

文章编号:1003-2754(2019)10-0887-03

# 单一延长应激对 Wistar 大鼠海马 Calcineurin 表达的影响

姜 淼, 王越甲, 安秋霖, 杨济菲, 马欣桐, 李思慧, 谢菊华

**摘要:** 目的 探讨创伤后应激障碍模型-单一延长应激对 Wistar 大鼠海马钙调神经磷酸酶(Calcineurin, CaN)表达的影响。方法 将 Wistar 大鼠( $n=30$ )随机分为单一延长应激组( $n=15$ )和对照组(Control,  $n=15$ )。前者对大鼠实施国际公认的创伤后应激障碍(posttraumatic stress disorder, PTSD)动物模型方法-单一延长应激(Single-Prolonged Stress, SPS)暴露,对照组不给予任何处理。14 d 后断脑取海马,通过 ELISA、Western blot、免疫组化等方法检测两组大鼠海马 CaN 的表达改变。结果 ELISA 结果显示单一延长应激暴露后大鼠海马组织匀浆 CaN 水平明显降低( $P<0.05$ );Western blot 检测示单一延长应激组大鼠海马 CaN  $\text{A}\alpha$  蛋白表达显著低于对照组( $P<0.01$ );免疫组化表明单一延长应激后 CaN  $\text{A}\alpha$  蛋白在海马  $\text{CA}_1$ 、 $\text{CA}_3$  区表达明显减少( $P<0.01$ ),而齿状回区(DG)无明显差异( $P>0.05$ )。结论 单一延长应激可致 CaN 下调, CaN 表达减少可能是 PTSD 海马损伤的重要分子机制之一。

**关键词:** 创伤后应激障碍; 单一延长应激; 海马; Calcineurin

中图分类号:R749 文献标识码:A

**The role of Calcineurin in hippocampus of the rat model of Posttraumatic stress disorder** JIANG Miao, WANG Yue-jia, AN Qiulin, et al. (Department of Histology and Embryology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the role of Calcineurin (CaN) in the rats of hippocampus in the model of Posttraumatic stress disorder. **Methods** Rats ( $n=30$ ) were randomly assigned into two groups ( $n=15$ , both), one group served as a control, while another was the experimental group, which was exposed to Single-Prolonged Stress (SPS). At 14 days after SPS exposure, hippocampus was collected, and the changes of CaN were examined by ELISA, Western blot and immunohistochemical methods. **Results** Our ELISA results showed that the levels of CaN from hippocampus tissue in SPS group were lower than that in the control group ( $P<0.05$ ); results of Western blot showed that the protein levels of CaN  $\text{A}\alpha$  downregulated in SPS group compared to the control group ( $P<0.01$ ); and immunohistochemical staining positive cells of CaN  $\text{A}\alpha$  were brown in the normal group, filled in the perikaryon. The immunoreactivity of CaN  $\text{A}\alpha$  at 14 days after SPS exposure was decreased, specifically in the pyramidal cell layer in the  $\text{CA}_1$  and the  $\text{CA}_3$  of hippocampus, but not in dentate gyrus (DG). **Conclusion** SPS down-regulated the expression of CaN in hippocampus, and changes of CaN may be one of important molecular mechanism on reduced cortex volume of PTSD.

**Key words:** Posttraumatic stress disorder; Single-prolonged stress; Hippocampus; Calcineurin

创伤后应激障碍(Posttraumatic stress disorder, PTSD)是经历或目睹严重威胁生命安全的创伤事件后出现的精神疾病<sup>[1,2]</sup>。这些创伤事件主要包括战争、地震海啸等自然灾害、性暴力等,同时严重躯体疾病如过敏性休克、截肢、尿毒症、致死性恶性肿瘤等也可导致 PTSD<sup>[3]</sup>,据报道约有 9.6% 的乳腺癌患者可发展为 PTSD,并严重影响患者的治疗及康复<sup>[4]</sup>。但至今为止,PTSD 发病机制尚不清楚。Calcineurin (CaN) 是大脑内广泛存在的、由催化亚基 A (CaN A) 和调节亚基 B (CaN B) 构成的四聚体蛋白磷酸酶<sup>[5]</sup>,参与了许多疾病如阿尔茨海默病、抑郁等的发生发展,在恐惧消退、神经元结构和兴奋性调节上发挥了重要作用<sup>[6,7]</sup>。本研究拟采用单一延长应激暴露建立 PTSD 动物模型,以观察 CaN 在 PTSD 致海马损伤中的表达改变,为 PTSD 发病机制研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 健康成年雄性 Wistar 大鼠( $n=30$ ),体重 180~210 g,由辽宁省长生生物有限公司提供。将大鼠随机分为正常对照组(Control 组,  $n=15$ )、单一延长暴露组 (SPS 组,  $n=15$ )。适应性喂养 7 d 后 SPS 组大鼠给予如下<sup>[8,9]</sup>应激暴露:禁饲大鼠 2 h;强迫游泳 20 min;休息 15 min 后乙醚麻醉 1~3 min 致深度昏迷。随后分笼常规饲养至 14 d 后取材进行后续试验。

收稿日期:2019-06-09;修订日期:2019-07-29

基金项目:辽宁省博士科研启动基金项目(No. 20170520016);辽宁省大学生科研基金(No. 201810164006);沈阳医学院科研基金(No. 20171005, No. 20163047)

作者单位:(沈阳医学院组织学与胚胎学教研室,辽宁 沈阳 110034)

通讯作者:谢菊华, E-mail: xjh814@126.com

### 1.2 方法

#### 1.2.1 ELISA 检测海马组织 CaN 水平

各组大鼠冰上快速剥离海马后,剪碎匀浆,1000 g/min 离心取上清。依据 ELISA 试剂盒(购自上海酶联生物有限公司)说明书进行后续操作,具体步骤如下:(1)标准品、待测样品各取 50 μl 加入 96 孔板孔内;(2)各孔内加入生物素标记的抗体(各 50 μl),震荡混匀后 37 °C 孵育 1.5 h;(3)甩去反应孔内液体,加入洗涤液,震荡 30 s,甩去洗涤液,用滤纸拍干。重复操作 3 次;(4)每孔加入亲和链酶素-HRP,37 °C 孵育 30 min;(5)按上述洗板后,加入 50 μl 终止液;(6)立即 450 nm 波长处测定各反应孔 OD 值,并换算出待测样品浓度。

#### 1.2.2 Western blot 检测 CaN 蛋白表达

取材时剥离海马组织,根据海马重量按 100 g: 0.3 ml 加入 RIPA 裂解液,超声粉碎后 12000 r/min,4 °C 离心后取上清。依据 BCA 蛋白定量试剂盒(购自北京鼎国)说明书检测蛋白浓度。各组分别取 50 μg 样品蛋白于 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳,电泳恒压 200 mA 转膜 1 h,5% 牛胚血清常温封闭 1.5 h,随后加入一抗 4 °C 过夜(CaN Aα: ABclonal 公司,1: 500 稀释;GAPDH:北京中杉金桥公司,1: 1000 稀释)。TBST 洗膜 10 min × 3 次后加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1.5 h。再次 TBST 洗膜 10 min × 3 次后 ECL 发光显影。对获得的条带经 Image J 软件分析,对各组灰度值 CaN Aα/GAPDH 的比值进行数据分析。

#### 1.2.3 免疫组化检测 CaN 蛋白分布

采用 0.4% 戊巴比妥钠对两组大鼠进行腹腔麻醉。麻醉成功后暴露心脏,剪开右心耳,用生理盐水灌流,直至流出液无色;随后用 4% 组织固定液灌流至大鼠肝脏发硬。取大鼠脑组织,并浸泡至固定液中 6 h 后采取石蜡包埋、切片待用。切片常规脱蜡水化后用 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 份) + 蒸馏水 (10 份) 去除内源性过氧化物酶,随后 5% BSA 封闭 0.5 h 后直接滴加一抗 CaN Aα (ABclonal 公司,1: 100) 4 °C 孵育过夜。PBS 冲洗后加入二抗,室温孵育 0.5 h 后滴加 DAB 显色液,光学显微镜下观察 CaN Aα 在不同海马分区的分布并用 Image J 软件分析 CaN Aα 阳性细胞所占百分比,并进行数据统计。

#### 1.2.4 统计学分析

所得数据均应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,灰度值及 CaN Aα 阳性细胞所占百分比等均用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,并进行两组独立样本间 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 ELISA 检测结果

SPS 组海马组织匀浆中 CaN 水平低于健康对照组 (*t* = 2.77, *P* < 0.05),提示单一延长应激后大鼠海马 CaN 水平降低(见图 1)。

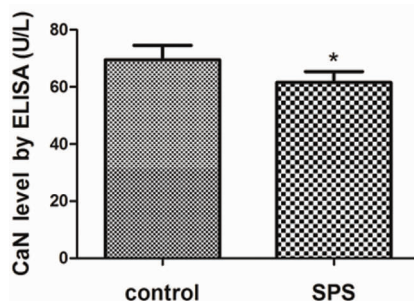
#### 2.2 Western blot 检测结果

CaN Aα 蛋白在正

常脑组织表达较多,尤其是海马组织<sup>[6]</sup>。单一延长应激后大鼠海马 CaN Aα 的表达明显降低,与正常对照组比较有显著差异 (*t* = 8.88, *P* < 0.01) (见图 2)。

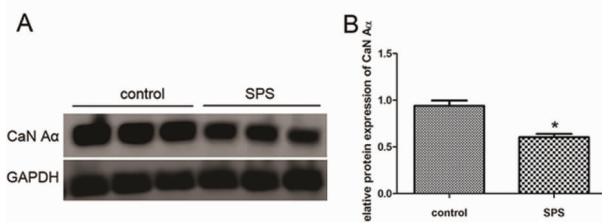
#### 2.3 免疫组化结果分析

CaN Aα 蛋白在正常大鼠和单一延长应激暴露大鼠海马不同区域的分布。CaN Aα 免疫组化阳性产物为棕黄色颗粒,单一延长应激后大鼠海马 CA<sub>1</sub>、CA<sub>3</sub> 神经元棕黄色颗粒所占面积明显减少(CA<sub>1</sub> 区两组比较, *t* = 3.766, *P* < 0.05; CA<sub>3</sub> 区两组比较, *t* = 5.42, *P* < 0.01),提示 SPS 暴露抑制了大鼠海马 CA<sub>1</sub>、CA<sub>3</sub> 区 CaN Aα 的表达,而齿状回(DG)区两组无明显差异 (*t* = 0.823, *P* > 0.05) (见图 3)。



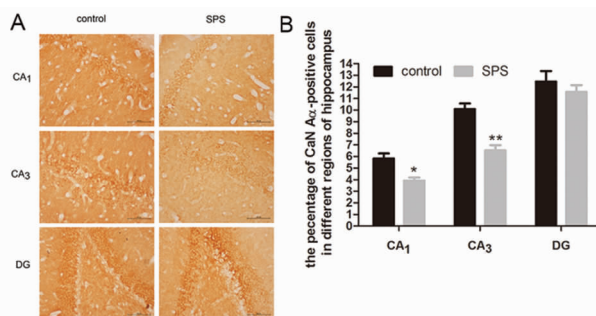
注: Control 代表正常对照组, SPS 代表单一延长应激组, 单一延长应激组 CaN 水平明显降低 (*P* < 0.05)

图 1 ELISA 方法检测单一延长应激组与正常对照组海马匀浆 CaN 的水平比较



注: Control 代表正常对照组, SPS 代表单一延长应激组, 单一延长应激组 CaN Aα 蛋白表达明显下调 (*P* < 0.05)

图 2 两组海马 CaN Aα 蛋白表达对比



注: Control 代表正常对照组, SPS 代表单一延长应激组, 单一延长应激组海马 CA<sub>1</sub> 区 CaN Aα 蛋白表达明显降低 (*P* < 0.05); CA<sub>3</sub> 区 CaN Aα 蛋白也明显降低 (*P* < 0.01)

图 3 两组 CaN Aα 蛋白在不同海马区域的比较

### 3 讨论

PTSD 多见于严重创伤事件后,患者常常表现出噩梦、高度警惕、持续回避、选择性遗忘等临床症状<sup>[1,2]</sup>。既往 PTSD 归属于焦虑障碍性疾病,但 2013 年第 5 版《American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders》(DSM-5) 提出“负性情绪和认知改变”也是其常见的临床症状之一,并将其从焦虑障碍中分离出来,归属于创伤和应激相关障碍性疾病。2018 年 WHO 第 11 版《International Classification of Diseases》支持并延续了 PTSD 的分类,PTSD 的临床诊断标准进一步得到细化和明确,慢性负性情绪与认知改变逐渐被重视和研究。

海马是机体情绪管理、学习认知、记忆等的重要调控结构<sup>[10]</sup>。长期负性情绪改变可使海马神经元可塑性降低、学习记忆能力降低、认知功能衰退和加速脑老化进程。而对海马体积缩小的 PTSD 患者给予认知行为治疗,患者海马体积可达到与对照组无明显差异<sup>[11]</sup>。由此可见,海马损伤是 PTSD 发生发展的关键,本研究以海马为主要研究结构,以探讨 PTSD 的具体发病分子机制。

CaN 是大脑内广泛存在的一种蛋白磷酸酶,参与了恐惧、抑郁、痴呆等许多疾病的发生发展,在神经元兴奋性、突触可塑性、记忆形成、情绪调控等上发挥了重要调控作用<sup>[5-7]</sup>。CaN 抑制剂是临床上器官移植患者常见的预防和排斥反应的药物,但长期使用可诱导患者出现抑郁样行为,如早期给予 CaN 抑制剂治疗的肾移植患者中,高达 66% 的患者出现抑郁<sup>[12]</sup>。同时动物模型实验结果发现,大脑杏仁核 CaN 下调是诱导焦虑和抑郁行为的充分条件<sup>[13]</sup>,CaN 是海马恐惧记忆的负性调节因子<sup>[14]</sup>。这些研究提示 CaN 功能抑制是引起抑郁情绪的重要机制。

在本研究中,我们观察发现单一延长应激暴露后大鼠海马组织匀浆 CaN 水平明显低于对照组( $P < 0.05$ )。而 Western blot 检测结果也表明 PTSD 模型大鼠海马 CaN A $\alpha$  蛋白表达显著低于健康对照组( $P < 0.01$ ),同时 CaN A $\alpha$  蛋白在海马 CA<sub>1</sub>、CA<sub>3</sub> 区表达显著减少( $P < 0.01$ ),而齿状回区(DG)无明显变化( $P > 0.05$ )。这些研究结果提示我们单一延长应激可致大脑海马 CaN 下调。鉴于 CaN 在抑郁、焦虑等负性情绪与恐惧记忆上的重要作用,我们有理由怀疑 CaN 下调与 PTSD 抑郁、焦虑、记忆力降低、认知减退有关,该方面尚待进一步深入研究。总之,本研究结果表明单一延长应激可下调大鼠海马 CaN

表达,CaN 抑制可能是 PTSD 海马损伤的重要分子机制之一。

### [参考文献]

- [1] Careaga MBL, Girardi CEN, Suchecki D. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016, 71: 48-57.
- [2] Garfinkel SN, Abelson JL, King AP, et al. Impaired contextual modulation of memories in PTSD: an fMRI and psychophysiological study of extinction retention and fear renewal[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(40): 13435-13443.
- [3] 张红霞,徐俊晔. 创伤后应激障碍诊断的研究进展[J]. *世界临床药物*, 2019, 40(5): 359-363.
- [4] Wu X, Wang J, Cofie R, et al. Prevalence of posttraumatic stress disorder among breast cancer patients: A meta-analysis[J]. *Iran J Public Health*, 2016, 45(12): 1533-1544.
- [5] Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium-and calmodulin-binding protein of the nervous system[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(12): 6270-6273.
- [6] Ni C, Li Z, Qian M, et al. Isoflurane induced cognitive impairment in aged rats through hippocampal calcineurin/NFAT signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(4): 889-895.
- [7] Liberzon I, Lopez JF, Flagel SB, et al. Differential regulation of hippocampal glucocorticoid receptors mRNA and fast feedback: relevance to post-traumatic stress disorder[J]. *J Neuroendocrinol*, 1999, 11(1): 11-17.
- [8] Xie JH, Han F, Shi YX. Single-prolonged stress activates the transcription factor ATF6a branch of the unfolded protein response in rat neurons of dorsal raphe nucleus[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 399: 209-216.
- [9] Van der Jeugd A, Ahmed T, Burnouf S, et al. Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2011, 95(3): 296-304.
- [10] 李 宁,刘紫阳,詹向红,等. 长期负性情绪应激对 D-gal 大鼠认知功能及海马 NR2B 基因甲基化表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 6: 702-707.
- [11] Levy-Gigi E, Szabo C, Kelemen O, et al. Association among clinical response, hippocampal volume, and FKBP5 gene expression in individuals with posttraumatic stress disorder receiving cognitive behavioral therapy[J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 74(11): 793-800.
- [12] Gok Oguz E, Ulusal Okayay G, Karaveli Garsoy G, et al. The impact of calcineurin inhibitors and mammalian target of rapamycin inhibitors on anxiety and depression scores in kidney transplant patients[J]. *Turk J Med Sci*, 2016, 46(5): 1341-1347.
- [13] Mineur YS, Taylor SR, Picciotto MR. Calcineurin downregulation in the amygdala is sufficient to induce anxiety-like and depression-like behaviors in C57BL/6J male mice[J]. *Biol Psychiatry*, 2014, 75(12): 991-998.
- [14] De la Fuente V, Federman N, Fustinana MS, et al. Calcineurin phosphatase as a negative regulator of fear memory in hippocampus: control on nuclear factor- $\kappa$ B signaling in consolidation and reconsolidation[J]. *Hippocampus*, 2014, 24(12): 1549-1561.