

·论著·

氯胺酮通过抑制 ERK1/2/NF-κB 信号通路发挥抗抑郁作用

覃斌, 叶刚, 吴述轩, 向登国, 牟俊英, 朱贤林

作者单位
恩施州中心医院麻醉科
湖北 恩施 445000
基金项目
湖北省自然科学基金面上项目(No.2016CFB368);
国家自然科学基金(No.81760257)
收稿日期
2019-03-25
通讯作者
朱贤林
qbmzk8888@sina.com

摘要 目的:探讨氯胺酮通过抑制 ERK1/2/NF-κB 信号通路发挥抗抑郁作用的炎症相关机制。**方法:**15 只正常大鼠为空白对照组(Blank 组),慢性不可预知刺激抑郁模型法构建成功的 45 只抑郁大鼠随机分为对照组(Con 组)、安慰剂组(Place 组)、实验组(Exp 组)3 组,每组 15 只。Con 组不予药物,Place 组建模成功后给予安慰剂灌胃,Exp 组给予氯胺酮灌胃 21 d。治疗前后,采用悬尾实验、强迫游泳实验、新奇抑制摄食实验检测行为学改变;ELISA、qRT-PCR 检测海马组织白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)各组表达;Western blot 检测海马组织 ERK1/2、NF-κB 炎症相关信号分子改变。**结果:**在行为学实验中,氯胺酮能显著缩短抑郁大鼠游泳不动时间($P<0.05$)及悬尾不动时间($P<0.01$)。无论在蛋白水平还是 mRNA 水平,Con 组 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达高于 Blank 组($P<0.05$);Exp 组的 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达较 Con 组下降($P<0.05$)。Con 组的 pERK1/2、pNF-κB 蛋白表达高于 Blank 组,Exp 组的 pERK1/2、pNF-κB 蛋白表达较 Con 组下降($P<0.05$)。**结论:**氯胺酮通过抑制 ERK1/2、NF-κB 信号分子,抑制炎症反应,显著改善抑郁大鼠的行为学。

关键词 氯胺酮;ERK1/2/NF-κB 信号通路;炎症反应

中图分类号 R741;R741.05;R749.4 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssngcj.2020.03.003

覃斌, 叶刚, 吴述轩, 等. 氯胺酮通过抑制 ERK1/2/NF-κB 信号通路发挥抗抑郁作用[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(3): 134-137.

Inflammation-Related Mechanism of Ketamine Exerting Antidepressant Effect by Inhibiting ERK1/2/NF-κB Signaling Pathway QIN Bin, YE Gang, WU Shu-xuan, XIANG Deng-guo, MOU Jun-ying, ZHU Xian-lin. Department of Anesthesia, The Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Hubei 445000, China

Abstract Objective: To investigate the inflammation-related mechanisms through which ketamine exerts antidepressant effects by inhibiting the ERK1/2/NF-κB signaling pathway. **Methods:** Fifteen normal rats were assigned to the blank control group (Group Blank). Chronic unpredictable stimulation was used to generate the depression rat model, and 45 successfully constructed depressed rats were randomly divided into three groups: control group (Group Con), placebo group (Group Place), and experimental group (Group Exp), with 15 rats in each group. Group Con was not given medication; Group Place was given placebo by oral gavage after successful model establishment; Group Exp was given ketamine by oral gavage for 21 days. Behavioral changes were detected by tail suspension test, forced swimming test, and novelty inhibition feeding test before and after treatment. The expression of interleukin-1β (IL-1β), IL-6, and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the hippocampus was detected by ELISA and qRT-PCR. Changes in signal molecules related to ERK1/2 and NF-κB inflammation in the hippocampus were detected by Western blotting. **Results:** Ketamine significantly shortened swimming immobility time ($P<0.05$) and tail suspension immobility time ($P<0.01$) in behavioral experiments. The expression of IL-1β, IL-6, and TNF-α in Group Con was significantly higher than that in Group Blank at both protein and mRNA levels. In addition, the expression of IL-1β, IL-6, and TNF-α in Group Exp was significantly lower than that in Group Con ($P<0.05$). The expression of pERK1/2 and pNF-κB in Group Con group was significantly higher than that in Group Blank, while the expression of pERK1/2 and pNF-κB in Group Exp group were significantly lower than that in Group Con ($P<0.05$). **Conclusion:** Ketamine can significantly improve the behavior of depressed rats by inhibiting inflammation through inhibiting signal molecules of ERK1/2 and NF-κB.

Key words ketamine; ERK1/2/NF-κB signaling pathway; inflammatory response

抑郁症是一种病因尚未明确的常见精神障碍,生物、心理与社会环境诸多因素参与抑郁症的发生发展,遗传与环境或应激因素之间的交互作用在抑郁症发生中亦被认为起重要作用^[1]。目前,抑郁症的发病机制仍不是特别清楚,神经递质分泌减少、神经细胞

凋亡、炎症反应、肠道菌群失调等均有可能参与抑郁症的发生^[2]。抑郁症患者外周血和脑脊液中相关炎性细胞因子表达升高,抗抑郁药物可通过抑制 IL-1、IL-6 和 TNF-α 等炎症相关因子而达到抗抑郁作用,说明炎症反应参与抑郁症的发生发展^[3]。氯胺酮是一种

临床常用的全身麻醉药,对N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体具有非选择性拮抗作用^[4]。大量研究证实氯胺酮具有快速、有效、相对持久的抗抑郁作用,且对难治性抑郁症、双相抑郁障碍等亦有效,但目前其具体机制仍缺乏进一步探究^[5]。细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK1/2)参与多种细胞活动,可通过调节核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)等多种机制调控中枢神经系统的炎症反应及细胞存活等,对学习记忆发挥重要作用^[6]。目前在抑郁症中,氯胺酮对于ERK1/2/NF- κ B信号通路的作用仍缺乏相关研究。因此,本研究拟通过建立大鼠抑郁模型,探究氯胺酮发挥抗抑郁作用的炎症相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8周SD大鼠60只,由湖北省硒与人体健康研究所提供,饲养于SPF级实验室中,充足饮食,室温(18~25)℃,湿度50%~80%。

1.1.2 主要试剂与设备 pERK1/2、ERK1/2、NF- κ B、pNF- κ B、GAPDH购自美国Abcam公司;PCR引物购于美国Genecopoeia公司;HRP标记羊抗大鼠、HRP标记羊抗兔购自博士德生物科技公司;免疫组化试剂盒购自碧云天生物科技股份有限公司;其他试剂与设备由湖北省硒与人体健康研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 60只大鼠按随机数字表法分为空白对照组(Blank组)、对照组(Con组)、安慰剂组(Place组)、实验组(Exp组)各15只。Blank组不予任何处理,常规喂养;Con组、Place组、Exp组按慢性不可预知刺激抑郁(chronic unpredicted mild stress, CUMS)模型法构建抑郁模型。Con组不予其他干预;Place组在造模后,与Exp组一致,每天3次灌胃,给予安慰剂(淀粉),持续21 d;Exp组在造模后,按成人体重与剂量折算公式,换算成大鼠剂量给予氯胺酮灌胃(10 mg/kg),持续21 d。

1.2.2 CUMS模型建立 给予大鼠21 d各种不同的刺激,平均每种刺激各2次,同种刺激不能连续出现,包括电击足底(电流强度1.0 mA,每隔1 min刺激1次,每次持续10 s,共3次)、冰水游泳(4℃,5 min)、热应激(45℃,5 min)、摇晃(1速率次/秒,15 min)、夹尾(1 min)、禁水(24 h)、禁食(48 h)和昼夜颠倒等刺激,使动物不能预料刺激的发生,持续21 d^[1]。

1.2.3 大鼠悬尾实验(tail suspension test, TST) 将大

鼠尾端(在距尾尖部约2 cm处)用医用胶布粘于悬尾箱(30 cm×30 cm×25 cm)上部支架上,使其成倒挂状态,头部离箱底约5 cm,悬挂6 min,统计后4 min内不动状态累计时间。不动状态定义为大鼠停止挣扎不动或无任何活动。

1.2.4 大鼠强迫游泳实验(forced swimming test, FST) 在末次给药1 h后进行测试,将大鼠置于高65 cm、直径30 cm、水深40 cm,水温(25±2)℃的自来水玻璃缸中,从大鼠入水后计时6 min,记录后4 min内静止不动行为累计时间。静止不动行为定义为大鼠在水中停止挣扎,或显示漂浮状态,仅有微小的肢体运动以保持头部浮在水面,无其他行为。

1.2.5 新奇抑制摄食实验(novelty suppressed feeding test, NSFT) 实验前大鼠禁食8 h。实验时,将大鼠放入长宽均为75 cm、高40 cm的敞箱中,敞箱中间放有少量食物,记录大鼠吃到食物的潜伏时间。

1.2.6 标本采集 于行为学实验结束后,10%水合氯醛(350 mL/kg)腹腔注射麻醉动物,断头取脑。

1.2.7 Western blot 提取大鼠海马组织蛋白,BCA法测定蛋白浓度,采用5×上样缓冲液稀释,调整蛋白浓度至等量,12%分离胶电泳,转膜90 min,5%脱脂奶粉室温封闭1 h, TBST漂洗10 min×3次,用5% TBST稀释的BSA稀释一抗,4℃孵育过夜,用TBST漂洗10 min×3次,加二抗室温下孵育1 h后,用TBST洗膜10 min×3次,在Gene Gnome曝光仪上曝光拍照,Quantity One分析灰度值,以GAPDH灰度值为内参。

1.2.8 ELISA 提取大鼠海马组织蛋白,测定蛋白浓度,调整蛋白浓度至等量。严格按照ELISA试剂盒要求操作,测定目的蛋白浓度。

1.2.9 qRT-PCR 获得大鼠海马组织样本,严格按照RNAgent Isolation System说明书,抽提总RNA。取1 μg总RNA,严格按照逆转录试剂盒说明书将总RNA逆转录成cDNA。PCR反应在PE公司GeneAmp8 5700型PCR扩增仪上进行,严格按照SYBR green说明书加样,各样本cDNA 2 μL;SYBR green 10 μL;商品化引物2 μL(IL-1 β : MQP065742; IL-6: MQP036327; TNF- α : MQP041783; GAPDH: MQP027158);RNAase free去离子水6 μL,总反应体系20 μL;按两步法反应94℃ 30 s, 58℃ 30 s,反复40个循环以GAPDH为内参进行分析,设置Blank组指标为1。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件分析数据,计量资料以(均数±标准差)表示,组间差异比较前行方差齐性检验

及正态性检验,所有数据均符合正态分布,方差齐者行*F*检验,方差不齐者行秩和检验,组间两两比较行*SNK-q*检验,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组TST、FST不动时间及NSFT潜伏期比较

建模成功后,Con组、Place组、Exp组的TST、FST不动时间及NSFT平均潜伏期均长于Blank组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。Exp组的TST、FST不动时间及NSFT潜伏期较Con组与Place组均缩短,差异有统计学意义(*P*<0.05);Con组与Place组的TST、FST不动时间及NSFT潜伏期比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见表1。

2.2 各组IL-1β、IL-6、TNF-α炎症因子表达比较

在mRNA及蛋白水平,Con组、Place组、Exp组的IL-1β、IL-6、TNF-α表达高于Blank组,差异有统计学意义(*P*<0.05);Exp组的IL-1β、IL-6、TNF-α表达较Con组、Place组下降,差异有统计学意义(*P*<0.05);Con组与Place组的IL-1β、IL-6、TNF-α表达比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见表2。

2.3 各组ERK、NF-κB蛋白表达比较

Con组、Place组、Exp组的pERK1/2、pNF-κB表达高于Blank组,差异有统计学意义(*P*<0.05);Exp组的pERK1/2、pNF-κB表达较Con组与Place组下降,差异有统计学意义(*P*<0.05);Con组与Place组的pERK1/2、pNF-κB表达差异无统计学意义(*P*>0.05),见图1。

表1 各组TST、FST不动时间及NSFT潜伏期比较(s, $\bar{x} \pm s$)

	只数	TST	FST	NSFT
Blank组	15	39.38±21.06	28.67±10.85	192.36±47.68
Con组	15	117.58±23.42 ^①	69.92±11.41 ^①	323.25±36.64 ^①
Place组	15	104.29±22.36 ^①	71.57±10.26 ^①	302.49±35.37 ^①
Exp组	15	51.57±10.26 ^{②③}	31.57±10.26 ^{②③}	226.67±31.78 ^{②③}
<i>F</i> 值	15	55.69	72.25	39.09
<i>P</i> 值	15	0.001	0.001	0.001

注:与Blank组比较,^①*P*<0.05;与Con组比较,^②*P*<0.05;与Place组比较,^③*P*<0.05

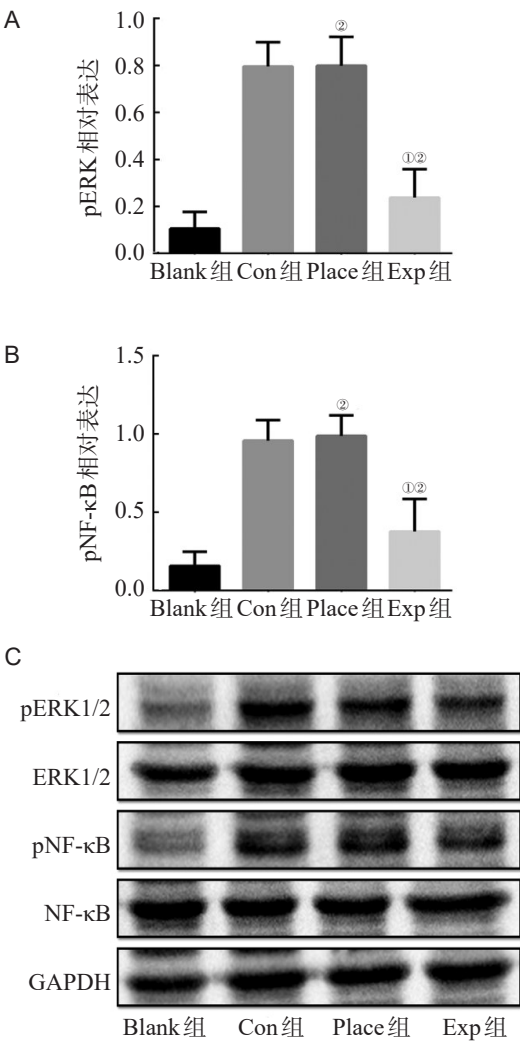
表2 各组mRNA水平IL-1β、IL-6、TNF-α炎症因子表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-1β		IL-6		TNF-α	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
Blank组	15	5.85±1.87	21.69±7.85	4.02±1.27	10.38±5.06	4.12±1.19	67.39±21.25
Con组	15	9.21±4.21 ^①	53.71±9.62 ^①	6.43±2.17 ^①	29.58±3.42 ^①	6.24±1.05 ^①	117.53±20.71 ^①
Place组	15	8.57±3.35 ^①	42.85±9.03 ^①	5.36±1.78 ^①	24.29±5.36 ^①	5.28±1.14 ^①	126.38±22.84 ^①
Exp组	15	3.19±0.97 ^{②③}	30.04±8.32 ^{②③}	1.74±0.77 ^{②③}	14.57±4.23 ^{②③}	1.55±0.37 ^{②③}	77.05±18.76 ^{②③}
<i>F</i> 值		16.46	39.11	32.09	55.26	108.8	29.18
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

注:与Blank组比较,^①*P*<0.05;与Con组比较,^②*P*<0.05;与Place组比较,^③*P*<0.05

3 讨论

氯胺酮最开始于1970年作为分离麻醉剂(对任何疼痛没有感觉,但保持意识清醒)用于临床,近年来其抗抑郁作用逐渐受到重视^[7]。Berman等^[8]通过9例抑郁患者的随机双盲试验发现静脉注射小剂量氯胺酮(0.5 mg/kg)后,超过50%的患者抑郁症状明显改善。Zarate等^[9]在17例抑郁症患者静脉注射氯胺酮



注:A~C: Western blot检测pERK1/2、pNF-κB蛋白表达比较。与Con组比较,^①*P*<0.01;与Place组比较,^②*P*<0.01

图1 各组ERK、NF-κB蛋白表达比较

(0.5 mg/kg)和安慰剂后比较发现,注射氯胺酮后110 min内即开始出现抑郁的明显改善,且持续时间长达2周,此后大量临床研究证实氯胺酮的显著抗抑郁作用^[10]。本实验也证实氯胺酮的显著抗抑郁作用,Exp组大鼠在给予氯胺酮后,行为学明显改善,这与临床研究结果一致。

但是,目前氯胺酮具体抗抑郁机制尚不十分明确,既往研究多认为氯胺酮可与中枢神经系统包括NMDA受体、阿片类受体、单胺类受体、类胆碱能受体、钠离子通道、钙离子通道等多种受体结合,启动下游信号通路,发挥抗抑郁作用^[11],但亦有研究认为氯胺酮可通过增加突触形成,增强突触可塑性发挥抗抑郁作用^[12]。近年来,抑郁形成的炎症相关机制逐渐受到重视,促炎因子在抑郁症的发病过程中发挥重要作用,通过抑制炎症反应可显著改善抑郁症状,但是抑制促炎因子是否与氯胺酮的抗抑郁作用相关仍不清楚^[13]。一项临床研究结果表明,抑郁患者血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量较高;有效患者的血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量均降低,而无疗效的患者则无此现象^[14]。本实验结果表明,Exp组大鼠在给予氯胺酮后,海马组织中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量均显著降低,提示氯胺酮可能通过抑制IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子,发挥抗抑郁作用。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子参与抑郁症发病过程的可能机制是通过改变神经元及轴突周围微环境,介导神经元凋亡与萎缩,导致神经元棘突以及长树突数量和密度减少^[14,15],但具体作用还有待进一步研究。

进一步探究与IL-1 β 、IL-6、TNF- α 合成分泌相关的ERK、NF- κ B信号分子在给予氯胺酮后的变化,氯胺酮治疗后ERK、NF- κ B信号分子的激活显著下降。已有研究表明,ERK、NF- κ B信号均影响海马和神经再生、神经可塑性,信号转导通路的激活与抑郁症发病及抗抑郁剂有关。在抑郁的发生发展过程中,多种损伤相关分子通过激活小胶质细胞或星形胶质细胞表面的DAMP受体,激活下游的ERK1/2信号途径,从而激活NF- κ B,使胶质细胞合成释放炎症因子与炎症趋化因子^[16]。同时,NF- κ B转录活性增强后,可增加nNOS和COX-2等基因的表达,从而增加神经元的兴奋性,可能与抑郁的发生密切相关。另外,有研究证实脑源性神经营养因子的表达激活TrkB信号途径,导致细胞外信号传导相关激酶ERK的去磷酸化,以及抑制糖原合酶激酶3的活性,这激活mTOR途径,反过来增加突触蛋白表达和棘突密度,从而增强突触功能,从而快速治疗抑郁^[17],这提示ERK信号通路还通过其他机制参与抑

郁的发生发展。因此,氯胺酮通过抑制ERK、NF- κ B激活,可能不仅通过抑制炎症反应这一机制达到治疗作用,还可能存在其他机制,有待进一步探讨。

综上,本研究通过动物实验首次证实氯胺酮可能通过抑制ERK、NF- κ B,抑制炎症反应,改善抑郁大鼠行为学,这是氯胺酮治疗抑郁症的重要分子机制之一,为进一步探究抑郁的形成与治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] 吴迪,王惠玲.脑电生物反馈仪治疗伴有睡眠障碍的抑郁症疗效分析[J].神经损伤与功能重建,2017,12:135-147.
- [2] Andrade C. Ketamine for Depression, 6: Effects on Suicidal Ideation and Possible Use as Crisis Intervention in Patients at Suicide Risk: (Clinical and Practical Psychopharmacology)[J]. J Clin Psychiatry, 2018, 79: pii: 18f12242.
- [3] 吕帅国,卢锡华,李廷坤,等.氯胺酮对抑郁小鼠中缝核色氨酸羟化酶2表达的影响[J].中华麻醉学杂志,2017,37:674-677.
- [4] Walker AK, Budac DP, Bisulco S, et al. NMDA Receptor Blockade by Ketamine Abrogates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior in C57BL/6J Mice[J]. Neuropsychopharmacology, 2013, 38: 1609-1616.
- [5] 李浩男,孙宏伟,王艳郁,等.短期低剂量褪黑素与氯胺酮对慢性应激抑郁模型大鼠的抑郁样行为及BDNF表达的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2017,26:1070-1075.
- [6] Kavalali ET, Monteggia LM. The Ketamine Metabolite 2R, 6R-Hydroxynorketamine Blocks NMDA Receptors and Impacts Downstream Signaling Linked to Antidepressant Effects[J]. Neuropsychopharmacology, 2018, 43: 221-222.
- [7] 杨晓玲,周敏,王晓斌,等.氯胺酮对抑郁大鼠海马微小RNA 206表达的影响[J].中华麻醉学杂志,2016,36:433-437.
- [8] Murrrough JW, Iosifescu DV, Chang L, et al. P.2.f.028 Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site, randomised controlled trial[J]. Am J Psychiatry, 2013, 23: S411-S412.
- [9] 杨春,李文媛,张广芬,等.不同剂量氯胺酮对抑郁大鼠海马脑源性神经营养因子和酪氨酸受体激酶B的影响[J].中华麻醉学杂志,2011,31:460-462.
- [10] Zarate C, Gould T, Zanos P, et al. Theories on the Mechanism of Action of Ketamine: From NMDA Receptor Inhibition to the (2R, 6R)-HNK Metabolite[J]. Biol Psychiatry, 2017, 81: S33-S34.
- [11] 刘大为,闵苏,任力.小剂量氯胺酮保护抑郁大鼠电休克后学习记忆中II组促代谢型谷氨酸受体的作用[J].中国神经精神疾病杂志,2018,44:50-55.
- [12] 陈东丽.氢溴酸西酞普兰联合奥扎格雷钠治疗老年急性脑梗死患者焦虑抑郁的临床研究[J].神经损伤与功能重建,2015,10:177-179.
- [13] Morris PJ, Moaddel R, Zanos P, et al. Synthesis and N-Methyl-D-aspartate (NMDA) Receptor Activity of Ketamine Metabolites[J]. Org Lett, 2017, 19(17): 4572-4575.
- [14] Antón M, Alén F, Gómez de Heras R, et al. Oleylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration[J]. Addict Biol, 2017, 22: 724-741.
- [15] Murrrough J W, Perez A M, Pillemer S, et al. Rapid and Longer-Term Antidepressant Effects of Repeated Ketamine Infusions in Treatment-Resistant Major Depression[J]. Biol Psychiatry, 2013, 74: 250-256.
- [16] Juan YS, Lee YL, Long CY, et al. Translocation of NF- κ B and Expression of Cyclooxygenase-2 Are Enhanced by Ketamine-Induced Ulcerative Cystitis in Rat Bladder[J]. Am J Pathol, 2015, 185: 2269-2285.
- [17] Belujon P, Grace AA. Restoring Mood Balance in Depression: Ketamine Reverses Deficit in Dopamine-Dependent Synaptic Plasticity[J]. Biol Psychiatry, 2014, 76: 927-936.

(本文编辑:王晶)