记物 MDA 和 GPX4 进行检测,结果显示,与对照组比较 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 脑区存在明显的铁死亡发生,提示两种抑郁模型小鼠关键脑区均存在 GSH 减少诱发的细胞铁死亡增加,并且发现星形胶质细胞可能是发生铁死亡的主要细胞类型,这可能与星形胶质细胞承担大脑物质代谢的功能相关,PSD 和 CSDS 小鼠 GSH 减少引发的铁死亡对星形胶质细胞产生了重要影响,同时,也不排除其他细胞发生铁死亡的可能,如小胶质细胞、周细胞、少突胶质细胞等,需要后续实验进一步验证。本研究结果提示通过外源性补充 GSH 可以改善 PSD 和 CSDS 小鼠抑郁样行为,为以 GSH 为靶点治疗抑郁症提供了理论基础。

综上所述,本研究利用代谢组学解析 PSD 和 CSDS 小鼠 mPFC 脑区的代谢物改变,发现 GSH 代谢异常在抑郁症发生中起到了关键作用,为寻找抑郁症治疗靶点提供了理论依据。但本研究存在一定的局限性:需要扩大样本量来增加实验结果的可靠性;本研究结果显示 GSH 减少引发的细胞铁死亡在抑郁症的发生中起到了重要作用,但是 GSH 减少的原因还需要进一步实验探索。在未来的研究中,我们将进一步解析 PSD 以及 MDD 之间的异同点,并且深入探索 GSH 减少引起的大脑细胞与功能变化,为后续深入研究抑郁症病因及寻找治疗靶点打下基础。

参考文献:

[1] VILLA R F, FERRARI F, MORETTI A. Post-stroke depression: mechanisms and pharmacological treatment[J]. Pharmacol Ther, 2018, 184: 131-144. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.11.005.

[2] HACKETT M L, ANDERSON C S, HOUSE A O. Interventions for treating depression after stroke[M]. Cochrane Database Syst Rev, 2004,(3): CD003437. DOI: 10.1002/14651858.CD003437.pub2.

[3] 黄术兵, 曲秀霞. 慢性瘙痒、慢性疼痛和抑郁症关系的思考[J]. 空军军医大学学报, 2022, 43(4): 518-521, 526. DOI:10.13276/j.issn.2097-1656.2022.04.030.
HUANG S B, QU X X. Thoughts on relationships between chronic pruritus, chronic pain and depression[J]. J Air Force Med Univ, 2022, 43(4): 518-521, 526. DOI:10.13276/j.issn.2097-1656.2022.04.030.

[4] TRIVEDI M H, RUSH A J, WISNIEWSKI S R, *et al*. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR * D: implications for clinical practice[J]. Am J Psychiatry, 2006, 163(1): 28-40. DOI: 10.1176/appi.ajp.163.1.28.

[5] MARX W, PENNINX B W J H, SOLMI M, *et al*. Major depressive disorder[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9: 44. DOI: 10.1038/s41572-023-00454-1.

[6] MALHI G S, MANN J J. Depression[J]. Lancet, 2018, 392(10161): 2299-2312. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)31948-2.

[7] DAS J, RAJANIKANT G K. Post stroke depression: the sequelae of cerebral stroke[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2018, 90: 104-114. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.04.005.

[8] SEO J S, WEI J, QIN L, *et al*. Cellular and molecular basis for stress-induced depression[J]. Mol Psychiatry, 2017, 22(10): 1440-1447. DOI: 10.1038/mp.2016.118.

[9] CLARKE R E, VOIGT K, REICHENBACH A, *et al*. Identification of a stress-sensitive anorexigenic neurocircuit

from medial prefrontal cortex to lateral hypothalamus[J]. Biol Psychiatry, 2023, 93(4): 309-321. DOI: 10.1016/j.biopsych.2022.08.022.

[10] LIN S, HUANG L, LUO Z C, *et al*. The ATP level in the medial prefrontal cortex regulates depressive-like behavior via the medial prefrontal cortex-lateral habenula pathway [J]. Biol Psychiatry, 2022, 92(3): 179-192. DOI: 10.1016/j.biopsych.2022.02.014.

[11] VAHID-ANSARI F, LAGACE D C, ALBERT P R. Persistent post-stroke depression in mice following unilateral medial prefrontal cortical stroke [J]. Transl Psychiatry, 2016, 6(8): e863. DOI: 10.1038/tp.2016.124.

[12] GOLDEN S A, COVINGTON H E 3rd, BERTON O, *et al*. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice[J]. Nat Protoc, 2011, 6(8): 1183-1191. DOI: 10.1038/nprot.2011.361.

[13] MCCARRON R M, SHAPIRO B, RAWLES J, *et al*. Depression [J]. Ann Intern Med, 2021, 174(5): ITC65-ITC80. DOI: 10.7326/ALTC202105180.

[14] SPELLMAN T, LISTON C. Toward circuit mechanisms of pathophysiology in depression[J]. Am J Psychiatry, 2020, 177(5): 381-390. DOI: 10.1176/appi.ajp.2020.20030280.

[15] SUN Q T, LI X N, REN M, *et al*. A whole-brain map of long-range inputs to GABAergic interneurons in the mouse medial prefrontal cortex[J]. Nut Neurosci, 2019, 22(8): 1357-1370. DOI: 10.1038/s 41593-019-0429-9.

[16] MONROE S M, HARKNESS K L. Major depression and its recurrences: life course matters [J]. Annu Rev Clin Psychol, 2022, 18: 329-357. DOI: 10.1146/annurev-clinpsy-072220-021440.

[17] DELL'OSSO L, CARMASSI C, MUCCI F, *et al*. Depression, serotonin and tryptophan[J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(8): 949-954. DOI: 10.2174/1381612822666151214104826.

[18] GOLD P W, CHROUSOS G P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states [J]. Mol Psychiatry, 2002, 7(3): 254-275. DOI: 10.1038/sj.mp.4001032.

[19] MAILLOUX R J, TREBERG J R. Protein S-glutathionlyation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria[J]. Redox Biol, 2016, 8: 110-118. DOI: 10.1016/j.redox.2015.12.010.

[20] MMRI J, KOPF M. Redox regulation of immunometabolism. [J]. Nat Rev Immunol, 2021,21(6):363-381. DOI: 10.1038/s41577-020-00478-8.

[21] LEI G, ZHUANG L, GAN B Y. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(7): 381-396. DOI: 10.1038/s41568-022-00459-0.

[22] DANG R Z, WANG M Y, LI X H, *et al*. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 41. DOI: 10.1186/s12974-022-02400-6.

[23] YANG Z, JIANG Y X, XIAO Y, *et al*. Di-Huang-Yin-Zi regulates P53/SLC7A11 signaling pathway to improve the mechanism of post-stroke depression[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 2): 117226. DOI: 10.1016/j.jep.2023.117226.

(**收稿**:2024-01-25;**修回**:2024-02-24)

(编辑 吴培红)