

研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2022.03.008

抗抑郁药对海马星形胶质细胞缝隙连接蛋白表达和通道功能的影响

梁沛彰 颜茹芳 张永华 黄焕森 汪灵芝

【摘要】 目的 探讨3种不同机制抗抑郁药对海马星形胶质细胞缝隙连接蛋白和通道功能的影响。方法 CCK-8实验检测不同机制抗抑郁药对海马星形胶质细胞的细胞毒性,采用蛋白免疫印迹法和细胞接种荧光示踪法测定3种不同机制抗抑郁药对由缝隙连接蛋白43(Cx43)组成的通道功能和Cx43蛋白表达的影响。结果 CCK-8实验显示,25.00 μmol/L 氟西汀、0.10 μmol/L 阿米替林和0.20 nmol/L 文拉法辛对海马星形胶质细胞无细胞毒性(P 均 >0.05);25.00 μmol/L 氟西汀、0.10 μmol/L 阿米替林和0.20 nmol/L 文拉法辛能抑制海马星形胶质细胞缝隙连接的荧光传递功能(P 均 <0.05),但3种抗抑郁药均不影响海马星形胶质细胞Cx43蛋白的表达(P 均 >0.05)。结论 抗抑郁药能够显著降低海马星形胶质细胞Cx43组成的通道功能。

【关键词】 细胞缝隙连接;星形胶质细胞;海马;抗抑郁药;缝隙连接蛋白43

Influence of antidepressants on connexin expression and gap junction function of hippocampal astrocytes Liang Peizhang, Yan Rufang, Zhang Yonghua, Huang Huansen, Wang Lingzhi. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

Corresponding author, Wang Lingzhi, E-mail: wlz4009@163.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effects of three antidepressants with different mechanisms on connexin expression and channel function of hippocampal astrocytes. **Methods** The cytotoxicity of antidepressants with different mechanisms on hippocampal astrocytes was assessed by CCK-8 assay. The effects of three antidepressants with different mechanisms on gap junction function and the expression level of connexin 43 protein (Cx43) were determined by cell inoculation fluorescence tracing and western blot. **Results** CCK-8 assay showed that 25.00 μmol/L fluoxetine, 0.10 μmol/L amitriptyline and 0.20 nmol/L venlafaxine had no cytotoxicity on hippocampal astrocytes (all $P > 0.05$). In addition, 25.00 μmol/L fluoxetine, 0.10 μmol/L amitriptyline and 0.20 nmol/L venlafaxine could significantly inhibit the fluorescence transfer function of gap junction in hippocampal astrocytes (all $P < 0.05$), whereas three antidepressants exerted on effects upon the expression of Cx43 in hippocampal astrocytes (all $P > 0.05$). **Conclusion** Antidepressants can significantly reduce the gap junction function composed of Cx43 in hippocampal astrocytes.

【Key words】 Gap junction; Astrocyte; Hippocampus; Antidepressant; Connexin 43 protein

作为边缘系统的重要组成部分,海马不仅参与学习、记忆与情感活动功能调控,同时在抑郁症心境障碍的产生演化过程扮演重要的作用。海马区富含星形胶质细胞。研究显示,抑郁症可以导致海马体积的变化,同时星形胶质细胞也发生变化^[12]。多种抗抑郁药可通过影响星形胶质细胞而发挥作用。尽管近年来越来越多的研究证实星形胶质细胞在抑郁症的发生发展中具有重要的作用^[34]。

但到目前为止,星形胶质细胞参与抑郁症的具体机制仍不清楚,哪些分子可以成为抗抑郁药的靶点还有待探究。细胞缝隙连接(GJ)是广泛存在于各种实质性器官组织细胞之间的一类蛋白质连接通道。每6个连接蛋白(Cx)在细胞膜上作为连接子围绕一起形成单个“半通道”。位于相邻细胞膜上2个相对应的“半通道”结合成1个完整的GJ。研究发现,<1 kDa的小分子物质(细胞信号

基金项目:广东省自然科学基金(2020A151501071);广州医科大学高水平大学学术骨干培育项目;广州市基础研究计划市校(院)联合资助基础与应用基础研究项目

作者单位:510260 广州,广州医科大学附属第二医院麻醉科

通信作者,汪灵芝, E-mail: wlz4009@163.com

分子和代谢物质如离子、糖等)可通过GJ快速转移、扩散到相邻接的细胞。GJ是信息物质在细胞之间进行传递的一个重要节点。目前为止,人体中共发现有21种Cx,分别以其分子量进行命名。中枢神经系统内星形胶质细胞主要表达的Cx为Cx43^[56]。近年研究证实,星形胶质细胞中Cx43蛋白及其组成的通道功能异常可能与抑郁症密切相关^[7]。我们通过前期的实验证实,海马星形胶质细胞Cx43蛋白通道参与了抑郁情绪障碍,但抗抑郁药是否影响海马星形胶质细胞Cx43蛋白表达和通道功能至今未见报道。为此进行本研究,探讨3种不同机制抗抑郁药对海马星形胶质GJ蛋白和通道功能的影响,现报告如下。

材料与方法

一、细胞来源和试剂

原代星形胶质细胞取材于清洁级2~3 d的无特定病原体(SPF)大鼠乳鼠,大鼠乳鼠购于广东省动物实验中心。本研究方案经医院伦理委员会批准(伦理批件号:B2021-022)。本课题中采用的实验试剂:青霉素、链霉素、胰酶、DMEM干粉和胎牛血清等购于美国Gibco公司,氟西汀、阿米替林和文拉法辛购于上海麦克林生化科技有限公司,CCK-8试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司,Calcine-AM购于Invitrogen-Thermo fisher公司,Cx43羊抗鼠单克隆抗体和 β -actin羊抗鼠单克隆抗体购于美国Sigma公司,二抗购于Abcam公司。

二、方法

1. 星形胶质细胞的纯化和培养

取2~3 d的SPF大鼠乳鼠5只,低温麻醉后打开颅骨,取出大脑,置于含预冷DMEM的培养皿中,解剖显微镜下取出海马,分离星形胶质细胞。星形胶质细胞贴壁后轻摇换液1次,去除死亡的细胞碎片,2~3 d换液1次,细胞培养7~9 d,置37℃恒温摇床摇振过夜(200转/分,16 h),弃上清后贴壁较牢的为星形胶质细胞,经胰酶消化星形胶质细胞,重悬后采用高糖DMEM培养基(内含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)培养和传代星形胶质细胞,进行后续实验^[8]。

2. CCK-8实验检测抗抑郁药对星形胶质细胞的毒性作用

在96孔板中,接种原代培养的星形胶质细胞

(1000个/孔),3种抗抑郁药氟西汀、阿米替林、文拉法辛参考既往文献报道设置不同的药物浓度组别,每组设置4孔,分别加入200 μ L培养基培养,细胞培养24 h后通过CCK-8试剂盒对细胞的活力进行测定,通过酶标仪于490 nm检测各孔的吸光度(D)值,根据公式:

$$\text{细胞存活率} = (D_{\text{实验孔}} - D_{\text{空白孔}}) / (D_{\text{对照孔}} - D_{\text{空白孔}}) \times 100\%$$

计算抗抑郁药对星形胶质细胞的活性,重复上述实验3次,结果取平均值。

3. 蛋白免疫印迹法检测Cx43在海马星形胶质细胞的表达

采用蛋白免疫印迹法,裂解细胞获取蛋白,并与标准蛋白比较进行目标蛋白定量(Bio-rad DC蛋白定量试剂盒),制备电泳凝胶,20 μ g蛋白进行上样,Bio-Rad电泳仪电泳,转膜液转膜,脱脂奶粉封闭,4℃孵育一抗(抗Cx43单克隆抗体,1:6000;抗 β -actin单克隆抗体,1:8000),二抗孵育30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,ECL发光试剂孵育。Bio-Rad凝胶成像系统收集图像,用生物图像系统(Gene Genius)分别对Cx43和 β -actin条带进行灰度扫描分析。

4. 细胞接种荧光示踪法检测海马星形胶质细胞GJ荧光传递功能

由于绿色荧光试剂Calcine-AM进入细胞经酶解后不能自由通过细胞膜但能通过GJ进入邻接细胞,以倒置荧光显微镜计数通过GJ染上绿色荧光的细胞数量,检测GJ功能。取星形胶质细胞接种于6孔板,培养3~4 d后待细胞相互融合,通过将Calcine-AM试剂与细胞共同孵育使该细胞染有绿色荧光,将该细胞定义为“供体细胞”。将经胰酶消化后的“供体细胞”接种至经不同抗抑郁药处理过的融合星形胶质细胞上,供体细胞接种4 h待与周围细胞融合,星形胶质细胞通过稳定的GJ(绿色荧光),由“供体细胞”进入邻接细胞。通过倒置荧光显微镜,计数一个“供体细胞”周围含有绿色荧光的星形胶质细胞数目,作为检测GJ功能的指标。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组与对照组间比较采用方差分析和Dunnett-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、抗抑郁药对海马星形胶质细胞的细胞毒性

为了排除抗抑郁药的细胞毒性影响细胞数量, 从而对 GJ 功能产生影响, 本研究首先用 CCK-8 法检测 3 种抗抑郁药对海马星形胶质细胞细胞毒性的影响。与对照组相比, 50.00 $\mu\text{mol/L}$ 氟西汀, 1.00、10.00 和 100.00 $\mu\text{mol/L}$ 阿米替林及 20.00 nmol/L 文拉法辛的细胞活力下降 (P 均 < 0.05), 表明药物在这些浓度下能抑制星形胶质细胞的生长, 见表 1。因此, 后续实验中选取该 3 种抗抑郁药无细胞毒性的较高浓度进行研究, 即 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 氟西汀、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 阿米替林和 0.20 nmol/L 文拉法辛。

二、抗抑郁药对海马星形胶质细胞 Cx43 蛋白表达的影响

蛋白免疫印迹法显示, 与对照组比较, 海马

星形胶质细胞 Cx43 在 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 氟西汀、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 阿米替林和 0.20 nmol/L 文拉法辛作用下未影响其表达。对各组条带的灰度值进行统计分析 (内参照为 β -actin 灰度值), 组间差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05), 见图 1。

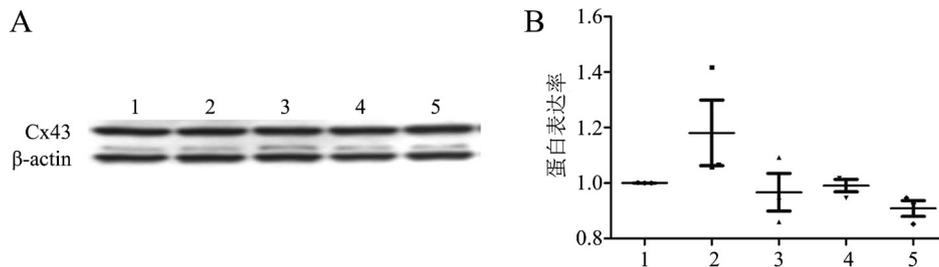
三、抗抑郁药对海马星形胶质细胞 Cx43 组成的 GJ 通道功能的影响

细胞接种荧光示踪显示 (图 2), 与对照组相比, 25 $\mu\text{mol/L}$ 氟西汀能够降低海马星形胶质细胞荧光传递功能, 荧光传递功能约为对照组的 (46 ± 2)%; 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 阿米替林能够降低荧光传递功能, 荧光传递功能约为对照组的 (66 ± 3)%; 0.20 nmol/L 文拉法辛能够降低海马星形胶质细胞荧光传递功能, 荧光传递功能约为对照组的 (62 ± 3)%, 氟西汀与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 阿米替林和文拉法辛与对照组比较差异亦有统计学意义 (P 均 < 0.05), 表明 3 种

表 1 3 种药物在不同浓度下对星形胶质细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

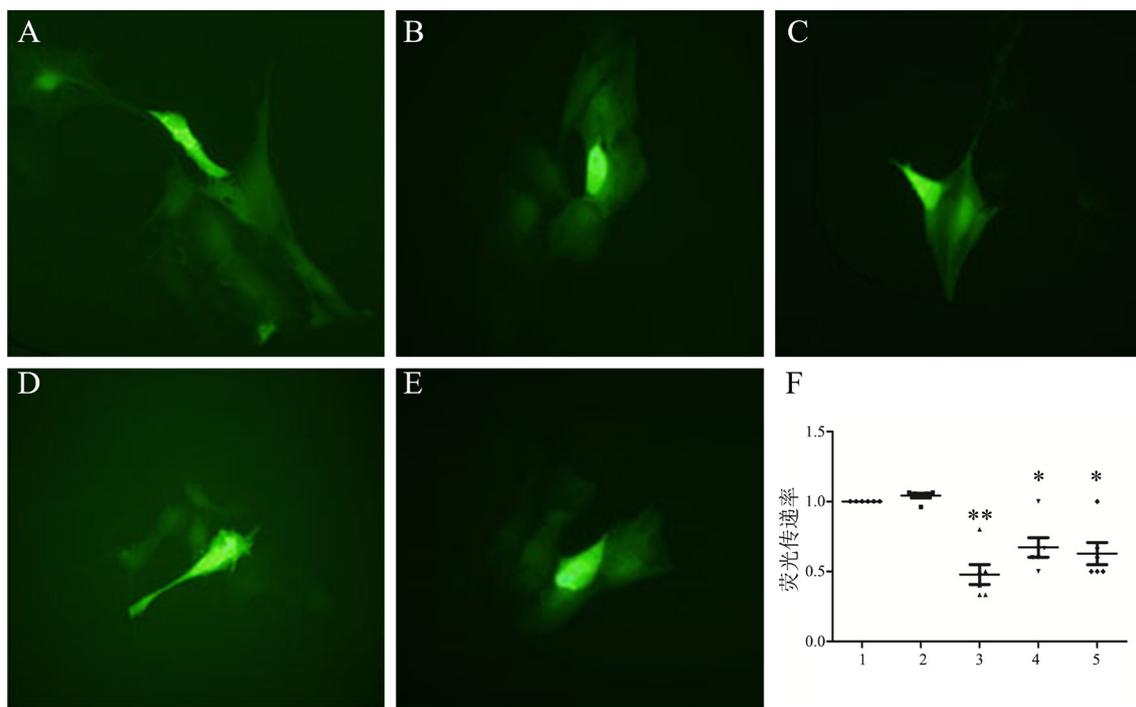
药 物	浓度 / ($\mu\text{mol/L}$)	星形胶质细胞活性	Dunnnett- t 值 ^a	P 值 ^a
空白对照		1.02 ± 0.04		
DMSO 对照		1.02 ± 0.04	0.068	0.947
氟西汀	0.05 $\mu\text{mol/L}$	1.02 ± 0.04	0.069	0.947
	0.50 $\mu\text{mol/L}$	1.02 ± 0.03	0.040	0.970
	5.00 $\mu\text{mol/L}$	1.02 ± 0.04	0.104	0.920
	25.00 $\mu\text{mol/L}$	1.01 ± 0.05	0.340	0.746
	50.00 $\mu\text{mol/L}$	0.92 ± 0.04	3.586	0.012
阿米替林	0.01 $\mu\text{mol/L}$	1.02 ± 0.03	0.092	0.930
	0.10 $\mu\text{mol/L}$	1.01 ± 0.04	0.462	0.660
	1.00 $\mu\text{mol/L}$	0.95 ± 0.03	2.822	0.030
	10.00 $\mu\text{mol/L}$	0.91 ± 0.03	4.712	0.003
	100.00 $\mu\text{mol/L}$	0.86 ± 0.03	6.624	< 0.001
文拉法辛	0.02 nmol/L	1.00 ± 0.01	0.774	0.468
	0.20 nmol/L	1.05 ± 0.07	0.570	0.589
	2.00 nmol/L	0.95 ± 0.04	2.434	0.051
	20.00 nmol/L	0.91 ± 0.03	6.390	< 0.001

注: ^a 与空白对照比较。



注: A 为蛋白免疫印迹法结果; B 为定量分析结果, 其中 1 为空白对照、2 为 DMSO 对照、3 为 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 氟西汀、4 为 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 阿米替林、5 为 0.20 nmol/L 文拉法辛; $n = 4$ 。

图 1 3 种抗抑郁药对海马星形胶质细胞 GJ 荧光传递功能的影响 (蛋白免疫印迹法)



注: A~E 分别为空白对照、DMSO 对照、25.00 $\mu\text{mol/L}$ 氟西汀、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 阿米替林、0.20 nmol/L 文拉法辛; F 为定量分析, 其中 1 为空白对照、2 为 DMSO 对照、3 为 25.00 $\mu\text{mol/L}$ 氟西汀、4 为 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 阿米替林、5 为 0.20 nmol/L 文拉法辛; $n = 4$, 与空白对照比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图 2 3 种不同抗抑郁药对海马星形胶质细胞 Cx43 蛋白表达的影响 (荧光示踪法, $\times 400$)

抗抑郁药均可以降低海马星形胶质细胞由 Cx43 所组成的 GJ 功能。

讨 论

抑郁症是一类严重的心境障碍, 心境低落为抑郁症的显著特征, 情绪低落、兴趣减退、活动减少的“三低”症状为抑郁症的主要临床表现。抑郁症影响全球 3.8% 的人口, 但其发病机制仍不十分清楚^[9]。脑内去甲肾上腺素和 5-羟色胺等单胺类神经递质水平低下被认为与抑郁症的发生密切相关, 目前经典的抗抑郁药在临床上的应用仍存在疗效滞后, 重症患者通过药物或联合心理治疗后仍会出现抗治疗反应和易复发等问题^[10-12]。近年多项研究显示, 广泛存在于神经元周围的星形胶质细胞在抑郁症患者和动物模型中有形态和功能的改变, 同时还伴随谷氨酸受体和转运体的异常^[3, 13]。Liu 等^[14]发现, 抗抑郁药帕罗西汀和单胺氧化酶抑制剂氯丙咪嗪能够明显增加抑郁模型大鼠海马区星形胶质细胞标志性蛋白 GFAP 的表达。研究者认为, 星形胶质细胞可能是抑郁症发生的根本原因, 而针对星形胶质细胞的治疗有望成为潜在

的治疗靶点^[15]。

抑郁症的发生伴随脑内多个部位 (皮质、海马、杏仁核等) 的结构和功能异常。海马是边缘系统的主要组成部分, 是学习、情感和记忆等高级神经活动的重要脑区。抑郁症可导致海马体积的变化、神经突触可塑性改变, 兴奋性氨基酸、单胺类神经递质分泌异常和神经营养因子等表达下调^[1]。在多种不同应激模式导致的抑郁动物模型中, 研究者发现海马区星形胶质细胞的数量和形态发生异常^[2]。氟西汀在临床上广泛应用, 通过选择性抑制 5-羟色胺再摄取发挥作用。阿米替林是三环类抗抑郁药, 是第一代单胺氧化酶再摄取抑制剂。文拉法辛是苯乙胺的衍生物, 通过抑制 5-羟色胺与去甲肾上腺素再摄取发挥作用。本研究通过 CCK-8 实验证实 3 种不同机制的抗抑郁药氟西汀、阿米替林和文拉法辛在一定浓度范围内对海马星形胶质细胞无抑制作用。蛋白免疫印迹法和荧光示踪法结果首次证实 3 种抗抑郁药均能够明显抑制星形胶质细胞 Cx43 组成的 GJ 功能, 但不影响 Cx43 蛋白表达。既往研究通过细胞划痕实验证实氟西汀、阿米替林和文拉法辛等抗抑郁药能够明显抑制小鼠皮质星形胶质细胞 Cx43 组成的 GJ

功能,但不影响 Cx43 蛋白表达^[16]。但其并未就抗抑郁药对海马星形胶质细胞 GJ 功能进行研究。组织细胞微环境中酸碱值、游离钙离子、细胞膜电位、连接蛋白磷酸化等多种因素可影响 GJ 的开放与闭合状态。研究表明 Cx43 的磷酸化能够导致 GJ 功能改变^[17]。Quesseveur 等^[18]报道,长期给予糖皮质激素的小鼠出现的抑郁样行为伴随海马 Cx43 磷酸化增多,而应用抗抑郁药氟西汀能够明显减少 Cx43 磷酸化和抑郁样症状。由此推测,抗抑郁药对 GJ 功能的影响可能与其磷酸化的改变有关,但仍需后续研究证实。

Cx 及其组成通道与抑郁症的发生关系密切。研究者在抑郁症患者的尸检结果以及急性、慢性应激导致的抑郁模型上均发现大脑 Cx43 表达的改变^[19]。同时动物研究还显示,抗抑郁药可通过影响海马或者前额叶 Cx43 蛋白或半通道的功能在慢性应激或者糖皮质激素慢性给药引起的抑郁大鼠中产生抗抑郁作用^[20]。这些研究结果均表明,皮质或额叶的星形胶质细胞 Cx43 蛋白及组成通道在抑郁症的发生过程中具有极其重要的作用。本研究首次发现抗抑郁药能够明显改变海马星形胶质细胞 Cx43 组成的 GJ 功能,这提示海马星形胶质细胞 Cx43 可能在抑郁症发生中起重要的作用。区别于以往主要针对神经元为靶点的药物开发,海马星形胶质细胞有望成为新的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Zarate-Garza P P, Ortega-Balderas J A, Ontiveros-Sanchez de la Barquera J A, et al. Hippocampal volume as treatment predictor in antidepressant naïve patients with major depressive disorder. *J Psychiatr Res*, 2021, 140 : 323-328.
- [2] Czéh B, Simon M, Schmelting B, et al. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 31 (8): 1616-1626.
- [3] Li Y, Luo Y, Tang J, et al. The positive effects of running exercise on hippocampal astrocytes in a rat model of depression. *Transl Psychiatry*, 2021, 11 (1): 83.
- [4] Ferreira F R, Cupido A, Catalan B, et al. Astrocyte intracellular Ca²⁺ and TrkB signaling in the hippocampus could be involved in the beneficial behavioral effects of antidepressant treatment. *Neurotox Res*, 2021, 39 (3): 860-871.
- [5] Wang L, Peng Y, Peng J, et al. Tramadol attenuates the sensitivity of glioblastoma to temozolomide through the suppression of Cx43-mediated gap junction intercellular communication. *Int J Oncol*, 2018, 52 (1): 295-304.
- [6] Fumagalli A, Heuninck J, Pizzoccaro A, et al. The atypical chemokine receptor 3 interacts with connexin 43 inhibiting astrocytic gap junctional intercellular communication. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 4855.
- [7] Okada M, Oka T, Nakamoto M, et al. Astroglial connexin 43 as a potential target for a mood stabiliser. *Int J Mol Sci*, 2020, 22 (1): 339.
- [8] 张楠,熊文雯,邢媛,等.大鼠海马神经元及星形胶质细胞的体外培养. *神经药理学报*, 2017, 7 (1): 24-28.
- [9] Mathers C D, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 2006, 3 (11): e442.
- [10] 高宇博,李亮萍,朱心红,等.抑郁神经生物学机制研究新进展. *生理学报*, 2012, 64 (4): 475-480.
- [11] 周素妙,黄兴兵.氧化应激参与抑郁症认知功能障碍机制的研究进展. *新医学*, 2019, 50 (12): 877-880.
- [12] 陈怡,梁其生,叶伟健,等.支持性心理治疗对复发老年抑郁症患者抑郁症状及生活质量的影响. *新医学*, 2013, 44 (3): 184-187.
- [13] Rubinow M J, Mahajan G, May W, et al. Basolateral amygdala volume and cell numbers in major depressive disorder: a postmortem stereological study. *Brain Struct Funct*, 2016, 221 (1): 171-184.
- [14] Liu Q, Li B, Zhu H Y, et al. Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2009, 19 (11): 796-805.
- [15] Shu X, Sun Y, Sun X, et al. The effect of fluoxetine on astrocyte autophagy flux and injured mitochondria clearance in a mouse model of depression. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (8): 577.
- [16] Jeanson T, Pondaven A, Ezan P, et al. Antidepressants impact connexin 43 channel functions in astrocytes. *Front Cell Neurosci*, 2016, 9 : 495.
- [17] Wang L, Peng J, Huang H, et al. Simvastatin protects Sertoli cells against cisplatin cytotoxicity through enhanced gap junction intercellular communication. *Oncol Rep*, 2015, 34 (4): 2133-2141.
- [18] Quesseveur G, Portal B, Basile J A, et al. Attenuated levels of hippocampal connexin 43 and its phosphorylation correlate with antidepressant- and anxiolytic-like activities in mice. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9 : 490.
- [19] Nagy C, Torres-Platas S G, Mechawar N, et al. Repression of astrocytic connexins in cortical and subcortical brain regions and prefrontal enrichment of H3K9me3 in depression and suicide. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2017, 20 (1): 50-57.
- [20] Sun J D, Liu Y, Yuan Y H, et al. Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology*, 2012, 37 (5): 1305-1320.

(收稿日期: 2021-09-16)

(本文编辑: 林燕薇)