

文章编号: 1005-8982(2016)01-0005-06

论著

## 电休克影响抑郁模型大鼠认知功能的机制研究\*

刘万富<sup>1</sup>, 陈国忠<sup>1</sup>, 刘鸿章<sup>2</sup>, 刘超<sup>3</sup>

(1. 南京军区福州总医院 麻醉科, 福建 福州 350025; 2. 河北大学附属医院 胃肠外科, 河北 保定 071000; 3. 天津市胸科医院 麻醉科, 天津 300222)

**摘要:目的** 观察不同电量和不同时长电休克(ECT)对嗅球切除抑郁模型大鼠海马谷氨酸(Glu)浓度和 Tau 蛋白过度磷酸化的影响以及 ECT 后学习记忆能力的变化。**方法** 建立大鼠嗅球切除抑郁模型,采用随机单位组 3×3 析因设计:将每只大鼠视为 1 个单位,对每个单位 2 个处理因素,即电流因子(3 水平:25、50 和 75 mA)和时长因子(3 水平:3、6 和 9 次 ECT)的所有组合(共 9 组, n=8)。全部 ECT 结束 24 h 内开始 Morris 水迷宫实验,检测实验大鼠海马区的长时程增强作用,留取海马组织。高效液相色谱法测海马中 Glu 的含量,免疫印迹法检测 p-AT8<sup>Ser202</sup>、GSK-3 $\beta$ <sup>T18</sup> 在海马中的表达。**结果** ECT 引发海马 Glu 浓度升高及 Tau 蛋白磷酸化加剧,同时学习记忆能力相应下降,ECT 的电流和时长均可影响该过程,两者的作用是相加的;GSK-3 $\beta$  是该过程信号通路的关键蛋白。**结论** ECT 导致海马中 Glu 浓度升高,从而加剧海马 Tau 蛋白的磷酸化程度,导致学习记忆障碍。

**关键词:** 电休克;抑郁症;微管相关蛋白;过度磷酸化;学习记忆能力

**中图分类号:** R749.054; R614.24

**文献标识码:** A

## Effect of electric shock on cognitive function in depression model rats and its mechanism\*

Wan-fu Liu<sup>1</sup>, Guo-zhong Chen<sup>1</sup>, Hong-zhang Liu<sup>2</sup>, Chao Liu<sup>3</sup>

(1. Department of Anesthesiology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fozhou, Fujian 350025, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China; 3. Department of Anesthesiology, Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300222, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of the electroconvulsive shock (ECT) of different electric current and different duration on the hyperphosphorylation of tau protein and the change of the learning-memory ability in depressed rats. **Methods** The depression rat model was established by removing olfactory bulbs. As the analysis of variance of factorial design, two intervention factors were set up which were the electric current groups (three levels: 25, 50 and 75 mA) and the duration groups (three levels: 3, 3 and 9 times electroconvulsive shock). Fifty-four adult depression model rats were randomly divided into 9 experimental groups (6 in each group). The morris water maze test started within 1 day after the course of electroconvulsive shock in order to evaluate learning-memory. The long-term potentiation was detected in the hippocampus of rats. The hippocampus was removed from rats within 1 day after the morris water maze test was finished. The content of glutamate in the hippocampus of rats was detected by the high performance liquid chromatography and the content of tau protein including p-AT8<sup>Ser202</sup> and GSK-3 $\beta$ <sup>T18</sup> in the hippocampus of rats was determined by Western blot. **Results** The electroconvulsive shock of different electric current and of different duration significantly up-regulated the content of glutamate and accelerated the hyperphosphorylation of tau protein and im-

收稿日期: 2015-02-10

\* 基金项目: 中国博士后科学基金(No. 2013M530880)

[通信作者] 刘鸿章, E-mail: 18931200299@189.com; Tel: 18931200299

• 5 •

paired learning-memory in depressed rats, with the performance of extending the evasive latency time and shortening the space exploration time in the depression model rats. The changes were correlated with the electric current and the duration of time of the electroconvulsive shock. GSK-3 $\beta$  was the key protein in this signaling pathway. **Conclusions** The results indicate that the electroconvulsive shock induces the impairment of learning-memory ability and the hyperphosphorylation of tau protein in depressed rats through up-regulated content of glutamate.

**Keywords:** electroconvulsive therapy; depression; tau protein; hyperphosphorylation; learning-memory ability

电休克(electroconvulsive therapy, ECT)后可出现谷氨酸(glutamic acid, Glu)信号系统功能异常<sup>[1]</sup>,可引起氧化应激,导致海马长时程增强作用(long-term potentiation, LTP)饱和状态和突触可塑性障碍。研究发现,兴奋性神经传递系统的激活在应激诱导的海马 Tau 蛋白的磷酸化中发挥作用<sup>[2]</sup>。本研究拟通过观察不同电量和不同时长 ECT 干预对嗅球切除抑郁模型大鼠认知功能,以及海马中 Glu 浓度和 Tau 蛋白过度磷酸化的影响,分析其分子生物学机制,以期为临床抑郁症治疗中,减少 ECT 后认知功能障碍提供理论依据和研究思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂及仪器** 色谱级 L-谷氨酸(L-glutamic acid, 美国 Sigma 公司),兔抗人 p-AT8<sup>Ser202</sup> 单克隆抗体(美国 Gene Tex 公司),小鼠抗人 GSK-3 $\beta$ <sup>1H8</sup> 单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司),二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),HPD-25D 型无油隔膜真空泵(上海鲁硕实业有限公司),YDJZ-II 型医用微型电动磨钻(上海慧恩医疗器械有限公司),Harvard 啮齿类动物 ECT 仪(美国自然基因有限公司),Morris 水迷宫视频分析系统(北京军事医学科学院),高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)系统(美国 Waters 公司),蛋白电泳系统(美国 Bio-rad 公司),金盘多媒体图像处理系统(成都金盘电子科大多媒体技术有限公司),光学显微照相系统(Olympus-45, 日本 Olympus 公司)。

**1.1.2 实验动物** 24 周健康雄性 SD(Sprague Dawley)大鼠,体重 250~300 g,由天津医科大学实验动物科学部提供。将大鼠置通风良好、12 h 明暗交替、

自由饮水摄食环境,每日触摸 2 min,使其适应实验室环境。适应性饲养 1 周后,建立大鼠嗅球切除抑郁模型<sup>[3]</sup>:2.75%戊巴比妥钠(55 mg/kg)腹腔注射麻醉,在两耳连线中点切开皮肤,暴露颅骨,距前凶前 7~8 mm 与正中缝两侧旁开 2 mm 的交点处,用电动磨钻将颅骨钻 2 个直径 2 mm 小孔,探针搅动破坏嗅球后,用真空泵吸出全部被破坏的嗅球组织,吸收性明胶海绵填入止血。青霉素溶液(20 万 u/ml)冲洗切口,缝合皮肤,肌内注射青霉素钠 4 万 u/只,连续给药 3 d。术后每天抚摸大鼠并称量,恢复 2 周后进行 Open field 测试,测试于上午 9:00 开始,选取 72 只总分为 30~120 的大鼠。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物实验原则** 经重庆医科大学伦理委员会批准后进行实验,按美国医学研究协会《实验动物处理原则》、美国科学学会和国家卫生研究院《实验动物使用和处理指南》进行,遵循双盲原则,大鼠孤笼饲养。

**1.2.2 实验动物分组** 采用随机单位组 3 $\times$ 3 析因设计:将每只大鼠视为 1 个单位,每个单位设计 2 个处理因素,即电流因子(3 水平:25、50 和 75 mA)和时程因子(3 水平:3、6 和 9 次 ECT)的所有组合(共 9 组,  $n=8$ )。

**1.2.3 实验动物干预措施** 通过随机数字发生器将 72 只嗅球切除抑郁模型大鼠随机分为 9 个实验组( $n=8$ ): I 组(25 mA, 3 次 ECT); II 组(25 mA, 6 次 ECT); III 组(25 mA, 9 次 ECT); IV 组(50 mA, 3 次 ECT); V 组(50 mA, 6 次 ECT); VI 组(50 mA, 9 次 ECT); VII 组(75 mA, 3 次 ECT); VIII 组(75 mA, 6 次 ECT); IX 组(75 mA, 9 次 ECT)。

**1.2.4 电休克处理** 于大鼠双颞侧安放电极,用 Harvard 啮齿类动物 ECT 仪行 ECT 处理:方波(单个正弦半波 20 ms),相应电流(25、50 和 75 mA),频率 50 Hz,持续 1 s 电刺激,引起强直阵挛发作为治疗

成功<sup>10</sup>,隔天 1 次,共次数(3、6 和 9 次),于上午 9:00 开始。

**1.2.5 Morris 水迷宫视频分析系统检测实验大鼠的学习记忆能力** 全部大鼠电休克结束 24 h 内开始 Morris 水迷宫实验。Morris 水迷宫被均分为 I、II、III、IV 4 个象限。训练前,水迷宫内盛自来水,加墨汁使水浑浊,检测前将平台置 I 象限水面下 2 cm。实验在上午 9:00~下午 3:00 进行,保持室内安静,物品放置及灯光状态一致,水温(24±1)℃。Morris 1.0 软件跟踪并记录分析相关数据。第 1~6 天进行定位航行实验:按逆时针方向分别从 I、II、III、IV 4 个象限将大鼠面向池壁放入水中,计时 120 s,检测前将平台置 I 象限正中水面下 2 cm。摄像系统记录大鼠寻找并爬上平台的时间为逃避潜伏期(escape latency, EL),若 120 s 内还未找到平台,则引导其至平台,停留 30 s,逃避潜伏期记 120 s。检测结束后以第 1~6 天逃避潜伏期的平均值作为学习成绩,逃避潜伏期越短则学习能力越好。第 7 天进行空间探索实验:撤除平台,将大鼠从距原平台最远的 III 象限面向池壁放入水中,摄像系统记录大鼠 60 s 内在各象限的游泳时间,以在原平台象限 I 象限游泳时间即空间探索时间(space exploration time, SET)作为记忆成绩,空间探索时间越长则记忆能力越好。

**1.2.6 检测实验大鼠海马区的长时程增强作用** 长时程增强作用,又称长期增益效应,是发生在 2 个神经元信号传输中的一种持久的增强现象,能够同步刺激 2 个神经元,与突触可塑性能力相关,LTP 是构成学习与记忆基础的主要分子机制。实验动物使用 10%乌拉坦溶液腹腔麻醉(18 ml/kg),将麻醉后的大鼠头部固定于江湾 I 型立体定位仪上,暴露头骨。刺激电机为双极电极,由 2 根彼此接近但又相互绝缘的钢丝构成(尖端直径约 100 μm、尖端相距 0.3 μm),插入位点为海马穿通纤维角状束(其颅骨立体定位坐标:以人字缝为零点,向后 7.8 mm,中线偏右 4.4 mm,深度 2.8~3.0 mm)。记录电极为 2 mol/L NaCl 灌制的玻璃微电极,尖端为 3~5 μm,阻抗 1~3 MΩ,记录细胞外场电位反应,插入位点是海马齿状回颗粒细胞层(其颅骨立体定位坐标:人字缝向后 3.8 mm,中线偏右 2.0~2.2 mm,深度 2~4 mm)。记录实验大鼠海马区的 LTP:选择能产生最大反应的 40%幅度的刺激强度,观察强直刺激后产生的增强效应(产生 LTP 的刺激参数:主间隔 1 s,即每隔 1 s 给予一串刺激,

250 Hz×10,波宽 0.2 ms,共给予 11 串刺激)。

**1.2.7 取材** 海马是与学习记忆功能密切相关,也是应激易累及损伤的主要靶区,故将海马作为研究区域。在 Morris 水迷宫实验结束后 12 h 内取大鼠海马,取材前禁食不禁水,腹腔注射 1.5 g/kg 20%氨基甲酸乙酯麻醉,快速断头开颅取脑;在去焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)冰面上吸除血迹,分离双侧海马。左侧海马用锡箔纸标记包裹后置于液氮过夜,置于 -80℃冰箱超低温保存,备做 Western blot 检测;右侧海马称重,加 1 ml 甲醇-水离心液,低温匀浆,取匀浆液 4℃、10 000×g 离心 15 min,取上清液,滤膜过滤后置于 -80℃冷冻保存,待测 Glu 含量(μg/g)。

**1.2.8 高效液相色谱法检测神经递质 Glu 在大鼠海马组织中的含量** 检测样品:处理好的右侧海马。试剂:Glu 标准品;OPA(分析纯,上海碧云天生物技术有限公司),β-巯基乙醇(美国 Amresco 公司),甲醇(色谱级,上海碧云天生物技术有限公司)。Glu 标准曲线的建立:配制浓度分别为 0.150、0.300、0.735、1.470、2.940、3.675 和 5.880 mg/L 的 Glu 标准溶液,衍生化处理后测定。应用外标法进行定量分析,以其峰面积(Y)对其浓度(X)进行直线回归,得到线性方程。海马中 Glu 含量的测定:对海马匀浆上清解冻,置入匀浆器,加入冷冻的甲酸(1 mol/L, 2 ml),冰浴下手动匀浆后,于 4℃、7 000 r/min 离心 30 min。取上清液置于 -20℃。每 1 ml 匀浆上清液加 0.75 ml 4%碳酸氢钠溶液混匀,44℃、3 000 r/min 离心 5 min,取上清液 0.45 μm 滤膜过滤后,取 24 μl 在进样瓶中加入衍生试剂 12 μl、四硼酸钠缓冲液(pH=9.18) 960 μl,混匀,20℃静置 3 min 后进样,梯度洗脱,测定 Glu 含量。

**1.2.9 免疫印迹法(Western blot, WB)检测 p-AT8<sup>Ser202</sup>、GSK-3β<sup>I<sup>H8</sup></sup> 在海马中的表达** 在过度磷酸化位点中,p-AT8<sup>Ser202</sup> 位点定位于微管结合区,其磷酸化参与调节 Tau 蛋白与微管的结合活性<sup>11</sup>,且该位点磷酸化程度与 ECT 应激关系紧密,故以 p-AT8<sup>Ser202</sup> 的表达作为 Tau 蛋白磷酸化程度标志。取左侧海马匀浆 0.2 g,提取蛋白,用 BCA 测定蛋白浓度,调节蛋白浓度一致。取等量样品,用 5×十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS) 加样缓冲液按 1:1 (V/V) 稀释,100℃煮沸 5 min;1×SDS 加样缓冲液溶解预染蛋白质



分子量标准混合物,100℃煮沸 3 min。取待测标本 15 μl 上样,[甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GRPDH)作蛋白质上样量标定],经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis,SDS-PAGE)电泳至预染蛋白质分子量标准所示目的分子量出现为止,湿法转膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭 3h,加入相应抗体[兔抗人 p-AT8<sup>Ser202</sup> 单克隆抗体或小鼠抗人 GSK-3β<sup>1H8</sup> 单克隆抗体(1:200)]4℃孵育过夜,用相应辣根酶标记 IgG(1:200)37℃孵育 2 h,DAB 显色,金盘多媒体图像处理系统测定阳性条带的积分光密度值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对各组样本进行方差齐性检验,经检验方差齐。各组样本进行析因设计,单因素方差分析各处理因素主效应和交互效应;单因素方差分析各处理因素单独效应, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ECT 对大鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期和空间探索时间的作用

随着 ECT 电流加大,大鼠认知障碍程度增加,即逃避潜伏期( $F=544.073, P=0.000$ )延长,空间探索时间( $F=355.141, P=0.000$ )缩短;随 ECT 干预时程延长,大鼠学习记忆障碍程度增加,即逃避潜伏期( $F=73.769, P=0.000$ )延长,空间探索时间缩短( $F=42.750, P=0.000$ )。两者呈相加效应(逃避潜伏期, $F=2.907, P=0.028$ ;空间探索时间, $F=5.455, P=0.001$ )。见表 1、2。

### 2.2 ECT 对抑郁模型大鼠海马区 LTP 的作用

随着 ECT 电流加大,大鼠认知障碍程度增加,即 LTP 缩短( $F=123.001, P=0.000$ );随 ECT 干预时程延长,大鼠学习记忆障碍程度增加,即 LTP 缩短( $F=22.535, P=0.000$ )。两者呈相加效应( $F=8.201, P=0.001$ )。见表 3。

### 2.3 ECT 对大鼠海马组织神经元中 Glu 含量的作用

随着 ECT 电流加大,海马中 Glu 浓度增高( $F=225.394, P=0.000$ );随 ECT 干预时程延长,海马中 Glu 浓度亦增高( $F=27.446, P=0.000$ )。两者呈相加效应( $F=3.088, P=0.022$ )。见表 4。

### 2.4 ECT 对大鼠海马组织神经元中 p-AT8<sup>Ser202</sup> 和 GSK-3β<sup>1H8</sup> 蛋白的作用

随着 ECT 电流加大,可增加海马中目标蛋白表达(p-AT8<sup>Ser202</sup>: $F=211.800, P=0.000$ ;GSK-3β<sup>1H8</sup>: $F=416.122, P=0.000$ );随 ECT 干预时程延长,可增强海马中目标蛋白的表达(p-AT8<sup>Ser202</sup>: $F=29.520, P=0.000$ ;GSK-3β<sup>1H8</sup>: $F=41.723, P=0.000$ );两者呈相加效果,(p-AT8<sup>Ser202</sup>: $F=3.728, P=0.009$ ;GSK-3β<sup>1H8</sup>: $F=2.623, P=0.043$ )。见附图和表 5、6。

表 1 ECT 对大鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期的作用  
( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	3 次 ECT	6 次 ECT	9 次 ECT	均值	F 值	P 值
25 mA	21.3 ± 4.0	28.7 ± 4.1	35.2 ± 4.5	28.4 ± 7.1	21.683	0.000
50 mA	37.5 ± 6.2	49.1 ± 8.3	65.3 ± 5.9	50.6 ± 13.4	33.026	0.000
75 mA	75.3 ± 8.5	89.0 ± 7.3	100.5 ± 6.6	88.3 ± 12.7	22.629	0.000
均值	44.7 ± 23.9	55.6 ± 26.4	67.0 ± 27.8	55.8 ± 27.3	73.769 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
F 值	146.393	162.783	259.063	544.073 <sup>1)</sup>	2.907 <sup>2)</sup>	
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>1)</sup>		0.028 <sup>2)</sup>

注:1)主效应的 F 统计量和 P 值;2)交互效应的 F 统计量和 P 值

表 2 ECT 对大鼠 Morris 水迷宫实验空间探索时间的作用  
( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	3 次 ECT	6 次 ECT	9 次 ECT	均值	F 值	P 值
25 mA	36.2 ± 4.6	34.4 ± 3.6	27.4 ± 2.7	32.7 ± 5.3	12.740	0.000
50 mA	24.5 ± 2.0	18.2 ± 3.2	13.8 ± 3.1	18.9 ± 5.2	29.084	0.000
75 mA	13.0 ± 1.7	11.1 ± 1.3	10.0 ± 1.2	11.3 ± 1.8	8.753	0.002
均值	24.6 ± 10.1	21.2 ± 10.4	17.1 ± 8.0	21.0 ± 9.9	42.750 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
F 值	116.911	138.056	108.031	355.141 <sup>1)</sup>	5.455 <sup>2)</sup>	
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>1)</sup>		0.001 <sup>2)</sup>

注:1)主效应的 F 统计量和 P 值;2)交互效应的 F 统计量和 P 值

表 3 ECT 对抑郁模型大鼠海马区 LTP 的作用  
( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	3 次 ECT	6 次 ECT	9 次 ECT	均值	F 值	P 值
25 mA	140.6 ± 15.6	133.6 ± 12.2	106.4 ± 9.2	127.0 ± 17.9	7.392	0.000
50 mA	95.2 ± 6.8	70.7 ± 10.9	53.6 ± 10.5	73.4 ± 17.6	18.502	0.000
75 mA	60.8 ± 8.5	53.7 ± 5.9	48.8 ± 5.1	54.5 ± 5.6	5.443	0.001
均值	98.9 ± 33.2	88.7 ± 30.1	69.4 ± 28.7	89.6 ± 29.3	22.535 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
F 值	39.818	65.442	55.108	123.001 <sup>1)</sup>	8.201 <sup>2)</sup>	
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>1)</sup>		0.001 <sup>2)</sup>

注:1)主效应的 F 统计量和 P 值;2)交互效应的 F 统计量和 P 值

表 4 ECT 对大鼠海马组织神经元中 Glu 含量的影响 ( $n=8, \mu\text{mol/g}, \bar{x} \pm s$ )

组别	3 次 ECT	6 次 ECT	9 次 ECT	均值	F 值	P 值
25 mA	50.20 ± 7.67	54.67 ± 7.52	65.40 ± 7.61	56.76 ± 9.75	8.448	0.002
50 mA	69.17 ± 12.08	90.53 ± 18.95	121.84 ± 22.62	93.85 ± 28.24	16.562	0.000
75 mA	137.81 ± 29.78	170.93 ± 18.77	184.39 ± 20.86	164.38 ± 30.15	8.240	0.002
均值	85.73 ± 42.54	105.38 ± 51.96	123.88 ± 52.64	104.99 ± 51.03	27.446 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
F 值	46.699	110.803	84.633	225.394 <sup>1)</sup>	3.088 <sup>2)</sup>	
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>1)</sup>		0.022 <sup>2)</sup>

注:1)主效应的 F 统计量和 P 值;2)交互效应的 F 统计量和 P 值

表 5 ECT 对大鼠海马组织神经元中 p-AT8<sup>Ser202</sup> 蛋白含量的影响 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

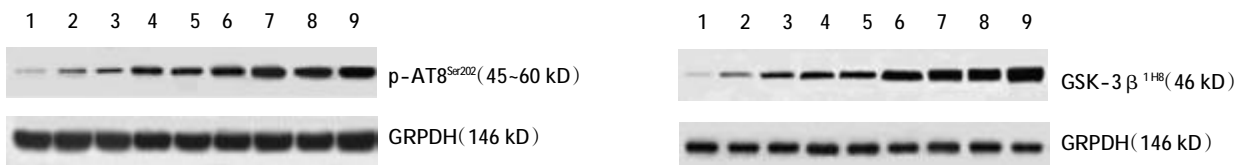
组别	3 次 ECT	6 次 ECT	9 次 ECT	均值	F 值	P 值
25 mA	419.88 ± 72.60	463.25 ± 61.80	543.25 ± 63.93	475.46 ± 82.07	7.134	0.004
50 mA	663.63 ± 120.33	801.75 ± 130.89	1002.75 ± 233.34	856.04 ± 247.52	14.061	0.000
75 mA	1201.75 ± 149.84	1475.38 ± 254.55	1771.50 ± 278.26	1482.88 ± 326.50	11.834	0.000
均值	761.75 ± 352.40	913.46 ± 459.09	1139.17 ± 551.76	938.125 ± 481.15	29.520 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
F 值	91.026	74.300	66.751	211.800 <sup>1)</sup>	3.728 <sup>2)</sup>	
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>1)</sup>		0.009 <sup>2)</sup>

注:1)主效应的 F 统计量和 P 值;2)交互效应的 F 统计量和 P 值

表 6 ECT 对大鼠海马组织神经元中 GSK-3 $\beta$ <sup>1H8</sup> 蛋白含量的影响 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	3 次 ECT	6 次 ECT	9 次 ECT	均值	F 值	P 值
25 mA	452.25 ± 61.92	561.38 ± 47.16	706.38 ± 86.72	573.33 ± 124.25	28.725	0.000
50 mA	833.88 ± 75.71	983.63 ± 127.03	1308.75 ± 137.51	1042.08 ± 231.11	34.691	0.000
75 mA	1475.63 ± 179.64	1657.88 ± 177.98	1747.13 ± 162.23	1626.88 ± 201.97	5.091	0.016
均值	920.58 ± 445.86	1067.63 ± 477.50	1254.08 ± 453.86	1307.68 ± 395.60	41.723 <sup>1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
F 值	153.428	146.710	124.234	416.122 <sup>1)</sup>	2.623 <sup>2)</sup>	
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>1)</sup>		0.043 <sup>2)</sup>

注:1)主效应的 F 统计量和 P 值;2)交互效应的 F 统计量和 P 值

A ECT 对大鼠海马组织神经元中 p-AT8<sup>Ser202</sup> 蛋白的影响B ECT 对大鼠海马组织神经元中 GSK-3 $\beta$ <sup>1H8</sup> 蛋白的影响

1: I 组(25 mA, 3 次 ECT); 2: II 组(25 mA, 6 次 ECT); 3: III 组(25 mA, 9 次 ECT); 4: IV 组(50 mA, 3 次 ECT); 5: V 组(50 mA, 6 次 ECT); 6: VI 组(50 mA, 9 次 ECT); 7: VII 组(75 mA, 3 次 ECT); 8: VIII 组(75 mA, 6 次 ECT); 9: IX 组(75 mA, 9 次 ECT)

附图 ECT 对大鼠海马组织神经元中 p-AT8<sup>Ser202</sup> 和 GSK-3 $\beta$ <sup>1H8</sup> 蛋白的影响

### 3 讨论

#### 3.1 ECT 与 Glu 及学习记忆障碍

Glu 在人脑中的含量为 8.4  $\mu\text{mol/g}$ , 大约 40% 的突触以谷氨酸为递质。Glu 对神经元的影响具有双向

作用,其适当激动 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)是保持神经元正常传递信息所必需的<sup>[6]</sup>,但如果脑内 Glu 释放过多则可激活磷酸肌醇环路,破坏细胞的超微结构,

使神经元变性或死亡,造成学习记忆障碍。应激使海马 Glu 水平明显升高,促进 GluR 过度激活,引发兴奋性神经毒性,致神经元损伤,形成学习记忆障碍。本实验发现 ECT 后海马 Glu 浓度上调、海马区 LTP 下降、实验大鼠学习和记忆功能障碍,与以往实验结果相同;本实验还发现,该过程与 ECT 的电流和时程呈正比,从而进一步完善该推论。

### 3.2 ECT、Glu 与 Tau 蛋白过磷酸化

本实验结果表明,ECT 导致的 Glu 浓度升高与 Tau 过度磷酸化有关,与 ECT 后学习记忆能力下降相关。Tau 蛋白促进轴突微管稳定,保持微管间距离,影响轴突运输。其过度磷酸化可降低轴突转运和神经信号传递障碍及突触退化,使神经元凋亡<sup>[7]</sup>。此外,Tau 蛋白作为一种可溶性的 DNA 分子伴侣,发生变性或错误折叠时,失去该能力。本实验中发现,ECT 后 Glu 在神经元中浓度升高,该过程与 ECT 的电流和时程呈正比。本实验发现,ECT 造成学习记忆障碍的机制很可能是通过提高 Glu 浓度,进而上调 Tau 蛋白磷酸化程度形成。即过度磷酸化的 Tau 蛋白一方面降低轴突的转运效率,使 Glu 在脑内进一步堆积,形成恶性循环;另一方面,干扰其作为分子伴侣的作用,造成神经元功能紊乱。

### 3.3 Tau 蛋白过磷酸化的信号传导机制

实验结果表明,学习记忆能力与 Tau 过度磷酸化有关,即 Tau 蛋白磷酸化程度愈高者,学习记忆能力越差。Tau 蛋白过度磷酸化的外源性机制是指蛋白激酶和蛋白磷酸酶的平衡失调引起的 Tau 蛋白过度磷酸化。GSK-3 $\beta$  是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 Tau 蛋白激酶,催化多个位点磷酸化<sup>[8-9]</sup>。Glu 抑制包括蛋白激酶 B (proteinkinase B,PKB) 等多种蛋白激酶的活性<sup>[10]</sup>,PKB 为 GSK-3 $\beta$  的上游调节分子。本实验发现,ECT 后 GSK-3 $\beta$  表达增强,同时磷酸化 Tau 蛋白 p-AT8<sup>Ser202</sup> 表达增强。故推测 ECT 后学习记忆障碍的分子生物学信号传导途径如下:ECT 应激导致 Glu 浓度升高 $\rightarrow$ PKB 活性抑制 $\rightarrow$ GSK-3 $\beta$  表达增加、活性增强 $\rightarrow$ Tau 蛋白磷酸化程度增加。

综上所述,推测 ECT 作为强应激导致海马 Glu 浓度升高,而 Glu 激动离子型受体 GluR,从而使 PKB 的活性下降,PKB 对 GSK-3 $\beta$  的抑制减弱,GSK-3 $\beta$  表达增加、活性增强,进而强化海马 Tau 蛋白的磷酸

化程度,影响 Tau 外显子 10 的可变剪接,降低轴突转运的效率,导致神经信号传递障碍、突触退化以及 LTP 抑制,甚至产生学习记忆障碍。此外,海马 Tau 蛋白过磷酸化之后致神经递质运输障碍,可进一步推动 Glu 在受损神经元的积聚,形成恶性循环,加重神经元损伤。

### 参 考 文 献:

- [1] Luo J, Min S, Wei K, et al. Propofol protects against impairment of learning-memory and imbalance of hippocampal Glu/GABA induced by electroconvulsive shock in depressed rats[J]. *J Anesth*, 2011, 25(5): 657-665.
- [2] Wu FY, Feng Q, Cheng M, et al. The activation of excitatory amino acid receptors is involved in tau phosphorylation induced by cold water stress[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2010, 37(5): 510-516.
- [3] Tasset I, Medina FJ, Pena J, et al. Olfactory bulbectomy induced oxidative and cell damage in rat: protective effect of melatonin[J]. *Physiol Res*, 2010, 59(2): 105-112.
- [4] Hoirsch-Clapauch S, Mezzasalma MA, NARDI AE. Pivotal role of tissue plasminogen activator in the mechanism of action of electroconvulsive therapy[J]. *J Psychopharmacol*, 2014, 28(2): 99-105.
- [5] Bibow S, Mukrasch MD, Chinnathambi S, et al. The dynamic structure of filamentous tau[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50(48): 11520-11524.
- [6] Han Y, Babai N, Kaeser P, et al. RIM1 and RIM2 redundantly determine Ca<sup>2+</sup> channel density and readily releasable pool size at a large hindbrain synapse[J]. *J Neurophysiol*, 2015, 113(1): 255-263.
- [7] Onishi T, Iwashita H, Uno Y, et al. A Novel Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitor 2-methyl-5-(3-(4-((S)-methylsulfinyl phenyl)-1-benzofuran-5-yl)-1, 3, 4-oxadiazole (MMBO) decreases tau phosphorylation and ameliorates cognitive deficits in a transgenic model of alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2011, 119(6): 1330-1340.
- [8] Bibow S, Ozenne V, Biernat J, et al. Structural impact of proline-directed pseudophosphorylation at AT8, AT100, and PHF1 epitopes on 441-residue tau[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(40): 15842-15845.
- [9] Wang Y, Yang R, Gu J, et al. Cross talk between PI3K-AKT-GSK-3 $\beta$  and PP2A pathways determines tau hyperphosphorylation[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(1): 188-200.
- [10] Prati F, De Simone A, Bisignano P, et al. Multitarget drug discovery for alzheimer's disease: triazinones as BACE-1 and GSK-3 $\beta$  inhibitors[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(5): 1578-1582.

(申海菊 编辑)