

阿戈美拉汀缓解 APP/PS1 转基因小鼠焦虑及抑郁样行为的机制

李 甜¹, 任俞桦², 高艳萍², 苏 强^{1, 2}

<https://doi.org/10.12307/2025.323>

投稿日期: 2024-02-07

采用日期: 2024-04-17

修回日期: 2024-05-10

在线日期: 2024-05-20

中图分类号:

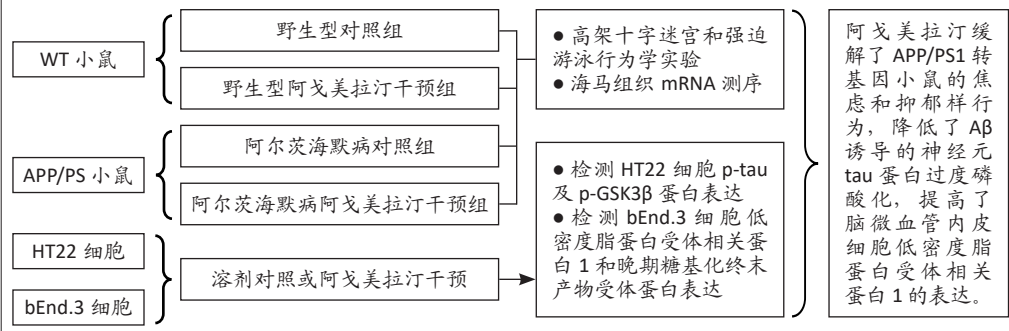
R453.9; R362; R749.1+6

文章编号:

2095-4344(2025)06-01176-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 阿戈美拉汀减轻 APP/PS1 转基因小鼠的焦虑及抑郁样行为



文题释义:

阿尔茨海默病: 是一种不可逆的进行性神经退行性疾病, 是最常见的痴呆类型, 该病脑内病理特征包括β-淀粉样蛋白沉积形成的老年斑、过度磷酸化tau蛋白聚集形成的神经原纤维缠结和大量神经元丧失, 最终导致脑萎缩。阿尔茨海默病的临床表现主要为认知和记忆功能障碍, 同时伴有神经精神症状, 如焦虑和抑郁。

阿戈美拉汀: 是一种褪黑素类似物, 具有激动褪黑素受体(MT1和MT2受体)和拮抗5-HT2C受体的双重效应, 临床上主要用来治疗重度抑郁症, 已有研究证实阿戈美拉汀对改善睡眠和认知也有积极的作用。

摘要

背景: 阿戈美拉汀在临床上用于治疗焦虑、抑郁等相关精神行为异常。前期研究证实, 阿戈美拉汀能够有效缓解阿尔茨海默病模型小鼠的认知行为、海马突触可塑性及脑病理特征, 然而阿戈美拉汀能否改善阿尔茨海默病模型小鼠的焦虑和抑郁样行为仍不清楚。

目的: 探究阿戈美拉汀对APP/PS1(阿尔茨海默病)转基因小鼠焦虑和抑郁样行为的改善效应及分子机制。

方法: ①将18只APP/PS1转基因小鼠随机分为模型对照组($n=9$)、模型干预组($n=9$), 将18只野生型小鼠随机分为对照组($n=9$)、干预组($n=9$), 模型干预组与干预组小鼠腹腔注射阿戈美拉汀10 mg/(kg·d), 连续注射31 d后进行高架十字迷宫、强迫游泳行为学实验与海马组织mRNA测序。②取小鼠海马神经元细胞株(HT22)、脑微血管内皮细胞株(bEnd.3), 分别分4组培养: 空白组不加入任何药物, 药物组加入20 μmol/L阿戈美拉汀, 模型组加入10 μmol/L β-淀粉样蛋白1-42, 实验组加入10 μmol/L β-淀粉样蛋白1-42+20 μmol/L阿戈美拉汀, 培养24 h后, 免疫印迹检测HT22细胞⁵⁴¹⁶p-tau和⁵⁹p-GSK3β的蛋白表达, 免疫印迹检测bEnd.3细胞低密度脂蛋白受体相关蛋白1、糖基化终产物受体的蛋白表达。

结果与结论: ①在高架十字迷宫实验中, 模型对照组小鼠的探索开放臂时间与开放臂进入次数均少于对照组($P < 0.05$), 模型干预组小鼠的探索开放臂时间与开放臂进入次数均多于模型对照组($P < 0.05$); 在强迫游泳测试中, 模型对照组小鼠的不动时间长于对照组($P < 0.05$), 模型干预组小鼠的不动时间短于模型对照组($P < 0.05$); 海马组织mRNA测序显示, 阿戈美拉汀可以增强APP/PS1小鼠海马区低密度脂蛋白受体相关蛋白1的表达。②免疫印迹检测显示, 模型组HT22细胞⁵⁴¹⁶p-tau蛋白表达高于空白组($P < 0.05$), 实验组HT22细胞⁵⁴¹⁶p-tau蛋白表达低于模型组($P < 0.05$), 药物组HT22细胞⁵⁹p-GSK3β蛋白表达高于空白组($P < 0.05$), 实验组HT22细胞⁵⁹p-GSK3β蛋白表达高于模型组($P < 0.05$), 实验组bEnd.3细胞低密度脂蛋白受体相关蛋白1蛋白表达高于模型组($P < 0.05$)。③结果表明, 阿戈美拉汀可通过促进脑内β-淀粉样蛋白和tau的清除来缓解阿尔茨海默病小鼠的焦虑和抑郁样行为。

关键词: 阿尔茨海默病; 阿戈美拉汀; APP/PS1转基因小鼠; 焦虑; 抑郁

缩略语: 低密度脂蛋白受体相关蛋白1: low density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1; 糖原合成酶激酶3β: glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β

Mechanism of agomelatine alleviating anxiety- and depression-like behaviors in APP/PS1 transgenic mice

Li Tian¹, Ren Yuhua², Gao Yanping², Su Qiang^{1, 2}

¹山西医科大学基础医学院生理学系, 细胞生理学教育部重点实验室, 细胞生理学山西省重点实验室, 山西省太原市 030001; ²山西医科大学汾阳学院医学检验系, 山西省汾阳市 032200

第一作者: 李甜, 女, 1991年生, 山西省太原市人, 汉族, 博士, 讲师, 主要从事阿尔茨海默病的防治研究。

通讯作者: 李甜, 讲师, 山西医科大学基础医学院生理学系, 细胞生理学教育部重点实验室, 细胞生理学山西省重点实验室, 山西省太原市 030001

通讯作者: 苏强, 技师, 山西医科大学基础医学院生理学系, 细胞生理学教育部重点实验室, 细胞生理学山西省重点实验室, 山西省太原市 030001; 山西医科大学汾阳学院医学检验系, 山西省汾阳市 032200

<https://orcid.org/0000-0002-1444-832X>(李甜)

基金资助: 国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(82301631), 项目负责人: 李甜; 山西省科技厅山西省基础研究自然科学基金青年项目(20210302124086), 项目负责人: 李甜

引用本文: 李甜, 任俞桦, 高艳萍, 苏强. 阿戈美拉汀缓解 APP/PS1 转基因小鼠焦虑及抑郁样行为的机制 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(6):1176-1182.



¹Department of Physiology, School of Basic Medicine; Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education; Shanxi Key Laboratory of Cell Physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; ²Department of Medical Laboratory, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, Shanxi Province, China

Li Tian, PhD, Lecturer, Department of Physiology, School of Basic Medicine; Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education; Shanxi Key Laboratory of Cell Physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: Li Tian, Department of Physiology, School of Basic Medicine; Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education; Shanxi Key Laboratory of Cell Physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Co-corresponding author: Su Qiang, Technician, Department of Physiology, School of Basic Medicine; Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education; Shanxi Key Laboratory of Cell Physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; Department of Medical Laboratory, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, Shanxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: Agomelatine is a clinically proven treatment for neuropsychiatric symptoms, such as anxiety and depression. Furthermore, our previous study has demonstrated that agomelatine ameliorates cognitive behaviors, hippocampal synaptic plasticity, and brain pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. However, it remains unclear whether agomelatine can improve anxiety and depression-like behaviors in Alzheimer's disease model mice.

OBJECTIVE: To investigate the improving effects of agomelatine on anxiety- and depression-like behaviors in APP/PS1 transgenic mice and its underlying molecular mechanisms.

METHODS: (1) Eighteen APP/PS1 transgenic mice were randomly divided into model control group ($n=9$) and model intervention group ($n=9$). Another wild-type mice were randomized into control group ($n=9$) and intervention group ($n=9$). Model intervention group and intervention group were intraperitoneally injected with 10 mg/kg agomelatine per day for 31 continuous days. Behavioral experiments, including the elevated cross maze and forced swimming tests, and mRNA sequencing of the hippocampus were then performed. (2) Mouse hippocampal neuronal cell lines (HT22) and brain microvascular endothelial cell lines (bEnd.3) were cultured and divided into four groups: blank group without any drug, drug group with 20 $\mu\text{mol/L}$ agomelatine, model group with 10 $\mu\text{mol/L}$ β -amyloid 1–42, and experimental group with 10 $\mu\text{mol/L}$ β -amyloid 1–42+20 $\mu\text{mol/L}$ agomelatine. After 24 hours of incubation, protein expression of $^{3416}\text{p-tau}$ and $^{59}\text{p-GSK3}\beta$ in HT22 cells was detected by immunoblotting, and protein expression of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and glycosylation end-product receptor in bEnd.3 cells was detected by immunoblotting.

RESULTS AND CONCLUSION: In the elevated plus maze test, the time spent in the open arms ($P < 0.01$) and the entries into open arms ($P < 0.05$) in the mice of model control group were evidently lower than those in the control group, whereas those were obviously increased in the model intervention group compared with the model control group ($P < 0.05$). Forced swimming test results showed that the immobile time exhibited a marked increase in the model control group compared with the control group ($P < 0.05$), but it was significantly decreased in the model intervention group compared with the model control group ($P < 0.05$). Hippocampal tissue mRNA sequencing showed that agomelatine enhanced the expression of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the hippocampus of APP/PS1 mice. Western blot analysis revealed that the level of $^{3416}\text{p-tau}$ in HT22 cells was higher in the model group than the blank group ($P < 0.05$), while it was markedly decreased in the experimental group compared with the model group ($P < 0.05$); the level of $^{59}\text{p-GSK3}\beta$ in HT22 cells was higher in the drug group than the blank group ($P < 0.05$) as well as higher in the experimental group than the model group ($P < 0.05$). Moreover, the expression of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in bEnd.3 cells was higher in the experimental group than the model group ($P < 0.05$). To conclude, agomelatine can alleviate anxiety- and depression-like behaviors in Alzheimer's disease mice by promoting the clearance of β -amyloid and phosphorylated tau.

Key words: Alzheimer's disease; agomelatine; APP/PS1 transgenic mice; anxiety; depression

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 82301631 (to LT); the Natural Science Research Youth Program of Shanxi Provincial Department of Science and Technology, No. 20210302124086 (to LT)

How to cite this article: LI T, REN YH, GAO YP, SU Q. Mechanism of agomelatine alleviating anxiety- and depression-like behaviors in APP/PS1 transgenic mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(6):1176-1182.

0 引言 Introduction

阿尔茨海默病是一种原发性、不可逆性的神经退行性疾病，是痴呆的最常见形式之一^[1]。进行性认知功能障碍是阿尔茨海默病的主要临床特征，严重影响到患者的日常生活能力。随着阿尔茨海默病病程的进展，脑内出现大量 β -淀粉样蛋白沉积和神经元细胞内 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结^[2]。尽管阿尔茨海默病的核心症状是记忆和认知功能障碍，但在阿尔茨海默病疾病进程中通常会观察到焦虑和抑郁等神经精神异常症状，尤为在轻度阿尔茨海默病患者中经常伴发焦虑和抑郁^[3]。目前已经对阿尔茨海默病患者的焦虑和抑郁进行了大量研究：一方面，焦虑和抑郁通常出现在阿尔茨海默病早期，被认为是阿尔茨海默病发展的重要危险因素^[4-5]；另一方面，焦虑、抑郁和阿尔茨海默病发生存在共同的生物学基础^[6-7]。因此，临床采用抗焦虑和抗抑郁多因素治疗方案被认为是缓解阿尔茨海默病的重要策略^[8]。

寻求能够协同改善阿尔茨海默病精神行为和认知功能的药物，已成为当前阿尔茨海默病防治研究的热点。前期通过文献回顾性分析发现，临床上主要用于治疗焦虑、

抑郁的阿戈美拉汀具有缓解包括阿尔茨海默病在内神经退行性疾病的潜能，提示阿戈美拉汀具有改善认知功能与精神行为的双重特性^[9]。前期研究已证实，阿戈美拉汀的确能够有效缓解 APP/PS1 转基因小鼠认知行为、海马突触可塑性及脑病理特征^[10]。然而，对于阿戈美拉汀是否能改善阿尔茨海默病小鼠的焦虑和抑郁样行为仍不清楚。为此，在前期研究基础上，此次实验观察阿戈美拉汀对 APP/PS1 转基因小鼠焦虑和抑郁样行为的影响，以及其对 β -淀粉样蛋白诱导海马神经元 tau 蛋白过度磷酸化、脑微血管内皮细胞低密度脂蛋白受体相关蛋白 1(low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1) 表达的影响，为解释阿戈美拉汀改善阿尔茨海默病认知和精神行为提供了新的依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，体外细胞学实验，统计分析进行 one-way ANOVA 或 two-way ANOVA 检验，方差齐性采用 LSD 法进行组间比较，方差不齐采用 Dunnett's T3 法。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 6-12 月在山西医科大学生理学系实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物和实验细胞 8 月龄雄性 APP/PS1 转基因 (阿尔茨海默病) 小鼠 ($n=18$) 及同窝野生型雄性小鼠 ($n=18$), 体质量 25-35 g, 均购自杭州子源实验动物科技有限公司, 许可证号: (SCXK(浙)2019-0004)。动物实验已获得山西医科大学实验动物伦理委员会批准, 审批号为 2021-034 号。

小鼠海马神经元细胞株 (HT22) 由山西医科大学生理学系实验室提供, 小鼠脑微血管内皮细胞株 (bEnd.3) 购于赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司。

1.3.2 实验试剂和仪器 阿戈美拉汀 (Abacm, 美国); 青-链霉素混合液、胰蛋白酶、PBS、RIPA 裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒和 ECL 化学发光检测试剂盒均购自博士德生物工程 (武汉) 有限公司; 山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG 和 β -actin 抗体购自上海生工生物工程股份有限公司; β -淀粉样蛋白 1-42 购于上海强耀生物科技有限公司; 胎牛血清 (Excell Bio, 澳洲); DMEM 高糖培养基 (Hyclone, 美国); 5416 p-tau 抗体、 59 p-糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3) 抗体 (CST, 美国); LRP1 抗体 (Abcam, 美国); 糖基化终产物受体抗体 (Santa, 美国); 高架十字迷宫宫体 (瑞沃德); 强迫游泳桶 (瑞沃德); 动物行为追踪分析系统 (EthoVision XT, Noldus Information Technology); 红外摄像头 (SONY); 高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国); 酶标仪 (Bio Tek, 美国); 电泳仪及转膜仪 (BIO-RAD, 美国); 凝胶成像系统 (Azure Biosystems, 美国); CO₂ 恒温细胞培养箱 (SANYO, 日本)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物实验

实验动物分组: 采用随机数字表法, 将 18 只 APP/PS1 转基因小鼠分为模型对照组 ($n=9$)、模型干预组 ($n=9$), 将 18 只野生型小鼠随机分为对照组 ($n=9$)、干预组 ($n=9$)。模型干预组、干预组小鼠腹腔注射阿戈美拉汀 10 mg/(kg·d)^[10], 模型对照组、对照组小鼠腹腔等量的注射生理盐水, 连续注射给药 31 d。

高架十字迷宫测试: 给药结束后, 将小鼠放入高架十字迷宫中央区域, 面朝开放臂, 通过监测系统记录 5 min 内小鼠的进入开放臂次数和探索开放臂时间, 以评估小鼠焦虑状态^[11]。

强迫游泳测试: 高架十字迷宫测试完成后, 游泳桶中注入温水, 将小鼠置于注水后的游泳桶内, 让其在桶内自由游动 6 min, 开启监测系统记录小鼠的活动状态, 分析后 4 min 内小鼠的不动状态, 计算小鼠的不动时间来

衡量小鼠抑郁水平^[12]。

mRNA 测序 (mRNA-Seq): 行为学实验结束后, 脱颈处死小鼠后取脑, 冰上剥离出海马组织, 进行 mRNA-Seq 实验。该实验在北京诺禾致源生物科技有限公司完成, 使用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行平台的双端测序模式的 RNA-seq。mRNA-Seq 简要步骤: ① RNA 提取与检测: 检测 RNA 的完整性和总量。②文库构建与质检。③上机测序: 采取边合成边测序, 在每一个测序簇延伸互补链时, 每加入一个被荧光标记的 dNTP 就能释放出相对应的荧光, 测序仪通过捕获荧光信号, 通过计算机软件将光信号转化为测序峰, 从而获得待测片段的序列信息。④数据分析: 根据基因表达水平定量分析后获取和分析差异基因表达, 利用 clusterProfiler(3.4.4) 软件实现差异表达基因 GO(Gene Ontology) 富集分析。

1.4.2 细胞实验

细胞培养及干预: 将 HT22 细胞和 bEnd.3 细胞加入含体积分数 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素混合液的 DMEM 培养基 (完全培养基) 中, 置入体积分数 5% CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱中培养。待细胞长满后, 用 PBS 清洗 1 次, 用 0.25% 胰酶消化细胞进行传代。将两种细胞分别接种于 6 孔板内, 加入 2 mL 完全培养基, 细胞密度 (6-8)×10⁵/孔, 分别分 4 组培养: 空白组不加入任何药物, 药物组加入 20 μ mol/L 阿戈美拉汀^[10], 模型组加入 10 μ mol/L β -淀粉样蛋白 1-42^[10], 实验组加入 10 μ mol/L β -淀粉样蛋白 1-42+20 μ mol/L 阿戈美拉汀。

免疫印迹检测: 药物处理 24 h 后收集细胞, 免疫印迹检测 HT22 细胞 5416 p-tau 和 59 p-GSK3 β 的蛋白表达, 免疫印迹检测 bEnd.3 细胞 LRP1、糖基化终产物受体的蛋白表达。向细胞中加入 RIPA 裂解液 (含 1% 磷酸酶抑制剂和 1% 蛋白酶抑制剂) 裂解细胞, 16 000×g 离心 10 min, 取上清作为细胞裂解蛋白样品。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定细胞蛋白样品浓度后, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液并高温变性。采用 12% SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 通过半干转方式将蛋白转至聚偏氟乙烯膜上, 将聚偏氟乙烯膜浸入脱脂奶粉中室温封闭 2 h, 剪取所需目的条带的膜。将膜分别进行一抗 (5416 p-tau、 59 p-GSK3 β 、LRP1、糖基化终产物受体及 β -actin, 稀释比例 1 : 500-1 : 1 000) 和二抗 (山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG, 稀释比例均为 1 : 5 000) 孵育后洗涤, 最后对洗涤后的膜进行 ECL 化学发光显影, 获取目的条带。

1.5 主要观察指标 各组小鼠精神行为及细胞模型 5416 p-tau、 59 p-GSK3 β 、LRP1 和糖基化终产物受体的蛋白表达。

1.6 统计学分析 满足正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行 one-way ANOVA 或 two-way ANOVA 检验, 方差齐性采用 LSD 法进行组间比较, 方差

不齐采用 Dunnett's T3 法。运用 GraphPad Prism 7 软件作图。 $P < 0.05$ 视为差异有显著性意义。该文统计学方法已经山西医科大学基础医学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 动物实验结果

2.1.1 实验动物数量分析 18 只 APP/PS1 转基因小鼠与 18 只野生型小鼠全部进入结果分析。

2.1.2 阿戈美拉汀明显缓解了 APP/PS1 转基因小鼠的焦虑样行为 在高架十字迷宫测试中, 与对照组小鼠相比, 模型对照组小鼠开臂探索时间缩短 $[(26.156 \pm 4.315), (9.333 \pm 2.409) \text{ s}, P < 0.01]$, 提示 9 月龄 APP/PS1 转基因小鼠已伴有焦虑样行为出现; 经阿戈美拉汀治疗后, 模型干预组小鼠开臂探索时间长于模型对照组 $[(24.191 \pm 3.022), (9.333 \pm 2.409) \text{ s}, P < 0.01]$, 见图 1A, 表明阿戈美拉汀有效改善了 APP/PS1 转基因小鼠表现出的焦虑样行为。同时, 模型对照组小鼠开放臂进入次数少于对照组 $(2.333 \pm 0.441, 10.222 \pm 1.188, P < 0.001)$, 模型干预组小鼠开放臂进入次数多于模型对照组 $(7.667 \pm 1.434, 2.333 \pm 0.441, P < 0.01)$, 见图 1B。这些结果表明, APP/PS1 转基因小鼠表现出焦虑样行为, 而阿戈美拉汀有效改善了 APP/PS1 转基因小鼠表现出的焦虑样行为。

2.1.3 阿戈美拉汀有效改善了 APP/PS1 转基因小鼠的抑郁样行为 在强迫游泳测试中, 模型对照组小鼠强迫游泳实验后 4 min 内的不动时间长于对照组 $[(199.222 \pm 9.334), (108.667 \pm 10.603) \text{ s}, P < 0.001]$, 提示 9 月龄 APP/PS1 转基因小鼠已伴有抑郁样行为出现; 模型干预组小鼠强迫游泳实验后 4 min 内的不动时间短于模型对照组 $[(137.444 \pm 20.626), (199.222 \pm 9.334) \text{ s}, P < 0.01]$, 见图 2, 结果表明阿戈美拉汀可以明显减轻 APP/PS1 转基因小鼠的抑郁样行为。

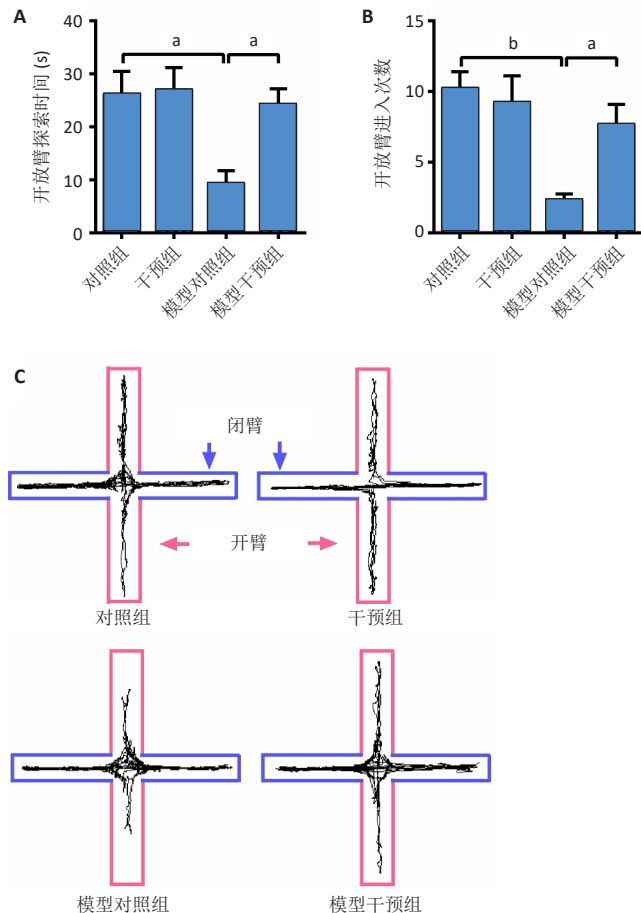
2.2 阿戈美拉汀抑制 β -淀粉样蛋白 1-42 诱导的 HT22 细胞 tau 蛋白过度磷酸化并促进 $^{59}\text{p-GSK3}\beta$ 表达 阿尔茨海默病脑内神经元 tau 过度磷酸化病理与其异常的精神行为表现有关^[13-14]。为此, 此次实验进一步利用培养的 HT22 细胞进行了 $^{5416}\text{p-tau}$ 和 $^{59}\text{p-GSK3}\beta$ 蛋白表达检测, 以检测阿戈美拉汀对 β -淀粉样蛋白 1-42 所致神经元 tau 蛋白磷酸化的影响。如图 3 所示, 模型组 HT22 细胞的 $^{5416}\text{p-tau}$ 蛋白表达高于空白组 ($P < 0.05$), 实验组 HT22 细胞的 $^{5416}\text{p-tau}$ 蛋白表达低于模型组 ($P < 0.05$), 表明阿戈美拉汀处理可有效抑制 β -淀粉样蛋白 1-42 诱导的 HT22 细胞 tau 蛋白过度磷酸化; 药物组 HT22 细胞的 $^{59}\text{p-GSK3}\beta$ 蛋白表达高于空白组 ($P < 0.01$), 实验组 HT22 细胞的 $^{59}\text{p-GSK3}\beta$ 蛋白表达高于模型组 ($P < 0.05$), 提示阿戈美拉汀可能是通过促进 $^{59}\text{p-GSK3}\beta$ 表达转而抑制 β -淀粉样蛋白 1-42 诱导的海马

神经元 tau 蛋白过度磷酸化, 以拮抗 β -淀粉样蛋白所致神经元损伤, 从而缓解神经元 tau 相关的精神行为异常。

2.3 阿戈美拉汀提高 bEnd.3 细胞 LRP1 蛋白的表达 通过对小鼠海马组织 mRNA 测序结果进一步分析 (图 4A), GO 富集分析显示, 阿戈美拉汀可以增强 APP/PS1 转基因小鼠海马区 LRP1 的蛋白表达。LRP1 被认为是分布在血脑屏障上皮细胞上的一种转运受体, 参与 β -淀粉样蛋白和 tau 的向外周转运和清除^[15-16]。相反, 糖基化终产物受体蛋白是表达在血脑屏障上皮细胞上介导外周 β -淀粉样蛋白进入脑内的关键受体^[17]。因此, 为了很好地模拟和检测 APP/PS1 转基因小鼠脑内微血管内皮细胞 LRP1 和糖基化终产物受体的蛋白表达情况, 利用 bEnd.3 细胞和免疫印迹手段检测了 β -淀粉样蛋白 1-42 存在的情况下阿戈美拉汀对 bEnd.3 细胞 LRP1 和糖基化终产物受体蛋白表达的影响。结果表明, β -淀粉样蛋白 1-42 处理可诱导 bEnd.3 细胞 LRP1 出现下调趋势, 同时给予阿戈美拉汀和 β -淀粉样蛋白 1-42 处理的 bEnd.3 细胞 LRP1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 各组 bEnd.3 细胞糖基化终产物受体蛋白表达比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 4B-D。结果表明, 阿戈美拉汀可能在不影响糖基化终产物受体蛋白表达的情况下诱导阿尔茨海默病小鼠脑内微血管内皮细胞 LRP1 蛋白表达升高, 进而促进阿尔茨海默病脑内 β -淀粉样蛋白和 tau 从中枢向外周转运和清除。

3 讨论 Discussion

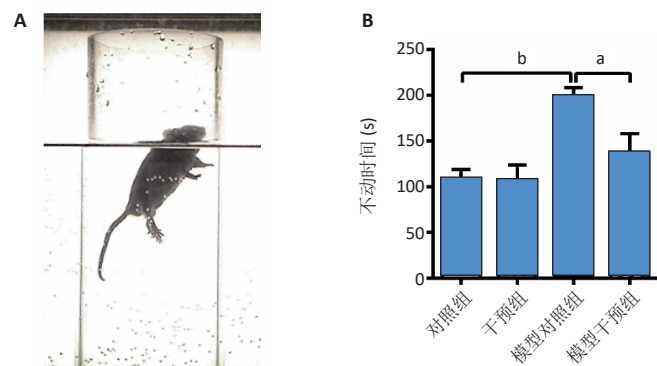
阿尔茨海默病是老年和老年前期最常见的一种痴呆类型, 是一种慢性进行性的神经退行性疾病。据《2019 年世界阿尔茨海默病报告》, 全球大约有 5 000 万痴呆患者, 到 2050 年将达到 1.52 亿^[18], 其中 60%-80% 是阿尔茨海默病型痴呆^[19]。随着中国人口老龄化速度加快, 截至 2019 年, 中国已有 700 多万阿尔茨海默病患者^[20], 其发病率还将持续上升, 不仅加重家庭经济 and 看护负担, 而且对医疗和社会造成重大影响。阿尔茨海默病主要的临床表现是早期出现学习记忆和认知功能下降, 晚期出现痴呆。然而近年研究发现, 神经精神症状是大多数阿尔茨海默病患者的前驱症状或者共病, 越来越被认为是阿尔茨海默病的核心临床症状之一, 其中焦虑和抑郁是阿尔茨海默病尤为常见的神经精神症状^[9]。大量流行病学资料显示, 抑郁症的患病率在轻度阿尔茨海默病中为 14.8%^[21], 在中度阿尔茨海默病中为 40%^[22], 同时轻度和重度阿尔茨海默病患者伴随出现焦虑的比例为 37%, 中度阿尔茨海默病患者伴随出现焦虑的为 38%^[23]。但是目前对于阿尔茨海默病的研究主要集中于认知损伤方面, 对于阿尔茨海默病患者伴随出现的神经精神症状尚未引起足够重视, 也缺乏有效干预手段。



图注：模型对照组 APP/PS1 转基因（阿尔茨海默病）小鼠腹腔注射生理盐水、模型干预组 APP/PS1 转基因（阿尔茨海默病）小鼠腹腔注射阿戈美拉汀，对照组野生型小鼠腹腔注射生理盐水，干预组野生型小鼠腹腔注射阿戈美拉汀。图 A 为各组小鼠在高架十字迷宫开放臂中探索时间的统计柱状图；B 为各组小鼠在高架十字迷宫中开放臂进入次数的统计柱状图；C 为在高架十字迷宫测试中各组小鼠的代表性运动轨迹图。^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.001$ 。

图 1 | 各组小鼠高架十字迷宫实验结果

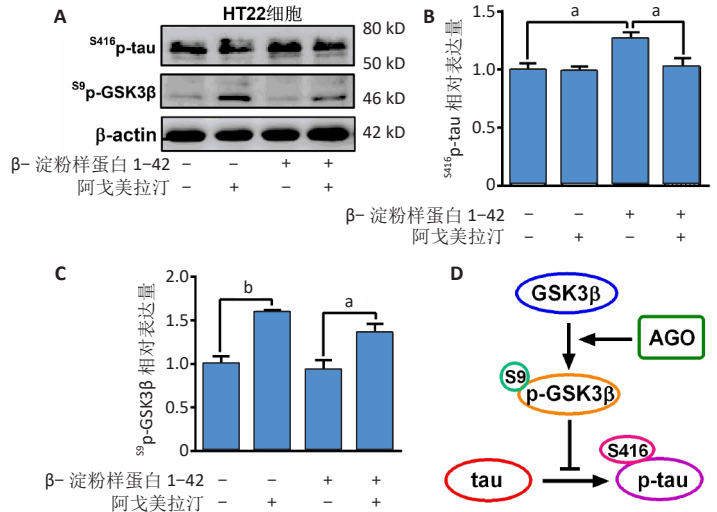
Figure 1 | Results of the elevated cross maze test of mice in each group



图注：模型对照组 APP/PS1 转基因（阿尔茨海默病）小鼠腹腔注射生理盐水，模型干预组 APP/PS1 转基因（阿尔茨海默病）小鼠腹腔注射阿戈美拉汀，对照组野生型小鼠腹腔注射生理盐水，干预组野生型小鼠腹腔注射阿戈美拉汀。图 A 为小鼠在强迫游泳测试中的代表性实验记录图；B 为强迫游泳测试后 4 min 内各组小鼠不动时间的统计柱状图。^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.001$ 。

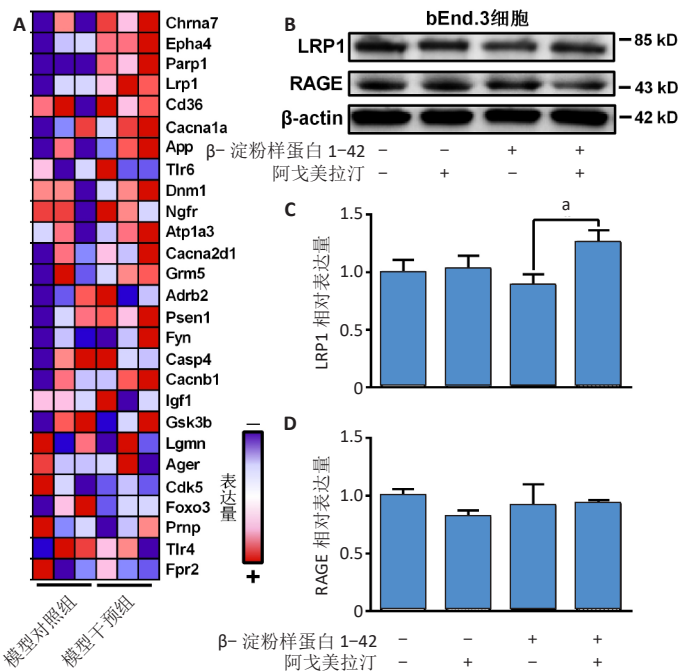
图 2 | 各组小鼠强迫游泳测试结果

Figure 2 | Results of the forced swimming test of mice in each group



图注：空白组不加入任何药物，药物组加入阿戈美拉汀，模型组加入 β-淀粉样蛋白 1-42，实验组加入 β-淀粉样蛋白 1-42+ 阿戈美拉汀。图 A 为各处理组细胞中 S416-p-tau 及 S9-p-GSK3β 蛋白的代表性原始免疫印迹条带图；B、C 分别为各处理组细胞中 S416-p-tau 及 S9-p-GSK3β 蛋白表达水平的统计柱状图，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；D 为阿戈美拉汀 (AGO) 抑制 β-淀粉样蛋白 1-42 诱导的海马神经元 tau 蛋白过度磷酸化的机制图，其中 GSK-3β 为糖原合成酶激酶 3β，↓ 代表激活，⊥ 代表抑制。

图 3 | 各组小鼠海马神经元 HT22 细胞 S416-p-tau 及 S9-p-GSK3β 的蛋白表达
Figure 3 | Expression of S416-p-tau and S9-p-GSK3β in murine hippocampal neuronal HT22 cells in each group



图注：LRP1 为低密度脂蛋白受体相关蛋白 1，RAGE 为糖基化终产物受体。图 A 为经 AGO 治疗 APP/PS1 小鼠海马组织中与 Aβ 相关的基因 GO 分析热图，模型对照组 APP/PS1 转基因（阿尔茨海默病）小鼠腹腔注射生理盐水，模型干预组 APP/PS1 转基因（阿尔茨海默病）小鼠腹腔注射阿戈美拉汀，GO 富集分析显示，阿戈美拉汀可以增强 APP/PS1 转基因小鼠海马区 LRP1 的表达；B 为各组 bEnd.3 细胞 LRP1 和 RAGE 蛋白的代表性原始免疫印迹条带图；C、D 分别为各组 bEnd.3 细胞 LRP1 和 RAGE 蛋白表达水平的统计柱状图，^a $P < 0.05$ 。

图 4 | 各组小鼠及脑微血管内皮细胞 (bEnd.3) 低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 及糖基化终产物受体的蛋白表达

Figure 4 | Expression of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and glycosylation end-product receptor protein expression in murine brain microvascular endothelial bEnd.3 cells in each group

药物重定位已成为当前药物研究的新趋势,缓解了药物研发工作量大、周期长的困境。老药新用是一种药物研发的新策略,可以有效缩短研发时间、降低研发的风险、节约研发成本^[24]。阿戈美拉汀被誉为是精神疾病类的一个“重磅炸弹”级的药物,既是首个褪黑素能抗抑郁、焦虑药物,也是5-羟色胺2C受体拮抗剂^[25]。临床研究已表明,阿戈美拉汀具有抗抑郁、抗焦虑、调整睡眠节律及调节生物钟作用,同时其不良反应少^[26-28]。前期通过文献回顾性分析发现,阿戈美拉汀具有改善认知的潜能^[9],并且阿戈美拉汀可以有效缓解阿尔茨海默病小鼠认知行为和脑病理特征^[10]。

阿戈美拉汀同时具有激动褪黑素受体(褪黑素1受体和褪黑素2受体)和拮抗5-羟色胺2C受体的双重效应^[29-30],这两种作用的有效结合使得阿戈美拉汀在抗抑郁、抗焦虑的治疗中显示出特有的药理作用。通过拮抗5-羟色胺2C受体,阿戈美拉汀可调控多巴胺和去甲肾上腺素的分泌,提高多巴胺和去甲肾上腺素的活性,进而改善抑郁、焦虑等神经精神症状的临床表现^[31-32]。神经精神症状与记忆、认知功能密切相关,而记忆和认知损害是多数神经退行性疾病和精神疾病的常见临床症状,因此,证明阿戈美拉汀能否改善阿尔茨海默病的学习记忆以及认知活动的同时缓解其焦虑、抑郁显得十分重要。APP/PS1转基因小鼠是国际公认的阿尔茨海默病动物模型,能够表现出随月龄而增加的 β -淀粉样蛋白病理特征和与临床阿尔茨海默病患者相似的认知障碍和精神行为异常。前期研究已经证实,阿戈美拉汀可以改善APP/PS1转基因小鼠学习记忆行为及 β -淀粉样蛋白病理特征,但缺失了抑郁药阿戈美拉汀本身对阿尔茨海默病小鼠精神症状的探究。为了进一步补充和完善阿戈美拉汀改善阿尔茨海默病精神行为的效应,此次实验继续采用行为学手段观察了阿戈美拉汀对APP/PS1转基因小鼠焦虑和抑郁样行为的改善效应,并探讨其可能的作用机制,以期为阿尔茨海默病防治提供新的思路。

焦虑作为阿尔茨海默病的一个危险因素已被广泛关注^[33]。此次实验高架十字迷宫测试结果发现,给予阿戈美拉汀治疗后,APP/PS1转基因小鼠的开臂探索时间明显增加,同时进入开放臂次数也明显升高,表明阿戈美拉汀可以明显改善APP/PS1转基因小鼠的焦虑样行为。同样,抑郁症也是阿尔茨海默病进一步发展的重要危险因素^[34],阿尔茨海默病患者通常存在抑郁样行为^[35]。接着,通过强迫游泳实验观察了阿戈美拉汀对APP/PS1小鼠抑郁样行为的影响,结果发现APP/PS1小鼠的确出现抑郁样行为表现,而阿戈美拉汀可以有效减轻APP/PS1小鼠的抑郁样行为,可见阿戈美拉汀在阿尔茨海默病动物模型实验中同样展现出抗抑郁、焦虑等神经精神症状的效应。

研究显示,阿尔茨海默病患者脑内tau升高与其抑郁的发生密切相关^[36],而且tau转基因小鼠可以表现出明显的抑郁样行为^[37]。于是,此次实验进一步检测了阿戈美拉汀对 β -淀粉样蛋白1-42所致HT22海马神经元tau蛋白过度磷酸化的影响,结果证实阿戈美拉汀可以促进⁵⁹p-GSK3 β 蛋白的表达,抑制 β -淀粉样蛋白1-42诱导的tau蛋白过度磷酸化,提示阿戈美拉汀可能拮抗阿尔茨海默病神经元tau蛋白过度磷酸化损伤,从而缓解tau相关的精神和认知行为异常。

前期研究已证实阿戈美拉汀可减轻阿尔茨海默病小鼠脑内 β -淀粉样蛋白病理^[10],提示阿戈美拉汀可能具有缓解阿尔茨海默病脑内 β -淀粉样蛋白和tau病理的双重效应,然而其机制并不清楚。为此,此次实验通过mRNA测序结果进一步分析,发现阿戈美拉汀治疗后APP/PS1小鼠海马区与 β -淀粉样蛋白和tau转运和清除密切相关的低密度脂蛋白受体相关蛋白1基因表达普遍升高。低密度脂蛋白受体相关蛋白1是分布在血脑屏障上皮细胞上的一种 β -淀粉样蛋白和tau的转运受体,与 β -淀粉样蛋白和tau从中枢向外周转运和清除密切相关^[15-16]。相反,糖基化终产物受体蛋白是表达在血脑屏障上皮细胞上介导外周 β -淀粉样蛋白进入脑内的关键受体^[17]。因此,此次实验利用脑内微血管内皮细胞(bEnd.3)和免疫印迹手段检测,在 β -淀粉样蛋白1-42存在的情况下阿戈美拉汀对bEnd.3细胞低密度脂蛋白受体相关蛋白1和糖基化终产物受体蛋白表达水平的影响,结果证实阿戈美拉汀干预后 β -淀粉样蛋白1-42处理的bEnd.3细胞低密度脂蛋白受体相关蛋白1蛋白表达水平升高,而糖基化终产物受体蛋白表达水平无明显改变。这一结果提示阿戈美拉汀可能在不影响糖基化终产物受体蛋白表达(即不影响 β -淀粉样蛋白和tau从外周向中枢转运)的情况下,提高阿尔茨海默病小鼠脑内皮细胞低密度脂蛋白受体相关蛋白1的蛋白表达,进而实现阿尔茨海默病脑内 β -淀粉样蛋白和tau从中枢向外周的净转运和清除。

综合以上结果分析,阿戈美拉汀对APP/PS1小鼠焦虑和抑郁样行为的改善效应也可能是其缓解阿尔茨海默病认知行为和疾病进程的另一重要因素。结合此次实验发现,阿戈美拉汀可能促进阿尔茨海默病小鼠脑内 β -淀粉样蛋白和tau的清除来改善阿尔茨海默病病理特征,提示阿戈美拉汀对阿尔茨海默病小鼠焦虑和抑郁样行为的缓解效应也可能归功于病理表现的改善。当然,这些仍有待进一步探究。

总之,目前有关阿戈美拉汀影响认知和精神行为的研究均提示,阿戈美拉汀以其独特药理作用为治疗阿尔茨海默病提供了新的思路,可能成为治疗阿尔茨海默病认知和精神行为功能损害的一种新策略。

作者贡献: 李甜和任俞桦负责实验实施、实验数据收集和撰写论文初稿,任俞桦和苏强负责实验数据分析处理,苏强和李甜负责实验设计,高艳萍和李甜负责论文审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- CACABELOS R. What have we learnt from past failures in Alzheimer's disease drug discovery? *Expert Opin Drug Discov.* 2022;17(4):309-323.
- BUSCHE MA, HYMAN BT. Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2020;23(10):1183-1193.
- CHEN Y, DANG M, ZHANG Z. Brain mechanisms underlying neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: a systematic review of symptom-general and -specific lesion patterns. *Mol Neurodegener.* 2021;16(1):38.
- GRACIA-GARCIA P, BUENO-NOTIVOL J, LIPNICKI DM, et al. Clinically significant anxiety as a risk factor for Alzheimer's disease: Results from a 10-year follow-up community study. *Int J Methods Psychiatr Res.* 2023;32(3):e1934.
- BOTTO R, CALLAI N, CERPELLI A, et al. Anxiety and depression in Alzheimer's disease: a systematic review of pathogenetic mechanisms and relation to cognitive decline. *Neurol Sci.* 2022;43(7):4107-4124.
- HASAN SMN, CLARKE C, STRAND T, et al. Putative pathological mechanisms of late-life depression and Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2023;1813:148423.
- PATEL P, MASURKAR AV. The relationship of anxiety with Alzheimer's disease: a narrative review. *Curr Alzheimer Res.* 2021;18(5):359-371.
- CACABELOS R, CARRIL JC, CORZO L, et al. Pharmacogenetics of anxiety and depression in Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics.* 2023;24(1):27-57.
- SU Q, LI T, LIU GW, et al. Agomelatine: a potential novel approach for the treatment of memory disorder in neurodegenerative disease. *Neural Regen Res.* 2023;18(4):727-733.
- LI T, SU Q, ZHANG Z, et al. Ube2c-inhibition alleviated amyloid pathology and memory deficits in APP/PS1 mice model of AD. *Prog Neurobiol.* 2022;215:102298.
- KRAEUTER AK, GUEST PC, SARANYAI Z. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:69-74.
- YANKELEVITCH-YAHAV R, FRANKO M, HULY A, et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp.* 2015(97):52587.
- KRELL-ROESCH J, RAKUSA M, SYRJANEN JA, et al. Association between CSF biomarkers of Alzheimer's disease and neuropsychiatric symptoms: Mayo Clinic Study of Aging. *Alzheimers Dement.* 2023;19(10):4498-4506.
- LEYDER E, SURESH P, JUN R, et al. Depression-related phenotypes at early stages of A β and tau accumulation in inducible Alzheimer's disease mouse model: Task-oriented and concept-driven interpretations. *Behav Brain Res.* 2023;438:114187.
- HUANG Z, LIN HWK, ZHANG Q, et al. Targeting Alzheimer's disease: the critical crosstalk between the liver and brain. *Nutrients.* 2022;14(20):4298.
- RAUCH JN, LUNA G, GUZMAN E, et al. LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. *Nature.* 2020;580(7803):381-385.
- DEANE R, DU YAN S, SUBMAMARYAN RK, et al. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003;9(7):907-913.
- PASSERI E, ELKHOURY K, MORSINK M, et al. Alzheimer's disease: treatment strategies and their limitations. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22):13954.
- LIVINGSTON G, HUNTLEY J, SOMMERLAD A, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet.* 2020;396(10248):413-446.
- JIA L, DU Y, CHU L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study. *Lancet Public Health.* 2020;5(12):e661-e671.
- ASMER MS, KIRKHAM J, NEWTON H, et al. Meta-analysis of the prevalence of major depressive disorder among older adults with dementia. *J Clin Psychiatry.* 2018;79(5):17r11772.
- CHEN P, GUARINO PD, DYSKEN MW, et al. Neuropsychiatric symptoms and caregiver burden in individuals with Alzheimer's disease: the TEAM-AD VA cooperative study. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2018;31(4):177-185.
- LEUNG DKY, CHAN WC, SPECTOR A, et al. Prevalence of depression, anxiety, and apathy symptoms across dementia stages: A systematic review and meta-analysis. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2021;36(9):1330-1344.
- JOURDAN JP, BUREAU R, ROCHAIS C, et al. Drug repositioning: a brief overview. *J Pharm Pharmacol.* 2020;72(9):1145-1151.
- SAVINO R, POLITO AN, MARSALA G, et al. Agomelatine: a potential multitarget compound for neurodevelopmental disorders. *Brain Sci.* 2023;13(5):734.
- MILLAN MJ. Agomelatine for the treatment of generalized anxiety disorder: focus on its distinctive mechanism of action. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2022;12:20451253221105128.
- YU Y, CHEN Y, MA L, et al. Efficacy of agomelatine with cognitive behavioral therapy for delayed sleep-wake phase disorder in young adults: A randomized controlled study. *Behav Sleep Med.* 2023;21(5):529-539.
- CHEN Y, LI J, LIAO M, et al. Efficacy and safety of agomelatine versus SSRIs/SNRIs for post-stroke depression: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int Clin Psychopharmacol.* 2024;39(3):163-173.
- ARMSTRONG SM, MCNULTY OM, GUARDIOLA-LEMAITRE B, et al. Successful use of S20098 and melatonin in an animal model of delayed sleep-phase syndrome (DSPS). *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;46(1):45-49.
- YOUS S, ANDRIEUX J, HOWELL HE, et al. Novel naphthalenic ligands with high affinity for the melatonin receptor. *J Med Chem.* 1992;35(8):1484-1486.
- MILLAN MJ, GOBERT A, LEJEUNE F, et al. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(3):954-964.
- STAHL SM. Mechanism of action of agomelatine: a novel antidepressant exploiting synergy between monoaminergic and melatonergic properties. *CNS Spectr.* 2014;19(3):207-212.
- MENDEZ MF. The relationship between anxiety and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis Rep.* 2021;5(1):171-177.
- DAFSARI FS, JESSEN F. Depression-an underrecognized target for prevention of dementia in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2020;10(1):160.
- SAIZ-VAZQUEZ O, GRACIA-GARCIA P, UBILLOS-LANDA S, et al. Depression as a risk factor for Alzheimer's disease: a systematic review of longitudinal meta-analyses. *J Clin Med.* 2021;10(9):1809.
- BABULAL GM, ROE CM, STOUT SH, et al. Depression is associated with tau and not amyloid positron emission tomography in cognitively normal adults. *J Alzheimers Dis.* 2020;74(4):1045-1055.
- EGASHIRA N, IWASAKI K, TAKASHIMA A, et al. Altered depression-related behavior and neurochemical changes in serotonergic neurons in mutant R406W human tau transgenic mice. *Brain Res.* 2005;1059(1):7-12.

(责任编辑: GW, ZN, WL, ZLJ)