论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1317-03

细胞因子受体在抑郁模型大鼠电休克治疗中的表达

高新学,况 利,李大奇,艾 明
(重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察细胞因子受体对抑郁模型大鼠海马神经元及胶质细胞再生中的作用。方法:采用慢性轻度不可预见性的应激建立大鼠抑郁模型,对模型大鼠行电休克(Electric convulsive therapy,ECT)及丙泊酚无抽搐电休克(Modified electric convulsive therapy,MECT)疗法,旷场分析进行行为学观察,免疫荧光方法观察神经元和胶质细胞上细胞因子受体的表达情况。结果:应激+ECT组、应激+MECT组与应激+假电击组比较,旷场分析、免疫荧光实验均有显著差异。结论:MECT治疗和ECT治疗能促进抑郁模型大鼠海马神经元及胶质细胞上细胞因子受体表达的改变,细胞因子可能参与抑郁症的病理机制,MECT治疗疗效可能较ECT治疗为优。

【关键词】抑郁症;海马;电休克;细胞因子受体
【中国图书分类法分类号】R749 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-22

Effessian of cytokine receptor in depressive rats treated electroshock therapy

GAO Xin-xue, et al
(*Center of Mental Health, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To observe the expression of cytokine receptor in neuron and astrocyte of the hippocampus of rats in depression. *Methods*:The depression model was produced by separation and un-predicted mild stressors. The behavior was measured by open-field test.The rats acceived electric convulsive therapy(ECT) or modified electric convulsive therapy (MECT) treatment. The expression of cytokine receptor in neuron and astrocyte of the hippocampus was observed by the immunofluorescence detection technique. *Results*:There were significant differences among the stress and ECT group ,the stress and MECT group and the stress and shame-electroshock group in the two test. *Conclusion*:Both the ECT and the MECT treatment can promote the expression of cytokine receptor in neuron and astrocyte of the hippocampus of rats in depression. The cytokine(CK)may play an important role in the pathophysiological mechanism of depression. And the MECT treatment may be more effective than the ECT treatment.

【Key words】 Depression;Hippocampus;Electroshock;Cytokine receptor

近年来,无抽搐电休克治疗抑郁症在临床上应用越来越广泛。然而其作用机制仍然很不明朗。细胞因子(CK)是一类主要由激活免疫细胞分泌的小分子蛋白质或多肽,在机体内具有重要的生物学活性。神经系统、内分泌系统和免疫系统之间存在着双向联系,建立了神经-内分泌-免疫这一分支学科,细胞因子则是三大系统之间的信息交流的重要物质。IL-2、IL-6、IFN-γ等作为细胞因子家族中不可或缺的成员,亦在神经精神疾患中扮演重要的角色。基于以上原因,本实验试以细胞因子为切入点,从形态学角度观察抑郁模型大鼠经无抽搐电休克治疗后,海马及齿状回神经元和胶质细胞的变化情况,对细胞因子在无抽搐电休克治疗抑郁症中的作用进行探讨。

作者介绍:高新学(1978-),男,硕士,
研究方向:抑郁与自杀的生物学机制。
通讯作者:况 利,女,教授,E-mail:kuangli0308@163.com。
基金项目:重庆市科委资助项目(渝科发计字[2004]54号)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年雄性SD大鼠40只,购置于第三军医大学实验动物中心,体质量(200±20) g。

1.1.2 试剂 兔抗鼠IL-2R、IL-6Rα、兔抗鼠IFN-γR多克隆抗体、SABC荧光显色试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及模型建立 大鼠购置后先熟悉饲养环境1

周,每天人工触摸2 min。1周后随机分为对照组、应激组、应激+假电击组、应激+电休克(Electric convulsive therapy, ECT)组、应激+丙泊酚无抽搐电休克(Modified electric convulsive therapy, MECT)组,每组8只。行旷场分析试验。结束后对照组即取标本,余32只单笼饲养,行21 d慢性不可预见性中等强度应激处理。具体应激为:禁食48 h,禁饮24 h,冰水游泳(4℃、5 min),热水游泳(45℃、5 min),电击足底(1 mA、45 V,每隔1 min刺激1次,每次刺激10 s,共30 min),夹尾1 min,摇晃(1 次/min、持续15 min)。实验过程中每种刺激至少给予2次,每天随机给予1种刺激。第22 d行旷场分析试验,试验后应激组即取标本,应激+假电击组行假电击实验,应激+电休克组行ECT治疗,应激+无抽搐电休克组行MECT治疗,10 d后行旷场分析试验,结束后全部取标本。

1.2.2 旷场分析试验(Open-field test) 旷场分析箱(80 cm×80 cm×40 cm)周壁为黑色,底面为面积相等的25块方格,将大鼠放入中央格,观察3 min活动情况。主要观察指标为中央停格时间、穿越格子数、站立次数、粪便粒数。

1.2.3 假电击实验、ECT治疗及MECT治疗 ECT治疗是把大鼠置于有新鲜垫料的塑料笼子里,经由有湿垫层的双耳夹电极施行,脉冲频率为100次/s,发作期5 s,电流强度60 mA。这可引起连贯的全身性的癫痫大发作,表现为特征性的阵挛或强直性痉挛。应激+ECT组所有大鼠每天接受此种治疗1次,历时10 d。假电击实验是把大鼠置于有新鲜垫料的塑料笼子里,经由有湿垫层的双耳夹电极,却并不行电击,与ECT组同时进行,历时十天。MECT治疗是先经鼠尾静脉静注阿托品0.3 mg,然后缓慢静注丙泊酚0.5 mg/kg,最后给予琥珀胆碱0.2 mg/kg,待四肢肌群阵颤全部消失后,与ECT组同法行电刺激,表现为面部和头颈部的细微阵颤,治疗时间同ECT组。

1.2.4 取材 麻醉动物,经左心室-主动脉插管,先用100 ml生理盐水快速灌注冲洗,待流出液体颜色变淡时,用400 ml 4%多聚甲醛PBS液,先快后慢,共需约40~60 min,至大鼠四肢抽搐、阵颤时,小心开颅取脑并修块,置于4%多聚甲醛溶液中固定48 h。梯度酒精脱水、透明、石蜡包埋、冠状切片、片厚约7 μm。

1.2.5 免疫荧光 切片脱蜡至水,用枸橼酸钠缓冲液微波加热至烧杯底部产生小气泡(约95℃)行抗原修复5 min。室温下冷却后,滴加1:10稀释的正常山羊血清封闭液,室温孵育20 min,甩去多余液,滴加1:100稀释的兔抗鼠抗体,4℃冰箱18 h,PBS液冲洗后,滴加1:100稀释的生物素化山羊抗兔二抗,37℃水浴30 min。PBS液冲洗后,滴加1:100稀释的SABC-FITC,37℃避光水浴30 min,水溶性封剂封片,荧光显微镜下观察,细胞膜上有黄绿色荧光为阳性结果,并利用激光共聚焦显微镜配备的生物软件包测量荧光强度。

1.2.6 图像分析 采用激光共聚焦显微镜及图像分析系统,对免疫荧光结果进行分析。测量平均荧光强度。每只动物取5张切片,每张切片测双侧海马CA1区、CA3区、齿状回(DG区)阳性细胞内的平均荧光强度值作为该动物的值。

1.3 统计学处理

实验所有数据以$\bar{x}\pm s$表示,数据采用方差分析作统计学处理,检验标准采用$\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 旷场分析结果

旷场分析结果表明,应激后表现出明显的抑郁状态,活动能力下降、兴趣丧失,中央停格时间、穿越格子数、站立次数及粪便粒数都比应激前明显减少,有显著差异($P<0.01$),说明21 d慢性不可预见性应激成功,抑郁大鼠模型建立。应激+ECT组的中央停格时间、穿越格子数、站立次数与应激+假电击组比较有显著差异($P<0.05$),应激+MECT组的中央停格时间、穿越格子数与应激+假电击组比较有显著差异($P<0.05$)。应激+ECT组与应激+MECT组各指标无统计学差异。

2.2 激光共聚焦显微镜观察结果

激光共聚焦显微镜在495 nm波长下激发FITC,在525 nm波长下可见黄绿色荧光。在不同的处理组均有不同程度的细胞因子受体的表达,表达量有明显的异质性。主要分布于细胞膜和膜内部分。除应激组与假电击组;对照组与MECT组外,两两相比差均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

经典理论认为,中枢神经系统是所谓的"免疫

表 1 细胞因子受体在抑郁模型大鼠电休克治疗中表达的旷场分析结果($\bar{x}\pm s$)

组别(n)	中央停格时间	穿越格子数	站立次数	粪便粒数
对照组(8)	2.5±0.7	45.1±10.2	27.4±5.5	4.3±1.9
应激组(8)	6.1±2.5**	26.3±8.6**	12.5±3.9**	7.1±2.5**
应激组+假电击(8)	5.6±1.7	28.1±8.8	12.9±3.8	6.4±2.5
应激+ECT 组(8)	4.2±1.4△	36.8±8.9△	18.4±5.2△	4.9±3.1
应激+MECT 组(8)	4.0±1.5△	37.6±7.5△	19.4±4.9△△	5.1±2.5

**与应激前比较 $P<0.01$;△与应激+假电击组比较 $P<0.05$;△△与应激+假电击组比较 $P<0.01$

表 2 细胞因子受体在抑郁模型大鼠电休克治疗中表达的各组免疫荧光强度($\bar{x}\pm s$)

组别(n)	IL-2R 荧光强度	IL-6Rα 荧光强度	IFN-γR 荧光强度
对照组(8)	69.9±1.3$^{\triangle}$	59.5±1.0$^{\triangle}$	29.9±1.4$^{\triangle}$
应激组(8)	18.2±1.6	15.1±1.0	56.0±1.0
假电击组(8)	15.0±1.2	13.3±1.2	56.3±1.5
ECT 组(8)	53.1±1.5$^{\triangle\triangle}$	52.2±1.7$^{\triangle\triangle}$	36.5±1.1$^{\triangle\triangle}$
MECT 组(8)	65.5±1.0$^{\triangle\triangle *}$	63.0±1.3$^{\triangle\triangle *}$	24.6±1.3$^{\triangle\triangle *}$

注:$^{\triangle}$与应激组及假电击组比较 $P<0.05$;$^{\triangle\triangle}$与应激组及假电击组比较 $P<0.01$;*与 ECT 组比较 $P<0.05$

豁免区”。然而,新近的研究发现,免疫反应不仅发生于中枢神经系统,并且参与中枢神经系统疾患的发展和转归机制之中。这其中也包括抑郁症的相关研究进展。业已证明,各种神经细胞包括神经元和胶质细胞均可合成和分泌细胞因子,其中以活化的星形胶质细胞为主。而星形胶质细胞在中枢神经系统中起着十分重要的作用,如调节神经元的离子和代谢产物、转运神经递质、参与损伤修复。IL-2、IL-6和IFN-γ是细胞因子家族中的重要成员。IL-2、IL-6可产生神经营养和神经保护作用:在应激环境下,其表达有显著提高。在人胎大脑神经细胞原代培养模型中,IL-2和IL-6促进细胞存活、生长和分化[1]。同时许多资料显示,中枢神经系统中IL-6的作用决定于活化的星形胶质细胞,IL-6还可反过来刺激星形胶质细胞和神经元的增生[2]。另外,IL-2和IL-6可使海马内的5-HT和DA神经元活动增加[3]。Kubera等[4](2000年)发现将西酞普兰和氟西汀的疗程延长四周可明显诱导IL-2和IL-6的产生。IFN-γ主要产生于T细胞和NK细胞,并能增强两者杀伤靶细胞的能力,还可诱导细胞表达IL-2受体,进而促进T细胞增殖,再扩大免疫反应,几乎所有有核细胞都表达其受体[5]。免疫反应时,MHCI类和Ⅱ类抗原分子起着重要作用。星形胶质细胞,少突胶质细胞,小胶质细胞及神经元,只有轻度表达Ⅰ类抗原分子,而IFN-γ可显著增加上述细胞表达MHCI类抗原分子,IFN-γ还能诱导星形胶质细胞亚群和小胶质细胞表达Ⅱ类抗原分子。Ⅰ类抗原分子和细胞毒T细胞与识别抗原有关,Ⅱ类抗原分子通常同辅佐细胞提呈抗原给T细胞相关系。藉此,IFN-γ被认为在中枢神经系统局部免疫反应中起到重要作用。

本实验采用单笼饲养与CUMS建立抑郁模型,应激后大鼠呈明显的活动能力下降、兴趣丧失、快感缺失,抑郁动物模型可靠[6]。旷场分析实验显示两种电休克治疗较应激+假电击组有显著改善。本实验免疫荧光结果表明,抑郁模型大鼠经电休克治疗后,海马神经元和胶质细胞中IL-2R、IL-6Rα和IFN-γR表达较对照组变化明显,具有统计学意义。这些更进一步证明,IL-2、IL-6和IFN-γ在抑郁症状的改善转归过程中的作用。

IL-6与其受体结合→受体再与gp130形成高亲和力受体(gp130是一种普遍存在于细胞膜表面的蛋白)→gp130二聚体→Jak激酶活化→STAT蛋白活化,形成二聚体→进入核内调节靶基因的表达。另外,IL-2可活化其他早期基因(如jun B、c-jun、jun-D、TIS11、NF-IL6βh、CEBPδ等)的表达,间接调节其他靶基因,促进细胞增殖。此外,IFN-γ能诱导蛋白激酶C转移到细胞膜上,还可诱导活化磷脂酶D,再激活蛋白激酶C;而蛋白激酶C是多种胞内信号传导所必须的。

以上这些可能都是IL-2、IL-6和IFN-γ介导抑郁症转归的深层机制。

另外,实验结果显示,MECT治疗组IL-2R和IL-6Rα荧光强度均较ECT治疗组高,IFN-γR荧光强度均较ECT治疗组低,且有统计学意义,结果显示,MECT治疗组IL-6Rα荧光强度和原位杂交表达率均较ECT治疗组高,且有统计学意义。其原因可能是:行ECT时,全身肌肉痉挛,这种强烈的刺激可能引起机体的炎症反应,进而产生大量的CK,这些CK与其受体结合,再介导各种细胞内的信号传导。而行MECT时,我们应用了丙泊酚。丙泊酚具有良好的脑保护作用[7],它明显抑制海马CA1区锥体细胞凋亡,对谷氨酸盐诱导的鼠脑皮质和海马区HT-2神经元凋亡亦有良好抑制作用。另一方面,MECT只引起部分肌肉的阵颤,而非全身肌肉的强烈痉挛,可能大幅减少了CK的释放。这可能是两种电休克治疗在中枢神经系统中的作用机制。

实验表明,某些细胞因子的确在抑郁症的病理生理及治疗中起一定作用。试想我们若能进一步在分子水平揭开细胞因子在神经元和胶质细胞信号传导中的具体机制,势必为抑郁症发病机制、治疗

论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1320-03

复元胶囊对气虚血瘀患者症状、血液流变学及心功能的影响

王晓霞,胡文兴,李荣亨
(重庆医科大学附属第一医院中西医结合科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨中成药新药复元胶囊对气虚血瘀证患者症状、血液流变学及心功能的影响。方法:40例气虚血瘀证患者分为治疗组和对照组各20例,在对基础疾病的治疗上,对照组加用心血康胶囊2粒,1日3次;治疗组加用复元胶囊5粒,1日3次,疗程8周,分别观察处理前后患者的症状、血液流变学指标及心功能指标。结果:治疗组在治疗后症状、血液流变学指标及心功能指标较对照组均有显著改善($P<0.05$或$P<0.01$)。结论:复元胶囊对气虚血瘀证患者症状、血液流变学及心功能有改善作用。

【关键词】复元胶囊;气虚血瘀;血液流变学;心功能
【中国图书分类法分类号】R969.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-05

Effect of fuyuan capsule on symptoms, heart function and hemorheology in patients with qi deficiency and blood stasis

WANG Wan-xia, et al
(*Department of Integration of Traditional and Western Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To explore the influence of fuyuan capsule treatment on patients with qi deficiency and blood stasis. *Methods*:40 cases with qi deficiency and blood stasis were divided into two groups, the fuyuan capsule group and the control group. Besides basic diseases were treated in two groups, the patients in control group were treated with xinxuekang capsule, while patients in fuyuan capsule group were treated with fuyuan capsule instead of xinxuekang capsule. Scores of symptom and indexes of Hemorheology and heart function were tested after 8 weeks.The data were compared with those of pretherapy. *Results*:Scores of symptom and indexes of Hemorheology in the fuyuan capsule group were significantly lower than those in the control group($P<0.05$ or $P<0.01$);indexes of heart function were significantly higher than that of control group($P<0.05$ or $P<0.01$). *Conclusion*:Fuyuan capsule treatment can lessen symptom of patients with qi deficiency and blood stasis, reduce blood viscosity, and enhance heart function.

【Key words】 Fuyuan capsule;Qi deficiency;Blood stasis;Heart function

作者介绍:王晓霞(1982-),女,硕士,
研究方向:肾病及风湿免疫、老年病。
通讯作者:李荣亨,男,教授,E-mail:Lrongheng1231@163.com。
基金项目:重庆市中管局课题(2005-B-18)。

中医学认为,百病皆伤气血。老年人因生机渐减,常伴气虚,气为血帅,血为气母,气行则血行,气滞则血瘀,因此气虚血瘀为老年病的常见病因,常常引起中风、冠心病等。给家庭和社会带来巨大的经济负

方法带来新的契机。

参 考 文 献

[1] 李兰英,魏 佼,尹学茜,等.IL-6、IL-2、TNF-α对人胎大脑神经细胞体外生长的影响[J]. 中国免疫学杂志,2001,17(11):604-607.
[2] Van Wagoner NJ,Benveniste EN. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes[J]. Journal of Neuroimmunology,1999,10(2):124-139.
[3] 陈 群,罗小年.抑郁症病人细胞因子的产生与治疗反应[J]. 国外医学精神病学分册,2002,29(3):147-150.
[4] Kubera M,Simbirtsev A,Mathison R,et al.Effects of repeated fluoxetine and citalopram administration on cytokine release in C57BL/6 mice[J]. Psychiatry Research,2000,96(3):255-266.
[5] 孙卫民,王惠琴.细胞因子研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1999.569-574.
[6] 许 晶,李晓铁.慢性应激抑郁模型的建立及评价[J]. 中国行为医学科学,2003,12(1):14-16.
[7] 秦晓辉,米卫东,张 宏,等.异丙酚对神经元缺氧损伤的保护及其作用机制[J]. 中国药理学通报,2003,19(9):1024-1072.

(责任编辑:关蕴良)