

重复经颅磁刺激对慢性应激抑郁大鼠抑郁行为及海马神经元再生的影响

张小乔 李鹏 霍江涛 潘庆敏 严洁

【摘要】目的 观察重复经颅磁刺激 (rTMS) 对慢性应激抑郁大鼠抑郁行为及海马神经元再生的影响,并探讨 rTMS 治疗抑郁症的可能机制。**方法** 共选取 36 只雄性 SD 大鼠,采用随机数字表法将其分为对照组、模型组及 rTMS 组。采用长期、不可预见性、中等强度应激将模型组及 rTMS 组大鼠制成抑郁动物模型,对照组大鼠未给予特殊处理。rTMS 组于制模成功后给予 rTMS 治疗。各组大鼠分别于治疗前及治疗 2 周后采用 Open-field 试验检测行为学改变;采用免疫组织化学染色法检测海马齿状回区 (DG) 神经前体细胞标记物-巢蛋白 (Nestin) 表达,并通过检测 5-溴脱氧尿苷 (BrdU) 水平观察 DG 区神经前体细胞增殖情况,选用 Western blot 法检测各组大鼠海马脑源性神经营养因子 (BDNF) 表达。**结果** 对照组大鼠 DG 区存在神经前体细胞,并且其中一些细胞处于分裂增殖状态;与对照组比较,模型组大鼠 DG 区神经前体细胞数量明显减少,增殖功能明显减弱,同时海马区 BDNF 表达亦显著降低;与模型组比较,rTMS 组行为学评分明显改善,DG 区神经前体细胞数量及增殖功能均明显提高,海马区 BDNF 表达亦显著增强。**结论** rTMS 能改善抑郁症大鼠抑郁行为,其治疗机制可能与 rTMS 增强海马 BDNF 表达,从而提高 DG 区神经前体细胞数量、促进其增殖有关。

【关键词】 重复经颅磁刺激; 抑郁症; 海马; 神经元再生

Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on depression behavior and hippocampus neuron regeneration in chronic stress depression rats ZHANG Xiao-qiao, LI Li, HUO Jiang-tao, PAN Qing-min, YAN Jie. Department of Neurology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

【Abstract】Objective To study the effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on depression behavior and hippocampus neuron regeneration in rats with chronic stress depression and to explore the therapeutic mechanism of rTMS on depressive disorder. **Methods** Thirty-six rats were divided into a control group, a model group and a rTMS group randomly, with 12 rats in each group. The depression model of rat was established by exerting long-term unpredictable moderate stress on the animals. Rats in rTMS group were given rTMS treatment after stress, while those in the control group were not given rTMS treatment. Open-field test was performed to test depression behavior of rats in each group before and after 2 weeks of rTMS treatment. Immunohistochemistry technique was used to detect expression of nestin, a marker of dentate gyrus (DG) neural precursor cells. Neuron regeneration was observed by use of 5-bromodeoxyuridine (5-BrdU). The expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus was detected through western blot. **Results** There observed neural precursor cells in DG area of rats in control group and some of them were proliferating. Compared with control group, the number of DG progenitor cells and proliferating ability of DG progenitor cells decreased in model group. The expression level of BDNF in model group was lower than that in model group as well. After rTMS treatment, depression behavior of rats in rTMS group improved significantly, number of DG progenitor cells increased and proliferating ability of DG progenitor cells elevated significantly. The expression level of BDNF in rTMS group was higher than that in model group as well. **Conclusion** rTMS therapy could ameliorate depressive behavior of depression rat. The therapeutic mechanism may be associated with rTMS promoting expression of BDNF in hippocampus, which increasing number of neural precursor cells in DG and promoting the proliferation DG neurons as results.

【Key words】 Repetitive transcranial magnetic stimulation; Depression; Hippocampus; Neuron regeneration

重复经颅磁刺激 (repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS) 是在经颅磁刺激基础上发展起来的一项新的神经电生理技术,目前临床已将其用于治疗

抑郁症患者。关于 rTMS 治疗抑郁症的确切机制尚未明了,相关研究表明其治疗机制涉及多个方面,包括调节脑内单胺类递质水平、调整机体睡眠节律及生物周期、改善大脑额叶血流及代谢等^[1-3]。近年来海马神经再生障碍假说是抑郁症病因学研究的重大突破之一^[4],许多抗抑郁药物均是通过影响海马神经元增

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.03.002

作者单位:442000 十堰,湖北医药学院附属太和医院干部病房神经内科(张小乔、霍江涛、严洁),干部病房心血管内科(潘庆敏),药学部(李鹏)

殖、分化及存活,促进神经细胞再生而发挥抗抑郁功效^[5];而关于 rTMS 是否也能通过影响海马神经元再生而发挥抗抑郁作用目前鲜见报道。基于上述背景,本研究通过观察 rTMS 对慢性应激抑郁大鼠海马神经元再生及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响,以进一步探讨 rTMS 治疗抑郁症的可能机制,为其更广泛的临床应用提供理论依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物与分组:共选取健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 成年大鼠 36 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,鼠龄 12 W,体重 180~220 g,在自由饮食、光/暗周期为 12 h/12 h、背景噪音为(40±10)db、温度为(20±3)℃条件下饲养 1 W 以适应环境;然后采用 Open-field 试验进行行为学评分,选择评分相近的大鼠,采用随机数字表法将其分为对照组、模型组及 rTMS 组,每组各 12 只。

2. 主要试剂及仪器:主要试剂包括 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxy-uridine, BrdU)、小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(1:200 稀释)、兔抗 Nestin 多克隆抗体(1:500 稀释)、小鼠链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(strept-avidin-biotin complex, SABC)试剂盒、兔 SABC 试剂盒(美国 Sigma 公司)、兔抗 bFGF IgG (Santa Cruz, USA)、蛋白质 marker (Promega 公司)、Western blot 检测试剂盒(Amersham 公司);主要仪器包括 Olympus 光学显微镜、HPIAS-1000 型彩色图像分析系统等。

二、制模方法

参照文献[6,7]将模型组及 rTMS 组大鼠制成慢性应激抑郁模型,具体制模方法如下:大鼠单笼喂养 21 d,期间给予各种刺激,包括电击足底、冰水游泳、热应激、束缚、夹尾、禁水、禁食及昼夜节律颠倒等。对照组大鼠群养,饲养期间无特殊处理。

三、rTMS 治疗

rTMS 组大鼠于制模 21 d 后给予 rTMS 治疗,采用丹麦 Dantec 公司产 Maglite Compact 磁刺激器,磁刺激线圈直径 12 cm,峰值刺激强度为 1.2 T,脉冲时限为 100 μs,选择 60% 最大刺激强度(约 0.72 T)刺激大鼠双侧脑半球,将刺激线圈紧贴大鼠头皮,线圈平面与大脑半球相切,磁刺激频率为 0.5 Hz,每侧刺激 30 次为 1 个序列,每日刺激 2 个序列,左、右侧各刺激 1 个序列,时间间隔 8 h,连续治疗 14 d。模型组及对照组大鼠均于相同时间点模拟磁刺激环境,但不给予 rTMS 治疗。

四、抑郁行为学测试

1. Open-field 试验:于 rTMS 治疗前及 rTMS 治疗 14 d 后进行,检测时保持室内隔音,将实验大鼠置于尺寸规格为 80 cm(长)×80 cm(宽)×40 cm(高)、周边不透明的敞箱中,于大鼠安静状态下记录其 5 min 内的活动情况,以大鼠穿越底面(3 爪以上跨入)方格数量为水平活动得分,以直立次数(两前肢离地 1 cm 以上)为垂直活动得分,每次测试后均需将动物排泄物清除干净。

2. 蔗糖水消耗试验:各组大鼠于上述时间点禁食、禁水 24 h 后给予 1% 蔗糖溶液,测定其 1 h 内饮用量。

五、大鼠海马标本制备及免疫组化检测

对照组、模型组及 rTMS 组于 rTMS 治疗结束前 24 h 各取 6 只大鼠,在处死前按每千克体重 50 mg 腹腔注射 BrdU,共注射 3 次,每 6 h 注射 1 次,于最后一次注射完毕 12 h 后经过量 10% 水合氯醛麻醉,开胸经左心室插管至升主动脉,先用 100 ml 生理盐水快速冲洗血液,接着用 400 ml、浓度为 4% 多聚甲醛 PBS 液灌注固定,然后将大鼠断头取脑,将脑组织置于 4% 多聚甲醛液中固定过夜,随后石蜡包埋,选择右侧海马部位进行连续冠状位切片,片厚 10 μm。采用 SABC 法对相同层面切片进行 BrdU 及 Nestin 免疫组化染色,在进行 BrdU 染色时,加入一抗前标本先用 2 N 盐酸(37℃)作用 1 h 以充分暴露抗原,将显色后的标本置于×200 倍显微镜下镜检,并随机取 5 个视野照相,采用图像处理软件进行分析。BrdU 染色以细胞浆内出现棕褐色颗粒者为阳性,Nestin 染色以细胞核内出现棕褐色颗粒者为阳性,分别对各组标本阳性细胞数量进行统计。每份标本的 BrdU 阳性细胞数取 5 个视野的平均值。

六、大鼠海马区 BDNF 检测

对照组、模型组及 rTMS 组于 rTMS 治疗 14 d 后各取 6 只大鼠采用过量水合氯醛麻醉,快速断头取脑,在显微镜下切取右侧海马脑组织制备蛋白质样品,并采用 Western blot 技术检测 BDNF 表达,随后采用凝胶图像处理系统进行扫描拍照,选用 BandScan V5.0 版凝胶图像处理软件分析各目标条带灰度值(A 值),以 BDNF/β-actin 比值表示 BDNF 相对水平。

七、统计学分析

本研究所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 版统计学软件包进行分析,计量资料比较采用 *t* 检验,多组样本均数间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠行为学变化

1. 蔗糖溶液消耗量比较: 治疗前模型组及 rTMS 组大鼠蔗糖溶液消耗量均较对照组显著下降; rTMS 组大鼠经 rTMS 治疗后, 其蔗糖溶液消耗量较治疗前及模型组均显著增加, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 具体数据详见表 1。

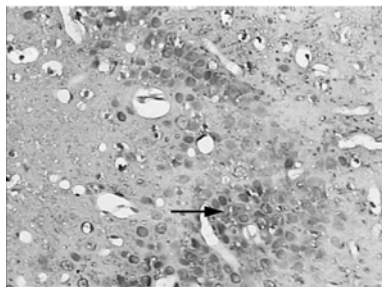
2. Open-field 试验结果比较: 治疗前模型组、rTMS 组大鼠水平运动及垂直运动得分均较对照组明显降低 ($P < 0.05$), 表明两组大鼠均出现明显抑郁行为; rTMS 组大鼠经 rTMS 治疗后, 其水平运动及垂直运动得分较治疗前及模型组均显著增高 ($P < 0.05$), 表明该组大鼠抑郁行为得到明显改善, 具体数据详见表 1。

表 1 治疗前后各组大鼠蔗糖溶液消耗量及 Open-field 试验评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	蔗糖溶液消耗量 (ml)	Open-field 试验 (分)	
			水平运动	垂直运动
对照组	12			
治疗前		14.23 ± 2.06	52.36 ± 10.72	18.03 ± 4.95
治疗后		16.35 ± 2.15	53.25 ± 11.64	18.50 ± 5.46
模型组	12			
治疗前		8.79 ± 1.82 ^a	14.28 ± 5.32 ^a	5.82 ± 3.15 ^a
治疗后		10.24 ± 1.98	18.16 ± 7.35 ^a	7.05 ± 3.72 ^a
rTMS 组	12			
治疗前		9.02 ± 1.75 ^a	13.95 ± 5.24 ^a	5.56 ± 3.07 ^a
治疗后		14.53 ± 2.05 ^{bc}	46.59 ± 9.82 ^{bc}	15.34 ± 4.28 ^{bc}

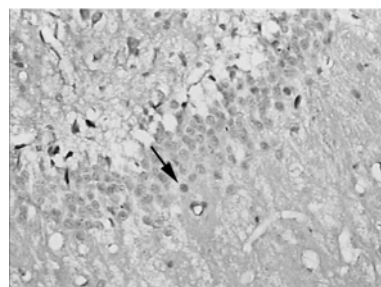
注: 与对照组相同时间点比较, ^a $P < 0.05$; 与组内治疗前比较, ^b $P < 0.05$; 与模型组治疗后比较, ^c $P < 0.05$

二、各组大鼠海马神经前体细胞数量及神经元再生情况比较



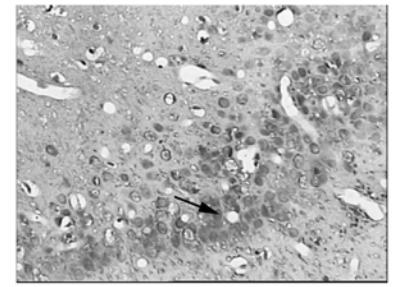
注: 箭头处为阳性细胞

图 1 对照组海马 DG 区 BrdU 阳性细胞表达 (免疫组化染色, ×200)



注: 箭头处为阳性细胞

图 2 模型组海马 DG 区 BrdU 阳性细胞表达 (免疫组化染色, ×200)



注: 箭头处为阳性细胞

图 3 rTMS 组海马 DG 区 BrdU 阳性细胞表达 (免疫组化染色, ×200)

三、各组大鼠海马 BDNF 表达比较

对照组大鼠海马区可见一定水平 BDNF 表达, 模型组大鼠海马区 BDNF 表达明显低于对照组, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, rTMS 组 BDNF 表达明显增强, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 具体情况详见图 4、表 2。

表 2 各组大鼠海马 DG 区 Nestin、BrdU 阳性细胞数量及海马 BDNF 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Nestin 阳性细胞数 (个/每高倍镜视野)	BrdU 阳性细胞数 (个/每高倍镜视野)	BDNF/β-actin 比值 (OD 值)
对照组	6	10.36 ± 1.12	18.63 ± 1.96	0.42 ± 0.025
模型组	6	4.24 ± 0.28 ^a	6.53 ± 1.26 ^a	0.26 ± 0.014 ^a
rTMS 组	6	8.97 ± 0.86 ^b	17.05 ± 1.82 ^b	0.68 ± 0.031 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

讨论

相关动物实验及临床研究均表明, 长期、低水平应激源刺激容易导致抑郁症发生及发展^[7,8]。本研究采用慢性、不可预见性应激造成大鼠活动能力降低, 发现其水平运动及垂直运动次数均明显减少, 糖水消耗量下降, 其表现出的抑郁状态与人类抑郁症临床表现中的核心症状类似, 符合抑郁症动物模型的特征及要求,

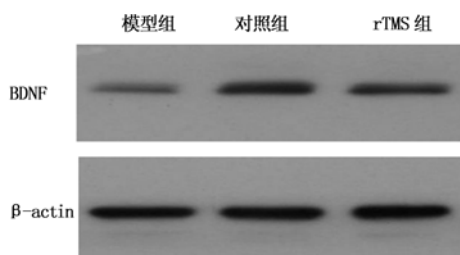


图 4 各组大鼠海马区 BDNF 表达比较

讨论

相关动物实验及临床研究均表明, 长期、低水平应激源刺激容易导致抑郁症发生及发展^[7,8]。本研究采用慢性、不可预见性应激造成大鼠活动能力降低, 发现其水平运动及垂直运动次数均明显减少, 糖水消耗量下降, 其表现出的抑郁状态与人类抑郁症临床表现中的核心症状类似, 符合抑郁症动物模型的特征及要求,

提示本研究抑郁症模型大鼠制作成功^[8]。

海马是大脑边缘系统重要组成部分,在学习记忆、情绪调节及内分泌、内脏活动中均具有重要作用,也是介导应激反应的重要脑区,慢性应激可损伤海马,引起其结构及功能发生改变^[8]。目前研究已证实,成年哺乳动物及灵长类动物(包括人)脑内某些特定区域,如海马齿状回颗粒下层(subgranular zone, SGZ)存在神经前体细胞,具有增殖、分化潜能,可分化为神经元及神经胶质细胞,参与海马损伤后修复及神经组织再生^[9]。Nestin 是神经前体细胞的标记蛋白,Brdu 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞增殖周期的 S 期可嵌入细胞核 DNA 中,通常被用来标记具有增殖活性的细胞^[10]。因此本研究采用免疫组化法检测 Nestin 阳性细胞及 Brdu 阳性细胞,以了解各组大鼠神经前体细胞数量及增殖情况;结果发现慢性应激抑郁大鼠海马 DG 区神经前体细胞数量较对照组明显减少,神经元再生能力明显减弱;经 rTMS 治疗后,发现抑郁大鼠海马 DG 区神经前体细胞数量明显增加,神经元再生能力也显著增强,大鼠抑郁行为亦得到明显改善,提示 DG 区神经元在抑郁症发生及恢复过程中均扮演重要角色,与 Perera 等^[11]应用抗抑郁剂治疗抑郁症得出的研究结果基本一致,同时也进一步验证了抑郁症与海马神经再生障碍有关。

BDNF 是哺乳动物脑内分布最广、含量最高的神经营养因子家族成员之一,对神经元生长、增殖及分化等方面均具有重要作用。近年来“神经营养假说”认为人类抑郁障碍与脑部 BDNF 表达降低及功能下调有关,即 BDNF 表达降低或功能下调会引起海马、皮质神经元发生形态及功能改变,从而参与抑郁症的发生及发展过程^[12, 13]。国外有学者研究后指出, rTMS 治疗能增加对抗抑郁药物耐受患者血浆中的 BDNF 水平,从而改善患者抑郁症状^[14]。本研究结果也发现,慢性应激抑郁大鼠海马 BDNF 表达明显降低,这可能是引起大鼠海马 DG 区神经前体细胞数量减少、增殖减弱,并诱发抑郁的重要原因之一。rTMS 治疗能促进大鼠海马区 BDNF 表达上调,从而使 DG 区神经前体细胞数量增加、增殖能力增强,推测这可能是 rTMS 治疗抑郁症的重要机制之一。关于 rTMS 促进海马 BDNF 表达的机制,目前尚未明确,本研究推测可能是磁刺激的生物电效应影响了神经细胞的代谢及功能,使其细胞内信号通路发生适应性改变,导致 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)上调,由于 CREB 又是调节 BDNF 表达的重要转录因子,故对提高 BDNF 水平具有重要意义^[15, 16]。

目前关于 rTMS 治疗抑郁症的参数(包括频率和强度选择)尚未达成一致,临床及基础研究多选择高频、低强度磁刺激,但 Sachdev 等^[17]研究指出,频率为

1 ~ 25 Hz 的低频或高频 rTMS 均有显著抗抑郁作用,且两者间疗效无明显差异。本研究选择低频、低强度 rTMS 作用抑郁大鼠,发现能上调大鼠 DG 区 BDNF 表达,促进 DG 区神经前体细胞增殖及神经元再生,对慢性应激抑郁大鼠的抑郁行为具有显著改善作用。

参 考 文 献

- [1] Ben SD, Guzawi H, Riboyad LJ, et al. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation alters beta-adrenergic and 5-HT₂ receptor characteristics in rat brain. *Brain Res*, 1999, 816:78-83.
- [2] Cohrs S, Tergau F, Riech S, et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation delays rapid eye movement sleep. *Neuroreport*, 1998, 9:3439-3443.
- [3] Conca A, Peschina W, Konig P, et al. Effect of chronic repetitive transcranial magnetic stimulation on regional cerebral blood flow and regional cerebral glucose uptake in drug treatment-resistant depressives. *Neuropsychobiology*, 2002, 45:27-31.
- [4] Taylor C, Fricker AD, Devi LA, et al. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell Signal*, 2005, 17:549-557.
- [5] Malberg JE, Duman RS. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 2003, 28:1562-1571.
- [6] Murua VS, Gomez RA, Andrea ME, et al. Shuttle-box deficits induced by chronic variable stress: reversal by imipramine administration. *Pharmacol Biochem Behav*, 1991, 38:125-130.
- [7] 许晶, 李小秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价. *中国行为医学科学*, 2003, 12:14-17.
- [8] Wu HH, Wang S. Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression. *Behav Brain Res*, 2010, 213:94-102.
- [9] Gonzalez PO, Jauregui HF, Galvez CA. Immune system modulates the function of adult neural stem cells. *Curr Immunol Rev*, 2010, 6:167-173.
- [10] Kadam SD, Mulholland JD, McDonald JW, et al. Poststroke subgranular and rostral subventricular zone proliferation in a mouse model of neonatal stroke. *J Neurosci Res*, 2009, 87:2653-2666.
- [11] Perera TA, Coplan JD, Lisanby SH, et al. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neurosci*, 2007, 27:4894-4901.
- [12] Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*, 2007, 10:1089-1093.
- [13] 尹烈虎, 李学成, 陆地, 等. 抑郁模型大鼠脑脊液、海马和皮层组织源性神经营养因子的变化. *第三军医大学学报*, 2009, 31:230-232.
- [14] Zanardini R, Gazzoli A, Ventriglia M, et al. Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on serum brain derived neurotrophic factor in drug resistant depressed patients. *J Affect Disord*, 2006, 91:83-86.
- [15] Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci*, 1996, 16:2365-2372.
- [16] 张小乔, 梅元武, 刘传玉. 经颅磁刺激对脑梗死大鼠皮质 c-Fos 和 BDNF 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28:86-89.
- [17] Sachdev PS, McBride R, Loo C, et al. Effects of different frequencies of transcranial magnetic stimulation (TMS) on the forced swim test model of depression in rats. *Biol Psychiatry*, 2002, 51:474-479.

(修回日期:2011-03-20)

(本文编辑:易 浩)