

· 基础研究 ·

## 成纤维细胞生长因子2对创伤后应激障碍模型大鼠行为及海马星形胶质细胞的影响

夏亮<sup>1</sup>, 王莉颖<sup>2</sup>, 翟明珠<sup>2</sup>, 吴迪<sup>1</sup>, 王玉同<sup>3\*</sup>, 朱霞<sup>1\*</sup>

(第四军医大学: <sup>1</sup>心理学教研室; <sup>2</sup>人体解剖与组织胚胎学教研室; <sup>3</sup>西京医院急诊科, 西安 710032)

**【摘要】目的** 探讨成纤维细胞生长因子2 (FGF2) 对创伤后应激障碍 (PTSD) 模型大鼠的行为以及海马星形胶质细胞的作用。**方法** 采用单次延长应激 (SPS) 建立大鼠PTSD模型, 然后在SPS大鼠第7d给予高剂量FGF2因子腹腔注射, 采用自发活动、高架十字迷宫方法观察高剂量FGF2单次给药对SPS模型大鼠行为学的影响; 同时利用星形胶质细胞标志物——胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 免疫荧光染色方法, 观察各组大鼠海马星形胶质细胞阳性表达的情况, 并利用双重荧光Western印迹法验证GFAP在不同实验组的蛋白表达情况。**结果** 与SPS组大鼠相比, FGF2高剂量给药后明显减轻SPS大鼠的焦虑或抑郁状态, 且明显增强海马内GFAP免疫反应阳性星形胶质细胞的表达。**结论** FGF2可明显改善SPS大鼠的焦虑或抑郁症状, 其治疗PTSD的机制可能与增加星形胶质细胞的活性有关。

**【关键词】** 应激障碍, 创伤后; 星形胶质细胞; 成纤维细胞生长因子2; 高架十字迷宫; 自发活动; 双重荧光Western印迹法; 大鼠

**【中图分类号】** R749.4

**【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2013.00077

## Impact of fibroblast growth factor 2 administration on behavior and hippocampal astrocytes in rats with posttraumatic stress disorders

XIA Liang<sup>1</sup>, WANG Li-Ying<sup>2</sup>, ZHAI Ming-Zhu<sup>2</sup>, WU Di<sup>1</sup>, WANG Yu-Tong<sup>3\*</sup>, ZHU Xia<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Psychology, <sup>2</sup>Department of Human Anatomy and Histology & Embryology, <sup>3</sup>Department of Emergency, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**【Abstract】 Objective** To determine the effect of fibroblast growth factor 2 (FGF2) injection on the behavior and astrocytes activation in the hippocampus in the rats of posttraumatic stress disorders (PTSD). **Methods** Single prolonged stress (SPS) was used to establish the PTSD rat model. Then a single high dose of FGF2 (50μg/kg) was given by intraperitoneal injection in 7d after the model establishment. Another 7d later, open-field test (OF) and elevated plus maze (EPM) test were used to evaluate rats' spontaneous activity, anxiety and depression behaviors. Immunofluorescence staining and double immunofluorescence Western blotting were used to detect the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampus in normal, PTSD, and FGF2 treated rats for astrocytes activation and expression level respectively. **Results** FGF2 treatment resulted in significantly decreased anxiety and depression behaviors compared with the PTSD rats, and enhanced the expression of GFAP obviously in the hippocampus. **Conclusion** FGF2 obviously attenuates anxiety and depression behaviors in the rats after SPS, which might be due to its enhancement in astrocyte activity in the hippocampus.

**【Key words】** posttraumatic stress disorders; astrocyte; fibroblast growth factor 2; elevated plus maze; spontaneous behavior; double fluorescence Western blotting; rats

*This work was supported by the Social Science Research Project in Shaanxi Province (2011K14-07-15).*

创伤后应激障碍 (posttraumatic stress disorder, PTSD) 是一种严重的灾难性事件或威胁 (如战争及自然灾害等) 所引发, 其主要症状为反复发生的闯入性记忆再体验、回避及持续的警觉性增高症候

群<sup>[1]</sup>。众多文献报道, 目前主要治疗PTSD的抗抑郁药物能增加海马内星形胶质细胞的活性。作为大脑中数量较多的细胞, 星形胶质细胞如何参与PTSD的发生机制仍不清楚。本实验采用单次延长应激

收稿日期: 2012-12-12; 修回日期: 2013-03-03

基金项目: 陕西省社科攻关课题 (2011K14-07-15)

通信作者: 朱霞, Tel: 029-84773112, E-mail: zhuxia@fmmu.edu.cn; 王玉同, Tel: 029-84774114, E-mail: wangyutong@fmmu.edu.cn

(single-prolonged stress, SPS)建立大鼠PTSD模型,利用胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)表达作为星形胶质细胞活化的指标,通过研究海马内GFAP的表达变化,来探讨海马星形胶质细胞是否参与PTSD的发病过程,并探讨成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)在治疗PTSD的焦虑或抑郁样行为中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠(均由第四军医大学动物实验中心提供),体质量在250~300g,鼠龄均为8周,各组动物的数量如图1所示。

### 1.2 动物模型的建立与FGF2给药

根据SPS方法建立模型<sup>[2]</sup>,即首先对大鼠进行2h的紧密束缚,随后进行15min的强迫游泳,直至大鼠暂时丧失运动功能,休息10min后进行乙醚麻醉至意识丧失,然后把动物放回鼠笼静养。正常大鼠在SPS期间禁食水。在建立SPS模型后第7d(SPS 7d)清晨,给予腹腔注射FGF2因子(Protech公司,美国),其剂量为50 $\mu$ g/kg大鼠体质量。单次给药结束后,将动物放回饲养室。在建立SPS模型后第14d(SPS 14d)时,将三组动物(正常、SPS 14d和SPS+FGF2组大鼠)给予行为学检测后处死,按照免疫组化和Western印迹法取材。

### 1.3 行为测定

(1)旷场实验:根据Blokland方法<sup>[3]</sup>,在直径为1.5m $\times$ 1.5m的黑暗旷场上方放置摄像头,监视动物在旷场内的活动情况,采集视频后由软件计算分析各项行为指标。具体为将大鼠放在旷场观察箱中,给予10s的适应期后,开始记录大鼠行为15min,分析大鼠在中央的活动时间及距离。(2)高架十字迷宫实验(elevated plus maze, EPM):参照Komada等<sup>[4]</sup>的方法,采用上海移数公司分析系统分析动物的各项行为指标。实验开始时将大鼠放于EPM的中央平台上,且鼠头统一朝向对侧开臂,5s适应期后,开始记录其行动5min,记录大鼠在开臂停留时间占总时间百分比以及大鼠进入开臂的次数百分比等行为学指标,在SPS造模结束后7d时测试正常组和SPS组的EPM和旷场实验,并且在SPS造模结束14d时测试正常组、SPS组和SPS+FGF2组的EPM和旷场实验。

### 1.4 免疫荧光染色

造模结束后第14d取脑切片,大鼠经生理盐水、4%多聚甲醛灌注,取脑并置于4%多聚甲醛溶液中后固定

4~6h,移入30%蔗糖PBS溶液中4 $^{\circ}$ C保存。待标本沉底后作脑冠状连续冰冻切片,片厚30 $\mu$ m。每只动物取连续5张切片,进行GFAP的免疫荧光染色。切片用0.01mol/L PBS漂洗3 $\times$ 10min后,分别加入单克隆小鼠抗GFAP(1:4000, Chemicon公司)和单克隆小鼠抗NeuN(1:4000, Chemicon公司)4 $^{\circ}$ C孵育48h后,再放在摇床上孵育过夜;孵育后用0.01mol/L的PBS漂洗3 $\times$ 10min,加入驴抗小鼠Alexa 488在室温下孵育6h;用PBS漂洗3 $\times$ 10min后,使用荧光封片剂封片,荧光共聚焦显微镜(FV1000, 奥林巴斯)拍照,为减少误差,所有组的切片都在相同染色和拍照条件下进行。三组动物均在SPS 14d时取脑进行免疫荧光染色。

### 1.5 Western印迹法测定蛋白

按照实验分组,将大鼠快速开颅取脑,冰上分离海马,加入含PMSF的单去污裂解液,匀浆裂解30min,将匀浆裂解液移入2.0ml离心管,13000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C离心5min,留取上清液,分装于0.5ml离心管,BCA法进行蛋白浓度测定,确定含10 $\mu$ g蛋白的上样体积。蛋白样品采用10%的SDS-PAGE进行电泳分离,加入预染Marker,根据预染Marker的位置确定所需蛋白GFAP、NeuN及 $\beta$ -actin的位置,将所需蛋白条带剪下,然后将胶上蛋白转移到PVDF膜上做免疫杂交反应(PVDF膜预先在甲醇中浸泡5min)。用含5%的脱脂奶粉的封闭液4 $^{\circ}$ C过夜,然后加入鼠抗GFAP抗体(1:4000, Chemicon公司),鼠抗 $\beta$ -actin(1:100, Santa Cruz公司),4 $^{\circ}$ C过夜后使用TBST洗膜,加入驴抗鼠Alexa Fluor 488(1:500, Santa Cruz公司)对GFAP标记的膜进行孵育2h,加入驴抗鼠的Alexa Fluor 594(1:500, Santa Cruz公司)对另外一张NeuN标记的PVDF膜进行孵育2h。后用TBST进行洗涤,10min/次,共3次。最后在博士德公司的Bio-Rad成像系统中进行荧光条带的扫描,并使用该软件进行分析,分析荧光密度值,以GFAP或NeuN与 $\beta$ -actin的荧光密度值之比来比较GFAP或NeuN蛋白的表达量。正常组和SPS+FGF2组均在SPS 14d时进行取材,而SPS组在SPS 7d和SPS 14d分别取材。

### 1.6 图像分析

使用激光共聚焦成像系统对海马GFAP免疫阳性星形胶质细胞拍照,计算单个视野下GFAP阳性细胞的数量。每个部位随机测试8张切片,每张切片选取8~12个视野(每1个视野面积约为50000 $\mu$ m<sup>2</sup>)。

### 1.7 统计学处理

采用SPSS13.0软件进行统计学分析,行为学和形态学结果用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,均数比

较采用ANOVA分析, 组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠旷场实验结果比较

SPS 7d组和SPS 14d组大鼠在旷场实验中的中央停留距离和中央停留时间均显著低于正常组(均 $P < 0.01$ )。正常SPS+FGF2给药组与正常组在旷场实验中的两指标的差异无统计学意义(图1A和B)。

### 2.2 各组大鼠EPM实验结果比较

与正常组相比, SPS 7d组和SPS 14d组大鼠在EPM中的开臂进入次数百分比和开臂停留时间百分比显著降低。与SPS 14d相比, SPS+FGF2给药组开臂进入次数百分比和开臂停留时间百分比显著升高(均 $P < 0.01$ ; 图1C和D)。

### 2.3 GFAP和NeuN在海马的免疫荧光表达分析

应用免疫荧光标记技术检测GFAP在海马的表达情况。GFAP阳性细胞呈绿色。在正常组及SPS+FGF2组中, 海马出现大量GFAP阳性细胞(图2C和F), 并且所有这些阳性细胞都是星形胶质细胞(图2)。与此相比, SPS组大鼠海马内GFAP阳性细胞数目明显减少(图2B和E)。提示SPS模型组显著抑制海马星形胶质细胞的活性。正常组(图2A和D)与SPS+FGF2组(图2C和F)海马星形胶质细胞数目接近。而神经元特异性标记物NeuN

的表达在三组中的差异无统计学意义。荧光强度分析结果表明, SPS组大鼠海马区的GFAP荧光强度与正常组和SPS+FGF2组的差异有非常显著统计学意义( $P < 0.01$ ), 其表达明显降低, 而海马区NeuN的荧光强度结果在三组间的差别无统计学意义( $P > 0.05$ ; 表1)。

### 2.4 GFAP和NeuN的Western印迹法结果分析

Western印迹法检测GFAP含量(荧光密度值), 结果显示: 与正常组比较, SPS 7d组GFAP表达明显减少[( $0.957 \pm 0.070$ ) vs ( $0.365 \pm 0.055$ ),  $P < 0.01$ ]; SPS 14d组GFAP的表达( $0.297 \pm 0.050$ )也明显减少( $P < 0.01$ ); SPS+FGF2组的GFAP( $0.939 \pm 0.076$ )与正常组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ; 图3); 同时, 本实验发现SPS 7d与SPS 14d组间GFAP表达的差异也无统计学意义。Western印迹法检测NeuN含量的结果显示, 正常组、SPS 7d组、SPS 14d组和SPS+FGF2组的差异均无统计学意义(图3)。

## 3 讨论

神经胶质细胞是神经组织中非常重要的一大类细胞群体。而目前认为星形胶质细胞在大脑信息处理及与神经元构成神经网络连接的过程中发挥重要作用<sup>[5]</sup>, 一个星形胶质细胞能与多个神经元进行信息交流, 而且它们在将营养物质运输到脑中起到了关键作用, 而任何通过血脑屏障的化学物质或药物都必须首

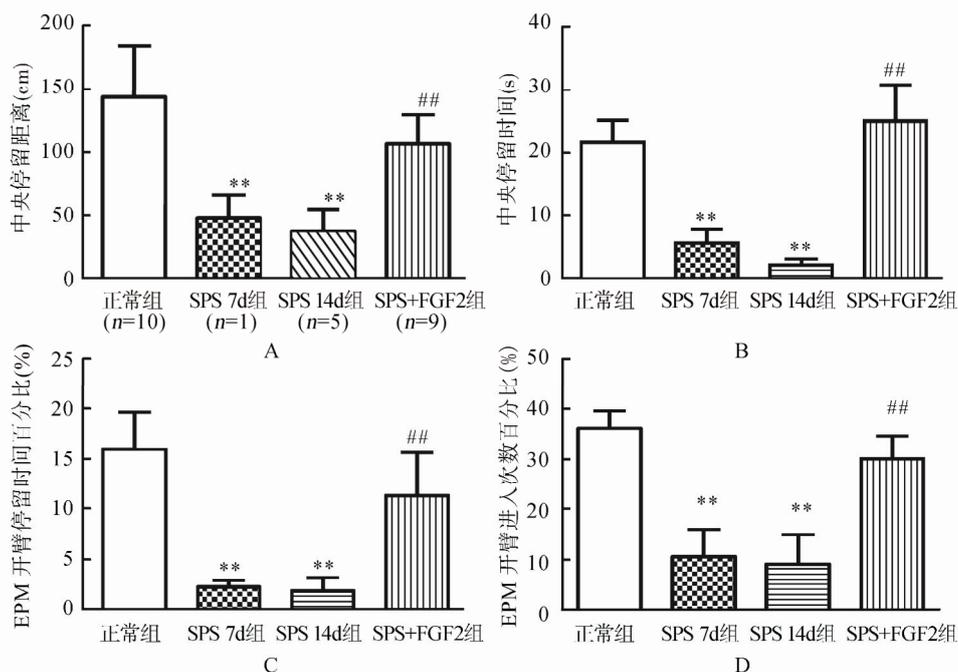


图1 各组大鼠旷场实验及EPM实验结果比较

Figure 1 Comparison of results in the open field test and elevated plus maze test in all groups  
A, B: 旷场试验; C, D: EPM实验。与正常组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与SPS 14d组比较, ## $P < 0.01$

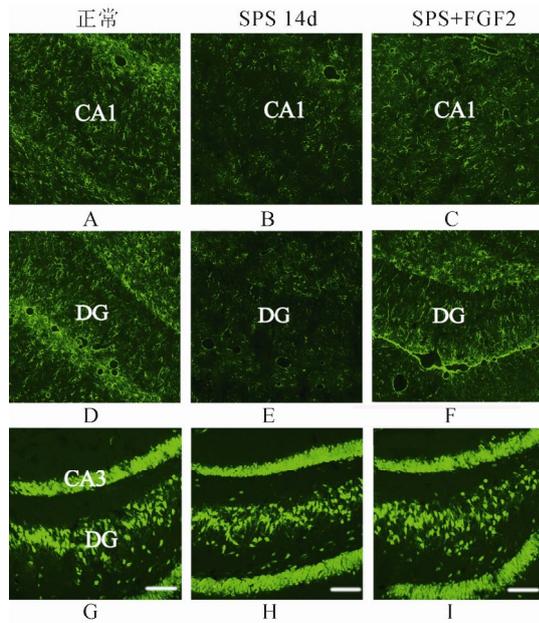


图2 各组大鼠海马区GFAP和NeuN免疫荧光染色

Figure 2 Immunofluorescent staining of GFAP and NeuN (green) in rat hippocampus (scale bar: 100μm)

A-C: 正常组、SPS 14d组、SPS+FGF2组的GFAP阳性细胞在CA1区的分布; D-F:正常组、SPS 14d组、SPS+FGF2组的GFAP阳性细胞在DG区的分布; G-I: 正常组、SPS 14d组、SPS+FGF2组的NeuN阳性细胞在CA3区的分布

表1 各组大鼠海马区GFAP和NeuN荧光强度分析

Table 1 Immunofluorescence intensity of GFAP and NeuN in rats hippocampus of three groups (n = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	GFAP	NeuN
正常组	93.12 ± 9.63	183.12 ± 27.68
SPS 14d组	41.35 ± 7.64**	173.12 ± 24.45
SPS+FGF2组	83.12 ± 8.37#	193.12 ± 18.32

注: 与正常组比较, \*\*P < 0.01; 与SPS 14d组比较, #P < 0.05

先与星形胶质细胞进行接触<sup>[6,7]</sup>。近年的最新研究表明, 星形胶质细胞在抑郁症的发生中发挥重要作用<sup>[8-10]</sup>, 而且在临床研究发现抑郁症患者的GFAP的表达明显减少<sup>[11,12]</sup>。但星形胶质细胞是否参与PTSD的发病过程, 目前国际上尚无相关报道。在本研究中, SPS模型组海马GFAP免疫反应阳性的星形胶质细胞数目明显减少, 且GFAP蛋白表达明显降低, 通过FGF2给药后, PTSD模型大鼠的焦虑或抑郁样行为明显减轻, 伴随GFAP的表达上调, 由此可见, 海马星形胶质细胞在PTSD发病过程中起重要作用。

本实验同时观察到, SPS组大鼠在旷场实验中的中央停留路程、中央活动时间明显减少, EPM迷宫实验结果显示SPS大鼠开臂进入次数的百分比和开臂停留时间百分比均明显缩短, 说明SPS大鼠的探究行为受到抑制, 回避和恐惧、焦虑水平增高, 环境适应能力下降, 这些症状都与PTSD发病的核心症状相似, 与既往研究结果一致<sup>[13]</sup>。研究表明, 脑室注射FGF2能明显改善大鼠抑郁状

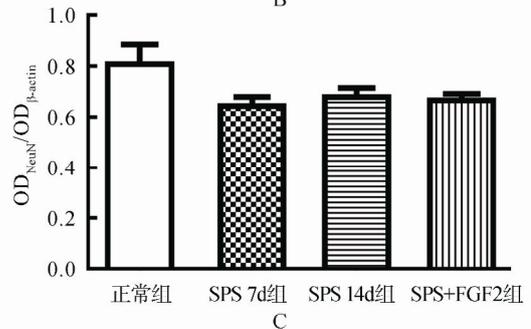
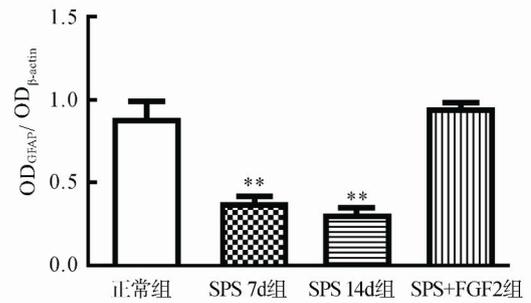
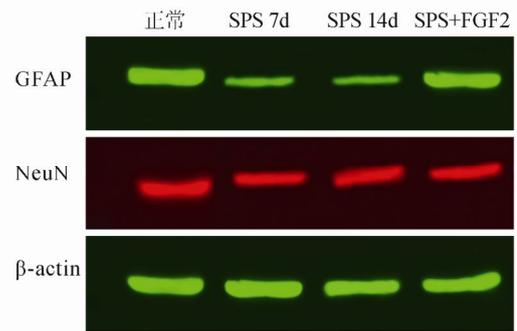


图3 海马区GFAP和NeuN表达的Western印迹结果图

Figure 3 Western blot analysis of GFAP and NeuN expression in hippocampus

A: Western印迹法检测; B, C: 蛋白灰度分析。各组n = 3。与正常组比较, \*\*P < 0.01

态<sup>[14,15]</sup>, 而全身性的皮下注射FGF2同样能减少大鼠的恐惧记忆的巩固, 并促进恐惧记忆的消退<sup>[16]</sup>。本研究采用高剂量单次FGF2腹腔注射, FGF2是否能通过血脑屏障进行到脑区发挥作用成了关键问题, 而文献表明FGF2作为一种生长因子, 能通过血脑屏障发挥作用<sup>[17]</sup>。研究发现, 内源性FGF2能增加星形胶质细胞的表达<sup>[18]</sup>, 我们的研究结果说明FGF2可能成为新型的PTSD的治疗药物, 其机制为调节了GFAP的表达来实现。

本研究提示FGF2通过激活海马星形胶质细胞来参与PTSD的治疗过程。但是FGF2通过何种途径进入海马区, 而且如何调节星形胶质细胞的活性, 这些问题还有待进一步研究。

【参考文献】

[1] Clayton PJ. PTSD, acute stress disorder, and DSM-V[J].

- Am J Psychiatry, 2004, 161(3): 584.
- [2] Yamamoto S, Morinobu S, Fuchikami M, *et al.* Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(9): 2108-2116.
- [3] Blokland A, Lieben C, Deutz NE. Anxiogenic and depressive-like effects, but no cognitive deficits, after repeated moderate tryptophan depletion in the rat[J]. *J Psychopharmacol*, 2002, 16(1): 39-49.
- [4] Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice[J]. *J Vis Exp*, 2008, (22) pii: 1088.
- [5] Paixao S, Klein R. Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2010, 20(4): 466-473.
- [6] Pretorius E, Marx J. Direct and indirect effects of corticosteroids on astrocyte function[J]. *Rev Neurosci*, 2004, 15(3): 199-207.
- [7] Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system[J]. *Mayo Clin Proc*, 2005, 80(10): 1326-1338.
- [8] Altshuler LL, Abulseoud OA, Foland-Ross L, *et al.* Amygdala astrocyte reduction in subjects with major depressive disorder but not bipolar disorder[J]. *Bipolar Disord*, 2010, 12(5): 541-549.
- [9] Yang K, Xie GR, Hu YQ, *et al.* Association study of astrocyte-derived protein S100B gene polymorphisms with major depressive disorder in Chinese people[J]. *Can J Psychiatry*, 2009, 54(5): 312-319.
- [10] Barley K, Dracheva S, Byne W. Subcortical oligodendrocyte- and astrocyte-associated gene expression in subjects with schizophrenia, major depression and bipolar disorder[J]. *Schizophr Res*, 2009, 112(1-3): 54-64.
- [11] Fatemi SH, Laurence JA, Araghi-Niknam M, *et al.* Glial fibrillary acidic protein is reduced in cerebellum of subjects with major depression, but not schizophrenia[J]. *Schizophr Res*, 2004, 69(2-3): 317-323.
- [12] Si X, Miguel-Hidalgo JJ, O'Dwyer G, *et al.* Age-dependent reductions in the level of glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex in major depression[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29(11): 2088-2096.
- [13] 刘俊丽, 夏亮, 王莉颖, 等. 单次延长应激导致的创伤后应激障碍行为伴随乳头体神经元活化[J]. *神经解剖学杂志*, 2012, 28(4): 397-400.
- [14] Turner CA, Gula EL, Taylor LP, *et al.* Antidepressant-like effects of intracerebroventricular FGF2 in rats[J]. *Brain Res*, 2008, 1224: 63-68.
- [15] Elsayed M, Banasr M, Duric V, *et al.* Antidepressant effects of fibroblast growth factor-2 in behavioral and cellular models of depression[J]. *Biol Psychiatry*, 2012, 72(4): 258-265.
- [16] Graham BM, Richardson R. Acute systemic fibroblast growth factor-2 enhances long-term extinction of fear and reduces reinstatement in rats[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2009, 34(7): 1875-1882.
- [17] Ye J, Lin H, Mu J, *et al.* Effect of basic fibroblast growth factor on hippocampal cholinergic neurons in a rodent model of ischaemic encephalopathy[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010, 107(6): 931-939.
- [18] Reuss B, Dono R, Unsicker K. Functions of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF-5 in astroglial differentiation and blood-brain barrier permeability: evidence from mouse mutants[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(16): 6404-6412.

(编辑: 胡晓晖)