

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.023

褪黑激素对精神分裂症小鼠行为及氧化应激的影响

潘小平¹, 李国成²

(1. 广西壮族自治区百色市第二人民医院, 广西 百色 533000; 2. 广西壮族自治区脑科医院, 广西 柳州 545505)

摘要:目的 探讨褪黑激素对精神分裂症小鼠行为及氧化应激的影响。方法 制备小鼠精神分裂症模型,第15天开始,利培酮组小鼠灌胃给予利培酮(0.025 mg/kg),褪黑素组小鼠灌胃给予褪黑素(5 mg/kg),对照组和模型组小鼠灌胃给予等量生理盐水,连续14 d后测定相关指标。结果 与对照组比较,其他3组小鼠社会交往时间和穿越平台次数减少,跨格总数和逃避潜伏期增加,脑组织中丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)含量显著升高,谷胱甘肽(GSH)含量显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,利培酮组和褪黑素组小鼠社会交往时间和穿越平台次数增加,跨格总数和逃避潜伏期降低,脑组织中MDA和NO含量显著降低,GSH含量显著增加($P < 0.05$);利培酮组和褪黑素组小鼠各指标的差异不显著($P > 0.05$)。结论 褪黑激素能减轻精神分裂症模型小鼠的行为异常症状,可阻断大脑氧化应激反应。

关键词:褪黑激素;精神分裂症;行为;氧化应激;小鼠

中图分类号:R965.2;R971+.41

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)09-0077-04

Melatonin on Behavior and Oxidative Stress in Mice with Schizophrenic

PAN Xiaoping¹, LI Guocheng²

(1. Baise Second People's Hospital, Baise, Guangxi, China 533000; 2. Guangxi Brain Hospital, Liuzhou, Guangxi, China 545505)

Abstract: Objective To explore the effect of melatonin on behavior and oxidative stress in mice with schizophrenic. **Methods** A mouse model of schizophrenia was established. From the 15th day, the mice in the risperidone group were administrated with risperidone (0.025 mg/kg), and the mice in the melatonin group were administrated with melatonin (5 mg/kg), the rats in control group and model group were administrated with normal saline, and the related indexes were measured after 14 days of continuous treatment. **Results** Compared with the control group, the social interaction time and the number of crossing platforms of the other three groups decreased, the total number of crossing grids and escape latency increased, the content of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) in brain tissue increased significantly, and the content of glutathione decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the risperidone group and melatonin group increased social interaction time and the number of crossing platforms, the total number of cross-grids and escape latency decreased, and the content of MDA and NO in the brain tissue was significantly reduced, and the peptide content increased significantly ($P < 0.05$); the differences between the indexes in the risperidone group and the melatonin group were not significant ($P > 0.05$).

Conclusion Melatonin can alleviate behavioral abnormalities in schizophrenic model mice and block oxidative stress in the brain.

Key words: melatonin; schizophrenia; behavior; oxidative stress; mice

精神分裂症是一种复杂的神经精神疾病,与多巴胺、胆碱能和谷氨酸能等神经递质系统的功能障碍有关,导致大脑生化和临床表型的改变^[1]。大量研究表明,抗氧化防御系统的崩溃与精神分裂症密切相关^[2]。目前,常用N-甲基-D-天冬氨酸谷氨酸受体(NMDA-R)拮抗剂如地卓西平(MK-801)、氯胺酮和苯环利定的药理学模型对精神分裂症进行动物机制研究^[3]。重复使用MK-801与自主活动增加、社交退缩和记忆丧失等一系列行为改变相关,曾报道与氧化状态的变化有关^[4]。MK-801的使用与大脑所有区域谷胱甘肽(GSH)/脂质过氧化和髓过氧化物酶活性的增加相关^[5]。多巴胺拮抗剂如利培酮能有效逆转精神分裂症患者阳性症状,但无法改善其认知障碍、社交退缩及与代谢紊乱相关的预期寿命下降^[6]。非典型抗精神病药物可治疗精神分裂症的阳性和阴性症状,但无明确证据表明其比利培酮更有效或耐受性更好^[7]。研究表明,褪黑素参与了精神分裂症的发病过程^[8],精神分裂症、昼夜节律障碍和精神分裂症患者褪黑激素水平的关系^[9]。褪黑素也被用于控制精神分裂

症相关的睡眠障碍和药物相关的迟发性运动障碍,但其治疗精神分裂症的作用机制尚不清楚^[10]。本研究通过腹腔注射MK-801诱导小鼠精神分裂症模型,并给予褪黑素进行干预,以探讨褪黑素通过对大脑氧化应激的影响,发挥减轻精神分裂症模型小鼠行为异常的作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: Sunrise型全自动酶标仪(瑞士Tecan公司);旷场实验设备(北京金盛恒星医疗器械公司); Morris水迷宫装置及 DigBehv 动物行为分析系统(上海吉量软件科技有限公司)。

试剂: 褪黑素和地卓西平马来酸盐(MK-801, 美国Sigma公司, 批号分别为M5250和1001799365); 利培酮(北京天衡药物研究院南阳天衡制药厂, 批号为06-140602); 丙二醛(MDA)试剂盒(批号为A020-2-2), 谷胱甘肽(GSH)试剂盒(批号为A005-1-2), 均购自南京建成生物工程研究所; 一氧化氮(NO)酶联免疫吸

附(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号为ml076941)。

动物:40只C57BL/6小鼠,河北医科大学实验动物中心提供,许可证号为SCXK(冀)2012-0002。

1.2 方法

动物模型制备、分组与给药:选择40只体质量在25~30g的雄性C57BL/6小鼠,于22~24℃、相对湿度为40%~70%、昼夜循环(12h/12h)的SPF环境中自由进食和饮水,适应性喂养1周后进行试验。按随机数字表法将小鼠均分为对照组、模型组、利培酮组和褪黑素组,各10只。模型组、利培酮组和褪黑素组小鼠均给予腹腔注射MK-801(0.1mg/kg),建模成功标准参考SAMS-DODD刻板行为评分标准^[11];对照组腹腔注射生理盐水(0.1mg/kg),选择小鼠左或右(每日交叉)下侧腹部进行注射,连续注射直至试验结束。第15天开始,利培酮组小鼠灌胃给予利培酮(0.025mg/kg),褪黑素组小鼠灌胃给予褪黑素(5mg/kg)^[12],对照组和模型组小鼠灌胃给予等量生理盐水,连续14d后进行相关试验。

社会交往测试:第21天,将小鼠置大小为100cm×100cm×40cm的社交测试箱内进行适应,每天适应5min,第28天给药结束后将模型组、利培酮组和褪黑素组小鼠与对照组小鼠进行两两配对,通过测试箱顶部安装的摄像头对小鼠的社交行为进行记录并分析。测试时间为7min,社交行为分为非攻击性行为(与同伴嗅闻、尾随、社交性玩耍、理毛)和攻击性行为(与同伴踢打、摔跤或打架),计算社交时间与测试时间的比值(%)。

旷场测试:所有小鼠做完社会交往测试后在安静的房间内将小鼠放入旷场实验设备的中心方格内,记录小鼠在10min内穿越格子的次数。

Morris水迷宫测试:第1~14天,小鼠在Morris水迷宫内自由游泳以适应环境,第21天开始对小鼠进行连续7d的水迷宫训练,在末次给药后进行水迷宫测试。

氧化应激指标测定:所有小鼠在做完行为测试后第2天脊髓脱臼处死,分离脑组织,用玻璃匀浆器将脑组织在冰冷的磷酸盐缓冲液中匀浆(1:10,W/V),在5000r/min(4℃)下离心15min,取上清液,根据试剂盒说明书分别检测MDA,GSH,NO的含量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 23.0统计学软件分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行单因素方差分析,组间两两比较用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠社交时间和跨格总数

与对照组比较,模型组、利培酮组和褪黑素组小鼠社交时间减少,跨格总数增加($P < 0.05$);与模型组比

较,利培酮组和褪黑素组小鼠社交时间增加,跨格总数降低($P < 0.05$);利培酮组和褪黑素组小鼠社交时间和跨格总数差异不显著($P > 0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠社交时间和跨格总数比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	社交时间(s)	跨格总数(次)
对照组	62.42 ± 5.61	232.50 ± 28.64
模型组	14.98 ± 2.13 ^a	348.27 ± 19.20 ^a
利培酮组	46.64 ± 4.14 ^{ab}	299.26 ± 16.34 ^{ab}
褪黑素组	44.15 ± 2.24 ^{ab}	302.39 ± 41.28 ^{ab}

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$ 。下表同。

2.2 小鼠学习记忆能力

与对照组比较,模型组、利培酮组和褪黑素组小鼠逃避潜伏期显著延长,穿越平台次数显著减少($P < 0.05$);与模型组相比,利培酮组和褪黑素组小鼠逃避潜伏期显著缩短,穿越平台次数显著增多($P < 0.05$);利培酮组和褪黑素组小鼠逃避潜伏期和穿越平台次数差异不显著($P > 0.05$)。详见表2。

表2 各组小鼠学习记忆能力比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	逃避潜伏期(s)	穿越平台次数(次)
对照组	21.20 ± 3.14	5.31 ± 0.65
模型组	47.19 ± 5.30 ^a	2.07 ± 0.54 ^a
利培酮组	34.46 ± 4.08 ^{ab}	3.86 ± 1.23 ^{ab}
褪黑素组	37.48 ± 6.50 ^{ab}	4.01 ± 0.64 ^{ab}

2.3 小鼠脑组织中MDA,GSH,NO含量

与对照组比较,模型组、利培酮组和褪黑素组小鼠脑组织中MDA和NO含量显著升高,GSH含量显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,利培酮组和褪黑素组小鼠脑组织中MDA和NO含量显著降低,GSH含量显著增高($P < 0.05$);利培酮组和褪黑素组小鼠脑组织中MDA,GSH,NO含量差异不显著($P > 0.05$)。详见表3。

表3 各组小鼠脑组织中MDA,GSH,NO含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MDA(nmol/g)	GSH(nmol/g)	NO(μmol/g)
对照组	25.34 ± 1.16	10.45 ± 0.89	30.06 ± 1.58
模型组	53.27 ± 4.21 ^a	5.25 ± 0.45 ^a	67.94 ± 4.30 ^a
利培酮组	36.26 ± 2.40 ^{ab}	8.12 ± 1.24 ^{ab}	42.52 ± 3.26 ^{ab}
褪黑素组	39.31 ± 5.28 ^{ab}	7.95 ± 0.70 ^{ab}	41.88 ± 3.59 ^{ab}

3 讨论

外源性褪黑激素的作用已被广泛研究。患者白天服用褪黑素可促进睡眠,并在海马区形成类似睡眠的大脑活动模型;外源性褪黑激素在啮齿类动物中有抗惊厥、抗焦虑、抗抑郁、促进记忆的作用^[12]。褪黑素对逆转MK-801诱导的小鼠精神分裂症相关行为和生化变化有好处^[12],明确了褪黑激素作为人类精神分裂症治疗辅助手段的有效性,但关于其作为唯一药物的潜在临床前信息仍然匮乏。MK-801通过NMDA-R的拮抗作

用诱导精神分裂症样症状,通过抑制 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元,导致谷氨酸和多巴胺的可用性增加,导致激发(过度运动)^[13]。本研究中以重复给予NM-DA-R受体拮抗剂MK-801建立了精神分裂症动物模型。利培酮是一种多巴胺(D₂)和5-羟色胺(5HT)_{2A}受体拮抗剂,由于对5-HT_{2A}和 α_1 -肾上腺素能受体的强效拮抗作用,具有抵抗MK-801诱导的过度运动能力,还可通过增加海马乙酰胆碱的释放、内侧前额叶皮层中乙酰胆碱或多巴胺浓度,以抵消MK-801诱导的记忆丧失,逆转与MK-801给药相关的社交或工作记忆缺陷^[14]。褪黑素具有中枢抑制作用(减少运动和梳理毛发),对运动的影响的可能原因是其在神经递质系统中恢复同步的能力,这可能会导致兴奋性和抑制性神经递质活动之间恢复平衡^[15]。褪黑素对大脑具有抗兴奋作用,其抗惊厥作用与褪黑素促进GABA的传递有关,增强GABA能直接抵消MK-801对谷氨酸和多巴胺的影响^[16]。褪黑素的记忆增强作用是通过神经细胞黏附分子(NCAM)的影响,导致重塑突触连接的能力增强而实现的^[17]。本研究结果显示,褪黑素具有中枢抑制作用,可减少开放领域的行为和增加社交能力,改善小鼠的学习记忆能力,抑制小鼠脑部的氧化应激状况。

精神分裂症中存在氧化损伤,氧化损伤也与预后有关,MK-801对大脑抗氧化状态的影响与PAWETCZYK等^[18]的研究结果一致。MK-801给药导致抗氧化活性的改变,GSH减少,NO和MDA(脂质过氧化指数)水平增加^[19]。给予利培酮能逆转氯胺酮诱导的氧化应激,褪黑素能增加大脑GSH活性,并降低脑MDA和NO水平^[20]。褪黑素的抗氧化作用能增加GSH过氧化物酶和还原酶的活性,刺激抗氧化酶清除自由基和中和活性氧/氮物种。褪黑素对脂质过氧化的影响归因于其中和引发脂质过氧化的毒性反应物(LOOH)的能力。褪黑素还对NO有亲和力,其易于渗透到亚细胞区室中,诱导内皮细胞损伤和凋亡^[21]。与标准抗精神病药利培酮相比,褪黑素也具有一定的抗氧化作用,提示其有助于改善与精神分裂症发病相关的氧化应激。

综上所述,褪黑素能逆转MK-801引起的行为变化,其效果与利培酮相当,其作用可能与阻断大脑氧化应激反应有关,可能成为治疗精神分裂症的药物和/或辅助治疗药物,但仍需更多的研究来证明其可作为精神分裂症治疗的潜在药物。

参考文献:

- [1] 程伟. 阿立哌唑联合利培酮治疗难治性精神分裂症临床对照研究[J]. 中国药业,2017,26(7):59-61.
- [2] VIDOVIĆ B, MILOVANOVIĆ S, DORĐEVIĆ B, et al. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress markers and antioxidative defense in patients with schizophrenia[J]. Psychiatr Danub,2014,26(3):205-213.
- [3] 司天梅,陈胜良,郝伟,等. 5-HT_{1A}受体参与常见精神疾病病理机制及5-HT_{1A}受体部分激动剂的潜在治疗效应研究进展[J]. 中国新药与临床杂志,2018,37(9):8-13.
- [4] GUEST PC, IWATA K, KATO TA, et al. MK-801 treatment affects glycolysis in oligodendrocytes more than in astrocytes and neuronal cells: insights for schizophrenia[J]. Front Cell Neurosci, 2015,9:180.
- [5] JI HH, VINOTH KUMAR R, KANG SY, et al. Effects of Flower Buds Extract of Tussilago farfara on Focal Cerebral Ischemia in Rats and Inflammatory Response in BV2 Microglia[J]. Chin J Integr Med,2018,24(11):844-852.
- [6] THOMAS - BROWN PL, MARTIN JS, SEWELL CA, et al. Risperidone Provides Better Improvement of Sleep Disturbances Than Haloperidol Therapy in Schizophrenia Patients With Cannabis - Positive Urinalysis[J]. Front Pharmacol,2018,9:769.
- [7] 李洁,姚贵忠,刘丽娟,等. 非典型抗精神病药物相关代谢不良反应的系统评价和meta-分析[J]. 中国心理卫生杂志, 2015,29(3):210-216.
- [8] 朱凤艳,石夏明,张建新,等. 褪黑素治疗迟发性运动障碍的随机对照研究[J]. 中华精神科杂志,2010,43(1):28-30.
- [9] TAM SK, PRITCHETT D, BROWN LA, et al. Sleep and circadian rhythm disruption and recognition memory in schizophrenia[J]. Methods Enzymol,2015,552:325-349.
- [10] 孙辰辉,郑伟,杨欣湖,等. 褪黑素治疗精神分裂症患者迟发性运动障碍的meta分析[J]. 上海精神医学,2017,29(3):129-136.
- [11] 李晓白,方贻儒,王祖承. 精神分裂症动物模型研究进展[J]. 上海精神医学,2004,16(3):184-185.
- [12] 程丹丹,陈岚芬,陈伟,等. 两种不同褪黑素治疗途径对局灶性脑缺血大鼠行为学及组织病理学的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2018,27(4):310-315.
- [13] CHAWLA MK, SUTHERLAND VL, OLSON K, et al. Behavior - driven Arc expression is reduced in all ventral hippocampal subfields compared to CA1, CA3 and dentate gyrus in rat dorsal hippocampus[J]. Hippocampus,2018,28(2):178-185.
- [14] ROGÓŻ Z, WĄSIK A, LORENC - KOCI E. Combined treatment with aripiprazole and antidepressants reversed some MK-801 - induced schizophrenia - like symptoms in mice[J]. Pharmacol Rep,2018,70(4):623-630.
- [15] LUO C, YANG Q, LIU Y, et al. The multiple protective roles and molecular mechanisms of melatonin and its precursor N - acetylserotonin in targeting brain injury and liver damage and in maintaining bone health[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 130: 215-233.
- [16] AGHDAM MS, FARD JR. Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (Fragaria x ananassa cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity[J]. Food Chemistry,2017,221:1650-1657.
- [17] ONAOLAPO AY, AINA OA, ONAOLAPO OJ. Melatonin attenuates behavioural deficits and reduces brain oxidative stress in a rodent model of schizophrenia[J]. Biomed Pharmacother,