

· 实验研究 ·

电针对抑郁样小鼠内侧前额叶锥体神经元
E/I 平衡的影响[※]朱传安 谢彦颖[▲]

摘 要 目的:探讨电针对抑郁样小鼠内侧前额叶(mPFC)锥体神经元兴奋/抑制(E/I)平衡变化的影响。**方法:**30 只 6~7 周龄 SPF 级雄性 C57/BL6 小鼠随机分为对照组、模型组、电针组,每组 10 只。采用慢性不可预见性温和性应激(CUMS)方法制备抑郁动物模型,电针百会、印堂进行干预,30 min/d,共 10 d。采用糖水偏好实验、强迫游泳实验、悬尾实验评估小鼠抑郁样行为,采用全细胞记录检测 mPFC 锥体神经元 E/I 比值。**结果:**与对照组比较,模型组小鼠糖水消耗显著减少、强迫游泳与悬尾不动时间显著增加,sEPSC 频率及电容量显著减少,sIPSC 频率及电容量显著增加,E/I 比值显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与对照组比较,电针组小鼠糖水消耗显著减少、强迫游泳与悬尾不动时间显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$),sEPSC 与 sIPSC 频率、幅度、电容量及 E/I 无明显改变,差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,电针组小鼠糖水消耗显著增加、强迫游泳与悬尾不动时间显著减少,sEPSC 频率及电容量显著增加,sIPSC 频率及电容量显著减少,E/I 比值显著提高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**电针能够改善小鼠抑郁样行为,改善 mPFC 区锥体神经元异常 E/I 平衡。

关键词 电针;小鼠;抑郁症;锥体神经元;兴奋/抑制平衡

抑郁症(depression)是世界上主要的精神心理障碍之一,全球约有 2.8 亿人患有抑郁症^[1]。抑郁症的症状广泛,涵盖情绪、动机、认知和生理领域,包括快感缺失、与奖赏相关的异常感知和记忆改变^[1]。外界应激,如童年虐待、校园霸凌、生活压力等,被认为是导致抑郁症发病的外在因素,越来越多的证据表明,表观遗传变化是应激与基因组相互作用的关键机制,从而导致 DNA 结构、基因表达和行为的改变^[2]。前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)是重度抑郁症中持续受损的脑区之一,研究^[3]显示,抑郁症患者 PFC 脑区的功能和结构发生异常,主要与负性情感、快感缺失、绝望样行为等密切相关。慢性应激引起的情绪障碍,如焦虑和抑郁,涉及 PFC,尤其是内侧前额叶(medial prefrontal cortex, mPFC)中兴奋性谷氨酸能系统和抑制性 GABA 能系统之间的失衡,然而,兴奋/抑制(excitatory/inhibitory, E/I)失衡的确切性质尚不清楚^[4]。循证医学指出,针灸对抑郁症疗效明确,且更加安全^[5]。目前,

研究发现针灸抗抑郁可能与调控丘脑-垂体-肾上腺轴、相关神经递质、海马区神经结构和功能、胞外特定信号通路等有关^[6],但具体机制尚不明确。本研究拟采用慢性不可预见性温和性应激(chronic unexpected mild stress, CUMS)制备抑郁样动物模型,探讨抑郁样小鼠 mPFC 脑区锥体神经元 E/I 平衡的变化,并观察电针对 E/I 平衡及小鼠抑郁样行为的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 30 只 6~7 周龄 SPF 级雄性 C57/BL6 小鼠购于厦门大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(闽)2018-003。饲养环境:每笼 5 只,温度 22~24 ℃,光暗周期 12 h/12 h。适应性饲养 1 w 后,将小鼠随机分为对照组、模型组、电针组,每组 10 只。动物实验在厦门市仙岳医院精神卫生研究室开展,所有操作均严格遵守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 异氟烷(麦克林, I833358-250 g)、一次性针灸针(中研太和, 0.16 mm×7 mm)、小动物行为学检测系统(Stoeling, ANY-maze version

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

▲通信作者 谢彦颖,男,副主任医师。研究方向:精神疾病的发病机制与针灸的作用机理。E-mail:yanying0202@163.com

• 作者单位 福建省厦门市仙岳医院(福建 厦门 361012)

4.99 m)、实验动物麻醉呼吸机(瑞沃德, R58S)、微电极拉制仪(Sutter, P-1000)、刺激器(BMS-master-9)、震动切片机(Leica, VT1000S)、放大器(Axon Instrument, Multiclamp 700B)、数模转换器(Axon Instrument, 1550B)、CMOS相机(HAMAMATSU, C11440-36U)。

1.3 动物模型制备 模型组、电针组采用CUMS方法制备抑郁动物模型^[7],连续21 d随机给予以下不同应激:①禁食禁水15 h;②无垫料饲养2 h;③无垫料饲养2 h+禁食禁水15 h;④笼子倾斜2 h+无垫料饲养2 h;⑤潮湿垫料饲养2 h;⑥明暗时间紊乱24 h+束缚1 h。模型成功标准:快感缺失(糖水消耗减少)、绝望无助行为(强迫游泳与悬尾实验中不动时间延长)^[7,8]。造模期间,对照组小鼠进行常规饲养。

1.4 干预方法 电针组小鼠行电针刺激,具体操作:使用5%异氟烷麻醉小鼠后,将异氟烷调至2%进行维持麻醉。小鼠俯卧位于保温垫(32 ℃),针刺百会、印堂(穴位定位参照《实验动物常用穴位名称与定位第3部分:小鼠》^[9]),刺入约5 mm,连接Master 9脉冲刺激器,其输出参数设置为连续波、2 Hz、1 mA,每天电针30 min,共10 d。电针期间其余组小鼠仅以相同方式麻醉,无电针干预。

1.5 观察指标与检测方法

1.5.1 糖水偏好实验^[8] 于干预结束后第1~3 d进行检测。小鼠单笼饲养,第1 d:予1瓶1%蔗糖水与1瓶纯水,自由饮食饮水;第2 d:予2瓶1%蔗糖水,自由饮食饮水;第3 d:禁水16 h后,予1瓶纯水与1瓶2%蔗糖水,记录24 h消耗量,调换两瓶位置/12 h。小鼠糖水偏好指数=蔗糖水/(蔗糖水+水)×100%。

1.5.2 强迫游泳实验^[8] 于干预结束后第4 d进行检测。透明塑料圆桶中装入20 cm深的纯水(水温为24~26 ℃),将小鼠放入圆桶中,测试6 min,记录后4 min小鼠不动时间。

1.5.3 悬尾实验^[8] 于干预结束后第5 d进行检测。用胶带固定小鼠尾部并悬吊在距离地面30 cm高的水平杆上,测试6 min,记录后4 min小鼠不动时间。

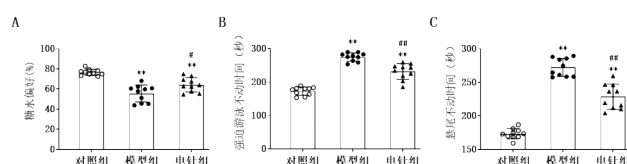
1.5.4 全细胞记录^[8] 于干预结束后第6 d进行检测。5%异氟烷麻醉小鼠后快速断头取脑,使用震动切片机制备300 μm厚度脑片,脑片34 ℃水浴孵育30 min,室温(23~26 ℃)孵育1 h。将电压钳制在-60 mV记录自发性兴奋性突触后电流(spontaneous excitatory postsynaptic currents, sEPSC), +10 mV记录自发性抑制性突触后电流(spontaneous inhibitory post-

synaptic currents, sIPSC)。实验过程中给脑片始终提供95% O₂与5% CO₂混合气体。记录完成后分析突触后电流的频率(Hz)、幅度(pA)、电容量(pC)及sEPSC/sIPSC结果。

1.6 统计学方法 采用SPSS 23.0对数据进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。数据若符合正态分布及方差齐性,采用单因素方差分析进行分析,两两比较采用Tukey检验;经校正后若不符合正态分布及方差齐性,采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

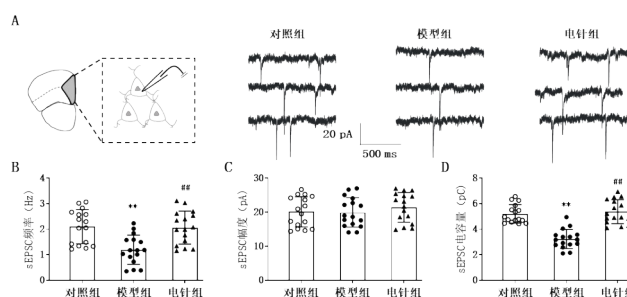
2.1 各组小鼠抑郁相关行为学比较 与对照组比较,模型组、电针组小鼠糖水消耗显著减少($P < 0.01$)、强迫游泳与悬尾不动时间显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,电针组小鼠糖水消耗显著增加($P < 0.05$)、强迫游泳与悬尾不动时间显著减少($P < 0.01$)。见图1。



与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图1 各组小鼠抑郁相关行为学比较

2.2 各组小鼠sEPSC比较 与对照组比较,模型组小鼠sEPSC频率显著减少($P < 0.01$),幅度无明显改变($P > 0.05$),电容量显著减少($P < 0.01$),电针组小鼠sEPSC频率、幅度、电容量均无明显改变($P > 0.05$);与模型组比较,电针组小鼠sEPSC频率显著增加($P < 0.01$),幅度无明显改变($P > 0.05$),电容量显著增加($P < 0.01$)。见图2。

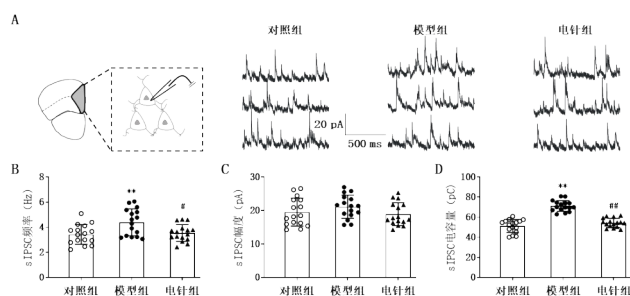


与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$

图2 各组小鼠sEPSC比较

2.3 各组小鼠sIPSC比较 与对照组比较,模型组小鼠sIPSC频率显著增加($P < 0.01$),幅度无明显改变($P > 0.05$),电容量显著增加($P < 0.01$),电针组小鼠sIPSC频率、幅度、电容量均无明显改变($P > 0.05$);与

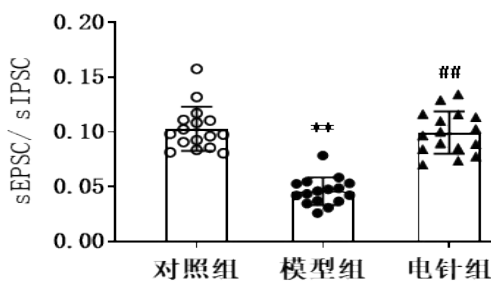
模型组比较,电针组小鼠 sIPSC 频率显著减少($P<0.05$),幅度无明显改变($P>0.05$),电容量显著减少($P<0.01$)。见图3。



与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图3 各组小鼠 sIPSC 比较

2.4 各组小鼠 E/I 平衡比较 与对照组比较,模型组小鼠 E/I 比值显著降低($P<0.01$),电针组小鼠 E/I 比值无明显改变($P>0.05$);与模型组比较,电针组小鼠 E/I 比值显著提高($P<0.01$)。见图4。



与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$

图4 各组小鼠 E/I 平衡比较

3 讨论

慢性应激是抑郁症最常见的发病原因,能够导致大脑发生多种生理变化,包括通过下丘脑-垂体-肾上腺轴改变皮质酮释放节律、神经发生受损、突触功能障碍和基因表达异常等^[10],同时还能引起行为方面改变,包括抑郁样行为、奖赏反应减少和睡眠障碍等^[11]。研究^[12]表明,暴露于慢性温和性应激环境中的动物在糖水偏好测试中糖水消耗明显减少,表明动物快感缺乏,与临床中抑郁症愉快感丧失相似。因此,慢性应激动物模型广泛用于抑郁性神经病理学研究中^[13]。

百会穴具有醒脑开窍、安神定志、通督定痫的功效^[14],印堂穴具有安神定惊、疏风止痛、醒脑通窍的功效^[15],且两穴均位于督脉之上,《素问·骨空论》记载“督脉者,起于少腹以下骨中央……上额交巅上,入络脑……”,因此督脉直接与脑连接,可通过调控自身神经影响脑的功能活动。同时,督脉循身之背,主一身之阳,统率督促全身阳经之气,有“阳脉之海”之称,而

抑郁症患者的临床表现主要以心境低落、兴趣和愉悦感缺失、精力降低等为主,多为中医“阳虚”范畴^[16,17],针刺百会、印堂可调节一身阳气,阳气充足,阴平阳秘,精神乃治,故可选此二穴治疗抑郁症^[18]。研究发现,电针百会、印堂能通过调节海马中碱性成纤维细胞生长因子(FGF2)的表达来改善 CUMS 诱导的大鼠抑郁样行为^[19],并且能够调节海马和前额叶星形胶质细胞中 GFAP 的表达,增加血清中抗炎细胞因子 IL-10 的含量发挥抗抑郁作用^[20],同时还可以通过调节 5-HT 受体水平,介导恢复海马 CA1 突触可塑性来改善抑郁样行为^[21]。

研究^[22]表明,PFC 在调节情绪、认知方面至关重要,兴奋性和抑制性神经传递之间的平衡起着根本性的作用,PFC 是一个独特的结合皮质区域,从感觉区域、边缘结构和神经核团接收多模态输入,并负责处理这些信息输入,以有效地指导正在进行的行为。PFC 中 E/I 失衡是多种精神疾病的病理基础,包括精神分裂症、孤独症、抑郁症、焦虑障碍等。研究^[23]发现,早期应激(母婴分离)可致不同年龄大鼠表现出不同的行为学表现:未成年大鼠表现出焦虑样行为,mPFC 锥体神经元 E/I 比值显著增高,主要表现在 sEPSC 频率及电容量增加,而成年大鼠表现出抑郁样行为,mPFC 锥体神经元 E/I 比值显著降低,主要表现在 sEPSC 频率及电容量降低、sIPSC 频率增高。在社交失败诱导的抑郁样小鼠模型中发现 mPFC 的神经元活动降低,激活 mPFC 神经元活性可以有效改善小鼠抑郁样行为^[24]。本研究发现,CUMS 所致抑郁样小鼠 mPFC 锥体神经元 E/I 比值降低,神经元活动下降,电针能够有效调控异常的 E/I 比值,激活神经元,改善小鼠抑郁样行为。

综上所述,CUMS 能够诱导 mPFC 锥体神经元 E/I 失衡介导抑郁样行为的发生,电针能够通过调控 E/I 平衡改善小鼠抑郁样行为,但 CUMS 是通过何种机制诱导 E/I 失衡及电针如何调控 E/I 的内在机制尚不清楚,在接下来的研究中将进一步完善相关机制探讨。

参考文献

- [1] MCCARRON R M, SHAPIRO B, RAWLES J, et al. Depression[J]. Ann Intern Med, 2021,174(5):ITC65-ITC80.
- [2] PARK C, ROSENBLAT J D, BRIETZKE E, et al. Stress, epigenetics and depression: A systematic review[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019,102: 139-152.
- [3] PIZZAGALLI D A, ROBERTS A C. Prefrontal cortex and depression[J]. Neuropsychopharmacology, 2022,47(1):225-246.

(下转第 54 页)