doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.005

氟西汀对 CUS 大鼠抑郁样行为及海马内源性大麻素相关基因表达的调节作用 *

薛姗姗 周翠红 于 欢 赵洁玉 王化宁 彭正午△

（空军军医大学第一附属医院心身科 陕西 西安 710032）

摘要 目的：探讨内源性大麻素 1 型受体（Cannabinoid receptor1，CB1R）、二酰基甘油脂肪酶（Diacylglycerol lipase alpha，DAGLα）和单酰甘油脂肪酶（Monoacylglycerol，MAGL）在氟西汀（Fluoxetine）改善慢性不可预见应激（Chronic unpredictable stress，CUS）大鼠抑郁样行为中的作用。**方法**：在本研究中，给予暴露于慢性不可预测应激（CUS）的大鼠腹腔注射氟西汀（10 mg/kg）或生理盐水治疗 14 天，最后一次腹腔注射结束 24 小时后评估抑郁样行为以及海马中 CB1R，DAGLα 和 MAGL 的表达。此外，通过注射慢病毒下调大鼠海马中 CB1R 和 DAGLα 的表达。病毒注射两周后，所有大鼠接受 CUS 刺激，然后腹腔注射 10 mg/kg 氟西汀或生理盐水 14 天。给药结束 24 小时后进行行为学及分子生物学检测。**结果**：（1）CUS 组大鼠具有明显的抑郁样行为，包括旷场中心活动时间减少（$P<0.05$），糖水摄取量下降（$P<0.05$），强迫游泳不动时间增加（$P<0.01$）；氟西汀治疗可以缓解 CUS 大鼠的抑郁行为，与 CUS 组相比较，CUS + Flx 组大鼠的糖水偏好和旷场中心活动时间增加（$P<0.05$，$P<0.05$），强迫游泳不动时间减少（$P<0.05$）；（2）CUS 组大鼠海马的 CB1R、DAGLα 的表达下调（$P<0.05$），MAGL 的表达上调（$P<0.05$）；氟西汀上调 CUS 大鼠海马的 CB1R 和 DAGLα 表达（$P<0.05$），下调了 MAGL 表达（$P<0.05$）；（3）病毒干预下调海马区的 CB1R 或 DAGLα 后，抑制了氟西汀的抗抑郁作用。**结论**：氟西汀可以通过调节 CUS 大鼠海马的内源性大麻素相关基因表达改善 CUS 大鼠的抑郁行为，发挥抗抑郁作用。

关键词：氟西汀；CUS；抑郁；内源性大麻素

中图分类号：R-33；R338.2；R749 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273（2020）07-1224-06

The Influence of Fluoxetine on the Depressive-like Behavior and the Expression of Endocannabinoid-Related Genes in the Hippocampus of CUS Rats*

XUE Shan-shan, ZHOU Cui-hong, YU Huan, ZHAO Jie-yu, WANG Hua-ning, PENG Zheng-wu△

(Department of Psychosomatic, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of fluoxetine treatment on CUS rat's behavior and the expression of endocannabinoid system-related genes, including CB1R (Cannabinoid receptor1), DAGLα (Diacylglycerol) and MAGL (Monoacylglycerol) in the hippocampus. **Methods:** In the present study, rats exposed to chronic unpredictable stress (CUS) were treated with intraperitoneal injection of fluoxetine (10 mg/kg) or saline for 14 days, and depression-like behaviors and the expression of Cannabinoid receptor1 (CB1R), Diacylglycerol lipase alpha (DAGLα) and Monoacylglycerol (MAGL) in the hippocampus were evaluated twenty-four hours after the last intraperitoneal injection. In addition, we knocked-down CB1R and DAGLα in the hippocampus of rats by lentivirus injection.After the finally intervention, rats were experienced behavior test and then sacrificed and the expression of CB1R and DAGLα in hippocampus were determined. **Results:** (1) CUS group induced significant depression-like behaviors. Rats in CUS group showed significant less time in the center field ($P<0.05$), decreased sucrose preference ($P<0.05$) and increased immobility time in forced swim test ($P<0.01$). In comparison with Sham, the rat in CUS group showed significant decreased sucrose preference ($P< 0.01$) and less center time ($P<0.05$) in open filed test, but increased freezing time in forced swim test ($P<0.05$); as well as the reduction of the expression of CB1R and DAGLα, increasing the expression of MAGL in the hippocampus. (2) The expression of CB1R and DAGLα in hippocampus of CUS group was down-regulated ($P<0.05$), and the expression of MAGL was up-regulated ($P<0.05$). Fluoxetine treatment reversed depressive-like behaviors and increased the expression of CB1R and DAGLα ($P<0.05$), decreased the the expression of MAGL in the hippocampus of CUS rat ($P<0.05$); (3) Rats in shCB1R + CUS + Flx and shDAGLα + CUS + Flx groups showed decreased sucrose preference ($P<0.05$), less cen-

* 基金项目：国家自然科学基金项目(81571309)

作者简介：薛姗姗（1989-），女，硕士，主要研究方向：神经生物学，电话：029-84771141，E-mail: xueshanshanchem@126.com

△ 通讯作者：彭正午（1984-），男，副研究员，主要研究方向：神经生物学，电话：029-84771141，

E-mail: pengzhengwu1446@163.com

（收稿日期：2019-08-28 接受日期：2019-09-23）

ter time (P<0.05) in open filed test and increased freezing time in forced swim test (P<0.05) than rats in scramble + CUS + Flx group. **Conclusions:** Fluoxetine treatment reversed depressive-like behaviors in rats exposed to CUS paradigm and restored the level of CB1R, DAGLα and MAGL1in the hippocampus.

Key words: Fluoxetine; Chronic unpredictable stress; Depressive; Endocannabinoid

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R338.2; R749 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1224-06

前言

抑郁症是严重威胁人类健康的精神疾患之一,具有患病率高、复发率高、致残率高、死亡率高等特点[1,2]。抑郁症不仅严重影响患者、家庭生活质量,同时也给社会造成了巨大的经济损失[3]。目前抑郁症的临床治疗以药物为主,氟西汀是常用的 5-羟色胺再摄取抑制剂(serotonin selective reuptake inhibitors, SSRIs),具有神经保护、抗炎等作用[4]。氟西汀在体内可代谢为诺氟西汀,比其他抗抑郁药有更长的半衰期,其治疗抑郁症的可靠性和安全性已在临床得已证明。但是,氟西汀抗抑郁的生物学机制并不完全清楚。

内源性大麻素系统主要由 G 蛋白偶联受体(CB1R 和 CB2R)和至少两个花生四烯酸衍生内源性配体 N- 花生四烯酸乙醇胺(anandamide,AEA)和 2- 花生酰甘油三酯(2-AG)组成[5]。2-AG 的合成酶为二酰基甘油脂肪酶(Diacylglycerol lipase α,DAGLα),水解酶为单酰基甘油酯酶(Monoacylglycerol lipase,MAGL)。内源性大麻素在大脑中广泛分布,大量临床及基础研究表明内源性大麻素信号是海马突触可塑性和功能的重要调节因子,与抑郁症的发病密切相关[6-9]。并且有研究表明,内源性大麻素与氟西汀对强迫症、焦虑恐惧、神经性厌食症等多种精神疾病的治疗作用有关,氟西汀参与调节动物大脑的大麻素一型受体(Cannabinoid receptor 1,CB1R)和内源性大麻素水平[10,11]。但是氟西汀是否通过调节海马的内源性大麻素系统发挥抗抑郁作用并不清楚。因此,本研究以慢性不可预见应激(Chronic unpredictable stress,CUS)大鼠为模型,观察了氟西汀对 CUS 大鼠抑郁样行为和海马 CB1R 表达和 2-AG 的影响,为抑郁症的治疗提供新的靶点和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验所用动物为 8 周龄左右的清洁级雄性 Sprague-Dawley(280-320 g)大鼠(SD 大鼠),购买自空军军医大学实验动物中心(中国西安)。饲养条件为 20-25℃,12 小时光照 / 黑暗循环(a.m. 8:00 - p.m. 8:00),每笼 4 只,随意获取水和食物(除 CUS 实验)。所有实验操作均符合美国国立卫生研究院实验动物护理与使用指南,并由空军军医大学动物使用和保护委员会批准。

1.1.2 主要试剂和仪器 氟西汀 (Sigma, St. Louis, MO);RNA 提取试剂 Trizol (Takara,108-95-2);反转录试剂盒(Takara,RR036A);SYBR Premix Ex Taq (Takara,RR820A);PCR 仪(Thermo Scientific);蛋白提取试剂盒(KeyGEN BioTECH,KGP2100);慢病毒(对照病毒 scramble,CB1R 和 DAGLα 下调病毒 shCB1R 和 shDAGLα)购自上海吉凯基因公司;PCR 仪(Thermo Scientific);实时定量 PCR 仪(Thermo Scientific Piko-Real);电泳槽(Bio.Rad);电动组织匀浆仪(Ika 公司);大鼠自发活动测试仪(上海吉量)。

1.2 方法

1.2.1 实验设计 实验一:将 24 只 SD 雄性大鼠随机分为 sham 组、CUS 组、CUS + Flx 组,每组 8 只。适应性饲养 7 天后,CUS 组、CUS + Flx 组大鼠给予 CUS 刺激,然后给予 CUS + Flx 组大鼠腹腔注射氟西汀(10 mg/kg)治疗 14 天,其它组注射生理盐水。最后一次腹腔注射结束 24 小时后进行糖水偏好、旷场和强迫游泳测试。随后处死动物,通过实时定量 PCR(real time-PCR)和 western blot 检测海马的 CB1R,DAGLα 和 MAGL 表达变化。

实验二:将 32 只大鼠随机分为四组:scramble + CUS、scramble + CUS + Flx、shCB1R + CUS + Flx、shDAGLα + CUS + Flx,每组 8 只;scramble + CUS、scramble + CUS +Flx 组大鼠海马注射对照病毒(scramble),shCB1R + CUS + Flx 组大鼠海马注射 CB1R 下调病毒 shCB1R,shDAGLα + CUS + Flx 组大鼠海马注射 DAGLα 下调病毒 shDAGLα。病毒注射两周后,所有大鼠接受 CUS 刺激,然后腹腔注射 10 mg/kg 氟西汀或生理盐水 14 天。给药结束 24 小时后进行行为学及分子生物学检测。

1.2.2 CUS 造模 按照随机顺序每天使用 1-2 种以下应激处理方法构建 CUS 模型[12]。(1)改变食物和饮水供应(禁水、禁食 24 h);(2)颠倒昼夜节律和改变光照性质(昼夜颠倒、闪光刺激、间断光照);(3)改变居住环境(潮湿垫料、倾斜鼠笼、单笼饲养);(4)陌生气味;(5)强迫游泳;(6)噪音干扰;(7)短时间内足底电击;(8)束缚应激;(9)陌生异常物品(塑料杯、碎布片、木勺等);(10)高温环境。大鼠每天接受 1-2 种刺激,持续处理 21天。

1.2.3 氟西汀给药 氟西汀溶于生理盐水中配成 5 mg/mL 的溶液(每天注射前现配),在 CUS 造模结束后 24 h 后按照 10 mg/kg/d 的剂量给大鼠腹腔注射氟西汀[13],连续注射 14 天。

1.2.4 立体定位注射 根据以往的的研究方法[14],将大鼠麻醉后(10%的水合氯醛)固定在立体定位以上(37 度保温),剃毛暴露头顶皮肤,碘伏消毒后沿脑中线切开皮肤,参照大鼠脑图谱定位齿状回(AP - 3.0 mm; L+/- 1.8 mm; H 3.6 mm),使用颅骨钻打开该位点颅骨,然后用微量注射泵以 0.2 μL/min 的速度向左右齿状回各注射 2 μL (1× 10^8TU/mL)病毒(对照 scramble 或下调病毒 shCB1R 或 shDAGLα),注射完成后 5 min 再缓慢拔出针头,缝合切口皮肤,细心护理直到其苏醒(约 30-60 min)。正常饲养两周后进行后续实验。

1.2.5 糖水偏好测试(sucrose preference test,SPT) 氟西汀给药结束后 24 h 进行行为学检测。首先将测试动物单笼饲养,第一天给予两瓶 1% 蔗糖水 24 h,第二天同时给予一瓶 1%的蔗糖水和一瓶自来水 24 h,第三天禁水禁食 24 h。第四天进行测

试，测试当天再同时给予两瓶饮水，其中一瓶为自来水（A 瓶），另一瓶为含 1%蔗糖的自来水（B 瓶），测试时间 1 h，计算大鼠在 1h 内的糖水摄取量（A）和自来水（B）的摄取量[15]。糖水偏好%=[A/(A + B)] × 100%。

1.2.6 **旷场实验**（open field test，OFT） 将大鼠放入旷场实验箱中央（47 cm× 47 cm），通过上方的红外摄像头监视并记录大鼠在 5 min 的活动情况。通过 clever sys 软件分析大鼠在旷场内的运动总路程、中央区活动时间及路程等各项行为指标，判断大鼠的水平活动度及探索行为。

1.2.7 **强迫游泳测试**（forced swim test，FST） 测试前一天先将大鼠置于透明塑料桶（水深 30 cm 以上，水温 23℃左右）进行预游泳适应 10 min。测试时，将大鼠置于同样的游泳装置中，游泳 5 min，摄像头记录游泳过程。然后按照大鼠游泳的行为表现分为漂浮不动（四肢中只有一个在轻微的游动）、挣扎和游泳三种状态进行分析，计算大鼠漂浮不动的时间来反映习得性无助行为。

1.2.8 **实时定量** PCR 使用 Trizol 提取海马组织 RNA 后，使用反转录试剂盒合成 cDNA（反转录体系：20 μL；mRNA:1 μg；反应条件：37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 10 min），然后进行实时定量 PCR（Real Time-PCR）反应（反应体系：20 μL；反应条件：第一步 95℃ 30 s，第二步 95℃ 5 s，60℃ 30 s，第二步循环 40 次，第三步 95℃ 15 s，最后维持 4℃），检测 CB1R，DAGLα 和 MAGL 基因以及内参基因 GAPDH 的 mRNA 表达情况。RT-PCR 引物由 Takara 公司合成，序列如表 1 所示。

表 1 Real Time-PCR **引物序列**

Table 1 The sequence primer of Real Time-PCR

Gene	Forward	Reveres
CB1R	CTGAGGGTTCCCTCCCGGCA	TGCTGGGACCAACGGGGAGT
DAGLα	CACGAGATGCTACGCTACAAAGA	GGCAGAGACAACACGAGCA
MAGL	CGGAACAAGTCGGAGGTTGA	TGTCCTGACTCGGGGATGAT
GAPDH	ATGATTCTACCCACGGCAAG	CTGGAAGATGGTGATGGGTT

1.2.9 **Western blot** 收集各组大鼠海马于裂解缓冲液中进行均将裂解，然后使用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定各组蛋白质浓度。然后，通过 SDS-PAGE 凝胶电泳（上样量：40 μg）分离样品并转移到 PVDF 膜上。然后用 5%脱脂奶粉室温摇晃封闭 1 h 后，将膜与以下一抗孵育（4℃，16 h）：CB1R (ab23703, 1:300, Abcam, Cambridge, UK)；DAGLα (ab81984, 1:500, Abcam, Cambridge, UK)；MAGL (ab24701, 1:2000, Abcam, Cambridge, UK)；β-actin antibodies (ab8227, 1:5000, Abcam, Cambridge, UK)。随后在室温条件下分别与以下二抗孵育 2 h：驴抗兔 IgG，1：10,000，Abcam；驴抗小鼠 IgG，1：10,000，Abcam，Cambridge，UK。最后使用 Super Signal West Pico 化学发光液（34077；Thermo Fisher Scientific，Inc。）显示目的蛋白条带并在 Bio-Rad QuantityOne1-D 软件（1709600；Bio-Rad Laboratories，Inc.，Hercules，CA，USA）上分析统计表达情况。

1.3 统计学方法

本实验采用 SPSS19.0 对所得数据进行统计分析，使用表示数据，各组之间的比较使用单因素方差分析，两两数据在比较前进行方差齐性检验，满足方差齐性则采用 LSD-t 检验，方差不齐则采用 Dunnett T 检验，P<0.05 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氟西汀治疗改善 CUS 大鼠的抑郁样行为

本实验通过糖水偏好、旷场和强迫游泳实验检测了各组大鼠的行为改变情况，结果如表 2 所示，各组大鼠进入旷场中心区的运动的时间（F2, 21=7.362, P<0.01）和中心区运动距离比之间存在显著性差异（F2, 21=6.137, P<0.05）。CUS 组大鼠进入旷场中心区的运动时间和运动距离比明显较对照组（Sham）减少（P<0.05; P<0.01）。氟西汀治疗增加了 CUS 大鼠进入旷场中心区的时间和在中心区的运动距离比 (与 CUS 组比 P<0.01; P<0.05)。

强迫游泳实验结果显示，各组大鼠游泳不动时间之间存在显著差异 （F2,21=7.286, P<0.01），CUS 较 sham 组明显增加（P<0.01），CUS + Flx 较 CUS 组明显下降（P<0.05），说明氟西汀能够抑制 CUS 所致大鼠的习得性无助行为。糖水偏好实验结果与强迫游泳结果相似，各组大鼠糖水摄取量存在显著差异（F2, 21=5.992, P<0.05），CUS 组较 sham 组大鼠的糖水摄取明显减少（P<0.05），CUS + Flx 较 CUS 组大鼠糖水摄取明显增加（P<0.05）。说明氟西汀能够缓解 CUS 大鼠的快感缺失行为。以上行为学检测结果表明氟西汀具有抗抑郁作用。

2.2 氟西汀调节大鼠海马的 CB1R、DAGLα 和 MAGL 基因表达

为了进一步阐述氟西汀抗抑郁作用的生物学机制，本实验检测了内源性大麻素受体 CB1R，内源性大麻素 2-AG 的合成酶 DAGLα 和水解酶 MAGL 在各组大鼠海马中的 mRNA 和蛋白表达变化。结果如图 1 所示，CUS 刺激降低的大鼠海马的 CB1R（图 1 A, D）和合成酶 DAGLα（图 1 B, E）的 mRNA 和蛋白水平（与 sham 组比 P<0.05），上调了水解酶 MAGL（图 1 C, F）表达（与 sham 组比 P<0.05）。而氟西汀治疗明显上调了 CUS 大鼠海马的 CB1R 和 DAGLα 表达 （CUS+Flx 组与 CUS 组比 P<0.05），下调了 MAGL 水平（CUS+Flx 组与 CUS 组比 P<0.05）。表明氟西汀治疗对海马的内源性大麻素系统具有调节作用。

2.3 shRNA 病毒干扰下调海马 CB1R 或 DAGLα 后阻断氟西汀对 CUS 大鼠的抑郁样行为的改善作用

为进一步验证内源性大麻素信号在氟西汀治疗抑郁症中的作用，我们通过病毒干扰技术下调了大鼠海马的大麻素受体 CB1R 和二酰基甘油脂肪酶基因表达，然后进行 CUS 造模，之后再给氟西汀治疗。结果如表 3 所示，scramble + CUS + Flx 组中央区运动距离比、中央区探索时间高于 scrambl e + CUS（P <

0.05)；shCB1R + CUS + Flx 组和 shDAGLα + CUS + Flx 的中央区运动距离百分比、中央区探索时间均低于 scramble + CUS + Flx 组（P<0.05）。scramble + CUS + Flx 组糖水摄取值高于 scramble + CUS 组（P<0.01)；shCB1R + CUS + Flx 组和 shDAGLα + CUS + Flx 组糖水摄取值均低于 scramble + CUS + Flx 组(P<0.05)。此外，scramble + CUS + Flx 组强迫游泳不动时间低于 scramble + CUS 组(P<0.01)；shCB1R + CUS + Flx 组和 shDAGLα + CUS + Flx 组的强迫游泳不动时间均高于 scramble + CUS +Flx 组(P<0.05)。Real-time PCR 和 western blot 结果显示(图 2)，shCB1R + CUS + Flx 组大鼠海马的 CB1R 表达明显低于 scramble + CUS + Flx 组(P<0.01)，shDAGLα + CUS + Flx 组大鼠海马的 DAGLα 表达明显低于 scramble + CUS + Flx 组(P<0.01)。说明 shRNA 干扰病毒下调大鼠海马 CB1R 或 DAGLα 后阻断了氟西汀的抗抑郁作用。

表 2 各组大鼠行为学的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 The antidepressant-like effect of fluoxetine on CUS rats($\bar{x}\pm s$)

Groups	Amount	The open-field test		The percentages of sucrose consumption (%)	The duration of immobility in the forced swim test(s)
		The distance of central movement relative to overall levels values(%)	The time of central movement(s)		
Sham	8	13.5± 1.43	79.81± 8.57	72.16± 6.37	83.14± 11.02
CUS	8	7.79 ± 0.93[b]	46.32 ± 6.12[a]	45.83 ± 5.84[a]	143.60 ± 13.31[b]
CUS+Flx	8	12.28 ± 1.23[c]	72.66 ± 4.02[d]	68.84 ± 5.32[c]	100.60 ± 9.99[c]
F value		6.137	7.362	5.992	7.286
P value		0.0113	0.0082	0.0157	0.0048

Note: Compared with Sham [a]P<0.05, [b]P<0.01; Compared with CUS [c]P<0.05, [d]P<0.01.

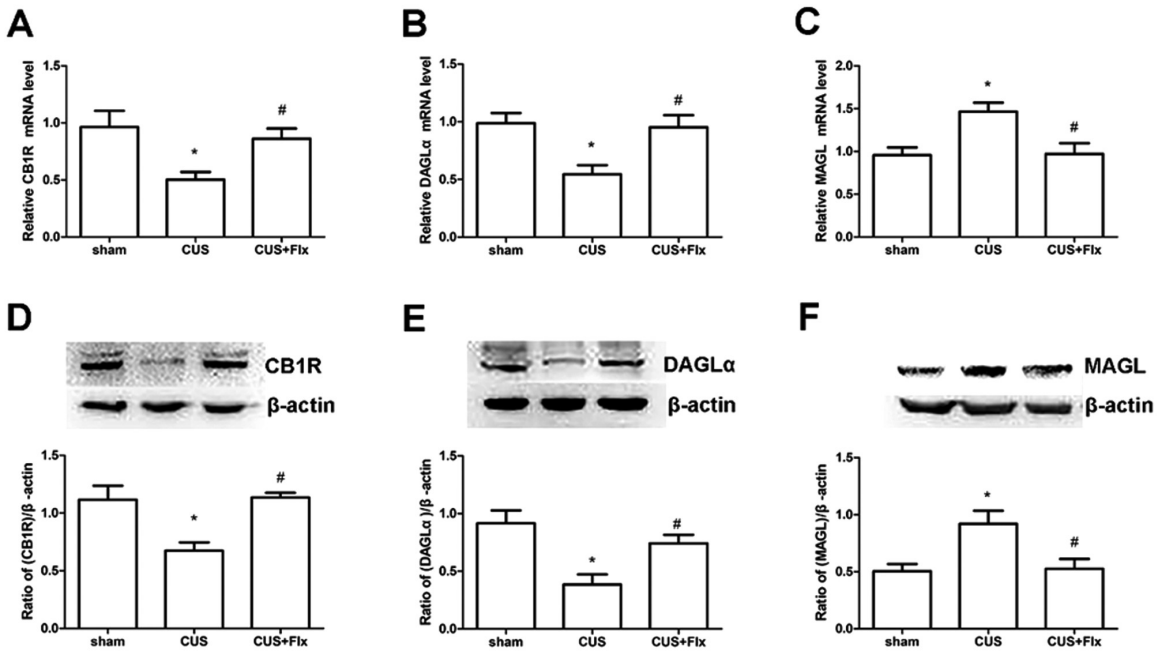

图 1 氟西汀调节 CUS 大鼠海马的 CB1R，DAGLα 和 MAGL基因表达。(A-C)sham，CUS，CUS+Flx 三组大鼠海马的 CB1R，DAGLα 和 MAGL mRNA 水平比较；(D-E)各组大鼠海马的CB1R，DAGLα 和 MAGL 蛋白水平变化。注：与 sham 组比 *P<0.05；与 CUS 组比 #P<0.05。

Fig.1 Effect of fluoxetine on the expression of CB1R, DAGLα and MAGL in the hippocampus of CUS rats. (A-C) Relative mRNA level of CB1R, DAGLα and MAGL in sham, CUS and CUS+Flx groups; (D-E) Representative immunoblots and densitometry analysis of (D) CB1R, (E) DAGLα and (F) MAGL expression in the total hippocampus of sham, CUS and CUS+Flx. *P<0.05, vs. sham; #P< 0.05, *P<0.05, vs. CUS.

3 讨论

内源性大麻素系统参与维持进食行为、睡眠 - 觉醒周期和激活奖赏回路。研究表明，内源性大麻素系统在多种情感障碍中发挥调节功能，包括抑郁情绪、失眠或嗜睡、食欲下降或增加等[16]。内源性大麻素受体广泛分布于压力调节和情绪的大脑区域，如前额皮质、下丘脑和海马，而且 2-AG 具有调节神经营养和突触可塑性的功能，并且参与奖赏、动机和情感过程[17-19]。另一方面，内源性大麻素与 5-HT 系统存在相互调节作用。5-HT 可以影响 CB1R 与 G 蛋白第二信使的结合过程，而且中枢 5-HT 活性的降低还可以抑制 CB1 受体激动剂对动物行为的影响[20,21]。已有大量的研究证实，CB1R 拮抗剂可导致抑郁样行为的增加，具有中枢 CB1R 激动剂活性的合成大麻素则减轻了动物模型中的抑郁样行为 [22]，CB1R 基因缺陷小鼠则表现出来

明显的抑郁样行为[23]；此外，2-AG 是 CB1 受体完全激动剂[16]，MAGL 抑制剂 JZL184 通过对 2-AG 降解的抑制可以起到一定的抗抑郁作用[24]。因此，CB1R 和 2-AG 在维持精神系统稳态中具有重要作用，对二者进行调节是治疗抑郁症的 2-AG 可能靶点之一[25]。

表 3 各组大鼠行为学的比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 3 The antidepressant-like effect of fluoxetine was blocked by shCB1R or shDAGLα（$\bar{x}\pm s$）

Groups	Amount	The open-field test		The percentages of sucrose consumption (%)	The duration of immobility in the forced swim test(s)
		The distance of central movement relative to overall levels values(%)	The time of central movement(s)		
scramble + CUS	8	10.43± 0.92	52.43 ± 4.22	39.29 ± 3.13	149.30± 15.87
scramble+CUS+Flx	8	15.98 ± 0.68[a]	8.55 ± 5.95[b]	70.23 ± 7.06[b]	80.71 ± 7.60[b]
shCB1R+CUS+Flx	8	10.76 ± 1.66[c]	59.11 ± 7.90[c]	47.75 ± 4.50[c]	127.50 ± 11.99[c]
shDAGLα+CUS+Flx		11.35 ± 0.87[c]	63.59 ± 6.52[c]	49.07 ± 4.52[c]	133.90 ± 11.78[c]
F value		5.572	5.554	6.918	5.895
P value		0.0082	0.0061	0.0022	0.0037

Note: Compared with scramble+CUS [a]P<0.05, [b]P<0.01; Compared with scramble+CUS+Flx [c]P<0.05.

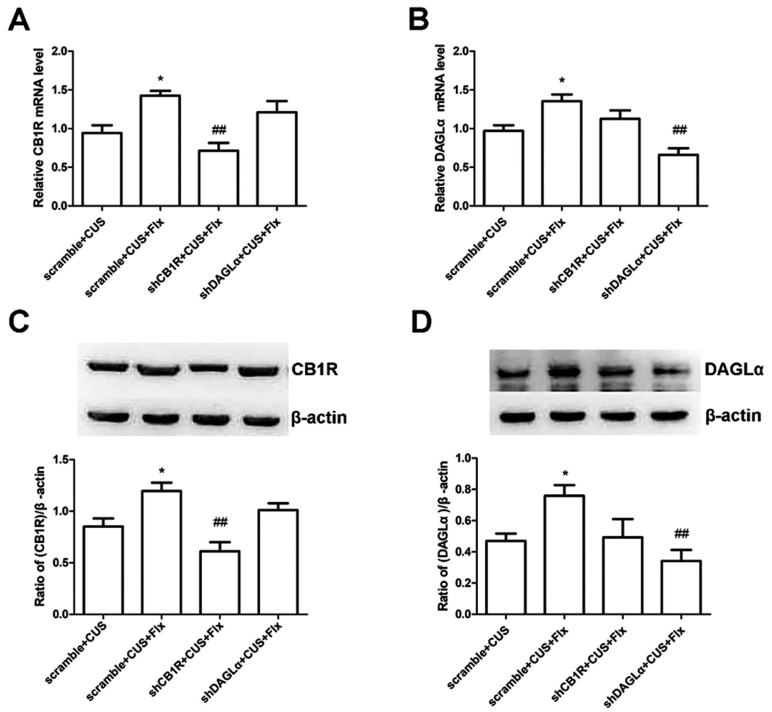

图 2 shRNA 病毒干扰下调大鼠海马的 CB1R 和 DAGLα 表达。（A, C）注射 shCB1R 病毒的大鼠海马的 CB1R mRNA 和蛋白表达下调；（B, D）注射 shDAGLα 病毒的大鼠海马的 DAGLα mRNA 和蛋白表达下调。注：与 scramble + CUS 组比 *P<0.05；与 scramble+CUS+ Flx 组比 ##P<0.01。

Fig.2 CB1R and DAGLα were down-regulated in the dentate gyrus of rats by shCB1R or shDAGLα lentivirus injection. (A, B) Relative mRNA level of CB1R1and DAGLα in rats after lentivirus injection; (C, D) Representative immunoblots and densitometry analysis of (C) CB1R and (D) DAGLα expression in the total hippocampus of scramble + CUS, scramble + CUS + Flx, shCB1R + CUS + Flx and shDAGLα + CUS + Flx. *P<0.05, vs. scramble + CUS; ##P<0.01, vs. scramble+CUS+ Flx.

海马是记忆获取和消退过程中的重要部位，而且其结构和功能异常与学习认知功能障碍以及焦虑抑郁情绪的发生密切相关[26]。分子机制研究发现，2-AG 水平和 CB1R 的功能是介导海马神经发生、焦虑恐惧行为和应激反应的关键分子[27,28]。2-AG 是机体内自然产生的内源性大麻素配体之一，主要由二酰基甘油脂肪酶（DAGLα）合成，由单酰基甘油脂肪酶（MAGL）降解[29]。已有研究发现，2-AG 可以通过刺激海马星形胶质细胞 CB1R，引起谷氨酸能神经元产生长时程增强效应，同时也可以作用于 GABA 能神经元 CB1R 并产生去极化诱导抑制，调节海马的突触可塑性并发挥抗抑郁作用[30]。我们的前期研究也证实，CUS 模型海马的 CB1R 表达水平降低，而有效的重复经颅磁刺激（repetitive transcranial magnetic stimulation，rTMS）干预在改善该模型抑郁样行为的同时，也上调了 CB1R 的表达水平，而在 rTMS 干预之前给予 CB1R 的拮抗剂 AM251

则可以抑制 rTMS 的抗抑郁作用[31]。我们进一步的研究还发现，CUS 大鼠海马 CB1R 和 DAGLα 的表达下调；通过慢病毒转染下调 CB1R 和 DAGLα 的表达，则可以抑制 rTMS 的抗抑郁作用[32]。因此，海马的 CB1R 和 DAGLα 表达变化对抑郁样行为具有重要的调节作用。

氟西汀是目前临床常用的抗抑郁药物[33]。其作用的主要机制是通过选择性地抑制 5-HT 转运体，上调突触间隙 5-HT 的浓度发挥抗抑郁作用。已有报道氟西汀慢性干预在提高突触 5-HT 浓度的同时，也增强了 CB1 受体的活性[34]。与此一致，本研究发现氟西汀治疗可以缓解 CUS 大鼠的抑郁行为，上调了海马中 DAGLα 和 CB1R 的表达水平，抑制了 MAGL 的表达。但是病毒干预下调海马的 CB1R 或 DAGLα 后，则抑制了其抗抑郁作用。提示氟西汀可能通过影响海马中 2-AG 的合成，抑制其降解，从而引起 CB1R 的活化而发挥抗抑郁的作用。

综上所述，我们的研究结果表明氟西汀治疗缓解了 CUS 大鼠的抑郁行为，这一作用可能与其上调了海马中 2-AG 的合成和 CB1R 蛋白表达有关。然而，不同剂量和时程氟西汀干预对海马 2-AG 的合成和 CB1R 表达的影响以及氟西汀对 eCB 作用的细胞机制还有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] Moussavi S., Chatterji S., Verdes E., et al. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys [J]. Lancet, 2007, 370(9590): 851-858

[2] 黄良峰, 陈洋洋, 赵炳功, 等. 抑郁症的成因及其新药治疗研究进展 [J].现代生物医学进展, 2018, 18(1): 180-186

[3] Yach D., Hawkes C., Gould C. L., et al. The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control [J]. Jama, 2004, 291(21): 2616-2622

[4] Lee J. Y., Lee H. E., Kang S. R., et al. Fluoxetine inhibits transient global ischemia-induced hippocampal neuronal death and memory impairment by preventing blood-brain barrier disruption [J]. Neuropharmacology, 2014, 79: 161-171

[5] Ibarra-Lecue I., Pilar-Cuellar F., Muguruza C., et al. The endocannabinoid system in mental disorders: Evidence from human brain studies [J]. Biochemical pharmacology, 2018, 157: 97-107

[6] Steenkamp M. M., Blessing E. M., Galatzer-Levy I. R., et al. Marijuana and other cannabinoids as a treatment for posttraumatic stress disorder: A literature review [J]. Depression and anxiety, 2017, 34(3): 207-216

[7] Hill M. N., Mclaughlin R. J., Bingham B., et al. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(20): 9406-9411

[8] Wang W., Trieu B. H., Palmer L. C., et al. A Primary Cortical Input to Hippocampus Expresses a Pathway-Specific and En docannabinoid-Dependent Form of Long-Term Potentiation [J]. eNeuro, 2016, 3 (4)

[9] Yin A. Q., Wang F., Zhang X. Integrating endocannabinoid signaling in the regulation of anxiety and depression [J]. Acta pharmacologica Sinica, 2019, 40(3): 336-341

[10] Gunduz-Cinar O., Flynn S., Brockway E., et al. Fluoxetine Facilitates Fear Extinction Through Amygdala Endocannabinoids [J]. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 2016, 41(6): 1598-1609

[11] Zarate J., Churruca I., Pascual J., et al. Brain endocannabinoid system is involved in fluoxetine-induced anorexia [J]. Nutritional neuroscience, 2008, 11(3): 111-118

[12] Chen Y. H., Zhang R. G., Xue F., et al. Quetiapine and repetitive transcranial magnetic stimulation ameliorate depression-like behaviors and up-regulate the proliferation of hippocampal-derived neural stem cells in a rat model of depression: The involvement of the BDNF/ERK signal pathway [J]. Pharmacology, biochemistry, and behavior, 2015, 136: 39-46

[13] Wang Y., Chang T., Chen Y. C., et al. Quetiapine add-on therapy improves the depressive behaviors and hippocampal neurogenesis in fluoxetine treatment resistant depressive rats [J]. Behavioural brain research, 2013, 253: 206-211

[14] Xue F., Xue S. S., Liu L., et al. Early intervention with electroacupuncture prevents PTSD-like behaviors in rats through enhancing hippocampal endocannabinoid signaling [J]. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 2019, 93: 171-181

[15] Liu M. Y., Yin C. Y., Zhu L. J., et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice [J]. Nature protocols, 2018, 13(7): 1686-1698

[16] Hill M. N., Hillard C. J., Bambico F. R., et al. The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressants[J]. Trends in pharmacological sciences, 2009, 30(9): 484-493

[17] Patel S., Hillard C. J. Role of endocannabinoid signaling in anxiety and depression [J]. Current topics in behavioral neurosciences, 2009, 1: 347-371

[18] Wilson R. I., Kunos G., Nicoll R. A. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus [J]. Neuron, 2001, 31(3): 453-462

[19] Bluett R. J., Baldi R., Haymer A., et al. Endocannabinoid signalling modulates susceptibility to traumatic stress exposure [J]. Nature communications, 2017, 8: 14782

[20] Devlin M. G., Christopoulos A. Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum [J]. Journal of neurochemistry, 2002, 80(6): 1095-1102

[21] Szucs E., Dvoracsko S., Tomboly C., et al. Decreased CB receptor binding and cannabinoid signaling in three brain regions of a rat model of schizophrenia [J]. Neuroscience letters, 2016, 633: 87-93

[22] Shen C. J., Zheng D., Li K. X., et al. Cannabinoid CB1 receptors in the amygdalar cholecystokinin glutamatergic afferents to nucleus accumbens modulate depressive-like behavior [J]. Nature medicine, 2019, 25(2): 337-349

[23] Valverde O., Torrens M. CB1 receptor-deficient mice as a model for depression[J]. Neuroscience, 2012, 204: 193-206

[24] 孙大龙. 内源性大麻素系统在抑郁症发生机制中的作用 [D]; 山东大学, 2011

[25] Hill M. N., Gorzalka B. B. Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? [J]. Behavioural pharmacology, 2005, 16(5-6): 333-352

(下转第 1252 页)

[16] Gangadaran P, Rajendran R L, Lee H W, et al. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia [J]. J Control Release, 2017, 264: 112-126

[17] Bai H, Lei K, Huang F, et al. Exo-circRNAs: a new paradigm for anticancer therapy[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 56

[18] Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 24): 5553-5565

[19] Wu J, Kuang L, Chen C, et al. miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis [J]. Biomaterials, 2019, 206: 87-100

[20] Wei Y, Wu Y, Zhao R, et al. MSC-derived sEVs enhance patency and inhibit calcification of synthetic vascular grafts by immunomodulation in a rat model of hyperlipidemia [J]. Biomaterials, 2019, 204: 13-24

[21] Liao Z, Luo R, Li G, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells modulate endoplasmic reticulum stress to protect against nucleus pulposus cell death and ameliorate intervertebral disc degeneration in vivo [J]. Theranostics, 2019, 9(14): 4084-4100

[22] Rong X, Liu J, Yao X, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/β-catenin pathway [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2019, 10 (1): 98

[23] Jin Y, Wang J, Li H, et al. Extracellular Vesicles Secreted by Human Adipose-derived Stem Cells (hASCs) Improve Survival Rate of Rats with Acute Liver Failure by Releasing lncRNA H19 [J]. EBio Medicine, 2018, 34: 231-242

[24] Guo S, Perets N, Betzer O, et al. Intranasal Delivery of Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Loaded with Phosphatase and Tensin Homolog siRNA Repairs Complete Spinal Cord Injury[J]. ACS Nano, 2019

[25] Yanning L, Guohua L, Aichun L, et al. AMSC-derived exosomes alleviate lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure by miR-17-mediated reduction of TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in macrophages[J]. EBioMedicine, 2018, 36: 140-150

[26] Triantafyllou E, Pop O T, Possamai L A, et al. MerTK expressing hepatic macrophages promote the resolution of inflammation in acute liver failure[J]. Gut, 2018, 67(2): 333-347

（上接第 1229 页）

[26] Hill A. S., Sahay A., Hen R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors [J]. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 2015, 40(10): 2368-2378

[27] Bedse G., Hartley N. D., Neale E., et al. Functional Redundancy Between Canonical Endocannabinoid Signaling Systems in the Modulation of Anxiety [J]. Biological psychiatry, 2017, 82(7): 488-499

[28] Jenniches I., Ternes S., Albayram O., et al. Anxiety, Stress, and Fear Response in Mice With Reduced Endocannabinoid Levels [J]. Biological psychiatry, 2016, 79(10): 858-868

[29] Bennett M. R., Arnold J., Hatton S. N., et al. Regulation of fear extinction by long-term depression: The roles of endocannabinoids and brain derived neurotrophic factor [J]. Behavioural brain research, 2017, 319: 148-164

[30] Wang Y., Gu N., Duan T., et al. Monoacylglycerol lipase inhibitors produce pro- or antidepressant responses via hippocampal CA1 GABAergic synapses[J]. Molecular psychiatry, 2017, 22(2): 215-226

[31] Wang H. N., Wang L., Zhang R. G., et al. Anti-depressive mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation in rat: the role of the endocannabinoid system [J]. J Psychiatr Res, 2014, 51: 79-87

[32] Xue S S, Xue F, Ma Q R, et al. Repetitive high-frequency transcranial magnetic stimulation reverses depressive-like behaviors and protein expression at hippocampal synapses in chronic unpredictable stress-treated rats by enhancing endocannabinoid signaling [J]. Pharmacology, biochemistry, and behavior, 2019, 184: 172738

[33] 吴光源. 抗抑郁药发展历程与氟西汀的应用 [J]. 中国心理卫生杂志, 2017, 31(12): 3

[34] J.M. Oliva, L. Urigüen, S. Pérez-Rial, et al. Chronic treatment with fluoxetine produced time realted alterations in opioid, cannabinoid and tirosine hydroxilase gene expression in selected regions of the rat brain[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2003