



电子、语音版

· 论 著 ·

亚甲蓝对创伤后应激障碍模型小鼠应激和神经元焦亡的作用机制研究

梁苗苗¹, 费晓炜², 豆雅楠², 张磊², 王利²

1. 中国人民解放军空军军医大学西京医院门诊部, 陕西 西安 710032

2. 中国人民解放军空军军医大学西京医院神经外科, 陕西 西安 710032

摘要:目的 研究亚甲蓝(MB)对创伤后应激障碍(PTSD)模型小鼠的神经炎症和神经元焦亡的影响及其可能分子机制。方法 60只C57BL/6小鼠被随机分为对照组(Control组)、模型组(PTSD组)、低剂量治疗组(MB 2 mg组)及中剂量治疗组(MB 10 mg组)4组。PTSD组采用单次长时间应激/电击(SPSS)在小鼠中诱导PTSD动物模型。通过旷场实验和高架十字迷宫实验来检测小鼠模型焦虑和抑郁反应。利用蛋白质印迹法检测核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(NLRP3)、裂解型胱天蛋白酶-1(Cleaved-Caspase-1)和N端加斯德敏D蛋白质(N-GSDMD)的蛋白质表达水平。利用免疫荧光技术检测N-GSDMD和NLRP3的表达。利用酶联免疫吸附试验检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-18(IL-18)等炎症因子的水平。结果 与Control组比较,PTSD组小鼠表现出明显的僵直和恐惧等行为学改变;N-GSDMD的阳性细胞数和蛋白质水平升高($P<0.05$),且NLRP3和Cleaved-Caspase-1、N-GSDMD的表达也增加;同时IL-1 β 和IL-18等炎症因子释放增加,神经元焦亡增加。无论低剂量还是中剂量MB治疗后,小鼠的应激样症状均获得改善,焦亡通路的相关分子表达水平也下降($P<0.05$),神经元焦亡减少;2 mg与10 mg MB在治疗效果上差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 低、中剂量的MB均改善PTSD小鼠的行为学异常,其机制可能是通过抑制NLRP3炎症小体激活,下调N-GSDMD表达,抑制神经炎症反应进而减轻神经细胞焦亡。

关键词:创伤后应激障碍;亚甲蓝;焦亡;核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3炎症小体;旷场实验

中图分类号:R651.15

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2026.04.002

Study on the mechanisms by which methylene blue affects stress responses and neuronal pyroptosis in a mouse model of post-traumatic stress disorder

LIANG Miaomiao¹, FEI Xiaowei², DOU Yanan², ZHANG Lei², WANG Li²

1. Outpatient Department, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

2. Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Corresponding author: WANG Li, Email: 534007233@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effects of methylene blue (MB) on neuroinflammation and neuronal pyroptosis in a post-traumatic stress disorder (PTSD) mouse model and its possible molecular mechanisms. **Methods** Sixty C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: control group, model group (PTSD group), low-dose treatment group (MB 2 mg group), and medium-dose treatment group (MB 10 mg group). PTSD was induced using single prolonged stress/shock (SPSS) in mice, that is, SPS with additional foot shock stimulation. The open field test and elevated plus maze test were used to assess anxiety- and depression-like behaviors in the model mice. Western blotting was used to measure the protein expression levels of nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3),

基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(No. 82571483);国家自然科学基金青年项目资助(No. 82401720);博士后第18批特别资助(2025T181193);陕西省重点研发计划项目(No.2023-YBSF-129)。

收稿日期:2025-10-31; **修回日期:**2026-07-28

作者简介:梁苗苗,女,主管护师。Email: wli110119@163.com。

通信作者:王利,男,副主任医师。Email: 534007233@qq.com。

Cleaved-Caspase-1, and N-terminal gasdermin D (N-GSDMD). Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of N-GSDMD and NLRP3. Enzyme-linked immunosorbent assay kits were used to measure the levels of inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18. **Results** Compared with the control group, the PTSD group exhibited obvious anxiety-, depression-, and fear-like behavioral changes; the number of N-GSDMD-positive cells and the expression of N-GSDMD were increased ($P<0.05$), the expression of NLRP3 and Cleaved-Caspase-1 and N-GSDMD was elevated, the release of inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18 was increased, and neuronal pyroptosis was enhanced. After treatment with either low-dose or medium-dose MB, the stress-like symptoms in mice were alleviated, the expression of pyroptosis pathway-related molecules was reduced ($P<0.05$), and neuronal pyroptosis was decreased. There was significant difference in therapeutic effect between 2 mg and 10 mg MB ($P<0.05$). **Conclusions** Both medium- and low-dose MB improve behavioral abnormalities in PTSD mice, and the underlying mechanisms may involve inhibiting NLRP3 inflammasome activation, down-regulating N-GSDMD expression, and inhibiting the neuroinflammatory response, thereby alleviating neuronal pyroptosis.

Keywords: post-traumatic stress disorder; methylene blue; pyroptosis; nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 inflammasome; open field test

亚甲蓝(methylene blue, MB),即3,7-双(二甲氨基)吩噻嗪-5-鎓氯化物,既是一种知名的常用于神经解剖的染料,也是一种著名的氰化物解毒剂^[1]。其不仅被美国食品药品监督管理局(FDA)批准为治疗高铁血红蛋白血症的一线用药,还被大量基础和临床研究发现对帕金森病、脑损伤、脊髓损伤和肌萎缩侧索硬化症等中枢神经系统疾病具有较好的疗效。其凭借强大的氧化还原作用及作为线粒体呼吸链中的替代电子载体的特性,发挥了重要的抑制炎症反应和拮抗细胞凋亡等作用^[2-4]。但是,关于MB通过抗炎和抗焦亡等机制发挥治疗创伤后应激障碍(post-traumatic stress disorder, PTSD)的研究鲜见报道。

PTSD是由经历或目睹极端创伤性事件(如战争、自然灾害、严重事故、暴力犯罪、性侵等)引发的一种精神心理疾病。其核心特征包括反复体验创伤、回避相关刺激、认知与情绪负面改变、警觉性增高,且症状持续超过1个月,并导致社会功能受损^[5-7]。新近研究发现,PTSD可造成皮质、海马和杏仁核等脑区核团中神经细胞损伤、死亡等病理性改变,少量国内外文献提示PTSD动物小胶质细胞中核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)炎症小体显著增加,提示神经细胞焦亡参与PTSD的发生发展^[8-9]。焦亡,是近年来发现的一种由NLRP3受体、凋亡相关斑点样蛋白质(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和裂解型胱天蛋白酶-1(Cleaved-Caspase-1)组成的NLRP3炎症小体诱发的新型程序性细胞死亡方式,通过释放成熟的白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)促进细胞发生炎症反应和焦亡^[10-13]。然而,神经元焦亡是否在PTSD发生发展中发挥作用,尚不清楚。

本研究目的在于探索MB对PTSD模型小鼠炎症反应和皮质神经元焦亡的保护作用及其分子机制,为临床治疗提供理论依据和实验证据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

MB(Sigma,美国);SDS凝胶配制试剂盒(索莱宝);RIPA(放射免疫沉淀法)裂解液、BCA(2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠)蛋白质定量试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司);兔抗小鼠 β -actin抗体(Proteintech, No.81115-1-RR);兔抗小鼠NLRP3抗体(Affinity, DF7438);兔抗小鼠N-GSDMD(Gasdermin D蛋白质被切割后产生的N端活性片段)抗体(Abcam, ab215203);兔抗小鼠Caspase-1剪切体抗体(CST, 89332);兔抗小鼠Pro-Caspase-1(Abcam, ab179515);山羊抗兔HRP(辣根过氧化物酶)二抗(西安壮志生物科技有限公司);HRP化学发光底物(美国Millipore);IL-1 β 、IL-18 ELISA试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司);凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad)。

1.2 实验动物

清洁级6~8周龄,C57BL/6雄鼠60只,体重20~25 g,由中国人民解放军空军军医大学动物实验中心提供。按照最佳饲养空间(每笼2~4只)将小鼠随机分笼,采用国家标准啮齿类动物SPF(无特定病原体动物)级饲料及垫料,饲养温度(24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度(65 $\pm$ 5)%,12 h光照,定期更换垫料,保证小鼠可自由饮食。本研究所有动物实验操作均通过中国人民解放军空军军医大学动物伦理委员会审查(批准号:250842)。

1.3 动物模型建立与分组

1.3.1 PTSD模型建立

实验环境为温度20~24 $^{\circ}$ C,相对湿度45%~65%,照明强度60~120 lx,背景噪音控制在45 dB以下。实验动

物需提前 60 min 适应环境。实验设备包括束缚管、强制游泳装置(水深 30 cm)、乙醚麻醉箱、电击刺激装置、计时器、温度计和录像设备。所有设备使用前需用 75% 乙醇消毒。

实验分为 4 个连续阶段:第一阶段为束缚应激,先检查束缚管状态,确保通气,而后将小鼠轻柔放入束缚管中持续 4 h;第二阶段为强制游泳,准备(23±1)℃清水,水深 30 cm,进行 30 min 强制游泳;第三阶段为乙醚麻醉,进行 5 min 乙醚麻醉,严密监控呼吸状态,等待完全清醒(15~20 min)后休息 30 min;第四阶段为足部电击:校准电击强度(0.7 mA),适应 3 min 后给予 2 s 电击,观察 30 s 后返回饲养笼。每个阶段都需严格监控动物状态,确保实验安全。强制游泳时准备救生设备,乙醚麻醉时配备急救设备。所有操作需轻柔,避免造成额外应激。通过记录和分析动物在各阶段的行为反应,评估模型小鼠对多重应激的耐受能力和应激反应特征。

1.3.2 分组

60 只 C57BL/6 小鼠被随机分为对照组(Control 组)、模型组(PTSD 组)、低剂量治疗组(MB 2 mg 组)及中剂量治疗组(MB 10 mg 组)4 组^[14]。PTSD 组采用单次长时间应激/电击(single prolonged stress/shock, SPSS)制备 PTSD 动物模型^[15]。制模后,将 MB 用生理盐水溶解,以 2 和 10 mg/(kg·d)腹腔注射 7 d。

1.4 行为学实验

旷场实验:实验前 6 h 将小鼠带入实验室,使其充分适应空间环境。各组小鼠测试均在上午(8:00~11:00)进行,每只小鼠测试 1 次。将小鼠放置于旷场箱的周边区域,背向操作者。用动物视频行为分析系统记录并计算各组小鼠在旷场箱内 15 min 的移动总距离,分析其自主活动情况。

高架十字迷宫实验:首先让实验动物在实验室环境适应 30 min,确保其处于安静清醒状态。测试时将小鼠轻柔放置于中央平台,头部朝向开放臂,随即开始计时并持续观察 5 min。其间需详细记录动物进入开放臂和封闭臂的次数、停留时间,以及探头探身、直立和理毛等行为表现。

胡须刺激实验:使用木棒轻柔触碰小鼠单侧胡须,每次刺激持续 3 s,间隔 30 s 进行下一次刺激。对每侧胡须进行 5 次重复测试,保持刺激力度一致。实时观察并记录小鼠对每次刺激的即刻反应,包括僵直、躲避、攻击、站立和呼吸等行为表现。

条件恐惧测试:实验分为 2 个阶段。训练阶段(第 1 天),①将小鼠轻柔放入实验箱适应 3 min;②给予 0.7 mA 电击刺激 2 s;③继续观察 30 s 后返回饲养笼。测试阶段(24 h 后),①将小鼠放回原实验箱;②连续观察记录 5 min;③详细记录僵直行为时间。

1.5 免疫荧光技术检测相关蛋白质分子定位情况

小鼠麻醉后,用肝素生理盐水和 4% 多聚甲醛溶液心脏灌注后取脑,脑组织经 4% 多聚甲醛固定 24 h,并脱水,置于 4℃ 冰箱保存。将脑组织浸入最佳切割温度复合物(optimal cutting temperature compound, OCT)包埋冷冻,进行冠状面连续切片。冷冻切片置于 4% 多聚甲醛固定 15 min,磷酸缓冲盐液(PBS)洗涤 3 次,血清封闭 30 min,加入一抗 4℃ 过夜, PBS 洗涤 3 遍,加入荧光二抗(1:1 000)避光室温孵育 2 h,使用含 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染料的封片剂封片。在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.6 蛋白质表达分析

采用蛋白质印迹法(Western blotting)。小鼠通过麻醉法处死,收集各组小鼠脑额叶组织,匀浆后提取蛋白质,BCA 法测定蛋白质浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离蛋白质后转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,使用 β -actin(1:1 000)、NLRP3(1:600)、Cleaved-Caspase-1(1:800)、Pro-Caspase-1(1:1 000)和 N-GSDMD(1:600)一抗 4℃ 孵育过夜,然后与 HRP 标记的二抗结合,室温孵育 1 h。化学发光法显色后照相。最后用凝胶成像系统(Image Master VDS)摄影,图像分析软件(ImageJ)进行灰度扫描分析。以目的蛋白质与 β -actin 的蛋白质产物条带灰度值之比作为其蛋白质水平的相对量。

1.7 酶联免疫吸附试验检测炎症因子

各组小鼠取脑组织,采用 4℃ 无菌 PBS 冲洗以去除血液等杂质。将剪碎的组织与 PBS 以 1:9 的比例(1 g 组织加入 9 mL PBS)及蛋白酶抑制剂混合后,置于冰上,充分研磨。将匀浆液于 4℃,5 000 r/min 离心 5~10 min,分离上清液。依据试剂盒说明书检测上清液中 IL-1 β 和 IL-18 的浓度。将标准工作液与样品加入反应孔中,37℃ 静置 30 min 以结合抗原;洗涤后加入一抗,室温孵育 2 h;再次洗涤后,加入 IL-1 β 和 IL-18 抗体溶液,室温孵育 2 h;反复洗涤后分别加入底物溶液,利用酶标仪测定吸光度。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,使用 GraphPad Prism 8.0 作图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间数据分布正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验,方差齐性检验采用 Levene 检验。对于单因素分组资料,在满足正态性与方差齐性假设时,组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)评估。若 ANOVA 提示组间总体差异具有统计学意义(双侧检验, $P < 0.05$),则进一步采用事后多重比较检验(post hoc multiple comparisons)两两比较,在方差齐性的前提下选用 Tukey 法,当方差不齐时采用 Games-Howell 检验。分类变量以例数(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

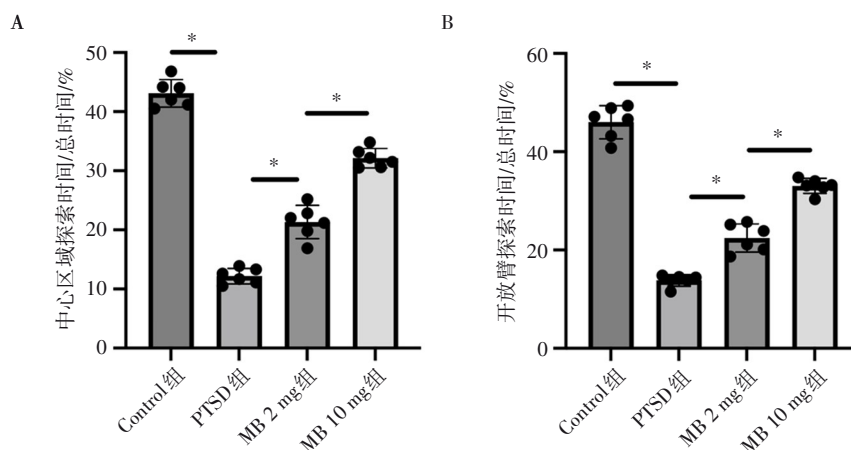
2 结果

2.1 各组小鼠中心区域探索时间及开放臂探索时间情况

各组小鼠旷场实验的中心区域探索时间占比和高架十字迷宫实验的开放臂探索时间占比较,差异具有统计学意义(中心区域探索时间占比: $F=241.300, P<0.0001$; 开放臂探索时间占比: $F=198.100, P<0.0001$)。

与Control组相比,PTSD组小鼠在高架十字迷宫的开放臂的停留时间和进入次数减少($P<0.05$),在旷场中心

区域的探索时间缩短($P<0.05$);同时,模型动物出现更长的僵直时间和更强的恐惧行为表现($P<0.05$)。MB干预后,与PTSD组比较,无论MB 2 mg组还是MB 10 mg组,小鼠在高架十字迷宫的开放臂的停留时间增加($P<0.05$),在旷场中心区域的探索时间增加($P<0.05$);同时,僵直时间缩短和恐惧行为表现减弱($P<0.05$)。MB 10 mg组与MB 2 mg组相比,高架十字迷宫开放臂的停留时间、旷场中心区域的探索时间均增加,僵直时间缩短和恐惧行为表现减弱($P<0.05$)。见图1。



A: 各组小鼠在旷场实验中中心区域探索时间占总时间的比例; B: 各组小鼠在高架十字迷宫中开放臂探索时间占总时间的比例。*表示相应两组之间比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

图1 MB对PTSD小鼠神经功能障碍的影响

2.2 各组PTSD小鼠脑组织中N-GSDMD的表达情况

各组小鼠脑组织中N-GSDMD的表达比较,差异有统计学意义($F=29.710, P=0.0001$)。与Control组相比,PTSD组小鼠前额叶皮质神经元的胞膜和胞浆中N-GSDMD呈点状表达,且N-GSDMD阳性细胞增加。MB处理后,与PTSD组比较,MB 2 mg组与MB 10 mg组前额叶皮质免疫荧光染色的N-GSDMD阳性细胞数减少($P<0.05$)。见图2。蛋白质印迹法检测的结果也表明,MB 2 mg组与MB 10 mg组均可降低PTSD导致的N-GSDMD蛋白表达水平($P<0.05$)。见图3。

2.3 各组小鼠脑组织中NLRP3通路蛋白表达情况

各组小鼠脑组织中NLRP3通路蛋白表达比较,差异具有统计学意义(NLRP3: $F=43.510, P<0.0001$; Cleaved-Caspase-1/Pro-Caspase-1: $F=197.900, P<0.0001$; N-GSDMD: $F=74.780, P<0.0001$)。与Control组比较,PTSD组小鼠脑组织中NLRP3、Cleaved-Caspase-1和N-GSDMD表达量增加($P<0.05$)。经过MB处理后,与PTSD组比较,MB 2 mg组和MB 10 mg组中NLRP3和N-GSDMD表达及Cleaved-Caspase-1活性下降($P<0.05$)。且MB 2 mg组与MB 10 mg组的NLRP3、N-GSDMD表达及Cleaved-Caspase-1活性比

较,差异有统计学意义($P<0.05$),但Pro-Caspase-1的表达水平在各组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图3A~3D。

此外,各组小鼠脑皮质中NLRP3及N-GSDMD的表达水平比较,差异有统计学意义(NLRP3: $F=10.040, P=0.0044$; N-GSDMD: $F=22.880, P=0.0003$)。进一步两两比较发现PTSD组的NLRP3较Control组表达增高,且阳性细胞形态学上一部分为小胶质细胞,而2和10 mg MB均能有效改善NLRP3的表达($P<0.05$)。同样的,N-GSDMD在脑皮质中有和NLRP3类似的改变($P<0.05$),尽管和PTSD组相比,2 mg MB处理未能降低N-GSDMD表达,但10 mg MB处理能有效降低N-GSDMD的表达($P<0.05$) (见图3E~3F)。

2.4 各组小鼠脑组织中炎症因子IL-1 β 、IL-18的含量

各组小鼠脑组织中IL-1 β 、IL-18的含量比较,差异具有统计学意义(IL-1 β : $F=316.600, P<0.0001$; IL-18: $F=118.100, P<0.0001$)。与Control组比较,PTSD组小鼠脑组织中IL-1 β 和IL-18含量增加($P<0.05$)。经过MB处理后,与PTSD组比较,MB 2 mg组及MB 10 mg组IL-1 β 和IL-18含量下降,且两组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图4。

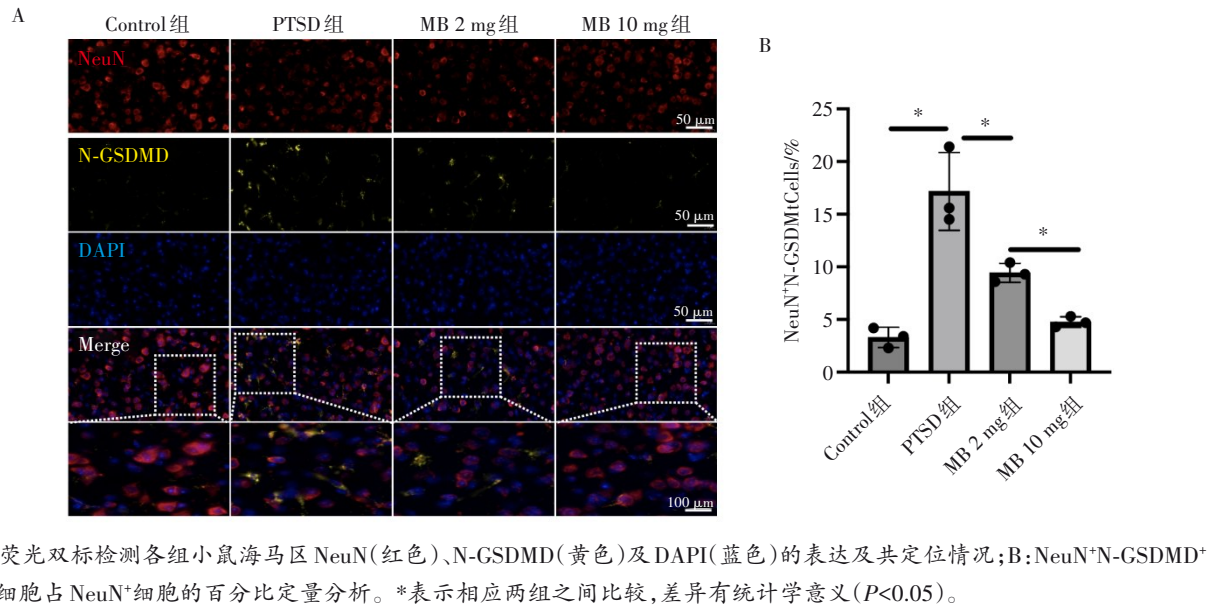


图2 各组小鼠脑组织中 N-GSDMD 免疫荧光图像($\times 20$)

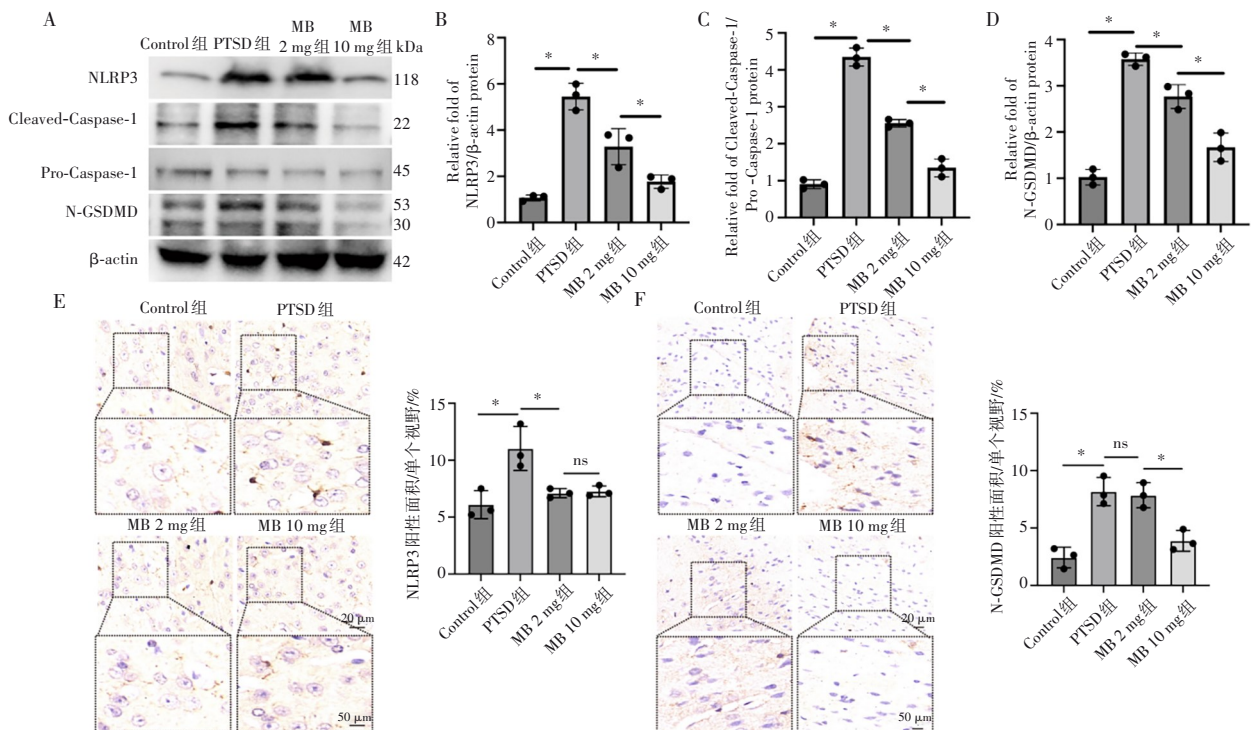
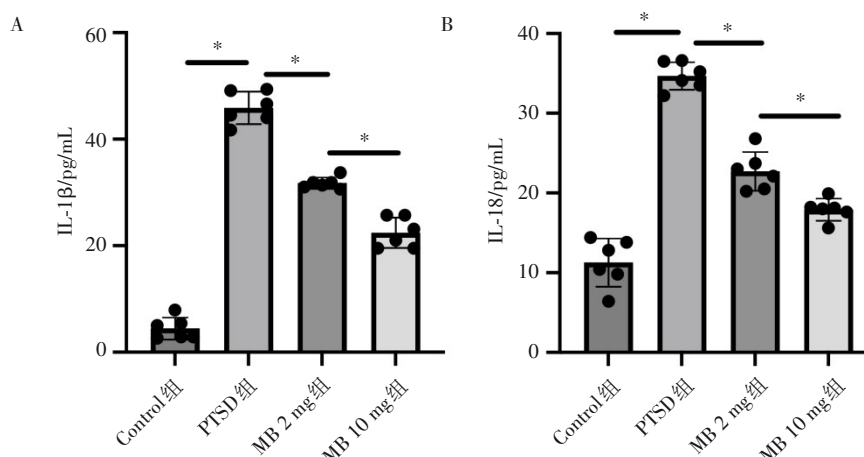


图3 各组小鼠脑组织中 NLRP3、Cleaved-Caspase-1、Pro-Caspase-1 和 N-GSDMD 的蛋白质表达水平



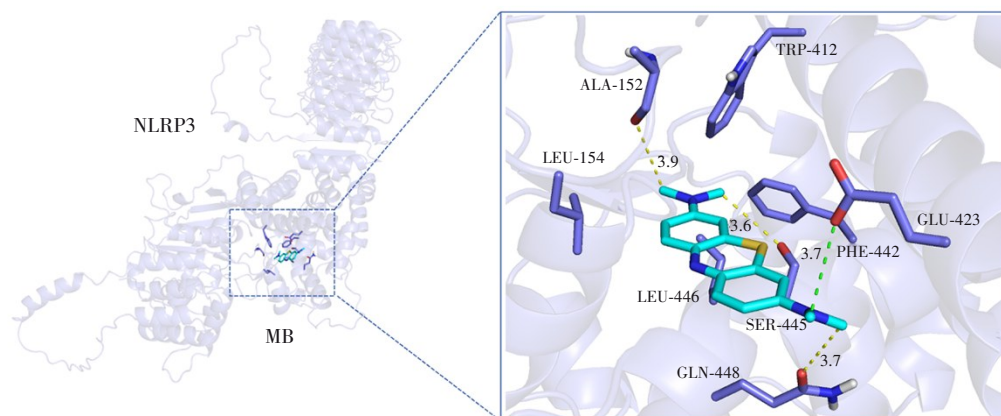
A:各组小鼠脑组织中IL-1 β 含量的ELISA检测结果;B:各组小鼠脑组织中IL-18含量的ELISA检测结果。*表示两组之间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图4 各组小鼠脑组织中IL-1 β 、IL-18表达情况

2.5 分子对接预测MB和NLRP3存在潜在结合能力

为了进一步研究MB抑制焦亡信号的潜在机制,笔者初步预测了MB和经典焦亡分子NLRP3的结合情况。使用的小鼠NLRP3蛋白质的全长三维结构获取自AlphaFold蛋白质结构数据库(AlphaFold Protein Structure Database, <https://alphafold.ebi.ac.uk>),对应的UniProt编号为Q8R4B8(模型编号:AF-Q8R4B8-F1),小分子MB的结构来自PubChem数据库,CAS号:61-73-4,采用遗传算法

(genetic algorithm, GA)进行构象采样和打分,根据对接得分进行构象排序挑选最优构象。根据分子对接结果,NLRP3蛋白质和小分子MB的结合能为-6.493 kcal/mol。小分子MB与NLRP3蛋白质的GLN-448,SER-445和ALA-152之间产生了氢键相互作用(如图5黄色虚线所示)。分子周围分布着多个疏水性氨基酸残基,包括LEU-446、LEU-154、ALA-152等(图5),这些残基与亚甲蓝的疏水骨架形成了良好的范德华力接触。



紫色部分为蛋白质NLRP3,蓝色部分为小分子MB。

图5 NLRP3蛋白质和小分子MB相互作用图

3 讨论

前额叶皮质主要调控哺乳动物的情绪活动和社交等,其结构损伤和功能障碍被认为是产生应激的核心因素之一。PTSD作为一种复杂的精神疾病,其模型小鼠发生类似焦虑和抑郁的行为学改变可能与前额叶皮质区的炎症反应密切相关^[5-9, 16]。本研究中,笔者通过旷场测试和高架十字迷宫实验,发现PTSD小鼠出现明显的焦虑样

行为,证明模型制作成功。同时,PTSD模型小鼠皮质区的炎症因子IL-1 β 和IL-18大量释放,提示炎症反应是参与PTSD发生发展的主要原因。进一步机制上发现焦亡相关分子NLRP3、Cleaved-Caspase-1/Pro-Caspase-1和N-GSDMD在MB的治疗下表达降低(图6)。分子对接预测提示MB存在直接调节NLRP3位点的可能性,为未来机制研究提供线索。

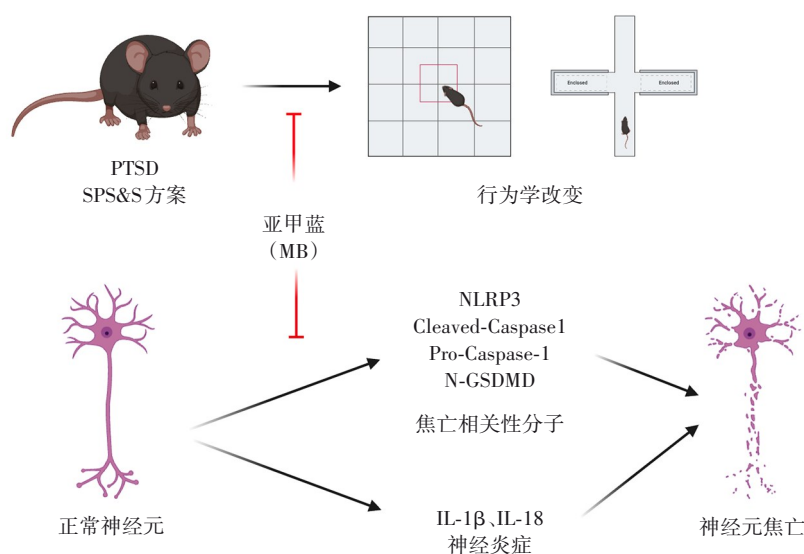


图6 MB通过焦亡信号调节PTSD小鼠行为学改善的机制图

PTSD的发病机制十分复杂,目前尚无特效药物。目前临床常用5-羟色胺再摄取抑制剂、苯二氮卓类药物治疗PTSD,但其对PTSD的应激性核心症状效果不佳,还具有起效时间长、副作用较多等缺点^[17-18]。MB作为一种吸收率高、用量小、起效快的小分子药物,具备抗炎、抗氧化、抗凋亡等作用,被应用于治疗氰化物中毒、高铁血红蛋白血症和帕金森病等神经系统疾病^[1-4]。白婧等^[14]利用MB预处理和治疗MPTP诱导的帕金森病小鼠,不仅缓解了模型小鼠的运动功能障碍,还部分改善了小鼠的类似焦虑行为。本研究中,首先通过经典焦虑测试结果发现,MB治疗后,PTSD模型小鼠在旷场实验中活动总路程增加,在旷场角落停留时间减少,平均速度增加。在高架十字迷宫实验中,治疗小鼠在闭合臂停留时间减少,进入开臂次数和时间均增加。这些行为学结果表明,MB能改善PTSD模型小鼠的焦虑和抑郁样行为,也缓解了小鼠的恐惧行为。

焦亡是一种程序性、炎症性的细胞死亡方式,与感染、炎症性疾病和癌症等病理过程密切相关。其核心特征是先由NLRP3、黑色素瘤缺乏因子2(absent in melanoma 2, AIM2)等模式识别受体激活,引发Caspase-1(或Caspase-4/5/11)的切割,随即Gasdermin家族蛋白质(如GSDMD)被激活,在细胞膜上形成孔洞,导致细胞肿胀、破裂,最终释放IL-1β和IL-18等促炎因子,加剧炎症反应^[10-13]。Grottemeyer等^[19]利用NLRP3抑制剂MCC950抑制小胶质细胞激活,并减少α-syn在多巴胺神经元中的聚集,提示NLRP3炎症小体参与帕金森病的发生发展。Grzesińska等^[20]发现PTSD模型小鼠的海马和前额叶皮质中NLRP3炎症小体表达增加,可能参与PTSD发病。Yamanashi等^[21]则利用NLRP3的另一种内源性抑制剂β-羟基

丁酸酯证明,炎症反应及细胞焦亡是导致PTSD小鼠焦虑和抑郁的关键原因。部分研究还发现,利用海松酸钠或者瘦素均可抑制PTSD模型动物脑组织中的NLRP3炎症小体激活、改善线粒体功能障碍并降低细胞凋亡水平,改善动物的学习和记忆能力,并降低焦虑和抑郁水平^[22-23]。本研究中无论中剂量MB,还是低剂量MB,均可下调NLRP3、N-GSDMD、Caspase-1表达,进而减少促炎因子IL-1β、IL-18的分泌,减少神经元焦亡。结合上述行为学和分子机制研究结果,MB作为药物再利用的典型例子,在已证实其安全性,可以节省大量时间及经费的基础上,不仅能治疗帕金森病等神经退行性疾病,还可以低剂量下调NLRP3信号轴,减少IL-1β和IL-18等炎症因子释放,直接减少神经元焦亡,以及可能间接通过降低小胶质细胞NLRP3介导的神经元焦亡,来共同改善动物焦虑和恐惧等神经功能障碍。

总之,本研究证明,给予PTSD模型小鼠中、低剂量的MB可缓解小鼠的焦虑和恐惧样行为,其机制可能与下调NLRP3炎症小体表达,减少促炎因子释放,减少细胞焦亡有关。这些结果表明MB就可能成为治疗PTSD的一种潜在药物。同时,由于本研究仅探讨MB拮抗皮质神经元焦亡的分子机制,缺乏对包括海马和杏仁核等其他脑区神经元及小胶质细胞等其他神经细胞损伤、死亡和修复机制的探索,课题组后续拟进一步探究MB治疗PTSD的其他潜在生理病理机制。

参考文献

- [1] XUE H J, THAIVALAPPIL A, CAO K. The potentials of methylene blue as an anti-aging drug[J]. Cells, 2021, 10(12): 3379.

- [2] GUREEV A P, SADOVNIKOVA I S, POPOV V N. Molecular mechanisms of the neuroprotective effect of methylene blue[J]. Biochemistry (Mosc), 2022, 87(9): 940-956.
- [3] IBARRA-ESTRADA M, KATTAN E, AGUILERA-GONZÁLEZ P, et al. Early adjunctive methylene blue in patients with septic shock: a randomized controlled trial[J]. Crit Care, 2023, 27(1): 110.
- [4] BHURTEL S, KATILA N, NEUPANE S, et al. Methylene blue protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity by upregulating brain-derived neurotrophic factor[J]. Ann N Y Acad Sci, 2018, 1431(1): 58-71.
- [5] SCHRADER C, ROSS A. A review of PTSD and current treatment strategies[J]. Mo Med, 2021, 118(6): 546-551.
- [6] 刘洪涛, 冯守宁, 解寒冰, 等. 重症颅脑损伤大鼠中SIRT1的表达情况及其对应激障碍的影响[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(3): 226-230.
- [7] MAERCKER A, CLOITRE M, BACHEM R, et al. Complex post-traumatic stress disorder[J]. Lancet, 2022, 400(10345): 60-72.
- [8] NATHALIE M, POLINENI S P, CHIN C N, et al. Targeting microglial polarization to improve TBI outcomes[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2021, 20(3): 216-227.
- [9] ZHENG L X, PANG Q Y, HUANG R Y, et al. Stress-mediated activation of ferroptosis, pyroptosis, and apoptosis following mild traumatic brain injury exacerbates neurological dysfunctions[J]. Mol Neurobiol, 2025, 62(4): 4055-4075.
- [10] BEDOUI S, HEROLD M J, STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 678-695.
- [11] WANG Y P, GAO W Q, SHI X Y, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. Nature, 2017, 547(7661): 99-103.
- [12] 王旭东, 梁强, 周景寰, 等. 焦亡机制及其在胶质瘤中的作用研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2024, 51(4): 69-76.
- [13] 姬丽娅, 柴佳林, 饶维, 等. 褪黑素通过抑制NLRP3减轻MPP⁺诱导的HT22细胞焦亡/炎性损害[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2022, 49(2): 1-5.
- [14] 白婧, 李笑冰, 罗耀文, 等. 亚甲基蓝通过减轻帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元焦亡以改善其运动功能障碍的实验研究[J]. 中华神经医学杂志, 2024, 23(3): 246-255.
- [15] CAI M D, PARK H R, YANG E J. Electroacupuncture modulates glutamate neurotransmission to alleviate PTSD-like behaviors in a PTSD animal model[J]. Transl Psychiatry, 2023, 13(1): 357.
- [16] EDINOFF A N, HEGEFELD T L, PETERSEN M, et al. Transcranial magnetic stimulation for post-traumatic stress disorder[J]. Front Psychiatry, 2022, 13: 701348.
- [17] MACKAY M, YANG B H, DURSUN S M, et al. The gut-brain axis and the microbiome in anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder[J]. Curr Neuropsychopharmacol, 2024, 22(5): 866-883.
- [18] GELDENHUYS C, VAN DEN HEUVEL L L, STEYN P, et al. Pharmacological management of nightmares associated with posttraumatic stress disorder[J]. CNS Drugs, 2022, 36(7): 721-737.
- [19] GROTEMEYER A, FISCHER J F, KOPRICH J B, et al. Inflammasome inhibition protects dopaminergic neurons from α -synuclein pathology in a model of progressive Parkinson's disease[J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 79.
- [20] GRZESIŃSKA A, OGŁODEK E A. Involvement of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), inflammasome NLRP3, and gamma-aminobutyric acid (GABA) pathway in cellular mechanisms of neuroinflammation in PTSD[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(12): 5662.
- [21] YAMANASHI T, IWATA M, SHIBUSHITA M, et al. Beta-hydroxybutyrate, an endogenous *NLRP3* inflammasome inhibitor, attenuates anxiety-related behavior in a rodent post-traumatic stress disorder model[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 21629.
- [22] MEI T, MA L C, KONG F Z. Sodium aescinate improve behavioral performance by inhibiting dorsal raphe nucleus *NLRP3* inflammasome in post-traumatic stress disorder rat model[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 671: 166-172.
- [23] JI M, GONG W L, WANG S M, et al. Leptin attenuates fear memory by inhibiting astrocytic *NLRP3* inflammasome in post-traumatic stress disorder model[J]. Neurochem Res, 2023, 48(4): 1180-1190.

责任编辑:王荣兵