

利用经颅磁刺激技术对炎性诱导小鼠抑郁样症状的治疗及机制探究

A Study of Treatment and Mechanism to Inflammation-induced Depression in Mice Using Transcranial Magnetic Stimulation

[摘要] 抑郁症是现代最为常见的几种心理疾病之一，其患者的炎症标志物水平显著升高，在正常个体中诱发炎症亦可导致抑郁，压力、抑郁亦可促炎，抑郁症与炎症存在互相促进的正反馈机制。目前，经颅磁刺激技术（Transcranial Magnetic Stimulation, TMS）已运用于抑郁症临床治疗，但其有效性的机制尚不清楚，参数仍有待优化。本研究关注感染炎症引发的抑郁样行为，使用脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）腹腔注射诱导神经炎症，构建炎性抑郁小鼠模型后使用高频 TMS 进行治疗，寻找合适的刺激范式。我们的结果表明，TMS 的治疗效果具有参数特异性以及时间窗口特异性，使用不同刺激参数、在不同时间窗口进行刺激可不同程度影响小鼠恢复效果。我们推断，致炎因子 LPS 刺激后，脑内免疫反应的激发存在一定时间规律，在不同时间点介入 TMS 刺激可影响神经炎症的促炎-抗炎调节。本研究寻找 TMS 调控缓解抑郁样行为的证据，提供人群中使用 TMS 治疗抑郁症的参考思路。

[关键词] 经颅磁刺激，抑郁症，神经炎症，脂多糖

1. 引言

抑郁症具有多种病理生理学机制，涉及多方面稳态失衡，常见影响因素有炎症、应激反应以及神经回路改变等。研究显示，抑郁症患者炎症标志物水平普遍升高^[1]，接受 IFN- α 促炎的受试者中 80% 以上出现抑郁症状^[2]，压力诱导的抑郁在脑中也会产生明显的炎症反应^[3]。抑郁症与炎症之间存在正反馈机制：炎症会诱发抑郁和心理压力，而心理压力又可促炎。作为大脑中重要响应炎症的免疫细胞，小胶质细胞免疫监控激活后，行为上可有促炎与抗炎二态转化^[4]。

抑郁症传统药物治疗方式存在一定的副作用，经颅磁刺激（TMS）技术作为非药物的治疗方式，已应用于精神疾病的临床治疗并取得一定成效，可在多种神经炎症疾病中调节小胶质细胞行为。然而，由于 TMS 对神经元、胶质细胞的激活存在参数特异性，不同刺激范式治疗的治疗效果多样，机制不明。

本研究选用脂多糖（LPS）诱导炎症构建小鼠抑郁模型。LPS 经腹腔注射进入循环后，可通过脂蛋白转运系统跨越血脑屏障^[5]，作为病原体相关分子模式被 TLRs 受体识别^[6]。中枢神经系统中，TLRs 受体主要分布于星形胶质细胞和小胶质细胞上^[7]，TLR4 受体特异识别 LPS 并集中分布于小胶质细胞^[8]。结合 LPS 后，TLR4 同二聚化并激活下游信号通路，最终产生细胞因子和趋化因子^[9]，引发神经炎症，诱发抑郁。

综上，目前 TMS 对于炎性抑郁小鼠模型治疗效果未清晰，对效果更佳的抑郁症 TMS 治疗范式之探索亦在进行中。研究试图寻找更佳刺激范式，探索 TMS 治疗起效机制，推测与小胶质细胞的抗炎转化相关。

2. 材料与方法

2.1 实验动物

雄性 C57BL/6 野生型小鼠（8-10 周）购买自上海斯莱克实验动物有限公司。单鼠单笼饲养，鼠房温度 28-29 °C，湿度 40（±10）%，昼夜周期 12/12 小时。实验前小鼠适应居住条件 72 h。

2.2 LPS 腹腔注射构建炎性抑郁模型

LPS 来自 *Escherichia coli*（serotype O55:B5），购买自 SIGMA-ALDRICH（St. Louis, MO）。原瓶 5 mg 粉末加入 5 mL 生理盐水配置为 1 mg/mL LPS 原液，取出 1 mL 于 1.5 mL 离心管中存放于 4 °C 冰箱中供平时使用，剩余原液冻存 -20 °C 冰箱中。称量小鼠体重，按照 1 mg/kg 的注射剂量配置 250 μ L 注射液，小鼠通过异氟烷气体短暂麻醉后，使用康德莱一次性无菌 1 mL 注射器腹腔注射。

2.3 TMS 治疗方案

使用改装后的尾静脉注射管固定小鼠体位，经颅磁刺激仪 MagPro R30（MagVenture，丹麦）八字线圈刺激强度 20% 最大输出。线圈中心十字对准小鼠头顶正中，采用高频方案刺激 20 min 后将小鼠放回鼠笼。

2.4 RNA-seq 数据采集

小鼠使用异氟烷气体深度麻醉后，迅速灌流取脑，脑组织冰上剪成黄豆大小保存在提供的 RNAlater 中，送上海逆耳生物科技有限公司测序。

2.5 行为学实验方法

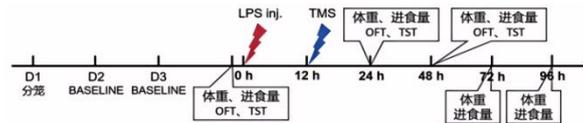


图 1. 小鼠在 LPS 注射后 12 h 进行 TMS 刺激操作方法

2.5.1 体重及进食量采集

小鼠每日固定时间称量体重，重新选取一颗重量 4.5-6 g 的新鼠粮替换旧鼠粮，提供充足饮用水。

2.5.2 旷场试验（Open Field Test, OFT）

使用白色 4 mm 亚克力板搭建旷场（长：50 cm，宽：50 cm，高：40 cm），旷场中心正上方放置 HF500 摄像头（深圳市杰锐微通电子科技有限公司），通过 USB 接口连接到电脑，使用 S-EYE 2.0（ShenZhen YOUNG WIN Technology Co., Ltd.）记录视频信息。将每只小鼠放入旷场中心，允许其自由探索 15 分钟。试验结束后，将小鼠放回笼中，用 75%乙醇清洁装置以消除小鼠留下的气味和粪便，等待 5 分钟酒精挥发完全后放入下一只小鼠。使用 Matlab R2023b（Windows）编写程序分析小鼠 10-15 分钟内运动轨迹。主要关注的指标整体运动距离（ODT）越短、进入中心区域次数（EIC）越少，小鼠抑郁焦虑程度越高。

2.5.3 悬尾试验（Tail Suspension Test, TST）

使用亚克力板搭建悬尾箱（长：25 cm，宽：25cm，高：40 cm），正面改为活板门便于取放小鼠，顶部安装的高精度 1N 条形盒测力计（FEIDIE®）末端接上焊锡丝通过小孔伸入箱体，其余位置贴锡箔遮光。将小鼠尾部三分之一处粘在焊锡丝上，与此同时使用华为 p40 拍摄悬尾指针运动视频，小鼠悬挂 6 分钟。实验结束后，小鼠放回笼中，喷洒 75%乙醇清洁装置。使用 Matlab R2023b 编写程序绘制指针 4-6 分钟波形图，判断静止时长（程序思路及操作详见实验记录 16）。小鼠静止时间越长，表示小鼠抑郁状态越高。

2.6 数据分析

所有行为学数据均表示为与 LPS 注射前 0 h 变化百分比，计算公式为：（注射第[0,24,48,72,96]小时数据-注射第 0 小时数据）÷（注射第 0 小时数据）×100%，以平均值 ± 标准误（mean ± s.e.）表示，使用 GraphPad Prism version10.0.0 for Windows（GraphPad Software, 美国马萨诸塞州波士顿, www.graphpad.com）。

3. 实验结果

3.1 小鼠腹腔注射 LPS 后出现明显抑郁样行为

如图 2A，与仅腹腔注射生理盐水相比，小鼠注射 LPS 后第 24 小时出现显著体重下降，48 小时未见恢复趋势，之后呈缓慢恢复，第 96 小时仍未完全恢复注射前体重。OFT 中（图 2B-D）第 24 小时的运动倾向显著减弱，且小鼠进入中心区域自由探索意愿显著下降，体现明显抑郁焦虑行为，48 小时现恢复倾向。TST 中（图 2E）小鼠在第 24 小时悬尾静止时长显著增加，体现明显抑郁样行为，在 48 小时逐渐恢复。

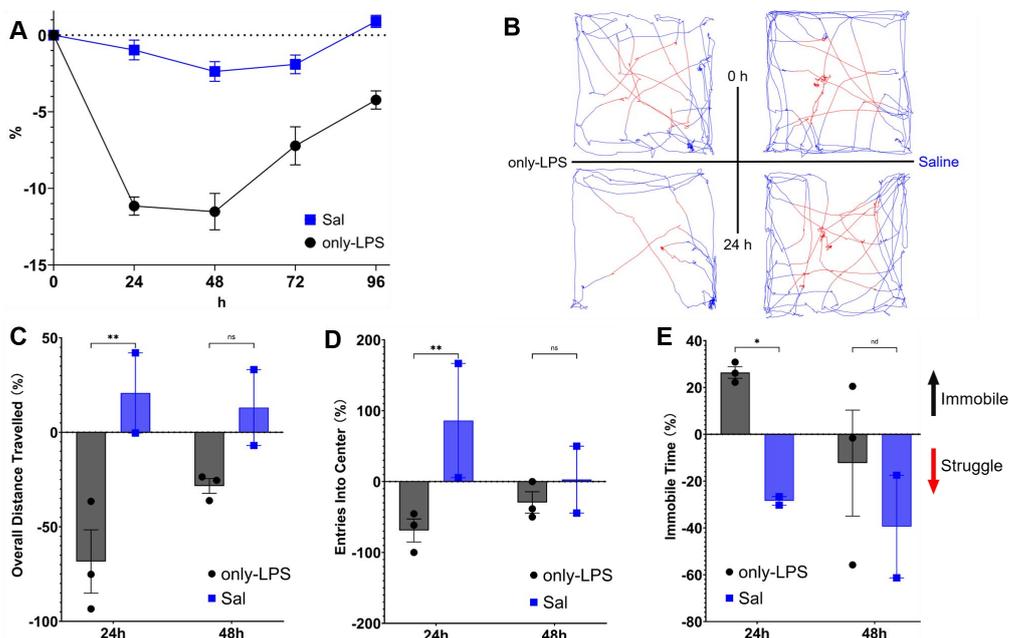


图 2. 小鼠腹腔注射 LPS 后出现显著抑郁样行为

A) 仅注射 LPS (n=13) 与仅注射生理盐水 (n=5) 小鼠体重变化; B-D) 仅注射 LPS (n=3) 与仅注射生理盐水 (n=2) OFT, B) 0 小时、24 小时旷场实验运动轨迹对比图, C) 注射后 24、48 小时整体运动距离变化, D) 注射后 24、48 小时进入中心次数变化, two-way ANOVA, Dunnett multiple comparison, ns 不显著, **p<0.01; E) 注射前后悬尾静止时长变化, 向上箭头为与注射前比较静止时长增加, 向下为挣扎时长增加, unpaired t-test, n.s.不显著, ***p<0.001。

3.2 TMS 治疗效果具有参数、时间窗口特异性

使用特定高频刺激参数在 LPS 注射后 12 小时 (图 3A) 时间窗口进行刺激, 恢复曲线在 LPS 注射后 48 小时即出现显著分离, 将 TMS 刺激时间窗口往前推至注射后 3 小时 (图 3B), 治疗效果仍较好。然而, 将时间窗口继续前推至 LPS 注射前 3 天连续密集 TMS (图 3C), 见治疗效果显著下降; 后推至 24 小时 (图 3D) 曲线分离亦不显著, 说明治疗效果较弱。

如图 3E, 更换刺激频率, 使用 5 Hz 低频进行 Null-TMS 刺激后, 恢复曲线与仅 LPS 注射曲线分离不显著。说明以上 TMS 刺激时间窗口、参数治疗效果均不佳。比较图 3F 各刺激方案小鼠恢复状况, 不同刺激参数、不同治疗时间窗口可使得小鼠恢复速度出现差异, 体现治疗效果的参数、时间窗口特异性。

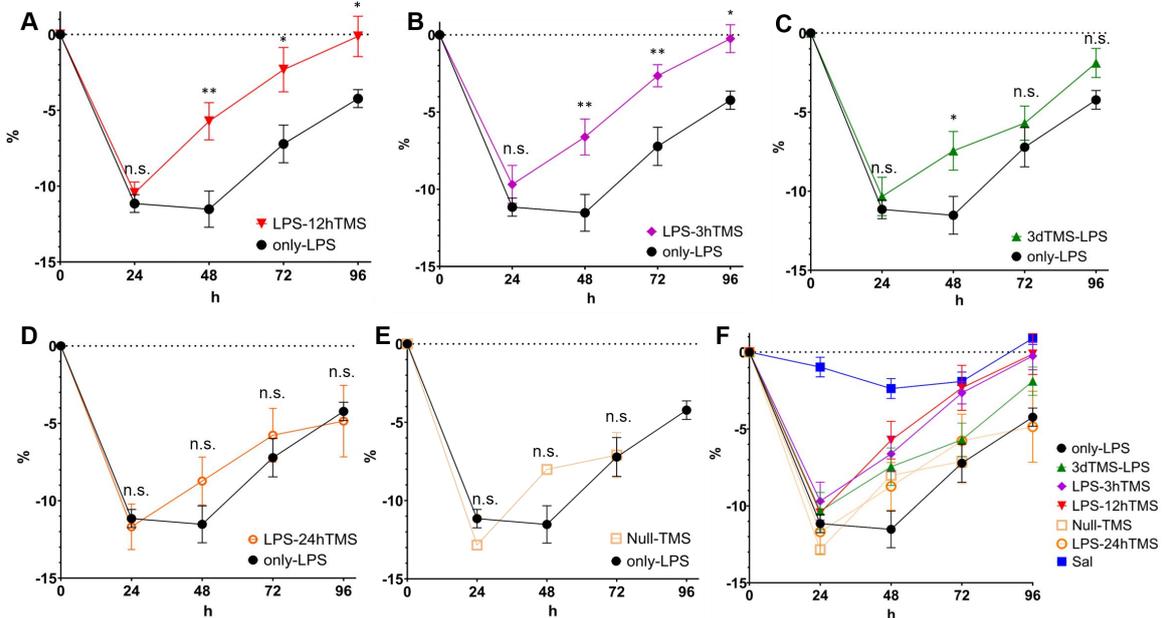


图 3. 不同参数、不同治疗时间窗口进行 TMS 刺激小鼠体重恢复变化率曲线

A) 仅 LPS 注射组 (n=13) 与 LPS 注射后 12hTMS 刺激组 (n=6-12) 对比图; B) 仅 LPS 注射组 (n=13) 与 LPS 注射后 3hTMS 刺激组 (n=9) 对比图; C) 仅 LPS 注射组 (n=13) 与 LPS 注射前 3 天连续 TMS 刺激组 (n=8); D) 仅 LPS 注射组 (n=13) 与 LPS 注射后 24hTMS (n=3) 对比图; E) 仅 LPS 注射组 (n=13) 与 LPS 注射后 12 小时 5 Hz 低频 TMS 刺激组 (n=3) 对比图。以上两组曲线间进行 unpaired t-test, n.s.不显著, *p<0.05, **p<0.01; F) 所有参数、时间窗口曲线汇总对比图。

3.3 在 12 h 时间窗口进行 TMS 刺激治疗效果明显, 体现抗炎机制

确定 LPS 注射后第 12 小时进行 TMS 刺激体重恢复速度的显著性后, 采集仅生理盐水注射、仅 LPS 注射、LPS 注射后 12hTMS 刺激三组小鼠 (每组 n=3) 注射后 48 小时的脑组织样品进行 RNA 测序, 得到差异基因表达。如图 4A, LPS 注射 48 小时后取样可见表征炎症的基因上调, 以 *Tgm2*、*Lcn2*、*Cd14*、*Sele* 为例; 相应地, 如图 4B 所示, 进行过在 LPS 注射后第 12 小时进行 TMS 刺激的小鼠在同一时间点取样, 发现以上被 LPS 激活上调的基因均转为下调, 且上调越高, 下调越明显, 体现 TMS 的抗炎机制。

TMS 在基因表达层面的抗炎机制也体现在行为学层面。图 4C 与图 2B 的典型个案运动轨迹图直观指出, TMS 治疗组在 LPS 注射后 24 小时旷场表现仍然良好。如图 4C-D, 与仅注射 LPS 的小鼠相比, 经受 12hTMS 治疗的小鼠在注射后 24 小时进行旷场试验 OFT, 进入中心区域探索的意愿显著提高, 表示抑郁焦虑行为大幅缓解; 运动倾向几乎无降低, 48 小时甚至显著提升。图 4F 显示 TST 中, 接受过 12hTMS 刺激的小鼠静止时长减少, 变化趋势与仅生理盐水注射组相似, 提示抑郁样行为得到缓解。

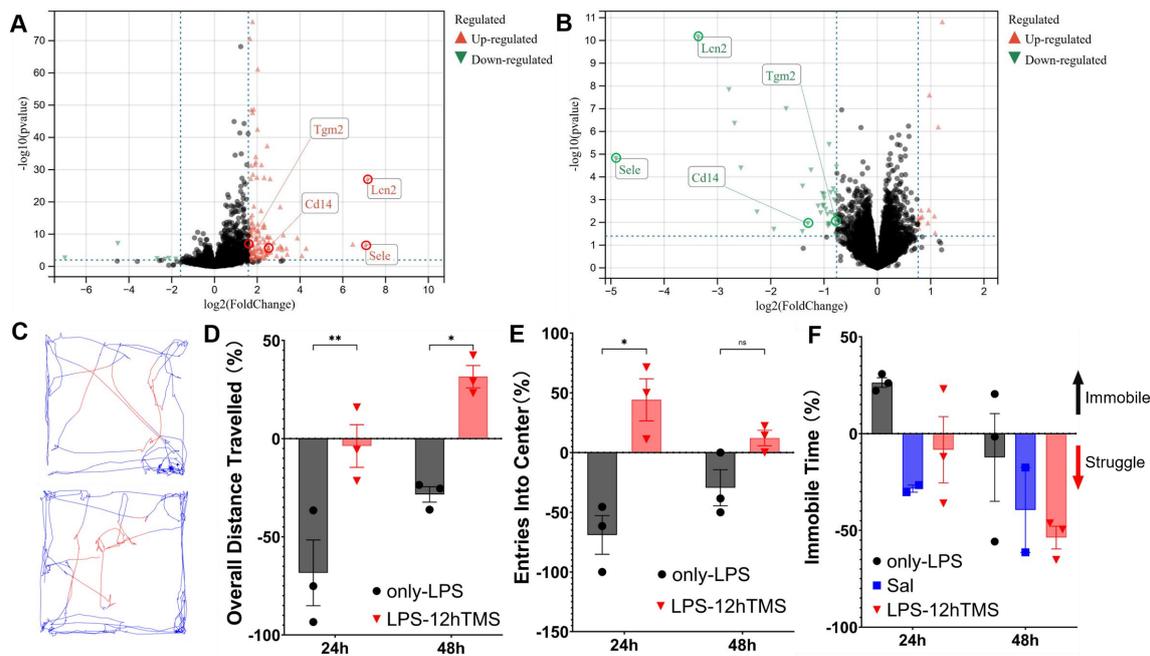


图 4. LPS 注射后第 12 小时进行 TMS 治疗效果良好

A) 仅注射 LPS 第 48 小时脑组织 RNA-seq 提示基因上调, 以 *Tgm2*、*Lcn2*、*Cd14*、*Sele* 为例; B) 注射 LPS 第 12 小时进行 TMS 刺激, 第 48 小时脑组织 RNA-seq 提示被 LPS 上调的基因转为下调, 以 A) 中四个基因为例。C-E) 仅 LPS 注射 (n=3) 与 LPS 注射后 12hTMS 刺激组 (n=3) 注射前后 OFT 对比; C) LPS 注射后 12hTMS 刺激组注射前 0 小时 (上)、注射后 24 小时 (下) OFT 运动轨迹案例图, D) 注射后 24、48 小时整体运动距离变化, E) 注射后 24、48 小时进入中心次数变化, two-way ANOVA, Dunnett multiple comparison, ns 不显著, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。F) 仅注射 LPS 组 (n=3)、仅注射生理盐水组 (n=2)、LPS 注射后 12hTMS 刺激组 (n=3) 第 24 小时、48 小时与注射前对比悬尾静止时长变化, unpaired t-test。

4. 讨论与展望

在炎症诱导抑郁模型中, 一般认为小鼠抑郁样行为与脑炎症直接相关。小鼠腹腔注射给药 LPS 后, 首先唤起外周炎症, 血脑屏障 (BBB) 可阻止中枢直接暴露在 LPS 致炎刺激下。尽管 LPS 外周注射可通过外周-中枢交流、BBB 转运系统^[10]等引起神经炎症, 但是与直接中枢给药相比, 从注射到引起神经炎症存在时间差。除响应致炎刺激外, 脑内免疫反应响应 TMS 刺激也具有有时效性, 难点在于寻找 LPS 注射后神经炎症发展的时间点并予以及时的 TMS 刺激。

实验结果表明, TMS 在免疫反应中起抗炎调节作用, 调节刺激时间点可使抗炎窗口与 LPS 致炎窗口重叠, 重叠程度不同可导致神经炎症严重程度、恢复速度产生差异。实验中, 3 小时、12 小时的 TMS 时间窗口均体现恢复速度的显著加快, 有效缓解抑郁样行为, 而过于靠前或滞后时间窗口内的 TMS 刺激治疗效果弱。实际操作中, 我们发现存在多种变量, 如小鼠对 LPS 反复注射有较强耐受, TMS 中对清醒小鼠的束缚使其应激而引起效果与低剂量 LPS 注射相似的轻微神经炎症等。综合考虑以上因素, 我们也尝试探索 LPS-TMS 脑内免疫反应的机制。

脑内主要的免疫细胞为小胶质细胞, 其被特定参数 TMS 激活后可有抗炎-促炎二态的转化, 我们以小胶质细胞为主体提出 TMS 治疗 LPS 诱导神经炎症的假设前提: I. LPS 强致炎刺激, 存在外周延迟, 产生大量致炎因子 (IF); II. TMS 可以长时间激活小胶质细胞进入抗炎态; III. 束缚可轻微而直接引起神经炎症, 产生少量 IF; IV. 抑郁样行为反映 Δ IF, 即与 24h 之前差值; V. 被 LPS 激活并转换的小胶质细胞短时间内无法响应 TMS 激活, 但是被 TMS 激活的小胶质细胞对 LPS 刺激敏感。计划未来使用 PLX3397 特异性剥夺小胶质细胞后重复实验步骤, 探究小胶质细胞在整体调节中的地位。

Tgm2、*Lcn2*、*Cd14*^[11]、*Sele*^[12] 基因表达水平与小鼠脑炎症水平呈现高度正相关。小胶质细胞 *Tgm2* 的上调会导致小鼠焦虑程度增加^[13], 外周 *Lcn2* 通过调节内侧前额叶皮层的神经活动并与压力诱发的焦虑样行为有关^[14]。未来可进一步关注相关通路, 结合下游产物调控小胶质细胞行为乃至动物行为的具体机制, 进一步探究 TMS 抗炎机制对小鼠抑郁焦虑行为的治疗效果。

参考文献

- [1] Felger, J. C., & Lotrich, F. E. (2013). Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience*, 246, 199-229.
- [2] Felger, J. C. (2019). Role of Inflammation in Depression and Treatment Implications. In M. Macaluso & S. H. Preskorn (Eds.), *Antidepressants: From Biogenic Amines to New Mechanisms of Action* (pp. 255-286). Springer International Publishing.
- [3] Steptoe, A., Hamer, M., & Chida, Y. (2007). The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain, behavior, and immunity*, 21(7), 901-912.
- [4] Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., & Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nature Reviews Neurology*, 11(1), 56-64.
- [5] Vargas-Caraveo, A., Sayd, A., Maus, S. R., Caso, J. R., Madrigal, J. L. M., García-Bueno, B., & Leza, J. C. (2017). Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. *Scientific Reports*, 7(1), 13113.
- [6] Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461.
- [7] Aghamiri, S. H., Komlakh, K., & Ghaffari, M. (2022). Toll-like receptors (TLRs) and their potential therapeutic applications in diabetic neuropathy. *International Immunopharmacology*, 102, 108398.
- [8] Leitner, G. R., Wenzel, T. J., Marshall, N., Gates, E. J., & Klegeris, A. (2019). Targeting toll-like receptor 4 to modulate neuroinflammation in central nervous system disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 23(10), 865-882.
- [9] Zhao, J.; Bi, W.; Xiao, S.; Lan, X.; Cheng, X.; Zhang, J.; Lu, D.; Wei, W.; Wang, Y.; Li, H.; et al. Neuroinflammation Induced by Lipopolysaccharide Causes Cognitive Impairment in Mice. *Sci. Rep.* 2019, 9, 5790.
- [10] Vargas-Caraveo, A., Sayd, A., Maus, S. R., Caso, J. R., Madrigal, J. L. M., García-Bueno, B., & Leza, J. C. (2017). Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. *Scientific Reports*, 7(1), 13113.
- [11] Rodrigues, F. D. S., Newton, W. R., Tassinari, I. D., da Cunha Xavier, F. H., Marx, A., de Fraga, L. S., Wright, K., Guedes, R. P., & Bambini-Jr, V. (2024). Cannabidiol prevents LPS-induced inflammation by inhibiting the NLRP3 inflammasome and iNOS activity in BV2 microglia cells via CB2 receptors and PPAR γ . *Neurochem Int*, 177, 105769.
- [12] Xiang, P., Chew, W. S., Seow, W. L., Lam, B. W. S., Ong, W. Y., & Herr, D. R. (2021). The S1P(2) receptor regulates blood-brain barrier integrity and leukocyte extravasation with implications for neurodegenerative disease. *Neurochem Int*, 146, 105018.
- [13] Liu, C., Gao, X., Shi, R. X., Wang, Y. Y., He, X. C., Du, H. Z., Hu, B., Jiao, J., Liu, C. M., & Teng, Z. Q. (2023). Microglial transglutaminase 2 deficiency causes impaired synaptic remodelling and cognitive deficits in mice. *Cell Prolif*, 56(9), e13439.
- [14] Yan, L., Yang, F., Wang, Y., Shi, L., Wang, M., Yang, D., Wang, W., Jia, Y., So, K. F., & Zhang, L. (2024). Stress increases hepatic release of lipocalin 2 which contributes to anxiety-like behavior in mice. *Nat Commun*, 15(1), 3034.