

网络出版时间: 2024-12-26 14:56:06 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1135.012>

多巴胺/糖原合成酶激酶-3 信号在急性睡眠剥夺致小鼠躁狂样行为中作用及机制

崔杨凤 陈 明

(安徽医科大学基础医学院药理学教研室, 合肥 230032)

摘要 目的 探究急性睡眠剥夺对小鼠躁狂样行为的影响及其可能的分子机制。方法 73 只雄性 8 周龄 C57BL/6 小鼠随机分为 2 组: 对照组(ctrl 组, $n=36$) 和急性睡眠剥夺组(SD 组, $n=37$)。在急性睡眠剥夺后, 运用旷场实验和高架十字实验评估小鼠的运动及探索能力; 运用悬尾实验评估小鼠的抑郁样行为。c-fos 染色观察脑组织中的神经元激活情况, ELISA 试剂盒检测海马(HIP) 和内侧前额叶皮层(mPFC) 中的神经递质多巴胺(DA) 水平, Western blot 法检测 HIP 和 mPFC 中糖原合成酶激酶-3(GSK-3 β)、磷酸化 GSK-3 β (p-GSK-3 β) 水平。结果 与 ctrl 组相比, SD 组小鼠在旷场实验中总运动距离和在中央区域的时间均增加($P<0.05$) , 高架十字实验中在开臂时间($P<0.0001$)、开臂距离($P<0.01$) 增加, 悬尾实验中静止不动时间减少($P<0.01$)。SD 组 HIP 和 mPFC 中神经元 c-fos 表达升高($P<0.01$) , DA 水平在 HIP($P<0.05$) 及 mPFC($P<0.01$) 中升高。Western blot 结果显示, 与 ctrl 组相比, SD 组小鼠在 mPFC 和 HIP 中 p-GSK-3 β /GSK-3 β 均降低($P<0.0001$, $P<0.05$) ; 而 p-GSK-3 β 蛋白水平在 mPFC 中降低($P<0.05$) , 在 HIP 中变化差异无统计学意义。结论 急性睡眠剥夺可能在小鼠 mPFC 中通过 DA 调控 GSK-3 水平, 抑制了 GSK-3 的丝氨酸磷酸化, 最终导致小鼠出现躁狂样行为。

关键词 急性睡眠剥夺; 躁狂样行为; 多巴胺; 糖原合成酶激酶-3; 磷酸化糖原合成酶激酶-3 β ; 神经元

中图分类号 R 749.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0087-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.012

睡眠障碍是现代生活中的一个常见问题, 患有睡眠障碍的个体更容易表现出创伤后应激障碍^[1]。小鼠的睡眠剥夺模型会诱发躁狂发作的某些方面, 如多动、性欲亢进和攻击行为^[2], 是一种比较理想的躁狂动物模型。躁狂是一种情绪、睡眠、行为和知觉的发作性紊乱。其特征是情绪膨胀、兴高采烈和/或易怒、精力充沛、浮夸、缺乏睡眠、思维受损和判断力差, 此类发作的复发已被确定为双相情感障碍(bipolar disorder, BD) 的诊断标志^[3]。

在过去的二十年里, 糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 作为一种激酶被广泛应用于人类多种疾病, 包括 II 型糖尿病、心血管疾病、慢性炎症、双相情感障碍、阿尔茨海默病和癌症, 此外, 过表达 GSK-3 β 的小鼠表现出躁狂症的迹象^[4]。多巴胺(dopamine, DA) 是一种单胺能神经递质, 与多种脑部疾病有关, 研究发现, 啮齿动物中 DA 和血清素介导的几种行为的调节与 GSK-3 活性

有关^[5]。虽然睡眠障碍和情绪障碍有关, 但具体机制尚不清楚。该研究通过建立小鼠睡眠剥夺模型, 检测小鼠可能出现的行为障碍, 探究其可能的发病机制, 并寻找相应的治疗靶点, 从而为临床上睡眠障碍导致的躁狂症状的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 8 周龄雄性野生型 C57BL/6 小鼠, 质量(23 ± 1) g, 每笼 5 只, 小鼠暴露在 12 h/12 h 的光/暗循环中, 可自由地获取水和食物。动物购自于斯贝福(北京) 生物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK(京) 2019-0010, 所有实验方案经安徽医科大学实验动物伦理委员会批准, 动物伦理号: LLSC20220902。

1.1.2 试剂 Western blot 所使用的一抗有: GSK-3 β (货号: WL03683)、磷酸化 GSK-3 β (p-GSK-3 β , 货号: WL01456) 均购自沈阳万类生物科技有限公司; β -actin 购自美国 Affinity 公司; BCA 蛋白浓度检测试剂盒(货号: BL521A)、ECL Western blot 发光液(货号: BL523B) 均购自北京兰杰柯科技有限公司; 蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(货号: P1045)、Western

2024-11-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82371541)

作者简介: 崔杨凤 硕士研究生;

陈 明 男, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: chenming@ahmu.edu.cn

blot 一抗稀释液(货号: P0023A) 均购自上海碧云天生物科技有限公司; 山羊抗兔 HRP 二抗(货号: ZB-2301) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 锂(Lithium, Li, 货号: L9650) 购自 Sigma(上海) 贸易有限公司; 兔抗 c-fos 一抗(货号: ab190289) 购自美国 Abcam 公司; ELISA 检测试剂盒小鼠 DA 试剂盒、小鼠去甲肾上腺素(noradrenaline, NE) 试剂盒、小鼠 5 羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT) (货号: MM-0626M2、MM-0627M2、MM-0443M2) 试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司。

1.1.3 实验仪器 全自动冷冻研磨仪(型号: JXF-STPRP-CL, 上海净信实业发展有限公司)、台式高速冷冻离心机(型号: H1-16KR, 湖南可成仪器设备有限公司)、多功能酶标仪(型号: Super Max3100, 上海闪谱生物科技有限公司)、电泳系统(型号: WIX-EP300, 韦克斯科技有限公司)、水平摇床(型号: NSP300, 泰州诺米医疗科技有限公司)、涡旋仪(型号: Vortex Mixer XW-80A, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)、智能组织切片成像分析系统(型号: Panoramic MIDI, 北京博益伟业仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型建立 雄性 8 周龄 C57BL/6 小鼠置清洁级动物房中常规饲养, 适应 1 周后随机分为 ctrl 组($n=36$) 和 SD 组($n=37$)。SD 组睡眠剥夺连续 72 h, 从 9:00 a.m. 开始造模, ctrl 组暴露在相同的条件下, 笼中无水。参照 Valvassori et al^[2] 的睡眠剥夺造模方法, 并根据实验的需要对造模方法进行调整。本研究采用改良多平台水环境法(MMPM) 建立小鼠的急性睡眠剥夺模型, 它是一种快速眼动睡眠剥夺, 在自制的睡眠剥夺笼(500 cm × 390 cm × 140 cm) 中放置等间距的 12 个高 5 cm、直径 3 cm 的圆形平台, 平台向中间凹陷, 使小鼠可以站在平台上自由移动并可以获取水和食物。睡眠剥夺箱内注有水, 水位低于平台约 1 cm, 水温保持恒定。当小鼠进入睡眠时, 由于骨骼肌的松弛使小鼠掉入水中而惊醒, 又跳上平台, 达成睡眠剥夺的目的。造模结束后进行旷场实验(open field test, OFT)、高架十字实验(elevated plus maze, EPM)、悬尾实验(tail suspension test, TST)、Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM) 等行为的检测, 行为学检测采用不同批次的小鼠进行实验。见图 1。

药物治疗组: 雄性 8 周龄 C57BL/6 小鼠置清洁级动物房中常规饲养, 适应 4 d 后随机分为 4 组(每

组 24 只): ctrl + sal 组、ctrl + Li 组、SD + sal 组、SD + Li 组。小鼠给予 0.9% 氯化钠溶液(10 ml/kg, 腹腔注射, qd) 或锂(47.5 mg/kg, 腹腔注射, qd) 治疗 7 d, 药物治疗 4 d 后进行急性睡眠剥夺方案, 治疗结束后检测小鼠的行为学指标。

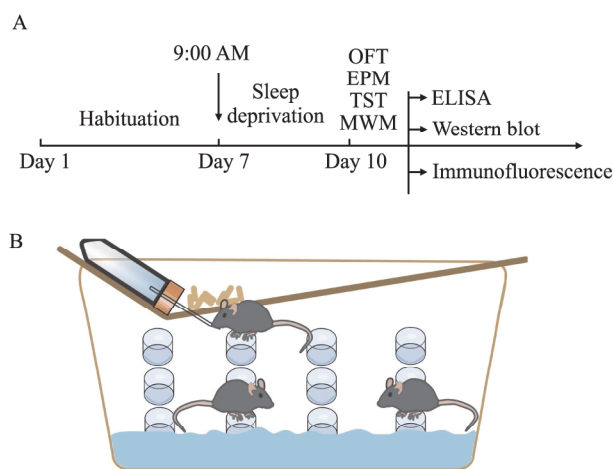


图 1 小鼠急性睡眠剥夺模型建立

Fig. 1 Establishment of acute sleep deprivation model in mice

A: Experimental timeline; B: Schematic diagram of acute sleep deprivation model.

1.2.2 OFT 采用 OFT 评估动物的运动能力。该设备是由一个 96 cm × 96 cm × 50 cm 的白色敞口箱组成, 敞口箱的底部划分为 9 个面积相等的格子, 实验开始时, 将小鼠放入中间格子适应 2 min, 然后分别观察每只测试小鼠在 5 min 和 60 min 内的运动活动, 并记录每只测试小鼠的总运动距离、速度、穿线次数、进入中央区域的时间、距离和进入中央区域的次数。每只小鼠测试结束后, 用 10% 的乙醇清理箱底消除气味, 实验过程中应保持安静避免干扰。

1.2.3 EPM 采用 EPM 评估动物的探索能力。该设备是由相互垂直的一对开臂(30 cm × 5 cm × 15 cm) 和一对闭臂(30 cm × 5 cm × 15 cm) 以及一个中心区域(5 cm × 5 cm) 组成, 实验开始时, 将小鼠面向开臂放置于中心区域, 观察每只测试小鼠在 5 min 内的运动轨迹, 并记录每只测试小鼠进入开臂的时间、距离和次数。每只小鼠测试结束后, 用 10% 的乙醇清理设备消除气味, 实验过程中应保持安静避免干扰。

1.2.4 TST 采用 TST 评估动物的抑郁状态。实验开始前用胶带将距小鼠尾尖约 1 cm 处固定在吸铁器上并垂直悬挂, 然后将小鼠腹部面对摄像机镜头, 实验测试时间为 6 min, 由监控系统拍摄后 4 min 内测试小鼠的运动状态, 并记录累计不动时间。

1.2.5 MWM 实验 采用 MWM 实验检测动物的空间学习记忆能力。该设备为一个直径 120 cm, 高 40 cm 的圆形水池, 将水池平均分为 4 个象限, 设定 4 个入水点, 每个象限对应的池壁上有不同颜色和形状的标志物以便小鼠找到隐藏平台, 将隐藏平台置于一个象限内, 并低于水面 1 cm 的位置, 水温保持在 22 ~ 26 °C, 其中水被钛白粉或无毒染料染色。前 4 d 为训练阶段, 第 5 天为测试阶段。实验开始时, 将小鼠面向池壁分别从 4 个入水点放入池中并记录小鼠的逃离潜伏期, 如果小鼠在 60 s 内未能找到平台, 则引导它游到平台停留 15 s, 并记录潜伏期为 60 s, 最后一天撤去平台记录小鼠运动过程。每只小鼠测试结束后用干毛巾擦干, 且两次下水的时间间隔不少于 20 min。

1.2.6 免疫荧光染色 (immunofluorescence, IF)

c-fos 是神经元活性的分子标志物, 为了确定急性睡眠剥夺后小鼠脑组织的激活区域, 使用免疫荧光检测 c-fos 的表达水平。小鼠睡眠剥夺结束后 2 h 内用异氟烷诱导麻醉, 取脑组织, 置于 4 % 多聚甲醛中固定 48 h, 脱水, 石蜡包埋, 4 μ m 切片, 常规脱蜡脱水, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 免疫荧光封闭液室温封闭 1 h, 甩掉封闭液, 滴加兔抗 c-fos 一抗 (1 : 200), 4 °C 过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 用山羊抗兔绿色荧光二抗 (1 : 200) 室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 细胞核用 4', 6'-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6'-diamino-2-phenylindole, DAPI) 染色 10 min, PBS 洗涤 3 次, 滴加抗荧光淬灭剂, 封片。图像采用智能组织切片成像分析系统扫描分析。

1.2.7 神经递质水平检测 使用 ELISA 试剂盒检测脑组织中海马 (Hippocampus, HIP) 和内侧前额叶皮层 (medial prefrontal cortex, mPFC) 的 DA、NE、5-HT, 试验方案按试剂盒中的说明书进行操作。

1.2.8 Western blot 检测 行为学实验结束后, 用三溴乙醇 (20 ml/kg) 腹腔注射小鼠, 待其麻醉后, 眼球取血, 颈椎脱臼处死小鼠, 取出脑组织, 剥离 HIP 和 mPFC, 整个过程在冰上操作。组织在 RIPA 强裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的冷变性缓冲液中匀浆破碎, 组织匀浆在 12 000 r/min 和 4 °C 下离心 15 min 收集上清液, 总蛋白使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定。将上清液与裂解液、5 $\times$ loading 缓冲液混合, 煮沸 10 min。蛋白样品在 10 % 十二烷基硫酸钠 (SDS) 聚丙烯酰胺凝胶 (80 V、40 min, 120 V、1 h) 上运行, 然后在冰浴下用 250 mA 恒流转移到 PVDF 膜上 1 h。在含 5 % 脱脂牛奶的 PBS-吐温缓冲

液 (0.01 mol/L PBS 和 0.05 % 吐温-20) 中, 室温封闭 2 h, 4 °C 下用一抗: 兔抗 GSK-3 β (1 : 1 000)、兔抗 p-GSK-3 β (1 : 1 000) 和兔抗 β -actin (1 : 5 000) 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 用兔抗辣根过氧化物酶 (HRP) (1 : 10 000) 室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 使用 ECL Western blot 发光液进行显色, 使用化学发光成像系统记录免疫反应条带, 用 Image J 软件分析。

1.3 统计学处理 所有数据均以均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示, 采用 GraphPad Prism 9.0 软件对定量资料进行统计学分析, 对于两组间的比较, 采用两组独立样本 *t* 检验比较两组间的均值, 对于两组以上的比较, 采用 One-way ANOVA 进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为测试

2.1.1 急性睡眠剥夺对小鼠运动、探索能力和抑郁样行为的影响 在 OFT 中, 与 ctrl 组相比, SD 组的小鼠在 5 min 内的总移动距离、穿线次数、速度、在中央区域的移动距离以及进入中央区域的次数差异均无统计学意义 (图 2A ~ E、G), 但在中央区域的时间升高 ($t = 2.746$, $P < 0.05$, 图 2F)。而在 60 min 内的 OFT 中, SD 组的小鼠总运动距离升高 ($t = 2.485$, $P < 0.05$, 图 2H、I), 并且速度 ($t = 2.844$ 、 2.410 、 2.129) 和穿线次数 ($t = 2.212$ 、 2.084 、 2.853) 在 40 ~ 60 min 内升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 2J、K)。在 EPM 中, 与 ctrl 组相比, SD 组小鼠在开臂中的访问时间和距离增加 ($t = 6.600$ 、 3.308 , $P < 0.0001$, $P < 0.01$, 图 3A ~ C), 而进入开臂的次数差异无统计学意义 ($t = 0.835$, $P > 0.05$, 图 3D)。在 TST 中, 与 ctrl 组相比, SD 组的小鼠静止不动时间减少 ($t = 3.851$, $P < 0.01$, 图 3E)。上述实验结果表明, 急性睡眠剥夺 72 h 后, 小鼠的运动能力增加、探索行为增加, 并未出现抑郁样行为。

2.1.2 急性睡眠剥夺对小鼠学习记忆能力的影响

在 MWM 实验中, 各组在训练阶段前 4 d 的轨迹图 (图 4A)、平均潜伏期 ($t = 1.060$ 、 0.297 、 2.118 , $P > 0.05$, 图 4B) 和测试阶段第 5 天的逃离潜伏期、目标象限时间百分比、穿线次数差异均无统计学意义 ($t = 1.386$ 、 0.078 、 1.505 , $P > 0.05$, 图 4C ~ E), 而与 ctrl 组相比, SD 组小鼠的速度升高 ($t = 2.530$, $P < 0.01$, 图 4F)。上述实验结果表明, 急性睡眠剥夺 72 h 后, 小鼠的学习记忆能力无显著变化。

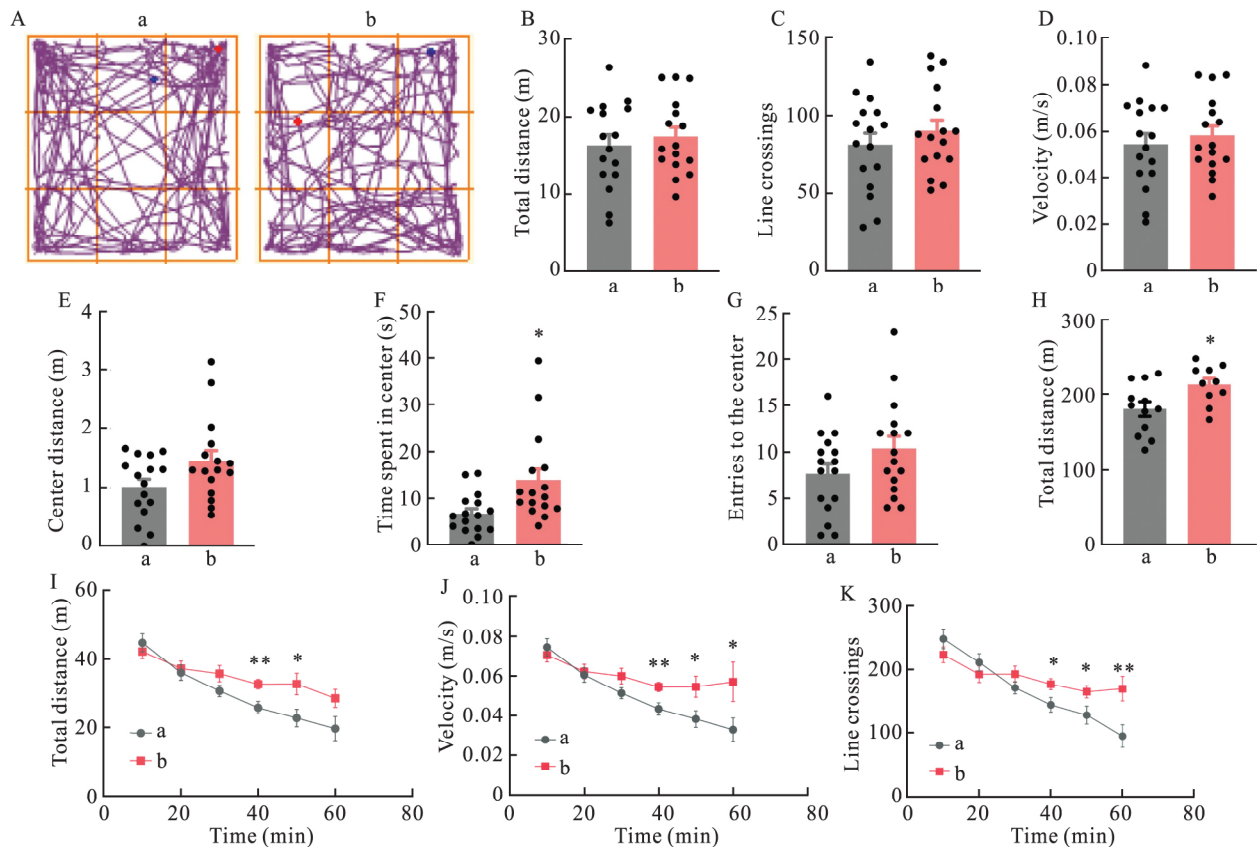


图2 OFT 中小鼠的运动能力

Fig.2 Motor ability of mice in OFT

A: Movement trajectories of ctrl group and SD group mice within 5 minutes in OFT; B - G: The total distance, line crossings, velocity, center distance, time spent in center and entries to the center of ctrl group and SD group mice within 5 minutes in OFT ($n = 16$); H: The cumulative total distance of ctrl group and SD group mice within 60 minutes in OFT; I - K: The total distance, velocity and line crossings of ctrl group ($n = 12$) and SD group ($n = 11$) mice within 60 minutes in OFT; a: ctrl group; b: SD group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ctrl group.

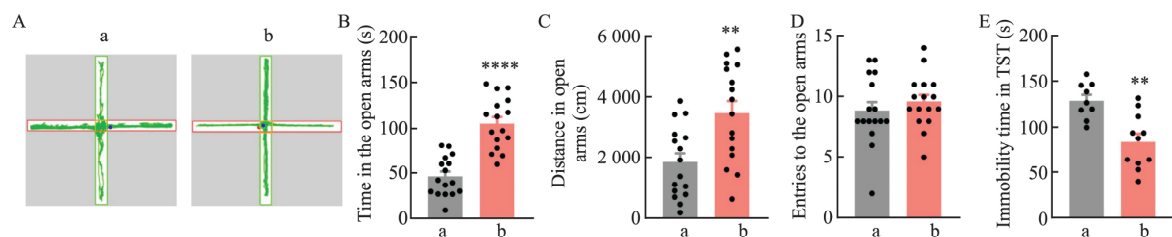


图3 EPM 和 TST 中小鼠的探索和抑郁样行为

Fig.3 Exploration and depression-like behavior of mice in EPM and TST

A: Movement trajectories of ctrl group and SD group mice in EPM; B - D: The time in the open arms, distance in the open arms and entries to the open arms of ctrl group and SD group mice in EPM ($n = 16$); E: Immobility time of ctrl group ($n = 9$) and SD group ($n = 11$) mice in TST; a: ctrl group; b: SD group; ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs ctrl group.

2.2 锂的治疗对急性睡眠剥夺行为学的影响

OFT 中,与 SD + sal 组比较,SD + Li 组小鼠的总移动距离、穿线次数、速度、中央区域的距离降低 ($t = 4.743, 4.218, 4.730, 2.639$, $P < 0.0001$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$, $P < 0.05$, 图 5A ~ D),在中央区域的时间和进入中央区域的次数差异无统计学意义(图 5E、F)。在 EPM 中,与 SD + sal 组比较,SD + Li 组

小鼠在开臂的距离减少 ($t = 2.653$, $P < 0.05$, 图 5H),但在开臂中的访问时间和进入开臂的次数差异无统计学意义(图 5G、I)。在 TST 中,与 SD + sal 组比较,SD + Li 组小鼠的静止不动时间变化差异无统计学意义(图 5J)。上述结果表明,锂的治疗降低了小鼠急性睡眠剥夺 72 h 后的运动能力,但并没有显著改变探索能力。

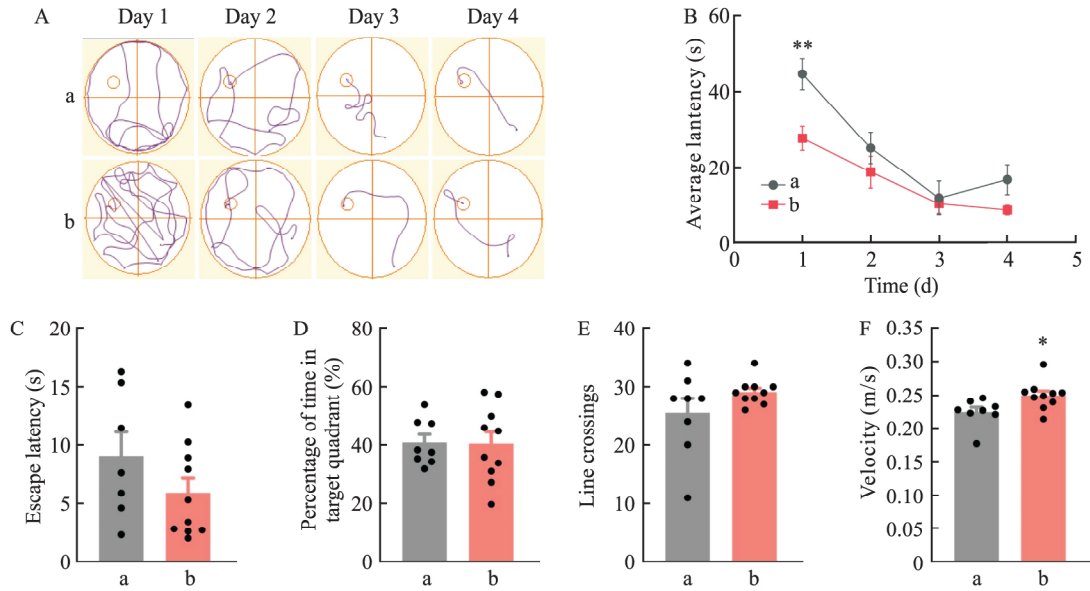


图4 MWM 实验中小鼠的学习记忆能力

Fig.4 Learning and memory ability of mice in MWM

A: Movement trajectories of ctrl group and SD group mice during the first four days of training in MWM test; B: The average latency finding the platform of ctrl group ($n=8$) and SD group ($n=10$) mice during the first four days of training in MWM test; C – F: Escape latency, percentage of time in the target quadrant, line crossings and velocity of ctrl group ($n=8$) and SD group ($n=10$) mice on the fifth day in MWM test; a: ctrl group; b: SD group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs ctrl group.

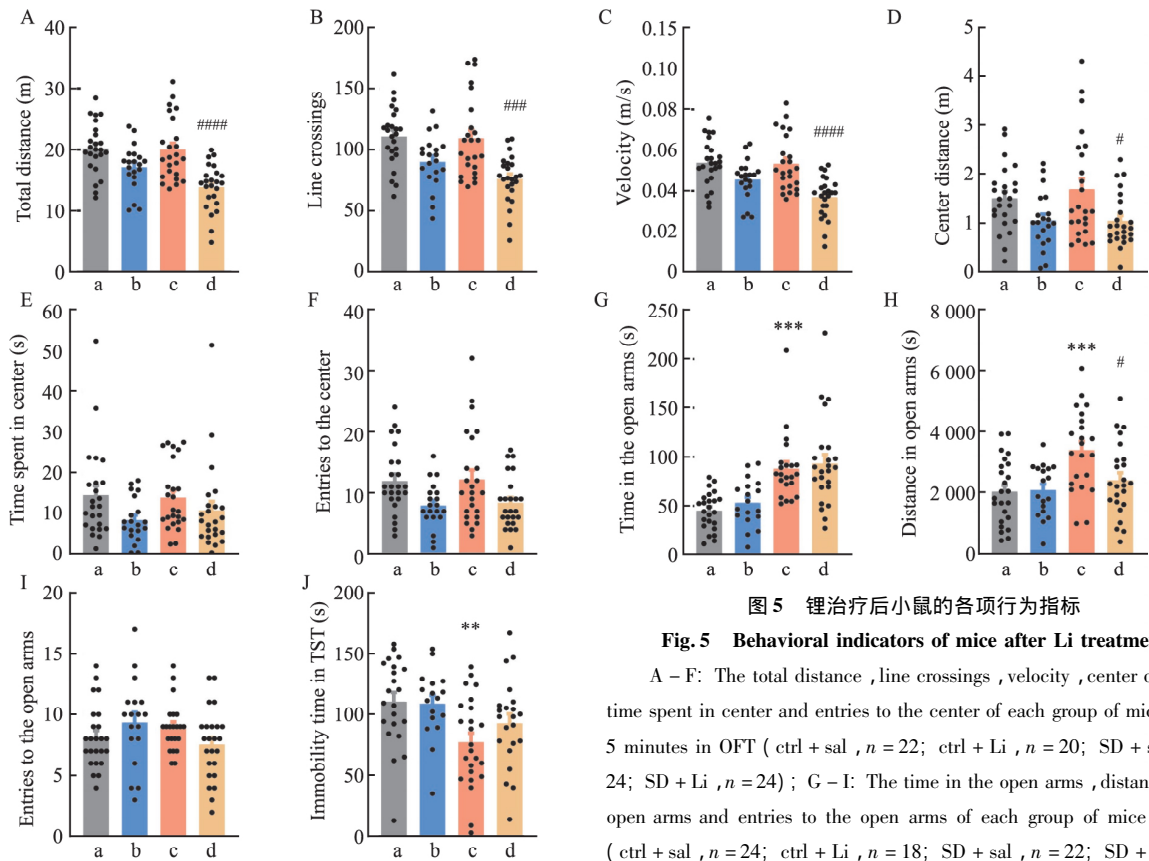


图5 锂治疗后小鼠的各项行为指标

Fig.5 Behavioral indicators of mice after Li treatment

A – F: The total distance, line crossings, velocity, center distance, time spent in center and entries to the center of each group of mice within 5 minutes in OFT (ctrl + sal, $n=22$; ctrl + Li, $n=20$; SD + sal, $n=24$; SD + Li, $n=24$); G – I: The time in the open arms, distance in the open arms and entries to the open arms of each group of mice in EPM (ctrl + sal, $n=24$; ctrl + Li, $n=18$; SD + sal, $n=22$; SD + Li, $n=24$); J: The immobility time of each group of mice within the last 4 minutes in TST (ctrl + sal, $n=22$; ctrl + Li, $n=17$; SD + sal, $n=24$; SD + Li, $n=22$); a: ctrl + sal group; b: ctrl + Li group; c: SD + sal group; d: SD + Li group; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs ctrl + sal group; # $P<0.05$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$ vs SD + sal group.

2.3 神经元信号指标 神经元中 *c-fos* 的蛋白表达可能间接报告神经元活动。SD 组小鼠在 HIP 中 *c-fos* 表达差异无统计学意义 ($t = 1.316, P > 0.05$, 图 6A、B) 在 mPFC 中 *c-fos* 表达升高 ($t = 3.394, P < 0.01$, 图 6C、D)。上述结果表明, 急性睡眠剥夺 72 h 后, mPFC 中的神经元显著激活。

2.4 分子指标 采用 Western blot 检测两组小鼠 HIP 和 mPFC 中 ser 9(抑制位点) p-GSK-3 β 和 GSK-

3 β 蛋白水平以及 DA、NE、5-HT 神经递质水平。与 ctrl 组相比, SD 组小鼠在 mPFC 和 HIP 中 p-GSK-3 β /GSK-3 β 均降低 ($t = 7.193, 2.507, P < 0.0001, P < 0.05$, 图 7A、B、H、I), GSK-3 β 的表达在两组之间差异无统计学意义 (图 7A、C、H、J)。与 ctrl 组相比, SD 组小鼠在 mPFC 和 HIP 中 DA 水平升高 ($t = 3.476, 2.316, P < 0.01, P < 0.05$, 图 7E、L), NE 在 mPFC 中表达水平升高 ($t = 2.348, P < 0.05$, 图 8F),

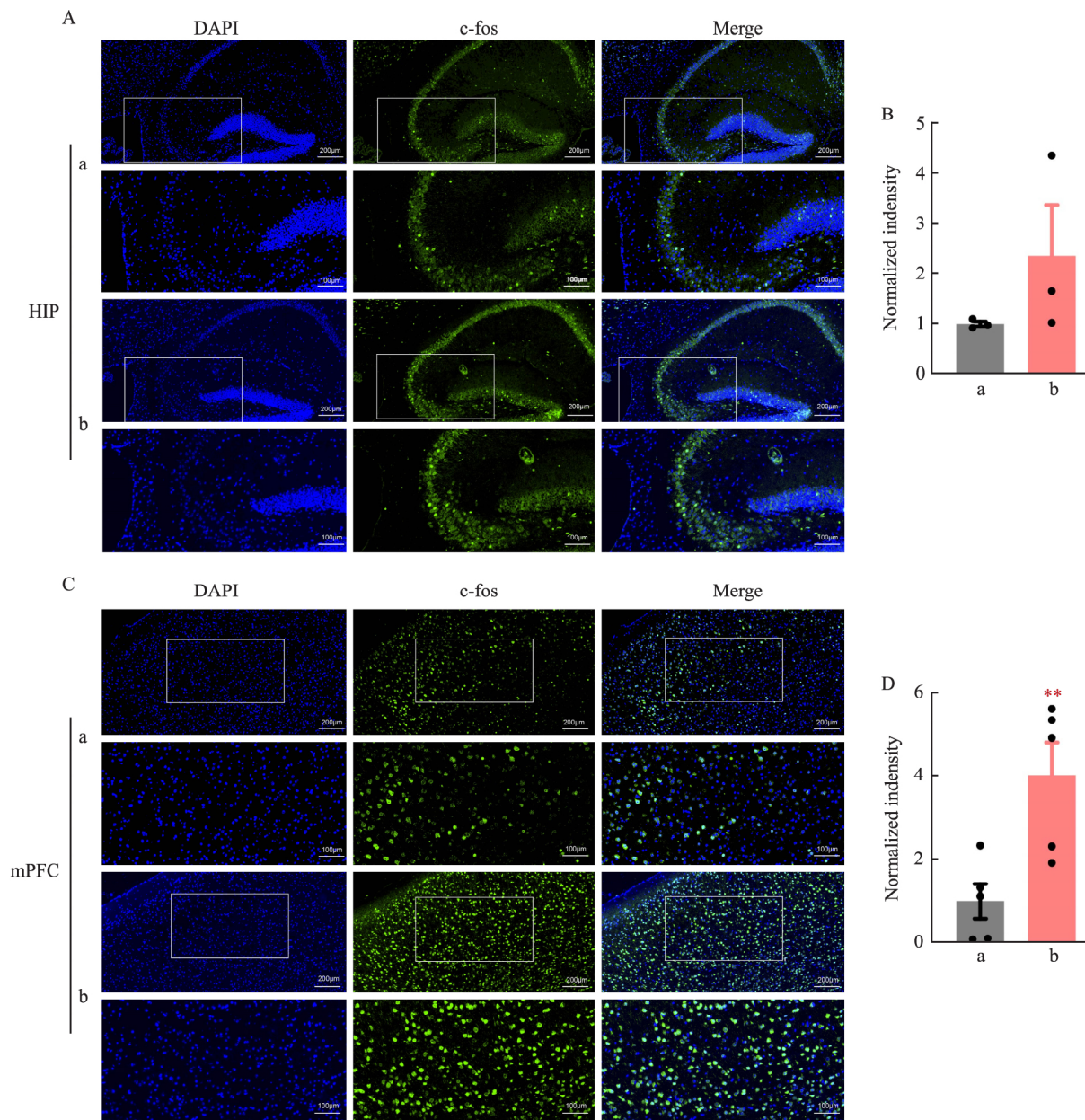


图 6 小鼠脑组织中 HIP 和 mPFC 区域神经元信号传导指标 $\times 10$

Fig. 6 Neuronal signaling indicators in HIP and mPFC regions of mouse brain tissue $\times 10$

A: Representative fluorescence images of neuronal marker *c-fos* in HIP region; B: Normalize the fluorescence intensity of *c-fos* in HIP region to the ctrl group ($n = 3$); C: Representative fluorescence images of neuronal marker *c-fos* in mPFC region; D: Normalize the fluorescence intensity of *c-fos* in mPFC region to the ctrl group ($n = 5$); a: ctrl group; b: SD group; ** $P < 0.01$ vs ctrl group.

而在 HIP 中降低 ($t = 2.668$, $P < 0.05$, 图 7M) 5-HT 在 mPFC 和 HIP 中变化差异无统计学意义 ($t = 0.104/0.447$, $P > 0.05$, 图 7G、N)。

3 讨论

双相情感障碍躁狂综合征或躁狂发作的神经病

理机制尚不明确,由于缺乏合适的动物模型,研究进展受到严重限制^[6]。目前,最常用的小鼠躁狂模型是基于药物治疗或基因修饰。而有一种躁狂小鼠模型是通过睡眠剥夺建立的,这类睡眠剥夺诱导的动物模型是研究失眠与躁狂症相关症状的因果机制的最佳实验范式之一^[7-8]。本研究中采用改良的多平

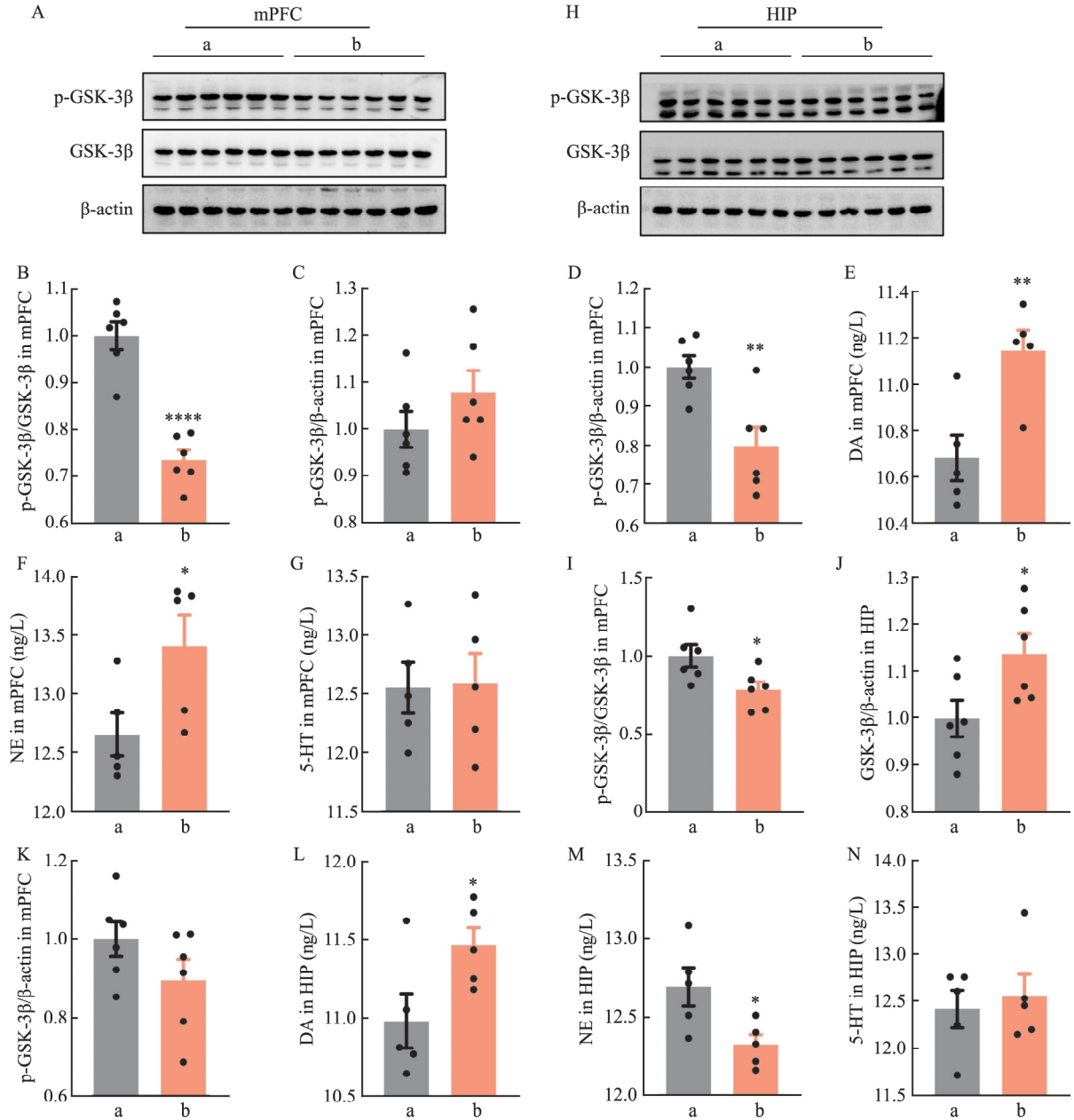


图 7 急性睡眠剥夺对小鼠 HIP 和 mPFC 区域 GSK-3β 和 p-GSK-3β 水平的影响

Fig. 7 The effect of acute sleep deprivation on the levels of GSK-3β and p-GSK-3β in the HIP and mPFC regions of mice

A - D: Representative protein bands and grayscale normalized statistical results of p-GSK-3β, GSK-3β, and β-actin in mPFC of ctrl group and SD group mice ($n = 6$); E: DA levels in mPFC of ctrl group and SD group mice ($n = 5$); F: NE levels in mPFC of ctrl group and SD group mice ($n = 5$); G: 5-HT levels in mPFC of ctrl group and SD group mice ($n = 5$); H - K: Representative protein bands and grayscale normalized statistical results of p-GSK-3β, GSK-3β, and β-actin in HIP of ctrl group and SD group mice ($n = 6$); L: DA levels in HIP of ctrl group and SD group mice ($n = 5$); M: NE levels in HIP of ctrl group and SD group mice ($n = 5$); N: 5-HT levels in HIP of ctrl group and SD group mice ($n = 5$); a: ctrl group; b: SD group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs ctrl group.

台水环境法 利用动物进入快速眼动睡眠时肌张力下降、肌肉松弛导致落水以达到睡眠剥夺的目的,此外,这种方法避免了小鼠社交孤立的影响,排除了社交障碍的因素。本研究实验结果显示,改良的多平台水环境法在进行 72 h 急性睡眠剥夺后,小鼠在 OFT 和 EPM 中表现出运动活性的增加以及探索行为增加(图 2、3),在 MWM 实验中 SD 组小鼠的速度也是显著高于 ctrl 组的,说明 72 h 急性睡眠剥夺后小鼠运动能力增加。同时,在 TST 中 SD 组小鼠表现出静止不动时间的减少(图 3E),但小鼠的学习记忆能力并未受到影响(图 4)。这些结果提示了经过 72 h 的睡眠剥夺后,小鼠出现了一定程度的躁狂样行为。

锂治疗是治疗 BD 的黄金标准^[9],锂治疗可逆转急性睡眠剥夺诱导的躁狂样行为,使 SD 组小鼠的运动活性下降(图 5)。此外,锂可以抑制 GSK-3,被认为通过增加磷酸化的 GSK-3 β 来影响许多神经保护途径,从而改善兴奋毒性的作用^[10-11]。GSK-3 作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,被广泛应用于多种人类疾病,除了在 BD 中发挥作用,它在调节神经元可塑性和细胞存活中也有重要作用。已有大量证据^[7,12]表明 GSK-3 β 与重度抑郁症有关,此外,GSK-3 β 有助于微管结合蛋白 tau 的异常磷酸化,这一过程被认为会导致阿尔茨海默病的神经原纤维缠结。GSK-3 与多种细胞内受体偶联信号蛋白以及几种受体本身具有调节性相互作用,且与轴突再生、神经元凋亡及神经系统稳定等密切相关,多巴胺能 D2 受体激活可诱导 GSK-3 的激活,抑制了 GSK-3 的磷酸化,从而诱发躁狂样症状^[13-14]。

BD 中存在多种神经递质系统紊乱,DA 能功能障碍也与 BD 有关,狂躁时 DA 能活动过度,促使 DA 受体下调,DA 能功能障碍可以被认为是 BD 发病机制的一个假定机制^[15]。似乎高 DA 能是躁狂症状发展的基础,而低 DA 能是 BD 抑郁期的基础。本研究比较了这些分子指标(p-GSK-3 β 、GSK-3 β 、DA、NE、5-HT)在 ctrl 组和 SD 组之间的差异,发现在 mPFC 中,急性睡眠剥夺后 p-GSK-3 β 的水平降低,DA、NE 的神经递质水平升高,表明急性睡眠剥夺的小鼠存在神经递质系统紊乱以及 GSK-3 β 的激活。

综上所述,急性睡眠剥夺可能通过影响小鼠 mPFC 中的 DA 神经递质水平抑制 GSK-3 的丝氨酸磷酸化,最终导致小鼠出现躁狂样行为。因此,靶向调控 GSK-3 信号可能成为临床睡眠障碍致躁狂患

者的治疗新途径。

参考文献

- [1] Liu H, Huang X, Li Y, et al. TNF signaling pathway-mediated microglial activation in the PFC underlies acute paradoxical sleep deprivation-induced anxiety-like behaviors in mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 100: 254–66. doi: 10.1016/j.bbi.2021.12.006.
- [2] Valvassori S S, Resende W R, Dal-Pont G, et al. Lithium ameliorates sleep deprivation-induced Mania-like behavior, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis alterations, oxidative stress and elevations of cytokine concentrations in the brain and serum of mice[J]. *Bipolar Disord*, 2017, 19(4): 246–58. doi: 10.1111/bdi.12503.
- [3] Cotovio G, Oliveira-Maia A J. Functional neuroanatomy of Mania[J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12: 29. doi: 10.1038/s41398-022-01786-4.
- [4] Ahmad F, Woodgett J R. Emerging roles of GSK-3 α in pathophysiology: emphasis on cardio-metabolic disorders[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(2): 118616. doi: 10.1016/j.bbamer.2019.118616.
- [5] Beaulieu J M, Sotnikova T D, Yao W D, et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(14): 5099–104. doi: 10.1073/pnas.0307921101.
- [6] Haggarty S J, Karmacharya R, Perlis R H. Advances toward precision medicine for bipolar disorder: mechanisms & molecules[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26: 168–85. doi: 10.1038/s41380-020-0831-4.
- [7] Li X, Chen B, Zhang D, et al. A novel murine model of Mania[J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28(7): 3044–54. doi: 10.1038/s41380-023-02037-8.
- [8] Ni R J, Wang Y Y, Pu W J, et al. Differential effects of sleep deprivation on behavior and microglia in a brain-region-specific manner in young and aged male mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2024, 117: 12–9. doi: 10.1016/j.bbi.2023.12.031.
- [9] Cheniaux E. The pharmacological treatment of bipolar disorder: a systematic and critical review of the methodological aspects of modern clinical trials[J]. *Braz J Psychiatry*, 2011, 33(1): 72–80. doi: 10.1590/s1516-44462011000100015.
- [10] Terao T, Ishii N, Hirakawa H. A specific group of patients with diagnostic conversion from depression to bipolar disorder and finally to dementia as a mental GSK-3 disease: a hypothesis[J]. *Bipolar Disord*, 2020, 22(4): 356–9. doi: 10.1111/bdi.12875.
- [11] de Sousa R T, Zanetti M V, Talib L L, et al. Lithium increases platelet serine-9 phosphorylated GSK-3 β levels in drug-free bipolar disorder during depressive episodes[J]. *J Psychiatr Res*, 2015, 62: 78–83. doi: 10.1016/j.jpsychires.2015.01.016.
- [12] Çiçekli M N, Tiryaki E S, Altun A, et al. GLP-1 agonist liraglutide improves ouabain-induced Mania and depressive state via GSK-3 β pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2022, 42

- (5): 486–94. doi: 10.1080/10799893.2022.2032747.
- [13] Beurel E, Grieco S F, Jope R S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148: 114–31. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
- [14] 徐晓津, 房茂胜, 缪 楹, 等. 布南色林通过激活 PI3K/AKT/GSK3 β 信号通路对精神分裂症大鼠海马神经元损伤的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(11): 1801–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2022.11.020.
- [14] Xu X J, Fang M S, Miao Y, et al. Effects of Blonanserin on hippocampal neurons damage in schizophrenic rats by activating PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathways [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(11): 1801–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2022.11.020.
- [15] Berk M, Dodd S, Kauer-Sant'anna M, et al. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder [J]. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 2007(434): 41–9. doi: 10.1111/j.1600–0447.2007.01058.x.

The role and mechanism of DA/GSK-3 signaling in manic-like behavior induced by acute sleep deprivation in mice

Cui Yangfeng, Chen Ming

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

Abstract Objective To explore the effects of acute sleep deprivation on manic-like behavior in mice and its possible molecular mechanisms. **Methods** Seventy-three 8-week male C57BL/6 mice were randomly divided into two groups: control group (ctrl group, $n=36$) and acute sleep deprivation group (SD group, $n=37$). After acute sleep deprivation, the motor and exploration ability of mice were evaluated by open field test and elevated plus maze. Depression-like behavior of mice was evaluated by tail suspension test. Neuronal activation in brain tissue was observed by c-fos staining, neurotransmitter levels in hippocampus (HIP) and medial prefrontal cortex (mPFC) were detected by ELISA Kit, and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and phosphorylated GSK-3 β (p-GSK-3 β) levels in HIP and mPFC were detected by Western blot. **Results** Compared with the ctrl group, the total movement distance ($P<0.05$) and the time in the central area ($P<0.05$) of the mice in SD group significantly increased in the open field test, and the open arm time ($P<0.0001$) and open arm distance ($P<0.01$) significantly increased in the elevated plus maze. In the tail suspension test, the immobility time ($P<0.01$) was significantly reduced. In SD group, the expression of c-fos in HIP and mPFC increased ($P<0.01$), and the level of neurotransmitter DA in HIP ($P<0.05$) and mPFC ($P<0.01$) significantly increased. Western blot results showed that compared with ctrl group, the ratio of p-GSK-3 β and GSK-3 β in mPFC and HIP significantly decreased in SD group ($P<0.0001$, $P<0.05$), while the level of p-GSK-3 β protein significantly decreased in mPFC ($P<0.05$), but there was no significant change in HIP. **Conclusion** Acute sleep deprivation may regulate the level of GSK-3 through DA in mPFC of mice, inhibiting the serine phosphorylation of GSK-3 and eventually leading to manic-like behavior in mice.

Key words acute sleep deprivation; manic-like behavior; DA; glycogen synthase kinase-3 β ; phosphorylated GSK-3 β ; neuro

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82371541)

Corresponding author Chen Ming, E-mail: chenming@ahmu.edu.cn