

松果体损伤大鼠模型 3 种制备方法的比较研究

王丹妮, 宋美卿, 杨 铃, 冯玛莉

(山西省中医药研究院中心实验室, 太原 030012)

[摘要] 目的 比较对氯苯丙氨酸 (para-chlorophenylalanine, PCPA)、电刺激应激及 PCPA 联合电刺激 3 种不同方法制备的松果体损伤模型, 评价松果体结构与功能变化, 为建立方法简便、建模时间短的松果体损伤模型提供依据。方法 40 只大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为空白对照组、PCPA 组、电刺激组及 PCPA 联合电刺激组。空白对照组不做任何处理; PCPA 组大鼠腹腔注射 PCPA 450 mg/kg, 连续 2 d; 电刺激组大鼠使用穿梭箱电刺激 (电压 30 V, 电流 0.8 A, 刺激时间 30 s, 间隔时间 30 s, 循环 60 次), 连续 5 d; PCPA 联合电刺激组大鼠使用电刺激第 4 天加用 PCPA, 操作同前。测试各组大鼠旷场活动、高架十字迷宫等行为学以及戊巴比妥钠协同睡眠等指标, ELISA 法检测血清褪黑素 (melatonin, MT) 水平, 镜下观察松果体病理组织结构。结果 3 个实验组大鼠旷场活动总距离和平均速度均显著低于空白对照组 ($P < 0.01$), PCPA 组、PCPA 联合电刺激组旷场活动中央区时间显著长于空白对照组 ($P < 0.05$), PCPA 联合电刺激组进入开放臂次数显著多于空白对照组 ($P < 0.05$), PCPA 组、PCPA 联合电刺激组进入开放臂时间显著长于空白对照组 ($P < 0.05$)。PCPA 组入睡潜伏期显著长于空白对照组 ($P < 0.05$)。3 个实验组血清 MT 水平均显著低于空白对照组 ($P < 0.01$)。病理组织学变化: PCPA 组松果体细胞排列紊乱, 核固缩, 数目明显减少, 空泡变性增多; 电刺激组松果体排列紊乱, 核固缩, 细胞数目稍减少, 空泡变性稍增多; PCPA 联合电刺激组松果体细胞排列紊乱, 核固缩, 数目明显减少, 空泡变性增多。结论 3 种不同造模方法均可造成大鼠松果体不同程度的损伤, 可为制作松果体不同损伤模型提供参考。

[关键词] 松果体; 昼夜节律; 褪黑素; 病理; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0215-05

Comparative Study of Three Pineal Gland Injury Model in Rats

WANG Danni, SONG Meiqing, YANG Qian, FENG Mali

(Central Laboratory of Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

Correspondence to: FENG Mali, E-mail: fengmali1@163.com

[Abstract] **Objective** To compare pineal gland injury models established using para-chlorophenylalanine (PCPA), electrical stimulation stress, and PCPA plus electrical stimulation, to evaluate the structure and function changes of the pineal gland, and to establish a simple and effective method of pineal gland injury model with short modeling time. **Methods** Forty rats were adaptively reared for 1 week and randomly divided into blank control, PCPA, electrical stimulation, and PCPA + electrical stimulation groups. The control group was left untreated. The PCPA group was intraperitoneally injected with PCPA 450 mg/kg for 2 consecutive days. The electric stimulation group was given a shuttle box with electric stimulation (voltage 30 V, current 0.8 A, stimulation time 30 s, interval 30 s, 60 cycles) for 5 consecutive days. The rats in the PCPA + electrical stimulation group were given electrical stimulation plus PCPA on the 4th day. The operation was the same as before. The rats in each group were tested for open field activities, elevated plus maze and other behaviors, pentobarbital sodium for sleep and other indicators. ELISA was performed to detect serum melatonin

[基金项目] 国家自然科学基金(81173574); 山西省自然科学基金(201901D111427)

[作者简介] 王丹妮(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理与内分泌疾病研究。E-mail: wdn0125@163.com

[通信作者] 冯玛莉(1963—), 女, 主任医师, 研究方向: 中药药理与内分泌疾病研究。E-mail: fengmali1@163.com

(MT) levels, and the pathological structure of the pineal gland was observed under a microscope.

Results The total distance and average speed of the rats in the three experimental groups were significantly lower than those of the rats in the control group ($P < 0.01$), and the central area time of the PCPA and PCPA + electrical stimulation groups was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The open arm number was significantly higher in the PCPA + electrical stimulation group than that of the control group ($P < 0.05$), and the open arm time ratios of the PCPA and PCPA + electrical stimulation groups were significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The latency period to falling asleep in the PCPA group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The serum MT levels in the three experimental groups were significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). In the PCPA group, the pineal gland cells were disorderly arranged, nuclear pyknosis was evident, the number of cells was significantly reduced, and vacuolar degeneration was increased. In the electrical stimulation group, the pineal gland cells were disorderly arranged, nuclear pyknosis was evident, the number of cells was slightly reduced, and vacuolar degeneration was slightly increased. In the PCPA + electrical stimulation group, the pineal gland cells were disorderly arranged, nuclear pyknosis was evident, the number of cells was significantly reduced, and vacuolar degeneration was increased. **Conclusion** Different degrees of damage to the pineal gland in rats can be caused by three different methods of making model, which can provide reference for making different pineal gland injury models.

[Key words] Pineal gland; Circadian rhythm; Melatonin; Pathology; Rats

松果体是机体调控生物钟节律的重要组成部分,是维持内源性生物钟运作的核心元件^[1-2]。松果体合成分泌的褪黑素(melatonin, MT)具有促进睡眠、调节时差、抗衰老、调节免疫和抗肿瘤等多种作用,因其可促进睡眠,被称为“生理性催眠剂”^[3-5]。随着年龄增长,松果体细胞会变大,有空泡改变,合成分泌褪黑素的能力下降,其调节昼夜节律作用减退^[6]。目前,松果体损伤动物模型有:通过分离左颈总动脉且永久性结扎,使新生大鼠出现缺氧缺血性脑病,研究松果体对机体昼夜节律的影响^[7],该手术操作复杂,成功率低;D-半乳糖致衰老大鼠松果体过氧化损伤模型,造模时间长^[8];对氯苯丙氨酸(para-chlorophenylalanine, PCPA)腹腔注射是目前公认的经典失眠动物模型,PCPA通过抑制色氨酸氨化酶合成,减少5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的生成,使睡眠-觉醒周期紊乱,该操作较简单,具有良好的可重复性^[9];电刺激应激模型可使昼夜节律紊乱,且操作简单,可重复性强^[10]。本课题组在制备PCPA致失眠大鼠模型和电刺激致睡眠-觉醒周期紊乱时发现两者均对松果体有影响,为寻找方法简便、造模时间短的松果体损伤模型,开展了以下实验。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性SD大鼠40只,体质量160~180 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004]。动物饲养于山西省中医药研究院中心实验室(符合动物实验通用要求,可开展SPF级动物实验),温度:20~23℃,湿度:40%~50%。实验经本院伦理委员会审查批准(SZYLY2020KY-0401),实验中涉及处理动物的操作均符合国家相关法规要求。

1.2 主要仪器与试剂

穿梭视屏分析系统(DB079)购自北京智鼠多宝生物科技有限责任公司;大鼠小鼠旷场活动实验系统(OFT-100)购自成都泰盟科技有限公司;全自动全封闭脱水机(Excelsior)购自美国Thermo公司;石蜡包埋机(TKY-BMB)购自湖北康泰医疗设备有限公司;万能显微镜荧光成像系统(BX51+DPT2+IPE)购自日本Olympus公司;多功能微孔读板机(H1)购自美国BioTek公司;PCPA(批号:1002600696)购自美国Sigma公司;戊巴比妥钠(批号:57-33-0)购自美国Sigma公司;无水碳酸钠(批号:931103)和碳酸氢钠(批号:20070713)

均为北京化工厂产品。MT 检测用 ELISA 试剂盒 (批号: EME174) 购自德国 IBL 公司。

1.3 模型制备

大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为空白对照组、PCPA 组、电刺激组和 PCPA 联合电刺激组, 每组 10 只。空白对照组不予任何操作, 其余各组采用以下不同造模方法。PCPA 组: 在实验第 4 天开始腹腔注射 PCPA 混悬液 (分别称取无水碳酸钠及碳酸氢钠 3.392 g、1.512 g, 分别加蒸馏水 320 mL、180 mL, 搅拌均匀, 混合, 检测 pH 为 10.1, 将 PCPA 溶于碳酸盐缓冲液, 配制为 45 g/L 的混悬液, 80 °C 加热 30 min, 超声 5 min, 现用现配), 腹腔注射 10 mL/kg, 连续 2 d。电刺激组: 实验第 1 天将大鼠置于穿梭箱并给予电刺激, 电刺激方法为电压 30 V、电流 0.8 A、刺激时间 30 s、间隔时间 30 s、循环 60 次, 同一时间连续电刺激 5 d。PCPA 联合电刺激组: 电刺激方法同电刺激组, 电刺激第 4 天加用 PCPA, 方法同 PCPA 组。

1.4 指标检测

1.4.1 旷场活动测试

旷场为 100 cm × 100 cm × 50 cm 的开口箱, 将大鼠置于旷场中适应 3 min, 接着记录 5 min 活动轨迹, 以检测其旷场活动。使用视频软件分析系统, 将其底部划分为 3 × 3 格子并记录其活动轨迹。检测大鼠活动总路程、平均速度及中央区停留时间。每次更换动物之前, 用 75% 乙醇溶液擦拭旷场及检测仪器, 以免上次动物残留信息影响下次测试结果。

1.4.2 高架十字迷宫测试

分别将大鼠置于高架十字迷宫同一处 (作为起始位置), 视频分析观察其 3 min 内活动轨迹。每次测试结束后, 喷洒 75% 乙醇溶液, 清洁大鼠活动区域以祛除残留气味, 避免干扰下一只动物的测试结果。

进入开放臂次数 (open arm entry, OE): 大鼠四足均在开放臂内至任一足从该臂中完全退出的次数总和。进入封闭臂次数: 大鼠四足均在封闭臂内至任一足从该臂中完全退出的次数总和。进入开放臂次数百分比 (OE%): $OE\% = \text{进入开放臂次数} / (\text{进入开放臂次数} + \text{进入封闭臂}$

次数) × 100%。进入开放臂的时间 (open arm time, OT): 大鼠四足均在开放臂中至任一足从该臂中完全退出的时间。进入封闭臂时间: 大鼠四足均在封闭臂中至任一足从该臂中完全退出的时间。进入开放臂时间百分比 (OT%): $OT\% = \text{开放臂停留时间} / (\text{开放臂停留时间} + \text{封闭臂停留时间}) \times 100\%$ 。

1.4.3 戊巴比妥钠协同睡眠实验

腹腔注射戊巴比妥钠 38 mg/kg, 睡眠以翻正反射消失为指标, 以大鼠背向下姿势保持 30 s 以上者, 判断为翻正反射消失。记录注射戊巴比妥钠后至大鼠翻正反射消失时间, 作为入睡潜伏期; 并观察记录翻正反射消失至觉醒的时间, 作为睡眠持续时间。

1.4.4 血清 MT 检测

各组大鼠于第 6 天上午 10:00 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 离心 3 000 r/min, 20 min, 取上层血清。采用 ELISA 双抗夹心法检测血清 MT, 按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.5 松果体病理组织学观察

取血后, 大鼠沿枕骨大孔开颅, 将大脑人字缝上部充分暴露, 见米粒大小松果体。完整取出松果体后, 脱颈椎处死大鼠。将剖取的松果体置于体积分数为 10% 的甲醛溶液中固定, 然后行常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色, 最后置于光学显微镜下观察。

1.5 统计分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 22.0 软件进行分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白对照组大鼠昼夜节律及行为活动正常, 被毛柔顺; PCPA 组大鼠白天夜晚活动不停, 易惊吓, 互相打斗, 被毛战栗; 电刺激组大鼠白天夜晚活动不停, 被毛战栗, 头部震颤, 放置穿梭箱时有对抗行为, 对穿梭箱有抵抗; PCPA 联合电刺激大鼠白天夜晚活动不停, 被毛战栗, 易惊吓, 互相打斗, 头部震颤, 对穿梭箱有抵抗。

2.2 旷场活动

PCPA 组、电刺激组和 PCPA 联合电刺激组大鼠旷场活动总距离和平均速度均显著低于空白

对照组 ($P < 0.01$); PCPA 组、PCPA 联合电刺激组旷场活动中央区时间均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组大鼠旷场活动比较

Table 1 Comparison of open field activities in each group of rats

组 别	总距离/cm	平均速度/(cm · s ⁻¹)	($\bar{x} \pm s, n=10$) 中央区时间/s
空白对照	1 711 ± 271	11.82 ± 1.35	1.98 ± 1.30
PCPA	1 007 ± 207**	8.71 ± 1.08**	6.97 ± 5.76*
电刺激	772 ± 294**	7.57 ± 1.86**	1.62 ± 2.02
PCPA 联合电刺激	983 ± 159**	8.52 ± 0.99**	7.25 ± 5.49*

注: PCPA 为对氯苯丙氨酸。与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.3 高架十字迷宫

PCPA 联合电刺激组大鼠的 OE% 显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); PCPA 组、PCPA 联合电刺激组的 OT% 均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组大鼠高架十字迷宫实验比较

Table 2 Comparison of elevated cross-maze experiments in each group of rats

组 别	OE%	OT%	($\bar{x} \pm s, n=10$)
空白对照	34.2 ± 23.6	25.4 ± 7.7	
PCPA	52.1 ± 18.0	48.9 ± 24.1*	
电刺激	48.8 ± 30.6	41.5 ± 39.2	
PCPA 联合电刺激	65.6 ± 31.6*	63.9 ± 30.3*	

注: PCPA 为对氯苯丙氨酸, OE% 为进入开放臂次数百分比, OT% 为进入封闭臂次数百分比。与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 戊巴比妥钠协同睡眠

PCPA 组大鼠入睡潜伏期显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 而电刺激组及 PCPA 联合电刺激组与空白对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$); 睡眠持续时间在各组间无明显差异 ($P > 0.05$, 表 3)。

2.5 血清 MT

PCPA 组、电刺激组、PCPA 联合电刺激组大鼠血清 MT 水平均显著低于空白对照组 ($P < 0.01$) (表 4)。

2.6 松果体病理组织学变化

松果体组织中有松果体细胞和胶质细胞, 前者占绝大多数。空白对照组松果体细胞和梭形胶质细胞排列紧密, 均匀分布, 清晰可见

表 3 各组大鼠戊巴比妥钠协同睡眠结果

Table 3 Synergistic sleep results of pentobarbital sodium administration in each group of rats

组 别	入睡潜伏期/min	睡眠持续时间/min	($\bar{x} \pm s, n=10$)
空白对照	4.44 ± 0.84	78.9 ± 12.9	
PCPA	5.21 ± 0.53*	88.2 ± 18.4	
电刺激	4.78 ± 0.64	67.0 ± 11.9	
PCPA 联合电刺激	4.95 ± 0.96	85.9 ± 14.8	

注: PCPA 为对氯苯丙氨酸。与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

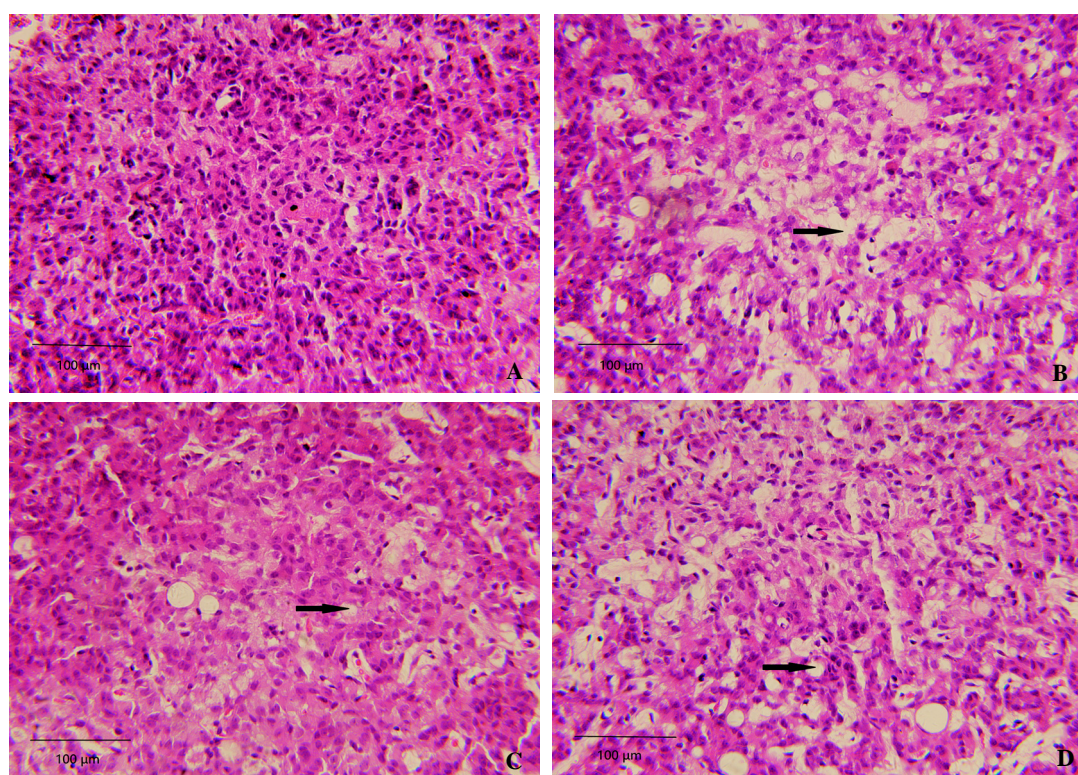
表 4 各组大鼠血清 MT 比较

Table 4 Comparison of serum MT levels in each group of rats

组 别	MT/(ng · L ⁻¹)	($\bar{x} \pm s, n=10$)
空白对照	165.9 ± 10.7	
PCPA	144.6 ± 11.8**	
电刺激	129.1 ± 12.3**	
PCPA 联合电刺激	153.2 ± 9.2**	

注: PCPA 为对氯苯丙氨酸, MT 为褪黑素。与空白对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

(图 1A); PCPA 组松果体细胞排列紊乱, 数目明显减少, 空泡变性增多, 细胞核固缩且向周边移动, 细胞界限模糊 (图 1B); 电刺激组松果体排列紊乱, 细胞数目稍减少, 空泡变性稍增多, 细胞核固缩, 细胞核向周围移动, 细胞界限模糊 (图 1C); PCPA 联合电刺激组松果体细胞排列紊乱, 数目明显减少, 空泡变性增多, 细胞核固缩且向周边移动, 细胞界限模糊 (图 1D)。



注: A 为空白对照组, B 为对氯苯丙氨酸 (PCPA) 组, C 为电刺激组, D 为 PCPA 联合电刺激组; 图中箭头所指为空泡改变。

图 1 各组大鼠松果体病理组织学变化 (HE 染色, $\times 100$)

Figure 1 Histopathological changes of the pineal gland in each group of rats (HE staining, $\times 100$)

3 讨论

由于大鼠难以用人类所能理解的语言表达, 其行为通常以行为实验来评价。行为体现了机体适应新环境的一系列反应, 也体现了机体心理活动过程。心理活动在人、动物均有体现, 负面心理活动主要包括抑郁、焦虑、恐惧这 3 类^[11]。松果体调控动物的昼夜节律生物钟, 也可能参与调控机体情绪。建立松果体损伤模型后, 可以通过旷场、高架十字迷宫检测其行为改变。

旷场实验反映动物紧张、兴奋、探索再到适应的一系列过程, 兴奋性的大鼠在适应的环境中表现为行动活跃, 四处走动^[12]。本研究中, PCPA 组、电刺激组、PCPA 联合电刺激组大鼠兴奋性有下降趋势。高架十字迷宫是大鼠由于好奇心探索新环境 (开放臂), 同时有嗜暗的天性 (封闭臂), 两者之间发生“探究 - 回避”相冲突的行为, 产生焦虑心理^[13]。本研究中, PCPA 组、电刺激组、PCPA 联合电刺激组大鼠均未表现出焦虑。

松果体作为调节昼夜节律的器官, 其结构功能的完整性具有重要意义。松果体组织病理学结果表明, 3 种造模方法均造成大鼠松果体细胞不同程度浓缩、空泡变性、核固缩、向周边移动, 表明细胞出现变性、凋亡和不同程度的坏死损伤, 其中 PCPA 联合电刺激最严重, PCPA 次之, 电刺激细胞损伤程度较轻。松果体细胞合成分泌 MT, 合成后并不储存于松果体细胞中, 而是被迅速地分泌到周围血液中。因此, 血液中的 MT 水平可以准确反映松果体合成分泌 MT 的能力^[14]。松果体细胞受损, 血清中 MT 含量减少, 入睡潜伏期增加。

综上所述, 大鼠腹腔注射 PCPA、电刺激及 PCPA 联合电刺激, 这 3 种方法均可造成大鼠不同程度的松果体损伤, 可作为松果体损伤相关疾病研究时动物模型的建立方法, 但其具体机制尚待进一步研究。

(下转第 251 页)