

4-(芳基乙炔基)-吡咯并[2,3-d]嘧啶通过抑制 mGluR5 调控 ERK1/2-SGK1 信号通路改善小鼠创伤后应激障碍

何存宝¹, 杨绍杰^{1,2}, 朱国旗¹

¹安徽中医药大学分子生物学(脑病)重点实验室, 安徽 合肥 230012; ²安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥 230061

摘要:目的 评价4-(芳基乙炔基)-吡咯并[2,3-d]嘧啶(10b)对单一长时程应激(SPS)诱导的小鼠创伤后应激障碍(PTSD)样行为及ERK1/2-SGK1信号通路的影响。方法 将C57 BL/6小鼠随机分为正常对照组,SPS模型组,化合物10b低、中、高剂量组和帕罗西汀组,6只/组。采用行为学实验评价SPS模型组小鼠的PTSD样行为;Western blotting联合免疫荧光检测小鼠海马组织代谢型谷氨酸受体5(mGluR5)、p-ERK、SGK1蛋白表达水平;HE染色检测肝肾组织的病理损伤;分子对接和分子动力学验证化合物10b与mGluR5结合的稳定性。结果 与对照组比较,SPS模型组小鼠表现出PTSD样行为($P<0.05$),海马mGluR5和p-ERK蛋白表达升高,SGK1蛋白表达减少($P<0.05$),而化合物10b可改善SPS组小鼠的行为异常($P<0.05$),并抑制mGluR5表达,逆转p-ERK和SGK1的异常($P<0.05$),且无明显肝肾毒性;分子对接和分子动力学结果显示10b与mGluR5结合稳定。结论 化合物10b能改善SPS诱导的小鼠PTSD样行为,其机制可能和抑制mGluR5调节ERK1/2-SGK1信号通路相关。

关键词:4-(芳基乙炔基)-吡咯并[2,3-d]嘧啶;创伤后应激障碍;代谢型谷氨酸受体5;单一长时程应激;ERK1/2;SGK1

4-(Arylethyl)-pyrrolo[2,3-d] pyrimidine improves post-traumatic stress disorder in mice by inhibiting mGluR5-regulated ERK1/2-SGK1 signaling pathway

HE Cunbao¹, YANG Shaojie^{1,2}, ZHU Guoqi¹

¹Key Laboratory of Molecular Biology (Brain Diseases), Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; ²Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China

Abstract: Objective To observe the effect of 4-(arylethynyl)-pyrrolo[2,3-d] pyrimidine (10b) on post-traumatic stress disorder (PTSD)-like behaviors and ERK1/2-SGK1 signaling pathway in mice. **Methods** C57BL/6 mouse models exposed to single prolonged stress (SPS) were treated with daily gavage of saline, 10b at low, moderate and high doses, or paroxetine for 14 days. The changes in PTSD-like behaviors of SPS mice with different treatments were observed using behavioral tests. Western blotting and immunofluorescence assay were used to detect the protein expression levels of mGluR5, p-ERK, and SGK1 in the hippocampus of the mice. Pathological changes in the liver and kidney tissues of the mice were examined using HE staining. Molecular docking and molecular dynamics analyses were employed to evaluate the binding stability between the compound 10b and mGluR5. **Results** Compared to the normal control mice, the SPS mice exhibited obvious PTSD-like behaviors with increased hippocampal expressions of mGluR5 and p-ERK proteins and decreased SGK1 protein expression. Compound 10b significantly ameliorated behavioral abnormalities in SPS mice, inhibited mGluR5 expression, and reversed the dysregulation of p-ERK and SGK1. No obvious liver or kidney toxicity was observed after 10b treatment. Molecular docking and dynamics studies demonstrated a stable interaction between 10b and mGluR5. **Conclusion** The compound 10b ameliorates PTSD-like behaviors induced by SPS in mice possibly by inhibiting mGluR5 expression to modulate the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. **Keywords:** 4-(arylethynyl)-pyrrolo[2,3-d] pyrimidine; post-traumatic stress disorder; metabotropic glutamate receptors 5; single prolonged stress; ERK1/2; SGK1

创伤后应激障碍(PTSD)是一种与应激反应相关的神经精神疾病,表现为创伤记忆闪回、应激回避、警觉性增高及易怒等负性情绪^[1]。代谢型谷氨酸受体5(mGluR5)是一种重要的代谢型谷氨酸受体,属于G蛋

白偶联受体家族,主要在中枢神经系统(如大脑和脊髓)中表达,在神经信号传递、突触可塑性、学习记忆、情绪调节以及多种神经系统疾病中发挥重要作用。mGluR5通过与谷氨酸结合激活下游的信号传导通路,调节神经元的兴奋性和突触功能^[2],且在情绪调节中扮演重要角色。mGluR5与焦虑症、抑郁症等精神疾病密切相关^[4]。mGluR5过度激活能导致病理性的神经兴奋性增加,与阿尔茨海默病等神经退行性疾病相关^[5]。mGluR5激活后能导致PTSD恐惧记忆消退困难^[6],可能是PTSD发生的重要靶点。重要的是,mGluR5是PTSD潜在自杀风险的重要干预和评价指标^[7]。

细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)是丝裂原活化蛋白

收稿日期:2024-11-27

基金项目:国家自然科学基金(82404890);安徽省自然科学基金(2208085MH282);安徽省高等学校科学研究项目(2024AH040137, 2024AH051044);新安医学与中医药现代化研究所“揭榜挂帅”项目(2023CXMMTCM013)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82404890).

作者简介:何存宝,在读硕士研究生,E-mail: 2247022996@qq.com

通信作者:杨绍杰,博士,讲师,E-mail: 1558589910@qq.com;朱国旗,博士,研究员,博士生导师,E-mail: Guoqizhu@gmail.com

激酶(MAPK)信号通路的重要成员。ERK1/2的异常激活是PTSD发生重要机制,可能和增强恐惧记忆的巩固^[8],导致海马体积缩小、神经元损伤和神经网络功能紊乱^[9]和调控下丘脑-垂体-肾上腺轴过度激活有关^[10]。糖皮质激素调节激酶1(SGK1)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,与细胞对应激的反应调节有关^[11]。它在大脑中表达并通过磷酸化和调节突触蛋白和转录因子来改变神经元功能^[12]。在PTSD患者死后对其脑组织进行检测,发现前额叶皮层中SGK1的表达下降,并且应激环境下,大鼠内侧前额叶皮层中SGK1敲低后出现认知障碍^[13]。早期研究发现,减少ERK/MAPK-SGK1激活能损害学习和记忆功能^[14]。SGK1受ERK1/2调控,而ERK1/2位于mGluR5的下游,细胞内mGluR5能调节ERK1/2的激活^[15,16]。因此,mGluR5可能通过ERK1/2-SGK1参与PTSD恐惧记忆消退困难。

4-(芳基乙炔基)-吡咯并[2,3-d]嘧啶(10b)是一种新型mGluR5拮抗剂,课题组前期研究表明10b能够提高血清5-羟色胺水平、降低血清皮质酮水平以及减轻突触损伤,在慢性不可预测轻度应激诱导的抑郁模型中表现出显著的抗抑郁活性,并且未发现10b对实验动物造成不良反应^[1,17]。但10b能否通过抑制mGluR5调节ERK1/2-SGK1进而改善PTSD症状仍不清楚。本研究通过单一长时程应激(SPS)诱导小鼠PTSD模型,探讨10b干预后对PTSD样行为的作用与机制,并初步观察其是否对肝、肾形成病理损伤,这对PTSD新药物开发具有重要意义。

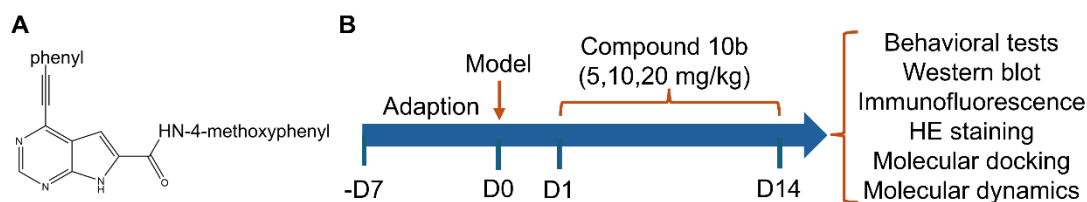


图1 化合物10b结构(A)及实验流程(B)

Fig.1 Compound 10b structure (A) and experimental protocol (B).

1.4 旷场实验

将小鼠放入旷场实验专用敞箱的中心方格内,观察实验小鼠5 min内的自发活动。使用自动分析系统(上海欣软信息科技)比较各组的中心时间、中心路程、中心次数、总路程和平均速度。每只小鼠完成测试后均用75%乙醇擦拭敞箱,以除去小鼠气味,避免干扰后续小鼠测试。

1.5 高架十字迷宫实验

将小鼠从高架十字迷宫的中央区面向开放臂放入,通过软件记录5 min内进入开放臂的时间并计算相应的

1 材料和方法

1.1 实验动物

36只成年雄性C57BL/6小鼠(2月龄,体质量20~25 g),饲养于温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为45%~65%的房间中,光照条件为12 h明/暗循环,可随意饮水和摄食。实验动物购于杭州子源实验动物科技有限公司[SCXK(浙)2019-0004],本实验经安徽中医药大学伦理委员会批准(伦理批号:AHUCM-mouse-2024165)。

1.2 药材与试剂

mGluR5、ERK、p-ERK和SGK1抗体(Biodragon),辣根过氧化物酶标记抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),盐酸帕罗西汀(中美史克),异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

1.3 模型建立与分组

C57BL/6小鼠适应1周后复制SPS模型,实验流程参考本课题组前期研究^[18]:束缚2 h,强迫游泳20 min,休息15 min后用异氟烷麻醉至意识模糊,重复2次,清醒后进行足部电击(2 mA, 2 s)。造模结束后将小鼠放回笼中。实验随机分为6组($n=6$):正常对照组(Control),SPS模型组,化合物10b低、中、高剂量组(SPS+10b-L/M/H)和帕罗西汀组(SPS+PRX)。造模24 h后灌胃给药化合物10b,低、中、高剂量分别为5、10、20 mg/kg;帕罗西汀组则给予10 mg/kg灌胃;正常对照组和SPS模型组给予等量的生理盐水。给药频次1次/d,连续14 d(图1)。

百分比,同时观察小鼠的焦虑样状态。每只小鼠完成测试后均用75%乙醇擦拭敞箱,以除去小鼠气味,避免干扰后续小鼠测试。

1.6 条件恐惧实验

条件恐惧实验分为适应期、训练期、再暴露期和消退期4个阶段。第1天为适应期:每只小鼠在恐惧箱里适应环境5 min;第2天为训练期:将小鼠置于恐惧箱中5 min,给予3次足底电击(1.0 mA,持续2 s,每次电击间隔73~74 s);第3天为再暴露期:将小鼠重新放置在恐惧箱中,暴露15 min,无足底电击,记录每只小鼠在15 min

内的凝滞时间,并分5个时间段(3 min/段)进行统计;第4天为消退期:将小鼠放入恐惧箱中5 min,无足底电击,记录前3 min的凝滞时间并统计。每只小鼠完成测试后均用75%乙醇擦拭敞箱,以除去小鼠气味,避免干扰后续小鼠测试。

1.7 Western blotting 检测

小鼠经5%异氟烷麻醉后迅速断头处死并取脑,在冰盘上迅速分离出两侧海马组织,加适量RIPA裂解液研磨,提取蛋白样品,BCA法测定蛋白浓度,Western blotting常规操作,用SDS-PAGE分离蛋白质样品并将其转移到NC膜上。在室温下用5%脱脂奶粉封闭2 h,将膜放入含有对应一抗抗体mGluR5(1:1000)、ERK(1:1000)、p-ERK(1:1000)和SGK1(1:1000)的稀释液中,4℃孵育过夜。加入1:10000稀释的二抗孵育2 h,洗涤后以ECL试剂显色并曝光。使用Image J软件分析统计蛋白表达的差异。

1.8 免疫荧光染色

小鼠经5%异氟烷麻醉后进行灌流,完毕后取出脑组织用4%多聚甲醛固定,在4℃条件下过夜,后用30%蔗糖溶液脱水48 h。脑组织进行冷冻切片(厚度20 μm),10%山羊血清封闭1 h。加入0.1 mol/L PBS(含0.4% Triton X-100和5%山羊血清)稀释的mGluR5一抗(1:200),4℃孵育过夜。PBS洗3次,15 min/次。洗完加入Alexa Fluor 593山羊抗兔IgG,室温下孵育2 h。用PBS洗涤3次,经DAPI染色,封片后用激光共聚焦显微镜拍摄图像。

1.9 HE染色

小鼠处死后取肝、肾组织,经固定、脱水、包埋制成石蜡样本,用切片机将样本切6 μm薄片,每个样本不同位置随机选取3张切片,脱蜡后,苏木精浸染5 min,取出后用自来水充分漂洗。用盐酸-乙醇分化15 s,自来水漂洗后用伊红染色3 min,自来水浸洗。经80%~90%~100%乙醇梯度脱水后,二甲苯浸泡2次,5 min/次,晾干、封片,显微镜下观察肝、肾组织病理特征。

1.10 分子对接

通过ChemDraw软件构建化合物10b结构,转换PDBQT文件格式后,作为分子对接的配体。从RCSB PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)中检索mGluR5的蛋白质结构。在去除游离水分子、添加氢原子和计算电荷之后,作为分子对接的受体。利用AutoDockTools软件将配体和受体进行分子对接,建立适合蛋白质大小的对接盒,生成DLG结果文件。选择具有最佳亲和力和最稳定的分子间作用力的3D构象,将其导出为PDBQT文件,并通过PyMOL软件进行分子对接可视化。

1.11 分子动力学

本研究进行分子对接配体-受体的动力学模拟,以

深入了解复合物的相互作用强度和稳定性。使用Gromacs 2024软件进行动力学模拟。模拟前,通过sobtop工具生成配体小分子拓扑文件,Gromacs内置命令准备蛋白质大分子结构和相应的拓扑文件。设置盐浓度为0.15 mol/L来实现系统电中性,该系统的分子力学使用50 000个台阶的最大陡峭下降方法进行优化。优化后的系统进行NPT集成平衡,采用2 fs的步长和100 ns的总持续时间,同时在此过程中限制固定系统的位置。

1.12 统计学分析

使用GraphPad Prism 9.5统计软件分析数据,计量资料采用均数±标准差表示。多组别比较采用单因素方差分析并通过Bonferroni事后检验比较组间差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 化合物10b改善SPS模型小鼠焦虑样行为

旷场实验结果显示,与Control组比较,SPS组小鼠的中心次数、中心路程、中心时间均减少($P<0.05$),与SPS组比较,SPS+10b-L、SPS+10b-M、SPS+10b-H组及SPS+PRX组小鼠运动中心次数、中心路程、中心时间均增加($P<0.05$),各组小鼠在旷场总路程和平均速度差异无统计学意义(图2A~E)。

高架十字迷宫实验结果显示,与Control组比较,SPS组小鼠进入开放臂时间百分比减少($P<0.05$),与SPS组比较,SPS+10b-L、SPS+10b-M、SPS+10b-H组及SPS+PRX组小鼠进入开放臂时间百分比增加($P<0.05$,图2F)。

2.2 化合物10b促进SPS模型小鼠恐惧记忆消退

在恐惧记忆测试的再暴露阶段,与Control组比较,SPS组小鼠的恐惧凝滞时间增加($P<0.05$),与SPS组比较,SPS+10b-L、SPS+10b-M、SPS+10b-H组及SPS+PRX组小鼠的恐惧凝滞时间均减少($P<0.05$);24 h后测试各组小鼠的恐惧凝滞时间,结果显示,与Control组比较,SPS组小鼠的恐惧凝滞时间增加($P<0.05$);与SPS组比较,SPS+10b-L、SPS+10b-M、SPS+10b-H组及SPS+PRX组小鼠的恐惧凝滞时间均减少($P<0.05$,图3)。

2.3 化合物10b通过mGluR5调节SPS小鼠海马ERK1/2-SGK1通路蛋白的表达

Western blotting结果显示,与Control组比较,SPS组小鼠海马组织中mGluR5和ERK磷酸化水平上升($P<0.05$),SGK1蛋白表达水平降低($P<0.05$);与SPS组比较,SPS+10b-M、SPS+10b-H组小鼠海马SGK1蛋白表达水平上升($P<0.05$),mGluR5和p-ERK蛋白表达降低($P<0.05$)。免疫荧光结果显示,与Control组相比,SPS组小鼠mGluR5在海马CA1区平均荧光强度升高;与SPS组相比,SPS+10b-H组则减少($P<0.05$,图4)。

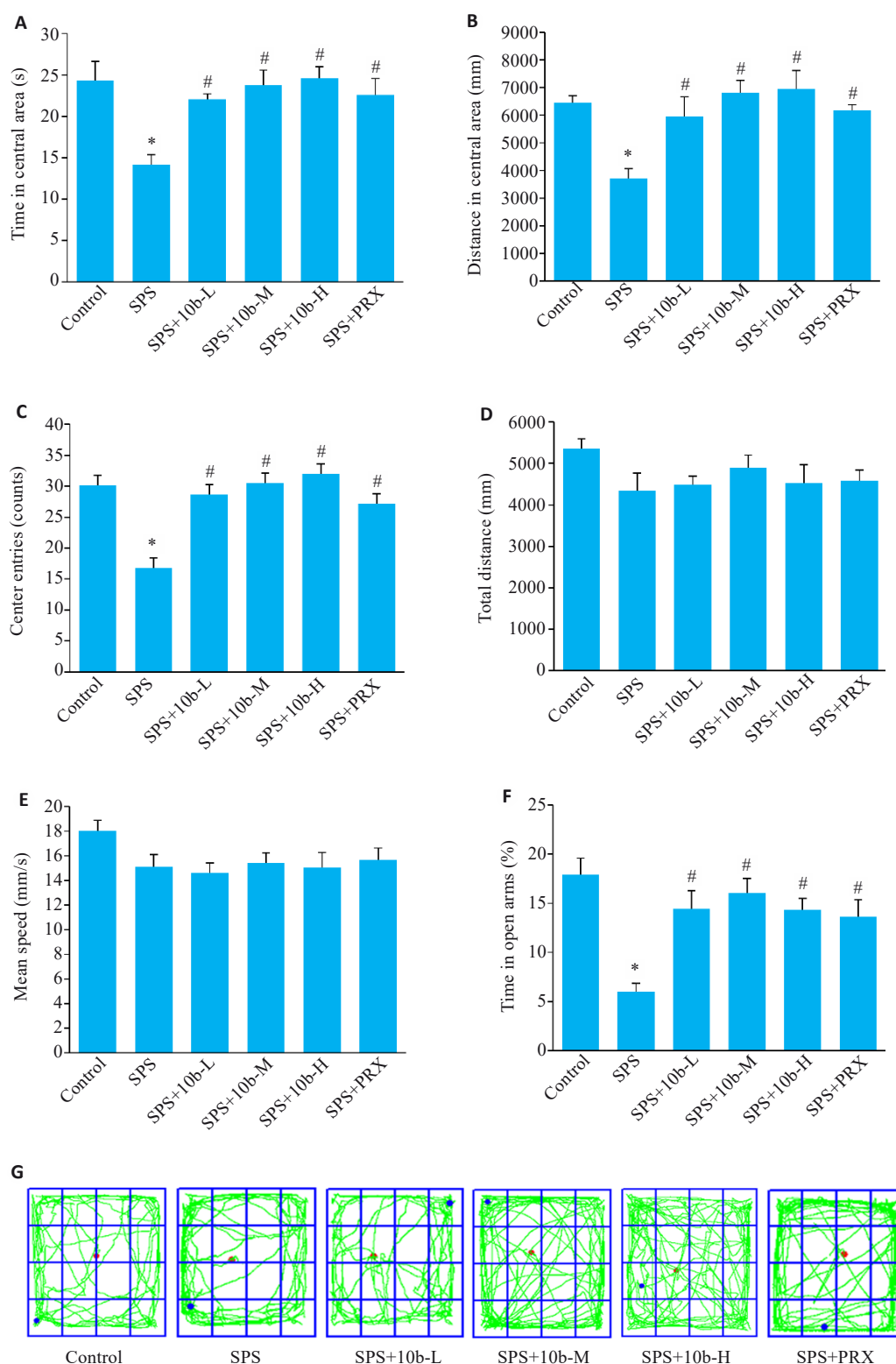


图2 化合物10b改善SPS小鼠焦虑样行为

Fig.2 Compound 10b improves anxiety-like behaviors in mice with single prolonged stress (SPS). A-E: Statistics of time in central area, distance in central area, center entries, total distance and mean speed in open field test; F: Percentage of time in open arms in elevated plus maze test; G: Motion trajectory of open field test; * $P < 0.05$ vs Control; # $P < 0.05$ vs SPS.

2.4 化合物10b对SPS小鼠肝、肾组织的病理学影响

HE结果显示,Control组、SPS组及SPS+10b-H组小鼠肝组织的肝小叶、肝索和肝血窦结构清晰可见,无损伤,并且3组小鼠的肾组织中肾小球、肾小管上皮细

胞结构均完好,亦无损伤(图5)。

2.5 分子对接及分子动力学显示化合物10b与mGluR5形成稳定结合体系

分子对接结果显示,化合物10b与mGluR5结合能

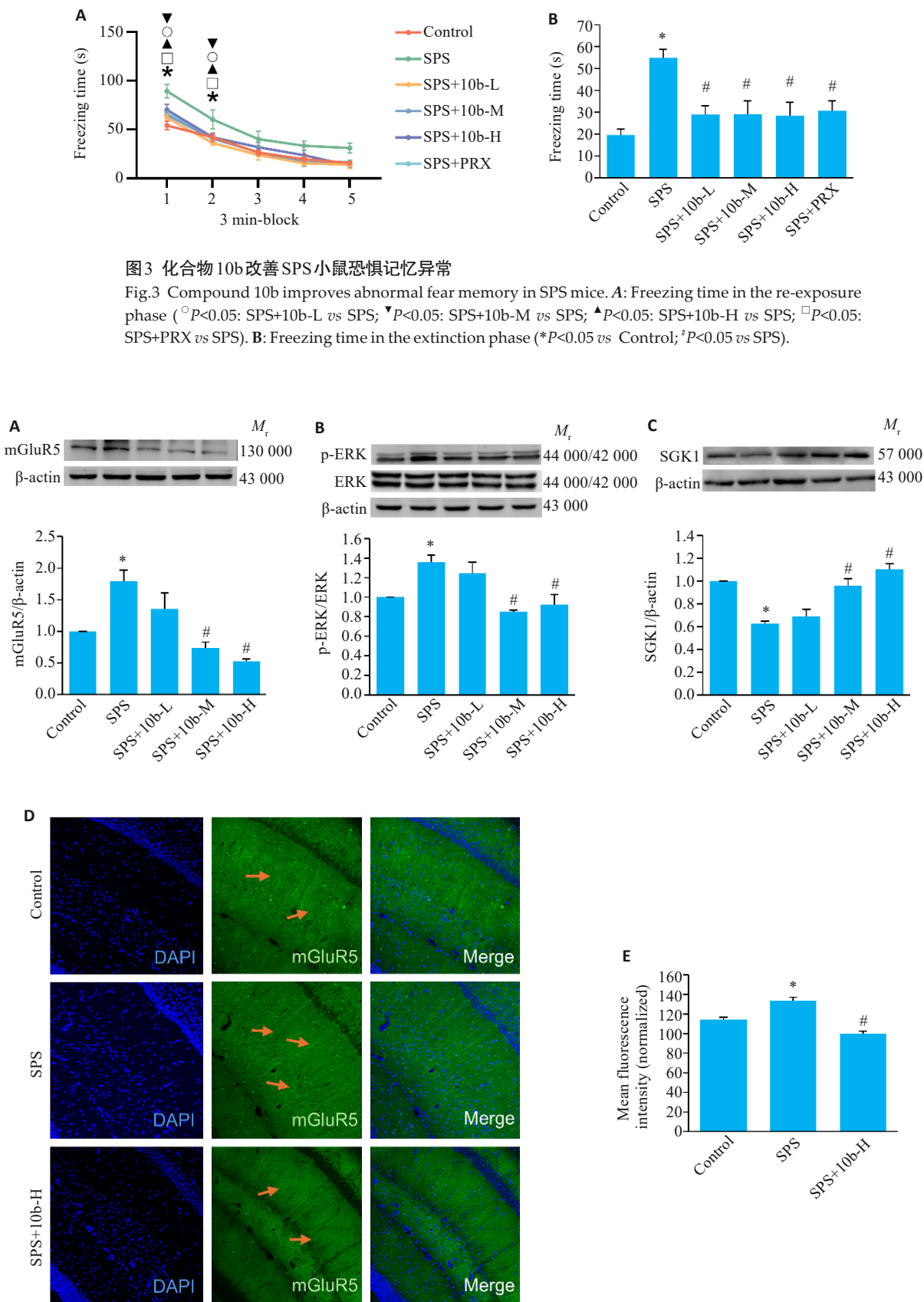


图4 化合物10b对小鼠海马组织mGluR5、p-ERK和SGK1蛋白表达水平的影响

Fig.4 Effects of compound 10b on expression levels of mGluR5, p-ERK and SGK1 proteins in mouse hippocampus. **A**: Western blotting and quantitative analysis of mGluR5 expression level. **B**: Western blotting and quantitative analysis of p-ERK expression levels. **C**: Western blotting and quantitative analysis of SGK1 expression; **D**, **E**: Immunofluorescence staining and fluorescence intensity of mGluR5 in hippocampal CA1 region. * $P<0.05$ vs Control; # $P<0.05$ vs SPS.

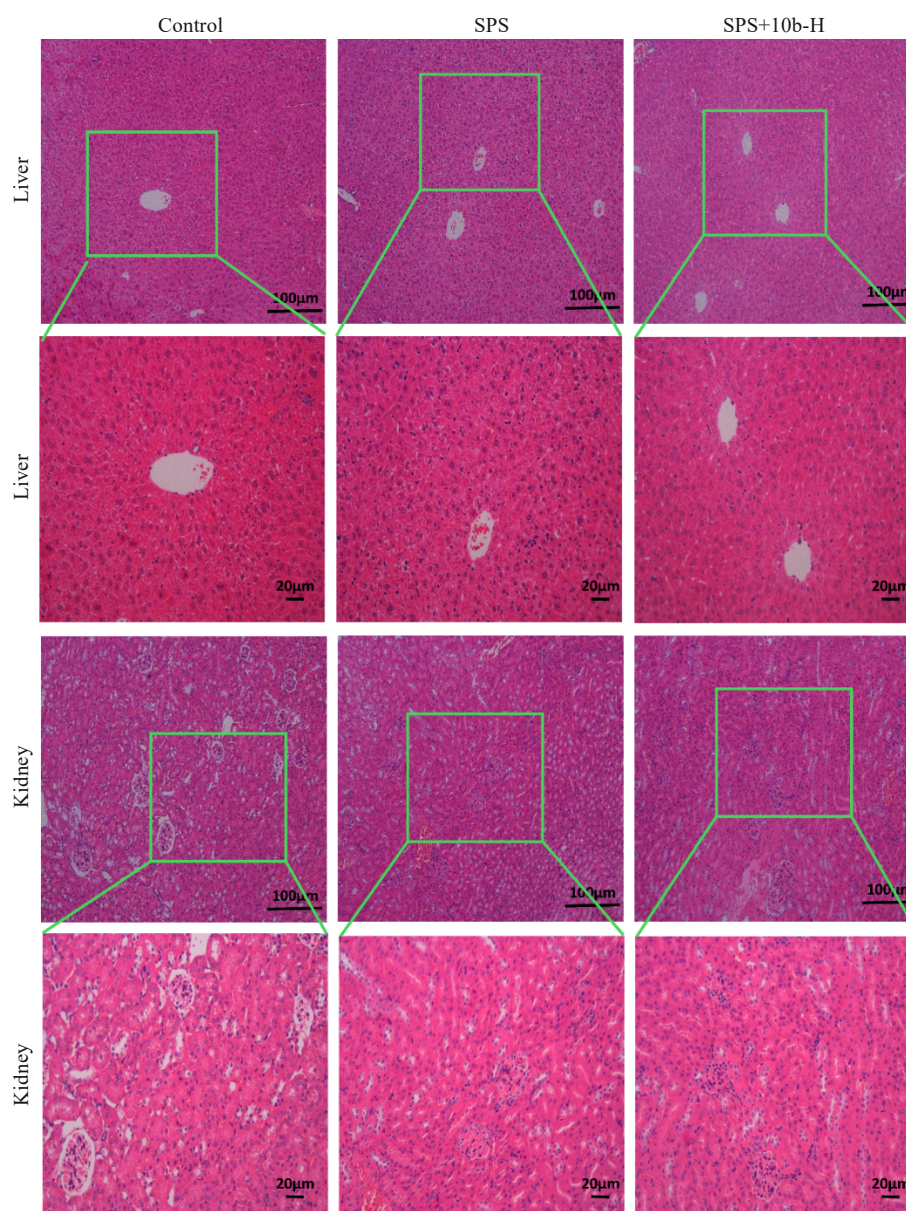


图5 化合物10b对SPS小鼠肝、肾组织的病理影响

Fig.5 Effects of compound 10b on liver and kidney histopathology in SPS mice.

为-4.4 kcal/mol,其结合能<-1.2 kcal/mol,化合物10b与mGluR5的对接良好。对10b与mGluR5复合物系统进行100 ns分子动力学模拟结果显示,化合物10b-mGluR5的均方根偏差(RMSD)在整个模拟过程中都在0.20~0.5 nm波动,最终平均值小于0.32 nm,RMSD值越低结合稳定性越高。化合物10b-mGluR5均方根波动(RMSF)均值为0.07 nm,残差运动小、系统稳定。化合物10b-mGluR5总结合自由能-967 247.58 kJ/mol(图6)。

3 讨论

本团队前期研究表明,化合物10b在慢性不可预测轻度应激诱导的抑郁模型中显示出显著的抗抑郁活性^[17]。鉴于其对神经精神疾病的治疗潜力,本研究进一步建立SPS小鼠模型,连续14 d给予模型小鼠不同剂量

的化合物10b进行干预,评价该新型化合物对PTSD的作用与机制。相比于先前的mGluR5拮抗剂MPEP(2-甲基-6-苯乙基吡啶)及MTEP(3-[(2-甲基-1,3-噻唑-4-基)乙炔基]-吡啶),增加脑源性神经营养因子(BDNF)和原肌球蛋白受体激酶B(TrkB)表达发挥抗抑郁作用^[19,20]。在此前的研究中,化合物10b同样可以增加突触相关蛋白BDNF、TrkB等表达^[17]。这提示化合物10b可能通过抑制海马mGluR5调节ERK1/2-SGK1信号通路,进而改善SPS诱导的小鼠焦虑样行为,促进恐惧记忆消退。

MPEP和2-氯-4-[1-(4-氟苯基)-2,5-二甲基-1H-咪唑-4-基乙炔基]-吡啶均为已知的mGluR5拮抗剂,它们在体内外实验中显示出对mGluR5的显著生物活性抑制^[21]。二者结构中都包含了mGluR5拮抗剂的一个典

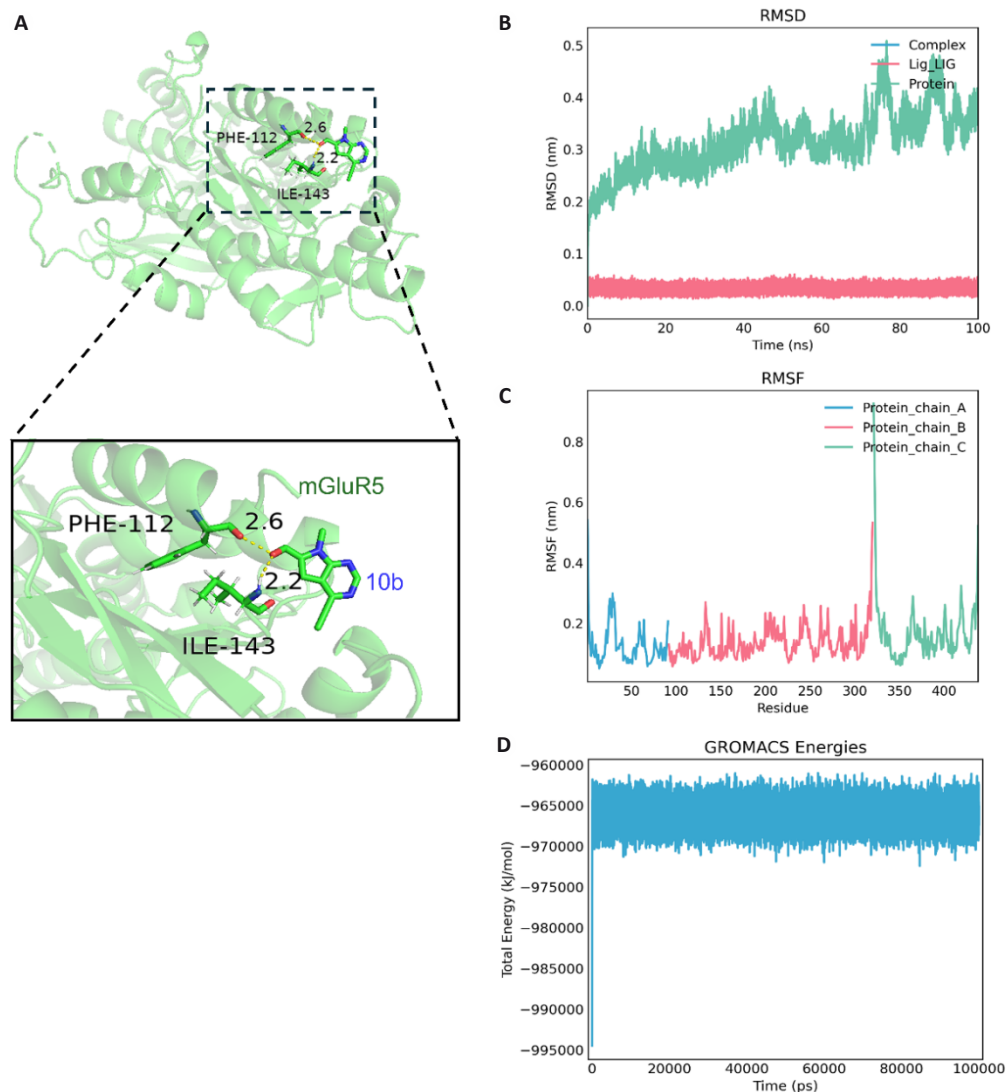


图6 化合物10b与mGluR5的分子对接及分子动力学

Fig. 6 Molecular docking and molecular dynamics studies of compound 10b with mGluR5. A: Visualization of the molecular docking of compound 10b with mGluR5. B-D: RMSD, RMSF and energy analysis of molecular dynamics of compound 10b with mGluR5.

型特征——乙炔基化学结构,在此基础上,化合物10b进一步引入了已被报道的mGluR5拮抗剂中常见的羧酸酰胺基团,以增强其药效。这一结构上的创新,旨在提升化合物10b对mGluR5的拮抗效果^[22]。Fenobam作为一种含有羧酸酰胺基团的非炔类mGluR5拮抗剂,在连续给药14 d后,能有效改善小鼠的焦虑行为并促进恐惧记忆的消退^[23]。此外,Fenobam并未观察到对小鼠肝脏及其他多个器官和系统的器质性损伤,这表明Fenobam具有较低的副作用和较高的安全性^[24]。因此,我们可以推测,与Fenobam类似的化合物10b可能在PTSD的治疗中展现出良好的效果和较高的安全性。本研究的行为学和组织病理学结果证实了推测。

mGluRs在中枢神经系统中广泛分布,参与调节多种神经功能。mGluRs能通过调节长时程增强和长时程抑制过程,影响恐惧记忆的形成和巩固^[25]。mGluR5已

被证明与海马、前额叶皮层的突触可塑性相关,这些区域在情绪和记忆处理中至关重要^[26]。另外,mGluR5与NMDA受体能相互作用,二者的协同激活对长时程增强至关重要。mGluR5可以通过调节NMDA受体的通透性和表达来影响NMDA受体的功能^[27]。同时,mGluR5与NMDA受体的物理和功能性相互作用可以调节细胞内钙信号,为突触可塑性提供更精细的调控^[28]。因此,过度活化的mGluR5可能导致异常的神经活动,这在神经精神疾病中具有病理学意义。在本实验中,SPS模型小鼠表现出PTSD样行为,可能与海马mGluR5表达升高导致的神经活动异常有关。

PTSD核心症状为恐惧记忆消退异常,mGluR5则在其发病机制中具有重要作用。研究表明,内侧前额叶皮层-基底外侧杏仁核回路参与焦虑行为和恐惧记忆的形成、维持和消退过程,并且多种神经递质与病理性恐

惧和焦虑行为有关,而谷氨酸能系统参与该回路调控PTSD行为^[29]。此外,前额叶皮层中的谷氨酸水平被用以预测健康和创伤暴露受试者的焦虑反应程度,而谷氨酸受体mGluR5与应激诱导的快感缺乏和焦虑行为的恢复能力有关^[30]。重要的是,mGluR5阻断或拮抗后使ERK活性降低,具有抗抑郁样作用^[31]。同样,mGluR5调节ERK磷酸化水平也被证明是阿片类药物诱导的情景记忆的分子基础^[32]。而SGK1受糖皮质激素调控,在应激条件下影响神经元传递和突触强度,并且受ERK调控^[33]。本研究结果指出,化合物10b能改善SPS诱导的小鼠PTSD样行为,包括促进恐惧记忆的消退和改善焦虑样行为,其作用机制可能与抑制mGluR5调控ERK1/2-SGK1通路有关。作为一种新型mGluR5拮抗剂,本团队前期不仅证实化合物10b具有抗抑郁作用,并且在本实验中利用分子对接和分子动力学模拟了10b与mGluR5的稳定结合作用,另外,HE染色也初步证实10b对肝肾组织并无病理性损伤,提示其可能成为一种治疗PTSD的一种潜在药物。

本研究存在不足之处。首先,实验证实化合物10b能改善SPS小鼠的焦虑样行为,促进恐惧记忆消退,但化合物10b在给药过程中开始起效的时间点并未进一步确定。其次,本实验模拟了10b与mGluR5的分子对接与分子动力学,但具体作用位点并未以实验方法进行验证。最后,10b作为mGluR5拮抗剂,实验仅探究了抑制mGluR5后对ERK1/2-SGK1信号通路及小鼠PTSD样行为的影响,并未对机制展开验证。这些问题的解决将有助于进一步揭示化合物10b的神经调控作用机制及新药物开发。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Maercker A, Cloitre M, Bachem R, et al. Complex post-traumatic stress disorder[J]. *Lancet*, 2022, 400(10345): 60-72.
- [2] Valdivia G, Ardiles AO, Idowu A, et al. mGluR-dependent plasticity in rodent models of Alzheimer's disease[J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2023, 15: 1123294.
- [3] Li X, Du ZJ, Xu JN, et al. mGluR5 in hippocampal CA1 pyramidal neurons mediates stress-induced anxiety-like behavior[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2023, 48(8): 1164-74.
- [4] Kim J, Kang S, Choi TY, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 in amygdala target neurons regulates susceptibility to chronic social stress [J]. *Biolog Psychiatry*, 2020, 92(2): 104-15.
- [5] Chen Y, Zhang Y, Chen Q, et al. Inhibition of mGluR5/PI3K-AKT pathway alleviates Alzheimer's disease-like pathology through the activation of autophagy in 5XFAD mice[J]. *J Alzheimers Dis*, 2023, 91(3): 1197-214.
- [6] Xuan SM, Su YW, Liang YM, et al. mGluR5 in amygdala modulates fear memory generalization[J]. *Front Behav Neurosci*, 2023, 17: 1072642.
- [7] Davis MT, Hillmer A, Holmes SE, et al. *In vivo* evidence for dysregulation of mGluR5 as a biomarker of suicidal ideation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(23): 11490-5.
- [8] Sun K, Xie R, Yi Z, et al. Amentoflavone impairs the reconsolidated fear memories through inhibition of ERK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2020, 622: 8-14.
- [9] First M, Gil-Ad I, Taler M, et al. The effects of fluoxetine treatment in a chronic mild stress rat model on depression-related behavior, brain neurotrophins and ERK expression[J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 45(2): 246-55.
- [10] Ma M, Quan HF, Chen SJ, et al. The anxiolytic effect of polysaccharides from stellariae *Radix* through monoamine neurotransmitters, HPA axis, and ECS/ERK/CREB/BDNF signaling pathway in stress-induced male rats[J]. *Brain Res Bull*, 2023, 203: 110768.
- [11] Thakur A, Choudhary D, Kumar B, et al. A review on post-traumatic stress disorder (PTSD): symptoms, therapies and recent case studies [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2020, 15(3): 502-16.
- [12] Miao XR, Chen QB, Wei K, et al. Posttraumatic stress disorder: from diagnosis to prevention[J]. *Mil Med Res*, 2018, 5(1): 32.
- [13] Park JC, Jeon YJ, Jang YS, et al. SGK1 knockdown in the medial prefrontal cortex reduces resistance to stress-induced memory impairment[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2021, 45: 29-34.
- [14] Yang YC, Ma YL, Liu WT, et al. Laminin-β1 impairs spatial learning through inhibition of ERK/MAPK and SGK1 signaling[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(12): 2571-86.
- [15] Stevenson RA, Hoffman JL, Maldonado-Devincci AM, et al. mGluR5 activity is required for the induction of ethanol behavioral sensitization and associated changes in ERK MAP kinase phosphorylation in the nucleus accumbens shell and lateral habenula [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 367: 19-27.
- [16] Li Y, Shi W, Dai J, et al. Upregulated TNF-α and lactate following ERK-SGK1 activation in the spinal dorsal horn underlies chronic postsurgical pain [J]. *Chin J Physiol*, 2020, 66(3): 144-5.
- [17] Du YL, Gao F, Sun HW, et al. Novel substituted 4-(Arylethynyl)-Pyrrolo [2, 3-d] pyrimidines negative allosteric modulators (NAMs) of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu5) Treat depressive disorder in mice[J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 261: 115855.
- [18] Xie P, Chen LX, Wang J, et al. Polysaccharides from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua prevent post-traumatic stress disorder behaviors in mice: Mechanisms from the perspective of synaptic injury, oxidative stress, and neuroinflammation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319: 117165.
- [19] Matrisciano F, Locci V, Dong E, et al. Altered expression and *in vivo* activity of mGlu5 variant receptors in the striatum of BTBR mice: novel insights into the pathophysiology of adult idiopathic forms of autism spectrum disorders[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2022, 20(12): 2354-68.
- [20] Cheng S, Xu J, Wang W, et al. Inhibition of mGluR5 alters BDNF/TrkB and GLT-1 expression in the prefrontal cortex and hippocampus and ameliorates PTSD-like behavior in rats [J]. *Psychopharmacology*, 2020, 240(4): 837-51.

- [21] Fuxe K, Borroto-Escuela DO. Basimglurant for treatment of major depressive disorder: a novel negative allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 5[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2015, 24(9): 1247-60.
- [22] Arsova A, Möller TC, Vedel L, et al. Detailed *in vitro* pharmacological characterization of clinically tested negative allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor 5[J]. *Mol Pharmacol*, 2020, 98(1): 49-60.
- [23] Witkin JM, Pandey KP, Smith JL. Clinical investigations of compounds targeting metabotropic glutamate receptors[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2022, 219: 173446.
- [24] Cavallone LF, Montana MC, Frey K, et al. The metabotropic glutamate receptor 5 negative allosteric modulator fenobam: pharmacokinetics, side effects, and analgesic effects in healthy human subjects[J]. *Pain*, 2020, 161(1): 135-46.
- [25] Luo L, Yang L, Zhang K, et al. Caveolin-1-mediated cholesterol accumulation contributes to exaggerated mGluR-dependent long-term depression and impaired cognition in Fmr1 knockout mice[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(6): 3379-95.
- [26] Hakon J, Quattromani MJ, Sjölund C, et al. Inhibiting metabotropic glutamate receptor 5 after stroke restores brain function and connectivity[J]. *Brain*, 2024, 147(1): 186-200.
- [27] Jin DZ, Chen H, Zhou MH, et al. mGluR5 from primary sensory neurons promotes opioid-induced hyperalgesia and tolerance by interacting with and potentiating synaptic NMDA receptors[J]. *J Neurosci*, 2023, 43(31): 5593-607.
- [28] Lutz S, Alviña K, Puente N, et al. Target cell-specific plasticity rules of NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus[J]. *Front Cell Neurosci*, 2023, 17: 1068472.
- [29] Zhang XY, Kim J, Tonegawa S. Amygdala reward neurons form and store fear extinction memory[J]. *Neuron*, 2020, 105(6): 1077-93. e7.
- [30] Blount HL, Dee J, Wu L, et al. Stress resilience-associated behaviors following predator scent stress are accompanied by upregulated nucleus accumbens mGlu5 transcription in female Sprague Dawley rats[J]. *Behav Brain Res*, 2023, 436: 114090.
- [31] Liu YW, Zhao L, Zhou M, et al. Transplantation with mGluR5 deficiency bone marrow displays antidepressant-like effect in C57BL/6J mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 79: 114-24.
- [32] Sanjay, Sood R, Jaiswal V, et al. Nobiletin regulates intracellular Ca^{2+} levels *via* IP3R and ameliorates neuroinflammation in $\text{A}\beta$ 42-induced astrocytes[J]. *Redox Biol*, 2024, 73: 103197.
- [33] Kim JM, Yang YS, Hong J, et al. Biphasic regulation of osteoblast development via the ERK MAPK-mTOR pathway [J]. *eLife*, 2020, 11: 203-12.

(编辑:林 萍)