

电针对 PTSD 样大鼠学习记忆及海马 CA1 区 Bcl-2/Bax 表达的影响

刘倩汝¹ 王 丽¹ 祁 鸣¹ 于 海² 张桂青¹

摘要 目的 探讨电针对创伤后应激障碍(PTSD)样大鼠学习记忆及海马 CA1 区 Bcl-2/Bax 表达的影响。方法 将 48 只健康清洁级雄性 SD 大鼠随机均分为 4 组:正常对照组、模型组、电针组和电针对照组,采用国际认定的单次延长应激(SPS)方法制作大鼠 PTSD 模型,在造模 6 h 后给予电针组和电针对照组针刺治疗,通过旷场实验和 Morris 水迷宫实验测试大鼠的情绪唤醒水平和学习记忆能力,采用 HE 染色观察大鼠海马组织 CA1 区组织形态变化,Western blot 实验检测大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白的表达。结果 与模型组大鼠比较,正常对照组和电针组大鼠站立与跨格次数均增多,平均上台潜伏期和穿台潜伏期缩短,穿台次数增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$);HE 染色结果表明,与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织 CA1 区海马神经元排列紊乱,结构异常,电针组 CA1 区海马神经元排列较整齐,结构趋于正常;与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达升高,与模型组比较,电针组大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 电针治疗可改善 PTSD 样大鼠的学习记忆能力,可能与下调海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达有关。

关键词 创伤后应激障碍; Bcl-2; Bax; 学习记忆

中图分类号 R 749.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)03-0340-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.004

《精神疾病诊断与统计手册》第五版将创伤后应激障碍(post-traumatic stress disorder, PTSD)描述为以一种或多种方式接触实际的或被威胁的严重暴力或创伤性事件而诱发的一类精神疾病,且常伴有注意力偏离与分离性遗忘^[1]。PTSD 患者海马体积缩小,神经元有凋亡现象^[2-3],而海马体在记忆存储、定向与提取中扮演重要角色,有研究^[4-5]表明,电针对 PTSD 认知功能损害有效,但作用机制尚未阐明。现欲以单次延长应激(single prolonged stress,

SPS)建立的 PTSD 样大鼠模型为切入点,借助 Morris 水迷宫、HE 染色和 Western blot 等研究手段,探讨电针对 PTSD 样大鼠记忆功能及海马 CA1 区凋亡相关因子 Bcl-2/Bax 表达的影响,以进一步揭示电针治疗 PTSD 的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 48 只成年清洁级雄性 Sprague Dawley 大鼠,180~220 g,购自新疆疾病控制动物中心[动物编号:SCXK(新)2019-0032];饲养环境:室温(24 ± 1)℃,相对湿度 50%~60%,昼夜 12 h/12 h 交替,保持通风,自由摄食、饮水,动物实验的开展符合本单位医学伦理部门的有关规定。

1.2 主要试剂 Anti-Bcl-2 兔多克隆抗体、Anti-Bax 小鼠单克隆抗体(英国 abcam 公司,货号 ab196495、ab77566); β -actin 内参抗体、HRP 标记羊抗兔、羊抗小鼠二抗(英国 abcam 公司,货号 ab205718、ab205719);苏木精伊红(HE)染色试剂盒(上海歌凡生物技术有限公司,货号 M020)。

1.3 模型制备 采用 SPSS22.0 软件将大鼠随机等分为正常对照组、模型组、电针组和电针对照组,依据课题组前期造模方法^[6],对模型组和电针组大鼠做如下处理:①禁锢 2 h;②强迫性游泳 20 min,其中水深 35 cm,水温 25℃,休息 15 min;③ 99.5% 的无水乙醚麻醉箱中麻醉至意识丧失,不能站立,后立即取出。电针组和电针对照组在造模 6 h 内,参照相关文献^[7-8],将大鼠固定在支架上,取“百会”、“大椎”和“足三里”,沿皮下缓慢进针,深度为 5 mm,连接电针仪,疏密波,频率为 5~10 次/s,至大鼠肌肉轻微震颤为宜,每次 15 min,持续 14 d。

1.4 模型评估 分别通过旷场实验和 Morris 水迷宫实验测试 4 组大鼠的情绪唤醒水平和学习记忆能力。①旷场实验:自制旷场实验箱,规格为 900 mm × 900 mm × 500 mm,底部为 16 个等大小方格,上方与红外摄像头相连,数据采集时间为 5 min,记录参数为大鼠在旷场中的直立次数与跨格次数;② Morris 水迷宫实验:前 5 d 为定位航行能力测试,将大鼠

2019-09-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31860279)

作者单位:石河子大学医学院第一附属医院¹ 康复心理科、² 麻醉科,石河子 832003

作者简介:刘倩汝,女,主治医师;

张桂青,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: firstli@126.com

面向迷宫内壁置入池内,若 60 s 内大鼠找到水中站台并停留 5 s,则同步的计算机停止跟踪。若找不到,则引导大鼠登到水中站台,并停留 10 s,使其充分感受周围的空间位置信息,重复 4 次,记录平均上台潜伏期。第 6 天为空间探索能力测试,移除水下站台,将大鼠从第 2、3 和 4 象限(非站台所在象限)的任意一个方位面壁置入池内 1 次,记录其穿台潜伏期(即穿过原站台所在位置所需时间)和穿台次数。

1.5 海马组织提取与 HE 染色 完成模型评估后采用 3% 水合氯醛 30 mg/kg 对 4 组大鼠行腹腔麻醉,暴露胸腔,剪开右心耳开始放血,随后向大鼠心脏以 50 ml/min 的速度推注生理盐水灌洗液,直至从右心耳流出的液体变得清亮,后迅速断头取脑,在冰上采用玻璃分针剥离双侧海马组织,一侧在液氮罐中保存 24 h 后于 -80°C 冰箱封存待用,另一侧经 10% 甲醛溶液固定 30 min 后行 50%、70%、80%、95% 和 100% 梯度酒精脱水,后在二甲苯中进行透明化处理,经浸蜡、包埋、切片、脱蜡与染色、漂洗、复染和封藏等一系列常规处理后,制作组织切片。光学显微镜下观察各组大鼠海马 CA1 组织形态特点。

1.6 Western blot 法检测 Bcl-2/Bax 蛋白表达 取先前冻存的海马组织 100 mg,用眼科剪剪碎,置于含 1% PMSF 的预冷 RIPA 裂解液中,充分裂解 30 min,于匀浆器中匀浆,15 000 r/min 离心 15 min,取上清液,后稀释、孵育,利用吸光度(optical density, OD)值测定样本蛋白浓度,煮沸冷却备用;配备 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶,恒压 100 V 电泳 90 min,后将蛋白转膜至 PVDF 膜上(恒压 80 V、60 min),PBST 洗膜 8 min $\times$ 3 次,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,敷一抗(Bcl-2 及 Bax, 1:800 β -actin, 1:1 000),于 4°C 冰箱过夜, PBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次、8 min $\times$ 5 次,敷二抗(HRP 标记羊抗兔,稀释比例为 1:5 000)2 h, PBST 洗膜 5 min $\times$ 4 次、10 min $\times$ 3 次,暗室中采用 ECL 化学发光法曝光显色,用 BandScan 软件得出胶片灰度值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间均数比较采用方差分析进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 旷场实验站立与跨格次数比较 与正常对照组比较,模型组大鼠站立次数与跨格次数均减少;与模型组比较,电针组大鼠站立与跨格次数均增多,差

异有统计学意义($P < 0.05$),其中正常对照组和电针对照组大鼠两项指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

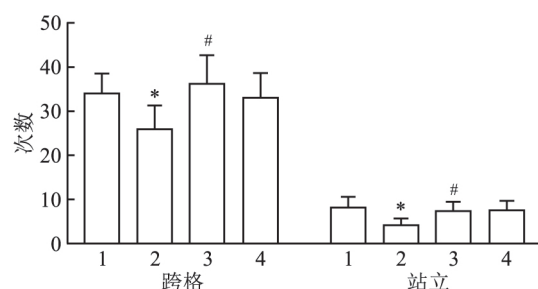


图 1 旷场实验各组大鼠站立与跨格次数比较

1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 电针组; 4: 电针对照组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.2 Morris 水迷宫实验 在定位航行能力测试阶段,前 2 d 各组大鼠平均上台潜伏期差异无统计学意义($P > 0.05$),第 3 天开始,与正常对照组比较,模型组大鼠平均上台潜伏期延长;与模型组比较,电针组大鼠平均上台潜伏期缩短,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在空间探索能力测试阶段,移除水下 20 mm 处的站台,与正常对照组比较,模型组大鼠穿台潜伏期延长,穿台次数减少;与模型组比较,电针组大鼠穿台潜伏期缩短,穿台次数增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中正常对照组和电针对照组大鼠以上指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

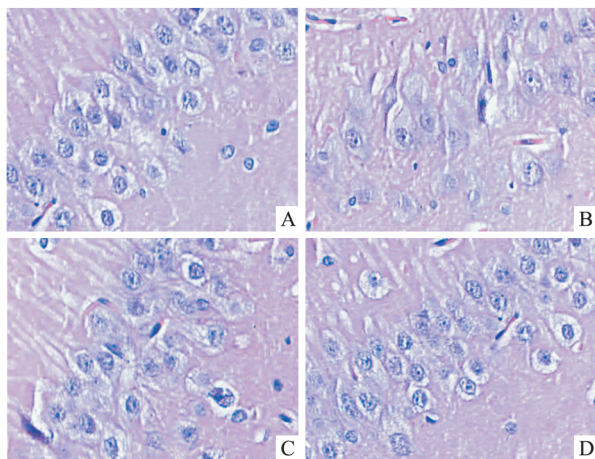
2.3 海马组织 HE 染色结果 与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织 CA1 区海马神经元排列紊乱,结构异常,且胞核和胞质界限较模糊,与模型组大鼠比较,电针组大鼠海马组织 CA1 区神经元排列较整齐,结构趋于正常,正常对照组和电针对照组大鼠海马组织 CA1 区神经元形态结构比较未见明显差异。见图 2。

2.4 大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达 各组大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达存在差异($F = 154.50$, $P < 0.05$; $F = 42.67$, $P < 0.05$)。与正常对照组(0.345 ± 0.034 ; 0.193 ± 0.031)比较,模型组(0.606 ± 0.049 ; 0.325 ± 0.054)大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,电针组(0.364 ± 0.034 ; 0.175 ± 0.035)大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),

表1 Morris 水迷宫实验大鼠上台潜伏期、穿台潜伏期和穿台次数的比较 ($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

Morris 水迷宫实验	正常对照组	模型组	电针组	电针对照组	F 值
上台潜伏期					
第1天	57.46 ± 5.21	59.32 ± 4.71	57.22 ± 4.95	58.34 ± 6.74	0.37
第2天	55.23 ± 4.16	56.45 ± 5.33	55.00 ± 3.41	57.11 ± 5.62	0.54
第3天	45.51 ± 6.39	53.32 ± 7.14*	47.02 ± 4.22#	46.32 ± 4.41	4.75
第4天	38.45 ± 3.36	49.22 ± 6.34*	39.47 ± 5.25#	36.71 ± 5.33	14.12
第5天	22.76 ± 5.51	31.22 ± 4.34*	24.15 ± 4.37#	25.41 ± 3.36	8.33
穿台潜伏期	17.21 ± 3.34	28.42 ± 5.28*	19.22 ± 5.38#	18.26 ± 5.51	12.24
穿台次数	7.35 ± 1.26	2.71 ± 0.94*	8.16 ± 0.64#	7.51 ± 1.91	29.77

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

图2 各组大鼠海马组织 CA1 区 HE 染色 $\times 400$

A: 正常对照组; B: 模型组; C: 电针组; D: 电针对照组

正常对照组和电针对照组 (0.321 ± 0.027 ; 0.165 ± 0.034) 大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图3。

3 讨论

近年来随着对 PTSD 研究的深入,除了典型的三大核心症状,即与创伤事件有关的侵入性记忆、持续回避与创伤事件有关的内容和与创伤事件有关的警觉性或反应性明显改变,人们开始更加关注创伤暴露者认知和心境方面的负性改变^[1],记忆力是认知功能的核心,而动物模型的引入为人们研究 PTSD 记忆力减退的发病机制提供了可能。中医认为,脑为元神之府,是调节人们精气神、认知、情绪情感和意志过程的集大成者,人体阳气蒸腾上行,填濡髓海,督脉循行于后背正中,与六条阳经均有交汇,百会位居大脑巅顶,可升阳益气,醒脑宁神,为督脉要穴,大椎为督脉、手、足三阳脉交会穴,可调脏腑机能,足三里可补益气血,治疗下肢痿痹,百会、大椎和足三里三穴的贯通与配合有滋养血脉,提升心智的功效。

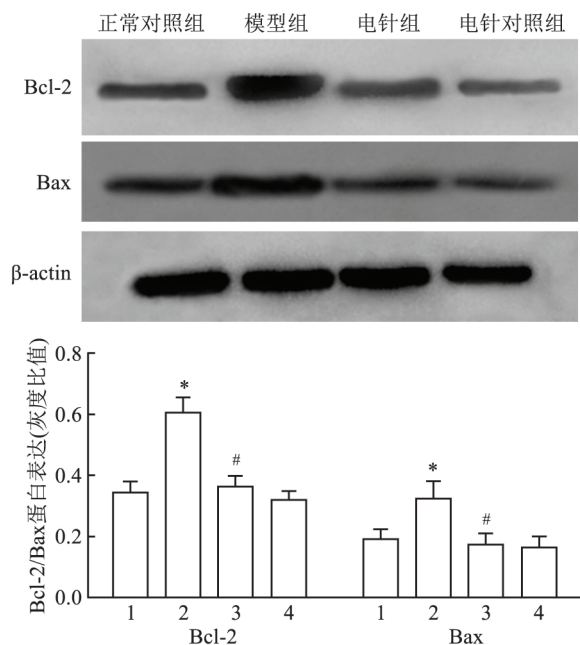


图3 大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白的表达

1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 电针组; 4: 电针对照组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

旷场实验是测试实验动物情绪唤醒水平和自主运动的经典行为学实验^[9],模型建立及电针干预后,与正常对照组比较,模型组大鼠在旷场中站立与跨格次数均减少,行为显呆滞、刻板;与模型组比较,电针组大鼠站立与跨格次数均增多,行为显主动、活跃,情绪唤醒水平增强,对周围事物的兴趣增加。积极的行为活动可提升个体的内在自我认知^[10],进而影响其对周围信息的判断和评价,Morris 水迷宫实验可通过定位航行和空间探索两个方面对实验动物的学习记忆能力进行评估^[11],从第3天开始,与模型组比较,电针组和正常对照组大鼠平均上台潜伏期缩短,定位航行能力明显提升;在第6天的空间探索阶段,撤去水下站台后,与模型组比较,电针组和正常对照组大鼠多次穿过水下站台且穿台时间很短,对水下站台位置的感知能力明显更强,这与李艳

鸣等^[12]研究结果类似,电针治疗提升了 PTSD 模型大鼠的学习记忆表现。

徐爱军等^[13]研究表明,SD 大鼠接受 SPS 应激后,学习记忆能力减退,海马神经元凋亡相关因子 Bcl-2/Bax 表达均上调,未行干预治疗。在本次研究中,在行为学检测后,以对创伤应激最为敏感的大鼠海马组织 CA1 区为切入点,HE 染色结果显示,模型组大鼠海马神经元排列紊乱,结构异常,且胞核和胞质界限较模糊;电针组大鼠海马组织 CA1 区神经元排列较模型组更整齐,结构已趋于正常,这或许可以从形态学的角度解释 PTSD 样大鼠认知记忆能力减退的原因。细胞凋亡包括诱导、调控和效应 3 个步骤和线粒体、死亡受体和内质网等 3 个主要途径,其中以线粒体依赖途径最为重要,Bcl-2 基因为优秀的抗凋亡基因代表,对促凋亡因子 Bax 有着直接的拮抗作用,Bcl-2/Bax 蛋白均在线粒体上游,能有效调控凋亡启动因子 cyt-c 的释放,进而激活重要的凋亡执行者 caspase-3,从而介导细胞的存活或死亡^[14]。Western blot 结果显示,与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达均升高,与模型组比较,电针组 Bcl-2/Bax 蛋白表达均降低,表达量恢复正常,电针治疗可改善 PTSD 样大鼠的学习记忆能力,可能与下调海马组织 CA1 区 Bcl-2/Bax 蛋白表达有关。值得注意的是,在上述几个方面,正常对照组和电针对照组均未表现出明显差异,表明对于正常健康 SD 大鼠而言,电针治疗不会对其情绪唤醒以及行为表现产生干扰,全部选用雄性大鼠,旨在避免雌性动物体内周期性激素水平变化对实验的影响。

参考文献

- [1] Association A P. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5) [M]. Arlington fifth edition, VA: American Psychiatric Pub, 2013:271-80.
- [2] Filipovic B R, Djurovic B, Marinkovic S, et al. Volume changes of corpus striatum, thalamus, hippocampus and lateral ventricles in posttraumatic stress disorder (PTSD) patients suffering from headaches and without therapy [J]. *Cent Eur Neurosurg*, 2011, 72(3):133-7.
- [3] 黎磊, 张华, 胡新宇, 等. 基于体素的形态学测量与自建模板及微分同胚图像融合方法对近期发病的创伤后应激障碍儿童的脑结构研究[J]. *中华放射学杂志*, 2017, 51(3):210-3.
- [4] Hollifield M, Sinclair-Lian N, Warner T D, et al. Acupuncture for post traumatic stress disorder: a randomized controlled pilot trial [J]. *J Nerv Ment Dis*, 2007, 195(6):504-13.
- [5] 赵桂君, 郭淑颖, 张怡, 等. 电针早期干预对预防创伤后应激障碍临床观察[J]. *上海针灸杂志*, 2014, 33(4):314-6.
- [6] 邢文龙, 刘超猛, 王梅子, 等. MKP-1 在 PTSD 样大鼠海马组织中表达改变[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(12):1889-92.
- [7] 谢康楠, 唐国庆, 詹海斌, 等. 电针对创伤后应激障碍模型大鼠蓝斑 nNOS 表达的影响[J]. *医学理论与实践*, 2015, 28(18):2421-3.
- [8] 陈坤黄寓, 王东, 杨欢, 等. 电针对颅脑损伤大鼠海马 CA1 区细胞凋亡的影响[J]. *针灸临床杂志*, 2019, 35(7):61-4, 97.
- [9] Perals D, Griffin A S, Bartomeus I, et al. Revisiting the open-field test: what does it really tell us about animal personality [J]. *Anim Behav*, 2017, 123:69-79.
- [10] 刘欢, 岳楠, 白长虹. 红色旅游情境下情绪唤起对游客认知的影响[J]. *社会科学家*, 2018(3):84-90.
- [11] Barnhart C D, Yang D, Lein P J. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0124521.
- [12] 李艳鸣, 赵桂君. 电针对 PTSD 大鼠体重和空间学习记忆的影响[J]. *黑龙江医学*, 2014, 38(3):233-5.
- [13] 徐爱军, 耿菲, 王海涛. 单一连续应激对大鼠行为学和海马 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29(4):312-3.
- [14] 董雅洁, 高维娟. bcl-2、bax、caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(21):4828-30.

Effects of electro-acupuncture on learning and memory and Bcl-2/Bax expression in hippocampal CA1 region of PTSD-like rats

Liu Qianru, Wang Li, Qi Ming et al

(Dept of Rehabilitation Psychology, The First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832003)

Abstract Objective To investigate the effects of electro-acupuncture on learning and memory and Bcl-2/Bax expression in hippocampal CA1 region of post-traumatic stress disorder (PTSD)-like rats. **Methods** Forty-eight healthy and clean male SD rats were randomly divided into four groups: control group, model group, electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group, 12 rats in each group. The PTSD model of rats was estab-

网络出版时间: 2020-3-30 17:08 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0845.005.html>

桥本甲状腺炎鼠动情周期子宫内膜 半乳糖凝集素-1 含量变化

高伟伟^{1,2} 李莉¹ 樊华¹ 杨昊¹ 柳田田¹ 王囡¹ 朱德发¹

摘要 目的 研究桥本甲状腺炎鼠动情周期子宫内膜半乳糖凝集素-1 (galectin-1) 表达。方法 选取 8~9 周龄的雌性小鼠共 40 只,按照随机数字表法将其均分成观察组和对照组。其中观察组小鼠于尾根部予以猪甲状腺球蛋白皮下注射,建立桥本甲状腺炎模型。分别比较 2 组小鼠血清甲状腺球蛋白抗体 (TgAb)、甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAb)、三碘甲状腺原氨酸 (T3)、四碘甲状腺原氨酸 (T4)、促甲状腺激素 (TSH) 水平、动情各期的子宫内膜厚度、galectin-1 mRNA 表达情况、galectin-1 蛋白的平均吸光度值 (AOD)、子宫组织匀浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-17a (IL-17a) 水平。结果 与对照组相比,观察组小鼠血清 TgAb、TPOAb 水平增高 ($P < 0.05$),甲状腺激素水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$);动情期子宫内膜厚度增加 ($P < 0.05$),galectin-1 蛋白的表达减少 ($P < 0.05$),动情周期 galectin-1 mRNA 水平减低

($P < 0.05$),动情周期子宫组织匀浆中 TNF- α 、IL-17a 表达减少 ($P < 0.05$)。结论 桥本甲状腺炎鼠动情期子宫内膜增厚,galectin-1 含量减低。子宫组织匀浆内 TNF- α 和 IL-17a 两种细胞因子减少。

关键词 桥本甲状腺炎;半乳糖凝集素-1;子宫内膜;动情周期;细胞因子

中图分类号 R 581.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0344-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.005

桥本甲状腺炎属于自身免疫性疾病之一,主要发生于女性人群^[1]。研究^[2]显示,不孕女性具有较高的桥本甲状腺炎发生率。因此,对桥本甲状腺炎与女性妊娠的关系进行深入研究尤为重要。人及哺乳动物的子宫内膜经过短暂的“着床窗口期”才允许胚胎着床,这一过程受到各种信号物质、细胞因子的调节。半乳糖凝集素家族成员在免疫调节、炎症反应以及肿瘤细胞的浸润、转移等一系列生理过程中发挥着重要作用^[3]。既往,半乳糖凝集素-1 (galactose agglutinin-1, galectin-1) 在肿瘤疾病的发生、进展、转移等方面的相关研究较多,由于胚胎着床和

2019-06-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272152)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院老年内分泌科,合肥 230022

² 安徽省第二人民医院普内科,合肥 230041

作者简介:高伟伟,女,硕士研究生;

朱德发,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: zdfa0168@sina.com

lished by the internationally recognized single prolonged stress (SPS) method. After 6 h of modeling, the rats in the electro-acupuncture group and electro-acupuncture control group were given acupuncture treatment. The open field test and Morris water maze were used to test the emotional arousal level and learning and memory ability of rats. The morphological changes of hippocampal CA1 region were observed by HE staining. Then the expression of Bcl-2/Bax protein in hippocampal CA1 region was detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the standing and crossing times of the control group and the electro-acupuncture group increased, the average incubation period and crossing latency shortened, the number of crossing times increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The results of HE staining showed that compared with the control group, the hippocampal neurons in CA1 area of the model group were disorderly arranged and had an unusual structure, and the hippocampal neurons in CA1 area of the electro-acupuncture group were arranged in order and the structure tended to be normal. Compared with the control group, the expression of Bcl-2/Bax protein in CA1 region of hippocampus in the model group increased, and the expression of Bcl-2/Bax protein in CA1 region of hippocampus in the electro-acupuncture group decreased compared with the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Electro-acupuncture can improve the learning and memory ability of PTSD-like rats, which may be related to the down-regulation of Bcl-2/Bax protein expression in CA1 region of hippocampus.

Key words post-traumatic stress disorder; Bcl-2; Bax; learning and memory