

◇ 药学研究 ◇

氟西汀对皮质酮诱导 Nesfatin-1 含量升高的影响

徐亚运¹, 陈征², 葛金芳², 陈飞虎²

(1. 合肥市第四人民医院药剂科, 安徽 合肥 230022; 2. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032)

摘要:目的 观察氟西汀对皮质酮诱导的 SH-SY5Y 细胞株中下丘脑摄食调节因子 Nesfatin-1 含量升高的影响。方法 采用体外培养细胞的方法, 建立 SH-SY5Y 细胞皮质酮损伤模型, 设氟西汀给药组 ($10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、皮质酮组和阴性对照组, 采用实时荧光定量 PCR、Western blot 和免疫组化的方法观察细胞中 Nesfatin-1 mRNA 及蛋白表达的变化。结果 与对照组相比, 皮质酮组细胞 Nesfatin-1 mRNA 和蛋白含量均显著升高; 氟西汀 ($10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后 Nesfatin-1 mRNA 和蛋白含量均显著降低。结论 氟西汀体外用药能够逆转皮质酮诱导的 SH-SY5Y 细胞 Nesfatin-1 表达上调。

关键词: 皮质酮; 氟西汀; Nesfatin-1; 神经母细胞瘤 SH-SY5Y

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.08.005

Effect of fluoxetine on the increased content of Nesfatin-1 induced by corticosterone in the SH-SY5Y cell

XU Yayun¹, CHEN Zheng², GE Jinfang², CHEN Feihu²

(1. Department of Pharmacy, Hefei Fourth People's Hospital, Hefei, Anhui 230022, China;

2. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of fluoxetine on the increased content of Nesfatin-1 induced by corticosterone in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell. **Methods** Using SH-SY5Y cell line to establish corticosterone-induced SH-SY5Y cell injury model. We designed five groups of fluoxetine ($10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), corticosterone group and control group. Real-time PCR, western blot and immunohistochemistry were used to measure the mRNA and protein expressions of Nesfatin-1. **Results** The mRNA and protein expressions of Nesfatin-1 in the corticosterone group were higher than those of the control group. The mRNA and protein expressions of Nesfatin-1 in the fluoxetine group were lower than those of the corticosterone group. **Conclusion** The increased content of Nesfatin-1 induced by the corticosterone treatment could be decrease by the fluoxetine treatment.

Key words: Corticosterone; Fluoxetine; Nesfatin-1; SH-SY5Y cell

抑郁症是一种以情感低落, 行为绝望为主要特征的精神疾病, 人群患病率达到 4% ~ 16%, 已经成为严重危害人类健康的公共卫生问题之一^[1]。Nesfatin-1 作为一种新型的摄食调节因子主要在中枢系统发挥作用^[2]。人群研究证实在患有重度抑郁症患者的血浆中 Nesfatin-1 的水平较正常受试者显著升高^[3], 与之一致的是, 本课题组前期研究显示急性应激刺激可导致大鼠血浆和下丘脑中 Nesfatin-1 的含量显著升高^[4], 并且腹腔注射 Nesfatin-1 能够激活下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴), 进而导致大鼠产生抑郁样的行为改变^[5]。以

上研究结果表明, Nesfatin-1 可能与抑郁症的发病机制密切相关。应激反应及其伴随的 HPA 轴的功能亢进近年来被认为在抑郁症的发病机制中发挥着重要的作用^[1]。皮质酮是 HPA 轴的终末效应激素, 采用皮质酮刺激可模拟抑郁症的 HPA 轴过度激活状态, 是抑郁症细胞模型的常用手段之一^[6]。本研究采用皮质酮体外刺激人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞, 在此基础上给予目前临床常用的抗抑郁药物氟西汀, 观察 Nesfatin-1 表达的改变, 旨在为更为深入地揭示 Nesfatin-1 与抑郁症之间的关联并为氟西汀治疗抑郁症的作用机制提供更新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 氟西汀及皮质酮均为美国 Sigma 公司产品。

基金项目: 国家自然科学基金 (81401122)

作者简介: 徐亚运, 男, 硕士研究生

通信作者: 陈飞虎, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药理学, E-mail:

cfhchina@sohu.com

1.1.2 仪器 NB-100 倒置显微镜为江苏宁波永新公司产品,PCR 扩增仪为德国 Eppendorf 公司产品。

1.1.3 细胞 SH-SY5Y 细胞株由安徽医科大学基础医学院药理教研室提供。

1.1.4 试剂 胰酶为美国 Sigma 公司产品,DMEM 和胎牛血清均为 Hyclone 公司产品,TRIzol 和反转录试剂盒均为 Sigma 公司产品,RNA 提取试剂盒为 Promega 公司产品,扩增试剂盒为 Promega 公司产品,兔 Nesfatin-1 抗体为美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司产品,兔 β -actin 抗体为美国 Delaware 公司产品,辣根酶标记山羊抗兔二抗为北京中杉金桥公司产品,免疫组化试剂盒为北京诺博莱德科技有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 从液氮罐中取出冻存的 SH-SY5Y 细胞株,迅速置于 37 ℃ 的水浴锅内并不断摇晃 1 min,使细胞冻存液尽快溶解,溶解后将冻存管在离心机中以 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 3 min,弃掉上清,将细胞用 DMEM 培养基重悬于培养瓶中,轻轻将细胞吹散,放于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。取对数期生长的细胞置于 12 孔细胞培养板中,将细胞按照 2×10^5 个/孔的密度铺板,继续培养 12 h,使细胞状态稳定。加入皮质酮(终浓度为 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)刺激细胞,同时设阴性对照组。12 h 后,给予不同浓度氟西汀(终浓度 $10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),继续培养 24 h。

1.2.2 RNA 的提取、cDNA 的合成和实时荧光定量 PCR 细胞总 RNA 提取采用 Promega 公司 RNA 提取试剂盒,使用 Sigma 公司的反转录试剂盒合成 cDNA。按照说明书操作。实时荧光定量 PCR 采用 SYBERGreen1 的方法,实验中所涉及到的引物序列见表 1,反应体系包括:10 μL MasterMix,上下游引物各 0.5 μL ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),30 ng 模板 DNA,用 ddH₂O 补足至 20 μL 。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法分析数据。

表 1 RT-PCR 使用的引物

基因	序列(5'-3')
Nesfatin-1	CAAGGGAAAAATCTGGGCCG
	ACAGTACCGTGCTTGGATGG
β -actin	TTGCTGACAGGATGCAGAA
	ACCAATCCACACAGAGTACTT

1.2.3 Western blot 法 按试剂盒说明采用 RIPA 裂解法提取细胞质中的蛋白质。然后用所提取的蛋白做 Western blot。每个样品孔中加入 20 μL 蛋白,蛋白用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转到

硝化纤维膜上。用封闭液(5% 脱脂奶粉)封闭。一抗(兔 Nesfatin-1 抗体,1:1 000 稀释)4 ℃ 孵育过夜。次日用 TBST ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.05% Tween-20, pH 为 7.5)洗涤 4 次,在辣根酶标记山羊抗兔二抗(1:10 000 稀释)孵育,洗膜后进行化学发光。以 β -actin 为内参来反映上样量的一致。

1.2.4 免疫组化 氟西汀作用 24 h 后,弃去细胞培养基,按免疫组化试剂盒说明书进行操作。依次加入 TritonX-100,3% 过氧化氢和 10% 山羊血清。弃去血清,加入 Nesfatin-1 一抗(1:500 稀释),4 ℃ 孵育过夜。次日加入生物素标记的二抗(1:1 000 稀释)。显色液 DAB 显色,苏木素复染,显微镜下观察。镜下观察爬片显示细胞质内有浅黄、棕黄或更深的棕褐色染色为 Nesfatin-1 阳性细胞标志,根据染色程度和阳性细胞的数量所占观察视野细胞总数的百分比,判断结果分为 3 个等级,强阳性(++) :细胞着色呈深棕黄色或者更深的棕褐色和阳性细胞数 >50%,记 3 分;中度阳性(+) :阳性细胞数及显色强度介于弱阳性与强阳性之间,记 2 分。弱阳性(+) :细胞着色呈淡黄色和仅个别细胞染色,阳性细胞数为 <5%,记 1 分。阴性(-) :未见阳性染色细胞,记 0 分。每张切片至少观察 5 个视野。

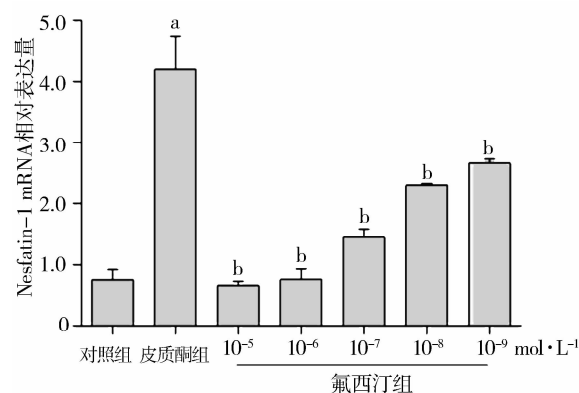
1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计分析软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氟西汀对皮质酮诱导的 Nesfatin-1 mRNA 表达的影响 与对照组相比,皮质酮组 Nesfatin-1 mRNA 表达显著升高,且差异有统计学意义($F = 12.35, P < 0.001$)。与皮质酮组相比,氟西汀组($10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Nesfatin-1 mRNA 含量均显著降低,且差异有统计学意义($F = 12.35, P < 0.001$),提示氟西汀可以降低由皮质酮诱导的 Nesfatin-1 mRNA 含量的升高。见图 1。

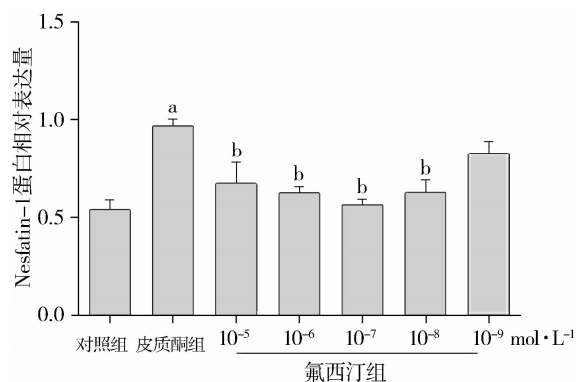
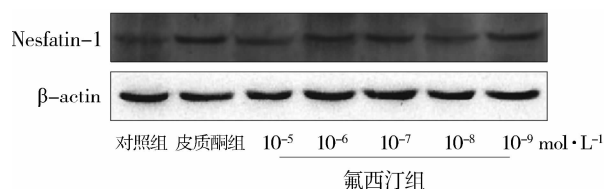
2.2 氟西汀对皮质酮诱导的 Nesfatin-1 蛋白含量变化的影响 Western blot 法检测 Nesfatin-1 蛋白表达的结果见图 2。与对照组相比,皮质酮组 Nesfatin-1 蛋白含量的变化显著升高,且差异有统计学意义($F = 6.16, P = 0.002$),说明皮质酮刺激可以升高 SH-SY5Y 细胞中 Nesfatin-1 蛋白的含量。与皮质酮组相比,氟西汀组($10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Nesfatin-1 蛋白含量均显著降低,且差异有统计学意义($F =$

6.16, $P=0.002$),提示氟西汀可以降低由皮质酮导致的 Nesfatin-1 蛋白含量的升高。



注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与皮质酮组相比,^b $P<0.01$ 。

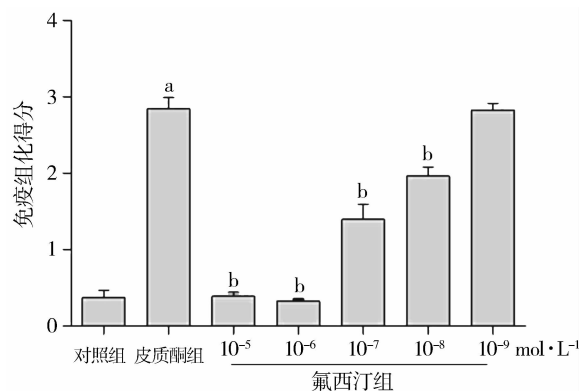
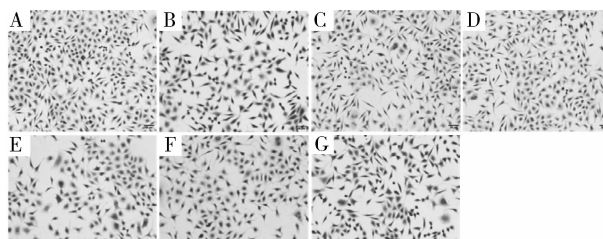
图1 氟西汀对皮质酮导致的 Nesfatin-1 mRNA 含量变化的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)



注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与皮质酮组相比,^b $P<0.01$ 。

图2 Western blot 法检测氟西汀对皮质酮诱导的 Nesfatin-1 蛋白含量变化的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

免疫组化法检测 Nesfatin-1 蛋白表达的结果见图3。与对照组相比,皮质酮组细胞呈棕黄或更深的棕褐色染色,提示 Nesfatin-1 蛋白含量的变化显著升高,且差异有统计学意义($F=8.23, P<0.001$)。随着氟西汀给药剂量的增加,细胞内棕褐色染色逐渐减淡,提示氟西汀可以降低由皮质酮导致的 Nesfatin-1 蛋白含量的升高,且氟西汀组($10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与皮质酮组相比,差异有统计学意义($F=8.23, P<0.001$)。



注:A. 对照组,B. 皮质酮组,C. ~G. 氟西汀组($10^{-5} \sim 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);与对照组相比,^a $P<0.01$;与皮质酮组相比,^b $P<0.01$ 。

图3 免疫组化法检测氟西汀对皮质酮诱导的 Nesfatin-1 蛋白含量变化的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

3 讨论

抑郁症已经成为危害人类身心健康的一类重大精神类疾病,根据世界卫生组织的预测,到2030年抑郁症将成为全球首位疾病负担。然而目前抗抑郁的药物并非对所有的抑郁症患者均有治疗作用,并且存在治疗周期长、副作用大等缺点。因此,深入探讨抑郁症的发病机制积极寻找高效低毒且治疗潜伏期短的新型抗抑郁药物成为近期研究的热点。

近些年来,应激反应及其导致的 HPA 轴功能亢进被广泛认为在抑郁症的发病机制中发挥着重要的作用。大量的研究也利用皮质酮在体内和体外构建抑郁症模型^[6-7],因此,结合前期试验的结果,在本研究中,我们采用 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的皮质酮来刺激人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株,使细胞处于一种应激状态。

Nesfatin-1 作为一种新型的摄食抑制因子,最初被发现于下丘脑中。随着研究的深入,在海马、脑干、胃肠道、胰腺等器官组织中均发现有表达,提示 Nesfatin-1 可能具有广泛的生理活性。近年来,Nesfatin-1 与应激反应以及抑郁症的关联成为研究者关注的热点。临床前实验表明受到束缚应激的大鼠,其中缝核、蓝斑核 Nesfatin-1 的表达均显著上调^[8],并且在急性应激构建的大鼠抑郁症模型中 Nesfatin-

1 的血浆含量显著升高^[4]。形态学研究则显示 Nesfatin-1 与促肾上腺素释放因子(CRH)等存在共定位表达的现象^[9]。临床研究也证实在重症抑郁症患者血浆中,Nesfatin-1 水平较正常受试者显著升高^[3]。与之一致的是,本课题组前期动物实验发现外周给予 Nesfatin-1 能够激活大鼠 HPA 轴,进而导致大鼠产生抑郁样行为改变,细胞实验显示 Nesfatin-1 与 CRH 在 SH-SY5Y 细胞中存在共表达现象^[5]。本研究结果表明,皮质酮体外刺激 SH-SY5Y 细胞可导致 Nesfatin-1 的基因和蛋白水平均显著升高,进一步提示 Nesfatin-1 在抑郁症的发病机制中可能发挥重要的作用。

基于“单胺类神经递质耗竭”学说设计的经典的抗抑郁药物主要分为单胺氧化酶抑制剂,三环类抗抑郁药以及选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂等。选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂是目前新药研发中开展最多的一类,由于其对 5-羟色胺的再摄取作用具有高选择性的抑制,且作用的靶点相对专一,几乎不影响其他神经受体,目前已成为应用最为广泛的抗抑郁一线药物^[10]。本课题组前期的研究结果证实氟西汀能够抑制 HPA 轴的过度激活^[11-12]。有研究报道 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量的氟西汀被应用于海马神经干细胞培养实验中^[13],结合预实验的结果,我们选取选取氟西汀 $(10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 作为治疗药物,观察在体外细胞实验中对由皮质酮引起的 Nesfatin-1 的含量升高是否存在改善作用。结果表明氟西汀 $(10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 均可以显著降低皮质酮组中的 Nesfatin-1 的含量,提示氟西汀治疗抑郁症的作用机制可能与影响摄食调节因子 Nesfatin-1 的含量有关。另外,氟西汀 $(10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 仅能降低皮质酮组中 Nesfatin-1 mRNA 水平,而对蛋白的水平无显著影响,我们尚不能明确其中的机制,但是大量的研究显示 mRNA 水平与蛋白质水平的相关性仅为 40% ~ 50%^[14],这可能为上述结果的解释提供一定的依据。

综上所述,本研究结果表明皮质酮可上调 SH-SY5Y 细胞中 Nesfatin-1 的表达,且氟西汀可以降低这一调节作用。结合 HPA 轴和氟西汀在抑郁症发病机制和治疗中的作用,本研究结果进一步提示 Nesfatin-1 与抑郁症发病机制密切相关,并有望成为抑郁症的潜在治疗靶标。

参考文献

- [1] KUNUGI H, HORI H, NUMAKAWA T, et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and depressive disorder; recent progress[J]. Japanese Journal of Psychopharmacology, 2012, 32(4): 203-209.
- [2] STENGEL A, TACHÉ Y. Role of brain NUCB2/nesfatin-1 in the regulation of food intake[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(39): 6955-6959.
- [3] ARI M, OZTURK OH, BEZ Y, et al. High plasma nesfatin-1 level in patients with major depressive disorder[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011, 35(2): 497-500.
- [4] XU YY, GE JF, QIN G, et al. Acute, but not chronic, stress increased the plasma concentration and hypothalamic mRNA expression of NUCB2/nesfatin-1 in rats[J]. Neuropeptides, 2015, 54: 47-53.
- [5] GE JF, XU YY, QIN G, et al. Depression-like Behavior Induced by Nesfatin-1 in Rats: Involvement of Increased Immune Activation and Imbalance of Synaptic Vesicle Proteins[J]. Front Neurosci, 2015, 9: 429.
- [6] LIU Y, SHEN S, LI Z, et al. Cajaninstilbene acid protects corticosterone-induced injury in PC12 cells by inhibiting oxidative and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis[J]. Neurochem Int, 2014, 78: 43-52.
- [7] ZHANG HY, ZHAO YN, WANG ZL, et al. Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal glycogen level and induces depression-like behavior in mice[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2015, 16(1): 62-69.
- [8] GOEBEL M, STENGEL A, WANG L, et al. Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats[J]. Brain Res, 2009, 1300: 114-124.
- [9] YOSHIDA N, MAEJIMA Y, SEDBAZAR U, et al. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis[J]. Aging (Albany NY), 2010, 2(11): 775-784.
- [10] 夏曦, 杨扬, 程怀东, 等. 抑郁对轻中度癌痛患者回顾性记忆功能的影响[J]. 安徽医药, 2015, 19(11): 2098-2102.
- [11] GE JF, PENG L, CHENG JQ, et al. Antidepressant-like effect of resveratrol: involvement of antioxidant effect and peripheral regulation on HPA axis[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2013(114/115): 64-69.
- [12] GE JF, GAO WC, CHENG WM, et al. Orcinol glucoside produces antidepressant effects by blocking the behavioural and neuronal deficits caused by chronic stress[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2014, 24(1): 172-180.
- [13] 张黎明, 李云峰, 刘艳芹, 等. 新生大鼠海马神经干细胞培养及皮质酮和氟西汀对其增殖的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(13): 53-55.
- [14] TIAN Q, STEPANIANTS SB, MAO M, et al. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells[J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(10): 960-969.

(收稿日期:2017-01-16,修回日期:2017-03-05)