

shRNA 敲降 CaMK II β 对抑郁症小鼠行为及神经递质水平的影响

韩亚琼, 陈永新, 谷 争, 汤光花, 褚留杰
(新乡医学院第二附属医院药学部, 新乡 453002)

【摘要】目的:探讨 shRNA 敲降 CaMK II β 对抑郁症小鼠行为及神经递质水平的影响。**方法:**45 只小鼠随机分为对照组、模型组和实验组。实验组小鼠经皮层注射 CaMK II β shRNA 腺相关病毒 1×10^9 CFU/只, 对照组和模型组经皮层注射对照 shRNA 腺相关病毒 1×10^9 CFU/只。感染 4 周后模型组和实验组采用慢性不可预见性应激制备抑郁症模型, 然后进行悬尾、强迫游泳、糖水消耗和蔽箱实验测试; 采用酶联免疫反应 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定 3 组小鼠前额叶皮层多巴胺 (dopamine, DA)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 和去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 水平。**结果:**与对照组和模型组比较, 实验组小鼠采用 CaMK II β shRNA 明显降低了 CaMK II β 蛋白的表达水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。3 组小鼠水平运动和垂直运动次数比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较, 模型组和实验组小鼠悬尾实验和强迫游泳实验持续不动时间明显增加, 糖水消耗量显著减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 实验组小鼠悬尾实验和强迫游泳实验持续不动时间明显增加, 糖水消耗量明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组和实验组小鼠 DA、5-HT 和 NE 水平明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 实验组小鼠皮层 DA、5-HT 和 NE 的水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:**腺相关病毒介导 CaMK II β shRNA 可明显下调脑组织 CaMK II β 蛋白水平, 并上调 DA、5-HT 和 NE 水平, 进而达到治疗抑郁症的效果。

【关键词】CaMK II; 抑郁症; 腺相关病毒; 神经递质

【中图分类号】R285

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-12-25

Effects of shRNA-mediated knockdown of CaMK II β on behavior and neurotransmitter levels in depressed mice

Han Yaqiong, Chen Yongxin, Gu Zheng, Tang Guanghua, Chu Liujie

(Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of short hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta (CaMK II β) on behavior and neurotransmitter levels in depressed mice. **Methods:** Forty-five mice were randomly divided into control group, model group, and experimental group. The experimental group received an intracortical injection of CaMK II β shRNA adeno-associated virus at 1×10^9 CFU/mouse, and both the control group and model group received an intracortical injection of control shRNA adeno-associated virus at 1×10^9 CFU/mouse. After four weeks of infection, chronic unpredictable stress was applied in both the model group and experimental group to develop an animal model of depression, followed by tail suspension, forced swimming, sugar water consumption, and covered box tests. The levels of dopamine (DA), 5-hydroxytryptamine (5-HT), and norepinephrine (NE) in the prefrontal cortex of three groups of mice were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** Compared with the control group and model group, the experimental group had significantly lower CaMK II β expression with CaMK II β shRNA adeno-associated virus ($P < 0.05$). There was no significant difference in the number of horizontal and vertical movements between the three groups ($P > 0.05$). Compared with the control group, both the model group and experimental group had significantly longer immobility time in tail suspension and forced swimming tests and less sugar water consumption ($P < 0.05$). Compared

with the model group, the experimental group had significantly longer immobility time in tail suspension and forced swimming tests and less sugar water consumption ($P < 0.05$). Compared with the control group, both the model group and experimental group

作者介绍: 韩亚琼, Email: 550778893@qq.com,

研究方向: 临床精神药理学研究。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190603.1534.010.html>
(2019-06-04)

had significantly lower levels of DA, 5-HT, and NE ($P < 0.05$). Compared with the model group, the experimental group had significantly higher levels of DA, 5-HT, and NE ($P < 0.05$). **Conclusion:** Adeno-associated virus-mediated CaMK II β shRNA can significantly down-regulate the level of CaMK II β and up-regulate the levels of DA, 5-HT, and NE in brain tissue, thus achieving the effect of treating depression.

【Key words】CaMK II β ; depression; adeno-associated virus; neurotransmitters

抑郁症是严重的情绪障碍性疾病, 临床主要表现为心情低落, 思维反应迟钝, 认知能力低下, 意志活动减退及躯体症状。随着社会压力逐渐增加, 抑郁症发病率呈逐年升高的态势, 已经成为严重影响人们生活质量和危害社会安全的疾病类型之一^[1-3]。随着抑郁症发病率的不断提高, 抑郁症发病机制的研究已经成为亟待解决的问题^[4-5]。目前比较明确的观点是: 脑内神经递质失衡进而导致神经功能紊乱是造成抑郁症发生的主要原因^[6]。5-羟色胺、去甲肾上腺素和多巴胺等是主要调节机体神经功能的组分^[7-8]。目前许多临床抗抑郁症药物主要通过增加突触内 5-羟色胺、去甲肾上腺素和多巴胺等神经递质的水平, 进而通过黄酮类化合物抑制单胺氧化酶活性及生物胺的重吸收完成, 以达到发挥抗抑郁作用的目的^[9-10], 但是抑郁症发病的分子机制目前尚不清楚。钙调蛋白依赖蛋白激酶 II (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases II, CaMK II) 是一类多功能的丝氨酸、苏氨酸激酶, 其中 CaMK II α 和 β 仅表达于神经系统^[11-12]。目前研究发现 CaMK II β 在许多抑郁症模型中表达上调, 而 CaMK II α 并未改变, 提示其可能参与了抑郁症的发生^[13-14]。但是干预 CaMK II β 或者抑制其激酶活性是否对抑郁症具有治疗作用尚不清楚。由于 CaMK II β 在抑郁症模型中呈高表达, 因此本研究采用腺相关病毒介导 CaMK II β shRNA 在脑组织中下调 CaMK II β , 分析其对抑郁症小鼠行为及神经递质水平的影响, 旨在分析抑郁症发病机制, 为抗抑郁症药物筛选和设计提供新的思路。

1 资料和方法

1.1 主要试剂和设备

小鼠 5-羟色胺(5-HT)检测试剂盒购自北京方程生物科技有限公司; 小鼠去甲肾上腺素(NE)和多巴胺(DA)检测试

剂盒购自北京诚林生物技术有限公司; CaMK II α 和 β 小鼠单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; Tubulin 小鼠单克隆抗体购自杭州华安生物有限公司; HRP 标记的羊抗小鼠二抗购自上海生物工程有限公司; Spectra Max 190 全波长酶标仪购自美国 MD 公司。

1.2 动物分组和给药

6 周 C57/B6 的小鼠, SPF 级, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 动物使用许可证号: SCXK(京)2016-0006。所有小鼠到货后均自由饮水和进食, 室内温度维持在 26~28 °C, 相对湿度维持在 70% 左右。45 只小鼠随机分为 3 组, 对照组、模型组和实验组。实验组小鼠经皮层注射 CaMK II shRNA 腺相关病毒 1×10^9 CFU/只, 对照组和模型组经皮层注射对照 shRNA 腺相关病毒 1×10^9 CFU/只。病毒感染 4 周后, 模型组和实验组小鼠采用慢性不可预知性应激建立抑郁症模型。所有建模小鼠在 21 d 内实施每天 1 次的随机交替应激处理。应激源如下: ①禁食 24 h; ②禁水 24 h; ③倾斜鼠笼 30° 24 h; ④小鼠尾根部 1 cm 夹尾 1 min; ⑤采用 9.5 cm $\times$ 3 cm 固定器束缚 2 h; ⑥ 17 °C 冷水连续浸泡 3 min; ⑦ 40 °C 热水浸泡 3 min; ⑧昼夜交替。每种刺激不连续使用。刺激 21 d 后, 进行悬尾、强迫游泳、糖水消耗及蔽箱实验; 取外周血分离血清测定神经递质水平; 处死后, 取脑组织采用 Western blot 分析 CaMK II α 和 β 表达水平。

1.3 蔽箱实验

制作 1 个 50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 40 cm 的小鼠反应箱, 内部涂为黑色, 底部平均分为 25 个正方形小格。实验时, 选择一个安静的场地, 全程处于黑暗条件下, 摄像系统记录小鼠在箱子内活性情况。记录小鼠三爪以上跨入方格的水平运动次数和前双肢脱离地面的次数, 每次跨入或者离地记为 1 分。

1.4 悬尾实验

实验在树脂玻璃暗箱中进行, 将小鼠尾部约 1 cm 处固定在距离地面 35 cm 的横杆上, 头部朝下, 保持倒立状态, 维持 6 min 后适应 1 min, 然后计算持续不动的时间。判断依据: 小鼠停止挣扎, 除了呼吸和胡须晃动外, 全程处于无助状态。

1.5 强迫游泳实验

3 组小鼠在接受刺激 21 d 后, 将小鼠置于直径 30 cm、高 25 cm 的玻璃圆筒内, 水深 15 cm, 水温保持在 24 °C, 强迫浸泡小鼠 6 min。判断标准: 所有小鼠仅头部露出水平, 呈漂

浮状,四肢静止。浸泡后 4 min 记录持续不动时间。

1.6 糖水消耗实验

每组小鼠在实验之前单独饲养,并禁食和禁水 24 h,然后于次日将装有 100 mL 30 mmol/L 蔗糖溶液和 100 mL 纯净水的水瓶放置于鼠笼,实验期间每天 2 次更换水瓶位置,防止小鼠习惯性进食。在小鼠自由饮水 1 h 后,测量蔗糖溶液和纯净水的消耗量。采用下述公式计算蔗糖偏嗜度。蔗糖偏嗜度(%)=糖水消耗/总液体体积×100%。

1.7 Western blot

3 组小鼠在接受刺激后处死,取脑组织,称取 100 mg,加入 200 μ L 组织裂解液吹打混匀,在冰上静置 1 h 后,14 000 r/min 离心 15 min,弃沉淀部分,上清转移至新的离心管,按照体积加入 5×上样缓冲液,水浴煮 20 min,使蛋白质完全变性,然后进行 SDS-PAGE,电泳结束后,采用水平电泳将目的蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5%牛血清白蛋白封闭 1 h 后,用 5%牛血清白蛋白稀释 CaMK II α 和 β 小鼠单克隆抗体(1:1 000),4℃孵育过夜,次日用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min,结束后用羊抗小鼠二抗在室温孵育 2 h,用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min 后,显色,以 Tubulin 作为内参。

1.8 ELISA 测定神经递质

3 组小鼠接受刺激后,麻醉处死,取出前额叶皮层并测质量,加入 200 μ L 生理盐水进行匀浆,然后以 15 000 r/min 离心 30 min,弃沉淀,上清转移至新的离心管。DA、5-HT 和 NE 水平严格按照 ELISA 试剂盒操作说明书进行。

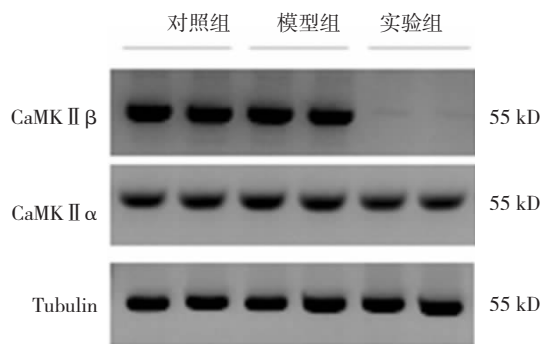
1.9 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 每组小鼠脑组织 CaMK II α 和 β 表达水平

对照组、模型组和实验组小鼠 CaMK II α 蛋白表达



A. Western blot 分析脑组织中 CaMK II α 和 β 表达水平

水平 (1.21 ± 0.15 ; 1.09 ± 0.20 ; 1.02 ± 0.19) 无统计学差异 ($F=0.941$, $P>0.05$), 如图 1 所示。与对照组和模型组比较, 实验组小鼠 CaMK II β 蛋白表达水平 (1.54 ± 0.21 ; 1.66 ± 0.22 ; 0.18 ± 0.08) 明显下调, 差异有统计学意义 ($F=9.107$, $P=0.000$)。

2.2 每组小鼠自发活动能力分析

对照组、模型组和实验组小鼠水平运动次数和垂直运动次数比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 3 组小鼠藏箱实验结果比较

组别	水平运动次数	垂直运动次数
对照组 ($n=15$)	78.12 ± 8.09	30.32 ± 8.91
模型组 ($n=15$)	75.93 ± 8.23	28.12 ± 9.05
实验组 ($n=15$)	79.99 ± 10.41	27.99 ± 10.32
<i>F</i> 值	0.791	0.375
<i>P</i> 值	0.120	0.491

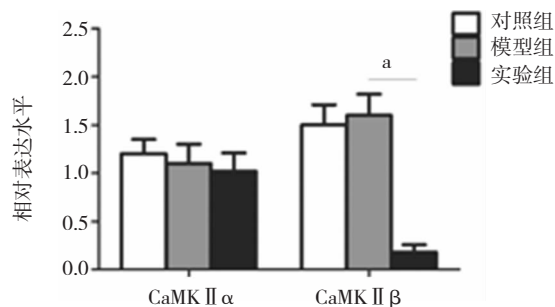
2.3 每组小鼠行为能力分析

与对照组比较, 模型组和实验组小鼠悬尾不动时间和强迫游泳实验不动时间明显延长 ($P<0.05$), 而 24 h 糖水消耗量明显减少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较, 实验组小鼠悬尾不动时间和强迫游泳实验不动时间明显缩短, 而 24 h 糖水消耗量明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 3 组小鼠治疗后行为学指标比较

分组	悬尾实验 (s)	强迫游泳实验 (s)	糖水消耗实验 (g)
对照组	84.19 ± 13.78	77.14 ± 13.65	20.71 ± 7.61
模型组	289.44 ± 19.73^a	168.89 ± 18.90^a	9.08 ± 4.15^a
实验组	120.54 ± 13.71^b	134.54 ± 14.19^b	13.09 ± 3.71^b
<i>F</i> 值	28.447	21.891	17.501
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与对照组比较, $P<0.05$; b, 与模型组比较, $P<0.05$



注: a, $P<0.05$

B. 定量分析脑组织中 CaMK II α 和 β 表达水平

图 1 3 组小鼠脑组织中 CaMK II α 和 β 表达水平

2.4 每组小鼠神经递质水平分析

与对照组比较,模型组和实验组小鼠前额叶皮层 DA、5-HT 和 NE 水平明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,实验组小鼠前额叶皮层 DA、5-HT 和 NE 水平明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 3 组小鼠治疗后脑组织 DA、5-HT 和 NE 水平比较 (ng/g)

分组	DA	5-HT	NE
对照组	612.33 ± 28.49	782.44 ± 38.57	23.44 ± 5.98
模型组	208.90 ± 23.17 ^a	365.44 ± 40.17 ^a	10.44 ± 4.29 ^a
实验组	487.28 ± 31.55 ^b	531.67 ± 30.12 ^b	13.59 ± 3.77 ^b
<i>F</i> 值	79.325	88.183	48.182
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b;与模型组比较, $P<0.05$

3 讨 论

CaMK II 是一类多功能丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,早期研究发现其在多种心血管器质性疾病及心律失常的发展中起重要作用^[15-16]。随着研究的不断深入,目前研究显示 CaMK II 在精神疾病特别是抑郁症发病过程中扮演重要作用。研究显示过表达 CaMK II β 可以促进小鼠出现抑郁症表型,但是将其第 43 位的赖氨酸突变为精氨酸,则可显著阻断其激酶活性,进而失去促进抑郁发生的作用^[17-18]。采用 CaMK II 的抑制剂处理大鼠抑郁症模型,发现大鼠抑郁症症状明显缓解^[19]。这一结果说明 CaMK II 特别是其亚基 CaMK II β 可能在抑郁症发生过程中发挥重要作用,但是 CaMK II β 如何作用于下游信号达到促进或抑制抑郁症需进一步探讨。

本研究采用腺相关病毒介导 CaMK II β shRNA 靶向注射至小鼠脑组织中,使其将脑组织中 CaMK II β 水平下调,进一步分析其对小鼠抑郁症的影响。重组腺相关病毒是基因传递和表达的一个重要工具,具有广泛的宿主范围及组织感染能力,既能感染分裂细胞,也能转导外源基因进入非分裂细胞,长期表达外源基因而不依赖宿主细胞活跃的分裂能力^[20]。本研究显示采用腺相关病毒介导 CaMK II β shRNA 可明显下调脑组织中 CaMK II β 的表达水平,但是并不影响 CaMK II α 的水平,说明采用腺相关病毒作为载体可实现这一目的。强迫游泳实验和

悬尾实验是评价抗抑郁药作用常用的 2 种动物模型,其作用原理均是通过对动物施以无法逃避的应激刺激造成动物的行为绝望而模拟人类的抑郁症症状^[21]。本研究对小鼠的抑郁症行为分析发现, CaMK II β 在小鼠脑组织中敲降并不影响小鼠自助活动能力,但是其他抑郁症相关的行为(悬尾不动时间、游泳不动时间和糖水消耗等指标)均明显得到改善,说明 CaMK II β 敲降可缓解小鼠抑郁症的症状。早期研究显示 CaMK II β 敲除的小鼠焦虑等行为明显缓解,焦虑是抑郁症的主要临床表现之一^[22-23]。另一研究显示采用 CaMK II 反义寡核苷酸能够通过改善 AD 样大鼠学习记忆能力和减轻 AD 样大鼠海马细胞损伤而发挥神经保护作用^[24]。上述结果与本研究结果一致,说明 CaMK II β 信号的激活促进了抑郁症病情的进展。

此外,本研究结果显示 CaMK II β 敲降可明显提高神经递质 5-HT、NE 和 DA 等物质水平,这一结果与小鼠抑郁症行为指标的改变一致,提示神经递质的水平可能受到上游 CaMK II β 激酶的调控。在激活状态下,神经递质合成通路被抑制,而在抑制状态下,神经递质合成通路处于激活状态,进而改善抑郁症的表型。

本研究仅在脑组织中敲降了 CaMK II β 蛋白的水平,初步探讨了其对抑郁症模型小鼠的治疗作用,需进一步筛选 CaMK II β 特异性抑制剂,靶向移植 CaMK II β 的活性,观察其对抑郁症的治疗效果,为抑郁症的治疗提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Bennett S, Thomas AJ. Depression and dementia: cause, consequence or coincidence[J]. Maturitas, 2014, 79(2): 184-189.
- [2] Liu MY, Zhang LJ, Zhou YX, et al. 5-hydroxytryptamine changes under different pretreatments on rat models of myocardial infarction and/or depression[J]. Chin Med J (Engl), 2017, 130(18): 2219-2225.
- [3] Teo CH, Soga T, Parhar IS. Brain beta-catenin signalling during stress and depression[J]. Neurosignals, 2018, 26(1): 31-42.
- [4] Guo Y, Cai H, Chen L, et al. Quantitative profiling of neurotransmitter abnormalities in the hippocampus of rats treated with lipopolysaccharide: focusing on kynurenine pathway and implications for depres-

- sion[J]. J Neuroimmunol, 2016, 295–296: 41–46.
- [5] Li K, Zhou T, Liao L, et al. β CaMK II in latera habenula mediates core symptoms of depression[J]. Science, 2013, 341(6149): 1016–1020.
- [6] Li X, Fan Y, Xiao S, et al. Decreased platelet 5-hydroxytryptamin (5-HT) levels: a response to antidepressants[J]. J Affect Disord, 2015, 187: 84–90.
- [7] Liu MY, Ren YP, Wei WL, et al. Changes of serotonin(5-HT), 5-HT_{2A} receptor, and 5-HT transporter in the Sprague–Dawley rats of depression, myocardial infarction and myocardial infarction co-exist with depression[J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128(14): 1905–1909.
- [8] López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission; the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(14): 1563–1586.
- [9] Rojas P, Serrano-García N, Medina-Campos ON, et al. Antidepressant-like effect of a *Ginkgo biloba* extract (EGb761) in the mouse forced swimming test; role of oxidative stress[J]. Neurochem Int, 2011, 59(5): 628–636.
- [10] Kulkarni SK, Bhutani MK, Bishnoi M. Antidepressant activity of curcumin; involvement of serotonin and dopamine system[J]. Psychopharmacology (Berl), 2008, 201(3): 435–442.
- [11] Gouet C, Aburto B, Vergara C, et al. On the mechanism of synaptic depression induced by CaMKIIN, an endogenous inhibitor of CaMK II[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49293.
- [12] Smith K. Mental health: a world of depression[J]. Nature, 2014, 515(7526): 181.
- [13] Miles S, Brown G, Corfe A, et al. Time-intensive behavioural activation for depression: a multiple baseline study[J]. J Behav Ther Exp Psychiatry, 2019, 63: 36–47.
- [14] Savitz J. Role of kynurenine metabolism pathway activation in major depressive disorders[J]. Curr Top Behav Neurosci, 2017, 31: 249–267.
- [15] Ferrero P, Said M, Sánchez G, et al. Ca^{2+} /calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca^{2+} -induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release kinetics during beta-adrenergic stimulation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 43(3): 281–291.
- [16] 孔令恒, 陈玉龙, 孙娜, 等. 抑制 CaMKII 减轻线粒体氧化应激可改善离体心脏缺血再灌注损伤[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(2): 181–186.
- [17] Wilkinson ST, Kiselycznyk C, Banasr M, et al. Serum and plasma brain-derived neurotrophic factor and response in a randomized controlled trial of riluzole for treatment resistant depression[J]. J Affect Disord, 2018, 241: 514–518.
- [18] Xiao W, Zhang XB, Wang Z, et al. Effect of manual acupuncture intervention on levels of 5-HTT, 5-HT_{1A}R, NE α 2R of brain tissues in rats with post-stroke depression[J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2016, 41(6): 528–534.
- [19] Li J, Kang S, Fu R, et al. Inhibition of AMPA receptor and CaMK II activity in the lateral habenula reduces depressive-like behavior and alcohol intake in rats[J]. Neuropharmacology, 2017, 126: 108–120.
- [20] Jang JH, Koerber JT, Kim JS, et al. An evolved adeno-associated viral variant enhances gene delivery and gene targeting in neural stem cells[J]. Molecular Therapy, 2011, 19(4): 667–675.
- [21] Cryan JF, Slattery DA. Animal models of mood disorders: recent developments[J]. Curr Opin Psychiatry, 2007, 20(1): 1–7.
- [22] 邹卿, 袁也丰, 孙伟铭, 等. 阿戈美拉汀与 SSRI、SNRI 类药物治疗抑郁症疗效与安全性的 Meta 分析[J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(10): 1288–1292.
- [23] Bachstetter AD, Webster SJ, Tu T, et al. Generation and behavior characterization of CaMKII β knockout mice[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105191.
- [24] 赵小芳, 钱冰, 王静, 等. CaMK II 反义寡核苷酸对阿尔茨海默病样大鼠海马细胞损伤的保护作用及其机制[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2017, 38(1): 13–17.

(责任编辑: 冉明会)