

电针通过增强突触可塑性改善抑郁样小鼠 社交与空间记忆能力作用研究[※]

黄志源 谢彦颖 马增明 朱传安[▲]

摘要 目的:观察电针百会、印堂对抑郁样小鼠社交与空间记忆能力的影响。**方法:**将 48 只 SPF 级雄性 C57/BL6 小鼠随机分为对照组、模型组、电针组、氟西汀组各 12 只,采用慢性不可预见性温和性应激制备抑郁样小鼠模型,电针组给予电针百会穴、印堂穴(连续波,2 Hz,1 mA,30 min/d),氟西汀组给予 10 mg/kg 氟西汀,每日干预 1 次,连续干预 10 d。使用糖水偏好实验、强迫游泳实验、悬尾实验、三箱社交实验、Y 迷宫实验评估各组小鼠抑郁行为、社交能力及空间记忆,使用离体电生理技术记录小鼠海马场电位,评估各组小鼠突触可塑性。**结果:**与对照组比较,模型组小鼠糖水消耗、社交时间、Y 迷宫新奇臂进入次数与探索时间、fEPSP 斜率均明显降低($P<0.01$),强迫游泳与悬尾实验不动时间均显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,电针组、氟西汀组小鼠糖水消耗、社交时间和 Y 迷宫新奇臂进入次数及探索时间、fEPSP 斜率均明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),强迫游泳与悬尾实验不动时间均显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与氟西汀组比较,电针组小鼠糖水消耗、悬尾实验不动时间、fEPSP 斜率均明显降低($P<0.05$),强迫游泳不动时间、社交时间和 Y 迷宫新奇臂进入次数及探索时间均无明显改变($P>0.05$)。**结论:**电针能够改善小鼠抑郁样行为,并且可以改善海马突触可塑性,改善小鼠社交能力与空间学习记忆。

关键词 电针;抑郁症;突触可塑性;社交;空间记忆力

抑郁症(depression)是一组以长期心境低落、愉快感缺乏、精力减退为主的常见精神障碍,全球每年约有 5% 的人患有抑郁症,而在中低收入国家更是高达 80%~90%,且 75 岁时的抑郁症平均发病风险预计为 19.6%,抑郁症已然成为世界范围内主要致残原因,也是全球疾病总负担的主要原因^[1]。抑郁症除了情绪方面的改变,其社交能力与记忆认知功能也伴有不同程度的降低^[2]。研究报道,针刺可以有效改善阿尔茨海默病、血管性痴呆患者的学习记忆能力,提高患者生活质量^[3,4],可能是通过改善突触可塑性,提高海马长时程增强(long-term potentiation, LTP)来实现的^[5,6]。那么针刺能否通过改善抑郁样小鼠的 LTP 来改善其社交与空间记忆能力,目前尚未报道。本研究拟采用慢性不可预见性温和性刺激(chronic unpredictable

mild stress, CUMS)制备小鼠抑郁样模型,通过电针百会穴、印堂穴观察电针对抑郁样小鼠社交与空间记忆能力的影响,并探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 48 只 6~7 w 龄 SPF 级雄性 C57/BL6 小鼠购于厦门大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(闽)2018-003。饲养环境:每笼 4 只小鼠,12 h/12 h 光暗周期,温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 。实验前将其适应性饲养 1 w,随机分为对照组、模型组、电针组、氟西汀组各 12 只。所有操作均严格遵守厦门市仙岳医院实验动物管理伦理审查委员会的规定,符合动物实验行为规范(批准文号:2022-KY-013)。

1.2 主要试剂和仪器 盐酸氟西汀分散片(Patheon France, 20 mg),异氟烷(麦克林,1833358-250 g)。

一次性无菌针灸针(中研太和,0.16 mm \times 7 mm)、实验动物麻醉呼吸机(瑞沃德,R58S)、刺激器(BMS-master-9)、小动物行为学检测系统(Stoeling, ANY-maze version 4.99 m)、震动切片机(Leica, VT1000S)、

[※]基金项目 厦门市医疗卫生科技计划项目(No.3502Z20214ZD1278)

[▲]通信作者 朱传安,男,医学博士。研究方向:精神疾病的发病机制与针灸的作用机理。E-mail:zhuchuanan666@126.com

• 作者单位 厦门市仙岳医院(福建 厦门 361012)

CMOS 相机 (HAMAMATSU, C11440-36U)、放大器 (Axon Instrument, Multiclamp 700B)、数模转换器 (Axon Instrument, 1550B)、微电极拉制仪 (Sutter, P-1000)。

1.3 动物模型制备 采用 CUMS 方法制备抑郁模型^[7], 模型组、电针组、氟西汀组连续造模 21 d, 其间小鼠每天随机给予以下不同应激: ①束缚 1 h; ②无垫料饲养 2 h; ③禁食禁水 15 h; ④明暗时间紊乱 24 h; ⑤潮湿垫料饲养 18 h; ⑥笼子倾斜 2 h。造模期间对照组小鼠常规饲养。

1.4 干预方法 小鼠“百会”“印堂”两穴定位参照《小鼠常用针灸穴位》^[8]。CUMS 造模结束后, 对电针组小鼠给予电针干预。异氟烷麻醉小鼠后, 针刺百会穴、印堂穴约 5 mm, 连接至 Master 9 脉冲刺激器 (连续波, 2 Hz, 1 mA), 30 min/d, 共 10 d。电针期间其余组小鼠仍以相同方式麻醉, 无电针干预。

氟西汀干预^[9]: 给予氟西汀组小鼠 10 mg/kg 灌胃治疗, 每日 1 次, 连续 10 d。其余组小鼠给予等量溶剂 (水)。

1.5 观察指标与检测方法

1.5.1 糖水偏好实验 干预结束后第 1~3 d 依照参考文献^[10]进行检测: 每只小鼠单笼饲养, 第 1 d 给小鼠 1 瓶 1% 的蔗糖水与 1 瓶纯水, 自由饮食饮水; 第 2 d, 给小鼠饮用 2 瓶 1% 蔗糖水; 第 3 d, 小鼠禁水 16 h, 之后给予 1 瓶纯水, 1 瓶 2% 蔗糖水, 记录 24 h 消耗量, 12 h 后调换两瓶的位置。计算蔗糖水消耗量/(蔗糖水消耗量+水消耗量)×100% 评估小鼠对糖水的偏好。

1.5.2 三箱社交实验 干预结束后第 4 d, 依照参考文献^[11]进行检测。三箱中两端箱子对角处放入 2 个倒置的金属丝网杯, 小鼠放入中间箱自由探索 5 min。之后将一只同龄同性别小鼠放入金属丝网杯中作为社交鼠, 待测小鼠放入中间箱自由探索 10 min, 记录与社交鼠接触的时间。

1.5.3 Y 迷宫实验 干预结束后第 5 d, 依照参考文献^[12]进行检测。关闭新奇臂, 将小鼠从起始臂末端放入, 自由探索起始臂和其他臂 15 min。结束后间隔 90 min, 打开新奇臂, 将小鼠从起始臂末端放入, 自由探索三个臂 5 min, 记录实验小鼠进入新奇臂的次数和时间。

1.5.4 强迫游泳实验 干预结束后第 6 d, 依照参考文献^[10]进行检测。将小鼠放入装有 20 cm 深的水 (24±2) °C 的透明塑料圆筒中, 强制游泳 6 min, 记录

后 4 min 不动时间。

1.5.5 悬尾实验 干预结束后第 7 d, 依照参考文献^[13]进行检测。将胶带贴在小鼠尾部距末端 2 cm 处, 并将小鼠悬吊在 30 cm 高的水平杆上, 悬吊 6 min, 记录小鼠后 4 min 不动时间。

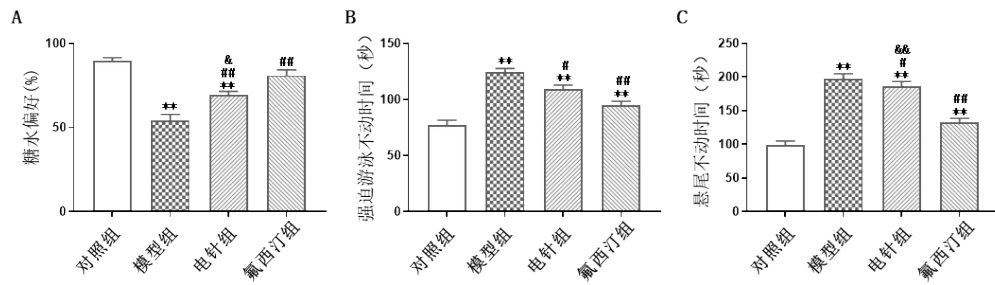
1.5.6 电生理记录 干预结束后第 8 d, 依照参考文献^[14]进行检测。小鼠麻醉后快速取脑, 制备脑片, 厚度为 300 μm, 32 °C 水浴孵育 30 min, 常温孵育 1 h, 整个过程中人工脑脊液 (包含氯化钠 120 mmol/L, 氯化钾 2.5 mmol/L, 二水合磷酸二氢钠 1.2 mmol/L, 碳酸氢钠 26 mmol/L, D-葡萄糖 10 mmol/L, 二水合氯化钙 2 mmol/L, 硫酸镁 2 mmol/L, pH 7.35~7.45, 渗透压 290~310 mOsm) 中始终通入 95% O₂ 与 5% CO₂ 混合气体。LTP 由高频刺激诱导 (100 Hz), 高频刺激之前记录 10 min 基线, 然后记录高频刺激诱发的兴奋性突触后电位 (fEPSPs), 记录 60 min。分析高频刺激后的斜率值与基线的百分比变化。

1.6 统计学方法 采用 Python 3.7 对实验数据进行分析及统计作图。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据符合正态分布及方差齐性, 采用单因素方差分析法对数据进行分析, 两两比较采用 Bonferroni 事后检验法进行分析。经校正后不符合正态分布及方差齐性, 数据采用非参数检验。所有统计结果以检验统计量 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验标准。

2 结果

2.1 各组小鼠抑郁相关行为学比较 与对照组比较, 模型组、电针组小鼠糖水消耗均明显减少 ($P < 0.01$), 强迫游泳与悬尾实验不动时间均明显延长 ($P < 0.01$); 氟西汀组小鼠糖水消耗无明显改变 ($P > 0.05$), 强迫游泳与悬尾实验不动时间均明显缩短 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 电针组、氟西汀组小鼠糖水消耗均明显增加 ($P < 0.01$), 强迫游泳与悬尾实验不动时间均明显缩短 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与氟西汀组比较, 电针组小鼠糖水消耗明显减少 ($P < 0.05$), 悬尾实验不动时间明显延长 ($P < 0.01$), 强迫游泳不动时间无明显改变 ($P > 0.05$)。见图 1。

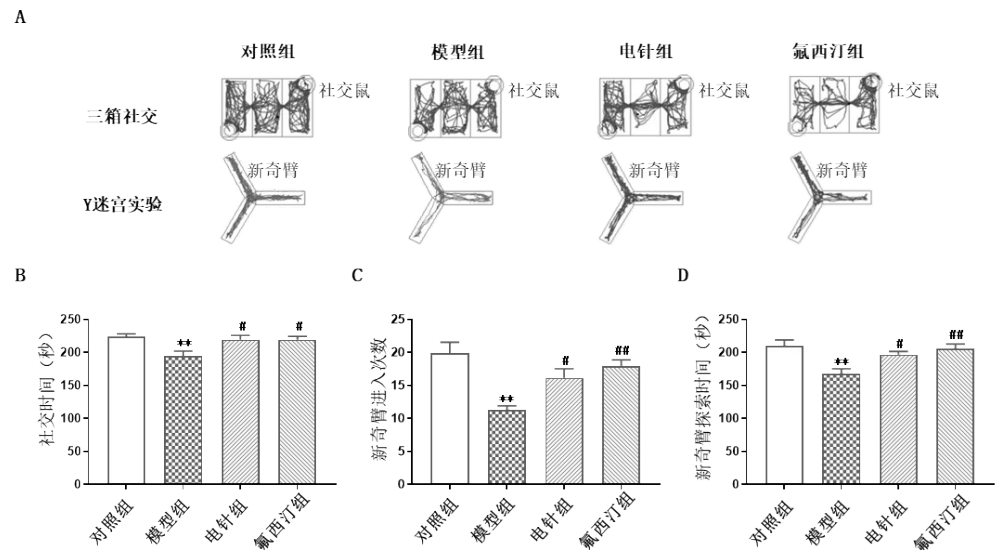
2.2 各组小鼠社交与空间记忆相关行为学比较 与对照组比较, 模型组小鼠社交时间明显减少 ($P < 0.01$), Y 迷宫中进入新奇臂的次数与时间均明显减少 ($P < 0.01$); 电针组与氟西汀组小鼠社交时间、Y 迷宫中进入新奇臂的次数与时间无明显改变 ($P > 0.05$)。与



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与氟西汀组比较, [&] $P < 0.05$, ^{&&} $P < 0.01$

图1 电针对小鼠抑郁相关行为学的影响

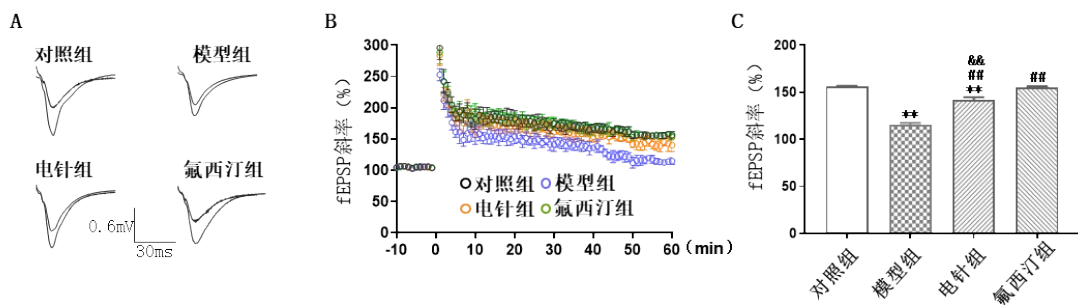
模型组比较,电针组、氟西汀组小鼠社交时间均明显增加($P < 0.05$),Y迷宫中进入新奇臂的次数与时间均明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与氟西汀组比较,电针组小鼠社交时间、Y迷宫中进入新奇臂的次数与时间无明显改变($P > 0.05$)。见图2。



与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

图2 电针对小鼠社交与空间记忆相关行为学的影响

2.3 各组小鼠LTP比较 与对照组比较,模型组、电针组小鼠fEPSP斜率均明显减少($P < 0.01$);氟西汀组小鼠fEPSP斜率无明显改变($P > 0.05$)。与模型组比较,电针组与氟西汀组小鼠fEPSP斜率均明显增加($P < 0.01$)。与氟西汀组比较,电针组小鼠fEPSP斜率明显减少($P < 0.01$)。见图3。



与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.01$; 与氟西汀组比较, ^{&&} $P < 0.01$

图3 电针对小鼠LTP的影响

3 讨论

抑郁症可归属于中医学“郁证”的范畴,常由情志所伤导致气机郁滞,脏腑功能失调,进而出现情绪低落、情志不舒、善太息等表现,为中医学常见的情志病之一^[15]。现代研究^[16]发现,来源于生活、学习、工作的慢性应激在抑郁症、焦虑障碍发病中发挥着重要作用,同时也是睡眠障碍、精神分裂症、双相情感障碍等精神心理疾病的重要发病因素。CUMS是模拟慢性应激制备抑郁症的经典方法,CUMS后动物表现出运动能力降低、精神萎靡、欣悦、快感缺乏等类似人类抑郁症状,能够较为真实地模拟抑郁症患者的某些病因和症状,是比较理想可靠的抑郁动物模型^[17]。本研究发现,CUMS后模型组小鼠快感降低,主要表现为糖水消耗减少,运动及认知功能损伤,社交、空间记忆能力的显著降低,与临床抑郁症患者的表现较为相似^[18]。

头为诸阳之会,脑为元神之府,情志病的发病与脑密切相关。“督脉入络脑”,与脑直接相关联,通过刺激本经上的腧穴能够达到调节本经及相交会经络的经气从而调控大脑功能,故有通督调神之说^[19]。百会穴位于督脉,同时又位于巅顶之处,为百脉交会之穴,具有醒脑开窍、安神定志、通督定痫之效^[20]。印堂穴位于头面部、两眉头之间,同时也位于督脉,具有安神定惊、疏风止痛、醒脑通窍的功效^[21],两穴合用共奏通督调神之效。研究发现,电针百会穴、印堂穴能够通过提高突触可塑性而有效改善母婴分离后抑郁样大鼠学习记忆能力,减少水迷宫寻找平台的潜伏期^[22],同时还能增加慢性应激所致焦虑样小鼠旷场中央区探索时间、高架十字迷宫开臂探索次数与时间,减轻小鼠焦虑样行为^[23]。

LTP的发生是由于短时间内强去极化电位激活了更多的NMDA型谷氨酸受体,从而使蛋白质磷酸化增强,促使钙离子大量流入突触后神经元,因而产生较强的兴奋性突触后电位,与突触可塑性密切相关,后者可直接反映学习记忆情况,因此LTP被认为是学习与记忆的主要分子机制之一^[24]。抑郁症往往会表现为突触前兴奋性递质释放减少^[25],同时海马LTP受损,表现出学习记忆能力的降低,水迷宫实验中潜伏期延长^[22],Y迷宫中表现出空间学习记忆受损^[26],其可能与氧化应激^[27,28]、炎症^[26]相关,而改善受损的LTP能够改善动物抑郁样行为及学习记忆能力^[22]。氟西汀作为临床一线抗抑郁药物,其能够提高细胞兴奋性^[7],抑制突触间5-羟色胺(5-HT)再摄取,增加突触间5-

HT浓度,增强神经可塑性,从而产生抗抑郁作用^[9]。本研究发现电针百会、印堂两穴能够改善海马突触可塑性。因此,本研究表明电针百会、印堂两穴可以改善小鼠抑郁样行为,同时改善小鼠社交及空间学习记忆能力,可能与电针能够降低氧化应激^[23]、减轻炎症^[29]、增强LTP^[22]等相关。

参考文献

- [1] HERRMAN H, PATEL V, KIELING C, et al [J]. Time for united action on depression: a Lancet-World Psychiatric Association Commission [J]. *Lancet*, 2022, 399(10328): 957-1022.
- [2] PRICE R B, DUMAN R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(3): 530-543.
- [3] HUNG S, FU W. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease [J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 47.
- [4] WANG L, PEI J, ZHAN Y, et al. Overview of Meta-Analyses of five Non-pharmacological Interventions for Alzheimer's disease [Z]. 2020: 12, 594432.
- [5] LI W, KONG L, WANG H, et al. High-frequency electroacupuncture evidently reinforces hippocampal synaptic transmission in Alzheimer's disease rats [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(5): 801-806.
- [6] YE Y, LI H, YANG J, et al. Acupuncture attenuated vascular dementia-induced hippocampal long-term potentiation impairments via activation of D1/D5 receptors [J]. *Stroke*, 2017, 48(4): 1044-1051.
- [7] TUNC-OZCAN E, PENG C, ZHU Y, et al. Activating newborn neurons suppresses depression and anxiety-like behaviors [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3768.
- [8] 程觅, 张雪, 史阳琳, 等. 实验大鼠和小鼠穴位定位的研究概况 [J]. *上海针灸杂志*, 2021, 40(5): 640-646.
- [9] PUŚCIAN A, WINIARSKI M, ŁĘSKI S, et al. Chronic fluoxetine treatment impairs motivation and reward learning by affecting neuronal plasticity in the central amygdala [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(3): 672-688.
- [10] LV H, ZHU C, WU R, et al. Chronic mild stress induced anxiety-like behaviors can be attenuated by inhibition of NOX2-derived oxidative stress [J]. *J Psychiatr Res*, 2019, 114: 55-66.
- [11] BRACHMAN R A, MCGOWAN J C, PERUSINI J N, et al. Ketamine as a prophylactic against stress-induced depressive-like behavior [J]. *Biol Psychiatry*, 2016, 79(9): 776-786.
- [12] KRAEUTER A, GUEST P C, SARANYAI Z. The Y-Maze for assessment of spatial working and reference memory in mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 105-111.
- [13] WANG H, LI F, ZHENG X, et al. Social defeat drives hyperexcitation of the piriform cortex to induce learning and memory impairment but not mood-related disorders in mice [J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 380.
- [14] YAN J, PAN Y, ZHENG X, et al. Comparative study of ROCK1 and ROCK2 in hippocampal spine formation and synaptic function [J]. *Neurosci*

Bull, 2019, 35(4):649-660.

[15]李亚慧, 赵红霞, 高蕊. 中医郁证病名解析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(4):430-432.

[16]MARIN M, LORD C, ANDREWS J, et al. Chronic stress, cognitive functioning and mental health [J]. Neurobiol Learn Mem, 2011, 96(4): 583-595.

[17]ANTONIUK S, BIJATA M, PONIMASKIN E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: meta-analysis of model reliability[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 99:101-116.

[18]MONROE S M, HARKNESS K L. Major depression and its recurrences: life course matters[J]. Annu Rev Clin Psychol, 2022, 18:329-357.

[19]阳祺. 论督脉治疗抑郁症[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(6): 119-120.

[20]王茹, 张捷, 韦玲, 等. 百会穴在神志病中的临床应用[J]. 山西中医, 2018, 34(1):59-60.

[21]王波, 杨华元. 从印堂穴归入督脉看经穴研究的发展[J]. 江苏中医药, 2011, 43(11):10-11.

[22]GUO L, LIANG X, LIANG Z, et al. Electroacupuncture ameliorates cognitive deficit and improves hippocampal synaptic plasticity in adult rat with neonatal maternal separation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018:2468105.

[23]吕航. 电针百会、印堂调节 vCA1 氧化应激改善 CUMS 所致焦虑的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.

[24]BALTACI S B, MOGULKOC R, BALTACI A K. Molecular mechanisms of early and late LTP[J]. Neurochem Res, 2019, 44(2):281-296.

[25]CHEN Y, ZHENG Y, YAN J, et al. Early life stress induces different behaviors in adolescence and adulthood may related with abnormal medial prefrontal cortex excitation/inhibition balance [J]. Front Neurosci, 2021, 15:720286.

[26]DISABATO D J, NEMETH D P, LIU X, et al. Interleukin-1 receptor on hippocampal neurons drives social withdrawal and cognitive deficits after chronic social stress[J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(9):4770-4782.

[27]DANG R, WANG M, LI X, et al. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1):41.

[28]DE SOUSA C N S, MEDEIROS I D S, VASCONCELOS G S, et al. Involvement of oxidative pathways and BDNF in the antidepressant effect of carvedilol in a depression model induced by chronic unpredictable stress [J]. Psychopharmacology (Berl), 2022, 239(1):297-311.

[29]WANG L, YANG J, LIN L, et al. Acupuncture attenuates inflammation in microglia of vascular dementia rats by inhibiting miR-93-Mediated TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020:8253904.

(收稿日期:2022-09-24)

(本文编辑:黄明愉)

(上接第40页)

[5]徐雪. 中医护理干预在妇科腹腔镜手术中的应用效果[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2023, 10(7):123-125.

[6]李雨霏. 不同压力二氧化碳气腹对妇科腹腔镜手术患者术后胃肠道功能影响的临床研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.

[7]叶练利, 王春菊. 腹腔镜下卵巢囊肿剔除患者术后胃肠道功能恢复护理方案探究[J]. 浙江创伤外科, 2023, 28(5):1000-1001.

[8]林友燕, 叶小红, 方爱军, 等. 中医护理准入管理制度在推广中医特色护理实践中的应用[J]. 中华现代护理杂志, 2021, 27(4):535-538.

[9]杨思敏. 基于“标本根结”理论探讨针刺对腹腔镜术后胃肠功能的影响[D]. 成都: 成都中医药大学, 2022.

[10]曹立幸, 黄阳雪, 陈其城, 等. 中药防治术后胃肠功能障碍研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12):5-8.

[11]邵建平, 苏锋, 李永元. 小承气汤保留灌肠对胃癌根治全胃切除术后患者腹胀症状及中医证候积分的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2022, 28(2):191-194.

[12]范粤缙, 陈卫东. 小承气汤联合艾灸治疗剖宫产后腹胀临床观察[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(8):1290-1291.

[13]韩旭东, 吴珍珍, 李芳, 等. 穴位敷贴及中药足浴联合 ERAS 技术对腹腔镜子宫全切术后胃肠功能恢复的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2021, 43(1):48-51.

[14]黄燕红, 张飞兰, 张芙蓉, 等. 足三里穴位注射结合点压按揉防治术后恶心呕吐 65 例[J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(10):761.

[15]刘荔娟, 张丽丽, 曾芳. 天枢穴治疗消化系统疾病临床运用规律分析[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(3):401-403.

[16]王小丽, 魏钰钰, 肖霞萍, 等. 穴位贴敷对腹腔镜术后胃肠功能恢复效果的 Meta 分析[J]. 医学信息, 2022, 35(13):103-109.

[17]黄阳雪, 武曼丽, 赵敏宏, 等. 穴位贴敷促进妇科腹腔镜术后胃肠功能恢复的 Meta 分析[J]. 世界中医药, 2021, 16(23):3523-3531, 3538.

[18]陈从从. 中药足浴配合穴位贴敷对妇科术后促进胃肠功能恢复的影响[J]. 双足与保健, 2018, 27(20):9-10.

(收稿日期:2023-10-30)

(本文编辑:蒋艺芬)