

· 论著 ·

# 重复经颅磁刺激对精神分裂症小鼠模型认知功能及海马内源性大麻素基因表达的影响

于欢 薛姗姗 赵建帅 王莹 赵洁玉 谭庆荣 周翠红

710032 西安,空军军医大学第一附属医院心身科(于欢、薛姗姗、王莹、赵洁玉、谭庆荣、周翠红),麻醉科(赵建帅)

通信作者:周翠红, Email: zch4610@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.08.001

**【摘要】目的** 探讨重复经颅磁刺激(rTMS)对双环己酮草酰二胺(CPZ)诱导的精神分裂症小鼠认知损伤的改善作用及内源性大麻素受体1(CB1R)、二酰基甘油脂肪酶(DAGL $\alpha$ )、N酰基磷脂酰乙醇胺磷脂酶D(NAPE-PLD)、脂肪酰氨水解酶(FAAH)和单酰基甘油脂肪酶(MAGL)表达的影响。**方法** 将24只C57BL/6小鼠随机分为对照组(sham)、模型组(CPZ)、模型+rTMS治疗组(CPZ+rTMS),每组8只。CPZ+rTMS组和CPZ组小鼠饲喂含有0.2% CPZ的饲料6周后,分别接受7 d的rTMS(5 Hz, 1.26 Tesla)或假刺激; sham组正常饲喂6周并接受7 d的rTMS假刺激。最后一次rTMS干预结束24 h后进行Y迷宫和三箱社交测试; 随后处死动物,取海马组织进行蛋白质印迹实验,检测其内源性大麻素相关基因的蛋白表达变化。**结果** 与sham组相比, CPZ组表现出明显的空间记忆损伤和社交缺陷,包括Y迷宫实际交替进臂百分比下降[ sham组(62.69 $\pm$ 7.92)%比CPZ组(43.78 $\pm$ 14.30)%,  $P < 0.01$ ]和三箱社交实验中与2处陌生小鼠接触时间减少[ sham组(233.41 $\pm$ 3.84)比(157.02 $\pm$ 63.62)s,  $P < 0.05$ ; CPZ组(164.30 $\pm$ 79.16)比(249.28 $\pm$ 58.31) s,  $P < 0.05$ ]。与sham组小鼠相比, CPZ组小鼠海马的CB1R、DAGL $\alpha$ 和NAPE-PLD蛋白表达下调[(1.14 $\pm$ 0.09)比(0.77 $\pm$ 0.13)、(0.76 $\pm$ 0.12)比(0.38 $\pm$ 0.10)、(0.81 $\pm$ 0.12)比(0.36 $\pm$ 0.11)],  $P < 0.05$ ], 而FAAH表达上调[(0.73 $\pm$ 0.09)比(1.14 $\pm$ 0.16)],  $P < 0.05$ ]。rTMS干预可以改善CPZ小鼠的空间记忆损伤和社交缺陷, CPZ+rTMS组小鼠在Y迷宫测试中的实际交替进臂百分比比较CPZ组上调[ CPZ组(43.78 $\pm$ 14.30)%比CPZ+rTMS组(60.40 $\pm$ 10.62)%,  $P < 0.05$ ]; 三箱社交实验中, CPZ+rTMS组小鼠与2处陌生小鼠接触时间更长[(236.74 $\pm$ 51.66)比(158.41 $\pm$ 68.45)s,  $P < 0.05$ ]。rTMS干预可以恢复CPZ小鼠海马的内源性大麻素相关基因表达水平, CPZ+rTMS组小鼠海马的CB1R、DAGL $\alpha$ 、FAAH和NAPE-PLD蛋白水平[(1.13 $\pm$ 0.11)、(0.68 $\pm$ 0.13)、(0.66 $\pm$ 0.08)、(0.64 $\pm$ 0.14)]与CPZ组比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** rTMS可以改善CPZ诱导的精神分裂症小鼠模型的认知损伤并调节该小鼠海马内源性大麻素相关基因表达水平。

**【关键词】** 精神分裂症; 重复经颅磁刺激; 海马; 内源性大麻素**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81904280, 81630032, 81671343)

**Impact of rTMS on cognitive function and endocannabinoid-related gene expression in the hippocampus in mice model of schizophrenia** Yu Huan, Xue Shanshan, Zhao Jianshuai, Wang Ying, Zhao Jieyu, Tan Qingrong, Zhou Cuihong

Department of Psychiatry, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China (Yu H, Xue SS, Wang Y, Zhao JY, Tan QR, Zhou CH); Department of Anesthesiologist, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China (Zhao JS)

Corresponding author: Zhou Cuihong, Email: zch4610@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on cognitive impairment and the expression of endocannabinoid system-related genes, including CB1R (cannabinoid receptor1), DAGL $\alpha$  (Diacylglycerol- $\alpha$ ), NAPE-PLD (N acylphosphatidyl ethanolamine

phospholipase D), FAAH (Fatty acid amide hydrolase) and MAGL (monoacylglycerol) in the hippocampus in cuprizone (CPZ)-induced mice model of schizophrenia. **Methods** A total of 24 C57BL/6 mice were randomly assigned to the following 3 groups ( $n=8$  for each group): sham, CPZ and CPZ + rTMS. The mice in the CPZ + rTMS and CPZ group were administered 0.2% CPZ in standard powdered rodent chow for 6 weeks, then received rTMS treatment (5 Hz, 1.26T) or sham rTMS treatment for 7 days; concurrently, the mice in sham group were fed with normal powdered rodent chow for 6 weeks, and then received sham rTMS treatment for 7 days. 24 hours after the completion of the last rTMS intervention, mice were subjected to Y-maze and 3-chamber tests. Then the mice were sacrificed, and Western blot was used to detect the protein expression of cannabinoid related genes in hippocampus. **Results** Compared with sham group, CPZ group showed significant spatial memory impairment and social deficits, including decreased percentages of spontaneous alternations in Y maze test [sham ( $62.69 \pm 7.92$ )% vs CPZ ( $43.78 \pm 14.30$ )%,  $P < 0.01$ ], and less duration with stranger in the 3-chamber test [sham: ( $233.41 \pm 3.84$ ) vs ( $157.02 \pm 63.62$ ),  $P < 0.05$ ]; CPZ: ( $164.30 \pm 79.16$ ) vs ( $249.28 \pm 58.31$ ) s,  $P < 0.05$ ]. Compared with sham group, the expression levels of CB1R, DAGL $\alpha$  and NAPE-PLD in hippocampus of the CPZ group was decreased [(1.14  $\pm$  0.09) vs (0.77  $\pm$  0.13), (0.76  $\pm$  0.12) vs (0.38  $\pm$  0.10), (0.81  $\pm$  0.12) vs (0.36  $\pm$  0.11),  $P < 0.05$ ], while expression of FAAH of the CPZ group was increased [(0.73  $\pm$  0.09) vs (1.14  $\pm$  0.16),  $P < 0.05$ ]. rTMS treatment improved cognitive impairment and social deficits in mice exposed to CPZ, evidenced by increased percentages of spontaneous alternations in Y maze test in CPZ+rTMS group than in CPZ group [CPZ: ( $43.78 \pm 14.30$ )% vs CPZ+rTMS: ( $60.40 \pm 10.62$ )%,  $P < 0.05$ ], and more duration with stranger in the 3-chamber test [(236.74  $\pm$  51.66) vs (158.41  $\pm$  68.45) s,  $P < 0.05$ ]. rTMS treatment reversed the level of endocannabinoid system-related genes in the hippocampus of CPZ mice, since the differences of the expression levels of CB1R, DAGL $\alpha$  and NAPE-PLD in hippocampus between CPZ+rTMS group [(1.13  $\pm$  0.11), (0.68  $\pm$  0.13), (0.66  $\pm$  0.08), (0.64  $\pm$  0.14)] and CPZ group were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** rTMS treatment can improve the cognitive impairment in CPZ-induced schizophrenia mice model and restored the protein level of endocannabinoid system-related genes in the hippocampus.

**【Key words】** Schizophrenia; Repetitive transcranial magnetic stimulation; Hippocampus; Endocannabinoid

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81904280, 81630032, 81671343)

精神分裂症是临床中较为难治的一种重性精神疾病,病程反复迁延,预后差,致残率和自杀率高,给家庭带来了沉重的经济和照料负担<sup>[1]</sup>。目前,对精神分裂症的治疗以药物治疗为主,包括以中枢神经系统多巴胺受体阻滞剂为代表的第一代抗精神病药物(first-generation antipsychotics, FGAs)和以利培酮、奥氮平、喹硫平、齐拉西酮为代表的第二代抗精神病药物(second generation antipsychotics, SGAs)。但是,不管是FGAs还是SGAs都存在不良反应、复发率高以及对患者认知障碍改善效果差等问题,最终导致其整体治疗效果不理想<sup>[2]</sup>。因此,有必要深入探索精神分裂症的发病机制并寻找新的治疗新方法。

重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)是临床常用的一种非侵入性脑刺激疗法,在多种精神疾病中发挥治疗作用。临床研究发现,一定频率的rTMS干预可以显著提高精神分裂症患者面部表情识别评分,缓解其认知障碍<sup>[3]</sup>。此外,rTMS对于抗精神病药物治疗无应答的患者也有较好治疗效果,可以明显改善患者的阴性症状和短期记忆<sup>[4]</sup>。但是,rTMS治疗精神分裂症的生物学机制并不十分清楚。

内源性大麻素(endocannabinoid, eCB)是一类由机体自然产生、在大脑中广泛分布的类似大麻的化学物质。大量研究表明,eCB信号在中枢神经系统突触可塑性以及对内源性和环境性损伤的反应中发挥重要作用,与精神分裂症的认知功能障碍密切相关<sup>[5]</sup>。临床研究发现,精神分裂症患者海马中的eCB信号异于常人,而抗精神病药物能够改善这一状况<sup>[6]</sup>。同时,基础研究也发现,精神分裂症小鼠模型的海马突触可塑性受损以及记忆损伤与海马的2-花生四烯酰甘油(2-Arachidonoylglycerol, 2-AG)和内源性大麻素受体1(CB1R)水平变化相关,而人为调节eCB水平可以改善其突触、髓鞘损伤和认知障碍<sup>[7-8]</sup>。前期的研究发现,rTMS可以激活海马eCB系统,修复抑郁症患者的脑结构,改善其认知障碍<sup>[9]</sup>。然而,rTMS对精神分裂症海马eCB的影响还不清楚。本研究以双环己酮草酰二胺(cuprizone, CPZ)诱导的精神分裂症小鼠为模型<sup>[10]</sup>,研究rTMS对该模型小鼠认知功能和海马eCB基因表达的影响,探索rTMS治疗精神分裂症可能的分子生物学机制,旨在为精神分裂症的治疗提供新思路。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 实验动物: 实验所用动物为8周龄左右的清洁级雄性C56BL/6小鼠(18~22 g), 购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 h光照/黑暗循环(8:00—20:00), 每笼4只, 随意获取水和食物。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。

2. 主要试剂和仪器: CPZ(St. Louis, MO, USA); 蛋白提取试剂盒(KeyGEN BioTECH, KGP2100); 电泳槽(Bio.Rad); 电动组织匀浆仪(Ika公司); rTMS磁刺激仪(YRD CCY-1, 中国依瑞德公司)。

### 二、方法

1. 实验设计: 小鼠适应性饲养1周后, 将24只小鼠随机分为对照组(sham)、模型组(CPZ)、rTMS治疗组(CPZ+rTMS), 每组8只。sham组小鼠在其笼中正常饲养6周后进行假性rTMS治疗7 d。CPZ组和CPZ+rTMS组小鼠给予0.2%的CPZ喂养6周, CPZ喂养结束后, 换成普通饲料, CPZ组小鼠接受假性rTMS治疗7 d, CPZ+rTMS组的小鼠接受5 Hz、1.26特斯拉(Tesla, T)的rTMS治疗7 d。rTMS干预结束后, 处死动物取海马组织提取蛋白, 采用蛋白质印迹法(Western blot)测定海马中的CB1R、二酰基甘油脂肪酶(DAGL $\alpha$ )、脂肪酰胺水解酶(FAAH)、单酰甘油脂肪酶(MAGL)和N酰基磷脂酰乙醇胺磷脂酶D(NAPE-PLD)的表达水平。

2. CPZ脱髓鞘模型构建: 将CPZ以0.2%的质量比混入饲料, 连续喂养6周。

3. rTMS干预: 使用圆形rTMS线圈, 内径2.5 cm, 外径5 cm。刺激参数设置为频率5 Hz, 强度1.26 T, 每天给予100个刺激串(每串刺激10 s, 刺激间隔15 s), 共1 000个脉冲, 连续刺激7 d。实验过程中, 用手限制小鼠运动, 将线圈置于小鼠颅骨顶点, 使线圈手柄与小鼠脊柱线平行。为排除非特异性应激的假定效应, 给予对照组(sham)和模型组(CPZ)小鼠每日假刺激程序5 min, 持续1周。假刺激过程中, 线圈置于小鼠颅骨上方高出头部10 cm处以确保动物感受到rTMS线圈点击产生的振动但没有接收到磁刺激。真实和假性rTMS处理在整个处理期间未产生明显的癫痫发作或任何行为改变。

4. 行为学测试: 文献报道, CPZ诱导脱髓鞘小鼠存在认知功能障碍, 包括空间记忆损伤和社交

缺陷<sup>[14]</sup>。本研究采用Y迷宫和三箱社交实验检测CPZ和rTMS干预对小鼠认知功能的影响。最后一次rTMS干预结束后24 h对小鼠进行行为学检测, 在14:00—18:00进行, 测试前将小鼠放在测试房间适应30 min。(1)Y迷宫测试<sup>[11-12]</sup>: 其被用于检测动物模型空间记忆和探索行为, 实验装置由3个闭臂(标记为A、B和C)(长30 cm, 宽10 cm, 高15 cm)组成Y字型(夹角120°), 距离地面45 cm。实验时, 将小鼠随意放在1个闭臂内, 让其自由在3个臂内活动, 通过上方的红外摄像头监视并记录小鼠在8 min内进入3个臂的次数和顺序。将老鼠四肢全部进入一只臂设为进入该臂一次。实际交替进臂次数是指按照顺序依次进入3个臂, 比如ABC、BCA、CAB。手动记录小鼠进臂总数和实际交替进臂次数。实际交替进臂百分比=[实际交替进臂次数/(总进臂次数-2)] $\times$ 100%。降低的实际交替进臂百分比代表认知功能损伤。(2)三箱社交实验<sup>[13]</sup>: 三箱社交箱由3个(30 cm $\times$ 30 cm $\times$ 30 cm)相通的箱子组成, 包括30 cm宽的中央区域以及左右两边宽30 cm的侧边区域, 左右两侧区域的中间位置各固定1个金属小笼子。实验分为两个阶段, 分别为社交能力测试阶段和社交趋新测试阶段。在社交能力测试阶段, 将1只和测试小鼠性别年龄相同的陌生鼠(陌生小鼠1)随机放入侧边区域的金属笼子内, 将实验小鼠放在中间的箱子里适应5 min, 然后打开通往两侧箱子的通道, 使其在社交箱中自由活动10 min, 上方摄像记录小鼠在社交箱中的活动情况, 计算实验小鼠在社交箱三区域活动时间; 在社交趋新测试阶段, 于另一侧的金属空笼子里放另一只性别年龄相同相仿的陌生鼠2, 让实验小鼠继续在社交箱中自由活动10 min, 记录其在3个区域的活动时间。

5. Western blot: 行为学测试结束后处死小鼠, 收集各组小鼠海马, 于裂解缓冲液中进行匀浆裂解并提取蛋白。采用BCA蛋白质定量试剂盒测定各组的蛋白质浓度, 采用SDS-PAGE凝胶电泳(上样量: 40  $\mu$ g)分离样品并转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温摇晃封闭2 h后, 将膜与以下一抗孵育(4℃, 16 h), 包括CB1R(ab23703, 1:300)、DAGL $\alpha$ (ab81984, 1:500)、MAGL(ab24701, 1:2 000)、 $\beta$ -actin antibodies(ab8227, 1:5 000)、FAAH(ab54615, 1:500)、NAPE-PLD(ab95397, 1:200)。随后在室温条件下分别与以下二抗孵育2 h, 包括驴抗兔IgG(1:10 000)、驴抗小鼠IgG(1:10 000)。所有抗体均购自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采用Bio-Rad QuantityOne1-D软件(1709600; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)分析统计表达情况。

6. 统计学方法: 应用SPSS 19.0统计学软件对所得数据进行分析, 计量资料用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, Y迷宫结果和Western blot结果采用单因素方差分析, 随后采用Tukey's post hoc test方法进行两两数据比较, 三箱社交实验结果采用组内 $t$ 检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. rTMS改善CPZ小鼠的认知损伤: 在Y迷宫测试中, 三组小鼠总的进臂次数比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与对照组相比, CPZ组小鼠的实际交替进臂次数减少( $P < 0.01$ ), 实际交替进臂百分比降低( $P < 0.01$ )。rTMS治疗后, CPZ小鼠的实际交替进臂次数( $P < 0.05$ )和实际交替百分比都较CPZ组有所增加( $P < 0.05$ ), 表明rTMS治疗可以改善CPZ导致的小鼠的空间记忆损伤。见表1。

表1 各组小鼠Y迷宫测试结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	总进臂次数	实际交替进臂次数	实际交替进臂百分比(%)
sham组	8	29.75 ± 5.90	17.13 ± 2.53	62.69 ± 7.92
CPZ组	8	23.50 ± 8.26	10.13 ± 5.96 <sup>a</sup>	43.78 ± 14.30 <sup>a</sup>
CPZ+rTMS组	8	30.38 ± 7.19	16.63 ± 3.16 <sup>b</sup>	60.40 ± 10.62 <sup>b</sup>
$F$ 值		2.241	4.421	6.730
$P$ 值		0.131	0.025	0.006

注: sham组 对照组; CPZ组 模型组; CPZ+rTMS组 重复经颅磁治疗组; 与sham组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与CPZ组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

三箱社交实验结果显示, 在社交能力测试阶段, sham组和CPZ+rTMS组小鼠在含有陌生小鼠1的区域停留的时间较在金属空笼区域停留时间长( $P < 0.05$ ), 而CPZ组小鼠在两边区域停留的时间差异无统计学意义( $P = 0.81$ )。见表2。

在社交趋新阶段, sham组和CPZ+rTMS组小鼠在含有新的陌生小鼠2的区域停留的时间较在含有陌生小鼠1的区域停留时间长( $P < 0.05$ ), 而CPZ组小鼠在陌生小鼠1的区域停留的时间较在陌生小鼠2的区域停留时间长( $P < 0.05$ )。见表3。

2. rTMS调节CPZ小鼠海马的eCB相关蛋白表达: 见图1。与对照组相比, CPZ组小鼠海马的CB1R受体[sham组( $1.14 \pm 0.09$ )比CPZ组( $0.77 \pm 0.13$ )],

表2 各组小鼠社交能力测试结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	金属空笼处停留时间(s)	陌生小鼠1处停留时间(s)	$t$ 值	$P$ 值
sham组	8	149.20 ± 43.49	228.90 ± 47.41 <sup>a</sup>	3.504	0.004
CPZ组	8	194.16 ± 64.35	185.69 ± 73.73	0.245	0.810
CPZ+rTMS组	8	150.40 ± 57.02	232.03 ± 59.24 <sup>a</sup>	3.000	0.010

注: sham组 对照组; CPZ组为模型组; CPZ+rTMS组 重复经颅磁治疗组; 与同组组内数据比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

表3 各组小鼠社交趋新能力测试结果( $\bar{x} \pm s$ )

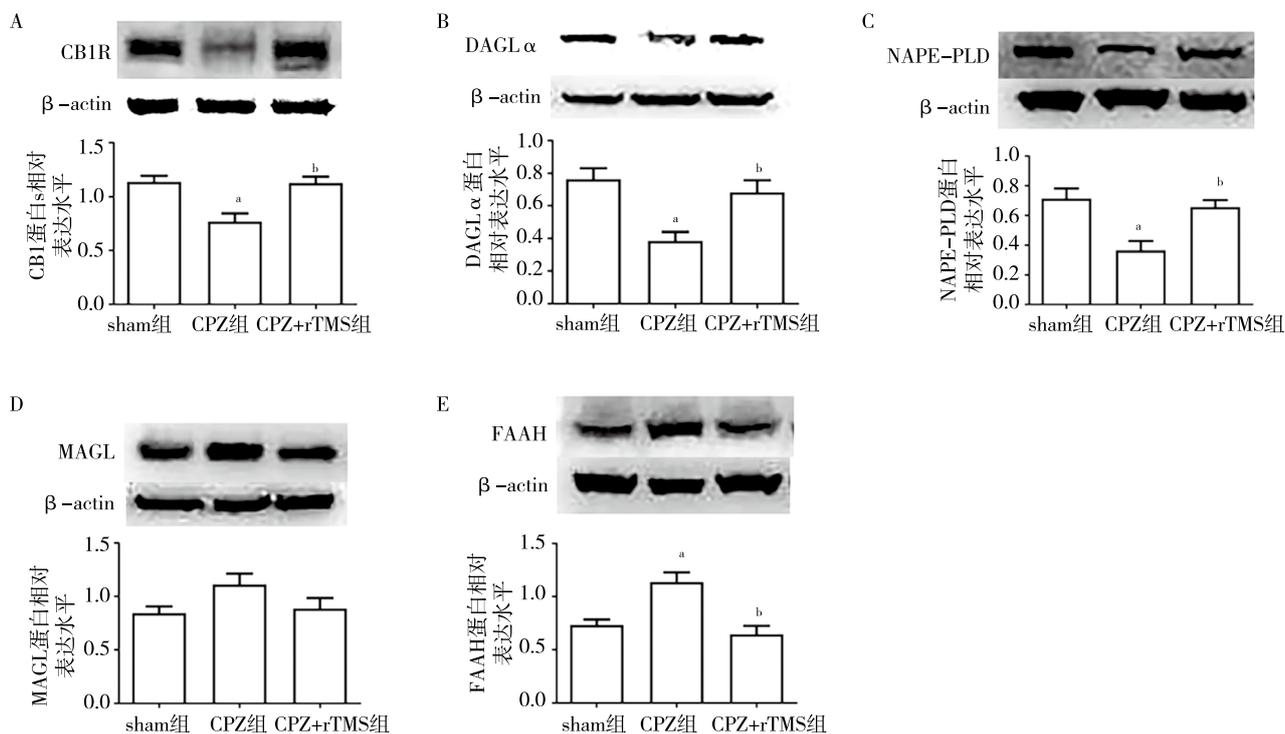
组别	只数	陌生小鼠1处停留时间(s)	陌生小鼠2处停留时间(s)	$t$ 值	$P$ 值
sham组	8	157.02 ± 63.62	233.41 ± 3.84 <sup>a</sup>	2.797	0.014
CPZ组	8	249.28 ± 58.31	164.30 ± 79.16 <sup>a</sup>	2.445	0.028
CPZ+rTMS组	8	158.41 ± 68.45	236.74 ± 51.66 <sup>a</sup>	2.447	0.028

注: sham组 对照组; CPZ组 模型组; CPZ+rTMS组 重复经颅磁治疗组; 与同组组内数据比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

$P < 0.05$ ], DAGL $\alpha$  [sham组( $0.76 \pm 0.12$ )比CPZ组( $0.38 \pm 0.10$ ),  $P < 0.05$ ]和NAPE-PLD蛋白水平[( $0.81 \pm 0.12$ )比CPZ组( $0.36 \pm 0.11$ ),  $P < 0.05$ ]明显下调, 水解酶FAAH蛋白水平[sham组( $0.73 \pm 0.09$ )比CPZ组( $1.14 \pm 0.16$ ),  $P < 0.05$ ]明显上调; rTMS干预上调了CPZ小鼠海马的CB1R受体[CPZ+rTMS组( $1.13 \pm 0.11$ )比CPZ组( $0.38 \pm 0.10$ ),  $P < 0.05$ ], DAGL $\alpha$  [CPZ+rTMS组( $0.68 \pm 0.13$ )比CPZ组( $0.38 \pm 0.10$ ),  $P < 0.05$ ]和NAPE-PLD[CPZ+rTMS组( $0.66 \pm 0.08$ )比CPZ组( $0.36 \pm 0.11$ ),  $P < 0.05$ ]蛋白水平, 下调了水解酶FAAH[CPZ+rTMS组( $0.64 \pm 0.14$ )比CPZ组( $1.14 \pm 0.16$ ),  $P < 0.05$ ]蛋白水平, 差异有统计学意义。此外, CPZ处理后, 小鼠海马的MAGL[sham组( $0.84 \pm 0.11$ ), CPZ组( $1.11 \pm 0.18$ ); CPZ+rTMS组( $0.89 \pm 0.17$ )]水平稍有上调, rTMS干预后有所恢复, 但是CPZ和rTMS对海马MAGL蛋白表达的作用差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 讨 论

CB1R是神经中枢系统表达的主要内源性大麻素受体, DAGL $\alpha$ 、NAPE-PLD、FAAH和MAGL是内大麻素系统中非常重要的酶, DAGL $\alpha$ 负责合成2-AG, NAPE-PLD合成N-花生四烯酸氨基乙醇(anandamide, AEA), FAAH水解AEA, MAGL水解2-AG。本实验研究了rTMS对CPZ小鼠海马组织CB1R受体及以上四种酶的蛋白表达的影响。rTMS是目前被广泛应用的一种非侵入性脑刺激疗法, 对



注: 1A 内源性大麻素受体1(CB1R); 1B 二酰基甘油脂肪酶(DAGLα); 1C N 酰基磷脂酰乙醇胺磷脂酶D(NAPE-PLD); 1D 单酰甘油脂肪酶(MAGL); 1E 脂肪酰胺水解酶(FAAH); 与 sham 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 CPZ 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图1 rTMS调节CPZ小鼠海马各蛋白的表达

抑郁症、焦虑症、精神分裂症等多种精神疾病有较好的临床治疗效果<sup>[15]</sup>。临床研究显示,一定参数的rTMS对精神分裂症阴性症状有着较为可靠的疗效,高频率rTMS(20 Hz)作用于左侧前额叶背外侧皮质(dorsolateral prefrontal cortex, DLPFC)可以有效改善精神分裂症阴性症状<sup>[16]</sup>,低频率(1 Hz)的rTMS作用于左侧颞顶皮质(temporoparietal cortex, TPC)对幻觉妄想也有一定的改善作用<sup>[17]</sup>。此外,越来越多的研究发现, rTMS对于认知障碍也有较为可靠的疗效,而且对海马的结构和功能有着显著的调节作用。临床研究发现, 20 Hz的rTMS刺激左侧DLPFC不仅可以改善对抗精神病药物治疗无应答患者的PANSS阳性症状评分、阴性症状评分以及总分,还可以有效改善患者的短期记忆<sup>[18-19]</sup>。基础研究也显示, 5 Hz的rTMS可以活化老年小鼠海马BDNF,上调突触蛋白synaptophysin和PSD95(post-synaptic density protein 95),增强海马的突触可塑性,改善小鼠的空间学习和记忆损伤<sup>[20]</sup>。前期的研究也发现, rTMS可以促进慢性不可预见性刺激(CUS)大鼠海马的神经发生,而且还可以上调海马突触相关蛋白表达<sup>[21]</sup>。因此, rTMS治疗精神分裂症改善海马结构和认知障碍在临床和动物模型方面均已得到证实,但其具体作

用机制并不十分清楚。

CPZ已经被证实可以诱导小鼠胼胝体、皮层、海马等多个脑区脱髓鞘并产生空间记忆损伤、社交障碍等与精神分裂症相关的行为变化,能够作为精神分裂症的动物模型之一<sup>[10]</sup>。一方面, CPZ可以诱导小鼠线粒体功能障碍和氧化应激,引发中枢神经系统中少突胶质细胞丢失和脱失,这类似于神经影像学检测到的精神分裂症患者大脑的白质异常。同时,经CPZ处理的小鼠出现了焦虑、空间记忆损伤、社交障碍等部分精神分裂症样行为<sup>[22-23]</sup>。另一方面,临床用于治疗精神分裂症的抗精神病药物可以改善CPZ诱导的髓鞘损伤和认知行为缺陷<sup>[13]</sup>。本研究以CPZ脱髓鞘小鼠为模型,发现5 Hz的rTMS有效改善了CPZ小鼠的空间记忆缺陷和社交障碍,这一结果与临床研究中的rTMS改善精神分裂症患者瞬时记忆相似,进一步证实rTMS可以缓解精神分裂症的认知障碍。

eCB系统是机体重要的调节系统之一,参与调节包括情绪控制、认知功能、神经发生、神经保护以及脂代谢在内的多个生理过程<sup>[24]</sup>。ECS包括2-AG、AEA两种主要配体, CB1R、CB2R两种配体以及DAGLα、NAPE-PLD、FAAH、MAGL四种主要代

谢酶<sup>[5]</sup>。其中 DAGL $\alpha$  和 NAPE-PLD 负责产生 2-AG 和 AEA, 而 MAGL 和 FAAH 负责水解 2-AG 和 AEA<sup>[25]</sup>。诸多研究显示, eCB 系统与精神分裂症密切相关。临床研究显示, 精神分裂症患者的海马 CB1R 的区域和分布容量明显低于健康人群, 而抗精神病药物能够有效地改善这一状况<sup>[6]</sup>; 此外, 精神分裂症患者的脑脊液和外周血的 AEA 水平较健康者升高, 而患者血液中的 2-AG 含量较健康者降低, 并且 AEA 和 2-AG 的含量变化程度与精神分裂症的发作病程具有一定的相关性<sup>[26]</sup>。临床尸检结果显示, 与无精神分裂症的尸体相比, 生前患有精神分裂症的尸体中海马的 FAAH 酶活性增高, AEA 水平下降, 而 2-AG 水平升高<sup>[27-28]</sup>。基础研究显示, 精神分裂症小鼠模型在表现出记忆损伤、对压力和恐惧敏感等精神分裂症样行为的同时, 海马的 2-AG 水平明显升高, 而海马的 CB1R 受体水平却显著下降, 海马的 LTP 突触可塑性严重受损<sup>[7]</sup>。此外, 人为调节 eCB 水平可以改善大鼠的认知和行为, 如 MAGL 的抑制剂选择性单酰基甘油脂肪酶抑制剂 (JZL184) 可以阻止抑制性长时程抑制 (I-LTD) 对大鼠造成的认知损伤, 延长海马切片的 DSE 效应<sup>[8]</sup>; 脂肪酸酰胺水解酶抑制剂 (URB597) 通过抑制 FAAH 活性、增加 AEA 水平缓解精神分裂症小鼠模型的记忆损伤和社交恐惧症状<sup>[29]</sup>, AEA 重吸收抑制剂 AM40 能够有效地改善精神分裂症大鼠模型的自发活动减少现象, 增加其社交行为<sup>[8]</sup>。本研究也发现, CPZ 诱导的精神分裂症模型小鼠海马的 CB1R 和内源性大麻素合成酶 DAGL $\alpha$  和 NAPE-PLD 表达下调, 而水解酶 FAAH 表达上调, 进一步证实 eCB 系统是精神分裂症发病机制中的关键角色之一。然而, rTMS 缓解精神分裂症的认知障碍是否与海马的内源性信号相关尚不清楚。本研究结果显示, rTMS 能够逆转 CPZ 脱髓鞘诱导的小鼠海马 eCB 基因表达变化, 上调 CB1R 受体、DAGL $\alpha$  和 NAPE-PLD 的表达, 下调 FAAH 表达, 说明 rTMS 可能通过调节海马的 eCB 信号通路影响海马功能, 发挥对精神分裂症认知障碍的治疗作用。

综上所述, 本研究发现 rTMS 可以改善 CPZ 诱导的精神分裂症小鼠认知损伤, 并且能够上调 CPZ 小鼠海马的 CB1 受体和 2-AG、AEA 合成酶, 下调内源性大麻素降解酶, 说明 rTMS 可能通过其对海马 eCB 系统的调节作用发挥其对精神分裂症的疗效。但本研究具有一定的局限性, 观察只局限于 CPZ 小鼠模型的认知行为以及海马的 eCB 基因蛋白水平改善情况, 但未能检测 rTMS 干预后内源性大麻素系统的主

要配体 2-AG 和 AEA 的水平变化, 也未能利用药物或者基因手段阻断 eCB 信号验证其在 rTMS 改善精神分裂症认知障碍中的重要性。rTMS 调节 eCB 信号的详细作用机制还有待进一步探索。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 实验操作为于欢, 数据收集与整理为薛姗姗、赵建帅、赵洁玉, 实验指导与文章修改为王莹、谭庆荣, 实验设计、论文撰写、审校为周翠红

## 参 考 文 献

- [1] Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2013, 382(9904): 1575-1586. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61611-6.
- [2] Chen AT, Nasrallah HA. Neuroprotective effects of the second generation antipsychotics [J]. *Schizophr Res*, 2019, 208: 1-7. DOI: 10.1016/j.schres.2019.04.009.
- [3] Jiang Y, Guo Z, Xing G, et al. Effects of high-frequency transcranial magnetic stimulation for cognitive deficit in schizophrenia: a Meta-analysis [J]. *Front Psychiatry*, 2019, 10: 135. DOI: 10.3389/fpsy.2019.00135.
- [4] Dlabac-de Lange JJ, Liemburg EJ, Bais L, et al. Effect of rTMS on brain activation in schizophrenia with negative symptoms: a proof-of-principle study [J]. *Schizophr Res*, 2015, 168(1/2): 475-482. DOI: 10.1016/j.schres.2015.06.018.
- [5] Egmond N, Straub V, der Stelt M. Targeting endocannabinoid signaling: FAAH and MAG lipase inhibitors [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, 61: 441-463. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-030220-112741.
- [6] Ranganathan M, Cortes-Briones J, Radhakrishnan R, et al. Reduced brain cannabinoid receptor availability in schizophrenia [J]. *Biol Psychiatry*, 2016, 79(12): 997-1005. DOI: 10.1016/j.biopsych.2015.08.021.
- [7] Clarke DJ, Stuart J, McGregor IS, et al. Endocannabinoid dysregulation in cognitive and stress-related brain regions in the Nrg1 mouse model of schizophrenia [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017, 72: 9-15. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2016.08.006.
- [8] Almeida V, Peres FF, Levin R, et al. Effects of cannabinoid and vanilloid drugs on positive and negative-like symptoms on an animal model of schizophrenia: the SHR strain [J]. *Schizophr Res*, 2014, 153(1/3): 150-159. DOI: 10.1016/j.schres.2014.01.039.
- [9] Wang HN, Wang L, Zhang RG, 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. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2014.01.004.
- [10] Hayakawa E, Ohgidani M, Fujimura Y, et al. Cuprizone-treated mice, a possible model of schizophrenia, highlighting the simultaneous abnormalities of GABA, serine and glycine in hippocampus [J]. *Schizophr Res*, 2019, 210: 326-328. DOI: 10.1016/j.schres.2019.06.010.
- [11] Zhang L, Xu S, Huang Q, et al. N-acetylcysteine attenuates the cuprizone-induced behavioral changes and oligodendrocyte loss in male C57BL/7 mice via its anti-inflammation actions [J]. *J*

- Neurosci Res, 2018, 96(5): 803-816. DOI: 10.1002/jnr.24189.
- [ 12 ] 任曼丽, 史明超, 裘冯卓, 等. 超氧化物歧化酶1突变基因G41S和G41D在小鼠内侧前额叶皮层过表达及对认知行为的影响[ J ]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2020, 29(7): 577-583. DOI: 10.3760/cma.j.cn371468-20200317-01136.
- Ren ML, Shi MC, Qiu FZ, et al. Effect of overexpression of superoxide dismutase 1 mutant genes G41S and G41D on cognitive behavior in medial prefrontal cortex of mice[ J ]. Chin J Behav Med & Brain Sci, 2020, 29(7): 577-583.
- [ 13 ] Wang HN, Liu GH, Zhang RG, et al. Quetiapine ameliorates schizophrenia-like behaviors and protects myelin integrity in cuprizone intoxicated mice: the involvement of notch signaling pathway[ J ]. Int J Neuropsychopharmacol, 2016, 19(2): pyv088. DOI: 10.1093/ijnp/pyv088.
- [ 14 ] Sen MK, Mahns DA, Coorsen JR, et al. Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination[ J ]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 107: 23-46. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.08.008.
- [ 15 ] Zorzo C, Banqueri M, Higarza SG, et al. Current state of transcranial magnetic stimulation and its use in psychiatry[ J ]. Actas Esp Psiquiatr, 2019, 47(3): 110-120.
- [ 16 ] Zhuo K, Tang Y, Song Z, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation as an adjunctive treatment for negative symptoms and cognitive impairment in patients with schizophrenia: a randomized, double-blind, sham-controlled trial[ J ]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2019, 15: 1141-1150. DOI: 10.2147/ndt.s196086.
- [ 17 ] Thomas F, Bouaziz N, Gallea C, et al. Structural and functional brain biomarkers of clinical response to rTMS of medication-resistant auditory hallucinations in schizophrenia patients: study protocol for a randomized sham-controlled double-blind clinical trial[ J ]. Trials, 2019, 20(1): 229. DOI: 10.1186/s13063-019-3311-x.
- [ 18 ] Guan HY, Zhao JM, Wang KQ, et al. High-frequency neuronavigated rTMS effect on clinical symptoms and cognitive dysfunction: a pilot double-blind, randomized controlled study in veterans with schizophrenia[ J ]. Transl Psychiatry, 2020, 10(1): 79. DOI: 10.1038/s41398-020-0745-6.
- [ 19 ] Xiu MH, Guan HY, Zhao JM, et al. Cognitive enhancing effect of high-frequency neuronavigated rTMS in chronic schizophrenia patients with predominant negative symptoms: a double-blind controlled 32-week follow-up study[ J ]. Schizophr Bull, 2020, 46(5): 1219-1230. DOI: 10.1093/schbul/sbaa035.
- [ 20 ] Ma Q, Geng Y, Wang HL, et al. High frequency repetitive transcranial magnetic stimulation alleviates cognitive impairment and modulates hippocampal synaptic structural plasticity in aged mice[ J ]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 235. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00235.
- [ 21 ] Xue SS, Xue F, Ma QR, 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 ]. Pharmacol Biochem Behav, 2019, 184: 172738. DOI: 10.1016/j.pbb.2019.172738.
- [ 22 ] Sen MK, Almuslehi MSM, Coorsen JR, et al. Behavioural and histological changes in cuprizone-fed mice[ J ]. Brain Behav Immun, 2020, 87: 508-523. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.01.021.
- [ 23 ] Shiri E, Pasbakhsh P, Borhani-Haghighi M, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate cuprizone-Induced demyelination by targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction[ J ]. Cell Mol Neurobiol, 2020. [ Online ahead of print ]. DOI: 10.1007/s10571-020-00910-6.
- [ 24 ] Stasiulewicz A, Znajdek K, Grudzien M, et al. A guide to targeting the endocannabinoid system in drug design[ J ]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2778. DOI: 10.3390/ijms21082778.
- [ 25 ] Urquhart P, Nicolaou A, Woodward DF. Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases[ J ]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1851(4): 366-376. DOI: 10.1016/j.bbalip.2014.12.015.
- [ 26 ] Garani R, Watts JJ, Mizrahi R. Endocannabinoid system in psychotic and mood disorders: a review of human studies[ J ]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2020, 106: 110096. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2020.110096.
- [ 27 ] Muguruza C, Morentin B, Meana JJ, et al. Endocannabinoid system imbalance in the postmortem prefrontal cortex of subjects with schizophrenia[ J ]. J Psychopharmacol, 2019, 33(9): 1132-1140. DOI: 10.1177/0269881119857205.
- [ 28 ] Yu Q, He Z, Zubkov D, et al. Lipidome alterations in human prefrontal cortex during development, aging, and cognitive disorders[ J ]. Mol Psychiatry, 2020, 25(11): 2952-2969. DOI: 10.1038/s41380-018-0200-8.
- [ 29 ] Kruk-Słomka M, Banaszkiwicz I, Słomka T, et al. Effects of fatty acid amide hydrolase inhibitors acute administration on the positive and cognitive symptoms of schizophrenia in mice[ J ]. Mol Neurobiol, 2019, 56(11): 7251-7266. DOI: 10.1007/s12035-019-1596-0.

(收稿日期: 2021-01-05)

(本文编辑: 赵金鑫)