

· 论 著 ·

电针结合重复经颅磁刺激对焦虑模型大鼠中枢 肾上腺皮质激素受体基因表达的影响*

周奇志¹, 魏焦禄¹, 蔡定均^{1△}, 彭晓华¹, 余曙光¹, 郑 重², 方杨琪³(1. 成都中医药大学针灸推拿学院针灸学实验室 610075; 2. 四川大学华西医院心理卫生中心
电生理室, 成都 610041; 3. 成都中医药大学附属医院针灸学校 610041)

摘要:目的 研究电针结合重复经颅磁刺激(rTMS)抗焦虑效应的中枢部分作用机制。方法 以单个持续刺激(SPS)方法复制大鼠焦虑动物模型,观察电针结合 rTMS 抗焦虑效应,运用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测大鼠海马和前额皮质区的盐皮质激素受体(MR)和糖皮质激素受体(GR)的基因表达。结果 电针结合 rTMS 具有抗焦虑叠加效应,还可升高焦虑模型大鼠海马 GR 基因表达水平。结论 电针结合 rTMS 具有抗焦虑协同效应,其机制可能与调节海马 GR 基因表达有关。

关键词:电针; 经颅磁刺激; 焦虑; 盐皮质激素受体; 糖皮质激素受体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.04.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)04-0317-03

Effects of electroacupuncture combined with rTMS on gene expression of adrenocortical hormone receptor in centrum of anxiety rat model*

Zhou Qizhi¹, Wei Jiaolu¹, Cai Dingjun^{1△}, Peng Xiaohua¹, Yu Shuguang¹, Zheng Zhong², Fang Yangqi³

(1. Laboratory of Acu-moxibustion, College of Acu-moxibustion and Tuina, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610075, China; 2. Mental Health Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 3. Acupuncture School of Affiliated hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To explore the effects and partial mechanisms of centrum by electroacupuncture combined with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in anxiety rat model. **Methods** The anxiety rat model was built by SPS, which was used to observe the anti-anxiety effects of electroacupuncture combined with rTMS. The gene expressions of MR and GR in the hippocampus and the prefrontal cortex were measured by RT-PCR. **Results** Emotional reaction in anxiety model could be reduced by three of therapeutics. Compared with electroacupuncture treatment and rTMS treatment, electroacupuncture combined with rTMS treatment showed more dominance. Compared with the model group, the gene expressions of GR in the hippocampus was significant increased in electroacupuncture combined with rTMS. **Conclusion** There is a cooperativity of anti-anxiety in the electric acupuncture combined with rTMS. Anti-anxiety effects of therapeutics are possibly related to modulation of the gene expressions of GR in the hippocampus.

Key words: electroacupuncture; transcranial magnetic stimulation; anxiety; mineralocorticoid receptors; glucocorticoid receptors

研究显示,焦虑障碍总体年发病率和终身患病率分别是 10.6% 和 16.6%^[1];且治疗成本高,干预措施的有效性 with 高成本并非成正比^[2]。中枢特别是海马、前额皮质等边缘结构分布有大量的肾上腺皮质激素受体[盐皮质激素受体(MR)和糖皮质激素受体 GR],MR 和 GR 均可与糖皮质激素结合,共同调节应激、焦虑情绪等,且 MR/GR 系统的失平衡可导致焦虑情绪的发生。电针、重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)治疗焦虑障碍均显示一定疗效^[3-4],但总体疗效还不够突出,尚缺乏二者结合的效应和机制研究。本课题拟探索电针结合 rTMS 抗焦虑协同效应的部分中枢作用机制,为临床寻求经济、有效和安全的治疗措施,提供科学的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 RAPID2 型 rTMS 器,英国 Magstim 公司生产; PM-200 十字迷宫视频跟踪系统,成都泰盟公司生产;基因扩

增仪(C1000, BIO-RAD); 荧光定量 PCR(CFX96, BIO-RAD)。总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)、Quantscript RT Kit Quant cDNA 第一链合成试剂盒和 Quant 一步法逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自北京 TIANGEN 生物技术公司。

1.2 方 法

1.2.1 实验分组与模型复制 (1)实验条件:选用清洁级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 180~220 g,购自成都中医药大学动物实验中心[合格证书号:川实动管质第 SCXK(川)2009-11]; (2)分组:将 50 只大鼠随机分为空白组、模型组、模针组、模磁组、磁针组,每组 10 只; (3)动物在实验前适应性驯养 1 周。参考单个持续刺激(single prolonged stress, SPS)方法^[5],复制焦虑模型,即禁饿 2 h,强迫性游水 20 min,乙醚麻醉至意识丧失后,立即放回原笼,单笼饲养。

1.2.2 实验方法 空白组:每天在相同的时间进行与模针组相同的方法固定。模型组:在造模后次日,处理方法同空白组。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30701125);四川省教育厅自然科学基金资助项目(07ZA018)。△ 通讯作者, Tel: 028-66875857; E-mail: dmdmdd@yahoo. cn.

模针组:在造模后次日进行电针治疗。穴位选择:“百会”、“长强”,依据《实验针灸学》的动物穴位图谱模拟定位^[6]。接电针治疗仪,选用疏密波,频率 15~25 次/分。每天 1 次,持续 15 min,连续治疗 3 d。模磁组:在造模后次日,对大鼠头部进行 rTMS 治疗。运动阈值(motor threshold, MT)为 75%,刺激频率 18.3 Hz,400 个脉冲。每天 1 次,连续治疗 3 d。磁针组:在造模后次日,对大鼠先后进行电针和 rTMS 治疗,方法同模针组和模磁组。

1.2.3 指标检测方法 (1)行为学检测:在治疗结束后次日,按文献^[7-8]分别进行旷场实验(open field, OF)和高架十字迷宫实验(elevated plus maze, EPM)。(2)脑组织和血清采集:实验结束后,采用乙醚轻度麻醉各组动物,断头迅速取脑,置于液氮冷冻待测。参照脑立体定位图谱^[9],取海马和前额皮质组织块约 20 mg,进行组织匀浆。(3)MR 和 GR 基因表达指标测试:按照相关试剂盒说明书,运用一步法 RT-PCR 测试基因表达。MR mRNA 上游引物 3'-AAC AAA ATG CCC CAC GGT TA-5'(20 bp),下游引物 3'-GGG ACG ATG CAA TGG ACT GT-5'(20 bp)。GR mRNA 上游引物 3'-GGA TTT CCA GAG CCC ACC AT-5'(20 bp),其下游引物 3'-CAT TCC TGA TGG TCA CCT CG-5'(20 bp)。

1.3 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件中一般线性模型(general linear models),运用多变量方差分析(multivariate)与多重比较(post hoc test)分析组间差异,利用析因设计的方差分析检验两种疗法有无交互作用。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 行为学实验 旷场实验结果:与空白组相比,模型组大鼠垂直运动次数明显减少($P < 0.05$);与模型组相比,模磁组、磁针组水平移动格数、垂直运动次数显著增加($P < 0.01$),模针组垂直运动次数显著增加($P < 0.01$);而磁针组较模针组、模磁组水平移动格数、垂直运动次数均显著增加($P < 0.05$)。十字迷宫实验结果:与空白组比较,模型组大鼠 OT%值、OE%值明显下降($P < 0.01$);与模型组相比,治疗 3 组 OT%值、OE%值均显著增加($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 行为学实验各组指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	旷场实验		十字迷宫实验	
	水平移动格数	垂直运动次数	OT%	OE%
空白组	110.67±13.35	18.45±4.32	0.36±0.12	0.46±0.19
模型组	99.33±21.62	12.67±3.78▲	0.11±0.06▲	0.13±0.12▲
模针组	107.56±15.48■	19.56±3.97★■	0.31±0.14★	0.32±0.11★
模磁组	121.00±13.65■	23.29±3.35■	0.30±0.12★	0.29±0.06★
磁针组	138.25±12.16★	30.00±6.76★	0.29±0.14★	0.31±0.14★

▲: $P < 0.05$, 与空白组比较; ★: $P < 0.05$, 与模型组比较; ■: $P < 0.05$, 与磁针组比较。

析因设计的方差分析结果显示,对行为学效应指标(OT%、OE%、水平移动格数和垂直运动次数)电针治疗的统计量 F 值分别为 6.500、8.594、5.154 和 15.073, P 值分别为 0.015、0.006、0.031 和 0.001, rTMS 4 个指标统计量 F 值分别为 4.617、5.043、21.778 和 36.140, P 值分别为 0.038、0.031、

0.000 和 0.000, 可认为两种治疗单独用有统计学意义,与表 1 结果基本一致。电针与 rTMS 同用时交互作用只在 OT%、OE% 两指标上差异有统计学意义(F 值分别为 7.657 和 5.478, P 值分别为 0.009 和 0.025), 表明在十字迷宫实验中电针、rTMS 同时运用显现抗焦虑协同效应。

2.2 各组大鼠海马、前额皮质 MR 和 GR 基因表达变化 大鼠经 SPS 造模后, (1)模型组海马 GR mRNA 的 CT 值、MR mRNA /GR mRNA 的 CT 值比值均较空白组升高($P < 0.05$); 而模针组和磁针组 GR mRNA 的 CT 值较模型组均有下降($P < 0.05$); MR mRNA 各组差异不明显($P > 0.05$)。结果见表 2。(2)模型组前额皮质 MR mRNA 和 GR mRNA 的 CT 值以及比值与空白组、治疗组比较差异不明显($P > 0.05$)。

由于 CT 值与起始模板拷贝数成反比, CT 值越大, 起始模板拷贝数越少, 表示基因表达量越少。因此结果提示, 造模后模型动物海马 GR 基因表达量、MR mRNA/GR mRNA 明显低于正常动物, 治疗各组均显示一定程度改善, 且电针和电针结合 rTMS 对海马 GR 基因表达量影响显著。

表 2 各组大鼠海马 MR 和 GR 的 mRNA CT 值及其比值的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MRmRNA	GR mRNA	MR mRNA/GR mRNA
空白组	18.72±1.59	16.93±2.26	1.12±0.18
模型组	17.92±1.38	18.94±2.42▲	0.96±0.11▲
模针组	17.82±2.39	16.89±2.18★	1.07±0.20
模磁组	17.18±2.46	17.08±2.32	1.03±0.26
磁针组	17.43±2.19	16.76±1.45★	1.04±0.13

▲: $P < 0.05$, 与空白组比较; ★: $P < 0.05$, 与模型组比较。

3 讨 论

焦虑障碍(anxiety disorder)是包括广泛性焦虑障碍、恐惧症、惊恐发作、创伤后应激障碍以及强迫症等在内的一组临床障碍^[10]。经过半个多世纪各国学者的研究, 已相继成功建立了各种各样的焦虑动物模型和检测方法。目前较多以 SPS 方法复制创伤后应激障碍(post traumatic stress disorder, PTSD)大鼠焦虑模型^[5,7,11-12]。OF 和 EPM 两项实验已成为国际公认有效评价动物焦虑情绪行为的常用测试方法^[7-8]。本研究选用 SPS 方法, 且单笼饲养, 造成动物躯体和心理应激刺激, 模型动物与正常比较有明显的焦虑样反应, 说明该焦虑模型塑造成功。本研究结果显示, 电针、rTMS 均有改善焦虑情绪反应的作用, 这与文献报道有一致性^[3-4,13]。电针结合 rTMS 抗焦虑协同效应的研究虽未见报道, 但本研究结果显示电针结合 rTMS 治疗焦虑抑郁具有协同效应^[14]。

目前关于电针结合 rTMS 抗焦虑机制研究尚缺乏。近年来研究表明 MR/GR 系统对焦虑、恐惧情绪反应等起重要作用。研究显示, 运用 SPS 造模大鼠, 24 h 急性应激后海马 GR 和 MR 的 mRNA 均降低, 可致 MR/GR 比值下降, 7、14 d 后 GR 升高、MR 仍下降, MR/GR 比值降低^[12]。在社会孤立应激模型(单笼饲养)研究中, 应激 1 周后在海马和丘脑 GR 结合率降低、顶叶皮质和垂体未见变化, MR 水平也未见变化; 3 周后在海马和丘脑下降的 GR 回复至正常水平, 而顶叶皮质 GR 结合率却下降, 海马和中隔组织的 MR 水平严重低下, 提示社会

应激刺激导致皮质激素受体持续下调以及不同脑区不同阶段 GR 和 MR 有不同变化^[15]。本研究结果显示,造模后 5 d 动物海马 GR 基因表达量、MR mRNA/GR mRNA 比值均发生了明显改变,即显著低于正常水平,而海马 MR 及前额皮质 GR 和 MR mRNA 表达水平均未现变化,这与文献报道有一定相似性。本研究 3 种治疗对模型动物海马 GR mRNA 表达量均有一定程度改善,且电针和电针结合 rTMS 影响明显。结合本研究结果,电针结合 rTMS 具有抗焦虑协同效应,其机制可能主要与改变海马 GR 基因表达有关。

综上所述,本研究初步揭示电针结合 rTMS 具有抗焦虑协同效应,其作用可能与调节肾上腺皮质激素受体基因表达相关,而基因表达改变后其下游分子事件是否参与了电针结合 rTMS 协同抗焦虑作用,尚待进一步探究。

参考文献:

- [1] Somers JM, Goldner EM, Waraich P, et al. Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature[J]. *Can J Psychiatry*, 2006, 51(2): 100-113.
- [2] Konnopka A, Leichsenring F, Leiblein E, et al. Cost-of-illness studies and cost-effectiveness analyses in anxiety disorders: A systematic review[J]. *J Affect Disord*, 2009, 114(1): 14-31.
- [3] 马铁明, 白增华, 任路, 等. 针刺治疗焦虑症疗效 Meta 分析[J]. *中国中医药信息杂志*, 2007, 14(2): 101-103.
- [4] Boggio PS, Rocha M, Oliveira MO, et al. Noninvasive brain stimulation with high-frequency and low-intensity repetitive transcranial magnetic stimulation treatment for posttraumatic stress disorder [J]. *J Clin Psychiatry*, 2010, 71(8): 992-999.
- [5] Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, et al. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder[J]. *Depress Anxiety*, 2009, 26(12): 1110-1117.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社,

2003, 327-329.

- [7] Wang HN, Peng Y, Tan QR, et al. Quetiapine ameliorates anxiety-like behavior and cognitive impairments in stressed rats: implications for the treatment of posttraumatic stress disorder[J]. *Physiol Res*, 2010, 59(2): 263-271.
- [8] Sidor MM, Rilett K, Foster JA. Validation of an automated system for measuring anxiety-related behaviours in the elevated plus maze[J]. *Neurosci Methods*, 2010, 188(1): 7-13.
- [9] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 75-84.
- [10] 邵福源, 王宇卉. 分子神经药理学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005, 4: 582-587.
- [11] Zhe D, Fang H, Shi YX. Expressions of hippocampal mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in the single-prolonged stress-rats[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2008, 41(4): 89-95.
- [12] Wang W, Liu Y, Zheng H, et al. A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder [J]. *Neuroscience Letters*, 2008, 441(2): 237-241.
- [13] Kanno M, Matsumoto M, Togashi H, et al. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on behavioral and neurochemical changes in rats during an elevated plus-maze test[J]. *J Neurol Sci*, 2003, 211(1/2): 5-14.
- [14] 何林丽, 郑重, 蔡定均, 等. 电针结合重复经颅磁刺激治疗焦虑抑郁共病随机对照研究[J]. *中国针灸*, 2011, 31(4): 294-298.
- [15] Buwalda B, Felszeghyb K, Horváth KM, et al. Temporal and spatial dynamics of corticosteroid receptor down-regulation in rat brain following social defeat[J]. *Physiol Behav*, 2001, 72(3): 349-354.

(收稿日期: 2011-02-21 修回日期: 2011-07-20)

(上接第 316 页)

- [13] Diringer MN, Edwards DF, Mattson DT, et al. Predictors of acute hospital costs for treatment of ischemic stroke in an academic center[J]. *Stroke*, 1999, 30(4): 724-728.
- [14] Lithner F, Asplund K, Eriksson S, et al. Clinical characteristics in diabetic stroke patients[J]. *Diabetes Metab*, 1988, 14(1): 15-19.
- [15] Arboix A, Rivas A, Garcia-Eroles L, et al. Cerebral infarction in diabetes: clinical pattern, stroke subtypes, and predictors of in-hospital mortality[J]. *BMC Neurol*, 2005, 5(1): 9-12.
- [16] Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, et al. Predictors of stroke in middle-aged patients with non-insulin-dependent diabetes[J]. *Stroke*, 1996, 27(1): 63-68.
- [17] Celli B, Decramer M, Leimer I, et al. Cardiovascular safety

of tiotropium in patients with COPD[J]. *Chest*, 2010, 137(1): 20-30.

- [18] Reggiani M. Five-year survival after first-ever ischaemic stroke is worse in total anterior circulation infarcts: the SINPAC cohort[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2009, 27(1): 29-36.
- [19] Di Carlo A, Lamassa M, Baldereschi M, et al. Risk factors and outcome of subtypes of ischemic stroke. Data from a multicenter multinational hospital-based registry. The European Community Stroke Project[J]. *J Neurol Sci*, 2006, 244(1/2): 143-150.
- [20] Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, et al. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events [J]. *Stroke*, 2004, 35(5): 1147-1152.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-06-22)