

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.08.025

电针对 WKY 模型大鼠抑郁样行为及缰核 c-fos 蛋白的影响

陈泽钦¹, 董 波¹, 黄 丽¹, 韩栩珂¹, 李 蔚², 徐世芬¹

1. 上海中医药大学附属上海市中医医院针灸科(上海 200071); 2. 新疆医科大学(新疆 乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 观察电针对 WKY 抑郁模型大鼠行为学及缰核 c-fos 蛋白表达的影响。**方法** 将 24 只雄性 WKY 大鼠随机分为电针组(EA)、假针组(sham EA)、模型组(model), 每组 8 只。另将 Wistar 雄性大鼠 8 只设为正常组(normal)。通过旷场实验、糖水实验、强迫游泳实验对大鼠进行行为学评价, 并用免疫荧光方法检测大鼠缰核中 c-fos 表达。**结果** 与正常组比较, 模型组旷场实验的水平运动、垂直运动和蔗糖水摄入比均明显下降($P < 0.05$), 强迫游泳的不动时间和缰核 c-fos 表达均增加($P < 0.05$)。与假针组比较, 电针组旷场实验的水平运动和垂直运动、蔗糖水摄入比均明显增加($P < 0.05$), 强迫游泳的不动时间和缰核 c-fos 表达减少($P < 0.05$)。**结论** 电针可改善 WKY 抑郁模型大鼠的行为异常, 明显降低缰核中 c-fos 的表达, 这可能是电针治疗抑郁症的机制之一。

【关键词】 电针; 抑郁症; 缰核; c-fos

Effects of electroacupuncture on the behavior and c-fos of habenular nucleus in the depressive-like rats with WKY model

CHEN Ze-qin¹, DONG Bo¹, HUANG Li¹, HAN Xu-ke¹, LI Wei², XU Shi-fen¹

1. Department of Acupuncture, Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200071; 2. Xinjiang Medical University, Urumqi, 830011

Abstract: Objective To observe the effects of electroacupuncture(EA) on depressive-like behavior and c-fos protein expression of habenular nucleus in the WKY rat model. **Methods** 24 male WKY rats were randomly divided into the EA, sham and model groups, 8 in each group. 8 Wistar male rats were set as normal group. The behaviors were evaluated by open field test, sucrose preference test and force swimming test, the expression of c-fos was detected by immunofluorescence. **Results** Compared with the control group, the behaviors of open field test and Sucrose preference test in model group decreased significantly ($P < 0.05$), and the immobile time of force swimming test and c-fos expression of habenular nucleus increased significantly ($P < 0.05$). Compared with sham group, the behaviors of open field test and Sucrose preference test in EA group increased significantly ($P < 0.05$), and the immobile time of force swimming test and c-fos expression of habenular nucleus decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture could improve the depressive-like behaviors of WKY rats and decrease the expression of c-fos protein in habenular nucleus. It may be one of the mechanisms of electroacupuncture on depression.

Keywords: electroacupuncture; depression; habenular nucleus; c-fos

抑郁症是一种伴有多种躯体心理症状的严重精神障碍性疾病, 常表现为悲伤、内疚、兴趣减弱、快感缺失的心理症状和多种躯体症状^[1]。在中国, 已经是仅次于心脏病的第二大疾患, 其巨大的经济和精神心理负担给家庭和社会造成了巨大的影响^[2]。针灸作为对精神疾病绿色而有效的古老治法值得进一步推广和应用。抑郁症从病因到症状多样而复杂, 普遍认为可能

由遗传、环境及心理等多种因素共同造成, 经典的抗抑郁药物如单胺氧化酶抑制剂、三环类药物以及单胺递质重摄取抑制剂在治疗上存在迟滞性、依赖性、疗效不确定性等缺点^[3]。传统病理生理学分子机制认为, 抑郁症主要与大脑内的单胺能神经递质在脑内的水平失衡相关, 近年来另外一种神经可塑性假说受到了越来越多的认可^[4-5]。该假说认为缰核在抑郁症发病机制中起到了关键的作用, 长期的负面情绪对包括缰核在内的与奖赏情绪相关的神经环路造成可塑性的变化, 从而加重抑郁症状^[6]。电针对缰核 c-fos 的研究尚未见报道, 本实验旨在观察电针后缰核活性的改变, 从而探讨电针治疗抑郁症的相关机制。

〔基金项目〕上海市教委科研创新重点项目(2014zz116); 上海市卫计委项目(ZY3-CCCX-3-3022)

〔作者简介〕陈泽钦, 男, 硕士生, 主要从事针灸治疗脑病研究工作

〔通讯作者〕徐世芬, 副教授, 硕士生导师。

E-mail: xu_teacher2006@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4 周龄 Wistar 和 Wistar Kyoto (WKY) SPF 级雄性大鼠, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证编号: SCXK(京)2012-0001。饲养于华东师范大学脑病研究所动物中心。

1.1.2 药物与试剂 蔗糖(5% 蔗糖水溶液: 将蔗糖 100 g 溶于蒸馏水中, 定容至 2 L), 美国 Sigma 公司; 异氟烷(批号: 2355843910), 深圳市瑞沃德生命科技有限公司; 4% 多聚甲醛(批号: 30525-89-4), 上海元象医疗器械有限公司; 一抗(1:50, 批号: NB600-1428), 美国 Novus 公司; 荧光二抗, 488-山羊抗小鼠(批号: GB25301), 谷歌生物; 二甲苯, 国药集团化学试剂有限公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, 批号: G1012), 谷歌生物; 抗荧光淬灭封片剂(批号: G1401), 谷歌生物。

1.1.3 仪器 电针治疗仪(G6805_1A), 上海华谊医用仪器厂; 旷场实验箱、强迫游泳实验系统, 上海移数信息科技有限公司; 包埋机(JB-P5), 武汉俊杰电子有限公司; 倒置荧光显微镜和成像系统(Nikon Eclipse Ti-SR/ Nikon DS-U3), 日本尼康公司。

1.2 分组与干预 将 24 只 WKY 大鼠随机分为电针组(EA)、假针组(sham EA)和模型组(model); Wistar 大鼠 8 只设为正常组(normal)。并记录初始体质量。

正常组、模型组不做任何干预。电针组: WKY 大鼠 8 只, 适应性喂养一周。参照《实验动物针灸穴位图谱》选取大鼠百会、印堂穴为治疗穴位。将电针治疗仪导线的正负极两端露出铜丝并缠绕于 0.25 mm × 25 mm 一次性不锈钢毫针上, 胶布固定。在透明储物盒底部钻 3 个直径约为 1 cm 的小孔, 与导线相连的毫针通过其中一个孔, 另外两个小孔为通气孔。治疗时, 将大鼠置于实验台上, 分别刺入百会、印堂穴约 5 mm, 以手下有沉紧感为度, 胶布固定针灸针。将事先准备好的透明储物盒盖住大鼠后, 采用电针仪, 给予连续波频率为 2 Hz 电流, 电流强度根据大鼠的耐受情况调整, 即头部出现颤动并且不嘶叫为度, 从 0.1 mA 开始依次逐渐加大, 每次治疗 15 min, 共 3 周。治疗过程中, 注意观察大鼠是否要将针灸针剥掉, 如有上述情况, 可轻轻拍打储物盒, 转移大鼠注意力。另外, 保持整个实验环境的安静, 避免声音或动作过大造成大鼠恐慌^[7]。假针组: WKY 大鼠 8 只, 适应性喂养一周。采用与电针组同样的抓取方法, 将同型号针灸针刺入大鼠百会、

印堂体表(不刺入穴位, 以避免非特异性针刺效应), 针灸针与导线相连, 但不通电。留针时间与治疗时间均同电针组。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 糖水偏好实验(sucrose preference test, SPT)

电针干预第 21 天结束当天, 训练大鼠适应含糖饮水。第一个 24 h, 每笼均放置 2 个水瓶, 其中 1 瓶为 5% 蔗糖水 150 ml, 另一瓶为纯水 150 ml。随后 24 h, 禁食禁水。正式实验时, 给予大鼠 5% 蔗糖水和纯水各 150 ml, 12 h 后两瓶水的位置进行调换, 24 h 后分别测量每只大鼠糖水和纯水的消耗量, 同时计算糖水偏好百分比。计算公式为: $[(糖水饮用量)/(糖水饮用量) + (纯水饮用量)] \times 100\%$ ^[8]。

1.3.2 强迫游泳实验(force swimming test, FST) SPT 测试结束当天, 进行 FST 预游泳。强迫游泳实验装置为高 40 cm、直径 30 cm 的透明丙稀酰胺树脂材料圆桶。将大鼠置于水温为 23 ℃ ~ 25 ℃, 水位 32 cm 的圆桶中, 保证大鼠后肢不能触及圆桶底部。第一天对全部大鼠进行 15 min 预游, 结束后擦干继续饲养。24 h 后进行 5 min 的强迫游泳测试, 记录并分析不动时间(漂于水面, 不动或微小动作时间)。每只大鼠测试结束后需重新换干净的水, 避免遗留粪便及气味对下一只大鼠测试造成干扰。

1.3.3 旷场实验(open filed test, OFT) 电针干预后第 25 天, 即 FST 测试后第二天进行 OFT。旷场实验箱为规格 80 cm × 80 cm × 40 cm, 四周及底面均为黑色的正方形敞箱。箱底用白线划分成 16 cm × 16 cm 等面积方格 25 个。将大鼠置于实验箱箱底的中央格, 记录大鼠水平运动时间和距离、中央运动时间和距离及垂直运动次数(两前肢离地或攀附箱壁记为 1)。敞箱顶部摄像头记录其 5 min 内的活动并通过连接电脑储存分析数据。每做完一只大鼠后, 立即清理箱内的粪便及尿液, 同时使用 75% 酒精喷洒擦拭实验箱, 避免前一只大鼠所遗留下的气味对下一只大鼠行为检测造成影响。

1.3.4 c-fos 表达 行为学试验结束后, OFT 测试后第二天进行取材, 麻醉、开胸, 经左心室冷藏 0.9% NaCl 溶液冲洗至两肺变白后, 4% 多聚甲醛灌流固定, 取脑后石蜡包埋, 修块切片(6 μm)。采用免疫荧光方法(immunofluorescence)检测大鼠缰核中 c-fos 的表达^[9]。具体操作如下。

①石蜡切片脱蜡至水: 二甲苯 I 15 min, 二甲苯 II

15 min,无水乙醇 I 5 min,无水乙醇 II 5 min,85% 酒精 5 min,5% 酒精 5 min,蒸馏水洗。②抗原修复:置于柠檬酸抗原修复缓冲液(pH 6.0)中修复。中火 8 min,停火 8 min,转中低火 7 min。冷却后置于 PBS(pH 7.4)中晃动洗涤 5 min×3 次。③BSA 封闭:滴加 3% BSA 室温封闭 30 min。④加一抗湿盒内 4 ℃ 孵育过夜。⑤加二抗,晃动洗涤 5 min×3 次。滴加二抗避光室温孵育 50 min。⑥DAPI 复染细胞核,晃动洗涤 5 min×3 次。滴加 DAPI 染液避光室温孵育 10 min。⑦封片:晃动洗涤 5 min×3 次用抗荧光淬灭封片剂封片。⑧镜检拍照:切片于尼康倒置荧光显微镜下观察并采集图像(紫外激发波长 330~380 nm,发射波长 420 nm;FITC 绿光激发波长 465~495 nm,发射波长 515~555 nm)。DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,c-fos 阳性表达为相应荧光素标记的绿光。在显微镜下记录阳性表达个数,每只大鼠选取 5 张切片,每个切片选取 3 个视野,取其平均数。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件分析处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),多组间两两比较用 LSD 法,两组间比较采用 t 检验方法。所有统计结果均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠蔗糖水喜好比的影响 电针组与假针组比较,蔗糖水喜好比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);但低于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组、假针组与正常组比较蔗糖水喜好比明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示 WKY 鼠蔗糖水喜好比低于正常大鼠,表现为兴趣缺失,电针可改善抑郁模型大鼠兴趣缺失的症状。见表 1。

2.2 对大鼠强迫游泳实验的影响 电针组与假针组比较,强迫游泳的不动时间明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组与正常组比较不动时间显著增大,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。WKY 大鼠在

强迫游泳中的不动时间越长,表明求生欲望越低,其抑郁症状越明显。提示 WKY 大鼠抑郁症状明显,经电针治疗后,可减少 WKY 大鼠强迫游泳中不动时间,增加求生欲,改善抑郁症状。见表 2。

表 1 各组大鼠 24 h 蔗糖水喜好比的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	蔗糖水喜好比(%)
正常组	8	85.5 ± 3.5
模型组	8	79.7 ± 3.2 * ^{###}
电针组	8	82.3 ± 8.3 [#]
假针组	8	78.6 ± 6.3 * ^{###}

注:与电针组比较,* $P < 0.05$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$

表 2 各组大鼠不动时间比较($\bar{x} \pm s, s$)

组别	n	不动时间(s)
正常组	8	46.6 ± 4.6
模型组	8	197.5 ± 18.1 ^{###}
电针组	8	81.4 ± 7.5
假针组	8	141.5 ± 13.2 *

注:与电针组比较,* $P < 0.05$,与正常组比较,^{###} $P < 0.05$

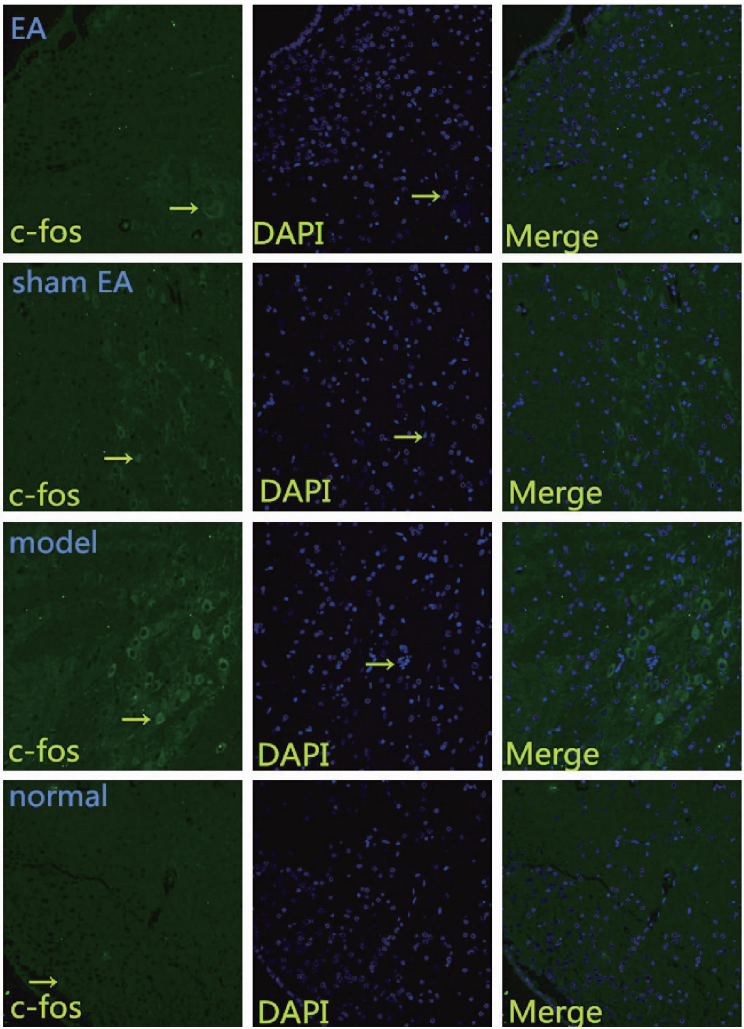
2.3 电针对各组大鼠旷场实验行为的影响 电针组与假针组比较,水平运动总时间和总距离及中央运动时间和路程均增加,差别有统计学意义($P < 0.05$)。模型组与正常组比较各指标均数值较小,差异有统计学意义($P < 0.05$)。垂直次数中电针组高于假针组($P < 0.05$),模型组则少于正常组,比较有统计学差异($P < 0.05$)。表示 WKY 大鼠水平运动距离和时间、垂直次数少于正常大鼠,是焦虑抑郁和探索好奇欲低下的表现;经电针治疗后,可增加大鼠活动距离、时间和探索欲,改善抑郁心理状态。见表 3。

2.4 对大鼠缰核中 c-fos 表达的影响 电针组与假针组比较,缰核中 c-fos 阳性表达个数明显减少($P < 0.05$),模型组与正常组比较 c-fos 阳性表达数增加($P < 0.01$)。提示 c-fos 在 WKY 大鼠缰核中表达高,说明缰核的活性更强,其抑郁症状越明显。而电针可减少 WKY 大鼠缰核内的 c-fos 表达水平,降低缰核的活性,改善抑郁症状。见图 1、表 4。

表 3 各组大鼠在旷场实验中的各项指标比较($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	水平运动总距离(cm)	水平运动总时间(s)	中央运动路程(cm)	中央运动时间(s)	垂直次数(次)
正常组	1 589 ± 146	88.3 ± 3.7	442 ± 93	41 ± 7	53 ± 13
模型组	1 136 ± 96 ^{###}	69.3 ± 8.1 [#]	196 ± 37 [#]	39 ± 4 ^{###}	47 ± 6 [#]
电针组	1 475 ± 121	81.3 ± 4.1	355 ± 74	37 ± 6	50 ± 11
假针组	1 213 ± 83 *	73.7 ± 6.2 *	217 ± 81 *	27 ± 3 *	33 ± 9 *

注:与电针组比较,* $P < 0.05$;与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$



注:图中箭头所指绿色的圆圈样表达为 c-fos 的阳性表达,蓝色为细胞核的显像。由上至下分别为电针组、假针组、模型组和正常组;由左至右分别为单 c-fos 的阳性表达、单细胞核表达和 c-fos 与细胞核融合图

图 1 各组大鼠缰核中 c-fos 的表达(免疫荧光染色,×200)

表 4 各组大鼠缰核中 c-fos 蛋白表达数量的比较($\bar{x} \pm s$, 个)

组别	n	c-fos
正常组	8	38.9 ± 11.6
模型组	8	62.3 ± 14.9 ^{###}
电针组	8	36.8 ± 19.8
假针组	8	65.6 ± 19.0 [*]

注:与电针组比较, * $P < 0.05$; 与正常组比较, ^{###} $P < 0.01$

3 讨论

中医学认为,抑郁症由情志不畅、气郁不舒、思虑过度而发病,其病位在脑,与心、肝、肾等多个脏腑有关。“病变在脑,首取督脉”^[10],治疗应以健脑提神、疏肝解郁、调畅情志为原则,以督脉的穴位为主。督脉与脑的关系密不可分,在治疗抑郁症中起着重要的作用。百会为督脉与手足三阳经及足厥阴肝经之会,位于头顶,有醒脑开窍、升提阳气之功,是宁心安神、定惊益智的要穴。《针灸大成》云其“主心烦闷,惊悸健忘,忘前

失后,心神恍惚”。印堂为经外奇穴,是督脉在前额所过之处,为调神清脑、疏通脑络的要穴。两穴相配伍可增强治疗情志疾患的疗效,而且可以减少多个穴位在治疗中产生的不确定性。本课题组长期应用此二穴治疗抑郁症,不仅起效快、无副作用,还可以有效改善饮食、消化、运动等多系统伴发紊乱的症状^[11]。

WKY 抑郁模型大鼠模拟了抑郁症患者的核心临床症状,被广泛应用于机制和疗效研究^[12]。本实验中 WKY 大鼠明显处于抑郁状态,与正常大鼠 SPT、OFT 和 FST 中活动性的测试均可体现出兴趣降低、快感缺失、求食欲望减弱等特点,证明该模型符合抑郁模型成功的评判标准。本实验研究发现,电针可明显改善抑郁大鼠行为学症状,增加大鼠蔗糖水喜好比,减少大鼠在强迫游泳中的不动时间,增加在旷场实验中的活动距离和时间,多方面改善大鼠的抑郁行为学表现。行为学评价可直观反映电针治疗抑郁症的效果,且现代的视频分析系统减少了人为操作的误差,为实验提供了

更加可靠的客观数据。

关于抑郁症的发病机制,传统经典的单胺类神经递质学说认为是由于脑内去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)和多巴胺(DA)等功能不足而造成的。然而此学说并不能完全解释抑郁症的机制,例如患者服用选择性 5-HT 再摄取抑制剂等抗抑郁药物能在给药后数分钟之内即增加了患者脑内突触间隙的 5-HT 的递质浓度,却往往需数周后才能改善患者临床症状,且治愈率也有限。随着更深入的研究,神经可塑性假说受到了普遍认可。该假说认为,抑郁症是大脑内与奖赏及情绪相关的神经环路在长期的负面情绪刺激下发生了可塑性变化,并最终导致了抑郁症的发生。缰核是位于丘脑后上方海马下方靠近中线左右对称的古老核团。越来越多的学者认为缰核在精神类疾病中包括抑郁症扮演着重要的角色,比如兴趣缺失、睡眠障碍、绝望行为等抑郁症核心症状都与缰核的异常神经活动有关^[5, 13]。缰核在中枢神经系统的单胺类神经调节中有着极其重要的作用,是连接前脑边缘系统和 midbrain 单胺中心的中心枢纽^[14]。刺激缰核能抑制 5-羟色胺能中心中缝背核及中缝核(dorsal raphe nucleus, DRN)和多巴胺能中心腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)的神经元活动^[9]。c-fos 为一种即早基因,参与大脑内多种重要功能的传导和调控,其表达产物 c-fos 蛋白被视为神经元活性的标志,是目前较为理想的脑功能活性定位标记^[15-16]。电针干预后缰核的 c-fos 蛋白表达降低,提示电针的抗抑郁机制可能与降低缰核的活性有关,通过影响缰核的活性,继而减少对下游腹侧被盖区、中缝核和中缝背核等单胺类神经递质中心的抑制,增加递质的释放而起到治疗作用。研究缰核活性在电针治疗抑郁症中的作用具有进一步的现实意义。

参考文献:

- [1] Tanahashi N, Takagi K, Amagasa N, *et al.* Effect of acupuncture stimulation on rats with depression induced by water-immersion stress [J]. *Neurosci Lett*, 2016 (618): 99-103.
- [2] 杨宏波, 张继川. 外侧缰核在抑郁症中的作用研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(5): 1246-1249.

- [3] Nitzan U, Bekerman T, Becker G, *et al.* Physician perception regarding side-effect profile at the onset of antidepressant treatment: a survey of Israeli psychiatrists and primary care physicians [J]. *Ann Gen Psychiatry*, 2016, 15(1): 1-5.
- [4] Nissen C, Holz J, Blechert J, *et al.* Learning as a model for neural plasticity in major depression [J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 68 (6): 544-552.
- [5] Lawson RP, Nord CL, Seymour B, *et al.* Disrupted habenula function in major depression [J]. *Mol Psychiatry*, 2016. DOI: 10.1038/mp.2016.81.
- [6] 叶奎. 缰核与抑郁症的研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(11): 1961-1963.
- [7] She Y, Xu J, Duan Y, *et al.* Possible antidepressant effects and mechanism of electroacupuncture in behaviors and hippocampal synaptic plasticity in a depression rat model [J]. *Brain Res*, 2015 (1629): 291-297.
- [8] Xu J, She Y, Su N, *et al.* Effects of electroacupuncture on chronic unpredictable mild stress rats depression-like behavior and expression of p-ERK/ERK and p-P38/P38 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. DOI: 10.1155/2015/650729.
- [9] Li K, Zhou T, Liao L, *et al.* β CaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression [J]. *Science*, 2013, 341(6149): 1016-1020.
- [10] 徐世芬, 庄礼兴. 抑郁症发病机制及其针刺干预的研究进展[J]. *针灸临床杂志*, 2007, 23(6): 51-54.
- [11] 徐世芬, 庄礼兴, 唐纯志. 针刺对抑郁大鼠行为学及神经内分泌的影响[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(12): 3137-3138.
- [12] Ye K, Li QQ, Jin XJ, *et al.* Effects of ketamine, imipramine, and their combination on depression-like behaviors in Wistar Kyoto rats [J]. *Sheng li xue bao*, 2016, 68(1): 12-18.
- [13] Hikosaka O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(7): 503-513.
- [14] Li B. Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression [J]. *Nature*, 2011, 470 (7335): 535-539.
- [15] Scammell TE, Estabrooke IV, McCarthy MT, *et al.* Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(22): 8620-8628.
- [16] Scammell T, Gerashchenko D, Urade Y, *et al.* Activation of ventrolateral preoptic neurons by the somnogen prostaglandin D2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(13): 7754-7759.

编辑: 季春来

收稿日期: 2016-04-13