

低频重复经颅磁刺激对卒中后抑郁大鼠行为学及海马 c-fos、c-jun 蛋白表达的影响

崔立玲¹ 朱志中¹ 程元元¹ 戚文军^{2,3}

摘要

目的:探讨重复经颅磁刺激(rTMS)对卒中后抑郁(PSD)模型大鼠行为学及海马 c-fos、c-jun 蛋白表达的影响。

方法:筛选 40 只健康雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、假手术组、模型组和治疗组(n=10)。对照组不给予任何干预处理;模型组和治疗组采用大脑中动脉栓塞法(MCAO)和慢性不可预见温和应激法(CUMS)建立 PSD 模型;假手术组和治疗组给予 rTMS 治疗;通过蔗糖水消耗实验、旷野实验和水迷宫实验对各组大鼠行为学进行评估;应用免疫组化实验检测各组大鼠海马 c-fos、c-jun 的阳性细胞灰度值。

结果:①蔗糖水消耗实验:与模型组比较,治疗组蔗糖水消耗量明显增多($P < 0.05$);②旷野实验:治疗组大鼠水平及垂直得分较模型组有显著提高($P < 0.05$);③水迷宫实验:治疗组大鼠较模型组学习和记忆能力都有所改善($P < 0.05$);④免疫组化实验:治疗组大鼠 c-fos 阳性细胞灰度值高于模型组($P < 0.05$),各组间 c-jun 阳性细胞灰度值差异不显著($P > 0.05$)。

结论:rTMS 能够有效改善 PSD 模型大鼠的抑郁样行为,其机制可能与海马 c-fos、c-jun 蛋白的表达有关。

关键词 卒中后抑郁;重复经颅磁刺激;疾病模型;动物

中图分类号:R743.3, R454.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2017)-10-1119-05

Effects of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on behavioristics and expression of c-fos and c-jun in hippocampus of rats with post stroke depression/CUI Liling, ZHU Zhizhong, CHENG Yuanyuan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(10): 1119—1123

Abstract

Objective: To investigate the effects of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on behavioristics and expression of c-fos and c-jun in hippocampus of rats with post stroke depression (PSD).

Method: Forty male SD rats were randomly and equally divided into four groups (10 in each): the control group, the sham group, the model group and the treatment group. The control group and sham group were given normal care without any intervention while the PSD model group and treatment group were treated with middle cerebral artery occlusion (MCAO) and chronic unpredictable mild stress (CUMS); The sham group and treatment group accepted the rTMS treatment; The sugar water consumption test, the open field test and water maze test were used to verify the effect of rTMS on the rats with PSD; The expression of c-fos and c-jun were detected by immunohistochemistry.

Result: Compared with the model group, the consumption of sugar of the treatment group increased significantly ($P < 0.05$); In the open-field test, the count of horizontal and vertical movement of the treatment group increased significantly ($P < 0.05$); In the water maze test, compared with the model group, learning and memory ability of treatment group improved ($P < 0.05$); the c-fos positive cells grey value of treatment group significantly increased ($P < 0.05$), c-jun positive cells grey value of each group had no significant difference ($P >$

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.10.006

1 天津市环湖医院康复医学科,天津,300350; 2 天津市药品检验所; 3 通讯作者

作者简介:崔立玲,女,硕士,医师; 收稿日期:2016-09-01

0.05).

Conclusion: rTMS can effectively improve depression-like behavior in rats with PSD. This may be related to the expression of c-fos and c-jun in hippocampus.

Author's address Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin, 300350

Key word post stroke depression; repetitive transcranial magnetic stimulation; disease model; animal

卒中后抑郁(post stroke depression, PSD)是卒中后常见的并发症,研究显示患者卒中后 PSD 的发病率为 29%—36%^[1],患者主要表现为兴趣减退、易疲劳、思维迟缓、悲观绝望,甚至出现自杀企图和行为等,直接影响患者的生存质量和功能康复^[2]。经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)是利用一定强度的时变磁场在脑内诱发感应电流,并以此刺激可兴奋组织并影响脑内各种代谢过程和电活动的一种技术^[3],而重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)是在 TMS 基础上发展起来的新的神经电生理技术^[4]。由于其具有无痛、无创伤、操作简单、安全可靠等优点,rTMS 已经越来越多地应用于临床研究,并被美国 FDA 批准用于抑郁症的治疗^[5],但 rTMS 对 PSD 的作用机制目前尚未明确^[6-7]。本研究采用大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)建立局灶脑缺血模型,应用慢性不可预见温和应激法(chronic unpredictable mild stress, CUMS)建立 PSD 大鼠模型,通过检测动物行为学指标评价 rTMS 对 PSD 的治疗效果,采用免疫组化实验计算 c-fos 和 c-jun 阳性细胞灰度值,探索 rTMS 治疗 PSD 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取 SPF 级 SD 大鼠 40 只(雄性,200—220g),由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。动物饲养于屏障环境内,温度 20—26℃,相对湿度 40%—70%,照明 12h 明暗交替,环境噪音<60dB。所有动物有关操作均遵循我院实验动物伦理委员会规定的准则,并被实验动物伦理委员会认可。

将 40 只大鼠按随机数字表法随机分成对照组、假手术组、模型组和治疗组,每组 10 只。对照组和假手术组常规饲养,不进行造模处理;模型组和治疗组采用 MCAO 法和 CUMS 法建立 PSD 大鼠模型;假手术组和治疗组造模后连续 7d 接受 rTMS 治疗。

1.2 主要器材及试剂

Mag Pro30 型经颅磁刺激仪(丹麦 Dantec 公司)、RB-100A 水迷宫测试系统(北京新天地科技有限公司)、兔抗大鼠 c-fos 抗体(美国 SANTA CRUZ 公司)、兔抗大鼠 c-jun 抗体(美国 SANTA CRUZ 公司)、EnVision 二步法试剂盒(丹麦 DAKO 公司)。

1.3 建立大鼠 PSD 模型

采用 MCAO 法建立局灶脑缺血模型^[8]:术前 12h 大鼠禁食不禁水,通过腹腔注射 10%的水合氯醛(250mg/kg)将大鼠麻醉,自胸骨柄至下颌骨间行 1cm 长的正中纵切口,游离左侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,结扎颈总动脉的近心端和颈外动脉的远心端;将线头直径 0.18mm 的大鼠栓线,由颈总动脉插入至大脑中动脉(深度约 12mm),并固定栓线。术中保持 22—25℃,术后注意保温和清洁,自由饮食饮水。

将造模成功的局灶脑缺血模型大鼠给予 21d 孤笼饲养,并采用 CUMS 法建立大鼠 PSD 模型^[9],大鼠每天随机接受以下处理措施:①昼夜节律颠倒;②食物和饮水供应的改变(禁食、禁水);③居住环境的改变(单笼饲养、鼠笼倾斜、潮湿垫料);④短时间内足底电击;⑤强迫游泳;⑥束缚应激;⑦高温环境;⑧噪音干扰;⑨陌生气味;⑩陌生物品(塑料杯、木勺、碎布片等)。

1.4 治疗方法

造模成功后,将清醒状态下的假手术组和治疗组大鼠置于一个长圆形塑料器具中进行固定,头部暴露于 MC125 圆形线圈下,线圈内经 10mm、外径 60mm,最大输出场强 3.7T,线圈中心对准并紧贴大鼠头颈部皮肤,刺激强度 1T、频率 1Hz,连续刺激 5 个序列,每一序列共刺激 25 次,间隔 2min,每天刺激 1 次,连续治疗 7d,每天治疗时间相对固定。模型组大鼠按如上方法进行固定,线圈中心对准并紧贴大鼠头颈部皮肤相同时间,但每次不给予 rTMS 治疗(即假刺激)。

1.5 指标检测

1.5.1 蔗糖水消耗实验:采用蔗糖水消耗实验评估 PSD 大鼠的快感缺失程度^[10],各组大鼠于造模前、治疗后第7天和治疗后第14天进行蔗糖水消耗实验,实验前一天禁食禁水,实验时测定各组大鼠1h内饮用1%蔗糖水的量,实验结束后恢复饮食饮水。

1.5.2 旷野实验:旷野实验检测动物的自主活动以及焦虑样行为^[11],各组大鼠于蔗糖水消耗实验6h后进行旷野实验,所有敞箱长宽均为80cm、高为40cm,内空的立柱体,周壁为黑色,地面用黑线划分为面积相等的25块。实验时记录大鼠穿越地面方块数作为水平活动得分,直立次数作为垂直活动得分。每只动物测定1次,每次3min,室内静音,每次实验后均需将动物粪便清除干净,比较各组得分差异。旷野实验的水平活动反映了大鼠的运动活动性水平;垂直活动的多少则反映其兴趣高低。

1.5.3 水迷宫实验:水迷宫实验是检测动物学习能力和记忆能力的常用方法^[12],于治疗后第14天旷野实验结束后进行水迷宫实验,水迷宫是观察动物空间辨别性学习的装置,由棕黑色塑料板制成,水深22cm,水温24℃左右,分为终点区、A区、B区、C区,终点区有台阶供动物爬出水面。每个区至终点作为一个阶段的训练,每个阶段训练3次。之后记录5min内动物由C区的起点游至终点区的台阶处所需全程时间及进入盲端次数(错误次数),24h后复测。

1.5.4 免疫组化实验:水迷宫实验结束后,腹腔注射10%水合氯醛(250mg/kg)麻醉各组大鼠,打开胸腔并暴露心脏,剪开右心房,用37℃ 100ml肝素化生理盐水经大鼠左心室注入冲洗全身血管,以4%多聚甲醛200ml灌注固定,断头取脑,弃嗅球、小脑和低位脑干,分离大鼠海马,冰盘上将海马固定、脱水、透明、石蜡包埋、切片。

免疫组化实验^[13]步骤:石蜡切片置于67℃烘箱中,烘片2h,脱蜡至水,用pH=7.4的PBS冲洗3次,每次3min;取一定量pH=6.0柠檬酸盐缓冲液,加入微波盒中,微波加热至沸腾,将脱蜡水化后的组织切片置于耐高温塑料切片架上,放入已沸腾的缓冲液中,中档微波处理10min,取出微波盒流水自然冷却,从缓冲液中取出切片,先用蒸馏水冲洗2次,之

后用PBS冲洗2次,每次3min;每张切片加1滴3% H₂O₂,室温下孵育10min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS冲洗3次,每次3min;除去PBS液,每张切片加1滴相应的第一抗体,室温下孵育2h;PBS冲洗3次,每次5min;除去PBS液;每张切片加1滴聚合物增强剂,室温下孵育20min, PBS冲洗3次,每次3min;除去PBS液,每张切片加1滴酶标抗鼠/兔聚合物,室温下孵育30min, PBS冲洗3次,每次5min;除去PBS液,每张切片加1滴新鲜配制的DAB液(二氨基联苯胺),5min后苏木素复染,0.1% HCl分化,自来水冲洗,蓝化,切片经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,晾干后观察,所有切片在Motic光学显微镜下进行观察,并采用Motic Image Advance 3.2软件进行灰度值测定。

1.6 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析。所有统计数据均采用均数±标准差表示,两组以上数据的比较用单因素方差分析或重复测量的方差分析进行比较,两两数据比较前进行方差齐性检验,满足方差齐性则采用LSD检验,方差不齐则采用Dunnett T3检验。

2 结果

2.1 蔗糖水消耗实验

快感缺乏是抑郁症的核心症状,蔗糖水消耗实验是快感缺乏的检测指标。实验结果显示:模型组蔗糖水消耗量逐渐减少,在治疗后第7天和第14天与对照组相比有显著差异($P < 0.05$);治疗组与模型组相比,治疗后第7天蔗糖水消耗量无显著差异($P > 0.05$),治疗后第14天治疗组蔗糖水消耗量增多,差异显著($P < 0.05$);假手术组与对照组相比,治疗后第7天蔗糖水消耗量无显著差异($P > 0.05$),治疗后第14天差异显著($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组蔗糖水消耗量的比较 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	例数	造模前	治疗后第7天	治疗后第14天
对照组	10	20.23±1.12	21.06±0.93 ^②	20.14±1.09 ^②
假手术组	10	19.19±1.15	21.54±1.44 ^②	22.03±0.86 ^{①②}
模型组	10	20.13±1.04	17.92±0.98 ^{①③}	14.79±1.21 ^{①③}
治疗组	10	19.19±1.06	17.44±1.35 ^{①③}	19.58±1.00 ^{②③}

与对照组比较:① $P < 0.05$;与模型组比较:② $P < 0.05$;与假手术组比较:③ $P < 0.05$

2.2 旷野实验

与对照组相比,模型组治疗后第7天和第14天大鼠水平活动得分均显著降低($P < 0.05$),治疗后第7天大鼠垂直得分无显著差异($P > 0.05$),治疗后第14天有显著差异($P < 0.05$);与模型组相比,治疗组治疗后第7天水平活动得分、垂直活动得分均无显著差异($P > 0.05$),治疗后第14天与模型组相比活动能力有显著改善($P < 0.05$);假手术组与对照组相比,治疗后第7天和第14天水平活动得分、垂直活动得分均无显著差异($P > 0.05$)。见表2。

2.3 水迷宫实验

模型组与对照组相比,完成学习和记忆任务所用时间明显延长,差异显著($P < 0.05$);治疗组与模型组相比,完成学习和记忆任务所用时间明显减少,差异显著($P < 0.05$);假手术组与对照组相比,完成学习和记忆任务所用时间均无显著差异($P > 0.05$)。见表3—4。

2.4 免疫组化实验

模型组与对照组相比,c-fos阳性细胞灰度值明显减少,差异显著($P < 0.05$);治疗组与模型组比较,c-fos阳性细胞灰度值明显增多,差异显著($P < 0.05$),但仍低于对照组,差异显著($P < 0.05$);假手术组与对照组相比,c-fos阳性细胞灰度值差异不显著($P > 0.05$);各实验组c-fun阳性细胞灰度值没有明显差异($P > 0.05$)。见表5。

表2 各组旷野实验结果 ($\bar{x} \pm s, \text{分}$)

组别	例数	水平得分		垂直得分	
		治疗后第7天	治疗后第14天	治疗后第7天	治疗后第14天
对照组	10	33.05±2.04 ^②	33.60±3.09 ^②	9.83±3.21	9.24±2.88 ^②
假手术组	10	34.63±3.11 ^②	33.95±2.87 ^②	9.61±3.27	9.15±3.18 ^②
模型组	10	18.66±3.04 ^{①③}	22.02±2.29 ^{①③}	8.31±3.36	5.55±2.02 ^{①③}
治疗组	10	19.75±3.22 ^{①③}	32.76±3.54 ^②	8.94±3.10	9.22±3.04 ^②

与对照组比较:① $P < 0.05$;与模型组比较:② $P < 0.05$;与假手术组比较:③ $P < 0.05$

表3 各组水迷宫实验学习成绩结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间(s)	错误次数
对照组	10	18.64±6.76 ^②	2.40±1.43 ^②
假手术组	10	18.34±2.09 ^②	2.70±1.34 ^②
模型组	10	54.51±6.52 ^{①③}	5.10±1.60 ^{①③}
治疗组	10	43.86±5.56 ^{①②③}	4.60±1.35 ^{①③}

与对照组比较:① $P < 0.05$;与模型组比较:② $P < 0.05$;与假手术组比较:③ $P < 0.05$

表4 各组水迷宫实验记忆成绩结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间(s)	错误次数
对照组	10	28.92±4.14 ^②	3.50±1.18 ^②
假手术组	10	27.52±4.11 ^②	3.70±1.57 ^②
模型组	10	89.64±7.95 ^{①③}	5.20±0.79 ^{①③}
治疗组	10	64.78±4.75 ^{①②③}	6.10±1.29 ^{①③}

与对照组比较:① $P < 0.05$;与模型组比较:② $P < 0.05$;与假手术组比较:③ $P < 0.05$

表5 各组大鼠海马c-fos和c-jun平均灰度值结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	c-fos	c-jun
对照组	10	78.57±2.76 ^②	80.16±5.63
假手术组	10	78.95±4.93 ^②	80.02±5.40
模型组	10	68.08±5.52 ^{①③}	77.46±4.34
治疗组	10	72.68±5.79 ^{①②③}	78.76±4.70

与对照组比较:① $P < 0.05$;与模型组比较:② $P < 0.05$;与假手术组比较:③ $P < 0.05$

3 讨论

PSD是指脑卒中后引发的抑郁症,属于继发性抑郁症的一种,脑卒中模型的建立方法有以下几种^[14-15]:四血管阻断法、大脑中动脉凝闭法、高血压模型自发脑出血法、脑栓塞法等。我们采用大脑中动脉栓塞法建立局灶脑缺血模型,缺血面积大小恒定、偏瘫程度相似、适合继续进行慢性不可预见温和应激法结合孤养法建立抑郁动物模型,而且模型重复性好。

抑郁症模型的建立方法主要有以下几种:应激模型、孤养或分养模型、药理学抑郁模型等。本实验采用慢性不可预见温和应激法建立抑郁动物模型,这种模型能够模拟人们在日常生活中所遇到的困难,其理论依据和人类抑郁症患者中慢性、低水平的应激源促进疾病发生发展的过程更为相似。

近年来,rTMS应用于脑卒中的研究和探讨逐渐增多,不同频率和强度的rTMS能促进脑梗死患者的语言、运动、学习记忆等功能的康复及抑郁情绪的改善^[16-18]。Fitzgerald^[19]的一项研究比较了高频与低频rTMS的疗效,结果显示两种治疗方式对抑郁症的疗效差异不显著,且低频治疗的安全性更高,耐受性更好,患者的依从性也优于高频治疗,研究提出低频rTMS可能是更佳的治疗方式。Kakuda W等^[20]的研究结果同样证明了低频rTMS能够安全有效地改善脑卒中患者手指活动度,提示低频rTMS能够更广泛地应用于脑卒中康复治疗。本实验采用刺激强度为1T、频率为1Hz的低频rTMS对PSD模型大鼠

进行治疗,效果显著,快感水平、活动水平和兴趣水平均有所提高,学习能力和记忆能力也有所改善。同时本实验通过对比正常大鼠与进行rTMS治疗的假手术组大鼠,结果发现两组大鼠行为学指标及海马c-fos、c-jun蛋白表达无明显差异,进一步证明低频rTMS的安全性。

c-fos和c-jun蛋白是即刻早期表达基因c-fos和c-jun编码产生的一种核蛋白,作为信号传导系统的第三信使,通过改变基因表达将细胞外刺激所致的细胞内短时信号与长期反应结合起来,通过激活神经递质受体调节c-fos的表达而减轻抑郁症状。研究表明^[21],抑郁行为大鼠脑内c-fos蛋白免疫阳性神经元数目增加均位于情感活动关系密切的海马区。因此,通过上调海马区c-fos和c-jun蛋白的表达,可达到治疗PSD的目的。c-fos和c-jun基因在正常情况下表达量水平较低,在外来因素刺激下,c-fos和c-jun mRNA可短暂地在胞质内积累,并翻译出相应的蛋白质c-fos、c-jun,经过广泛地修饰加工后跨核膜进入细胞核内,二者构成异源二聚体或同源二聚,把基因上调区转录激活蛋白1(activator protein 1, AP-1)结合位点相结合后影响靶基因表达^[22]。c-fos早期在脑中参与神经元信号的整合、转导、分析与凋亡,与神经功能、学习记忆相关,其表达可能直接参与了神经元的分化、生长及神经突触的可塑性变化等过程。神经元c-fos适度表达,能促进损伤神经元的再生,若过度表达,则加重神经元的损伤并阻止其修复与再生。本实验发现,低频rTMS治疗PSD大鼠海马c-fos阳性细胞灰度值明显高于模型组($P < 0.05$),治疗组海马c-fun阳性细胞灰度值高于模型组,但差异不显著($P > 0.05$)。结果表明,rTMS能够有效改善PSD模型大鼠的抑郁样行为,其机制可能与海马c-fos、c-jun蛋白的表达有关,进而影响细胞增殖,但其增殖机制有待进一步探索。

综上所述,通过MCAO法结合CUMS法建立的PSD模型大鼠,重复性好、稳定性强;rTMS对PSD有很好的治疗效果,其治疗机制可能与c-fos、c-jun蛋白的表达有关。

参考文献

[1] Yuan HW, Wang CX, Zhang N, et al. Poststroke depression

- and risk of recurrent stroke at 1 year in a Chinese cohort study[J]. Plos One, 2012, 7(10):e46906.
- [2] Rodgers M, Asaria M, Walker S, et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of low-intensity psychological interventions for the secondary prevention of relapse after depression: a systematic review[J]. Health Technol Assess, 2012, 16(28):1—130.
- [3] Tarapore PE. Cortical Mapping with Transcranial Magnetic Stimulation[M]. Functional Mapping of the Cerebral Cortex, 2016:141—157.
- [4] Schutter DJ, van Honk J. A framework for targeting alternative brain regions with repetitive transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression[J]. J Psychiatry Neurosci, 2005, 30(2):91—97.
- [5] Padberg F, George MS. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the prefrontal cortex in depression[J]. Exp Neurol, 2009, 219(1):2—13.
- [6] McIntyre A, Thompson S, Burhan A, et al. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Depression Due to Cerebrovascular Disease: A Systematic Review[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2016, 25(12):2792—2800.
- [7] Thompson SR, McIntyre A, Mehta S, et al. Treatment of vascular depression and post stroke depression using repetitive transcranial magnetic stimulation: systematic review[J]. Archives of Physical Medicine & Rehabilitation, 2015, 96(10): e118—e118.
- [8] Zhang S, Yao Y, Shi J, et al. The temporal evolution of diffusional kurtosis imaging in an experimental middle cerebral artery occlusion (MCAO) model[J]. Magn Reson Imaging, 2016, 34(7):889—895.
- [9] Su Q, Cheng Y, Jin K, et al. Estrogen therapy increases BDNF expression and improves post-stroke depression in ovariectomy-treated rats[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3): 1843—1848.
- [10] Wang S, Sun H, Liu S, et al. Role of hypothalamic cannabinoid receptors in post-stroke depression in rats[J]. Brain Res Bull, 2016, (121):91—97.
- [11] Wu C, Zhang J, Chen Y. Study on the behavioral changes of a post-stroke depression rat model[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(1):159—163.
- [12] Feng SF, Shi TY, Fan Y, et al. Long-lasting effects of chronic rTMS to treat chronic rodent model of depression [J]. Behavioural Brain Research, 2012, 232(1):245—251.
- [13] Li DQ, Li XJ, Duan JF, et al. Effects of Wuling Capsule on Hippocampal-dependent Cognitive Changes in Post-stroke Depression Rats[J]. International Journal of Pharmacology, 2011, 7(1):50—57.

(下转第1134页)