

# 电针对慢性疲劳综合征大鼠脑组织转化生长因子- $\beta_1$ 基因转录和蛋白表达的影响

王德龙<sup>1</sup>, 杨燕<sup>1</sup>, 姜凡<sup>1</sup>, 郭静<sup>1</sup>, 石天宇<sup>1</sup>, 屈媛媛<sup>1</sup>, 聂宏<sup>2</sup>, 杨添淞<sup>2</sup>

**摘要 目的:**探讨电针治疗对慢性疲劳综合征(CFS)模型大鼠脑组织中TGF- $\beta_1$ 基因转录及蛋白表达的影响。**方法:**雄性SD大鼠48只,随机分为正常组、模型组、束缚组和针刺组,各12只。模型组采用慢性复合应激因素制备CFS模型;束缚组仅给予与针刺相同时间的捆绑;针刺组给予百会、额区、顶区电针治疗;共15 d。RT-PCR技术检测各组TGF- $\beta_1$  mRNA的转录水平,Western blot技术检测各组TGF- $\beta_1$ 蛋白表达水平。**结果:**模型组和束缚组大鼠海马和下丘脑中TGF- $\beta_1$  mRNA转录水平显著高于正常组( $P < 0.01$ ),针刺组与正常组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );针刺组海马和下丘脑中TGF- $\beta_1$  mRNA转录水平显著低于模型组( $P < 0.01$ ),束缚组和模型组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。正常组中TGF- $\beta_1$ 蛋白表达显著低于其他3组( $P < 0.01$ );针刺组大鼠海马和下丘脑中TGF- $\beta_1$ 蛋白表达水平明显低于模型组( $P < 0.01$ ),束缚组和模型组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论:**电针能够降低CFS模型大鼠海马与下丘脑中TGF- $\beta_1$  mRNA转录水平和TGF- $\beta_1$ 蛋白表达水平。

**关键词** 慢性疲劳综合征;电针;转化生长因子- $\beta_1$

中图分类号 R741;R741.02 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssngcj.2018.04.003

**Effects of Electric Acupuncture on the Transforming Growth Factor- $\beta_1$  Protein and Gene Expression in Rats with Chronic Fatigue Syndrome** WANG De-long<sup>1</sup>, YANG Yan<sup>1</sup>, JIANG Fan<sup>1</sup>, GUO Jing<sup>1</sup>, SHI Tian-yu<sup>1</sup>, QU Yuan-yuan<sup>1</sup>, NIE Hong<sup>2</sup>, YANG Tian-song<sup>2</sup>. 1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

**Abstract: Objective:** To study the effect of electric acupuncture on the transforming growth factor (TGF)- $\beta_1$  signaling pathways of the chronic fatigue syndrome (CFS) rat model. **Methods:** Forty-eight SD rats were randomly assigned to the normal group, model group, bound group, and acupuncture group with 12 rats per group. The CFS rat model was established by applying multiple chronic stress factors. The bound group rats were subject to binding for an equal duration of time as that of the acupuncture treatment applied to the acupuncture group rats. Acupuncture group rats were treated for 15 days by electric acupuncture to the Baihui acupoint, frontal lobe area, and parietal lobe area. TGF- $\beta_1$  mRNA transcription was tested by RT-PCR, and TGF- $\beta_1$  expression was assessed by Western blot. **Results:** Model group and bound group rats showed significantly increased TGF- $\beta_1$  mRNA transcription levels in the hippocampus and hypothalamus compared to normal group rats ( $P < 0.01$ ); there was no significant difference between the acupuncture group and normal group ( $P > 0.05$ ). The acupuncture group showed significantly decreased TGF- $\beta_1$  mRNA transcription levels compared to the model group ( $P < 0.01$ ) while the bound group and model group showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). The normal group displayed lower TGF- $\beta_1$  expression compared to the other 3 groups ( $P < 0.01$ ). Acupuncture group rats showed significantly decreased TGF- $\beta_1$  expression levels in the hippocampus and hypothalamus compared to model group rats ( $P < 0.01$ ); the bound group and model group showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Electric acupuncture can reduce TGF- $\beta_1$  mRNA transcription levels and TGF- $\beta_1$  protein expression in the hippocampus and hypothalamus of CFS model rats.

**Key words** electric acupuncture; chronic fatigue syndrome; transforming growth factor- $\beta_1$

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)是现代人群多发的一种特发性症候群,但实验室检查未发现明显的标志性改变<sup>[1]</sup>。CFS的病因目前并不明确,普遍认为是多种病因综合作用的结果,可能与营养代谢障碍、神经内分泌异常、免疫功能异

常、病毒感染等因素密切相关<sup>[2]</sup>。海马是大脑边缘系统中参与学习记忆的重要结构,对认知与情绪的管控有着重要的作用<sup>[3]</sup>;下丘脑主要功能为调节内脏和内分泌活动<sup>[4]</sup>,上述2个脑内结构与疲劳感的产生有密切的联系,与本病的发生发展密切相关。根据已有

**作者单位**

1. 黑龙江中医药大学

哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学附属第一医院神经内科

哈尔滨 150040

**基金项目**

国家自然科学基金

(No. 81704170,

No. 81473761);

教育部博士点基金

项目(No. 20122327

110007);

黑龙江省中医管理局

课题

(No. ZHY16-003)

**收稿日期**

2017-12-17

**通讯作者**

杨添淞

124390232@qq.

com

的文献报道及本课题组前期研究结果,本研究观察电针对CFS模型大鼠海马和下丘脑中转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\beta_1$ 蛋白和基因表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性SD大鼠60只,体质量为(200±10)g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心,动物合格证号SCXK黑2008-004。

1.1.2 实验仪器与试剂 G6805-II型电针仪购于上海医用电子仪器厂。兔抗TGF $\beta_1$ 购于美国Abcom公司,BCA蛋白定量试剂盒和蛋白抽提试剂购于北京赛诺博生物技术有限公司,Goldview染料购于北京诺特莱斯公司。

### 1.2 方法

1.2.1 分组及模型制备 SD大鼠单笼、适应性饲养1周。全部大鼠进行水迷宫定位航行和空间搜索实验<sup>[9]</sup>,结果显示学习记忆功能正常的大鼠由组外人员按照随机数字表法随机分成正常组、模型组、束缚组和针刺组,共4组,每组12只。其余大鼠为补充性饲养。

参考文献<sup>[6-8]</sup>采用慢性复合应激因素制备CFS模型:让大鼠游泳至力竭状态,并每天随机选取半天禁食、半天禁水、通宵光刺激、电刺激、疼痛刺激中的2种刺激使大鼠处在身体疲劳与精神应激的状态,共刺激15 d。正常组不给予刺激和电针治疗,常规饲养;模型组不给予电针治疗;束缚组仅给予与针刺相同时间的捆绑,不给予刺激也不给予电针治疗。

1.2.2 电针治疗 针刺组从造模之日开始进行额区中间和顶叶中央后回的体表投影部位(以下简称额区和顶区)和百会穴的电针治疗。百会穴参照《实验针灸学》中标示的实验动物(大白鼠)常用腧穴简表取穴,额区中间和顶叶中央后回根据鼠脑解剖相关文献<sup>[9,10]</sup>及预实验结果取相应部位的体表投影,将取穴的相应部位附近行剪毛与常规消毒,选择0.35 mm×25 mm规格的毫针在百会、额区、顶区等穴处快速破皮进针,破皮刺入皮下后进针10 mm,随后在针灸针上连接电针仪,设定输出波形为连续波,输出频率50 Hz,刺激强度为针刺局部肌肉轻微跳动为度,电针30 min/次,1次/d,治疗15 d。

1.2.3 组织取材 麻醉状态下将大鼠断头,取出双侧下丘脑和海马,一半用于提取总RNA,另一半用于提取总蛋白<sup>[11,12]</sup>。

1.2.4 TGF $\beta_1$  mRNA转录水平检测 采用RT-PCR法:提取一侧下丘脑和海马总RNA,逆转录后取1  $\mu$ L,加入dNTP 1  $\mu$ L,上下游引物各0.5  $\mu$ L, Taq DNA polymerase 1  $\mu$ L,buffer 1  $\mu$ L,灭菌水5  $\mu$ L。反应条件为94  $^{\circ}$ C 4 min,94  $^{\circ}$ C 30 s,退火30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,35个循环后,72  $^{\circ}$ C延伸10 min。随后进行电泳,UVP凝聚成像系统分析、扫描、拍照,获取条带平均密度和面积数据计算基因转录水平。TGF  $\beta_1$  正义链:5'-CCAAGGAGACGGAATACAGG-3',反义链:5'-GTGTTGGTTGTAGAGGGCAAG-3'(大连宝生物公司设计)。内参为GAPDH。

1.2.5 TGF $\beta_1$ 蛋白表达水平检测 采用Western blot法:提取一侧下丘脑和海马总蛋白,转膜、洗膜,3% BSA-TBST稀释兔抗TGF $\beta_1$ (1:1 000),室温孵育10 min,4  $^{\circ}$ C过夜。洗膜后将膜完全浸没3% BSA-TBST中室温轻摇30 min,加GAPDH鼠单抗(1:5 000),室温孵育2 h;洗膜后用5%脱脂奶粉-TBST稀释二抗,山羊抗小鼠IgG(H+L)HRP(1:10 000),室温轻摇40 min;洗膜;ECL显色、曝光、显影、定影。凝胶成像系统分析并拍照,以蛋白条带的强度代表蛋白的表达量。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 11.5软件处理数据。计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用独立样本均数 $t$ 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠脑组织TGF- $\beta_1$ mRNA转录水平

4组海马和下丘脑均检测到TGF- $\beta_1$  mRNA转录,模型组和束缚组大鼠海马和下丘脑中TGF- $\beta_1$  mRNA转录水平显著高于正常组( $P<0.01$ );针刺组与正常组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。针刺组海马和下丘脑中TGF- $\beta_1$  mRNA转录水平显著低于模型组( $P<0.01$ ),束缚组和模型组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1、图1。

### 2.2 各组大鼠脑组织中TGF $\beta_1$ 蛋白表达

各组大鼠海马和下丘脑均有TGF- $\beta_1$ 蛋白表达,正常组中TGF- $\beta_1$ 蛋白表达显著低于其他3组( $P<0.01$ );针刺组大鼠海马和下丘脑中TGF- $\beta_1$ 蛋白表达水平明显低于模型组( $P<0.01$ ),束缚组和模型组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表2、图2。

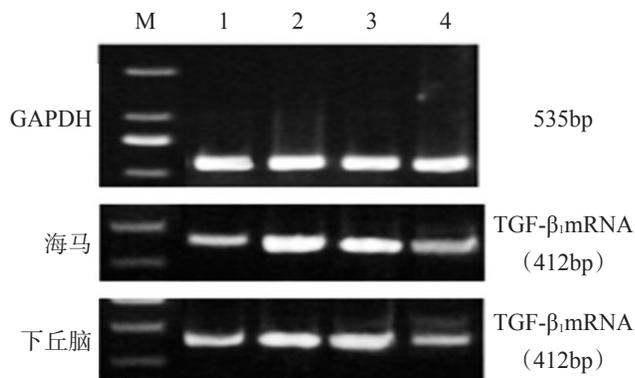
## 3 讨论

巨大的信息量作为一种应激刺激导致CFS的发病

表1 各组大鼠脑组织中TGF-β1 mRNA转录水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	海马	下丘脑
正常组	12	0.652±0.032 <sup>②</sup>	0.638±0.049 <sup>②</sup>
模型组	12	1.089±0.123 <sup>①</sup>	0.859±0.053 <sup>①</sup>
束缚组	12	0.999±0.151 <sup>①</sup>	0.827±0.048 <sup>①</sup>
针刺组	12	0.740±0.047 <sup>②</sup>	0.626±0.033 <sup>②</sup>

注:与正常组比较,<sup>①</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>②</sup>P<0.01



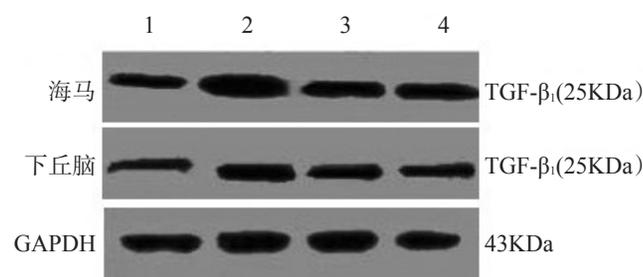
注:M为DNA Marker 2 000DL,1为空白组,2为模型组,3为束缚组,4为针刺组;GAPDH大小为535 bp,TGF-β<sub>1</sub> mRNA大小为412 bp

图1 各组海马和下丘脑TGF-β<sub>1</sub> mRNA电泳图

表2 各组大鼠脑组织中TGF-β1 蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	海马	下丘脑
正常组	12	0.822±0.050 <sup>②</sup>	0.558±0.055 <sup>②</sup>
模型组	12	1.132±0.099 <sup>①</sup>	1.011±0.081 <sup>①</sup>
束缚组	12	1.126±0.084 <sup>①</sup>	0.969±0.079 <sup>①</sup>
针刺组	12	0.952±0.063 <sup>①②</sup>	0.685±0.042 <sup>①②</sup>

注:与正常组比较,<sup>①</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>②</sup>P<0.01



注:1为空白组,2为模型组,3为束缚组,4为针刺组;GAPDH分子量43 kDa,TGF-β<sub>1</sub>分子量25 kDa

图2 各组海马和下丘脑TGF-β<sub>1</sub>蛋白Western blot电泳图

率呈逐年增多的趋势<sup>[13]</sup>。英国一项前瞻性研究发现,CFS患病率为2.6%,排除合并心理障碍的患者后,患病率为0.5%<sup>[14]</sup>。本病的治疗手段有限且疗效不佳<sup>[15-17]</sup>。电针可有效缓解CFS患者的综合状况<sup>[18-21]</sup>,但作用机制不清。

本课题组观察电针对CFS大鼠海马和下丘脑中

TGF-β<sub>1</sub>基因转录和蛋白表达的影响,探索电针治疗本病的机制。正常脑组织中TGF-β<sub>1</sub>含量很低,在病理条件下,脑组织中TGF-β<sub>1</sub>表达量增加<sup>[22,23]</sup>。TGF-β<sub>1</sub>参与辐射状胶质细胞向星形胶质细胞的转化,在神经元与神经胶质细胞两者的相互作用中发挥着重要的作用<sup>[24]</sup>。TGF-β<sub>1</sub>还参与了由脑外伤引起的胶质斑痕形成<sup>[25]</sup>。体内及体外研究均发现,TGF-β<sub>1</sub>可通过上调神经生长因子合成的方式来增加内皮生长因子、成纤维生长因子或通过增加TGF-β<sub>1</sub>本身的释放来促进神经元分化存活<sup>[22]</sup>。在中枢神经系统损伤的修复过程中,TGF-β<sub>1</sub>又是强效的血管生长因子,能够促进损伤局部的血管新生<sup>[26]</sup>,增强纤维连接蛋白的表达及损伤局部胶原组织形成,从而起到促进局部损伤修复的目的。TGF-β<sub>1</sub>还参与调节细胞因子网络的平衡,通过影响补体的激活来抑制炎症反应,起到保护中枢神经系统的作用。因为针刺技术是一种体表刺激疗法<sup>[27]</sup>,笔者在设计实验时,为避免捆绑实验动物形成的体表刺激对实验结果造成干扰,加设束缚组来阐释此问题。结果证明针刺是改善CFS的主要手段。

综上所述,针刺是改善CFS的有效方法,其机制可能与TGF-β<sub>1</sub>水平的改变有关。

### 参考文献

- [1] 李立华,仇军,刘声,等. 中医体质偏颇与慢性疲劳综合征的关系研究[J]. 世界中医药, 2017, 12: 1171-1174, 1178.
- [2] 鲁光宝,李旗,刘海洲. 慢性疲劳综合征病因病机中西医方面的研究进展[J]. 中国当代医药, 2009, 16: 12-13.
- [3] 陈任,方姝晨,宁宇,等. Ghrelin对小鼠认知功能的影响及机制探讨[J]. 神经损伤与功能重建, 2015, 10: 471-473.
- [4] 吴雪艳. 应激反应与抑郁症中下丘脑的性别差异: 针对人脑样本和应激动物的研究[D]. 浙江大学, 2016.
- [5] 余群星. 基于Morris水迷宫学习记忆方法的研究[D]. 哈尔滨商业大学, 2015.
- [6] 华金双,傅文,邵伯雍. 逆针灸对慢性疲劳大鼠血清ACTH、CORT、CRH的影响[J]. 中医研究, 2017, 30: 67-70.
- [7] 刘丰怡. 俞募配穴法埋线治疗肝郁脾虚型慢性疲劳综合征的疗效观察[D]. 广州中医药大学, 2014.
- [8] 杨启昭. 背俞穴埋线干预慢性疲劳综合征大鼠的作用机制研究[D]. 广州中医药大学, 2015.
- [9] 郑达理. 借助立体定位技术和荧光界定GFP裸小鼠脑解剖结构[D]. 苏州大学, 2012.
- [10] 李安安. 用于绘制高分辨小鼠全脑图谱的断层成像系统研究[D]. 华中科技大学, 2010.
- [11] 邹显巍,刘爱东,余建萍. 自发性癫痫大鼠皮质和海马中GLT-1、EAAC-1表达[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11: 293-295.
- [12] 秦小云,李桂成,张庆金,等. 大鼠侧脑室注射Nesfatin-1对糖脂代谢的影响及其与下丘脑AMPK表达的关系[J]. 中风与神经疾病杂志, 2017, 34: 901-904.
- [13] 姜凡. 针刺治疗慢性疲劳综合征随机对照试验的系统评价[D]. 黑龙江中医药大学, 2017.
- [14] Jason LA, Katz BZ, Shiraishi Y, et al. Predictors of Post-Infectious Chronic Fatigue Syndrome in Adolescents[J]. Health Psychol Behav Med, 2014, 2: 41-51.
- [15] Collin SM, Heron J, Nikolaus S, et al. Chronic fatigue syndrome

fistulas[J]. Neurosurgery, 2013, 73: ons211-ons222.  
 [12] Aviv RI, Huynh T, Huang Y, et al. An in vivo, MRI-integrated real-time model of active contrast extravasation in acute intracerebral hemorrhage[J]. Am J Neuroradiol, 2014, 35: 1693-1699.  
 [13] 张莉宏,万宏伟,王小春,等.经颅多普勒超声在额部入路微创锥颅术后颅内压监测的应用[J].中国美容医学, 2012, 21: 162-164.  
 [14] Qayyum H, Ramlakhan S. Can ocular ultrasound predict intracranial

hypertension? A pilot diagnostic accuracy evaluation in a UK emergency department[J]. European Journal of Emergency Medicine, 2013, 20: 91-97.  
 [15] 康慧莉,詹维伟,丁勇,等.超声在高血压性脑出血微创清除术中的应用[J].介入放射学杂志, 2016, 25: 74-77.  
 [16] Lochner P, Mader C, Nardone R, et al. Sonography of the optic nerve sheath beyond the hyperacute stage of intracerebral hemorrhage[J]. Journal of Ultrasound, 2014, 17: 225-228.

(本文编辑:雷琪)

(上接第171页)

(CFS/ME) symptom-based phenotypes and 1-year treatment outcomes in two clinical cohorts of adult patients in the UK and The Netherlands[J]. J Psychosom Res, 2018, 104: 29-34.  
 [16] Collin SM, Crawley E. Specialist treatment of chronic fatigue syndrome/ME: a cohort study among adult patients in England[J]. BMC Health Serv Res, 2017, 17: 488.  
 [17] Clark LV, Pesola F, Thomas JM, et al. Guided graded exercise self-help plus specialist medical care versus specialist medical care alone for chronic fatigue syndrome (GETSET): a pragmatic randomised controlled trial[J]. Lancet, 2017, 390: 363-373.  
 [18] 谭惠娟. 针灸治疗慢性疲劳综合征的文献研究[D]. 成都中医药大学, 2016.  
 [19] 李元鑫. 音乐电针治疗慢性疲劳综合征 60 例临床观察[J]. 黑龙江医药, 2014, 27: 405-406.  
 [20] 胡艺超. 电针结合逍遥丸治疗慢性疲劳综合征的临床研究[D]. 广州中医药大学, 2013.  
 [21] Ng SM, Yiu YM. Acupuncture for chronic fatigue syndrome: a randomized, sham-controlled trial with single-blinded design[J]. Altern

Ther Health Med, 2013, 19: 21-26.  
 [22] E Rota, G Bellone, P Rocca, et al. Increased intrathecal TGF-beta1, but not IL-12,IFN-gamma and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients [J]. Neurol Sci, 2006, 27: 33-39.  
 [23] Buckwalter MS, Yamane M, Coleman BS, et al. Chronically increased transforming growth factor-beta1 strongly inhibits hippocampal neurogenesis in aged mice[J]. Am J Pathol, 2006, 169: 154-164.  
 [24] Stipursky J, Gomes FC. TGF-β1/SMAD Signaling Induces Astrocyte Fate Commitment In Vitro: Implications for Radial Glia Development[J]. Glia, 2007, 55: 1023-1033.  
 [25] Vivien D, Ali C. Transforming growth factor-beta signalling in brain disorders[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17: 121-128.  
 [26] Wyller VB, Nguyen CB, Ludviksen JA, et al. Transforming growth factor beta (TGF-β) in adolescent chronic fatigue syndrome[J]. J Transl Med, 2017, 15: 245.  
 [27] 朱兵. 系统针灸学:复兴“体表医学”[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015: 2-8.

(本文编辑:唐颖馨)

