

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.21.015

针刺印堂百会风池肾俞穴组对慢性应激模型大鼠海马脑源性神经营养因子基因表达的影响

史榕苒, 李辉, 刘乃刚, 于战歌[□], 唐学章^{*}

(中日友好医院, 北京市朝阳区樱花东路 2 号, 100029)

摘要 目的 探讨针刺印堂百会风池肾俞穴组治疗抑郁症的可能作用机制。方法 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、针刺组、西药组, 每组 10 只。正常组大鼠正常饲养, 其余各组大鼠孤养并进行 28 天的不可预见的慢性应激刺激建立慢性应激性大鼠模型。造模同时模型组每日予 2 ml 生理盐水灌胃; 针刺组选用印堂、百会、风池(双侧)、肾俞(双侧)进行针刺治疗, 每次 30 min, 每日 1 次; 西药组给予氟西汀胶囊 0.18 mg/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次, 各组均灌胃 28 天; 正常组正常饲养不灌胃。检测各组大鼠海马脑源性神经营养因子(BDNF)、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB) mRNA 含量及海马 BDNF I-47 位点、BDNF I-17 CpG6 位点基因甲基化水平。结果 与正常组比较, 模型组大鼠海马 CREB、BDNF mRNA 含量水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 针刺组和西药组较模型组大鼠海马 CREB、BDNF mRNA 含量增加($P < 0.05$)。各组大鼠 BDNF I-47 位点甲基化水平未出现明显差异($P > 0.05$), 在 BDNF I-47 CpG6 位点上模型组大鼠甲基化水平明显低于正常组($P < 0.05$), 其他各组未出现明显差异。结论 针刺印堂百会风池肾俞穴组可有效增加慢性应激模型大鼠海马内 CREB、BDNF mRNA 水平, 可能是其抗抑郁机制之一。

关键词 抑郁症; 针刺; 印堂百会风池肾俞穴组; 脑源性神经营养因子; 环磷酸腺苷效应元件结合蛋白; 基因甲基化

抑郁症是精神科常见病、多发病, 其发病以显著而持久的心境低落为主要症状, 属于心境障碍的一种^[1], 抑郁症的发病受遗传影响, 在环境与基因的交互作用下发病^[2]。中医学针刺疗法治疗抑郁症不仅可有效缓解抑郁症状, 而且跟抗抑郁药比较, 具有起效迅速、无毒副作用等特点, 成为抗抑郁治疗中的重要组成部分^[3]。我们临床采用针刺印堂百会风池肾俞穴组治疗抑郁症疗效肯定^[4]。脑源性神经营养因子(BDNF)是神经营养因子家族的重要一员, 在中枢神经系统中表达广泛, 其神经级联信号通路联 cAMP-CREB-BDNF-TrkB 被称为“神经营养信号通路”, 是脑细胞维持可塑性、保持营养、维持功能活动的重要信号通路^[5]。已有研究表明, 神经营养信号通路损害, 抑郁症患者海马脑区 BDNF 含量明显降低^[6]。部分学者发现 BDNF 在抑郁症患者血清里亦存在低表达现象, 而这种情况在经过抗抑郁治疗后会得到明显改善^[7]。

因此, BDNF 有可能成为抑郁症潜在的参考指标。本研究观察针刺印堂百会风池肾俞穴组对慢性应激模型大鼠神经营养信号通路的影响及 BDNF 基因甲基化表达的影响, 探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性清洁级 SD 大鼠 40 只, 体重(200 ± 20 g), 实验动物许可证号: SCXK(京)2004-2007, 由北京华阜康生物医学有限公司提供。实验前于温度(23 ± 1)℃、湿度 55% ~ 60% 动物饲养室适应性喂养 7 天。

1.2 药品与试剂

氟西汀胶囊(美国礼来公司, 批号: 104041); Trizol 提取总 RNA 试剂(Invitrogen 公司, 批号: T1503); 逆转录-聚合酶链反应试剂盒(批号: CW0581)、Access RT-PCR system(批号: CW0744)、DNAMarker(批号: CW2090)、Power SYBR Green PCR Master Mix(批号: CW0957)均为 CWbiotech 公司产品; 环磷酸腺苷效应元件结合蛋

基金项目: 国家自然科学基金(81202766)

* 通讯作者: tangxuezhang@126.com, 13901017751

白 (CREB)、BDNF、 β -actin 引物,由上海英骏生物技术有限公司合成,引物设计如下: CREB: 上游 5'-ACCAGCAGACTGGAGATGCT-3', 下游 5'-TACAGTGGAGCAGATGACG-3'; BDNF: 上游 5'-AGCTGAGCGTGTGTGACAGT-3', 下游 5'-ACCCATGGGATTACACTTGG-3'; β -actin: 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3', 5'-TTTAATGTACGCACGATTTTC-3'。

1.3 主要仪器

DYY-III-8B 型稳压稳流型电泳仪,北京市六一仪器厂; 5810R 型高速低温离心机,德国 Eppendorf 公司; GeneQuant 型核酸定量仪,英国 Pharmacia Biotech 公司; 凝胶扫描成像分析仪, Kodak 公司; Chromo 4 型实时 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司; ABI PRISM 377 DNA Sequencer、3100 DNA Sequencer, 爱普拜斯应用生物系统上海有限公司。

1.4 动物分组及模型制备

将 40 只大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、针刺组、西药组,每组 10 只。正常组大鼠正常饲养,自由进食水。其余各组大鼠参考文献

[6] 方法建立慢性应激性大鼠模型,大鼠均单笼饲养,并进行 28 天的慢性轻度不可预见性应激刺激: 每 7 天随机使用 1 次夹尾 (每次 15s, 每次 3 min)、冰水游泳 (4℃, 3 min)、束缚 (每次 4h)、潮湿环境 (24h)、昼夜颠倒、断食 (24h)、断水 (24h)。

1.5 干预方法

模型组每日造模前 1h 予 2 ml 生理盐水灌胃; 针刺组于造模前 1h 选用印堂、百会、风池 (双侧)、肾俞 (双侧), 穴位选择参照大鼠穴位图谱 [6]。采用 30 号 1 寸毫针 (华佗牌针灸针, 苏州医疗用品厂有限公司) 进行针刺: 百会穴针尖向后头部, 印堂穴针尖向鼻尖方向, 均平刺; 风池穴、肾俞穴直刺, 进针深度为 0.5 ~ 1 cm, 每次 30 min, 每日 1 次; 西药组于造模前 1h 给予氟西汀胶囊 0.18 mg/ (kg · d) 灌胃, 每日 1 次。正常组正常饲养不灌胃, 其余各组均灌胃 28 天。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 海马 CREB、BDNF mRNA 表达 实验结束, 大鼠断头于冰皿上快速剥离海马, 用生理盐水洗净, 立即放入清洁的 5 ml 塑料离心管中, 置于 -85℃ 冰箱中备用。采用实时荧光定量 PCR 法检测 CREB、BDNF mRNA 表达, 实验操作按产品说明书进行, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据的相对定量分析。

1.6.2 海马 BDNF 基因表观遗传学表达 选取 BDNF 全基因序列中 BDNF I 启动子区的 17CpG 岛进行基因甲基化观察。采用 MSP 法测定大鼠海马 BDNF I -17 及 BDNF I -17CpG6 位点甲基化改变, 稀释引物至终浓度 10 μ M, 通过 OD 检测及凝胶电泳检测 DNA 浓度及纯度, NaHSO₃ 处理待检测 DNA 样品, 送北京博森生物技术有限公司测序分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计软件进行统计学处理, 符合正态分布且方差齐的计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马 CREB、BDNF mRNA 表达比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠海马 CREB 及 BDNF mRNA 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 针刺组和西药组大鼠海马 CREB 及 BDNF mRNA 水平有所升高 ($P < 0.05$); 而针刺组和西药组组间比较, CREB 及 BDNF mRNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠海马 CREB、BDNF mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CREB	BDNF
正常组	10	1.155 $\pm$ 0.644	1.005 $\pm$ 0.506
模型组	10	0.585 $\pm$ 0.425*	0.420 $\pm$ 0.310**
针刺组	10	0.923 $\pm$ 0.310 $^{\Delta}$	0.790 $\pm$ 0.375 $^{\Delta}$
西药组	10	0.996 $\pm$ 0.353 $^{\Delta}$	0.827 $\pm$ 0.419 $^{\Delta}$

注: CREB, 环磷酸腺苷效应元件结合蛋白; BDNF, 脑源性神经生长因子; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠海马 BDNF I -17 CpG 启动子区甲基化水平比较

表 2 示, 各组大鼠 BDNF I -17 位点甲基化水平未出现明显差异 ($P > 0.05$); 但在 BDNF I -17 CpG6 位点上模型组大鼠甲基化水平明显低于正常组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而针刺组和西药组未出现明显差异 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠海马 BDNF I -17 CpG 启动子区甲基化水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BDNF I -17	BDNF I -17 CpG6
正常组	10	0.056 $\pm$ 0.030	0.052 $\pm$ 0.030
模型组	10	0.049 $\pm$ 0.021	0.027 $\pm$ 0.015*
针刺组	10	0.046 $\pm$ 0.026	0.045 $\pm$ 0.028
西药组	10	0.056 $\pm$ 0.030	0.046 $\pm$ 0.030

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

抑郁症属于中医学情志病范畴,目前临床以症状为依据,参照郁证、脏燥、癲狂病、梅核气等疾病对抑郁症加以治疗。中医学认为,“脑为元神之府”,主管人体的神经功能活动,在内外环境刺激下,七情内伤损伤脑的功能是情志病发病的基础,情志刺激日久,郁结内生,引发精神、脏腑出现动态整体性损伤而发病,各种抗抑郁治疗的终极目标都是恢复大脑调控情绪的功能。本研究中百会、印堂位于督脉,起到通督调神醒脑的功效;风池穴有醒脑开窍、疏风清热、明目益聪、平肝熄风的作用;肾俞穴补肾益气,起到通督助阳、益髓宁神的作用。

机体处于抑郁状态时,脑内 BDNF 的功能下降,含量降低,有学者提出尝试将血液中 BDNF 基因甲基化水平作为判断抑郁程度及抗抑郁疗效水平的衡量标准,BDNF 水平可能成为潜在的抑郁症生物学标记物^[10-11]。慢性应激可显著抑制海马 BDNF I、BDNF IV 外显子转录表达,人类 BDNF I 甲基化程度与抑郁的发病与治疗均存在明显的关系,BDNF I 甲基化图谱有可能成为抑郁症诊疗的有效参照^[12]。CREB 是 BDNF 重要的转录调节因子,CREB 磷酸化后启动 BDNF 因子的转录,增加 CREB 表达的干预方法可以改善脑内 BDNF 含量下降的病理损伤,起到抗抑郁作用,部分研究认为 CREB 可能是根据不同机制研发出抗抑郁药的共同受体后靶点^[13]。我们前期研究结果显示,针刺大鼠印堂百会风池肾俞的组合,可以有效减轻 HPA 轴亢进情况,增加大鼠血清 BDNF 因子含量,对脑神经元活性起保护作用,起到了纠正大鼠异常行为的功效^[14]。

本研究结果显示,针刺组在增加海马 CREB mRNA 表达的同时,也增加了 BDNF mRNA 表达,这可能与针刺激活了神经营养信号通路有关,说明针刺该组穴可有效增加海马内 BDNF 水平,从而逆转和阻断神经细胞萎缩凋亡,起到抗抑郁作用。鉴于实验时间和条件的限制,此次研究中我们仅选择了 BDNF I 启动子区的 17CpG 岛进行基因甲基化的观察,但并未发现各组间 BDNF I -17 甲基化出现明显差异性改变。但是通过对 17CpG 岛的甲基化观察发现,模型大鼠在 17CpG6 岛上出现了降低表现,而在其他各组间未出现明显差异,这可能与选择样本甲基化观测数量过少和实验周期不足有

关,而针对我们发现的 BDNF 基因启动子区位点甲基化差异的改变,需要进一步更加细化和深入的研究。

参考文献

- [1] 李凌江,马辛. 中国抑郁障碍防治指南 [M]. 2 版. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2015: 1-2.
- [2] 党永生,李胜斌,孙中生. 重性抑郁障碍发病的表观遗传调控假说 [J]. 遗传, 2008, 30(6): 665-670.
- [3] 罗和春. 电针治疗抑郁症临床观察与实验研究 [J]. 北京医科大学学报, 1987, 19(1): 45-47.
- [4] 史榕苒,唐学章,李辉,等. 颈夹脊、腰夹脊加头针为主穴电针治疗抑郁症 38 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2013, 54(15): 1291-1294.
- [5] CASTREN E, RANTAMAKI T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: re-activation of developmental plasticity [J]. Dev Neurobiol, 2010, 70(5): 289-297.
- [6] ROTH TL, ZOLADZ PR, SWEATT JD, et al. Epigenetic modification of hippocampal BDNF DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder [J]. J Psychiatr Res, 2011, 45(7): 919-926.
- [7] BOSKER FJ, TERPSTRA P, GLADKEVICH AV, et al. Changes in winter depression phenotype correlate with white blood cell gene expression profiles: a combined meta-gene and gene ontology approach [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2014, 58: 8-14. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.10.015.
- [8] 韩焱晶,李文迅,贾宝辉,等. 电针对抑郁模型大鼠海马脑源性神经营养因子基因表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(9): 1004-1007.
- [9] 华兴邦,李辞蓉,周浩良,等. 大鼠穴位图谱的研制 [J]. 实验动物与动物实验, 1991(1): 1-3.
- [10] FUCHIKAMI M, MORINOBU S, SEGAWA M, et al. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potential diagnostic biomarker in major depression [J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23881.
- [11] AUTRY AE, MONTEGGIA LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders [J]. Pharmacol Rev, 2012, 64(2): 238-258.
- [12] BRUNONI AR, BAEKEN C, MACHADO-VIEIRA R, et al. BDNF blood levels after electroconvulsive therapy in patients with mood disorders: a systematic review and meta-analysis [J]. World J Biol Psychiatry, 2014, 15(5): 411-418.
- [13] JI Y, PANG PT, FENG L, et al. Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons [J]. Nat Neurosci, 2005, 8(2): 164-172.

[[4] 史榕苒, 丁海涛, 李辉, 等. 不同穴组针刺对抑郁大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴相关因子及血清脑源性神经

养因子的影响 [J]. 针刺研究, 2015, 40(6): 444-449.

Impact of Needling Points Group of Yintang (EX-HN3) -Baihui (DU20) -Fengchi (GB20) - Shenshu (BL23) on Expression of Hippocampus Brain-derived Neurotrophic Factor Gene of Chronic Stress Model Rats

SHI Rongxing, LI Hui, LIU Naigang, YU Zhange, TANG Xuezhong

(China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of needling points group of Yintang (EX-HN3) - Baihui (DU20) -Fengchi (GB20) -Shenshu (BL23) in treating depression. **Methods** Forty Sprague Dawley (SD) rats were randomized into normal group, model group, needling group and the western medicine group, with 10 rats in each group. Rats in the normal group were fed normally. Rats in other groups were fed alone and were made chronic stress rat models by 28 days of unpredictable chronic stress stimuli. At the same time of modeling, the model group was given normal saline 2ml by gavage every day. The needling group was given 30 minutes of acupuncture treatment in Yintang (EX-HN3), Baihui (DU20), bilateral Fengchi (GB20) and bilateral Shenshu (BL23) once every day. The western medicine group was given fluoxetine capsule 0.18 mg/(kg · d) by gavage once every day. Rats in other groups were treated by gavage for 28 days except the normal group. It was detected that rats' hippocampus brain-derived neurotrophic factor (BDNF), adenosine cyclophosphate responsive element-binding protein (CREB) mRNA level, as well as the methylation levels of hippocampus BDNF I-17 locus gene and BDNF I-17 CpG6 locus gene. **Results** Compared with the normal group, rats' hippocampus CREB and BDNF mRNA level in the model group decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, rats' hippocampus CREB and BDNF mRNA level in the needling group and the Western medicine group increased ($P < 0.05$). The difference of methylation levels of rats' BDNF I-17 locus in all groups was not significant ($P > 0.05$). The methylation level of rats' BDNF I-17 CpG6 locus in the model group was lower than that in the normal group ($P < 0.05$); the difference among other groups was not significant. **Conclusion** Needling points group of Yintang-Baihui-Fengchi-Shenshu might increase the levels of chronic stress model rats' hippocampus CREB and BDNF mRNA, which might be one of the mechanisms of treating depression.

Keywords depression; needling; points group of Yintang (EX-HN3) -Baihui (DU20) -Fengchi (GB20) - Shenshu (BL23); brain-derived neurotrophic factor; adenosine cyclophosphate responsive element-binding protein; gene methylation

(收稿日期: 2017-04-11; 修回日期: 2017-06-23)

编辑: 邓 媛

欢迎订阅 2018 年 《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R) 是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中国中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 荣获第二届、第三届、第四届新闻出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、专家论坛、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 20.00 元, 全年 480 元。读者可以到全国各地邮局办理订阅手续 (邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632, 010-64089195。国外发行: 中国国际图书贸易总公司 (北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: M140)。本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。

网址: <http://zzzy.chinajournal.net.cn>

扫一扫 关注

