

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.15.017

实验研究

针刺对慢性应激抑郁大鼠额叶皮层星形胶质细胞的影响

卢峻¹, 金树英¹, 包伍叶^{1,2}, 卢丽³, 梁佳⁴, 图娅^{*}

(1. 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 内蒙古民族大学附属医院; 3. 河北唐山市丰润区中医医院; 4. 中国中医科学院研究生院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102638, 81173334); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20110013110009); 北京中医药大学自主选题项目资助项目 (2011JYBZZ-JS067)

摘要 **目的** 探讨针刺百会、内关抗抑郁的可能作用机制。 **方法** 将 32 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、针刺组和氟西汀组, 每组 8 只。除正常组外其余各组采用 28 天慢性不可预知的应激方法建立抑郁症大鼠模型, 在造模同时针刺组选取百会、内关穴针刺 10 min, 隔日 1 次, 共 28 天; 氟西汀组给予氟西汀 10 mg/kg 灌胃; 正常组和模型组不干预。分别采用 RT-PCR、免疫组化法检测胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) mRNA 和 GFAP 在额叶皮层的表达。 **结果** 与正常组比较, 模型组大鼠额叶皮层星形胶质细胞形态萎缩, 模型组额叶皮层 GFAP mRNA 表达、GFAP 积分光密度值 (IOD) 均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 针刺组和氟西汀组星形胶质细胞形态明显改善, GFAP mRNA 表达、GFAP IOD 值均显著升高 ($P < 0.01$)。 **结论** 针刺百会、内关穴可能通过上调额叶皮层 GFAP 表达, 改善慢性应激造成的星形胶质细胞损伤, 发挥抗抑郁作用。

关键词 针刺; 百会穴; 内关穴; 抑郁症; 星形胶质细胞; 胶质原纤维酸性蛋白

抑郁症是严重危害人类健康的常见情感性精神障碍疾病, 以持续显著的心境低落为主要特征。抗抑郁药存在不良反应、患者对药物耐受性差以及易复发等问题。针刺疗法治疗抑郁症具有整体调节、无副作用的特点, 其疗效已被大量临床实践证实^[1-3]。以往的研究多集中于神经元的抗抑郁机制, 而近年来研究表明, 神经胶质细胞参与了抑郁症发病机制, 而且抗抑郁药可以调节胶质细胞的功能^[4]。胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) 是星形胶质细胞的骨架蛋白和特有标记物。因此, 本研究采用慢性应激抑郁症大鼠模型, 观察针刺百会、内关穴对抑郁大鼠额叶皮层 GFAP 表达的影响, 进一步探讨其治疗抑郁症的可能机制。

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠 32 只, 清洁级, 体重 (180 ±

20) g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。实验前适应性饲养 1 周。实验动物许可证号: SCXK (京) 2009-2007。

1.2 主要试剂及仪器

总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen 公司, 批号: 15596026); 逆转录试剂盒 (Fermentas 公司, 批号: 00016324); GFAP 兔抗大鼠多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: BA0056); 兔 SP 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: 13122A01); 氟西汀 (浙江丽晶化学有限公司, 分析纯, 批号: 20120227)。

Gene II 型 DNA/RNA 测定仪 (瑞典 Pharmacia biosystem 公司); GeneAmp 9600 型普通 PCR 仪 (美国应用生物公司); DYCP-31D 型琼脂糖水平电泳槽 (北京市六一仪器厂); Image master VDS 扫描仪 (瑞典 Pharmacia Biotech 公司); CM1800 型恒冷箱冷冻切片机 (德国 Leica); 光学显微镜 (日本 Olympus); 环球牌针灸针 (0.25 mm ×

* 通讯作者: tuyab@263.net

13 mm, 苏州针灸用品有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备

32 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为正常组、模型组、针刺组和氟西汀组, 每组 8 只。正常组大鼠正常摄食饮水, 不接受任何刺激。其余各组大鼠接受 28 天慢性应激进行造模^[5], 大鼠适应性饲养 1 周后, 每日随机接受 1 种不同的应激刺激, 具体方法包括: 断食 24 h; 断水 24 h; 夹尾 2 min; 束缚 3 h; 冷水游泳 5 min (10℃); 摇晃 30 min, 造模共持续 28 天。

2.2 干预方法

针刺组在造模同时隔日 1 次在应激前接受针刺干预, 选取百会及内关穴, 穴位定位及针刺深度均参考《实验针灸学》^[6], 进针后捻转, 留针 10 min, 共 28 天。

氟西汀组在造模同时每日在应激前 1 h 灌胃给予氟西汀 10 mg/kg, 共 28 天。

正常组与模型组不干预。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 RT-PCR 法检测大鼠额叶皮层 GFAP mRNA 表达 实验结束后断头处死大鼠, 取额叶皮层 (每组 5 只)。按试剂盒说明书提取组织总 RNA, 并将 mRNA 反转录为 cDNA, 反应条件为 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min。PCR 反应条件为 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共 30 个循环。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统照相, 计算目的基因灰度值与内参 β -actin 的比值。GFAP 上游引物 5'-GGTGTGGAGTGCCT-TCGTAT-3', 下游引物 5'-TACGATGTCCTGG-GAAAAGG-3', 片段长度为 139bp; β -actin 上游引物 5'-CCACCGCAAATGCTTCTAAAC-3', 下游引物 5'-AAGACTGCTGCTGACACCTTC-3', 片段长度

239 bp (由上海生工生物工程有限公司合成)。

2.3.2 免疫组化法检测大鼠额叶皮层 GFAP 表达

实验结束后麻醉大鼠, 进行常规左心室灌注固定 (每组 3 只)。快速灌注生理盐水约 150 ml, 至大鼠肝脏发白, 随即灌注 4% 多聚甲醛约 300 ml。取脑修块, 放入 4% 多聚甲醛后固定 12 h, 后移入 20% 蔗糖溶液, 4℃ 下存放过夜, 待组织块沉底。常规骤冷, 恒冷箱切片行冰冻切片, 片厚 20 μ m。切片吹干, 进行免疫组化 SP 法染色。每只动物取 3 张染色切片, 每张在待测部位取 5 个视野。采用 Image-pro plus 5.1 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司) 分析 GFAP 免疫组化染色的积分光密度值 (IOD)。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠额叶皮层 GFAP mRNA 表达比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠额叶皮层 GFAP mRNA 表达明显下降 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 针刺组、氟西汀组大鼠额叶皮层 GFAP mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠额叶皮层 GFAP mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GFAP mRNA
正常组	5	0.41 $\pm$ 0.07
模型组	5	0.20 $\pm$ 0.03*
针刺组	5	0.35 $\pm$ 0.08 [#]
氟西汀组	5	0.38 $\pm$ 0.07 [#]

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.01$

3.2 各组大鼠额叶皮层 GFAP 表达的比较

图 1 示, 免疫组化染色显示正常组大鼠额叶皮层可见 GFAP 免疫反应阳性细胞, 胞质染色呈星形, 突起长短不一。模型组大鼠星形胶质细胞萎

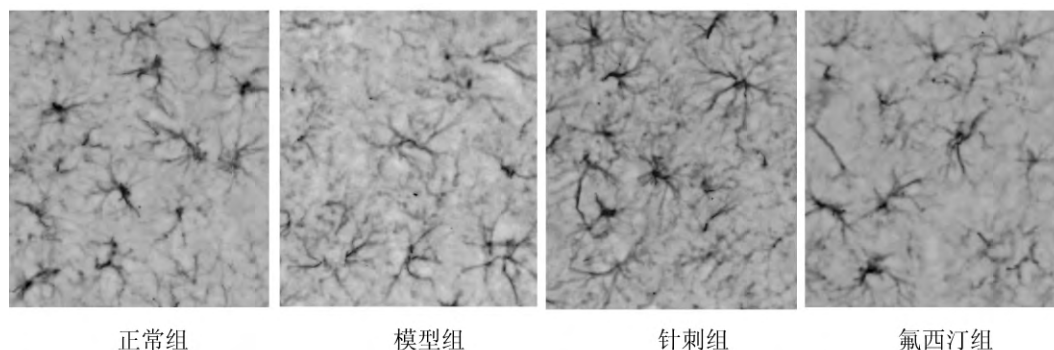


图 1 各组大鼠额叶皮层 GFAP 免疫组化染色 ($\times 400$)

缩。针刺组和氟西汀组可逆转星形胶质细胞萎缩。表 2 示, 模型组大鼠额叶皮层 GFAP IOD 值较正常组明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 针刺组、氟西汀组大鼠额叶皮层 GFAP IOD 值显著升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠额叶皮层 GFAP 表达 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GFAP 积分光密度值
正常组	3	7252.34 ± 1104.90
模型组	3	3702.05 ± 797.25*
针刺组	3	5999.62 ± 1074.23#
氟西汀组	3	6360.96 ± 1113.05#

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$

4 讨论

中医学虽无抑郁症病名, 但根据其症状可以归属于“郁证”、“癰证”、“脏躁”和“百合病”的范畴。抑郁症多因七情所伤, 引起心、肝、脾、肾诸脏功能紊乱, 脑神失调而致病。中医认为, “脑为元神之府”、“心主神明”。因此本研究采用通督醒脑、宁心安神之法, 选取百会、内关穴。督脉循行入脑, 《素问·骨空论》言: “督脉者……上额交巅, 上入络脑, 还出别下项”。督脉又为阳脉之海, 统领诸经, 因此督脉经穴可调节脑神疾病及经脉所属脏腑病变。百会属督脉, 为手足三阳经、督脉及足厥阴肝经之会。《备急千金要方》记载: “烦闷恍惚, 喜怒无常, ……次灸百会一处七壮”, 因此, 百会醒脑安神, 是治疗抑郁症之要穴。中医认为, 心包代心受邪, 内关为手厥阴心包经络穴, 故取内关可以宁心安神。百会和内关合用治疗抑郁症, 共奏通督醒脑、宁心调神之功。杨丹等研究了 2001 ~ 2011 年国内针刺治疗抑郁症的临床文献, 发现经脉中以督脉出现频率最高, 穴位中以百会出现频率最高, 内关仅次于印堂位居第三^[1]。

近年来的研究表明, 神经胶质细胞参与抑郁症的发病机制^[2]。神经胶质细胞在调节神经系统的发育、神经元的损伤和修复、神经元再生和可塑性等方面发挥重要作用, 并参与神经元间突触连接的形成^[3]。GFAP 是星形胶质细胞所特有的细胞骨架蛋白, 对维持星形胶质细胞的形态结构及功能具有重要意义, 因此, GFAP 常被作为星形胶质细胞的特异性标记物。既往研究结果显示, 抑郁症患者脑胶质细胞数目和形态改变^[4], 大脑前皮层和海马 GFAP 表达明显降低^[5], 额叶皮层损害^[6]。动物实验研究显示, 慢性应激可以导致脑星形胶质细胞的萎缩, GFAP 表达下降^[7]。

本研究结果表明, 慢性应激抑郁大鼠额叶皮层星形胶质细胞形态萎缩, 额叶皮层 GFAP 表达明显下降^[8]。针刺和氟西汀治疗可以增加额叶皮层 GFAP 表达, 提示针刺可改善星形胶质细胞损害, 发挥对胶质细胞的保护作用。有研究报道, 电针可以改善抑郁大鼠海马胶质细胞的萎缩并增加海马 GFAP 表达^[9]。这些提示针刺可以缓解抑郁状态下大脑星形胶质细胞的损伤。

本课题组前期研究表明, 针刺可以激活慢性应激抑郁大鼠额叶皮层和海马的细胞外信号调节性激酶 (ERK) -cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 信号通路^[10]; 提高脑源性神经营养因子在额叶皮层和海马的表达^[11]; 减轻海马神经元凋亡, 促进海马神经元再生^[12], 提示针刺可以改善慢性应激导致的大脑神经元损伤、保护脑神经元。而神经胶质细胞对于神经元的损伤修复起着重要作用。星形胶质细胞可以通过产生神经营养因子如脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子等, 调节神经元生长和神经可塑性, 参与海马神经元的再生^[13]。我们推测, 针刺可能通过缓解慢性应激引起的神经胶质细胞受损, 进而改善神经元损伤、促进神经元再生, 从而发挥抗抑郁作用。针刺改善星形胶质细胞损害, 可能是针刺发挥抗抑郁效应的另一脑细胞保护机制。

参考文献

- [1] 罗和春, Halbrich U, 沈渔邨, 等. 电针与氟西汀治疗抑郁症疗效的对照研究 [J]. 中华精神科杂志, 2003, 36 (4): 215-219.
- [2] 段冬梅, 图娅, 陈利平. 电针与百忧解对伴躯体症状抑郁症有效性的评价 [J]. 中国针灸, 2008, 28 (3): 167-170.
- [3] 郑美, 林燕红, 张建斌, 等. 针刺联合抗抑郁药治疗抑郁症 44 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2012, 53 (11): 927-932.
- [4] Banasr M, Duman RS. Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2007, 6 (5): 311-320.
- [5] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. Psychopharmacology (Berl), 1987, 93 (3): 358-364.
- [6] 张露芬. 实验针灸学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 219-220.
- [7] 杨丹, 翟双庆. 从针灸治疗抑郁症考察经脉与神志关系 [J]. 中国针灸, 2013, 33 (4): 317-320.

- [8] Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons [J]. Annu Rev Physiol, 2001, 63:795-813.
- [9] Cotter DR, Pariante CM, Everall IP. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications [J]. Brain Res Bull, 2001, 55(5):585-595.
- [10] Webster MJ, OGrady J, Kleinman JE, et al. Glial fibrillary acidic protein mRNA levels in the cingulate cortex of individuals with depression, bipolar disorder and schizophrenia [J]. Neuroscience, 2005, 133(2):453-461.
- [11] Dwivedi Y, Rizavi HS, Zhang H, et al. Aberrant extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 signalling in suicide brain: role of ERK kinase 1 (MEK1) [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2009, 12(10):1337-1354.
- [12] Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, et al. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole [J]. Mol Psychiatry, 2010, 15(5):501-511.
- [13] Liu Q, Li B, Zhu HY, et al. Glia atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture treatment [J]. J Affect Disord, 2011, 128(3):309-313.
- [14] Lu J, Liang J, Wang JR, et al. Acupuncture activates ERK-CREB pathway in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013:469765. doi: 10.1155/2013/469765.
- [15] 梁佳, 卢峻, 崔善福, 等. 针刺对抑郁模型大鼠皮层和海马脑源性神经营养因子基因和蛋白表达的影响 [J]. 针刺研究, 2012, 37(1):20-24.
- [16] 戴巍, 李卫东, 卢峻, 等. 电针对慢性应激抑郁大鼠海马神经元凋亡及 JNK 信号转导通路的影响 [J]. 针刺研究, 2010, 35(5):330-334.
- [17] Newman EA. New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission [J]. Trends in Neurosci, 2003, 26(10):536-542.

Effects of Acupuncture on Astrocytes in Prefrontal Cortex of Chronic Stress Depression Rats

LU Jun¹, JIN Shuying¹, BAO Wuye^{1,2}, HU Li³, LIANG Jia⁴, TU Ya¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities; 3. TCM Hospital of Fengrun District, Tangshan, Hebei; 4. China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To research the possible mechanism of antidepressant effect of acupuncture on Baihui (GV20) and Neiguan (PC6). **Methods** Totally 32 SD rats were randomized into normal group, model group, acupuncture group and fluoxetine group, with 8 in each. The depression models were established with 28 day-chronic unpredictable stress in all groups except the normal group. During modeling, the acupuncture group was given acupuncture on Baihui (GV20) and Neiguan for 10 min every other day for 28 days. The fluoxetine group was gavaged with 10 mg/kg fluoxetine. The expressions of glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA and GFAP in prefrontal cortex in the normal group were detected with RT-PCR and immunohistochemical staining respectively. **Results** Comparing with the normal group, the morphology of astrocytes was shrinking and the expression of GFAP mRNA and integrated optical density (IOD) of GFAP were significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the morphology of astrocytes was significantly improved and the expression of GFAP mRNA and IOD of GFAP were significantly increased in the acupuncture group and fluoxetine group ($P < 0.01$). **Conclusion**

Acupuncture on Baihui (GV20) and Neiguan (PC6) can relieve the damage of astrocytes caused by chronic stress and play an antidepressant role possibly by up-regulating the expression of GFAP in prefrontal cortex.

Keywords acupuncture; Baihui (GV20); Neiguan (PC6); depression; astrocyte; glial fibrillary acidic protein

(收稿日期: 2014-01-20; 修回日期: 2014-04-10)

编辑: 焦爽

欢迎邮购医学光盘

四大经典 VCD 《黄帝内经》《伤寒论》《金匱要略》《温病学》全套 2500 元, 其中《金匱要略》单套 800 元, 其余每套 600 元。四大基础 VCD 《中医基础理论》、《中医诊断学》、《中药学》、《方剂学》全套 2700 元, 单套 700 元。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社; 收款人: 北京医海林音像书店, 邮编: 100700, 联系人: 张伟平, (010) 64014411-3036; 叶晨, (010) 64013162。