

网络出版时间: 2023-09-19 16:21:47 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1413.022>

# 急性睡眠剥夺调控 AMPK-自噬信号致小鼠抑郁样行为机制

杜宏梅, 崔杨凤, 陈明

**摘要** 目的 研究急性睡眠剥夺(SD)对小鼠焦虑和抑郁样行为的影响,并探讨其可能的分子机制。方法 随机将33只雄性8周龄C57BL/6小鼠分为环境对照(EC)组和SD组。采用旷场实验和十字高架实验评估小鼠自主行为和焦虑行为;采用强迫游泳实验和悬尾实验检测小鼠抑郁行为。Western blot法检测小鼠海马区神经炎症蛋白和自噬相关蛋白水平的表达。结果 与EC组比较,在旷场实验中SD组小鼠总运动距离显著增加( $P < 0.01$ ),穿线次数和中央区域时间未表现出显著差异;在强迫游泳实验中SD组小鼠不动时间显著增加( $P < 0.01$ ),但悬尾实验和十字高架实验中各指标均无显著差异。Western blot结果显示:与EC组比较,SD组小鼠海马区NLRP1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18和自噬蛋白p62水平显著升高,Atg5、Atg7水平显著降低,AMPK磷酸化水平也显著降低。结论 SD可能通过抑制小鼠海马区AMPK-自噬信号,上调神经炎症水平,导致小鼠出现抑郁样行为。  
**关键词** 急性睡眠剥夺;抑郁样行为;自噬;神经炎症;p-AMPK

中图分类号 R 749.42

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1737-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.022

睡眠障碍是我国乃至全世界一个重要的健康问题,与年龄增长有密切关系,我国预估有超过3亿人

2023-04-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81801064)

作者单位:安徽医科大学基础医学院药理学教研室,合肥 230032

作者简介:杜宏梅,女,硕士研究生;

陈明,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: chenming@ahmu.edu.cn

存在睡眠障碍。长期睡眠不足会增加老年人患心脑血管疾病、抑郁症、糖尿病和肥胖的风险,损害认知功能、记忆功能和免疫系统<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2-3]</sup>发现,长期失眠会引发焦虑不安、抑郁等精神异常,而焦虑、抑郁又反过来进一步加重睡眠紊乱,形成恶性循环。抑郁症是现代最为常见的精神疾病之一,抑郁症患者临床上主要表现为情绪持续低落,并伴有失眠、食欲减退,部分患者出现焦虑、运动性激越及幻觉,甚至产生自杀行为。虽然睡眠障碍和情绪障碍之间关系密切,但具体机制尚不清楚,目前也缺乏有效的防治措施。该研究通过建立小鼠急性睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)模型,研究其与小鼠焦虑和抑郁样行为之间的联系,探讨其可能的机制,并寻找相应靶点,从而为临床上睡眠障碍导致的抑郁症治疗提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 33只SPF级别雄性C57BL/6小鼠,体质量(20±1)g,购自于斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。

**1.1.2 试剂** Western blot所使用的一抗NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白(NOD-like receptor thermal protein structural domain-associated protein, NLRP1)、NLRP3购自美国Abcam公司,白细胞介素(interleukin, IL)-18、IL-1 $\beta$ 、泛素结合蛋白(ubiquitin-

14, and the trend of HC group was similar to that of H group. ③ The lung tissue structure of H group was irregular, RAC value of which decreased significantly after 7 days of peak, and the difference between H group and HC group was statistically significant ( $P < 0.01$ ). ④ The MDA value of H group increased on day 7 and gradually decreased on day 14, while the SOD activity decreased obviously on day 7, and there were significant differences in MDA and SOD activity between H group and HC group at 14 days and 21 days ( $P < 0.05$ ). ⑤ The expression of Nrf2 mRNA in H group was significantly enhanced at day 7 and stabilized at day 14, and there were statistically significant differences between H and HC groups at day 3, day 7 and day 14 ( $P < 0.05$ ). ⑥ The relative expression level of Nrf2 mRNA was positively correlated with MDA and negatively correlated with SOD. **Conclusion** Caffeine can regulate oxidative stress response through Nrf2 pathway and alleviate lung oxidative stress injury induced by hyperoxia in neonatal rats with BPD.

**Key words** bronchopulmonary dysplasia; caffeine; hyperoxia-induced lung injury; oxidative stress

binding protein p62)、凋亡相关微粒蛋白(apoptosis-associated particulate protein, ASC) 购自于沈阳万类生物科技有限公司, 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、腺苷酸活化蛋白激酶(protein levels of adenylyate-activated protein kinase, AMPK)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(phosphorylated adenylyate-activated protein kinase p-AMPK)、 $\beta$ -actin 购自美国 Affinity 公司, 自噬相关蛋白(autophagy-associated protein, Atg) 5、Atg7 购自美国 CST 公司, 配用比例均按照说明书, 使用的二抗山羊抗兔购自中杉金桥生物技术有限公司, 使用比例为 1:10 000, BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

**1.1.3 主要仪器** 涡旋仪 Vortex Mixer XW-80A 购于海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 电泳系统 WIX-EP300 购于韦克斯科技(北京)有限公司, 高速冷冻离心机 HI-16KR 购于湖南可成仪器设备有限公司, 水平摇床 NSP-300 购于泰州诺米医疗科技有限公司, 自动高灵敏度化学发光成像系统购于美国 Bio-Rad 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组与模型建立** 雄性 8 周龄 C57BL/6 小鼠放置于清洁级动物房常规饲养 1 周, 随机分为环境对照(environment control, EC)组( $n=16$ )和 SD 组( $n=17$ )。参考 Misrani et al<sup>[4]</sup>的造模方法, 提前 1 d 将小鼠放置于跑步机适应 1 h, 适应条件为开 5 min, 关 5 min, 运行速度为 2 cm/s。造模时间是早上 9:00 至第 2 天早上 9:00。造模时 SD 组运行 3 s, 停止 12 s, 造模 24 h, 运动速度 2 cm/s, EC 组造模 24 h 的运行条件为开 15 min, 关 60 min, 运动速度 2 cm/s。造模结束后的 2 d 内进行行为学检测, 行为结束后取材。当动物在跑步机上时, 食物和水均可获得, 正常生存可以保证。

**1.2.2 旷场实验** 观察小鼠运动能力和焦虑行为的实验, 实验仪器分为两个部分: 一个敞口箱(96 cm $\times$ 96 cm $\times$ 50 cm)和一个自动数据收集系统。首先将敞口箱设置为 9 个大小同样的方格子, 实验时将小鼠放在敞口箱的中间区域, 实验对象自由运动 2 min 适应环境, 然后记录实验对象运动 3 min 内的总运动距离、穿线次数、在中间区域静止的时间。每只动物测试过后, 用 10% 乙醇清理箱子底部, 并用干净抹布仔细擦干, 以消除箱子里气味, 并在实验过程中全程保持安静避免干扰。

**1.2.3 十字高架实验** 十字高架实验是用来评定动物焦虑程度的行为学实验。实验仪器由一组垂直

交叉的开臂(30 cm $\times$ 5 cm $\times$ 15 cm)和一组闭臂(30 cm $\times$ 5 cm $\times$ 15 cm)和一个中心区域(5 cm $\times$ 5 cm)组成。首先把小鼠面对开臂放于中心位置, 让实验对象自由运动 5 min, 计算小鼠进入开臂的时间和次数。每只动物测试过后, 用 10% 乙醇清理箱子底部动物粪便和尿液, 在实验的过程中全程保持安静。

**1.2.4 悬尾实验** 利用悬尾实验评判小鼠的抑郁状况的程度。实验时使用胶带把小鼠尾尖大约 1 cm 处粘在吸铁器上, 然后将小鼠的腹部对准摄像机镜头, 实验的测试时间为 6 min, 通过实时记录和观察小鼠实验后 4 min 内的累积不动时间, 记下各组小鼠的耳标以方便后续数据分析。在实验全过程保证环境安静, 尽可能排除人为因素对实验结果的影响。

**1.2.5 强迫游泳实验** 用 25 °C 的自来水填充直径 10 cm、高度 25 cm 的透明圆柱体, 将每只鼠放入装水的圆筒容器中 6 min, 前 2 min 适应环境, 记录后 4 min 实验时间内的累积不动时间, 记下各组小鼠的耳标以方便后续数据分析。每只鼠测试后更换干净的水, 从而排除水中残留物的影响。

**1.2.6 Western blot 法检测小鼠大脑组织中自噬和炎症水平** 行为学试验结束后, 按 0.2 ml/10 g 三溴乙醇腹腔注射小鼠, 待其麻醉后, 用颈椎脱臼处死小鼠后, 取其脑组织, 在冰上操作, 分离小鼠海马。通过研磨裂解离心提取上清液, 根据购买的 BCA 试剂盒说明书进行操作提取海马中总蛋白浓度(EC 组:  $n=6$ ; SD 组:  $n=6$ )。然后变性蛋白上样电泳(70 V、45 min; 120 V、1 h), 转膜(200 mA、40 min; 250 mA、90 min), 牛奶(TBST 配制 5% 脱脂牛奶)封闭 1 h 或更长时间, 孵相应一抗 4 °C 摇床过夜, TBST 洗膜再孵对应的二抗, 再用 TBST 洗膜最后显影, 利用相应的显影系统及对应软件对显影条带进行分析得出数据。所有条带均以  $\beta$ -actin 为内参。

**1.3 统计学处理** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 所得的定量资料均采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学相关分析, 两者之间的比较采用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 急性 SD 实验对小鼠运动能力和焦虑样行为的影响** 旷场实验结果显示: 与 EC 组比较, SD 组小鼠在中央区域时间、穿线次数均无显著差异( $t=0.3693$ 、 $1.362$ , 均  $P > 0.05$ ), 总移动距离显著增加( $t=3.593$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 1。十字高架实验结果

显示:与 EC 组比较,SD 组小鼠在开壁中的访问时间和进入次数均无显著差异( $t = 1.483, 1.872$ , 均  $P > 0.05$ ),见图 2。上述结果表明,急性 SD 后,小鼠基本运动能力增加,但是对小鼠焦虑样行为无明显影响。

**2.2 急性 SD 实验对小鼠抑郁样行为的影响** 与 EC 组比较,SD 组小鼠在强迫游泳实验中的不动时间显著增加( $t = 2.857, P < 0.01$ ),但在悬尾实验中的不动时间未显著增加( $t = 0.738, P > 0.05$ ),提示急性 SD 会导致小鼠出现一定程度的抑郁行为。见图 3。

**2.3 急性 SD 实验对小鼠海马区神经炎症的影响** 采用 Western blot 检测两组小鼠海马区炎症小体

及炎症因子水平。与 EC 组比较,SD 组小鼠海马区 NLRP1 炎症小体( $P < 0.05$ )、TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ )、IL-1 $\beta$  ( $P < 0.01$ ) 及 IL-18 ( $P < 0.05$ ) 等炎症因子蛋白表达水平显著增加,而 NLRP3 炎症小体含量和 ASC 等蛋白水平无明显变化,表明急性 SD 可能通过调节 NLRP1 炎症小体信号导致小鼠神经炎症。见图 4。

**2.4 急性 SD 实验对小鼠海马区自噬水平的影响** 通过 Western blot 检测两组小鼠海马区自噬相关蛋白水平。与 EC 组比较,SD 组小鼠海马区组织中 p62 水平显著升高( $P < 0.001$ ),Atg7 ( $P < 0.001$ )、Atg5 ( $P < 0.05$ ) 水平明显降低,表明急性 SD 能够降低小鼠海马区自噬水平。见图 5。

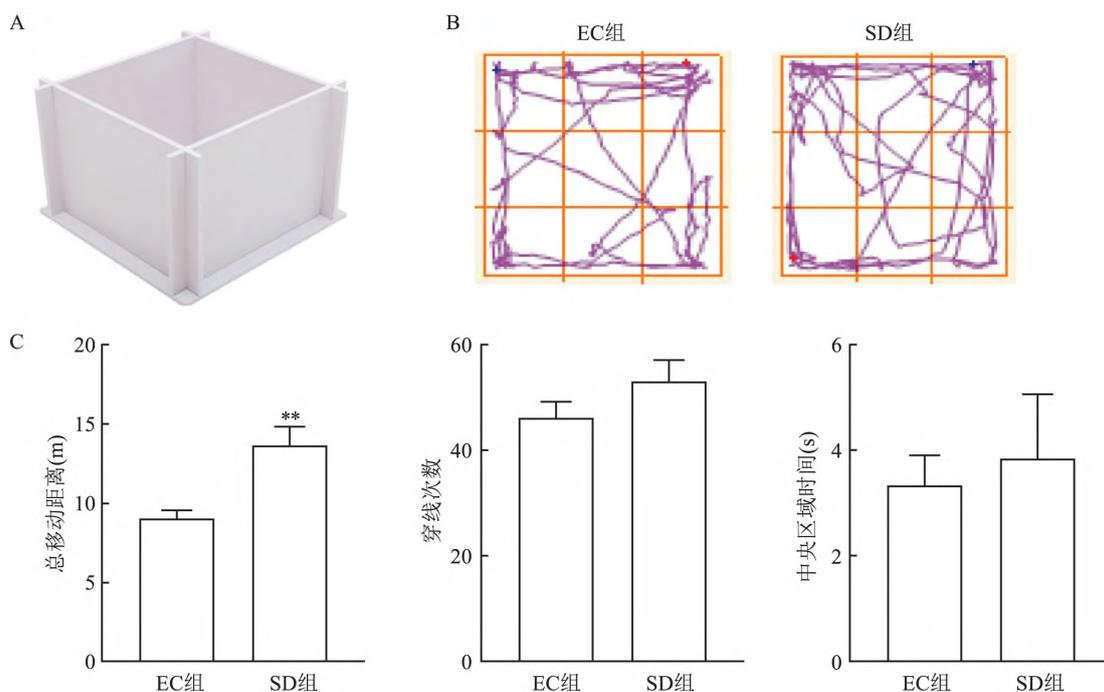


图1 旷场实验中各组小鼠的探索能力

A: 旷场实验示意图; B: 旷场实验的小鼠运动轨迹图; C: 旷场实验结果统计分析; 与 EC 组比较: \*\*  $P < 0.01$

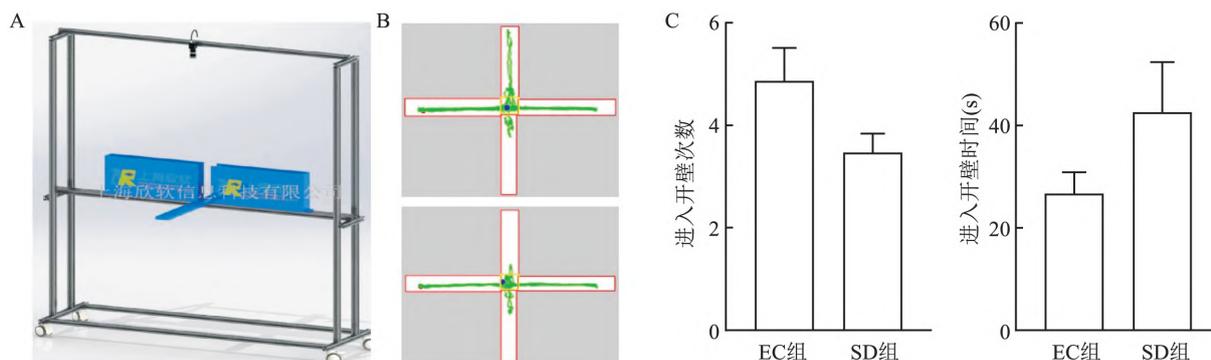


图2 十字高架实验中各组小鼠的焦虑行为

A: 十字高架实验示意图; B: 十字高架实验小鼠运动轨迹图; C: 十字高架实验结果统计分析

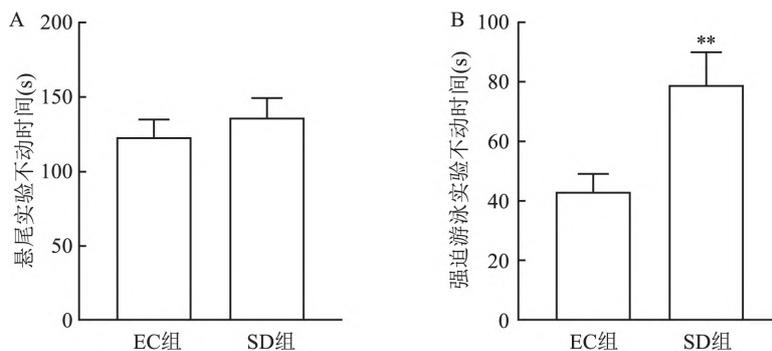


图3 悬尾实验和强迫游泳实验中各组小鼠的抑郁样行为

A: 悬尾实验不动时间; B: 强迫游泳实验不动时间; 与 EC 组比较: \*\*  $P < 0.01$

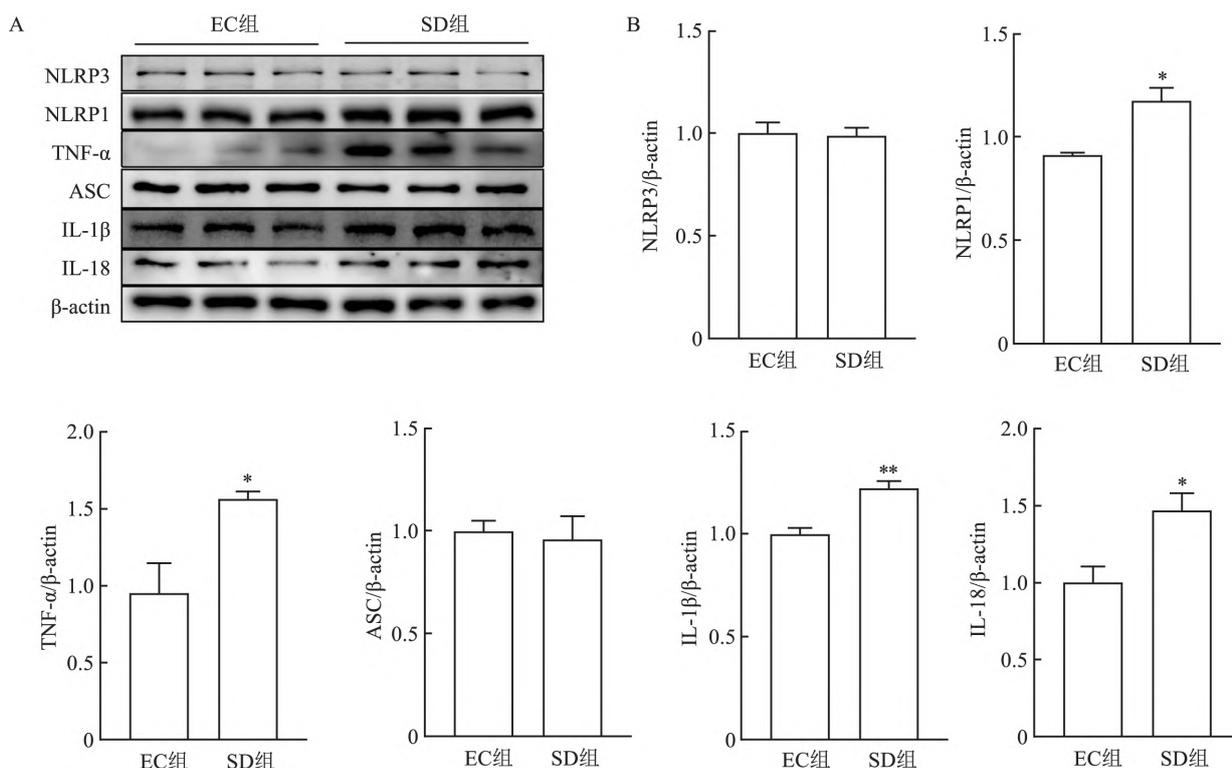


图4 急性SD实验对小鼠海马区炎症水平的影响

A: 小鼠海马区的 Western blot 蛋白条带; B: 小鼠海马区的 NLRP3/β-actin、NLRP1/β-actin、TNF-α/β-actin、ASC/β-actin、IL-1β/β-actin 和 IL-18/β-actin 水平; 与 EC 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

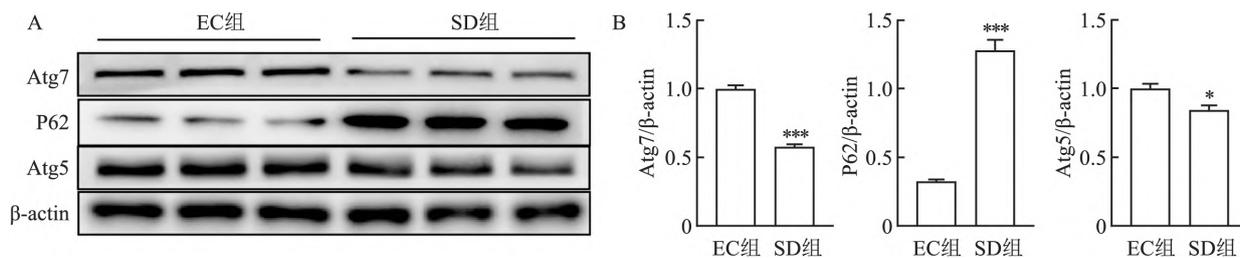


图5 急性SD实验对小鼠海马区自噬水平的影响

A: 小鼠海马区的 Western blot 蛋白条带; B: 小鼠海马区的 Atg7/β-actin、p62/β-actin、Atg5/β-actin 水平; 与 EC 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$

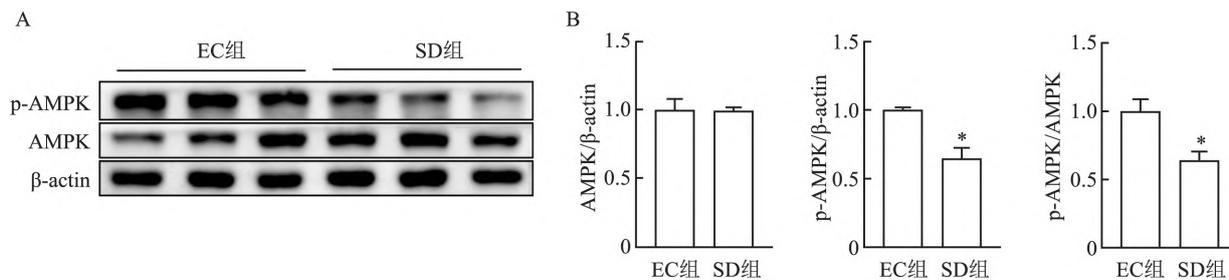


图6 急性SD实验对小鼠海马区AMPK和p-AMPK水平的影响

A: 小鼠海马区的Western blot蛋白条带; B: 小鼠海马区的AMPK/β-actin、p-AMPK/β-actin、p-AMPK/AMPK水平; 与EC组比较: \*  $P < 0.05$

**2.5 急性SD实验对小鼠海马区AMPK和p-AMPK水平的影响** 通过Western blot检测两组小鼠海马区AMPK和p-AMPK蛋白水平。与EC组比较SD组小鼠海马区p-AMPK表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), AMPK水平无显著差异, 提示急性SD可能通过降低AMPK磷酸化, 进而降低自噬功能。见图6。

### 3 讨论

流行病学和临床研究<sup>[5-6]</sup>表明, 全世界有超过3亿人患有抑郁症, 大多数的失眠者还伴随着情绪障碍, 主要表现为抑郁或焦虑。本研究在急性SD造模后发现小鼠强迫游泳实验不动时间明显增加, 而十字高架及旷场实验等检测焦虑行为的指标并无显著差异, 提示急性SD可能会导致小鼠出现一定程度的抑郁样行为, 但是并不会导致焦虑样的行为发生。

炎症因子异常增多所致免疫激活是抑郁症的重要发病机制之一。本研究结果表明, 在24h急性SD后, 小鼠海马区炎症小体NLRP1以及TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18等炎症因子水平明显增加, 提示急性SD可能通过激活而NLRP1炎症小体, 从而造成神经炎症发生。炎症小体NLRP1主要表达在神经元上, 而NLRP3主要表达在胶质细胞上<sup>[7-8]</sup>。本研究结果显示NLRP3表达水平并无显著改变, 提示急性SD可能通过影响神经元炎症进而产生致抑郁样行为的作用。自噬功能损伤也是抑郁症发病重要假说之一, 自噬可能成为睡眠障碍和抑郁症的有效治疗靶点, 增加小鼠自噬功能可显著改善小鼠抑郁样行为发生<sup>[9-10]</sup>。自噬作为真核生物细胞遭遇各种应激压力时发生的一种基本应答方式, 参与细胞的多种生命活动, 使细胞在各种应激条件下维持一种动态平衡状态, 主要负责清除受损的细胞器、有缺陷的蛋

白质和其他细胞成分<sup>[11]</sup>。自噬平衡是细胞存活的必要条件, 只有达到平衡才可以维持细胞的正常代谢和功能, 从而使机体能够正常运行, 为了对抗炎症因子异常增多, 自噬会产生基本的应答反应以维持机体的动态平衡<sup>[12]</sup>。本研究结果表明, 急性SD显著降低小鼠海马区Atg7、Atg5等自噬相关蛋白表达水平, 进而导致小鼠神经炎症发生。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白和AMPK是调控自噬的信号通路中最经典的2个信号通路<sup>[13]</sup>。AMPK是维持细胞能量稳态的重要物质, 可以通过很多途径激活细胞自噬, 促进葡萄糖和脂肪酸利用的代谢, 并介导许多重要组织和器官中有益细胞的生存; AMPK的活性主要由AMP与ATP和ADP与ATP比率的增加发出信号, 可对ATP低水平做出反应; 在其激活后, AMPK通过促进产生ATP的分解代谢途径同时抑制能量消耗过程来恢复能量稳态<sup>[14-15]</sup>。本研究中发现SD组小鼠海马区AMPK磷酸化水平显著降低, 提示急性SD可能通过抑制AMPK磷酸化而抑制自噬, 进而导致了海马区发生神经炎症。本研究结果还表明, SD组小鼠海马区NLRP1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18和自噬蛋白p62水平显著升高, Atg5、Atg7水平显著降低, AMPK磷酸化水平也显著降低, 小鼠表现轻度抑郁行为。

综上所述, 急性SD可能通过损伤AMPK-自噬信号, 诱导神经炎症, 从而导致小鼠出现抑郁样行为, 因此靶向调控AMPK-自噬信号可能为临床睡眠障碍致抑郁患者的治疗提供相应靶点。

### 参考文献

- [1] Kitamura T, Miyazaki S, Sulaiman H B, et al. Insomnia and obstructive sleep apnea as potential triggers of dementia: is personalized prediction and prevention of the pathological cascade applicable? [J]. EPMA J 2020, 11(3): 355-65.
- [2] 潘 锋. 创新研究提升睡眠障碍临床诊疗水平——访中国科

- 学院院士、北京大学第六医院院长陆林教授[J]. 中国医药导报 2020, 17(13): 1-3.
- [3] Chellappa S L, Aeschbach D. Sleep and anxiety: from mechanisms to interventions[J]. *Sleep Med Rev* 2022, 61: 101583.
- [4] Misrani A, Tabassum S, Chen X, et al. Differential effects of citalopram on sleep-deprivation-induced depressive-like behavior and memory impairments in mice[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2019, 88: 102-11.
- [5] Li Y I, Starr L R, Wray-Lake L. Insomnia mediates the longitudinal relationship between anxiety and depressive symptoms in a nationally representative sample of adolescents[J]. *Depress Anxiety*, 2018, 35(6): 583-91.
- [6] Chen R, Cui Z, Capitaio L, et al. Precision biomarkers for mood disorders based on brain imaging[J]. *BMJ* 2020, 371: m3618.
- [7] Panda C, Voelz C, Habib P, et al. Aggregated Tau-PHF6 (VQIVYK) potentiates NLRP3 inflammasome expression and autophagy in human microglial cells[J]. *Cells* 2021, 10(7): 1652.
- [8] Yap J K Y, Pickard B S, Chan E W L, et al. The Role of Neuronal NLRP1 inflammasome in Alzheimer's disease: bringing neurons into the neuroinflammation game[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(11): 7741-53.
- [9] Tripathi A, Scaini G, Barichello T, et al. Mitophagy in depression: Pathophysiology and treatment targets[J]. *Mitochondrion*, 2021, 61: 1-10.
- [10] Zhang K, Wang F, Zhai M, et al. Hyperactive neuronal autophagy depletes BDNF and impairs adult hippocampal neurogenesis in a corticosterone-induced mouse model of depression[J]. *Theranostics* 2023, 13(3): 1059-75.
- [11] Kardideh B, Samimi Z, Norooznezhad F, et al. Autophagy, cancer and angiogenesis: where is the link? [J]. *Cell & Bioscience*, 2019, 9(1): 1-10.
- [12] Byrnes K, Blessinger S, Bailey N T, et al. Therapeutic regulation of autophagy in hepatic metabolism[J]. *Acta Pharm Sin B* 2022, 12(1): 33-49.
- [13] 曹慧, 徐立, 宋文婷. 脑缺血后神经元自噬与凋亡机制及中药干预作用的研究进展[J]. *中药新药与临床药理* 2021, 32(3): 441-8.
- [14] Steinberg G R, Hardie D G. New insights into activation and function of the AMPK[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2023, 24(4): 255-72.
- [15] Brown K K. AMPK CA (R) Sts a new light on amino acid sensing [J]. *EMBO J* 2021, 40(21): e109575.

## Acute sleep deprivation leads to depression-like behavior by modulating AMPK-autophagy signaling

Du Hongmei, Cui Yangfeng, Chen Ming

(Dept of Pharmacology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** This work mainly studied the effects of acute sleep deprivation (SD) on anxiety and depression behavior in mice and explored possible molecular mechanisms. **Methods** 33 male 8-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into environment control (EC) group and a SD group. The open field test and elevated plus maze test were used to evaluate their spontaneous and anxiety behavior, while the forced swimming test and tail suspension test were used to detect depression behavior in mice. The expression of neuroinflammatory proteins and the levels of autophagy-related proteins were detected by Western blot method. **Results** Behavioral results showed that comparing to the EC group, the total distance traveled by mice in the SD group significantly increased in the open field test ( $P < 0.01$ ), while the number of crossings and time spent in the central area did not show significant differences. Results from the forced swimming test showed that immobility time significantly increased in the SD group mice ( $P < 0.01$ ), but there were no significant differences in tail suspension and elevated plus maze test. Western blot results showed that comparing to the EC group, the levels of NLRP1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, and autophagy protein p62 in the hippocampus of the SD group mice significantly increased, while the levels of Atg5, Atg7 decreased significantly, and the phosphorylation level of AMPK also decreased significantly. **Conclusion** SD may induce depression-like behavior in mice by inhibiting the AMPK-autophagy signaling pathway in the hippocampus and upregulating neuroinflammatory levels.

**Key words** acute sleep deprivation; depression-like behavior; autophagy; neuroinflammation; p-AMPK