

• 实验研究 •

基于突触可塑性理论探讨电针对 WKY 大鼠行为学及前额皮层突触相关蛋白 mTOR 和 GSK-3 β 的影响 *

冯荣荣¹, 吕桃桃¹, 邢龙飞², 李晓慧¹, 黄树航¹, 秦丽娜^{1△}

(1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学, 北京 102488)

摘要: **目的** 观察电针“百会”和“印堂”对 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠行为及前额皮层相关蛋白 mTOR 和 GSK-3 β 表达的影响。**方法** 将 30 只雄性 WKY 大鼠随机分为电针组、假针组、模型组, 每组 10 只。另将 10 只 Wistar 雄性大鼠设为正常组。正常组、模型组常规喂养 21 d, 不进行任何干预, 假针组予以假针刺安慰治疗。电针组取“百会”和“印堂”进行治疗。21 d 后通过体质量、旷场实验、糖水偏好实验对大鼠行为学改变进行评价。运用 Western Blot 法检测大鼠前额皮层 mTOR 和 GSK-3 β 的表达水平。**结果** 与正常组相比, 模型组体质量、旷场实验的水平运动、垂直运动、蔗糖水摄入比明显低于正常组; 与假针组相比, 电针组大鼠体质量、旷场的水平运动和垂直运动、蔗糖水摄入比明显增加; 前额皮层 mTOR 的表达量中, 电针组高于假针组, 正常组高于模型组; 前额皮层 GSK-3 β 的表达量中, 电针组低于假针组, 正常组低于模型组。**结论** 电针可改善 WKY 大鼠的抑郁状态, 可能与前额皮层 mTOR 表达上调, GSK-3 β 表达下调有关。

关键词: 电针; Wistar-Kyoto 大鼠; 抑郁症; mTOR; GSK-3 β ; 突触可塑性

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2022)02-0054-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2022.02.014

Exploring the Effects of Electroshock on Behavior and Prefrontal Cortex Synapse-related Proteins mTOR and GSK-3 β in WKY Rats Based on Synaptic Plasticity Theory

FENG Rongrong¹, LYU Taotao¹, XING Longfei², LI Xiaohui¹, HUANG Shuhang¹, QIN Lina¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

ABSTRACT: Objective To observe the effects of electroacupuncture "Baihui (DU20)" and "Yintang (EX-HN3)" on the behavior and expression of mTOR and GSK-3 β in prefrontal cortex of Wistar-Kyoto(WKY) rats. **Methods** Thirty male WKY rats were randomly and equally divided into an electroacupuncture group, sham-acupuncture group and model group. Another 10 male Wistar rats were set as a normal group. The normal and model groups were normally fed routinely for 21 days without any intervention, and the sham group was treated with sham-acupuncture for comfort. In the electroacupuncture group, the rats were treated at "Baihui (DU20)" and "Yintang (EX-HN3)", and the behavioral changes were evaluated by their body mass, open field test and sugar-water preference test after 21 days. The expression levels of mTOR and GSK-3 β in the prefrontal cortex were measured by Western Blot. **Results** Compared with the normal group, the body mass, horizontal movement in the open field experiment, vertical movement and sucrose water intake ratio of the model group were significantly lower than those of the normal group; compared with the sham group, the body mass, horizontal and vertical

收稿日期: 2022-02-18

* 基金项目: 北京中医药大学第三附属医院科研孵化项目 (2019kyfh-05); 北京中医药大学新教师启动基金项目 (2020-JYB-XJSJJ-066)

第一作者简介: 冯荣荣(1994-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 针灸治疗神志病。

△通信作者: 秦丽娜, E-mail: qinqin1978119@sina.com

movement in the open field and sucrose water intake ratio of the rats in the electroacupuncture group were significantly increased; the expression of mTOR in the prefrontal cortex was higher in the electroacupuncture group than that in the sham group, and expression of mTOR in the normal group was higher than that in the model group. The expression of GSK-3 β in the prefrontal cortex in the electroacupuncture group was lower than that in the sham group, and the expression of GSK-3 β in the normal group was lower than that in the model group. **Conclusion** Electroacupuncture can improve the depressive state of WKY rats, which may be related to the upregulation of mTOR and downregulation of GSK-3 β in the prefrontal cortex.

KEY WORDS: electroacupuncture; Wistar-Kyoto rats; depression; mTOR; GSK-3 β ; synaptic plasticity

抑郁症是一种复杂的情志病,常伴有精神萎靡、兴趣减退、少言寡语、悲伤忧郁、失眠焦虑、不喜与外界接触等临床症状,严重者会出现自残、甚至自杀等行为^[1-2]。随着社会压力的增加,抑郁症的发病率逐年增加,全球约有3.5亿人正遭受着抑郁症的折磨^[3],对家庭和患者造成了巨大的精神伤害,对社会也产生了难以估计的经济损失^[4]。目前西医治疗抑郁症主要以抗抑郁药为主,存在不良反应明显、疗效不确定、患者依从性差等问题。中医电针因不良反应小、疗效好而得到广泛关注^[5]。关于抑郁症的发病机制,传统认为主要涉及单胺类神经递质功能失调、非单胺类神经递质受体表达的下调和通路信号的传递中断^[6]。突触可塑性理论在抑郁症发病机制的研究中有利于揭示抗抑郁的新靶点,而脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)对细胞的分化和突触可塑性具有重要作用^[7]。

针刺“百会”和“印堂”可以增加BDNF,直接调控PI3K-Akt通路,而PI3K-Akt与BDNF神经可塑性调节、CREB磷酸化关系密切,因此电针可介导CREB调节抑郁大鼠的神经可塑性^[8]。自发抑郁的WKY大鼠前额皮层在PI3K信号传导通路中可以发现突触可塑性破坏^[9],GSK-3和PI3K-Akt-mTOR信号网络通过不同受体激活PI3K及下游活性蛋白,促进细胞生长、增殖和合成代谢^[10]。在神经元的主要信号控制通路中,激活GSK-3介导的mTOR抑制是通过突触活性诱导L-LTP(长持续长时程增强)的关键,这种突触活动可以参与突触可塑性相关蛋白质的表达^[11]。有证据表明,mTOR的激活和GSK-3 β 的抑制参与了抗抑郁的系统,在抑郁症的发病机制中起到了重要作用^[12-13]。因此,基于突触可塑性理论针刺WKY大鼠“百会”和“印堂”观察对前额皮层相关蛋白mTOR和GSK-3 β 表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性Wistar大鼠10只,WKY大鼠30只,6周龄,体质量(210 ± 20)g,SPF级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006,购进后在中日友好医院临床研究所动物房内适应性喂养1周,每笼3只,动物每日专人喂养,控制温度($20 \sim 25^{\circ}\text{C}$)和湿度($55\% \pm 2\%$),自然昼夜节律。

RIPA蛋白裂解液(#9806,Cell Signaling Technology);BCA蛋白定量试剂盒(#7780,Cell Signaling Technology);mTOR抗体(2983T,CST);GSK-3 β 抗体(12456T,CST);山羊抗兔IgG-HRP(111-035-003,Jackson ImmunoResearch);山羊抗小鼠IgG-HRP(115-035-003,Jackson ImmunoResearch);ECL发光液(WBKLS0500,Millipore)自制旷场实验箱:规格为80 cm $\times$ 80 cm $\times$ 40 cm敞形立方体,箱壁四面为黑色、箱底为白色,箱底为25个16 cm $\times$ 16 cm的正方形。自制束缚袋:规格为15 cm $\times$ 20 cm的帆布袋。针灸针为中研太和牌规格为0.25 mm $\times$ 25 mm的毫针,北京中研太和医疗器械有限公司。电针仪规格为SDZ-II的华佗牌。蔗糖生产于天津市北辰方正试剂厂。低温冷冻离心机(Fresco17,美国热电ThermoFisher);精密天平(Quintix35-1CN,德国赛多利斯Sartorius)。

1.2 实验动物分组 将10只Wistar大鼠设为正常组,将30只WKY大鼠随机平均分为电针组、假针组、模型组,实验开始前1 d测量大鼠体质量。

1.3 动物实验操作 正常组和模型组,常规喂养,不予实验操作。电针组:10只WKY大鼠适应性喂养1周。使用自制布袋将WKY大鼠四肢进行束缚,参照《实验动物针灸穴位图谱》定位“百会”和“印堂”,选用规格为0.25 mm $\times$ 25 mm毫针,为避免实验差异,针刺操作始终由1人完成。“百会”向后头部,“印堂”向

鼻尖方向予以平刺,针刺深度为 5~10 mm。针刺后连接电针仪,正极与“百会”相连,负极与“印堂”相连,予频率为 2 Hz 的连续波,电流由 0.1 mA 开始逐渐增大,以头部出现微微颤动而不挣扎、嘶叫为度,治疗时间每次 20 min,共治疗 21 d。治疗过程中注意观察大鼠是否耐受,如出现挣脱,及时予以调整电针及安抚大鼠。另外,注意保持实验环境的安静,避免因其他原因造成的声响使大鼠受到惊吓。假针组:WKY 大鼠 10 只,适应性喂养 1 周。采取同样的束缚方法将大鼠固定,使用同规格的针灸针刺入大鼠“百会”和“印堂”的皮层,刺入深度为 1~2 mm,不刺入肌肉层,以防止非特异性针刺效应,将针灸针与电针仪导线相连,但不通电。留针时间、治疗疗程及其他注意事项均与电针组相同。各组治疗 21 d 后测定实验后体质量、旷场实验、糖水消耗量、mTOR 和 GSK-3 β 蛋白表达水平。

1.4 行为学测定 体质量检测:观察实验前 1 d 和结束后各组大鼠体质量的变化并进行统计分析。

旷场实验:在实验开始前 1 d、实验结束后分别进行旷场实验。保持实验室环境安静,将大鼠放入箱底的最中间方格内,两名实验记录者分别记录大鼠在 5 min 内的水平运动和垂直运动的次数。大鼠 3 只脚跨越箱底横格数记为水平运动 1 分;大鼠两前肢腾空或攀附箱侧壁记为垂直运动 1 分。每只大鼠检测 1 次,检测完清理大鼠残余大小便,并用 75%医用酒精对旷场箱底进行清洁擦拭,避免上 1 只大鼠遗留的气味影响下 1 只大鼠的实验测评,待箱底酒精挥发后继续实验。

1.5 糖水偏好实验 在实验开始前 4 d,予大鼠适应性双瓶饮用 1%蔗糖水。第 1 天,两瓶均装 1%蔗糖水;第 2 天,1 瓶装纯净水,1 瓶装 1%蔗糖水;第 3 天,实验动物禁食禁水。禁食禁水 24 h 后,在下午 14:00~15:00,每笼同时予以提前称好的 2 瓶水:1 瓶纯净水,1 瓶 1%蔗糖水,2 h 后交换瓶子位置,4 h 后取走 2 瓶,分别进行称重。计算公式:糖水偏好指数=糖水消耗量/(糖水消耗量+纯水消耗量) $\times$ 100%。该实验分别于针刺治疗前、治疗后进行测试。

1.6 Western Blot 法 行为学检测第 2 天后,麻醉后进行固定断头冰板取大鼠额叶组织,RIPA 溶液裂解后,提取蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后,将浓度调成一致。电泳条件:浓缩胶 80 v 恒压,约 30 min 后分离胶 120 v 恒压,300 mA 转膜约 1.5 h。电泳后用 5%牛

奶-TBST (5g 的脱脂奶粉溶到 95 mL 的 TBST 溶液中)封闭 1 h,然后浸泡于一抗溶液(mTOR,1:1 000;GSK-3 β ,1:2 000)4 $^{\circ}$ C 过夜,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,然后加入二抗溶液 (Goat-Anti-Rabbit IgG-HRP,1:10 000)孵育 1 h,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min 后,用 ECL 发光试剂曝光成像并运用 Image J 软件分析蛋白灰度值。

Western Blot 分析方法及相关蛋白条带图:得到目标条带,保存白色背景 8 位 tiff 格式,导入 Image J 进行反转,选中每个条带,使用 Bandpeak quantification 插件,自动分析条带背景并得出目标条带灰度值,将检测指标条带灰度值与内参(β -actin)灰度值相比,得出相对灰度以反映相对表达量。

1.7 统计学方法 应用统计软件 SPSS25.0 对上述行为学结果进行统计分析,数据结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,对数据做正态分布检验和组间方差齐性检验,符合正态分布且方差齐的要求,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较各组间的差异;数据不符合正态分布或方差不齐,采用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 电针可以治疗抑郁大鼠体质量减轻的症状 治疗前,正常组(Wistar 大鼠)体质量明显高于其它组,而 WKY 大鼠 3 组间无显著差异。治疗后电针组大鼠的体质量明显高于假针组(表 1)。结果表明,WKY 大鼠有体质量减轻的临床症状,而电针可以阻止抑郁大鼠的体质量减轻。

表 1 大鼠治疗前后体质量检测结果($\bar{x}\pm s$, $n=10$,g)

组别	治疗前	治疗后
正常组	270.19 $\pm$ 5.78	411.09 $\pm$ 14.15
模型组	242.27 $\pm$ 4.79*	279.89 $\pm$ 7.45*
假针组	245.31 $\pm$ 6.02*	284.59 $\pm$ 12.60*
电针组	244.96 $\pm$ 6.19*	314.25 $\pm$ 11.61

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与电针组比较,# $P<0.05$ 。

2.2 电针可以增加抑郁大鼠的水平运动能力 治疗前,正常组(Wistar 大鼠)的水平运动次数明显大其它组,而 WKY 大鼠 3 组间无显著差异。治疗后电针组的水平运动次数大于假针组(表 2)。

表2 大鼠治疗前后旷场水平运动实验测评结果($\bar{x}\pm s, n=10$,分)

组别	治疗前	治疗后
正常组	46.20±3.33	46.50±4.45
模型组	17.80±2.62*	14.40±2.72*
假针组	18.60±4.95*	15.40±4.20#
电针组	18.10±4.38*	22.30±5.29

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与电针组比较,# $P<0.05$ 。

2.3 电针可以增加抑郁大鼠的垂直运动能力 治疗前,正常组(Wistar大鼠)的垂直运动次数明显大于其它组,而WKY大鼠3组间无显著差异。治疗后电针组高于假针组的水平运动次数,具有显著差异(表3)。

表3 大鼠治疗前后旷场垂直运动实验测评结果($\bar{x}\pm s, n=10$,分)

组别	治疗前	治疗后
正常组	23.60±2.12	23.00±2.40
模型组	5.40±1.58*	5.40±2.07*
假针组	5.80±1.23*	6.10±1.73#
电针组	5.90±1.52*	10.60±2.17

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与电针组比较,# $P<0.05$ 。

2.4 电针可以改善抑郁大鼠的快感缺失 治疗前,正常组(Wistar大鼠)的糖水消耗百分比明显多于其它组,而WKY 3组之间无显著差异。治疗后电针组大鼠的糖水消耗百分比高于假针组(表4)。这说明与正常组相比,模型组WKY大鼠的糖水喜好率明显下降,而电针可以增加抑郁大鼠的糖水喜好率。

表4 大鼠实验前后糖水消耗百分比比较($\bar{x}\pm s, n=10, \%$)

组别	治疗前	治疗后
正常组	43.71±3.76	42.33±3.04
模型组	17.91±2.62*	17.60±1.59*
假针组	19.65±3.37*	18.56±2.29#
电针组	19.45±13.11*	25.59±3.11

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与电针组比较,# $P<0.05$ 。

2.5 电针治疗后WKY大鼠前额皮层mTOR和GSK-3β的蛋白表达 与正常组相比,电针组、假针组、模型组mTOR蛋白表达水平降低,GSK-3β蛋白表达水平升高;与假针组相比,电针组mTOR蛋白表达水平升高,GSK-3β蛋白表达水平降低(图1、表5)。

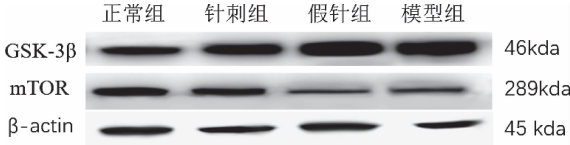


图1 不同组别的mTOR和GSK-3β蛋白表达

表5 大鼠前额皮层突触相关蛋白mTOR和GSK-3β的表达水平($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	mTOR(相对灰度)	GSK-3β(相对灰度)
正常组	1.04±0.31	0.75±0.87
模型组	0.45±0.98*	2.70±0.75*
假针组	0.45±0.23#	2.67±0.78#
电针组	0.75±0.20	1.54±0.13

注:源自图1的定量分析。与正常组比较,* $P<0.05$;与电针组比较,# $P<0.05$ 。

3 讨论

中医对于抑郁症早有记载,主要将其归为“郁证”、“百合病”等,多因情志不舒、饮食不节、忧思过度,其病机主要涉及肝失疏泄、心失所养、脾失运化,产生瘀血、痰湿等病理产物,继而致气机不畅,脏腑气血阴阳失调郁而发病^[14]。抑郁症其病位在脑,脑为髓海,又为元神之府,主人体精神活动,督脉入颅脑络,总督全身阳经气血故取督脉穴“百会”和“印堂”以安神解郁^[8]。“百会”为百脉交会之处,“承天气”为督脉与诸阳经和足厥阴肝经交会之处,此处阳气较盛,针刺此处具有调神醒脑、升阳补虚的功效^[15]。印堂位于两眉中心,与督脉相关联,印堂-督脉-脑调理论,具有安神通络作用,可以调理全身气血^[8, 16]。现代研究基于督脉调神理论将“百会”和“印堂”作为针刺治疗抑郁症的首选穴。

关于抑郁症的发病机制尚未完全阐明,突触可塑性调控不良是抑郁症新兴的病因理论,可导致大脑区域信号连接障碍或减少,造成抑郁症的发生^[17]。研究表明阻断突触可塑性会导致前额叶皮质突触减弱,神经元萎缩,而且在抑郁症患者大脑中发现前额叶皮质体积减小和脊柱树突数量减少及功能的减弱现象^[18]。有证据表明,WKY模型中存在着与突触可塑性相关的电路特异性缺陷,且与抑郁患者有相近的临床症状包括减重、低运动、降低蔗糖获取、新奇性减退、缺乏激励动机等有关^[19]。本实验表明电针可恢复抑郁大鼠

的体质量,增强运动行为,增加探索力和奖励机制,增加 mTOR 水平,降低 GSK-3 β 水平,从而改善 WKY 大鼠的抑郁行为。尸检中发现,抑郁患者额叶皮质中 mTOR 有明显缺陷,而 GSK-3 β 的活动可增加情感障碍,造成突触缺陷,引起抑郁症的发生^[20]。mTOR 是调节细胞增殖、凋落和蛋白质合成的靶点,而激活则可以增加树突的成熟和功能所需的一些蛋白质的合成。抑制或下调 GSK-3 β 可以负向调节 mTORc1,从而可以有效保护新生的突触细胞的丢失,缓解抑郁症患者的不良情绪^[21]。因此,电针改善 WKY 大鼠的抑郁状态,可能与上调前额皮层 mTOR,下调 GSK-3 β 有关。

综上所述,通过测定 WKY 大鼠行为学和额叶相关蛋白 mTOR 和 GSK-3 β 的表达水平,可以得出电针可以有效改善 WKY 大鼠的抑郁状态,恢复突触可塑性,本研究为电针治疗抑郁症提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 袁培,周昌乐,许家伦. 中医情志疗法在抑郁症诊疗中的应用[J]. 中华中医药杂志,2021,36(8):4853-4856.
- [2] 陈泽钦,董波,黄丽,等. 电针对 WKY 大鼠抑郁样行为及海马 GluR1 的影响[J]. 吉林中医药,2017,37(2):166-169.
- [3] SMITH K. Mental health: a world of depression[J]. Nature, 2014,515(7526):180-181.
- [4] 亓新庆,亓雪梅,刘甜梦,等. 从虚论治抑郁症方药研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(17):217-226.
- [5] 杨丽虹,杨玲玲,谢倩文,等. 中医与西医治疗抑郁症临床试验结局指标及测量工具的比较研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2020,22(12):4377-4383.
- [6] 徐睿. 抑郁症的发病机制和中西医治疗进展[J]. 中华中医药杂志,2021,36(9):5436-5440.
- [7] 黄芸,张治楠,黄泳,等. PI3K-AKT 信号通路与抑郁症的关系及中医干预作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2020,54(2):108-112.
- [8] 金红,郑熙圆,陈颖,等. 针刺百会、印堂治疗抑郁症的研究概况[J]. 中国民族民间医药,2021,30(11):62-66.
- [9] MARSDEN W N. Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2013,43:168-184.
- [10] HERMIDA M A, DINESH KUMAR J, LESLIE N R. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network[J]. Adv Biol Regul, 2017,65:5-15.
- [11] MA T, TZAVARAS N, TSOKAS P, et al. Synaptic stimulation of mTOR is mediated by Wnt signaling and regulation of glycogen synthetase kinase-3[J]. J Neurosci, 2011,31(48):17537-17546.
- [12] ZHOU W, DONG L, WANG N, et al. Akt mediates GSK-3 β phosphorylation in the rat prefrontal cortex during the process of ketamine exerting rapid antidepressant actions[J]. Neuroimmunomodulation, 2014,21(4):183-188.
- [13] ABELAIRA H M, RÉUS G Z, NEOTTI M V, et al. The role of mTOR in depression and antidepressant responses[J]. Life Sci, 2014,101(1-2):10-14.
- [14] 鲜慈英,凌志峰,黄斌,等. 中医药治疗抑郁症研究现状[J]. 湖北民族大学学报(医学版),2020,37(1):75-78.
- [15] 肖战说. 提神醒脑揉百会[J]. 中医健康养生,2021,7(9):38-39.
- [16] 黄志源,谢彬,陈进东,等. 印堂穴磁刺激治疗抑郁症临床研究[J]. 中外医疗,2017,36(36):5-7.
- [17] 于威威,袁琳,徐莹,等. 基于突触可塑性机制探讨氯胺酮抗抑郁作用的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2021,37(15):2100-2103.
- [18] 魏乐,黄欣怡,唐中秋,等. 海马神经元突触可塑性在抑郁症防治机制中的研究进展[J]. 湖北民族大学学报(医学版),2021,38(3):73-76.
- [19] ALEKSANDROVA L R, WANG Y T, PHILLIPS A G. Evaluation of the Wistar-Kyoto rat model of depression and the role of synaptic plasticity in depression and antidepressant response[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019,105:1-23.
- [20] LI N, LEE B, LIU R J, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists[J]. Science, 2010,329(5994):959-964.
- [21] LIU R J, Fuchikami M, DWYER J M, et al. GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold doses of ketamine[J]. Neuropsychopharmacology, 2013,38(11):2268-2277.