

豆腐果昔通过 NCALD/sGC/cGMP/PKG 轴缓解慢性不可预见性温和应激大鼠的抑郁样行为

杜鑫^{1,2}, 张晓彤⁴, 芦娟^{1,2}, 葛鹏^{1,2}, 胡海涛^{1,2}, 付梦雪^{1,2}, 张袁祥^{1,5,6}, 王国栋^{1,5,6,7}, 童九翠^{1,2,3}

¹皖南医学院药学院, 安徽 芜湖 241002; ²皖南医学院安徽高等院校非编码RNA转化研究重点实验室, 安徽 芜湖 241001; ³皖南医学院第一附属医院(弋矶山医院)³药学部, ⁴临床药学科, 安徽 芜湖 241001; ⁵安徽省多糖药物工程技术研究中心, 安徽 芜湖 241002; ⁶安徽省皖南地区植物药活性物质筛选与再评价工程实验室, 安徽 芜湖 241002; ⁷安徽省代谢性疾病药物基础研究创新中心, 安徽 芜湖 241002

摘要:目的 探讨豆腐果昔(Helicid)通过神经钙素 δ (NCALD)改善慢性不可预见性温和应激(CUMS)大鼠抑郁样行为的功能及其分子机制。方法 SD大鼠进行单笼适应性饲养1周后,随机分成正常对照组($n=20$)、CUMS组大鼠($n=70$)。正常对照组大鼠始终不进行任何刺激,CUMS组大鼠连续给予慢性不可预知温和刺激6周,建立大鼠抑郁模型。成功建模后,根据旷场实验和体质量结果,将CUMS组大鼠进一步分组,分别开展两部分实验:侧脑室注射腺相关病毒沉默NCALD,分为CUMS+SAL组、CUMS+AAV组和CUMS+AAV-si-NCALD组,10只/组;豆腐果昔灌胃治疗的基础上侧脑室注射腺相关病毒过表达NCALD,分为CUMS+SAL组、CUMS+Helicid+SAL组、CUMS+Helicid+AAV组和CUMS+Helicid+AAV-oe-NCALD组,10只/组。通过体质量、蔗糖偏好实验和旷场实验评估大鼠抑郁状态,Western blotting法测定海马组织中NCALD、sGC α 1、sGC β 1、PKG1/2和cleaved-caspase-3蛋白水平,ELISA法测定cGMP蛋白水平。结果 与正常对照组比较,CUMS大鼠海马中NCALD表达上调($P<0.05$)、cleaved-caspase-3水平增加($P<0.05$)及sGC/cGMP/PKG信号通路异常激活($P<0.05$);而腺相关病毒沉默NCALD后,下调了cleaved-caspase-3水平,抑制了sGC/cGMP/PKG信号通路的异常激活,改善了CUMS大鼠抑郁样行为($P<0.05$)。豆腐果昔治疗同样下调了上述指标($P<0.05$),减轻抑郁样行为($P<0.05$),但在过表达NCALD条件下,豆腐果昔的保护作用被逆转($P<0.05$)。结论 豆腐果昔通过下调NCALD表达,抑制了sGC/cGMP/PKG通路的异常活化,改善CUMS大鼠的海马组织凋亡,从而发挥抗抑郁作用。

关键词:豆腐果昔;神经钙素;sGC/cGMP/PKG信号通路;慢性温和不可预知应激模型

Helicid alleviates depression-like behavior in rats with chronic unpredictable mild stress through the NCALD/sGC/cGMP/PKG axis

DU Xin^{1,2}, ZHANG Xiaotong⁴, LU Juan^{1,2}, GE Peng^{1,2}, HU Haitao^{1,2}, FU Mengxue^{1,2}, ZHANG Yuanxiang^{1,5,6}, WANG Guodong^{1,5,6,7}, TONG Jiucui^{1,2,3}

¹School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; ²Key Laboratory of Non-coding RNA Transformation Research of Anhui Higher Education Institution, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China; ³Department of Pharmacy, ⁴Department of Clinical Pharmacy, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China; ⁵Anhui Provincial Engineering Research Center for Polysaccharide Drugs, Wuhu 241002, China; ⁶Anhui Provincial Engineering Laboratory for Screening and Re-evaluation of Active Compounds of Herbal Medicines in Southern Anhui, Wuhu 241002, China; ⁷Anhui Innovative Center for Drug Basic Research of Metabolic Diseases, Wuhu 241002, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of helicid for improving depressive-like behaviors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress (CUMS). **Methods** SD rats were randomly divided into normal control group ($n=20$) and CUMS group ($n=70$) to receive no stimulation and mild unpredictable stress for 6 weeks, respectively. After successful modeling, CUMS rats were further divided into 7 subgroups for intracerebroventricular injection with saline, adeno-associated virus (AAV) vector, or AAV carrying si-NCALD (NCALD silencing experiment, $n=10$); or intracerebroventricular injection with saline, saline with daily helicid gavage, AAV vector with helicid gavage, or NCALD-overexpressing AAV with helicid gavage (NCALD overexpression experiment, $n=10$). The depressive state of the rats was evaluated by assessing changes in body weight, sucrose preference, and open field test. The expressions of NCALD, sGC α 1, sGC β 1, PKG1/2, and cleaved-caspase 3 in the hippocampus of the rats were detected by Western blotting, and hippocampal cGMP level was determined with ELISA. **Results** Compared with the normal control rats, CUMS rats showed significantly increased hippocampal expressions of NCALD and cleaved caspase-3 and abnormal activation of the sGC/cGMP/PKG pathway. Silencing NCALD by intracerebroventricular injection of AAV-si-NCALD significantly reduced cleaved caspase-3 and inhibited sGC/cGMP/PKG pathway activation in the hippocampus, and improved depressive-like behaviors of the rats. Helicid treatment produced similar effects, but its effect was abolished by intracerebroventricular injection of NCALD-overexpressing AAV. **Conclusion** Helicid relieves depressive-like behaviors in CUMS rats by downregulating NCALD, inhibiting abnormal sGC/cGMP/PKG activation, and reducing hippocampal apoptosis.

Keywords: helicid; neurocalcin δ ; sGC/cGMP/PKG signaling pathway; chronic mild unpredictable stress

收稿日期:2025-06-30

基金项目:安徽省卫生健康科研重点项目(AHWJ2022a027);安徽省高校科研计划项目-省高校重大科研项目(2024AH040248)

作者简介:杜鑫,在读硕士研究生,E-mail:20239150@stu.wnmc.edu.cn

通信作者:童九翠,教授,硕士生导师,E-mail:tongjiucui@wnmc.edu.cn;

王国栋,教授,硕士生导师,E-mail:wangguodong@wnmc.edu.cn

抑郁症是一种由多种因素相互作用引发的常见精神障碍,具有发病率高、复发率高、治愈率低的特点^[1]。当前临床治疗主要依赖化学合成类抗抑郁药物,如选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)和去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRIs)。但该类药物存在疗效有限、起效缓慢、副作用明显及易产生治疗抵抗等问题,严重影响患者生活质量^[2-6]。因此,迫切需要探索新的作用靶点及抗抑郁药物,以实现更快速起效、更持久疗效及更低毒副作用的治疗目标。

近年来,天然药物因其多靶点作用机制和低毒副作用等优势,在抑郁症研究中备受关注。豆腐果苷(Helicid)是从云南山龙眼科植物萝卜树果实中提取的一种具有生物活性的天然成分,其具有镇静、镇痛、安眠等药理活性,已被用于辅助治疗头痛、睡眠障碍等神经系统相关疾病^[7]。既往研究表明,豆腐果苷具有一定的抗抑郁潜力,可能通过调节神经递质、氧化应激状态及神经营养因子水平发挥作用,但其具体靶向机制尚不清楚^[8]。

神经钙调素 δ (NCALD)是神经钙传感器蛋白家族的重要成员,主要在中枢神经系统中表达,参与钙信号转导及G蛋白偶联受体(GPCR)通路的激活^[9-11]。先前课题组研究,对慢性不可预知性温和应激(CUMS)抑郁大鼠组与CUMS+helicid治疗组进行转录组测序,发现CUMS模型大鼠中NCALD表达水平升高,经豆腐果苷治疗后下降,说明NCALD可能在豆腐果苷发挥抗抑郁作用中起关键作用^[12,13]。此外,NCALD可能通过调控可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)-环磷酸鸟苷(cGMP)-蛋白激酶G(PKG)信号通路,进而调节神经可塑性、细胞凋亡及炎症反应。该信号通路的异常激活已被证实在抑郁症的发生与进展中发挥重要作用^[14]。然而,目前尚缺乏系统研究探讨NCALD是否在豆腐果苷抗抑郁机制中发挥关键作用,其与sGC/cGMP/PKG信号通路的相互关系亦缺乏直接的实验证据。

本研究拟构建CUMS大鼠模型,并通过侧脑室注射腺相关病毒(AAV)干预NCALD表达,以明确NCALD在抑郁样行为发生中的功能作用,并进一步验证豆腐果苷是否通过调控NCALD及其下游sGC/cGMP/PKG信号通路发挥抗抑郁作用。该研究有望为抑郁症的防治提供新的分子机制支持和潜在治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

90只雄性SD大鼠(体质量170 g~210 g)购自南京青龙山动物饲养场。在实验开始前,所有大鼠在湿度45%±10%、温度(23±2)℃的SPF级动物房中单笼适应性饲养1周,并进行12 h:12 h的昼夜交替。动物的饲养和使用均经皖南医学院实验动物福利与伦理委员会审

核批准(伦理批号:LLSC-2022-268)。

1.2 主要试剂及仪器

豆腐果苷(纯度≥98%)(Tokyo);腺相关病毒(AAV,安徽汉恒生物科技有限公司);ELISA试剂盒(苏州卡尔文生物技术有限公司);抗体:anti-NCALD(1:1000)/anti-cleaved caspase-3 (1:1000)(Cell Signaling Technology);anti-sGC α 1 (1:1000)/anti-sGC β 1 (1:1000)(Cayman Chemical);anti-PKG1/2 (1:1000)(BioVision);0.22 μ m PVDF膜(MILLEXGP);酶联免疫检测仪、蛋白/核酸凝胶成像仪(Bio-Rad)。

1.3 CUMS大鼠抑郁模型的建立

CUMS是一种广泛应用于抑郁症研究的动物模型^[15];对CUMS组大鼠施加一系列不可预知的温和应激刺激,包括昼夜交替、潮湿垫料(250 mL水混合木屑垫)、夹尾1 min、冷水浸泡(4℃,5 min)、禁食或禁水(24 h)、倾斜笼(45℃,24 h)和悬尾1 min。实验中将CUMS组大鼠单笼饲养,并从第1天开始按照随机的刺激手段对大鼠进行不可预知的刺激。

1.4 动物分组及处理

大鼠适应性喂养7 d后,将90只大鼠随机分为CUMS组($n=70$)和正常对照组($n=20$)。CUMS组大鼠单笼饲养,进行为期6周的慢性不可预测温和应激;正常对照组大鼠4只/笼正常饲养,不接触任何刺激。

进行6周的CUMS刺激后,在CUMS建模6周后,根据旷场实验和体质量结果,将大鼠进一步分组,分别开展两部分实验:①侧脑室注射腺相关病毒沉默NCALD,分为CUMS+SAL组、CUMS+AAV组和CUMS+AAV-si-NCALD组,10只/组;②豆腐果苷灌胃治疗的基础上侧脑室注射腺相关病毒过表达NCALD,分为CUMS+SAL组、CUMS+Helicid+SAL组、CUMS+Helicid+AAV组和CUMS+Helicid+AAV-oc-NCALD组,10只/组。正常对照组大鼠仅侧脑室注射生理盐水不进行任何刺激,豆腐果苷灌胃治疗组根据先前研究结果,均采用32 mg/(kg·d)灌胃给药进行干预^[16]。第7周经侧脑室注射后,大鼠休息3 d(期间不进行任何刺激),除此之外CUMS刺激在整个实验期间持续进行(图1)。

1.5 侧脑室注射

造模成功后,用3%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)麻醉CUMS组大鼠。剔除毛发和碘伏擦拭后使用脑立体定位装置固定大鼠脑袋将AAV-NCALD、AAV-si-NCALD或生理盐水注射到大鼠的侧脑室中。侧脑室定位注射的坐标为:以前囟点为中心,旁开1.5 mm,向后囟方向1.1 mm,深4.5 mm),AAV病毒载体浓度为 1×10^{12} copies/mL,体积为10 μ L,以0.2 μ L/min注射。注射后使用骨蜡将小孔封闭,然后用医用手术线将剪开的皮肤缝合。

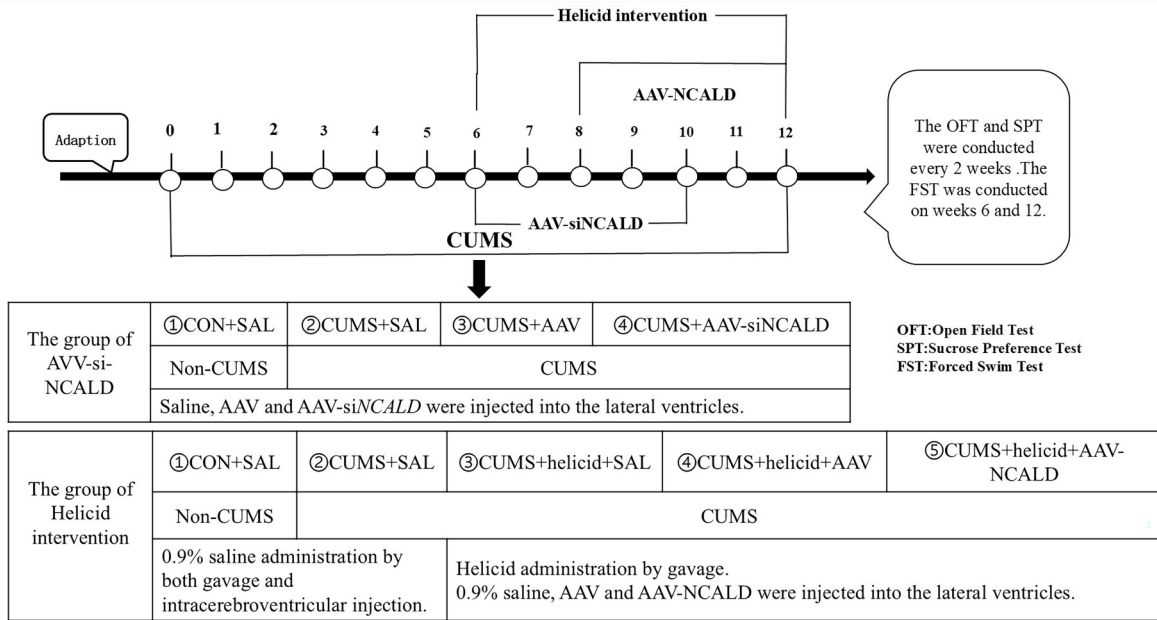


图1 动物实验分组情况及流程图

Fig.1 Grouping of the rats and flow chart of the animal experiment.

1.6 体质量及行为学检测

1.6.1 体质量 对大鼠进行称重,1次/周,记录和分析大鼠每周体质量的变化。

1.6.2 旷场实验(OFT) 实验周期为1次/2周,将大鼠缓慢放置于旷场装置中央(120 cm×120 cm×60 cm),该装置由黑色外壳构成,底部为开放地板。装置上方安装摄像头,连接至计算机,使用运动识别软件实时记录大鼠5 min内的活动状态。自动分析的行为指标包括运动总距离、站立次数及穿越格子数。为确保实验一致性,每次测试前均用10%乙醇溶液清洁装置,消除气味干扰。

1.6.3 蔗糖偏嗜度实验(SPT) 实验周期为1次/2周,每次实验为期4 d:第1天,给予每只大鼠两瓶1%的蔗糖水供其自由饮用,并定期更换两瓶的位置以消除位置偏差;第2天,给予一瓶1%蔗糖水和一瓶自来水,同样定期更换位置;第3天,大鼠禁食禁水;第4天,提供一瓶1%蔗糖水和一瓶自来水,自由饮用2 h后称量每瓶的质量,记录蔗糖水与自来水的消耗量。蔗糖偏嗜度(SPR,%)=蔗糖水消耗量÷(蔗糖水消耗量+自来水消耗量)×100%。

1.6.4 强迫游泳实验(FST) 实验周期为1次/6周,将大鼠置于圆柱形透明容器中(水深35 cm,水温23~25℃)。实验分两阶段:第1天预实验,让大鼠游泳15 min以适应环境;24 h后进行正式测试,记录大鼠在5 min内的累积不动时间(如漂浮或轻微动作维持头部漂浮)。测试通过连接计算机的摄像头实时采集数据,并用专业软件自动分析。实验后将大鼠擦干并放回笼中。

1.7 样本收集

在第10周和第12周行为学检测后,使用3%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)麻醉大鼠,断头采血。采集血液

后高速离心(3000×g,10 min),收集上层血清。随后,迅速分离海马组织,将其置于标记好的EP管中,先在液氮中短暂冷冻,后转移至-80℃冰箱中保存。

1.8 酶联免疫吸附测定(ELISA)

采用ELISA试剂盒(苏州卡尔文生物技术有限公司)检测cGMP水平。抗原稀释至5 μg/mL,50 μL/孔包被过夜后,用1×PBST清洗3次(3~5 min/次)。加入1%牛血清白蛋白封闭液(250 μL/孔),(35±2)℃孵育2 h后清洗3次。海马上清液以1:1000稀释,加入100 μL/孔,37℃孵育1.5 h。随后加入1:1000稀释的酶标羊抗鼠辣根过氧化物酶标记IgG(50 μL/孔),37℃孵育1 h。加入底物溶液避光孵育10 min后,添加终止液(50 μL/孔)终止反应,酶标仪测定A_{450nm}值。

1.9 蛋白免疫印迹

使用细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒提取蛋白后,将样品在沸水中孵育5 min,并用BCA试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样品加载至SDS-PAGE凝胶(10%分离胶和5%堆积胶),初始电压90V,样品进入分离胶后调整至110V电泳。随后,使用110V恒定电流将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)75 min。用含5%脱脂乳的TBST在室温下封闭2 h后,加入以下稀释的一抗:anti-PKG1/2(1:1000)、anti-sGCα1(1:1000)、anti-sGCβ1(1:1000),anti-cleaved-caspase-3(1:1000),4℃孵育过夜。然后用TBST洗膜3次(10 min/次),再加入稀释的山羊抗兔抗体(1:3000)孵育2 h。洗膜后,用ECL发光试剂显色,应用凝胶成像系统(Bio-Rad)以显示印迹条带。

1.10 统计学分析

数据分析采用SPSS18.0统计软件。数据结果以均

数±标准差表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验;3组及以上的比较采用单因素方差分析,并使用LSD检验进行两两比较。样本量根据功效分析及相关文献计算。本研究中所展示图片由 GraphPad Prism 9.0 和 illustrator 2023 绘制。统计学显著性设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 CUMS大鼠抑郁模型的建立

在CUMS刺激期间,正常对照组和CUMS组的大

鼠体质量均有所增加,但第2~6周,正常对照组大鼠的体质量始终高于CUMS组($P < 0.05$,图2A)。在6周刺激后,CUMS组大鼠在OFT中的总距离、站立次数、穿越格子数均低于正常对照组($P < 0.05$,图2B、C);CUMS组大鼠在SPT中蔗糖偏嗜度指标均低于正常对照组($P < 0.001$,图2E);CUMS组大鼠在FST中的不动时间延长($P < 0.05$,图2F)。基线期,两组大鼠的各项指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

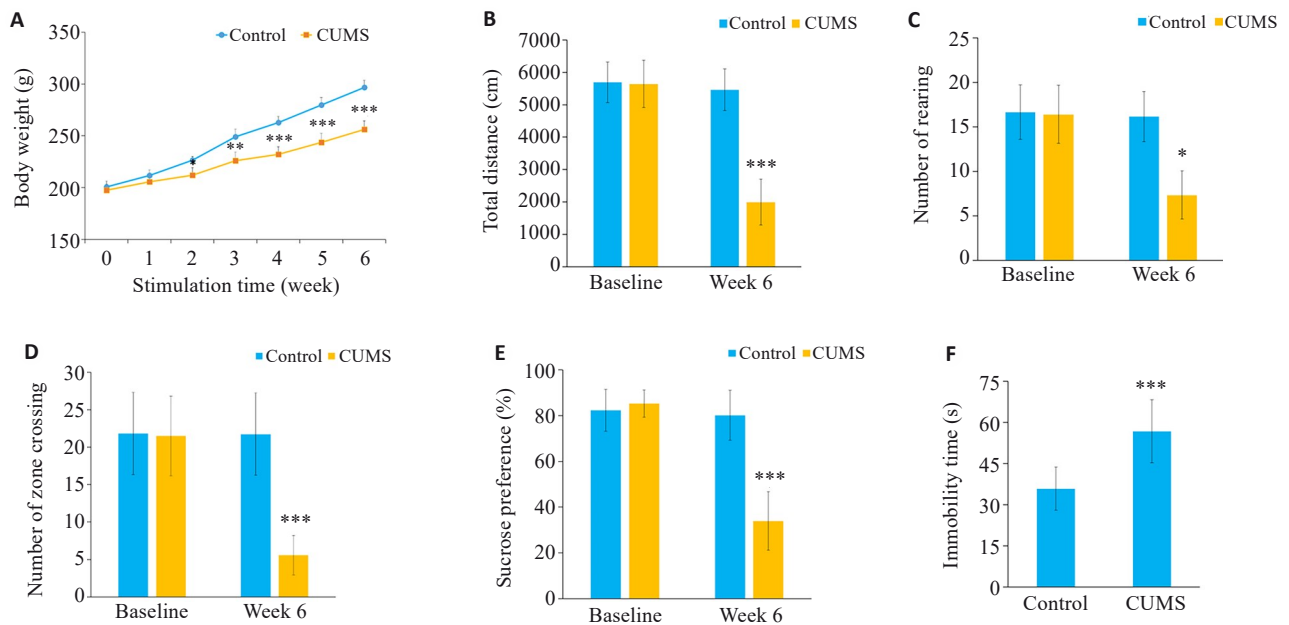


图2 CUMS刺激6周后大鼠的体质量及行为学变化

Fig.2 Body Weight and behavioral changes of the rats after 6 weeks of CUMS stimulation. **A:** Changes of body weight of rats during CUMS. **B:** Effect of CUMS on total distance traveled of the rats in open field test. **C:** Effect of CUMS on rearing times of the rats in open field test. **D:** Effect of CUMS on the number of zone crossing in open field test. **E:** Effect of CUMS on sucrose preference of the rats in each group. **F:** Effect of CUMS on immobility time of the rats during forced swimming test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control.

2.2 沉默 NCALD 对 CUMS 大鼠体质量和抑郁样行为的影响

侧脑室注射 AAV-si-NCALD 腺相关病毒沉默 NCALD 并观察大鼠体质量和抑郁样行为的变化。4 周后,与 CUMS+AAV 组大鼠相比,CUMS+AAV-si-NCALD 组大鼠的体质量(图 3A)、总距离(图 3B)、站立次数(图 3C)、穿越格子数(图 3D)和蔗糖偏嗜度(图 3E)均增加($P < 0.001$),而不动时间缩短(图 3F, $P < 0.001$)。为排除生理盐水和 AAV 载体的影响,本研究比较了 CUMS+SAL 组与 CUMS+AAV 组,发现两组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 沉默 NCALD 对 CUMS 大鼠海马中的 cleaved-caspase-3 和 sGC/cGMP/PKG 信号通路的影响

与正常对照组相比,CUMS+SAL 组中 NCALD 的表达升高($P < 0.001$),而在 CUMS+AAV-si-NCALD 组中,其表达水平降低($P < 0.01$,图 4A、B)。与正常对照组

相比,CUMS+SAL 组大鼠中 cleaved-caspase-3 表达上调($P < 0.001$),而在沉默 NCALD 后,其表达水平降低($P < 0.05$,图 4C、D)。本研究检测了海马中 sGC α 、sGC β 、PKG 和 cGMP 的表达水平。结果显示,与正常对照组相比,CUMS+SAL 组中 sGC α 、sGC β 、PKG 和 cGMP 的水平升高($P < 0.01$),而在 CUMS+AAV-si-NCALD 组中,这些指标均降低($P < 0.05$,图 4E~I)。为排除生理盐水和 AAV 载体的影响,本研究比较了 CUMS+SAL 组和 CUMS+AAV 组的差异。结果显示,整个实验期间,这两组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 豆腐果苷治疗及过表达 NCALD 对 CUMS 大鼠体质量和抑郁样行为的影响

在豆腐果苷治疗的基础上,侧脑室注射 AAV-oe-NCALD 腺相关病毒并测量大鼠体质量和抑郁样行为的变化。6 周后,与 CUMS+SAL 组大鼠相比,CUMS+Helicid+SAL 组大鼠的体质量(图 5A)、总距离(图 5B)、

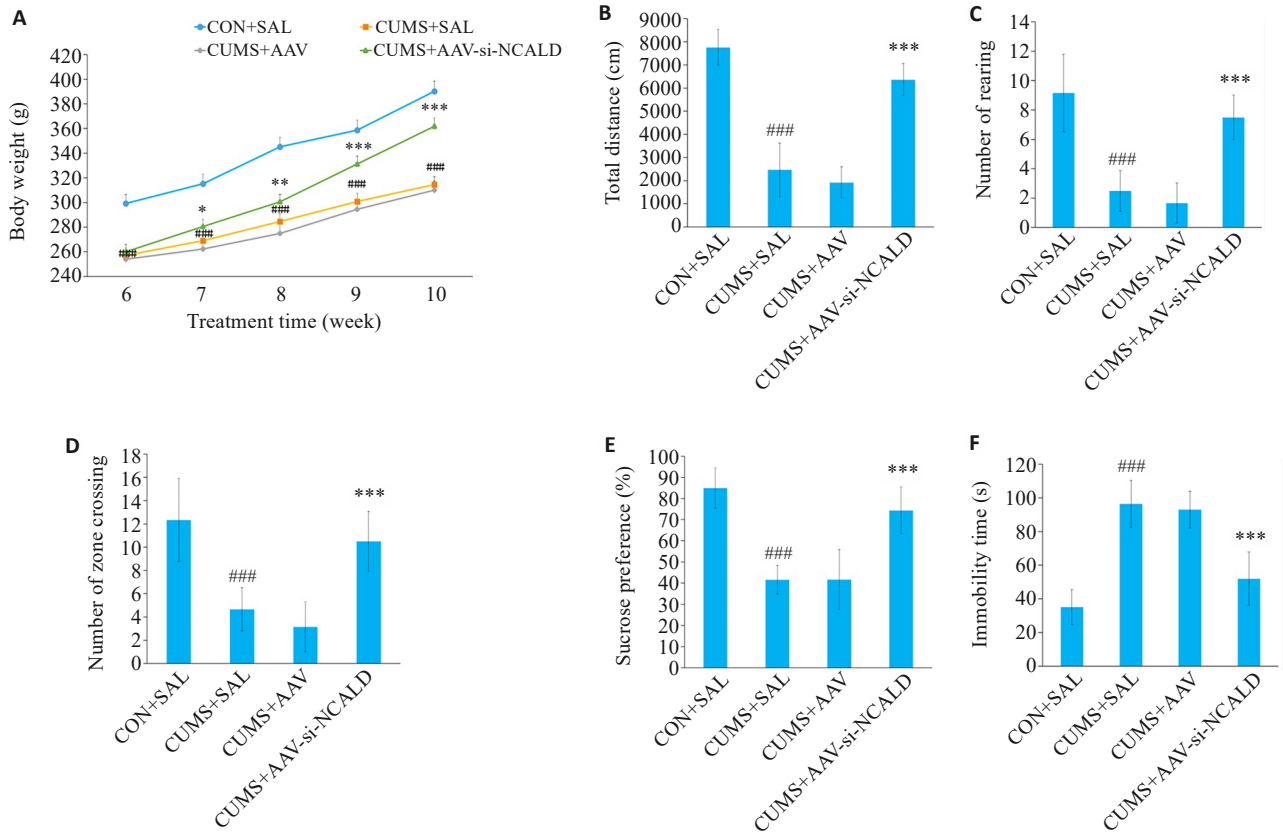


图3 沉默NCALD缓解CUMS诱导的大鼠抑郁样行为

Fig. 3 NCALD silencing attenuates CUMS-induced depression-like behaviors in rats. **A:** Changes of body weight of the rats after NCALD silencing. **B:** Changes of total distance of the rats in open field test after NCALD silencing. **C:** Changes of rearing times in open field test after NCALD silencing. **D:** Changes of the number of zone crossing in open field experiment after NCALD silencing. **E:** Changes of sucrose preference in rats after NCALD silencing. **F:** Changes of immobility time of the rats after NCALD silencing. ^{###} $P < 0.001$ vs CON+SAL; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs CUMS+AAV.

站立次数(图5C)、穿越格子数(图5D)和蔗糖偏嗜度(图5E)均增加($P < 0.001$);而不动时间缩短(图5F, $P < 0.001$)。过表达NCALD后,与CUMS+Helicid+AAV组大鼠相比,CUMS+Helicid+AAV-oe-NCALD组大鼠的体质量(图5A)、总距离(图5B)、站立次数(图5C)、穿越格子数(图5D)和蔗糖偏嗜度(图5E)均减少($P < 0.001$);而不动时间增加(图5F, $P < 0.001$),逆转了豆腐果苷的治疗效果。为排除生理盐水和AAV的影响,本研究比较了CUMS+Helicid+SAL组与CUMS+Helicid+AAV组,发现整个实验期间两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 豆腐果苷灌胃治疗及过表达NCALD对CUMS大鼠海马中的cleaved-caspase-3和sGC/cGMP/PKG信号通路的影响

检测各组NCALD的表达水平以确保AAV-oe-NCALD的正常功能,结果显示,与CON+SAL组相比,CUMS+SAL组中NCALD的表达升高($P < 0.001$);豆腐果苷治疗后,NCALD表达降低($P < 0.05$)。在注射AAV-oe-NCALD后,NCALD的表达水平再次升高($P < 0.05$,图6A、B),验证了病毒载体的有效性。与CON+

SAL组相比,CUMS+SAL组中cleaved-caspase-3的表达上调($P < 0.001$);豆腐果苷治疗后降低了其表达($P < 0.01$)。在过表达NCALD后,cleaved-caspase-3的表达水平再次上升($P < 0.05$,图6C、D)。进一步分析显示,与CON+SAL组相比,CUMS+SAL组中sGC α 、sGC β 、PKG、cGMP的水平升高($P < 0.01$);豆腐果苷治疗后,这些指标均下降($P < 0.05$)。当过表达NCALD时,这些指标再次上升($P < 0.05$,图6E~I)。为排除生理盐水和AAV载体的影响,比较CUMS+Helicid+SAL组和CUMS+Helicid+AAV组的差异,结果显示,整个实验期间,两组间的统计学差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

抑郁症临床症状主要表现为情绪低落、兴趣丧失、认知障碍,还伴有反应迟缓、思维迟钝、记忆力下降、自卑、行为绝望甚至自杀等表现^[17]。抑郁症动物模型众多,不同的模型在行为表现及神经生物学机制上存在一定差异,因此,比较不同模型诱导的神经环路特征,对于深入理解抑郁症发病机制及评估治疗策略至关重要^[18]。慢性不可预知轻度压力(CUMS)模型具有较高的可靠性和稳定性,是模拟人类长期遭受慢性低强度应激致病

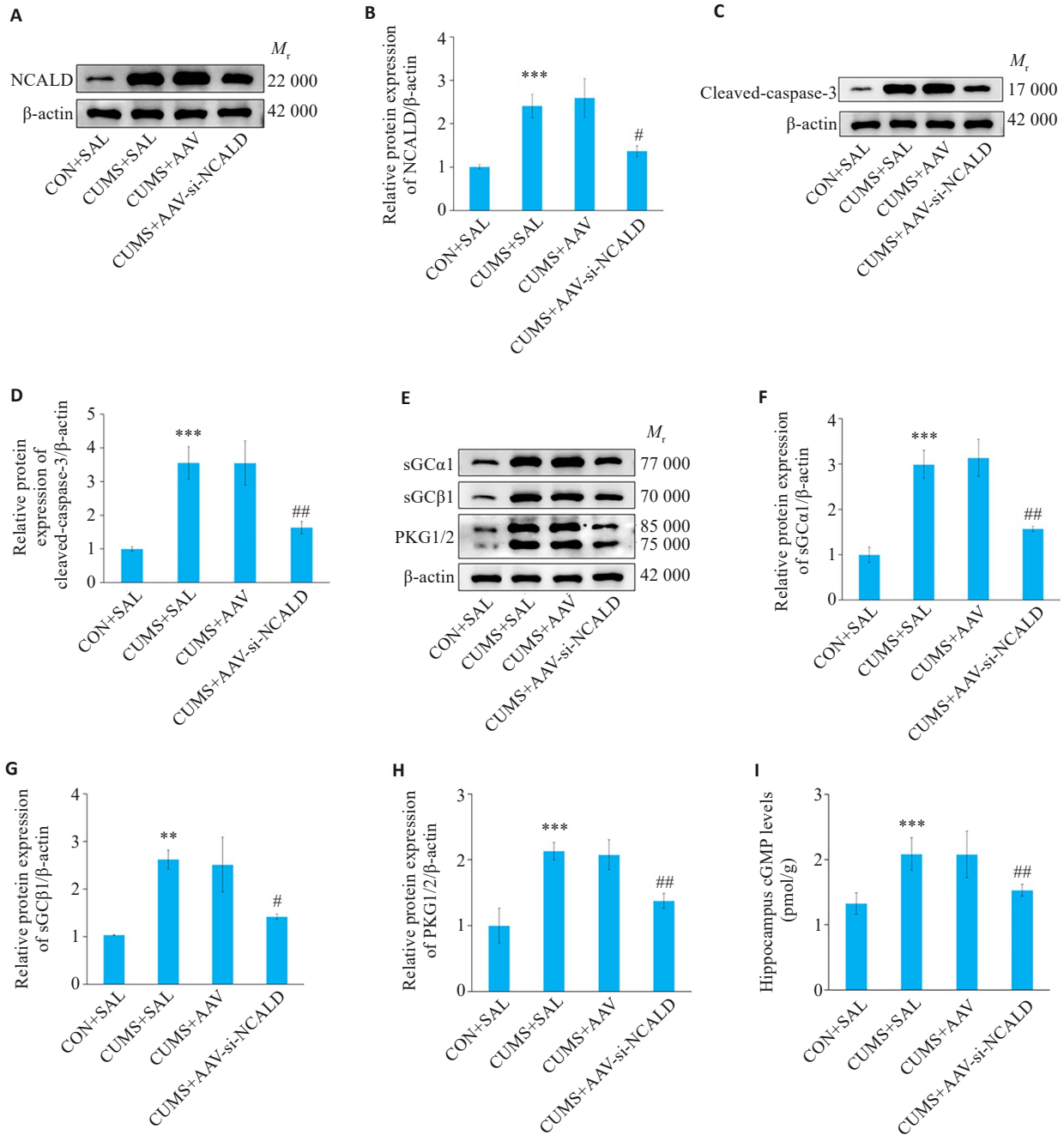


图4 沉默NCALD对sGC/cGMP/PKG信号通路和凋亡细胞因子cleaved-caspase 3的调节作用

Fig. 4 Regulatory effect of AAV-si-NCALD on the sGC/cGMP/PKG signaling pathway and hippocampal expression of caspase-3 in CUMS rats. **A, B:** Protein levels of NCALD in the hippocampus detected using Western blotting. **C, D:** Protein levels of cleaved caspase-3 in the hippocampus detected using Western blotting. **E-H:** Protein levels of sGCα, sGCβ and PKG in the hippocampus detected using Western blotting. **I:** Protein levels of cGMP in the hippocampus detected using ELISA. ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs CON+SAL; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs CUMS+AAV.

的最优模型,其诱发因素及表现出的抑郁样行为与抑郁症患者的临床症状高度相似,已被广泛用于抑郁症的基础研究^[19, 20]。在CUMS模型中,蔗糖偏好度是评估实验动物快感缺失的重要指标^[21];强迫游泳实验常用于评估实验动物的绝望状态^[22];旷场实验是用于评估实验动物自发活动以及焦虑状态的经典行为学实验^[23]。本研究通过测量大鼠体质量,蔗糖偏好度实验,旷场实验以及强迫游泳实验来评价大鼠的抑郁状态。结果表明CUMS刺激后大鼠体质量增长受限、蔗糖偏好率下降、

不动时间延长以及探索行为减少。

海马组织的细胞凋亡被认为是慢性应激诱导抑郁症的重要病理特征^[24]。细胞凋亡能够直接导致神经元数量减少和功能异常,影响情绪调节和认知功能,从而加重抑郁症状^[25]。常用神经元凋亡分子标志物有Bcl-2家族蛋白(Bax/Bcl-2)、细胞色素c/半胱天冬酶-9(caspase-9)、聚ADP核糖聚合酶(PARP)和cleaved-caspase-3等^[26-28]。Cleaved-caspase-3是凋亡的主要执行者之一,是调控细胞凋亡的关键酶,在接受内源性

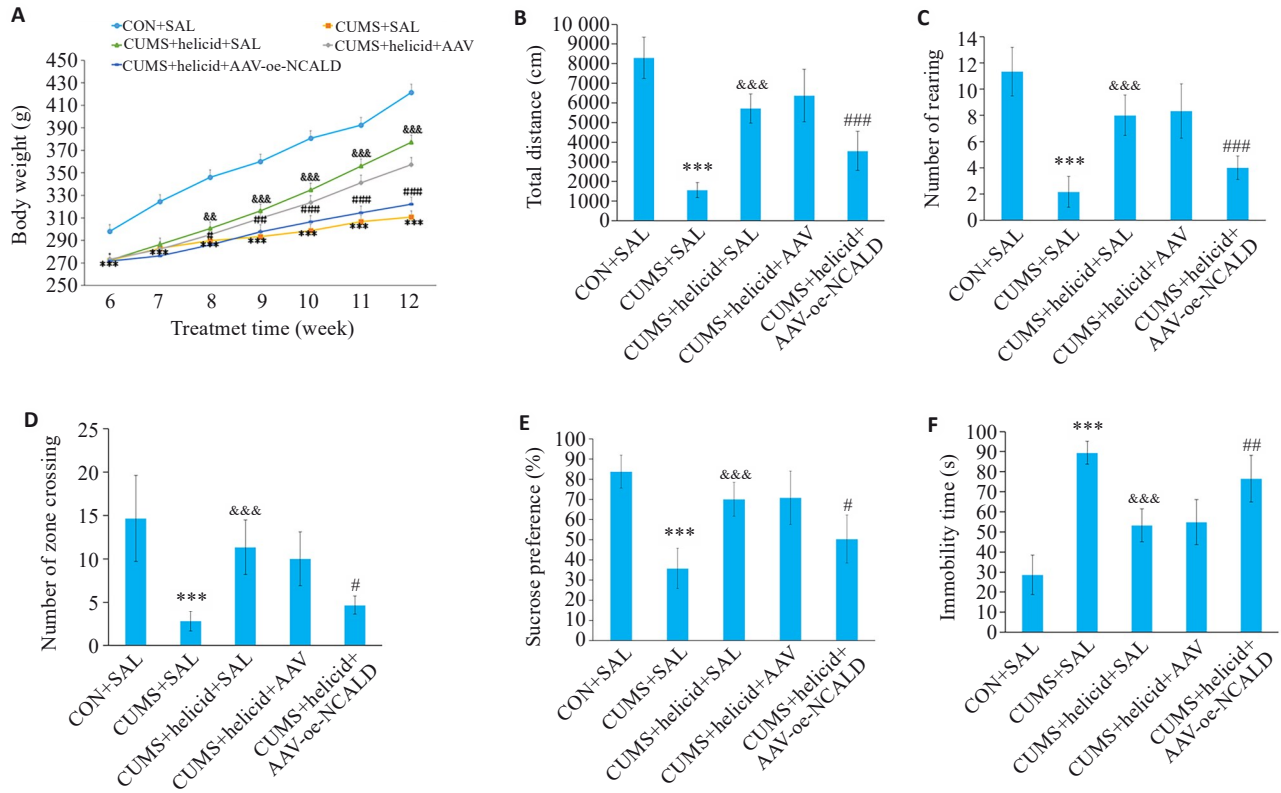


图5 过表达NCALD逆转了豆腐果苷的治疗作用

Fig.5 Overexpression of NCALD attenuates the therapeutic effect of helicid. A: Changes of body weight of the rats after helicid treatment and NCALD overexpression. B: Changes of total distance traveled of the rats in open field test in different groups. C: Changes of rearing times in open field test of the rats in different groups. D: Changes of the number of zone crossing in open field test of the rats in different groups. E: Changes of sucrose preference of the rats in different groups. F: Changes of immobility time of the rats in different groups. *** $P < 0.001$ vs CON+SAL; &&& $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ vs CUMS+SAL; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.01$ vs CUMS+helicid+AAV.

caspase-9或外源性 caspase-8的激活信号后被切割为活性亚基,其激活常用于评估凋亡程度^[29]。研究指出,cleaved-caspase-3在多数细胞类型的凋亡中必不可少,是典型凋亡标志(如染色质凝集、DNA断裂)的关键介导者^[30]。因此,检测cleaved-caspase-3可视为细胞正在经历执行性凋亡阶段。本研究发现CUMS刺激显著上调了大鼠海马组织中cleaved-caspase-3的表达,而沉默NCALD和豆腐果苷治疗均能显著抑制cleaved-caspase-3的上调,表明了沉默NCALD在应激诱导的海马组织凋亡中具有保护作用。然而,在过表达NCALD的情况下,这种保护作用被逆转,进一步证实了NCALD在调控海马组织凋亡中的作用。

NCALD是一种在大脑高表达,高度保守的神经元钙传感器蛋白,同时与各种神经系统疾病有关^[10, 31]。其生理功能和异常表达的意义迄今为止仍然难以确定^[32]。国际小鼠表型联盟平台提供的表型数据表明,NCALD^{KO/KO}小鼠过度活跃和焦虑,并表现出体质量严重减少^[33]。本研究中观察到,CUMS大鼠海马中NCALD的表达上调,提示其可能参与抑郁样行为的发生。进一步通过侧脑室注射AAV病毒,下调NCALD

的表达则有效改善了CUMS诱导的大鼠抑郁样行为。豆腐果苷灌胃治疗后也抑制CUMS大鼠海马中NCALD的表达,并有效缓解了抑郁样行为;而在过表达NCALD的条件下,豆腐果苷的抗抑郁效应被显著削弱,表明豆腐果苷的抗抑郁作用依赖于其对NCALD表达的调控。

NCALD作为一种神经元钙传感器蛋白,KEGG Pathway Database显示其参与了cGMP信号通路。sGC-cGMP-PKG信号通路是调控神经功能的重要分子网络,其过度激活已被证明与神经退行性疾病密切相关,一氧化氮(NO)可通过sGC/cGMP/PKG信号通路减少细胞凋亡^[34]。研究发现,NO/cGMP/cGMP 激酶I(cGKI)信号通路靶向负调控内质网的钙释放参与多种细胞进程^[35]。本研究发现,CUMS模型大鼠的sGC、cGMP和PKG水平显著升高,提示该通路被异常激活。通过沉默NCALD和豆腐果苷治疗,我们观察到sGC/cGMP/PKG信号通路的活性显著下调,同时大鼠的抑郁样行为得到改善。过表达NCALD后sGC、cGMP和PKG水平再次显著升高,这一结果表明NCALD可能通过促进sGC/cGMP/PKG信号的过度激活,加重应激诱

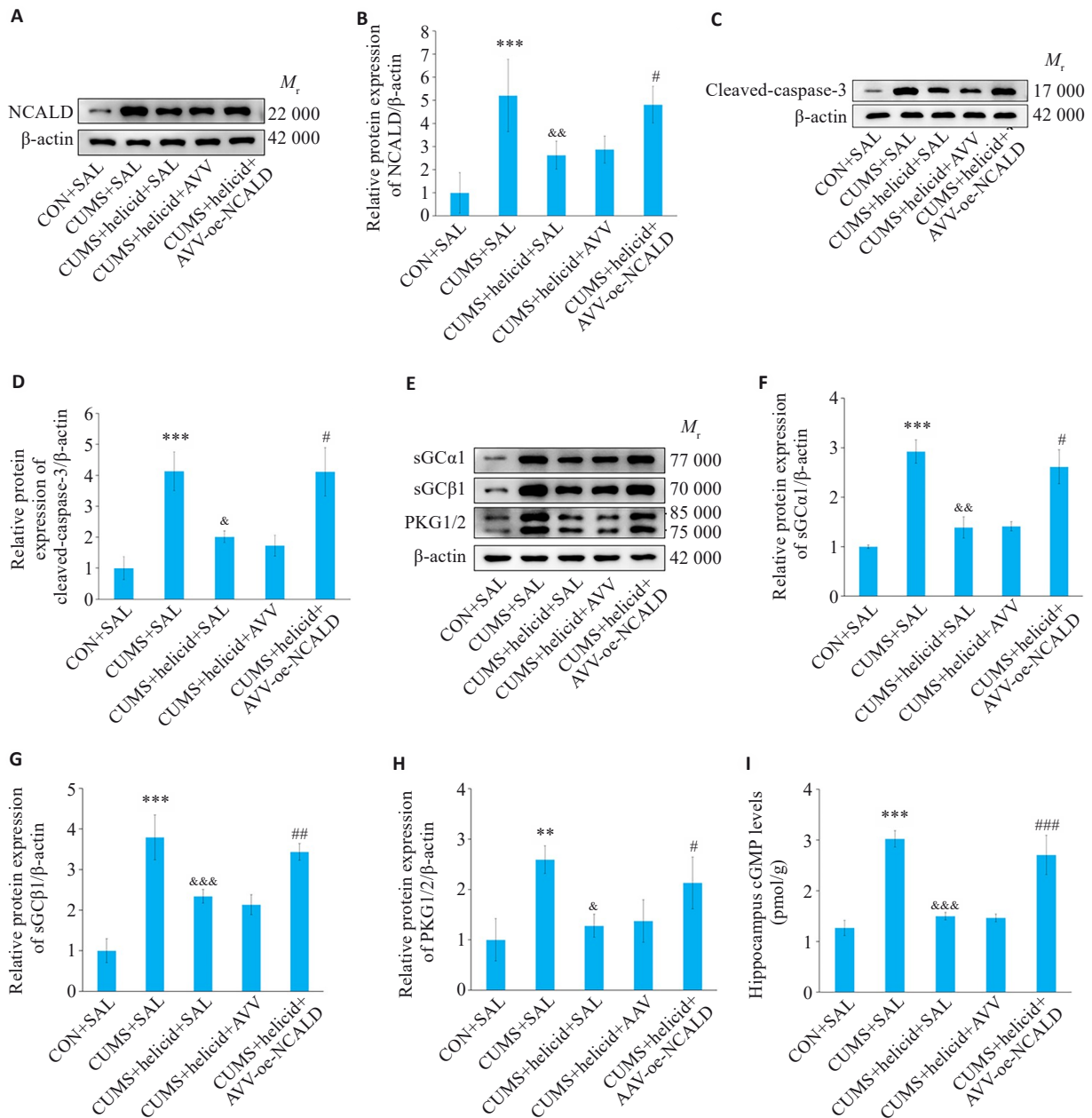


图6 豆腐果昔通过NCALD对sGC/cGMP/PKG信号通路和凋亡细胞因子cleaved-caspase 3的调节作用
 Fig.6 Helicid modulates the sGC/cGMP/PKG signaling pathway and hippocampal caspase-3 expression by regulating NCALD expression. **A, B:** Protein levels of NCALD in the hippocampus detected using Western blotting. **C, D:** Protein levels of cleaved caspase-3 in the hippocampus detected using Western blotting. **E-H:** Protein levels of sGC α 1, sGC β 1 and PKG in the hippocampus detected using Western blotting. **I:** Protein levels of cGMP in the hippocampus detected using ELISA. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CON+SAL; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ vs CUMS+SAL; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs CUMS+helicid+AVV.

导的海马区细胞凋亡并导致抑郁样行为。

综上所述,豆腐果昔通过下调NCALD表达,抑制了sGC/cGMP/PKG通路的异常活化,减轻了CUMS模型大鼠的海马组织凋亡,改善了CUMS模型大鼠的抑郁样行为。本研究首次证明豆腐果昔通过抑制NCALD表达并负向调控sGC/cGMP/PKG信号通路发挥抗抑郁作用,为NCALD作为抑郁症潜在治疗靶点提供了理论依据。值得关注的是豆腐果昔可能还通过多

靶点机制(不限于sGC/cGMP/PKG通路)发挥疗效,有待进一步深入探讨。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

[1] Cuijpers P, Miguel C, Harrer M, et al. The outcomes of mental health care for depression over time: a meta-regression analysis of response rates in usual care[J]. J Affect Disord, 2024, 358: 89-96.

- [2] Zhdanava M, Pilon D, Ghelerter I, et al. The prevalence and national burden of treatment-resistant depression and major depressive disorder in the United States[J]. *J Clin Psychiatry*, 2021, 82(2): 20m13699.
- [3] Wiesinger T, Kremer S, Bschor T, et al. Antidepressants and quality of life in patients with major depressive disorder - Systematic review and meta-analysis of double-blind, placebo-controlled RCTs[J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2023, 147(6): 545-60.
- [4] Peleg LC, Rabinovitch D, Lavie Y, et al. Post-SSRI sexual dysfunction (PSSD): biological plausibility, symptoms, diagnosis, and presumed risk factors[J]. *Sex Med Rev*, 2022, 10(1): 91-8.
- [5] Protti M, Mandrioli R, Marasca C, et al. New-generation, non-SSRI antidepressants: drug-drug interactions and therapeutic drug monitoring. part 2: NaSSAs, NRIs, SNDRIs, MASSAs, NDRIs, and others[J]. *Med Res Rev*, 2020, 40(5): 1794-832.
- [6] Murphy SE, Capitão LP, Giles SLC, et al. The knowns and unknowns of SSRI treatment in young people with depression and anxiety: efficacy, predictors, and mechanisms of action[J]. *Lancet Psychiatry*, 2021, 8(9): 824-35.
- [7] Zhang MQ, Wang TX, Li R, et al. Helicid alleviates pain and sleep disturbances in a neuropathic pain-like model in mice[J]. *J Sleep Res*, 2017, 26(3): 386-93.
- [8] 董九翠. 豆腐果昔抗抑郁作用的分子机制研究[D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2019.
- [9] Vijay-Kumar S, Kumar VD. Neurocalcin. role in neuronal signaling[J]. *Meth Mol Biol*, 2016, 172: 261-79
- [10] Wang W, Zhou Z, Zhao W, et al. Molecular cloning, mapping and characterization of the human neurocalcin delta gene (*NCALD*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1518(1/2): 162-7.
- [11] Burgoyne RD. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca^{2+} signalling[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(3): 182-93.
- [12] Muiños-Bühl A, Rombo R, Ling KK, et al. Long-term *SMN*- and *Ncald*-ASO combinatorial therapy in SMA mice and *NCALD*-ASO treatment in hiPSC-derived motor neurons show protective effects[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 4198.
- [13] Zhang YX, Zhang XT, Li HJ, et al. Antidepressant-like effects of helicid on a chronic unpredictable mild stress-induced depression rat model: Inhibiting the IKK/I κ B α /NF- κ B pathway through *NCALD* to reduce inflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 93: 107165.
- [14] Maratha S, Sharma V, Walia V. Possible involvement of NO-sGC-cGMP signaling in the antidepressant like effect of pyridoxine in mice[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(1): 173-83.
- [15] Antoniuk S, Bijata M, Pomimaskin E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101-16.
- [16] Tong JC, Zhou ZM, Qi WW, et al. Antidepressant effect of helicid in chronic unpredictable mild stress model in rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 13-21.
- [17] Wakefield JC. Diagnostic issues and controversies in DSM-5: return of the false positives problem[J]. *Annu Rev Clin Psychol*, 2016, 12: 105-32.
- [18] Tian XY, Russo SJ, Li L. Behavioral animal models and neural-circuit framework of depressive disorder[J]. *Neurosci Bull*, 2025, 41(2): 272-88.
- [19] Pollak DD, Rey CE, Monje FJ. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions[J]. *Ann Med*, 2010, 42(4): 252-64.
- [20] Markov DD, Novosadova EV. Chronic unpredictable mild stress model of depression: possible sources of poor reproducibility and latent variables[J]. *Biology (Basel)*, 2022, 11(11): 1621.
- [21] Liu XF, Zhou JL, Zhang T, et al. Meranzin hydrate elicits antidepressant effects and restores reward circuitry[J]. *Behav Brain Res*, 2021, 398: 112898.
- [22] 楚玉玺, 王晓丹, 崔 璨, 等. 防风对动物抑郁行为影响的实验研究[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(6): 96-102.
- [23] 王维刚, 刘震泽, 吴文婷, 等. 小鼠动物实验方法系列专题(七)旷场实验在小鼠行为分析中的应用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(11): 1191-6.
- [24] Xu DH, Du JK, Liu SY, et al. Upregulation of *KLK8* contributes to CUMS-induced hippocampal neuronal apoptosis by cleaving *NCAM1* [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(4): 278.
- [25] Vanderhaeghen P, Cheng HJ. Guidance molecules in axon pruning and cell death[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(6): a001859.
- [26] Kosten TA, Galloway MP, Duman RS, et al. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the *bcl-2* family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(7): 1545-58.
- [27] Chen M, He GP, Li Q. Maternal deprivation promotes hippocampal neuronal apoptosis *via* ERK1/2 signaling[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018, 23(10): 1923-32.
- [28] 王康恒, 王 毅. 基于mTOR/ULK1/ATG13通路探讨纹状体蓝总苷对抑郁症大鼠海马神经元过度自噬的保护作用[J]. *蚌埠医学院学报*, 2023, 48(10): 1333-8, 1345.
- [29] D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis[J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(11): 700-9.
- [30] Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(2): 99-104.
- [31] Wirth B, Barkats M, Martinat C, et al. Moving towards treatments for spinal muscular atrophy: hopes and limits[J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2015, 20(3): 353-6.
- [32] Upadhyay A, Hosseinibarkooie S, Schneider S, et al. Neurocalcin delta knockout impairs adult neurogenesis whereas half reduction is not pathological[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 19.
- [33] Baptista P, Andrade JP. Adult hippocampal neurogenesis: regulation and possible functional and clinical correlates[J]. *Front Neuroanat*, 2018, 12: 44.
- [34] Jeong SO, Son Y, Lee JH, et al. Both nitric oxide and nitrite prevent homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and subsequent apoptosis *via* cGMP-dependent pathway in neuronal cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(1): 164-9.
- [35] Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase *Ibeta* [J]. *Nature*, 2000, 404(6774): 197-201.