

网络出版时间: 2018-11-5 15:38 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.015.html>

MKP-1 在 PTSD 样大鼠海马组织中表达改变

邢文龙¹, 刘超猛¹, 王梅子¹, 朱志慧¹, 张桂青²

摘要 目的 探讨创伤后应激障碍(PTSD)样大鼠行为学改变与海马组织中丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(MKP-1)表达的关系。方法 将30只清洁级SD大鼠随机分为Control组、PTSD 1 d组、PTSD 3 d组、PTSD 7 d组、PTSD 14 d组,每组各6只,使用国际认定的单次延长应激(SPS)方法制作大鼠PTSD模型。通过旷场试验、Morris水迷宫观察大鼠的行为学变化。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blot法分别检测大鼠海马组织中MKP-1 mRNA和蛋白水平的变化。结果 PTSD 7 d组、PTSD 14 d组与Control组相比直立次数、进格次数以及穿台次数减少,潜伏期延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PTSD 7 d组、PTSD 14 d组与Control组相比,海马组织中MKP-1 mRNA及蛋白表达水平明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 PTSD样大鼠行为改变、记忆下降考虑与海马组织中MKP-1基因及蛋白表达增高有关,MKP-1可能参与了PTSD的发病机制,有望作为PTSD发生发展的参考指标。

关键词 创伤后应激障碍; 丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1; 海马组织

中图分类号 R 749.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)12-1889-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.015

创伤后应激障碍(posttraumatic stress disorder, PTSD)是经历异乎寻常的灾难性创伤事件所造成,以延迟出现和持续存在为特点的身心障碍。在最新出版的DSM-5中将核心症状修改为:与创伤事件有关的创伤性体验重现、持续性回避与创伤事件有关的刺激、认知与心境方面消极改变和警觉性增高或反应性明显改变,在创伤后开始出现或加重^[1],但其发病机制复杂,产生各种表现的具体机制需要进一步的研究。丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(mito-

gen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1)是一种双特异性蛋白磷酸酶,可以使苏氨酸或酪氨酸残基去磷酸化,负向调控MAPK信号通路,从而参与了神经元及突触可塑性、神经元功能和存活等方面的调节^[2]。同时,近期也有研究显示,MKP-1在抑郁中是一种负性调节蛋白,在抑郁模型的大鼠海马组织中明显上升^[3],而且通过注射升高海马组织中的MKP-1后,大鼠会出现抑郁样行为^[4]。然而在PTSD患者中也会出现认知与心境等方面的消极表现,这是否也与海马组织中的MKP-1的表达有关。该实验旨在研究PTSD样大鼠海马组织MKP-1 mRNA及蛋白表达与大鼠的行为学改变和认知改变之间的关系,以进一步探讨PTSD的发生机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30只健康清洁级雄性SD大鼠,体重(180±20)g,由新疆疾病控制动物中心提供。实验动物的饲养严格按照石河子大学动物饲养规定,光照时间控制在12/12 h,温度(21±2)℃,适应环境7 d。

1.2 主要试剂 山羊多克隆抗MKP-1抗体(英国abcam公司);兔抗山羊二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);荧光定量PCR试剂盒(德国Qiagen公司);cDNA合成试剂盒(美国Thermo-fementas公司)。

1.3 模型制备 按照随机数表法将SD大鼠分为Control组、PTSD 1 d组、PTSD 3 d组、PTSD 7 d组、PTSD 14 d组(每组 $n=6$)。PTSD组均采用2005年日本文部省召开的国际PTSD科学会议确定的SPS模型^[5]进行造模,依次通过连续束缚2 h、强迫游泳、乙醚麻醉3个步骤进行模型制备,造模完成后7 d内尽量避免打扰。

1.4 旷场实验 于造模后第8、10、14、21天,分别对PTSD 1 d组、PTSD 3 d组、PTSD 7 d组、PTSD 14 d组和Control同一时间段进行旷场试验。旷场箱为(900 mm×900 mm×500 mm),箱底部划分25个16 mm×16 mm格子,将其置于安静的环境中,避免光线直射,通过红外摄像机,记录大鼠5 min的运动

2018-07-26 接收

基金项目 “十二五”新疆生产建设兵团医药卫生重点领域科技攻关项目(编号:2012BA023)

作者单位: ¹ 石河子大学医学院,石河子 832003

² 石河子大学医学院第一附属医院康复心理科,石河子 832008

作者简介: 邢文龙,男,硕士研究生;

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

轨迹,水平得分(也称为自主运动),定义为大鼠水平穿越的方格数,规定大鼠3个或4个爪进入同一记为1分;垂直得分(也称为探索行为),定义为以2个后爪支撑身体,2个前爪离开底面,每离开一次就记为1分^[8]。通过观察大鼠的站立次数、跨格次数评判大鼠的行为学指标。

1.5 水迷宫实验 分别于9、11、15、22 d对PTSD 1 d组、PTSD 3 d组、PTSD 7 d组、PTSD 14 d组和Control组进行连续5 d的Morris水迷宫实验测量各组的空间探索能力;在实验后的第6天撤掉Morris水迷宫水下站台,测定大鼠的空间记忆能力。

1.6 定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)检测大鼠海马组织MKP-1的mRNA水平 ①分别于刺激后第15、17、21和28天,将SD大鼠麻醉后采用断头取脑,取出大鼠大脑,迅速剥离获取海马组织;②用TRIzol法提取海马组织的总RNA,采用紫外分光光度计(Thermo NanoDrop 2000)测量总RNA的浓度与纯度,当260 nm/280 nm在1.8~2.0范围内时,按照cDNA合成试剂盒说明书进行逆转录;③MKP-1基因引物设计、合成由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。引物序列为:上游引物:5'-AAGATATGCTCGACGCCTTG-3',下游引物:5'-GTCTGCCTTGTGTTGTCCT-3'; β -actin上游引物:5'-CAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3',下游引物:5'-CGGTGTCCCTTCTGAGTGTT-3';④采用荧光定量PCR试剂盒在64孔ABI Prism7300序列检测系统(美国应用生物系统公司)进行扩增。内参基因与目的基因各重复3次,同时设3个阴性对照,建立总体积为20 μ l的反应体系,反应条件为:95 $^{\circ}$ C,2 min(1个循环);95 $^{\circ}$ C,5 s;60 $^{\circ}$ C,30 s(40个循环),循环结束后得到扩增曲线;95 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,1 min;95 $^{\circ}$ C,30 s;60 $^{\circ}$ C,15 s后得到溶解曲线。

1.7 Western blot法检测MKP-1的蛋白表达 取大鼠海马,用研钵研碎,研磨之前用液氮冷却研钵,在研磨过程中同时滴加液氮,充分研磨后加RIPA裂解液,提取出总蛋白。采用紫外分光光度计测量总蛋白的浓度,配平后取20 μ g蛋白上样,通过12%的SDS-PAGE胶电泳,电转到PVDF膜,用血清封闭2 h,一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C摇床孵育16 h。TBST溶液

洗膜后,上二抗(1:10 000)常温孵育1 h,TBST再次冲洗后移至暗室进行显影。蛋白表达通过条带的灰度值表示。

1.8 统计学处理 采用SPSS 18.0软件进行分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 旷场实验进格次数和直立次数比较 PTSD 1 d组、PTSD 3 d组与Control组相比在进格次数和直立次数中差异无统计学意义($P > 0.05$),PTSD 7 d、PTSD 14 d组与Control组相比,进格次数减少,直立次数下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 水迷宫定位航行能力比较 大鼠在应激后分别于9、11、14、21 d行连续5 d的水迷宫实验,在第1~3天,PTSD 1 d、PTSD 3 d、PTSD 7 d、PTSD 14 d组与Control组相比上台潜伏时间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);在4、5 d,与PTSD 1 d、PTSD 3 d组与Control组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),PTSD 7 d、PTSD 14 d组与Control组相比潜伏期时间缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.3 水迷宫空间探索能力比较 在水迷宫实验的第6天行空间探索能力比较,穿台潜伏期和穿台次数与Control组比较,PTSD 1 d、PTSD 3 d组差异无统计学意义($P > 0.05$),PTSD 7 d、PTSD 14 d组与Control组相比所需时间延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

2.4 大鼠海马组织MKP-1 mRNA水平表达 PTSD 1 d(0.81 $\pm$ 0.17)、PTSD 3 d(1.06 $\pm$ 0.39)组与Control组(0.67 $\pm$ 0.08)相比大鼠大脑海马组织的MKP-1 mRNA的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),PTSD 7 d(2.61 $\pm$ 0.65)、PTSD 14 d(2.54 $\pm$ 0.76)组与Control组相比MKP-1 mRNA的表达升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 大鼠海马组织MKP-1蛋白水平表达 Western blot的实验结果显示,PTSD 7 d组、PTSD 14 d组MKP-1蛋白表达较Control组明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1。

表1 旷场实验直立次数和进格次数比较($\bar{x} \pm s$)

旷场实验	Control组	PTSD 1 d组	PTSD 3 d组	PTSD 7 d组	PTSD 14 d组	F值
进格次数	6.17 $\pm$ 1.47	6.50 $\pm$ 1.87	6.67 $\pm$ 1.75	3.00 $\pm$ 1.79*	2.67 $\pm$ 1.51*	8.36
直立次数	36.33 $\pm$ 7.11	34.00 $\pm$ 5.06	39.33 $\pm$ 5.53	24.67 $\pm$ 7.71*	22.17 $\pm$ 7.13*	4.77

与Control组比较: * $P < 0.05$

表2 水迷宫实验($\bar{x} \pm s$)

水迷宫实验	Control 组	PTSD 1 d 组	PTSD 3 d 组	PTSD 7 d 组	PTSD 14 d 组	F 值
上台潜伏期						
第1天	58.21 ± 4.38	58.76 ± 2.35	59.04 ± 2.34	59.04 ± 2.37	57.26 ± 6.69	0.21
第2天	56.12 ± 3.33	57.52 ± 2.80	55.51 ± 2.46	56.44 ± 4.15	56.76 ± 6.70	0.22
第3天	48.16 ± 8.31	50.10 ± 8.41	51.08 ± 4.99	51.13 ± 3.08	51.60 ± 4.00	0.88
第4天	39.75 ± 7.27	38.91 ± 5.28	47.85 ± 3.22	45.07 ± 6.04	46.30 ± 4.10*	11.49
第5天	20.16 ± 5.21	25.58 ± 7.63	38.48 ± 4.27	39.79 ± 3.47*	41.47 ± 7.75*	15.68
穿台潜伏期	15.04 ± 5.97	18.93 ± 8.66	20.60 ± 6.65	25.60 ± 8.03*	32.71 ± 10.87*	4.13
穿台次数	6.75 ± 0.93	6.41 ± 0.74	5.83 ± 1.69	2.91 ± 0.97*	3.00 ± 1.58*	13.69

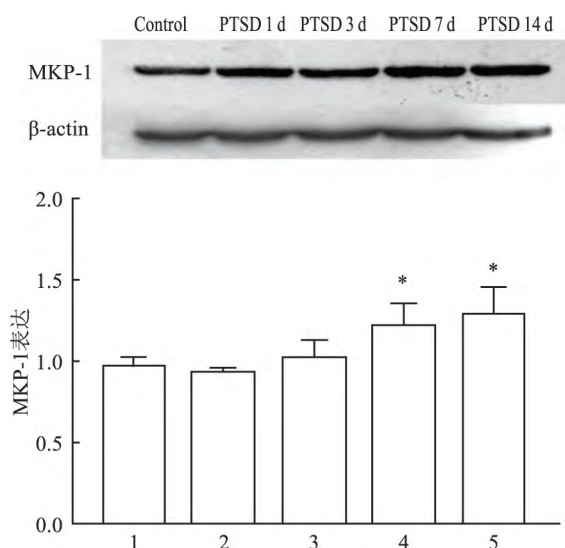
与 Control 组比较: * $P < 0.05$ 

图1 大鼠海马组织 MKP-1 的表达

1: Control 组; 2: PTSD 1 d 组; 3: PTSD 3 d 组; 4: PTSD 7 d 组; 5: PTSD 14 d 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

PTSD 是一种发病机制不清、病情复杂多变,治疗效果不理想的一种心身障碍疾病,起初是在战争后的士兵中发现的,也成为“战争疲劳”,经过对该疾病的进一步认识,发现经历严重威胁个体生命的事件如恐怖袭击、暴力犯罪和虐待、军事战斗、自然灾害、严重事故等创伤性或危及生命的事件后,也会出现类似表现。根据美国 PTSD 中心统计的数据来看,在美国 PTSD 的终生患病率为 5%,女性多于男性,女性的患病率约为男性的两倍,其中 PTSD 患者中将有 30% 的人会有长期伴随症状^[1]。然而近年来,错综复杂的原因引起自然灾害与人为灾难频繁发生,这些突发事件对人体生理上的损害可能会在一定时间内痊愈,但是会对人们造成严重而持久的心理创伤。因此 PTSD 越来越成为社会关注的重点^[2],也成为精神病学、心身医学和临床心理学的

研究重点。SPS 刺激制造 PTSD 样大鼠模型是目前国际公认的最高仿真模型,已广泛应用于 PTSD 机制的研究。在本研究结果中,给予大鼠 SPS 刺激后 PTSD 7 d 组、PTSD 14 d 组的旷场试验结果提示大鼠在经应激后紧张度增高,自主行为减少,探索欲望下降,在 Morris 水迷宫实验结果中显示大鼠空间探索以及定位定航能力均出现下降的情况,这两个结果提示大鼠在行为、记忆方面出现改变,这与典型的 PTSD 样症状的特征相吻合^[3]。表明本实验 SPS 刺激制作创伤后应激障碍模型是可靠的。

MKP-1 属于促分裂原活化蛋白激酶磷酸酶(mitogen-activated protein kinase phosphatases, MKPs)家族,通过去磷酸化作用负向调控 MAPK(p38、ERK1/2、JUN)的信号通路,在神经细胞的生长、分化、增殖、凋亡中有着重要作用^[4]。Comalada et al^[5]研究发现, MKP-1 在神经系统的调节中起着重要作用,参与神经系统的中的认知、学习、神经元发育等多个方面。有研究表明, MKP-1 使 JNK 信号传导通路失活,引起微管结构不稳定,从而影响神经元的轴突发育^[11-12],也可通过磷酸化和泛素化对 ERK 信号转导通路进行控制,影响海马组织轴突的可塑性和长时程增强作用(long-term potentiation, LTP),而 LTP 是巩固记忆的重要机制^[13]。也有研究^[14-15]显示 MKP-1 表达上调会通过负向调控 MAPK 信号,引起 NO 生成减少造成脑血流灌注不足,加重脑组织损伤,导致脑神经元细胞凋亡。然而目前国内对 MKP-1 在 PTSD 方面研究的报道较少。本实验从不同时间点对 MKP-1 进行检测,研究结果显示, PTSD 1 d 组、PTSD 3 d 组中 MKP-1 mRNA 以及蛋白表达并无明显改变,而在 PTSD 7 d 组与 PTSD 14 d 组的 MKP-1 mRNA 以及蛋白表达高于 Control 组,这说明 SD 大鼠在受到 SPS 刺激后海马组织中的 MKP-1 水平是动态波动的,出现的紧张度增高,自主行为减少,学习记忆能力下降等症状也可能与 MKP-1 水平升高有关。本研究中全部选用雄性 SD 大鼠,主要是

避免雌性鼠在其性周期中因雌激素水平变化对 MKP-1 的表达产生影响, 从而造成结果不准确。

参考文献

- [1] Association A P. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5) [M] //Diagnostic and statistical manual of mental disorders: American Psychiatric Association, 2013, 189(2): 4189.
- [2] Crowell S, Wancket L M, Shakibi Y, et al. Post-translational regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP)-1 and MKP-2 in macrophages following lipopolysaccharide stimulation: the role of the C termini of the phosphatases in determining their stability [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(42): 28753–64.
- [3] Duric V, Banasr M, Licznarski P, et al. A negative regulator of MAP kinase causes depressive behavior [J]. *Nat Med*, 2010, 16(11): 1328–32.
- [4] Wang C H, Zhang X L, Li Y, et al. Role of hippocampus mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 mRNA expression and DNA methylation in the depression of the rats with chronic unpredictable stress [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(4): 473–82.
- [5] Kaufer D, Friedman A, Seidman S, et al. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression [J]. *Nature*, 1998, 393(6683): 373–7.
- [6] Grønli J, Murison R, Fiske E, et al. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions [J]. *Physiol Behav*, 2005, 84(4): 571–7.
- [7] Iribarren J, Prolo P, Neagos N, et al. Post-traumatic stress disorder: evidence-based research for the third millennium [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2005, 2(4): 503–12.
- [8] Boysan M, Ozdemir P G, Ozdemir O, et al. Psychometric properties of the Turkish version of the PTSD Checklist for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (PCL-5) [J]. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*, 2017, 27(3): 300–10.
- [9] Boutros T, Nantel A, Emadali A, et al. The MAP kinase phosphatase-1 MKP-1/DUSP1 is a regulator of human liver response to transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(12): 2558–68.
- [10] Comalada M, Lloberas J, Celada A. MKP-1: a critical phosphatase in the biology of macrophages controlling the switch between proliferation and activation. [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(8): 1938–48.
- [11] Jeanneteau F, Deinhardt K. Fine-tuning MAPK signaling in the brain: the role of MKP-1 [J]. *Commun Integr Biol*, 2011, 4(3): 281–3.
- [12] 袁 杨, 刘 昊, 王海涛, 等. 抑郁大鼠海马区微管蛋白表达的变化 [J]. *安徽医科大报*, 2016, 51(3): 355–7, 362.
- [13] Valjent E, Caboche J, Vanhoutte P. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory [J]. *Mol Neurobiol*, 2001, 23(2–3): 83–99.
- [14] 刘光杰, 刘家传, 王金标, 等. 缺氧预处理对颅脑外伤大鼠海马 GADD34 表达及神经元细胞凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(1): 32–7.
- [15] 张 雪, 刘丽君, 等. 大鼠脑创伤后 MKP-1 表达上调、NO 的生成减少 [J]. *基础医学与临床*, 2015, 35(8): 1015–9.

Study of MKP-1 expression alteration in the hippocampal tissue of the PTSD rats

Xing Wenlong, Liu Chaomeng, Wang Meizi, et al
(Medical College, Shihezi University, Shihezi 832003)

Abstract Objective To investigate the relationship between the behavioral changes of rats with posttraumatic stress disorder (PTSD) and the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in hippocampus. **Methods** Thirty SD rats of clean grade were randomly assigned into control group, PTSD 1 d group, PTSD 3 d group, PTSD 7 d group and PTSD 14 d group with 6 in each group. The PTSD rat model was made by an internationally recognized single prolonged stress (SPS) method. Open-field test and Morris water maze were used to observe the behavior changes in rats. Meanwhile, real time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the changes of MKP-1 mRNA level and protein level in hippocampus of rats, respectively. **Results** Compared with the control group, the number of erect times, entry times and frequency of crossing the platform decreased and the incubation period of the rats was prolonged in PTSD 7 d and PTSD 14 d group ($P < 0.05$). The expression level of MKP-1 mRNA and protein in the hippocampus of PTSD 7 d group and PTSD 14 d group were significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Behavioral change and memory decline in rats with PTSD are considered related to the increased expression of MKP-1 gene and protein in hippocampus. MKP-1 probably be involved in the pathogenesis of PTSD, so the MKP-1 may serve as a reference index for the occurrence and development of PTSD.

Key words PTSD; MKP-1; hippocampus