

电针对慢性应激抑郁大鼠海马 CNTF R α 、EGFR 蛋白表达的影响

胡 诚¹ 王 晶² 张丹妹¹ 史榕苻³ 包伍叶¹ 宋映周¹ 卢 俊¹ 图 娅¹ 郭继红¹

(1 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京, 100029; 2 世界中医药学会联合会, 北京, 100101; 3 中日友好医院针灸科, 北京, 100029)

摘要 目的:观察电针对抑郁大鼠海马睫状神经营养因子受体(CNTF R α)、表皮生长因子受体(EGFR)蛋白表达的影响,探讨慢性应激抑郁模型(CUMS)大鼠星形胶质细胞功能的改变及电针的干预作用趋势。方法:雄性SD大鼠随机分为4组:空白组、模型组、模型+电针组、模型+氟西汀组,每组10只。利用生物素标记蛋白芯片技术,检测大鼠CNTF R α 、EGFR蛋白的表达。结果:模型组与空白组比较,大鼠海马CNTF R α 、EGFR蛋白表达上调(fold change = 1.50, 1.37)。模型+电针组、模型+氟西汀组与模型组比较,CNTF R α 水平下调(fold change = 0.73, 0.50),EGFR表达水平下调(fold change = 0.61, 0.47)。结论:各组大鼠海马CNTF R α 、EGFR的表达存在差异性,这可能是星形胶质细胞功能改变及针刺抗抑郁的机制之一。

关键词 电针;抑郁症;慢性应激;海马;星形胶质细胞

Influence of Electro-acupuncture on CNTF R α 、EGFR protein expression in rats with chronic stress depression

Hu Cheng¹, Wang Jing², Zhang Danmei¹, Shi Rongxing², Bao Wuyue¹, Song Yingzhou¹, Lu Jun¹, Tu Ya¹, Wu Jihong¹

(1 School of Acu-moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese medicine, Beijing 100029, China; 2 World Federation of Chinese medicine Societies, Beijing 100101, China; 3 China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To observe the effect of electroacupuncture on ciliary neurotrophic factor receptor and epidermal growth factor receptor of the hippocampal in the depression model rats. **Methods:** SD rats were randomly divided into four groups: blank group, model group, model + EA group, and model + fluoxetine. Use biotin-labeled protein chip technology to detect the expression of CNTF R α and EGFR. **Results:** Compared to the blank group, the protein expression of CNTF R α and EGFR in the model group are upregulation. Compared to the model group, CNTF R α and EGFR expression are downregulation in model + EA group and model + fluoxetine group. **Conclusion:** The different expression of CNTF R α and EGFR in each group may be one of the mechanisms of antidepressant by acupuncture.

Key Words Electro-acupuncture; Depression; Chronic Stress; Hippocampus; Astrocyte

中图分类号:R245.9+7 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.05.024

抑郁症是一种常见的精神疾患,主要表现为显著而持久的心境低落,思维行为改变,并伴有躯体症状^[1]。电针治疗抑郁症可起到减轻躯体症状、降低抗抑郁药物不良反应的作用,并且针药结合使用,还可使疗效叠加^[2]。针刺治疗抑郁症已成为临床中的重要组成部分,显示出了较大的优势,但其作用途径较复杂,且尚没有统一的定论。本研究首次利用生物素标记蛋白芯片技术,筛选出与星形胶质细胞功能变化相关的睫状神经营养因子受体(CNTF R α)、表皮生长因子受体(EGFR),旨在丰富针刺治疗抑郁症的机制研究。

1 材料与方法

1.1 动物 健康雄性SD大鼠(200 $\pm$ 20)g,清洁级,共40只。由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2004-2007。所有动物在实验前适应性喂养1周,实验室温度(23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、湿度

55%~60%。

1.2 主要试剂和仪器电针仪(华佗牌,SDZ-II型);氟西汀(Fluoxetine hydrochloride,法国礼来公司,批号:J20120001);AAR-BLM-1试剂盒(美国Ray-Biotech公司,芯片批号:4015806、4015807);包括膜芯片(RayBio[®] Biotin label-based Rat antibody array 1)、标记试剂、终止液、封闭缓冲液、红外荧光剂—链霉亲和素、透析管和浮漂、20X的洗液I、20X的洗液II、纯化柱、孵育盒;红外荧光扫描仪(Licor-Odyssey,美国LI-COR公司)。

1.3 方法

1.3.1 模型制备 对参考文献的造模方法进行改进^[3]。除空白组外,其余3组大鼠进行28d各种不同的应激刺激,包括:断食24h;断水24h;夜间光照12h;冷水游泳(4 $^{\circ}$ C,5min,水深30cm);潮湿垫料;夹尾

2 min; 束缚 3 h。

1.3.2 动物分组 采用随机数字表的方法将大鼠分为空白组、模型组、模型 + 电针组、模型 + 氟西汀组, 每组 10 只。空白组动物自由摄食饮水, 不接受任何刺激且群养。其他 3 组动物孤养, 且每天进行慢性应激造模处理。其中, 模型 + 电针组动物每日在应激刺激前 1 h, 进行电针干预。模型 + 氟西汀组动物每日在应激刺激前 1 h, 进行氟西汀灌胃干预。

1.3.3 针刺方法 取穴: 针刺穴位参考《实验针灸学》^[4], 选取“百会”“印堂”穴。操作: 针具选用 30 号 1 寸毫针(2.5 cm), 平刺进针, 深度为 0.5 ~ 1 cm。进针后, 接电针治疗仪, 以大鼠头部微颤为宜, 留针 20 min/次。

1.3.4 给药方法 将药物溶于蒸馏水中, 给药容积为 5 mL/kg 体重, 用药剂量 10 mg/kg 体重。

1.4 取材及检测方法 于慢性应激 4 周后, 灌流, 取脑放入液氮中, 然后转移到 -80 °C 冰箱保存待测。1) 样品透析: 将每组的 10 个大鼠海马组织混合, 取 200 μ L 组织裂解液加入透析管中, 然后在 4 000 mL 的 1 $\times$ PBS (pH = 8) 中 4 °C 边搅拌边透析。更换透析液 1 次/3 h。2) 测定蛋白浓度: 采用 BCA 试剂盒 (Pierce 公司, 货号: 23227) 检测淋巴液蛋白浓度。3) 生物素标记: 将标记试剂小管快速离心, 管中加入 500 μ L 1 $\times$ PBS 溶解粉末, 上下吹打将标记试剂混匀, 制备成 1 $\times$ 标记试剂溶液; 向新的离心管中加入适当量的标记试剂, 快速混匀, 此后, 每 5 min 轻弹离心管以混合反应试剂, 摇床上室温孵育 30 min; 加入 5 μ L 终止液, 用纯化柱去除未与芯片上蛋白结合的生物素; 将柱子放入 50 mL 收集管中; 于 3 000 r/min 离心机离心 3 min, 去掉储存液, 重复两次此操作后, 清洗干净柱子; 将柱子放入一个新的 50 mL 离心管中, 缓慢将标记好的样品加入树脂床的中央。4) 封闭和孵育: 用镊子拖着膜或者夹着膜的边缘将膜缓慢浸没到 2.5 mL 的封闭缓冲液中, 有标志的面朝上, 避免气泡产生, 盖上孵育盒的盖子, 室温振荡孵育 1 h; 用抽液泵抽去封闭液, 每张膜芯片加入 2.5 mL 封闭液稀释好的样品, 盖上盖子, 包上塑料薄膜, 4 °C 环境下过夜; 抽去样品, 每个孵育盒中加入约 3 mL 的 1 $\times$ 洗液 I (20 $\times$ 洗液用去离子水稀释) 室温振荡洗膜, 洗膜 4 次, 5 min/次; 抽去 1 $\times$ 洗液 I, 加入 1 $\times$ 洗液 II 室温振荡洗膜, 洗膜 3 次, 5 min/次; 抽去 1 $\times$ 洗液 II, 每张膜加入 2.5 mL 用封闭液 8 000 倍稀释的 CW800 - 链霉亲和素; 室温避光振荡孵育 2 h; 洗膜 (步骤同上)。5) 扫描: 使用美国 LI - COR 公司的 LI - COR Odyssey Scanner 进行扫描, 设定波长为 800 扫描通道, 扫描强度 intensity 为 7.0, 分辨率为 42 μ m。采

用仪器自带分析软件提取数据, 采用 AAR - BLM - 1 的数据分析软件来进行数据预分析。

2 结果

4 周应激处理后, 与空白组相比, 模型组大鼠海马 CNTF R α 表达上调 (fold change = 1.50); 相较于模型组, 模型 + 电针组、模型 + 氟西汀组 CNTF R α 表达下调 (fold change = 0.73, 0.50)。见图 1。

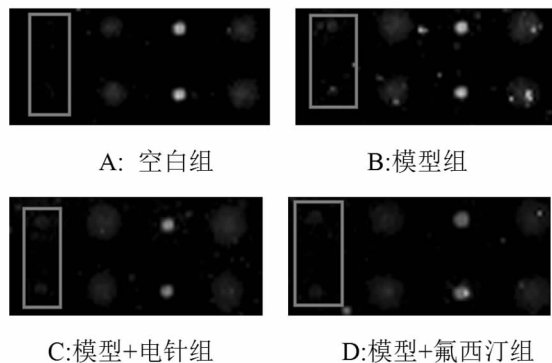


图 1 各组海马 CNTF R α 的表达

与空白组相比, 模型组大鼠海马 EGFR 蛋白的表达上调 (fold change = 1.37); 与模型组相比, 模型 + 电针组、模型 + 氟西汀组 EGFR 表达下调 (fold change = 0.47)。见图 2。

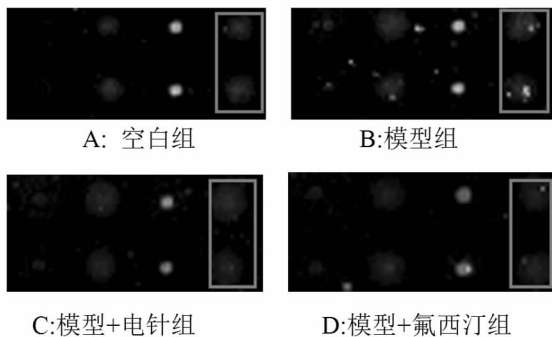


图 2 各组海马 EGFR 的表达

3 讨论

3.1 星形胶质细胞与抑郁症 星形胶质细胞 (Astrocyte, AST), 作为中枢神经系统中数量最多、分布最广的一类细胞, 是神经元的支持细胞。在突触重塑、神经细胞再生、神经元调节方面, AST 也起着重要的作用^[5]。AST 与情绪障碍性疾病的发生有着密切的联系。Czeh 等^[6]对成年雄性树鼯进行 5 周心理应激, 发现其海马 AST 总数减少, 胞体体积减小。Lori L^[7]等用磁共振成像技术观察包括抑郁障碍的情绪障碍性疾病患者, 发现其星形胶质细胞密度减少。AST 在脑损伤中起着双重作用。郭志慧等^[8]认为, 脑组织受损后释放多种因子激活了 AST, 而活化的 AST 在早期对神经元有保护作用, 另一方面, 也通过释放多种损伤因子

对神经元产生毒性。姜硕等^[9]建立抑郁大鼠模型并用针刺治疗发现,模型大鼠 AST 明显减少,针刺干预后 AST 增多。

3.2 关于指标的选择 生物素标记蛋白芯片技术具有实用性强、快速、准确、高通量、高灵敏度等特点^[10]。弥补了基因组研究不能获得对疾病状态进行了解的缺陷。本课题应用生物素标记蛋白芯片技术,共检测出大鼠 90 个蛋白的表达情况。着重关注了 CNTF R α 和 EGFR 两个指标。CNTF R α 是睫状神经营养因子 (CNTF) 的特异性结合蛋白质。KAHN 等^[11]发现体外培养的 AST 表面均有 CNTF 受体的表达。EGFR 具有络氨酸激酶活性。有研究表明^[8],AST 活化后,EGFR 表达明显上调,而抑制 EGFR 会抑制 AST 的活化。此外,何健等^[12]认为,AST 被激活后,细胞表面的 CNTF R α 、EGFR 超表达,通过改善复杂的内环境,有利于定向诱导神经干细胞向神经元分化。这对进一步探讨抑郁状态下 AST 功能的变化及针刺干预的影响,完善针刺抗抑郁的机制研究有着重要的意义。

通过检索发现,国内研究多重 AST 特异性标记物胶原纤维酸性蛋白 (GFAP) 的表达与 AST 功能的关系,而少有其他相关蛋白的报道。生物素标记蛋白芯片技术为我们提示了 CNTF R α 、EGFR 蛋白差异性变化的趋势,但对于所筛选的蛋白的可靠性和二者的作用及影响机制,还有待实验和临床的进一步验证和完善。

参考文献

[1] Yu S, Holsboer F, Almeida O F. Neuronal actions of glucocorticoids: fo-

cus on depression[J]. J Steroid Biochem mol Biol, 2008, 108(3-5): 300-309.

[2] 段冬梅, 图娅, 陈利平. 电针与百忧解对伴躯体症状抑郁症有效性的评价[J]. 中国针灸, 2008, 28(3): 167-170.

[3] 戴巍, 李卫东, 卢峻, 等. 电针对慢性应激抑郁大鼠海马神经元凋亡及 JNK 信号转导通路的影响[J]. 针刺研究, 2010, 35(5): 330-334.

[4] 张露芬. 实验动物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 150-156.

[5] 张敬军. 星形胶质细胞的研究[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(7): 788-791.

[6] Czeh B, Simon m, Schmelting B, et al. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment[J]. Neuropsychopharmacology, 2006, 31(8): 1616-1626.

[7] Altschuler LL, Abulseoud OA, Foland-Ross L, et al. Amygdala Astrocyte Reduction in Subjects with major Depressive Disorder but Not Bipolar Disorder[J]. Bipolar Disorders, 2010, 12(5): 541-549.

[8] 郭志慧, 武衡. 星形胶质细胞活化与表皮生长因子受体表达的相关性研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 27(8): 683-685.

[9] 姜硕. 电针修复慢性应激致抑郁大鼠海马星形胶质细胞损伤的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.

[10] 田浩梅, 易受乡. 抗体蛋白芯片技术应用研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(3): 75-78.

[11] KAHN m A, HUANG C J, CARUSO A. Ciliary neurotrophic factor activates JAK/STAT signal transduction cascade and induces transcriptional expression of glial fibrillary acidic protein in glial cells[J]. J Neurochem, 1997, 68(4): 1413-1423.

[12] 何健, 尹宗生, 高维陆, 等. 大鼠表皮生长因子、睫状神经营养因子真核表达载体的构建及其体外表达的鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(23): 4284-4289.

(2014-02-12 收稿 责任编辑: 王明)

(上接第 615 页)

[15] 刘密, 常小荣, 严洁, 等. 艾灸对胃黏膜损伤大鼠胃黏膜表皮生长因子、转化生长因子- α 及其受体的影响[J]. 针刺研究, 2011, 36(6): 403-408.

[16] 沈雪勇. 经络腧穴学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 29.

[17] 沈雪勇. 经络腧穴学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 59.

[18] 侯丽颖, 季幸妹, 曾常春, 等. 从脾功能不同角度探讨脾虚证线粒体改变意义[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(2): 92-94.

[19] 穆艳云, 李忠仁, 牛文民, 等. 电针对缺血再灌注脑损伤大鼠海马线粒体 ATP 酶活性的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(4): 298-270.

[20] 张强, 吴绪平, 王华, 等. 电针邻门穴对缓慢性心律失常大鼠心率及心肌组织 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 27(9): 1837-1839.

[21] 游世晶, 夏勇, 李艺, 等. 经皮穴位电刺激对大运动量耐力训练大鼠骨骼肌能量代谢的影响[J]. 上海针灸杂志, 2011, 30(3): 192-194.

[22] 沈雪勇, 丁光宏, 邓海平, 等. 冠心病患者内关穴红外辐射光谱病理信息分析[J]. 红外与毫米波学报, 2006, 25(6): 443-446.

[23] 刘汉平, 沈雪勇, 邓海平, 等. 冠心病患者劳宫穴红外辐射光谱研究

[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(4): 52-53.

[24] 周倫, 沈雪勇, 丁光宏, 等. 寸口脉太渊穴红外辐射光谱病理信息探测[J]. 上海针灸杂志, 2006, 25(10): 37-40.

[25] 周倫, 沈雪勇, 丁光宏, 等. 跌阳脉冲阳穴红外辐射光谱病理信息探测[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(6): 369-371.

[26] 丁光宏, 沈雪勇, 褚君浩, 等. 中医灸与人体穴位红外辐射光谱特性研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2002, 21(4): 356-360.

[27] 洪文学, 蔡建红, 景军, 等. 传统中医艾灸疗法的热辐射光谱特性的研究[J]. 生物医学工程研究, 2003, 22(4): 27-30.

[28] 沈雪勇, 丁光宏, 褚君浩, 等. 人体穴位和艾灸红外辐射光谱与穴位红外传输[J]. 上海中医药大学学报, 2001, 15(4): 33-35.

[29] Yeager RL, Franzosa JA, Millsap DS, et al. Effects of 670-nm photoherapy on development[J]. Photomed Laser Surg, 2005, 23(3): 268-272.

[30] Grossman N, Schneid N, Reuveni H, et al. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species[J]. Lasers Surg med, 1998, 22(4): 212-218.

[31] Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible and near-IR radiation on cells[J]. J Photochem Photobiol B, 1999, 49(1): 1-17.

(2014-03-26 收稿 责任编辑: 王明)