

基于突触可塑性理论研究电针对抑郁模型大鼠行为学及海马突触相关蛋白 mTOR、GSK-3 β 的影响*

黄树航¹, 邢龙飞¹, 杨帅², 李晓慧¹, 冯荣荣¹, 王子未¹, 秦丽娜^{1, Δ}

(1. 北京中医药大学第三附属医院康复科, 北京 100029; 2. 北京市大兴区中西医结合医院, 北京 100163)

摘要: 目的: 通过观察电针“印堂”和“百会”对抑郁模型大鼠的行为学及海马突触相关蛋白 mTOR、GSK-3 β (糖原合成酶激酶-3 β) 的影响, 探讨针刺治疗抑郁症的作用机制。方法: 正常组 15 只 Wistar 大鼠, 45 只 WKY (Wistar-Kyoto) 大鼠随机分为电针组、假针组、模型组, 治疗前后对所有大鼠进行糖水偏好试验 (Sugar Preference Test, SPT)、旷场试验 (Open Field Test, OFT) 和体重测量。电针组取大鼠“百会穴”“印堂穴”电针治疗, 假针组进行假针刺干预, 模型组和正常组不进行任何干预。电针组、假针组每天干预 1 次, 干预 21 天。治疗结束后, 用 Western Blot 法检测大鼠海马 mTOR、GSK-3 β 的表达。结果: 和 Wistar 大鼠相比, 干预前 WKY 大鼠的体重、OFT 和 SPT 评分明显降低 ($P < 0.01$)。干预 21 次后, 与模型组及假针组相比, 电针组大鼠的体重、OFT 和 SPT 评分明显升高 ($P < 0.01$); 电针组海马 mTOR 的表达量要比模型组和假针组更高 ($P < 0.05$), 且正常组的明显高于模型组 ($P < 0.01$); 电针组海马 GSK-3 β 的表达量低于模型组和假针组 ($P < 0.05$), 正常组明显低于模型组 ($P < 0.01$)。结论: 电针可有效缓解 WKY 大鼠的抑郁症状, 其作用机制可能是通过上调 WKY 大鼠海马内 mTOR 蛋白的表达水平, 下调 GSK-3 β 蛋白的表达水平, 进而改善其突触可塑性, 从而改善大鼠的抑郁症状。

关键词: 电针; 抑郁症; 突触可塑性

中图分类号: R 245.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2023) 11-0075-06

Study on the Effects of Electroacupuncture on Behavior and Hippocampal Synapse Related Proteins mTOR and GSK-3 β in Depression Model Rats Based on Synaptic Plasticity Theory/HUANG Shuhang¹, XING Longfei¹, YANG Shuai², et al// (1. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China; 2. Beijing Daxing District Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing 100163, China)

Abstract: Objective: Explore the mechanism of acupuncture on treating the depression by observing the effects of electroacupuncture (EA) at “Baihui” (GV20) and “Yintang” (GV29) on depressive behavior and hippocampal synapse-related protein mTOR and GSK-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β) of WKY rats (Wistar-Kyoto rats, an animal model of depression) Methods: 15 Wistar rats served as normal group. 45 WKY rats were randomly divided into EA group, Sham Acupuncture (SA) group and model group. Sucrose Water Preference Test (SPT), Open Field Test (OFT) and body mass were measured in all rats before and after the treatment. EA group were treated with GV20 and GV29, SA group were treated with sham acupuncture. Fed model group and normal group were regularly raised without any intervention. After the treatment, we detect the Protein expression of mTOR and GSK3- β in rat hippocampus synapsis by Western blot. Results: Before the treatment, WKY rats have higher weight and perform better in SPT and OFT, compared with Wistar rats ($P < 0.01$). After the treatment, EA group have higher weight, SPT rate and OFT rate compare among SA group and model group. ($P < 0.01$). The expression level of mTOR in hippocampus in EA group was higher, compared among SA group and model group ($P < 0.05$). The expression level of mTOR in hippocampus in normal group was higher, compared with model group ($P < 0.01$). The expression level of GSK3- β in hippocampus in EA group was lower, compared among SA group and model group ($P < 0.05$). The expression level of GSK3- β in hippocampus in normal group was lower, compared with model group ($P < 0.01$) Conclusion: The depression symptoms of WKY rats were relieved by electroacupuncture treatment. Its mechanism could be related to the up-regulating expression of mTOR in hippocampus and the down-regulating expression of GSK3- β , these changes of protein expression can improve the synaptic plasticity in hippocampus and therefore alleviate depression.

Keywords: electroacupuncture, depression, synaptic plasticity

抑郁症 (Depression) 是一类以显著且持续的情绪低落、活力减退为主症的神志病, 已成为中国第

* 基金项目: 北京中医药大学第三附属医院科研孵化项目 (编号: 2019kyfh-05); 北京中医药大学校级课题 (编号: 2020-JYB-XJSJJ-066)。 Δ 通讯作者: 秦丽娜, 主任医师, 博士, E-mail: qinqin1978119@sina.com, dianhua; 第一作者: 黄树航, 硕士研究生, 研究方向: 针灸治疗情志病, E-mail: 838556835@qq.com。

二重要的卫生问题^[2], 占全球非致命疾病的 10%, 全世界每年重度抑郁症发病率可达 9.3%^[3]。抑郁症是一种患病率高、严重危害人类身心健康、具有高自杀风险的精神疾病^[4], 从郁郁寡欢到悲恸欲绝, 抑郁症患者的心境并不匹配其处境^[1]。目前临床常用治疗方案是选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SS-RIs)、三环类抗抑郁药 (TCAs) 等药物, 但均有毒副作用大、心理依赖性强、使用顺应性差等弊端^[5]。临床上亟需一种针对抑郁症的绿色有效的治疗方法^[6]。因此, 针灸得到了广泛关注, 但其抗抑郁机制尚未得以阐释。

抑郁的发病机制现分为几种假说: 单胺类神经递质假说、下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴) 功能失常假说、突触可塑性假说等^[7]。其中, 突触可塑性假说主张患者的突触可塑性失调 (囊泡数量、囊泡内神经递质及突触活动区数量和面积的失调) 通过影响海马结构、减少神经元再生、阻碍信号通路最终导致抑郁^[8-9]。mTOR 信号通路通过促进突触蛋白的形成以增加突触的可塑性^[10], 进而参与多种经典抗抑郁药的抗抑郁反应^[11], GSK-3 的产生和磷酸化则通过降低突触形成以抗抑郁^[12]。本篇研究基此选择 WKY 大鼠为研究对象, 取“印堂”和“百会”为主穴, 观察电针对 WKY 大鼠抑郁行为及海马突触相关蛋白 mTOR、GSK-3 β 的影响, 以期揭示针刺治疗抑郁的原理。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 WKY 大鼠 45 只, 雄性 Wistar 大鼠 15 只, 体重 (210 $\pm$ 20) g, SPF 级, 6 周龄, 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。购置后适应性饲养于中日友好医院临床研究所动物房 1 周, 每 3 只 1 笼, 自由摄食饮水。饲养室环境: 温度 (22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)、湿度 (55 $\pm$ 2%), 自然昼夜节律 (12h 日照/黑暗, 06:00 开灯, 18:00 关灯)。所有动物操作均遵守中日友好医院临床研究所《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂与仪器 自制旷场试验箱: 由纸板做成的无顶箱, 80cm $\times$ 80cm $\times$ 40cm, 箱壁为黑色, 底部为白色, 用黑线将底部平分为 25 个正方形。自制束缚袋: 15cm $\times$ 20cm 带松紧绳的帆布袋。针灸针: 0.25mm $\times$ 25mm 北京中研太和医疗器械有限公司生产。电针仪: 华佗牌电针仪, 型号为: SDZ-II。主要试剂见表 1。

表 1 Western Blot 实验主要试剂

试剂	货号	厂商
RIPA 蛋白裂解液	#9806	Cell Signaling Technology
5 * Loading buffer 上样缓冲液	#7722	Cell Signaling Technology
BCA 蛋白定量试剂盒	#7780	Cell Signaling Technology
ECL 发光液	WBKLS0500	Millipore

(续表 1)

化学发光仪	WD-9423C	北京六一仪器
Goat-anti-Rabbit IgG-HRP	111-035-003	JacksonimmunoResearch
Goat-anti-Mouse IgG-HRP	115-035-003	JacksonimmunoResearch

1.1.3 实验仪器 见表 2。

表 2 Western Blot 实验主要仪器

仪器名称	型号	厂商
低温冷冻离心机	Fresco17	美国热电 ThermoFisher
酶标仪	FC	美国热电 ThermoFisher
垂直电泳槽	Mini Protean Tetra	美国伯乐 Bio-Rad
转印槽	Mini Trans Blot	美国伯乐 Bio-Rad
电泳仪	PowerpacBasic	美国伯乐 Bio-Rad
水平脱色摇床	TS-1	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
酸度计	PHS-3C	上海仪电科学仪器股份有限公司
精密天平	Quintix35-1CN	德国赛多利斯 Sartorius
超低温冰箱	DW-86L400	浙江捷盛低温设备有限公司
纯水仪	UPW-N2-15UV	上海仪电科学仪器股份有限公司

1.2 实验方法

1.2.1 造模 本实验中选取的 WKY 大鼠有忧郁、焦虑等行为异常, 常作为抑郁症的实验动物模型, 用于抑郁症机制和抗抑郁药物的研究^[13], 无需造模。

1.2.2 分组 随机将 45 只 WKY 大鼠平均分为电针组 (EA 组)、假针组 (SA 组) 和模型组; 将 15 只 Wistar 大鼠设为正常组。

1.2.3 治疗干预 假针组: 雄性 WKY 大鼠 15 只, 适应性喂养 1 周后, 每天针刺 1 次, 每次治疗 20min, 治疗 21 天, 常规喂养 21 天。大鼠针刺操作方法: 先用束缚袋束缚大鼠 (仅露出头部), 再根据《实验针灸学》^[14] 分别选取大鼠的“百会”和“印堂”, 用 0.25mm $\times$ 25mm 的毫针进行针刺 (为保证操作均一性, 所有针刺均由同一人完成)。“百会”向头后平刺, “印堂”向前方平刺, 针刺 1~2mm, 仅在皮层, 以防止针刺对大鼠的不良刺激, 将针与电针仪相连, 但不通电。注意: 保持实验环境安静, 避免大鼠受惊。电针组: 雄性 WKY 大鼠 15 只, 适应性喂养 1 周后, 进行同假针组一样的干预, 但针刺深度改为 5~10mm, 针刺后连接电针仪, 正极连“百会”, 负极连“印堂”, 予 2Hz 的连续波, 电流由 0.1mA 起, 根据大鼠耐受度慢慢加大 (以头微微颤动而不挣扎、嘶叫为度)。模型组: 雄性 WKY 大鼠 15 只, 适应性喂养 1 周后, 每天进行布袋束缚 1 次, 每次束缚 20 分钟, 常规喂养 21 天。正常组: 雄性 Wistar 大鼠 15 只, 适应性喂养 1 周后, 不进行任何干预, 常规喂养 21 天。

1.2.4 检测指标 体质量检测: 实验前、后测量并记录每只大鼠的体质量, 实验结束后分析各组之间大鼠体质量的差异。旷场试验: 实验开始前 1 天起, 至取材前一天, 进行旷场试验。每只大鼠测 1 次, 每次试验只把 1 只大鼠放入旷场箱正中间, 由两人

分别记录大鼠 5min 内的水平和垂直运动得分。水平运动得分：大鼠穿越（大鼠的 3 只爪子均穿越到另一空格）旷场试验箱底面的正方形格数，穿越 1 格为 1 分。垂直运动得分：大鼠双前肢离开地面（腾空或攀附旷场箱侧壁）的次数，离开 1 次记 1 分。每次试验结束后清理箱内的粪便及尿液，并用 75% 医用酒精进行清洁，以保证实验环境的一致性，待酒精挥发完毕后继续下一次试验。在场观察及记录人员需保持实验室周围环境安静，避免声音对大鼠的惊吓影响旷场试验结果。糖水偏好试验：在适应性喂养期间，训练大鼠适应性饮用 1% 蔗糖水，期间皆双瓶饲养。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，实验动物禁食水。24h 后，每笼同时予以提前备好的 1 瓶纯净水和 1 瓶 1% 蔗糖水，2h 后交换瓶子位置，4h 后取走两瓶，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）×100%。该试验分别于干预前、后进行。取材：在大鼠腹腔注射 3mg/mL 戊巴比妥钠进行麻醉，麻醉剂量为 30mg/kg，待其充分麻醉后，迅速断头，于冰板上取全脑，参照第六版《鼠脑立体定位图谱》^[15] 所示，于耳间 4.80mm、前囟-4.20mm 冠状切开，取海马组织放入已编号的 1.5mL EP 管中，再迅速将管投入液氮预冻，待取材结束后，保存至-80℃ 冰箱。Western blot 法检测：①提取总蛋白：海马组织剪成小块后于细胞破碎机匀浆，加入 10 倍组织体积的中等强度 RIPA 裂解液，离心取上清。②浓度定量：用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量，并将浓度调整为 2ug/μL。③制胶：根据目的蛋白的分子量，配制 8% 的分离胶和浓缩胶。④制样：将 5 * Loading Buffer 以 1：4 的比例加入样品，100℃ 水浴 10min。⑤上样电泳：10 孔胶上样 15μL 共 30μg。电泳条件：浓缩胶恒压 80V；分离胶恒压 120V，约 30mins。⑥转膜：电转印到 PVDF 膜上⑦封闭：5% 脱脂牛奶（0.5% TBST 配制）封闭 1 h。⑧孵化一抗：加入 BDNF、mTORC1、p-mTORC1、PSD95、Synapsin I、GluR1 和 β-actin 一抗（稀释比例均为 1：1 000）孵育过夜。⑨孵化二抗：加入二抗（1：5 000）室温孵育 1 h。⑩ECL 曝光：本次实验使用自动曝光，先用化学发光仪进行预冷处理，再将膜放入暗匣中曝光，用显影定影试剂和 ECL 发光液发光显色，关好箱门，进行自动曝光并拍摄照片。

1.2.5 统计学 应用统计软件 SPSS25.0 对上述行为学结果进行统计分析，数据结果用均值±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 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义，以 $P<0.01$ 表示有显著性差异。

2 实验结果与分析

2.1 体质量 由表 3 可见，在实验前，正常组大鼠体质量明显较电针组、假针组、模型组更高（ $P<0.01$ ），而电针组、假针组、模型组之间没有统计学差异（ $P>0.05$ ）。实验后，正常组大鼠体质量明显高于电针组、假针组、模型组（ $P<0.01$ ）；与模型组相比，电针组大鼠的体质量明显增加，具有显著差异（ $P<0.01$ ），而假针组大鼠的体质量与模型组相比没有统计学差异（ $P>0.05$ ）。由此可见，大鼠抑郁后，体重会明显下降，而电针可以缓解抑郁大鼠体重减轻的症状。

表 3 实验前后各组大鼠体质量比较（ $\bar{x}\pm s, n=15$ ）

组别	实验前 (g)	实验后 (g)
正常组	268.16±10.87	412.36±26.12
电针组	237.74±8.33**	327.47±24.99***
假针组	243.21±10.95**	282.89±17.03**
模型组	242.98±11.77**	296.45±20.96**

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

2.2 旷场试验 旷场试验，以实验动物在陌生环境中垂直和水平运动的频率和持续时间作为指标，反映其在新环境中的自主探索行为与紧张度。旷场试验的指标低，代表其兴趣降低、缺乏活力，而这些表现常见于抑郁患者。由表 4 可见，在实验前，正常组大鼠水平穿越格数明显多于电针组、假针组、模型组（ $P<0.01$ ），而电针组、假针组、模型组之间没有统计学差异（ $P>0.05$ ）。实验后，正常组大鼠水平穿越格数明显多于电针组、假针组、模型组（ $P<0.01$ ）；与模型组相比，电针组大鼠的水平穿越格数增加，具有显著差异（ $P<0.01$ ），而假针组大鼠的水平穿越格数与模型组相比没有统计学差异（ $P>0.05$ ）。

表 4 实验前后各组大鼠水平穿越格数比较（ $\bar{x}\pm s, n=15$ ）

组别	治疗前 (格)	治疗后 (格)
正常组	46.80±6.89	48.27±8.70
电针组	21.53±7.26**	33.40±6.17***
假针组	19.27±6.58**	21.87±4.81**
模型组	19.73±7.54**	20.00±6.23**

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

由表 5 可见，在实验前，正常组大鼠垂直运动次数明显多于电针组、假针组、模型组（ $P<0.01$ ），而电针组、假针组、模型组之间没有统计学差异（ $P>0.05$ ）。实验后，正常组大鼠垂直运动次数明显多于电针组、假针组、模型组（ $P<0.01$ ）；与模型组相比，电针组大鼠的垂直运动次数增加，具有显著差异（ $P<0.01$ ），而假针组大鼠的垂直运动次数与模型组相比没有统计学差异（ $P>0.05$ ）。可见大鼠抑郁后，其旷场试验的指标下降，提示大鼠对新环境失

去探索的兴趣。而在电针后，旷场试验的指标上升，表明其对新环境的探索兴趣有所恢复。

表 5 实验前后各组大鼠垂直运动次数比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	实验前(次)	实验后(次)
正常组	23.20±3.53	22.67±3.02
电针组	5.33±2.56**	13.47±2.63***
假针组	6.67±2.09**	6.27±2.07**
模型组	5.73±2.37**	5.87±2.17**

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

2.3 糖水偏好试验 SPT 啮齿类动物极其喜欢甜味，当其对蔗糖的偏好降低表明缺乏快感，其实质是对奖励刺激缺乏兴趣，这是抑郁症的核心症状。SPT 广泛适用于评估啮齿动物的抑郁症状，是反应快感是否缺失的一种试验。糖水消耗量下降提示其奖励行为失调、快感缺失^[16]。由表 6、7 可见，在实验前，正常组大鼠糖水消耗量、消耗百分比明显多于电针组、假针组、模型组 ($P<0.01$)，而电针组、假针组、模型组之间没有统计学差异 ($P>0.05$)。实验后，正常组大鼠糖水消耗量、消耗百分比明显多于电针组、假针组、模型组 ($P<0.01$)；与模型组相比，电针组大鼠的糖水消耗量、消耗百分比增加，具有显著差异 ($P<0.01$)，而假针组大鼠的糖水消耗量、消耗百分比与模型组相比没有统计学差异 ($P>0.05$)。上述结果表明，大鼠抑郁后，糖水消耗量减少，而经过电针治疗后，糖水消耗量有所恢复，提示电针可以改善大鼠的抑郁症和相关性快感缺乏症。

表 6 实验前后各组大鼠糖水消耗量比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	实验前(g)	实验后(g)
正常组	41.89±4.19	40.70±3.61
电针组	19.87±3.97**	28.99±3.26***
假针组	20.77±3.59**	22.49±3.33**
模型组	20.93±3.75**	21.16±3.11**

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

表 7 实验前后各组大鼠糖水消耗百分比比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	实验前(%)	实验后(%)
正常组	79±4.03	80±3.67
电针组	68±3.60**	72±3.31***
假针组	67±4.52**	68±3.50**
模型组	68±3.26**	69±5.06**

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，*** $P<0.05$

2.4 Western Blot 法 与正常组相比，电针组、假针组、模型组 mTOR 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)，GSK-3 β 蛋白表达水平显升高 ($P<0.01$)；与模型组相比，电针组 mTOR 表达水平上调 ($P<0.05$)，GSK-3 β 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)，而假针组 mTOR、GSK-3 β 蛋白表达水平与模型组相比

无明显变化 ($P>0.05$)。见表 8，图 1。

表 8 各组大鼠海马突触相关蛋白 mTOR、GSK-3 β 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	mTOR/B-actin	GSK-3 β /B-actin)
正常组	1.12±0.27	0.90±0.30
电针组	0.80±0.21*#	1.75±0.51***
假针组	0.50±0.20**	2.44±0.60**
模型组	0.50±0.23**	2.48±0.57**

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$

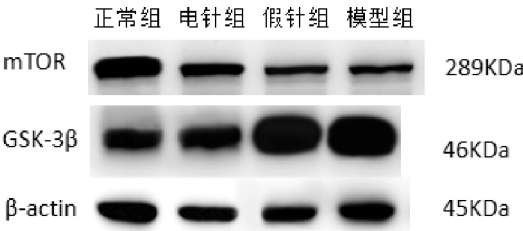


图 1 各组大鼠海马突触相关蛋白 mTOR、GSK-3 β 表达水平

3 讨论

抑郁症，作为病名在古籍中没有直接记载，但其症状包含于中医的“郁”“癫”“百合病”以及“脏躁”等病，主要由情志不畅或思虑过重导致气郁而发病，其病位在脑，与心、肝密切相关^[17]。治疗方面，西药治疗副作用大，依赖性强，易耐受。相比之下，针刺疗效迅速且持久，安全系数高。电针，是将针柄与电针仪相连，输出一定量的脉冲电流作用于局部针刺部位的一种特殊针刺手法，具有参数可控、客观、标准化、可重复性高等特点^[18]，能消除针刺手法对实验影响，是针刺机制研究中控制变量的重要方法。抑郁病位在脑，根据“治病务求于本”，选择“至风府，入脑，上巅”的督脉经穴，体现了中医“阴病治阳”和“脑为元神之府”的理论。“脑为元神之府”，是指通过治理经过脑的督脉以调节元神，是中医选用督脉经穴治疗郁证和癫证的理论依据^[19]。在督脉诸多经穴中，本实验选取了“百会”和“印堂”。百会穴，其深处即为脑，还是“头气之街”。根据“四海”理论，“脑为髓海”，“其输上在其盖”（盖即“百会”），可聚百脉阳气，协督脉总领一身之阳，有醒脑开窍之功，是升提阳气、镇静安神的要穴。印堂，属于经外奇穴，位于前额处，督脉的循行线上，为醒脑开窍、疏通脑络的要穴^[17]，在“印堂调神理论”指导下广泛用于抑郁症的治疗中^[20]。

海马为大脑边缘系统的重要部分，除控制短期记忆的定向和存储转换外，也司控情绪，是慢性应激损伤和抑郁损伤的主要靶器官。最新研究表明，抑郁症患者所受的慢性应激，会抑制海马齿状回腹

侧的神经发生,这种神经发生优先于情绪调节,这可能是诱发抑郁症的器质性基础之一^[21-22]。所以,缓解对海马神经再生的损害,调节齿状回功能,是抗抑郁药的某些行为效应所必需的^[23-24]。除了上述病理改变,抑郁还会减少海马突触可塑性的 LTP (长时程增强),增加海马突触可塑性 LTD (长时程抑制)^[25]。

mTOR,是存在于胞浆中的一种丝/苏氨酸蛋白激酶,在调控细胞生长和增殖中发挥关键作用^[26]。mTOR 可通过快速磷酸化,改变突触可塑性,发挥快速且长久的抗抑郁的作用^[27]。mTOR 信号的激活与 GSK-3 的失活有关。氯胺酮与 GSK-3 抑制剂的联合给药可诱导 GSK-3 的磷酸化,激活 mTOR 信号通路,增加突触形成以抗抑郁。在 GSK-3 α 和 GSK-3 β 基因突变小鼠,即 GSK-3 磷酸化失活小鼠的研究中,发现氯胺酮不产生抗抑郁行为反应。以上两个实验提示 mTOR 激活和 GSK-3 磷酸化的共同作用,可发挥抗抑郁作用,是氯胺酮抗抑郁作用的一种收敛机制,是氯胺酮抗抑郁机制的关键下游靶点^[28]。

GSK-3,能调控糖原合成酶(GS)活性,作用于众多信号蛋白、结构蛋白和转录因子,调节细胞的分化、增殖、存活和凋亡,其信号通路在调控海马神经发生和抑郁行为中发挥重要作用。我们在蛋白免疫印迹的结果中比较抑郁和正常大鼠 GSK-3 β 磷酸化水平发现,抑郁大鼠的 GSK-3 β 磷酸化水平更高。GSK-3 的产生和磷酸化增加,一可以阻碍 mTOR 信号的激活,二可以导致甲基苯丙胺诱导的神经退行性变和神经行为改变,如认知障碍、焦虑和抑郁。使用二甲双胍能激活大鼠 CREB、BDNF 和 Akt 蛋白的表达,抑制 GSK-3 蛋白的表达,从而降低甲基苯丙胺诱导的氧化应激和炎症,改善焦虑、抑郁状态,提高认知和运动能力等^[29]。六味地黄汤治疗抑郁的机制是通过影响 GSK-3 β 等通路,进而降低腹侧海马的氧化应激水平^[30]。这些研究表明 GSK-3 的产生和磷酸化是抑郁发生的关键靶点。

电针“百会”和“印堂”可以抗抑郁,增加 WKY 大鼠的体质量,恢复其缺失的快感和对新事物探知的欲望。这种抗抑郁的机制可能是通过上调 mTOR 的表达,抑制 GSK-3 β 的产生和磷酸化,以改善大鼠海马的突触可塑性,从而治疗 WKY 大鼠的抑郁。

参考文献

[1] 中国精神障碍分类与诊断标准第三版(精神障碍分类)[J]. 中华精神科杂志, 2001 (03): 59-63.
[2] 刘顺发. 我国抑郁症患病情况的流行病学研究现状[J]. 医学文选, 2006 (04): 861-863.
[3] Salk R H, Hyde J S, Abramson L Y. Gender Differences in Depression in Representative National Samples: Meta-Analyses of Diagnoses and Symptoms [J]. Psychological bulletin, 2017, 143 (8): 783-822.

[4] 舒良. 抑郁症的评定与治疗 [J]. 中华医学杂志, 1999 (05): 78-80.
[5] 夏杰, 刘微娜, 漆正堂. GSK3 β / β -catenin 信号通路在运动和氟西汀改善 CUMS 小鼠抑郁行为中的作用机制 [J]. 西安体育学院学报, 2019, 36 (05): 610-618, 630.
[6] Quintana D S, Steen N E, Andreassen O A. The Promise of Intranasal Esketamine as a Novel and Effective Antidepressant [J]. JAMA Psychiatry, 2018, 75 (2): 123.
[7] 尹一淑, 刘军莲, 王佳平, 等. 抑郁症相关发病机制研究进展 [J]. 医学综述, 2022, 28 (12): 2368-2372.
[8] 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]. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2019, 105: 1-23.
[9] Kavalali E T, Monteggia L M. Targeting Homeostatic Synaptic Plasticity for Treatment of Mood Disorders [J]. Neuron, 2020, 106 (5): 715-726.
[10] 李晓慧, 秦丽娜, 邢龙飞, 等. 电针对 WKY 抑郁模型大鼠行为学及前额叶皮质 GLUR1、NR2B 蛋白表达的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2022, 41 (08): 818-823.
[11] Yao Y, Ju P, Liu H, et al. Ifenprodil rapidly ameliorates depressive-like behaviors, activates mTOR signaling and modulates proinflammatory cytokines in the hippocampus of CUMS rats [J]. Psychopharmacology, 2020, 237 (5): 1421-1433.
[12] Liu R-J, Fuchikami M, Dwyer J M. GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold doses of ketamine [J]. Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 2013, 38 (11): 2268-2277.
[13] Paré WP. Stress ulcer susceptibility and depression in Wistar Kyoto (WKY) rats [J]. Physiol Behav., 1989.
[14] 张露芬. 实验针灸学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
[15] Paxinos G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates [M]. Compact 6th Edition. Academic Press, 2008.
[16] Yin C-Y, Li L-D, Xu C. A novel method for automatic pharmacological evaluation of sucrose preference change in depression mice [J]. Pharmacological Research, 2021, 168: 105601.
[17] 陈泽钦, 董波, 黄丽, 等. 电针对 WKY 大鼠抑郁样行为及缰核 GluR1 的影响 [J]. 四川中医, 2017, 35 (01): 34-37.
[18] Almansoub H A M M, Tang H, Wu Y. Tau Abnormalities and the Potential Therapy in Alzheimer's Disease [J]. Journal of Alzheimer's disease: JAD, 2019, 67 (1): 13-33.
[19] 刘兰英, 王玲玲. “脑为元神之府”理论在针灸治疗抑郁症中的指导意义 [J]. 针灸临床杂志, 2003 (08): 8-10.
[20] 韩李莎, 鲁海, 胡佳慧, 等. 印堂调神理论发微 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35 (02): 687-689.
[21] Hayley S, Poulter M O, Merali Z. The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity [J]. Neuroscience, 2005, 135 (3): 659-678.
[22] Duman R S, Malberg J, Nakagawa S. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress [J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2001, 299 (2): 401-407.
[23] Arantes-Gonçalves F, Coelho R. [Depression and treatment. Apoptosis, neuroplasticity and antidepressants] [J]. Acta Medica Portuguesa, 2006, 19 (1): 9-20.

地榆七柏汤含药血清对 H_2O_2 诱导的 Caco-2 细胞 Th1/Th2 平衡的影响*

靳瑾¹, 王逾¹, 马震²

(1. 新疆医科大学附属医院中医医院消化科, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学附属医院中医医院普外二科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的: 分析地榆七柏汤含药血清对 H_2O_2 诱导的 Caco-2 细胞 Th1/Th2 平衡的影响, 为地榆七柏汤的临床开发和机制研究提供实验依据。方法: 选取 60 只健康雄性 SD 大鼠, 将其随机分为空白组、模型组、柳氮磺胺吡啶 (SASP) 组、地榆七柏汤组 (分低、中、高剂量 3 组), 每组 10 只。构建三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导的溃疡性结肠炎 (UC) 动物模型, 空白组和模型组均给予生理盐水灌肠, SASP 组、地榆七柏汤组 (分低、中、高剂量 3 组) 分别给予含 SASP、生药 (剂量为 0.5g/ml、1.0g/ml、3.0g/ml) 的汤剂灌肠, 制备相关血清, 以 H_2O_2 为刺激因子, 以 Caco-2 细胞为载体, 建立 Caco-2 炎症细胞模型, 检测对比各组白介素 (IL)-4、干扰素 (INF)- γ 及 INF- γ /IL-4 水平。结果: 大鼠 DAI 评分: 模型组>SASP 组>低剂量地榆七柏汤组>中剂量地榆七柏汤组>高剂量地榆七柏汤组>空白组 (均 $P<0.05$)。大鼠血清 INF- γ 、INF- γ /IL-4 水平: 模型组>SASP 组>低剂量地榆七柏汤组>中剂量地榆七柏汤组>高剂量地榆七柏汤组>空白组 (均 $P<0.05$); 血清 IL-4 水平: 模型组<SASP 组<低剂量地榆七柏汤组<中剂量地榆七柏汤组<高剂量地榆七柏汤组<空白组 (均 $P<0.05$)。Caco-2 细胞 INF- γ 、INF- γ /IL-4 水平: 细胞模型组>SASP 组>低剂量地榆七柏汤组>中剂量地榆七柏汤组>高剂量地榆七柏汤组>空白对照组 (均 $P<0.05$); Caco-2 细胞 IL-4 水平: 细胞模型组<SASP 组<低剂量地榆七柏汤组<中剂量地榆七柏汤组<高剂量地榆七柏汤组<空白对照组 (均 $P<0.05$)。结论: 地榆七柏汤含药血清能够下调 H_2O_2 诱导的 Caco-2 细胞中 Th1 细胞因子 (INF- γ) 分泌和上调 Th2 细胞因子 (IL-4) 水平, 促使 Th1/Th2 平衡恢复, 起到抗炎效果, 且高剂量地榆七柏汤含药血清效果更佳。

关键词: 地榆七柏汤; Th1/Th2 细胞平衡; 炎症因子

中图分类号: R 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2023) 11-0080-05

Effects of Diyu Qibai decoction-containing serum on Th1/Th2 balance of H_2O_2 -induced Caco-2 cells/JIN Jin¹, WANG Yu¹, MA Zhen² (1. Department of Gastroenterology of Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University Xinjiang 830011, China; 2. General Second Department of Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University Xinjiang Urumqi 830011, China)

Abstract: Objective: To analyze the effects of Diyu Qibai decoction-containing serum on Th1/Th2 balance of H_2O_2 -induced Caco-2 cells, and to provide experimental evidence for the clinical development and mechanism research of Diyu Qibai decoction. Methods: Sixty healthy male SD rats were selected and randomly divided into blank group, model group, sulfasalazine (SASP) group and Diyu Qibai decoction groups (low-, middle- and high-dose groups), with 10 rats in each group. The animal models of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced ulcerative colitis (UC) were constructed. Blank group and model group were given normal saline enema, and SASP group and Diyu Qibai decoction groups (low-, middle- and high-dose groups) were

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区卫生健康青年医学科技人才专项科研项目 (编号: WJYW-202134)。

- [24] Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression [J]. Nature Neuroscience, 2007, 10 (9): 1110-1115.
- [25] Marsden W N. Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates [J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 2013, 43: 168-184.
- [26] 徐子绚, 宋杰, 王平, 等. 电针对阿尔茨海默病模型大鼠 GSK3 β 信号通路相关蛋白的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23 (9): 2023-2031.
- [27] Zhang K, Yamaki V N, Wei Z. Differential regulation of GluA1 expression by ketamine and memantine [J]. Behavioural Brain Research, 2017, 316: 152-159.
- [28] 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.
- [29] Keshavarzi S, Kermanshahi S, Karami L. Protective role of metformin against methamphetamine induced anxiety, depression, cognition impairment and neurodegeneration in rat: The role of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathways [J]. Neurotoxicology, 2019, 72: 74-84.
- [30] 黄芳, 谭子虎, 单楠, 等. 六味地黄汤通过调节 AMPK/Akt/GSK3 β /Nrf2 通路减轻糖尿病抑郁大鼠 vHIP 髓鞘损伤及抑郁样行为 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (02): 38-46.

(收稿日期 2023-05-10)