

电针干预对慢性疲劳综合征大鼠海马和下丘脑区 p65 及 COX-2 蛋白表达的影响

杨添淞¹, 杨燕², 王德龙², 王玉琳², 郭静², 石天宇², 屈媛媛², 王月², 孙维伯³, 孙忠人²

摘要 目的:探讨电针干预对慢性疲劳综合征(CFS)大鼠海马和下丘脑区 NF-κB p65 和 COX-2 蛋白表达的影响。**方法**:清洁级 SD 雄性大鼠 36 只,随机将大鼠分为正常组、模型组、治疗组各 12 只,建立 CFS 动物模型,治疗组选择百会、情感 1 区、感觉区给予电针治疗,应用免疫组化方法,检测各组大鼠海马、下丘脑区 NF-κB p65 及 COX-2 表达的变化情况。**结果**:模型组大鼠海马和下丘脑区可见 NF-κB p65、COX-2 蛋白阳性表达显著增加,与正常组比较有显著性差异($P<0.01$);治疗组大鼠海马和下丘脑的 NF-κB p65 阳性细胞表达明显减少,与模型组比较有显著性差异($P<0.01$)。**结论**:针刺治疗能降低 CFS 大鼠海马与下丘脑中 NF-κB p65、COX-2 蛋白表达。

关键词 慢性疲劳综合征;NF-κB p65;COX-2

中图分类号 R741;R741.05 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.07.001

Effects of Scalp Electroacupuncture on Expression of p65 and COX-2 Protein in Hippocampus

and Hypothalamus of Rats with Chronic Fatigue Syndrome YANG Tian-song¹, YANG Yan², WANG

De-long², WANG Yu-lin², GUO Jing², SHI Tian-yu², QU Yuan-yuan², WANG Yue², SUN Wei-bo³, SUN

Zhong-ren². 1. Department of Educational Administration, The First Affiliated Hospital of Heilongjiang

University of Chinese Medicine, Ha'erbin 150040, China; 2. Graduate School, Heilongjiang University Of

Chinese Medicine, Ha'erbin 150040, China; 3. Heilongjiang Experimental Middle School, Ha'erbin 150001,

China

Abstract Objective: To investigate the effects of scalp electroacupuncture on the expression of NF-κB p65 and COX-2 protein in the hippocampus and hypothalamus of rats with chronic fatigue syndrome (CFS).

Methods: Thirty-six pathogen-free male SD rats were randomly divided into the normal group, model group, and treatment group with 12 rats per group. The CFS animal model was established. The treatment group was given acupuncture therapy to the Baihui, emotional zone 1, and sensory zone. Immunohistochemistry was employed to examine the variation in expression of NF-κB p65 and COX-2 in the hippocampus and hypothalamus of rats in each group.

Results: Compared with that of the normal group, the hippocampus and hypothalamus of rats in the model group showed significantly increased positive expression of NF-κB p65 and COX-2 protein ($P<0.01$). Compared with that of the model group, the hippocampus and hypothalamus of rats in the treatment group displayed significantly reduced expression of NF-κB p65 positive cells ($P<0.01$). **Conclusion:** Acupuncture can reduce the expression of NF-κB p65 and COX-2 protein in the hippocampus and hypothalamus of CFS rats.

Key words chronic fatigue syndrome; NF-κB p65; COX-2

作者单位

1. 黑龙江中医药大学附属第一医院教务科

哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学研究生院

哈尔滨 150040

3. 黑龙江省实验中学

哈尔滨 150001

基金项目

国家自然科学基金(No. 81704170, 81473761);教育部博士点基金(No. 20122327110007);黑龙江省中医管理局课题(No. ZHY16-003)

收稿日期

2018-04-03

通讯作者

孙忠人

sZR006@163.com

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)是以持续或反复发作极度疲劳为特征的现代生活方式症候群,表现为全身多系统的非正常生理反应,已成为影响城市人口健康的多发病^[1]。1987年,美国疾病控制与预防中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)将一组以慢性或反复发作的极度疲劳,休息后不能缓解,持续时间至少半年为主要特征,严重影响人们的工作、教育、社会行为和个人活动的症候群命名为CFS^[2]。现代医学无明确、有效的治疗方法和药物,大量文献报道针灸对改善CFS疲劳

症状有肯定疗效,但作用机制尚无明确阐述。现在有证据表明CFS与炎症反应系统的激活和氧化应激的增加有关,核转录因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)作为细胞内调节炎症反应和氧化应激的主要上游介质,在CFS的发病过程中扮演着重要角色^[3]。基于NF-κB及其下游炎症介质环氧酶2(cyclooxygenase, COX-2)在炎症反应中的重要作用,本研究观察电针干预CFS大鼠海马和下丘脑区NF-κB p65及COX-2蛋白表达,以进一步探知NF-κB/COX-2信号通路在电针抗CFS中所发挥的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级健康雄性SD大鼠36只,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,体质量(220±30)g,许可证号:SCXK黑2008004。大鼠在安静环境下适应性饲养7 d,室温(22±2)℃,相对湿度55%~60%。饲养期间给予充足清洁饮水,自由摄食。

1.1.2 主要设备与试剂 6805-II电针仪,购于常州市武进长城医疗器械有限公司;2135型切片机,购于德国莱卡公司;moticam3000显微摄影系统与MoticMed6.0病理图像分析系统,购于美国Motic公司;电热恒温箱,购于上海一恒科技有限公司;大鼠声光电刺激实验装置由黑龙江中医药大学实验中心自制;TES-1350A型噪音机,购于台湾泰仕电子有限公司;兔抗NF-κB p65多克隆抗体和兔抗COX-2多克隆抗体,均购于武汉博士德生物工程有限公司;PV-6001二抗和DAB显色剂,购于北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 造模 适应性饲养后,将大鼠分为正常组、模型组、治疗组3组,每组12只,参考相关文献造模^[4-6]并加以改进,采用力竭游泳加慢性复合应激刺激多重因素制备CFS模型,共进行28 d,造模期间大鼠单笼饲养。

大鼠于前3 d在游泳缸中适应性游泳,每日1次,每次20 min,水深>35 cm,水温(25±2)℃。开始正式造模时大鼠负重游泳至力竭每天1次。当大鼠浮在水面不运动时用木棒驱赶,使其维持运动状态直至游泳动作明显失调为力竭标准。动物出现力竭后及时捞起避免溺水,用毛巾擦干体表,吹风机吹干,单独置笼中休息。正常组动物相同条件常规饲养,不参与游泳造模。在大鼠负重力竭游泳后随机给予包括12 h禁食,12 h禁水,通宵照明,噪声刺激(110 dB,1 h)在内的不可预知的慢性应激刺激,每天随机给予两种不同刺激,使大鼠不能预料刺激的发生,以避免产生适应,同时又要将刺激强度控制在大鼠能承受的范围内。

1.2.2 针刺操作 造模完成后对治疗组进行电针治疗。大鼠百会、情感1区、感觉区等取穴参照《实验针灸学》动物标准穴位图谱。大鼠相关部位常规剪毛消毒,用0.35 mm×25 mm毫针在百会、情感1区、感觉区等穴处快速刺入皮下,连接G6805-II电针仪,调节电针参数,频率50 Hz,连续波,电针强度以肌肉微微跳动为度,每日电针一次,每次持续30 min,连续电针治疗15 d。正常组、模型组不给予任何治疗。

1.2.3 组织取材方法 取血后,用注射器在心尖处将

4℃生理盐水缓慢注入左心室,同时在右心房心耳下方剪一小口,使液体经体循环后从右心房流出。流出的液体颜色变清时,换用冷的4%多聚甲醛PBS液继续灌注,直至大鼠四肢肌肉发硬僵直,肝、肺逐渐变白停止心脏灌注。断头取脑,放入4%多聚甲醛溶液中,以备免疫组化染色的使用。

1.2.4 主要观察指标 采用免疫组化方法,检测各组大鼠海马和下丘脑区NF-κB p65及COX-2蛋白表达,并用病理图像分析系统进行分析。①免疫组织化学染色:将脑组织按常规方法制成石蜡切片,然后二甲苯脱蜡、梯度酒精水化,高温修复抗原;滴加一抗(NF-κB p65和COX-2浓度分别为1:60和1:80)4℃孵育过夜;滴加二抗(PV-6001),37℃孵育30 min;DAB显色5~10 min;苏木素复染、脱水、中性树胶封片,显微镜下观察。②免疫组化分析:采用MoticMed6.0病理图像分析系统,每组每张切片随机观察并计数海马或下丘脑区3个不重复视野,在400倍视野下,像素512×480,摄入图像分析系统,选择免疫组化分析模块,通过灰度调节,区分视野内阳性信号面积并结合目测进行分析,计算阳性细胞总数,取其平均值,每组各分析6例。

1.3 统计学处理

应用SPSS18.0软件包进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马和下丘脑区NF-κB p65蛋白表达比较

正常组大鼠海马和下丘脑区可见NF-κB p65阳性蛋白表达,阳性表达的细胞数目较少且颜色较淡;而模型组NF-κB p65阳性表达细胞数量相对增多,颜色较深,与正常组比较有显著性差异($P < 0.01$);治疗组的NF-κB p65阳性细胞表达明显减少,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),见图1A、表1。

2.2 各组大鼠海马和下丘脑区COX-2蛋白表达比较

正常组大鼠海马和下丘脑区可见COX-2阳性蛋白表达,阳性表达的细胞数目较少且颜色较淡;而模型组COX-2阳性表达细胞数量相对增多,颜色较深,与正常组比较有显著性差异($P < 0.01$);治疗组的COX-2阳性细胞表达明显减少,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),见图1B、表1。

3 讨论

CFS患者除躯体症状之外,精神症状也较为突出,大量文献报道CFS患者普遍存在精神抑郁、焦虑的负

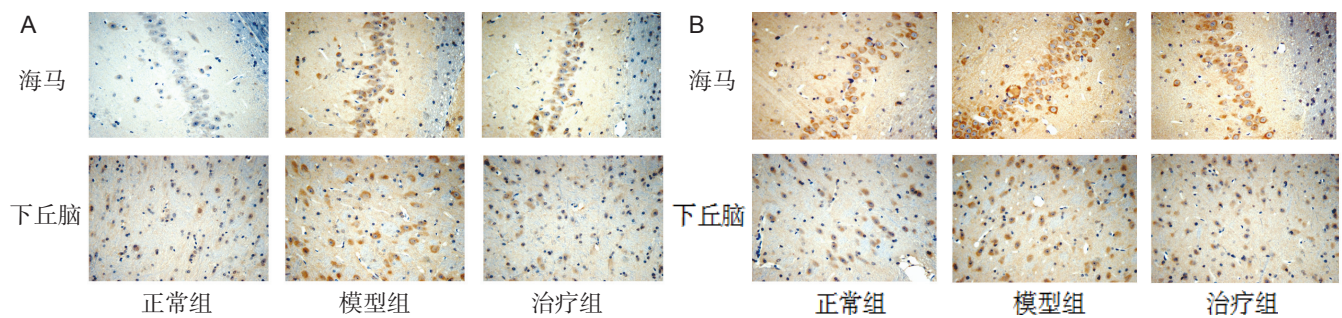


图1 各组大鼠海马及下丘脑NF-κB p65(A)、COX-2(B)表达(免疫组化染色,×400)

表1 各组大鼠脑组织中NF-κB p65、COX-2蛋白表达($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	NF-κB p65 阳性细胞数目		COX-2 阳性细胞数目	
		海马区	下丘脑	海马区	下丘脑
正常组	6	14.50±1.87	10.50±1.87	28.17±2.93	22.83±2.48
模型组	6	30.83±3.71 ^②	27.33±2.16 ^②	53.67±5.35 ^②	38.67±2.80 ^②
治疗组	6	18.83±2.48 ^{①③}	16.33±2.07 ^{②③}	34.17±4.26 ^{①③}	27.50±2.43 ^{②③}

注:与正常组比较,^① $P<0.05$,^② $P<0.01$;与模型组比较,^③ $P<0.01$

性情绪因素,并且CFS患者的疲劳程度越重,其躯体化症状和抑郁程度越明显^[7],临床上抗抑郁药的使用常常能减轻CFS患者症状。人体的情绪反应中枢在大脑,有研究表明CFS可能与脑内炎症有关,且不同部位的炎症程度导致CFS患者出现不同的症状表现^[8]。因此本实验着重研究CFS大鼠海马和下丘脑区脑组织的变化情况。其中海马是公认的人体认知和情绪调节的重要中枢核团,其损伤主要体现在学习记忆障碍,下丘脑是NEI网络的高级整合中枢,其损伤主要体现在肢体疼痛和认知障碍。从海马和下丘脑角度进行针灸治疗CFS的机制研究,对解释针灸的疗效有一定帮助。

本研究的主要观察指标为NF-κB p65和COX-2,NF-κB为一种控制DNA转录、细胞因子生成和细胞存活的蛋白质复合体,可通过病毒、肿瘤坏死因子等激活,发挥免疫应答调控作用,NF-κB信号通路不仅可在各阶段介导炎症反应,同时也参与细胞周期调控、凋亡等多种生理过程,是机体炎症反应的重要观察指标^[9]。NF-κB主要以p50/p65二聚体形式存在,其中NF-κB p65含转录活化区,参与基因转录的起始调节。COX-2是合成前列腺素重要的限速酶,在炎症反应中发挥重要作用,是导致细胞毒性作用的关键因子,各种损伤因素如生长因子、细胞因子、炎症介质和激素等可诱导COX-2表达。活化的NF-κB可以结合下游靶基因,启动靶基因转录,从而增加COX-2的基因表达^[10]。

观察CFS模型大鼠海马、下丘脑区NF-κB p65及COX-2变化情况,免疫组化结果显示与正常组相比模型组海马和下丘脑区的NF-κB p65及COX-2蛋白含量升高,说明海马、下丘脑区有炎症改变可能是CFS的发

病机制之一,而治疗组与模型组相比,海马和下丘脑区的NF-κB p65及COX-2蛋白含量降低,说明电针治疗可以减轻CFS大鼠海马、下丘脑的炎症反应,而达到抑制神经损伤的目的。

本研究结果为CFS与脑内炎症相关提供了进一步的支持,同时根据大脑结构分区选取头部腧穴,有效减轻CFS大鼠脑组织的炎性状态,改善了CFS大鼠的躯体及精神疲劳症状,为CFS的诊断防治提供了新的思路。

参考文献

[1] 潘莉,张静平,李丽花.慢性疲劳综合征研究进展[J].中国热带医学,2010,10:1556-1557.

[2] Fukuda K, Straus SE, Hickie I, et al. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group[J]. Ann Intern Med, 1994, 121: 953-959.

[3] Maes M, Mihaylova I, Bosmans E. Not in the mind of neurasthenic lazybones but in the cell nucleus: patients with chronic fatigue syndrome have increased production of nuclear factor kappa beta[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2007, 28: 456-462.

[4] Singh PK, Chopra K, Kuhad A, et al. Role of Lactobacillus acidophilus loaded floating beads in chronic fatigue syndrome: behavioral and biochemical evidences[J]. Neurogastroenterol Motil, 2012, 24: 366-e170.

[5] Sachdeva AK, Kuhad A, Chopra K. Epigallocatechin gallate ameliorates behavioral and biochemical deficits in rat model of load-induced chronic fatigue syndrome[J]. Brain Res Bull, 2011, 86: 165-172.

[6] Cao Y, Li Q. The variation of the 5-hydroxytryptamine system between chronic unpredictable mild stress rats and chronic fatigue syndrome rats induced by forced treadmill running[J]. Neuroreport, 2017, 28: 630-637.

[7] 张振贤,张烨,王扬,等.理虚解郁方对慢性疲劳综合征患者负性情绪及皮质醇与5-羟色胺的影响[J].上海中医药大学学报,2012,26: 38-40.

[8] 蓝建中.慢性疲劳综合征或与脑内炎症相关[J].山东中医杂志,2014,33: 467-467.

[9] 王晓晨,吉爱国. NF-κB 信号通路炎症反应[J].生理科学进展,2014,45: 68-71.

[10] 张茜燕,殷小平.一氧化氮对TLR4/NF-κB信号通路影响的研究进展[J].神经损伤与功能重建,2017,12: 48-51.

(本文编辑:王晶)