

文章编号: 1005-0957 (2024) 12-1386-10

• 动物实验 •

“疏肝调神”针刺对抑郁小鼠肝-脑轴 MAT/SAM/m6A 的影响

封艳艳¹, 彭敏¹, 周逸夫¹, 李仲贤¹, 陈铿羽¹, 符文彬², 周鹏¹

(1. 广州中医药大学附属深圳宝安中医院, 深圳 518000; 2. 广东省中医院, 广州 510120)

【摘要】 目的 研究“疏肝调神”针刺对抑郁小鼠肝-脑轴甲硫氨酸腺苷转移酶(methionine adenosyltransferase, MAT)/腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)/N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)的影响, 探讨“疏肝调神”的物质基础。**方法** 将 36 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组、模型组和针刺组, 每组 12 只。模型组和针刺组连续 7 d 腹腔注射 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 脂多糖进行抑郁造模, 针刺组在 LPS 腹腔注射第 3 天开始针刺百会、印堂、合谷和太冲穴干预, 其中太冲穴连接电针, 予疏密波(2 Hz/50 Hz), 电流 1 mA, 每次 20 min, 连续干预 14 d。干预完成后, 对各组小鼠进行旷场实验(open field test, OFT)、强迫游泳实验(forced swimming test, FST)和糖水偏好实验(sucrose preference test, SPT)行为学检测; 用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)检测肝脏甲硫氨酸腺苷转移酶 1A(methionine adenosyltransferase 1A, Mat1a)、甲硫氨酸腺苷转移酶 2A(methionine adenosyltransferase 2A, Mat2a)mRNA 表达变化; 用 Western blot 检测 Mat1a、Mat2a 蛋白表达; 用酶联免疫吸附法检测血清 SAM 和前额叶皮质 SAM、m6A 表达水平。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠 OFT 中平均移动速度、总路程、水平移动次数、垂直移动次数均降低($P<0.05$), FST 中静止不动时间增加($P<0.05$)。与模型组比较, 针刺组小鼠 OFT 中平均移动速度、总路程、水平移动次数、垂直移动次数均升高($P<0.05$), FST 中静止不动时间减少($P<0.05$), SPT 中糖水偏好率增加($P<0.05$); 与对照组比较, 模型组肝脏 Mat1a mRNA 表达未见明显变化, Mat2a mRNA 表达下降($P<0.05$), Mat1a、Mat2a 蛋白表达减少($P<0.05$)。与模型组比较, 针刺组肝脏 Mat1a mRNA 表达未见明显变化, Mat2a mRNA 表达升高($P<0.05$), Mat1a、Mat2a 蛋白表达升高($P<0.05$); 与对照组比较, 模型组血清、前额叶皮质 SAM 表达下降($P<0.05$)。与模型组比较, 针刺组血清、前额叶皮质 SAM 表达升高($P<0.05$); 与对照组比较, 模型组前额叶皮质 m6A 表达降低($P<0.05$)。与模型组比较, 针刺组 m6A 表达升高($P<0.05$)。**结论** “疏肝调神”针刺可显著改善小鼠抑郁行为, 其机制可能与针刺增加肝脏 Mat1a、Mat2a 合成, 促进 SAM 分泌, 进而上调前额叶皮质 m6A 水平有关。

【关键词】 针刺疗法; 抑郁症; 甲硫氨酸腺苷转移酶 1A; 甲硫氨酸腺苷转移酶 2A; 腺苷甲硫氨酸; N6-甲基腺苷; 小鼠

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2024.13.4001

Effect of “liver-soothing and mind-regulating” acupuncture on the liver-brain axis MAT/SAM/m6A in a depression mouse model FENG Yanyan¹, PENG Min¹, ZHOU Yifu¹, LI Zhongxian¹, CHEN Kengyu¹, FU Wenbin², ZHOU Peng¹. 1. Shenzhen Bao'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China; 2. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

[Abstract] Objective To investigate the effect of liver-soothing and mind-regulating acupuncture on the liver-brain

基金项目: 中国博士后基金面上项目(2022M720925); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515110808); 深圳市科技计划项目(JCYJ20220530141414032); 深圳市宝安区中医药发展基金会“针灸治疗常见病、多发病、重大疾病的中医药研究专项”(2022KJCX-ZJZL-1, 2022KJCX-ZJZL-9)

作者简介: 封艳艳(1990—), 女, 主治医师, Email: fengyanyan90@gzucm.edu.cn

通信作者: 周鹏(1980—), 男, 主任医师, Email: zhoupeng80@gzucm.edu.cn

axis MAT/SAM/m6A in depression mice and to discuss the material basis of “liver-soothing and mind-regulating”.

Method Thirty-six male C57BL/6 mice were randomized into a control group, a model group, and an acupuncture group, each consisting of 12 mice. The model and acupuncture groups received intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) at 500 $\mu\text{g/kg}$ for 7 consecutive days to develop depression models. The acupuncture group started to receive acupuncture at Baihui (GV20), Yintang (GV29), Hegu (LI4), and Taichong (LR3) points since the 3rd day of LPS injection, and Taichong points were treated with electroacupuncture with the sparse-intense wave (2 Hz/50 Hz) at 1 mA, 20 min each session for 14 d successively. When the intervention finished, mice in each group went through behavioral tests, including the open field test (OFT), forced swimming test (FST), and sucrose preference test (SPT). The quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) test was used to determine the changes in the mRNA expression of methionine adenosyltransferase 1A (Mat1a) and methionine adenosyltransferase 2A (Mat2a) in the liver; Western blot was used to detect the protein expression of Mat1a and Mat2a; the enzyme-linked immunosorbent assay was adopted to measure the expression levels of serum S-adenosylmethionine (SAM) and prefrontal cortex SAM and N6-methyladenosine (m6A). **Result** Compared to the control group, mice in the model group showed decreases in the average moving speed, total distance, number of horizontal movements, and number of vertical movements in the OFT ($P<0.05$) and increased stationary time in the FST ($P<0.05$). Compared to the model group, mice in the acupuncture group showed increases in the average moving speed, total distance, number of horizontal movements, and number of vertical movements in the OFT ($P<0.05$), reduced stationary time in the FST ($P<0.05$), and enhanced sucrose preference rate in the SPT ($P<0.05$). Compared to the control group, the liver Mat1a mRNA expression had no significant difference, but the Mat2a mRNA expression dropped in the model group ($P<0.05$), while the protein expression of both Mat1a and Mat2a dropped ($P<0.05$). Compared to the model group, the liver Mat1a mRNA expression had no significant difference, but the Mat2a mRNA expression increased in the acupuncture group ($P<0.05$), and the protein expression of both Mat1a and Mat2a increased ($P<0.05$). Compared to the control group, the expression of SAM in the serum and prefrontal cortex decreased in the model group ($P<0.05$). The expression of SAM in the serum and prefrontal cortex increased in the acupuncture group compared to the model group ($P<0.05$). Compared to the control group, the m6A expression in the prefrontal cortex dropped in the model group ($P<0.05$). The m6A expression increased in the acupuncture group compared to the model group ($P<0.05$). **Conclusion** The liver-soothing and mind-regulating acupuncture method can significantly improve depression-related behaviors in the mouse model; increasing the synthesis of Mat1a and Mat2a in the liver, promoting the secretion of SAM, and subsequently up-regulating the m6A level in the prefrontal cortex may play a role in the mechanism.

[Key words] Acupuncture therapy; Depression; Methionine adenosyltransferase 1A; Methionine adenosyltransferase 2A; S-adenosylmethionine; N6-methyl- adenosine; Mice

抑郁症是一种常见的精神障碍类疾病, 主要临床表现为显著而持久的情绪低落、兴趣缺乏、精力减退、思维迟缓等, 具有高发病率、高复发率、高致残率、高自杀率、低治愈率的四高一低特点^[1]。新型冠状病毒肺炎疫情大流行以来, 全球重度抑郁症患者将增加 27.6%, 抑郁症已经成为全球性健康危机^[2]。抑郁症的发病机制包括单胺类神经递质假说、下丘脑-垂体-肾上腺轴假说、神经炎症假说、突触可塑性和神经再生

假说等^[3]。N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m6A) 修饰是真核生物 mRNA 最常见的一种转录后修饰, 占 RNA 甲基化修饰的 80%^[4]。近年来的研究表明, 抑郁患者外周血及抑郁小鼠前额叶皮质 m6A 修饰水平降低, 可能是导致抑郁症发生发展的重要因素^[5]。通过提高 m6A 修饰水平, 可改善小鼠抑郁样行为^[6-7]。甲硫氨酸腺苷转移酶 (methionine Adenosyltransferase, MAT) 主要包括肝脏中甲硫氨酸腺苷转移

酶 1A(methionine adenosyltransferase 1A, Mat1a)和甲硫氨酸腺苷转移酶 2A(methionine adenosyltransferase 2A, Mat2a),是合成腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)所必须的酶。SAM 是甲基化修饰的主要供体。通过促进肝脏 Mat1a 合成可增加 SAM 分泌并释放入血, SAM 穿过血脑屏障进入脑区可上调前额叶皮质 m6A 水平,从而缓解小鼠焦虑样行为^[7]。

符文彬教授关注抑郁症二十余年,提出“疏肝调神”针刺抗抑郁治疗理论。前期研究证实,“疏肝调神”针灸方案对轻中度抑郁症及其合病的有效率均在 70% 以上^[8-10]。然而,“疏肝调神”的物质基础为何?“疏肝”为何能“调神”?目前尚缺乏这方面的研究。本研究旨在从肝-脑轴角度初步探讨“疏肝调神”针刺对 MAT/SAM/m6A 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 36 只, 体重(18±2)g, 购于广东省医学实验动物中心, 合格证号为 SYXK(粤)2018-0085。实验动物于广州中医药大学动物实验中心饲养, 维持室内温度 25℃, 相对湿度 50%, 整体环境清洁安静, 通风良好, 定期更换垫料, 自由饮食。适应性喂养 7 d 后, 将小鼠随机分为对照组、模型组和电针组, 每组 12 只, 实验过程及对动物的处理严格遵循《关于善待实验动物的指导性意见》进行。本研究方案获得广州中医药大学动物实验伦理委员会的批准, 编号为 20211111007。

1.2 主要试剂和仪器

脂多糖, PBS 磷酸缓冲液, RIPA 裂解液, 0.22 μm 硝酸纤维素膜, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(L8880, P1022, R0010, P-N66485, PC0020, Solarbio); 异氟烷(R510-22-10, 深圳瑞沃德科技有限公司); RNA 提取试剂盒, 反转录试剂盒, qPCR 试剂盒(AG21017, AG11706, AG11701, 艾科瑞生物); β-actin 抗体(4970S, CST); Mat1a 和 Mat2a 抗体(67408-1-Ig, 55309-1-AP, Proteintech); 山羊抗兔 IgG H&L (HRP) (ab6721, Abcam); 高灵敏度化学发光检测试剂盒(CW0049, 康为世纪); S-Adenosylmethionine 酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(ab287822, Abcam); EpiQuik™

m6A RNA Methylation Quantification Kit(P-9005, EpiQuik)。小动物麻醉仪(ZS-MV-IV, 中国, 众实科技); 韩氏电针仪(HANS-200A, 中国, 南京济生医疗科技有限公司); 光学显微镜(BX43, 美国, Olympus); 多功能酶标仪(Synergy H1, 美国, Biotek); 梯度 PCR 仪(T-100, 美国, Bio-Rad); 荧光定量 PCR 仪(480II, 瑞士, Roche); 核酸定量仪(Nanodrop One, 美国, Thermo); 高通量组织研磨器(SCIENTZ-48, 中国, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 垂直电泳系统(Mini-protean, 美国, Bio-Rad); 凝胶成像仪(Syngene, 英国, G:BOX F3)。

1.3 造模方法

小鼠自由饮食, 造模前各组小鼠先进行旷场实验(open field test, OFT)和强迫游泳实验(force swimming test, FST), 将过度活跃的小鼠(平均移动速度≥50 mm/s 或静止不动时间≤60 s)及活性不足的小鼠(平均移动速度≤30 mm/s 或静止不动时间≥100 s)剔除。剔除后, 对照组 10 只, 模型组 8 只, 电针组 10 只。参照 LI W 等^[11-12]的方法采用脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)腹腔注射制备小鼠抑郁模型。模型组和电针组小鼠连续 7 d 腹腔注射 500 μg/(kg·bw) LPS, 对照组小鼠注射等体积的生理盐水。

1.4 干预方法

电针组在 LPS 腹腔注射造模 3 天后开始给予电针刺激, 取穴百会、印堂、合谷(双侧)和太冲穴(双侧), 定位参照《实验针灸学》^[13]中相关标准。操作时先使用异氟烷吸入将小鼠麻醉, 采用 0.18 mm×10 mm 一次性针灸针对小鼠进行针刺, 其中百会、印堂斜刺进针约 3 mm。双侧合谷、太冲直刺约 1 mm。对太冲穴进行电针, 针刺太冲穴及太冲穴上约 5 mm 的位置使之形成环路, 使用韩氏电针仪, 电流强度 1 mA, 疏密波, 频率 2 Hz/50 Hz, 持续刺激 20 min。连续干预 14 d。

1.5 行为学检测

行为学检测方式根据参考文献进行操作^[14]。

1.5.1 OFT

将小鼠放入 40 cm×40 cm×50 cm 的旷场正中格, 观察 5 min 内小鼠行为变化。检测并记录平均运动速度、总路程、水平运动评分、垂直运动评分。平均移动速度、总路程、水平运动次数由 Supermaze 软件根据拍摄的视频自动统计并记录。水平移动次数指小鼠三足跨格次数。垂直移动次数指小鼠双上肢离开地面

站立次数。

1.5.2 FST

将小鼠缓慢放置于树脂玻璃透明水桶(20 cm×18 cm)内适应性游泳 20 min。24 h 后将小鼠放进相同的水桶内游泳 6 min,并记录后 3 min 内的累计不动时间,即小鼠漂浮在水面不动或四肢轻微划动状态的累计时间,不动代表小鼠行为绝望的状态。

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

各组小鼠单笼饲养,分别给予两瓶水喂养。一瓶为 2%蔗糖水,一瓶为纯水,自由饮食饮水 24 h,中间更换一次水的位置。禁食禁水 12 h 后称量两瓶蔗糖水与纯水各 150 g,分别放置在各个鼠笼的两侧,给予自由饮食。12 h 后称量糖水与纯水消耗量。计算并记录纯水消耗、糖水消耗、糖水偏爱值。蔗糖水偏爱值=[蔗糖水消耗量/(蔗糖水消耗量+纯水消耗量)]×100%。

1.6 样本采集与处理

小鼠行为学指标检测完成后,使用 3%戊巴比妥钠按 30 mg/(kg·bw)剂量腹腔注射对小鼠进行麻醉,将镊子夹小鼠尾部无反应视为麻醉成功。小鼠眼球取血,室温静置 2 h 后离心 5 min,3 000 rpm/min,取上清置于 -80 ℃保存备用。小鼠断颈处死,取一叶肝脏置于 4%多聚甲醛中固定用于制备石蜡切片,其余肝脏组织 -80 ℃保存。取脑,在冰袋上对脑组织进行剥离,取双侧前额叶皮质, -80 ℃保存。

1.7 指标检测

1.7.1 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)检测 Mat1a、Mat2a mRNA 表达

每组取 6 只小鼠肝脏组织 20 mg,将组织研磨后用 Trizol 法提取总 RNA,按照反转录试剂盒说明将 RNA 反转录为 cDNA,使用 SYBR Green 法进行 qPCR 操作。以 GAPDH 作为参照内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 Mat1a、Mat2a 相对表达量,为确保实验结果可靠性,本研究每个基因分别设计了两个引物进行 qPCR 实验。引物序列见表 1。

1.7.2 Western blot 法检测肝脏组织中 Mat1a、Mat2a 蛋白表达

各组分别随机选取 3 个样本,充分研磨组织后加入 RIPA 裂解液提取总蛋白。使用 BCA 试剂盒测定并将蛋白浓度调整为 10 μg/μL。样本加入 Loading buffer 经水煮变性、凝胶电泳后,转移到 PVDF 膜上,使用 5%

脱脂奶粉封闭 1 h,Mat1a、Mat2a 抗体按 1:1 000 比例稀释,分别 4 ℃孵育过夜。孵育后使用 PBST 充分洗涤,5%脱脂奶粉按 1:5 000 的比例稀释二抗,室温孵育 1 h 后使用 PBST 充分洗涤。最后加入 ECL 显影液置于凝胶成像仪中显影,使用 ImageJ 软件对灰度值进行检测并统计。

表 1 引物序列及长度

基因		引物序列(5' →3')	引物长度
Mat1a-1	上游	CACATCAGAATCTGTAGGAGAGGG	119
	下游	ACACTGTCTCACAGGCCACCTT	
Mat1a-2	上游	CATCGTGCTCGCTCACAAACT	136
	下游	CACAGGGATGACTGCACCATT	
Mat2a-1	上游	AGTGGTTCGTGAAGCCATAAAG	189
	下游	TCAGTGGCATAACCAACATCA	
Mat2a-2	上游	CTTCACAGGCGTTCATT	147
	下游	CAAGCCACTTAGCATCAGGGT	
GAPDH	上游	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游	TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

1.7.3 酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清、前额叶皮质中 SAM 蛋白表达

ELISA 检测具体操作严格按照说明书进行。提前稀释好实验所需试剂,所有样本稀释 5 倍,设置标准孔、样本孔和空白孔。各孔加入相应样本后,立即加入 50 μL 检测抗体,37 ℃孵育 45 min。去掉检测抗体并充分清洗后加入 SABC 工作液,37 ℃孵育 30 min。去除 SABC 工作液并清洗后加入 TMB 37 ℃避光孵育 30 min,加入终止液。在 450 波长下读取吸光值,Origin 软件拟合曲线标准曲线并计算样本浓度。

1.7.4 m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒检测前额叶皮质 m6A 水平

提前准备清洗液、捕获抗体稀释液、检测抗体稀释液、增强溶液、阳性对照样品、检测样本 300 ng/样总 RNA。每孔加入 80 μL 结合液,分别将 2 μL 阴性对照、阳性对照、检测样本加入到各自孔内,轻柔且充分混匀后 37 ℃孵育 90 min。去除结合液,加入捕获液室温孵育 60 min。去除捕获液,加入检测液,室温孵育 30 min。去除检测液,加入增强液室温孵育 30 min。充分清洗后各孔加入检测液避光孵育至溶液变为蓝色。加入终止液,将酶标板置于酶标仪,在 450 nm 波长处读取吸光值,Origin 2022b 软件拟合曲线标准曲线

并计算样本浓度。

1.8 统计学分析

采用 Graphpad Prism7.0 软件进行绘图级统计分析。符合正态分布的计量数据以均数±标准差表示,比较用 t 检验;不符合正态分布则用非参数 Mann-Whitney 检验进行比较。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组小鼠行为学变化比较

本研究操作流程如图 1 所示。LPS 连续腹腔注射 7 d 进行抑郁小鼠造模,第 3 d 开始进行“疏肝调神”针刺,连续针刺 14 d。针刺 10 d 后开始行为学检测。OFT 结果显示,与对照组比较,模型组小鼠平均移动速度和移动总路程均显著降低($P<0.05$),提示 LPS 导致小鼠活动性下降。模型组小鼠水平和垂直移动次数均显著减少($P<0.05$),水平和垂直移动次数降低提示小鼠自主行为与探究行为变得消极,出现抑郁行为。使用“疏肝调神”针刺后,与模型组比较,针刺组小鼠平均移动速度、移动总路程均上升($P<0.05$),水平和垂直

移动次数显著上升($P<0.05$)。FST 结果显示,与对照组比较,模型组小鼠静止不动时间增加($P<0.05$)。与模型组比较,针刺组小鼠静止不动时间显著减少($P<0.05$)。尽管在 SPT 中,与对照组比较,模型组小鼠糖水偏好值无统计学意义,但有下降趋势。与模型组相比,针刺组小鼠糖水偏好值显著上调($P<0.05$)。以上结果提示,“疏肝调神”针刺具有改善小鼠抑郁样行为的作用,详见图 2。

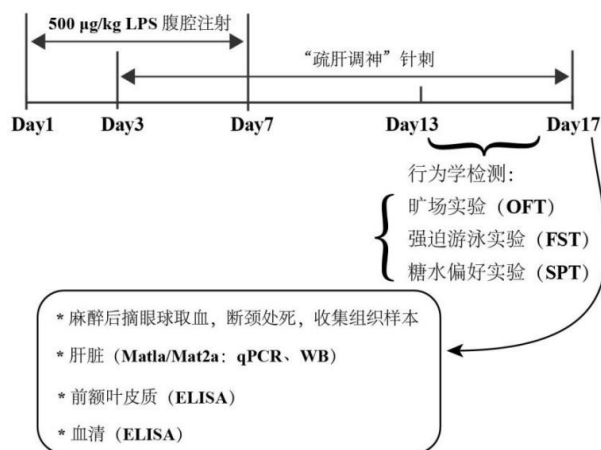
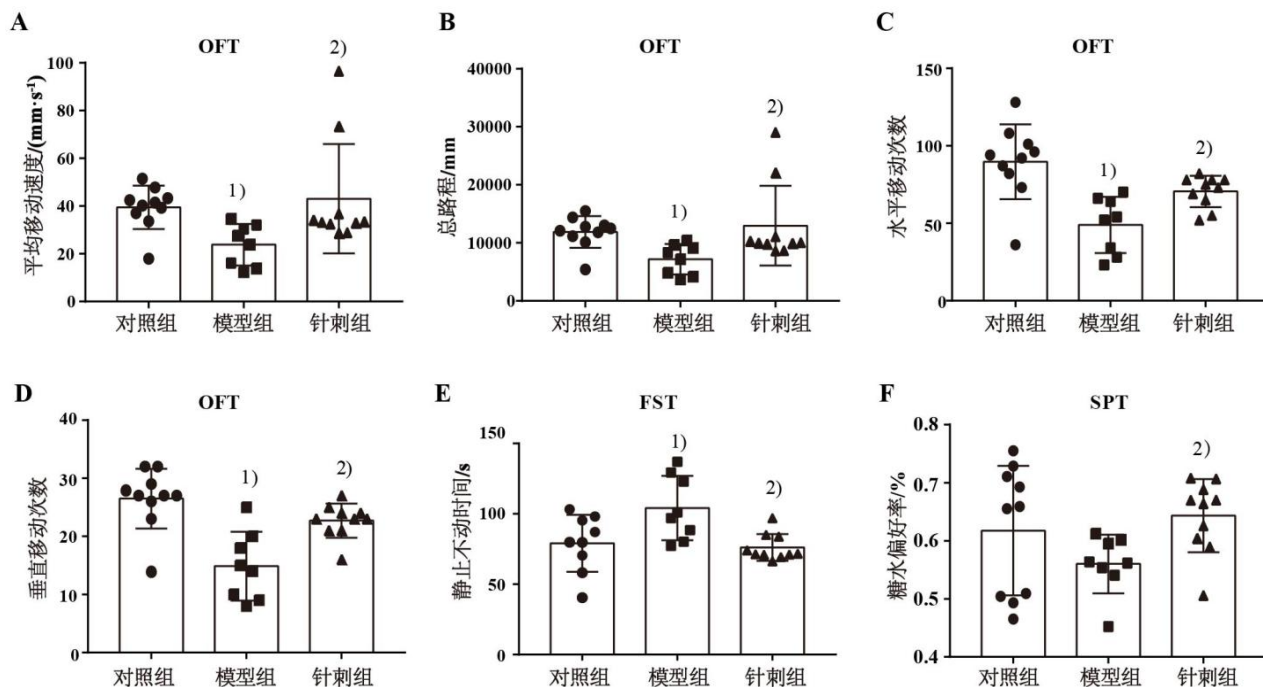


图 1 操作流程示意图



注:A 平均移动速度,B 总路程,C 水平移动次数,D 垂直移动次数,E FST 静止不动时间,F SPT 糖水偏好率。与对照组比较 ¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较 ²⁾ $P<0.05$ 。

图 2 3组小鼠 OFT、FST、SPT 行为学比较($\bar{x} \pm s$, $n=8\sim10$)

2.2 3 组小鼠肝脏 Mat1a、Mat2a mRNA 和蛋白表达比较

qPCR 结果显示, Mat1a mRNA 表达差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较, 模型组肝脏 Mat2a mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 针刺组肝脏 Mat2a mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。详见图 3。

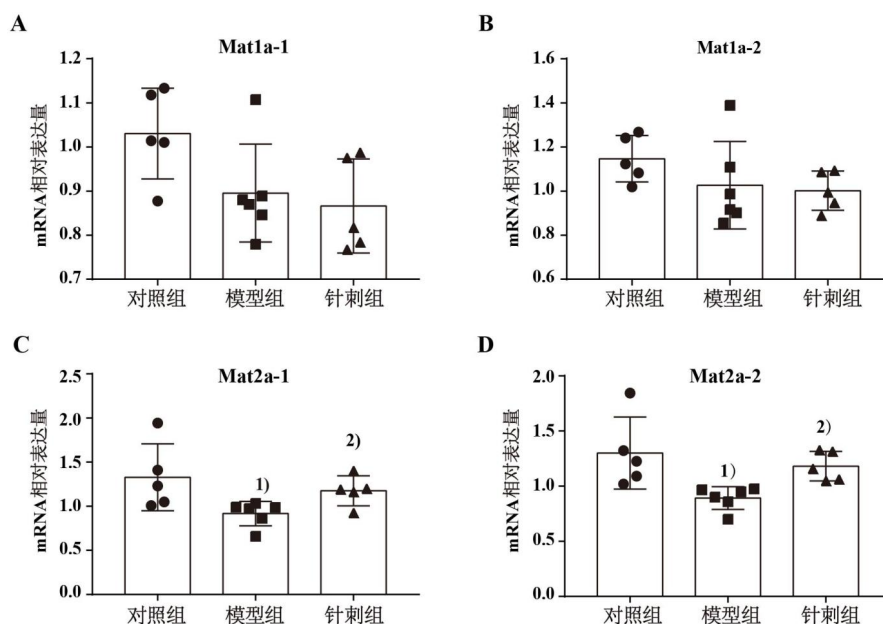
Western blot 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏 Mat1a、Mat2a 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 针刺组 Mat1a、Mat2a 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。详见图 4。

2.3 3 组小鼠血清和前额叶皮质中 SAM 蛋白比较

ELISA 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清、前额叶皮质中 SAM 表达降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 针刺可促进血清、前额叶皮质 SAM 表达上调 ($P < 0.05$)。详见图 5。

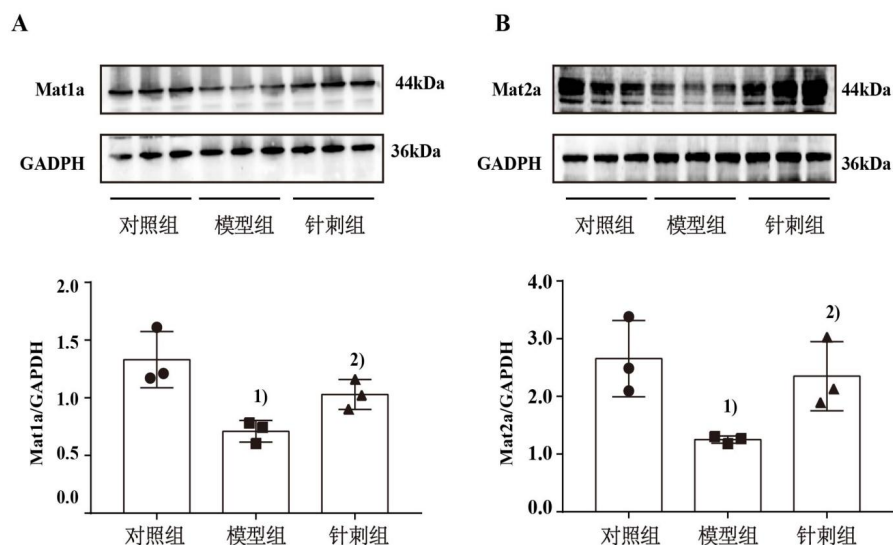
2.4 3 组小鼠前额叶皮质 m6A 修饰水平比较

与对照组比较, 模型组前额叶皮质区 m6A 修饰水平下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 针刺组前额叶皮质区 m6A 修饰水平显著上调 ($P < 0.05$)。详见图 6。



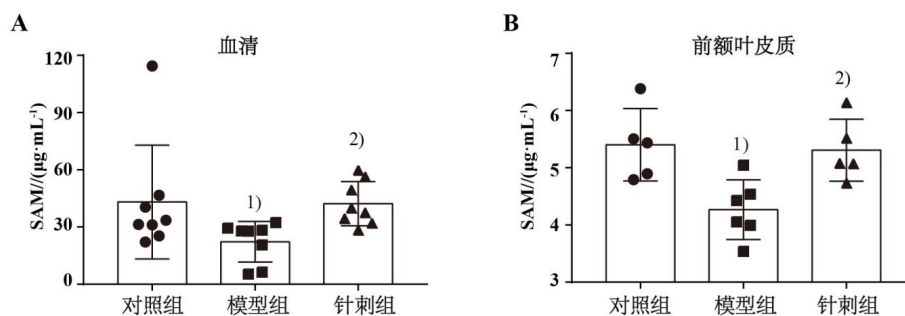
注: A Mat1a 基因引物 1 qPCR 结果, B Mat1a 基因引物 2 qPCR 结果, C Mat2a 基因引物 1 qPCR 结果, D Mat2a 基因引物 2 qPCR 结果。与对照组比较 ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

图 3 3 组小鼠肝脏中 Mat1a、Mat2a mRNA 表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=5\sim6$)



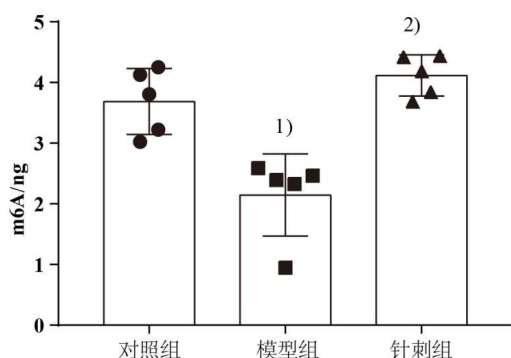
注: A Mat1a 蛋白表达, B Mat2a 蛋白表达。与对照组相比较 ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

图 4 3 组小鼠肝脏 Mat1a、Mat2a 蛋白表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注:A 血清中 SAM 蛋白表达, B 前额叶皮质 SAM 蛋白表达。与对照组比较 ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

图5 3组小鼠 SAM 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



注:与对照组比较 ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

图6 3组小鼠前额叶皮质 m6A 修饰水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3 讨论

抑郁症的发病机制复杂多样,在中医中属于“郁证”范畴。郁证的发生与七情内伤和脏气郁结有关。针刺治疗抑郁已经在临床上得到广泛认可,《抑郁症中西医结合诊疗专家共识》中明确了针灸对抑郁症的治疗作用^[15-16]。“疏肝调神”针灸方案是由符文彬教授提出的抗抑郁治疗理论,其抗抑郁治疗作用在前期临床和实验研究中已经得到反复验证^[8-10, 17-18]。课题组前期研究显示,“疏肝调神”针刺能够保护神经元,促进脑可塑性,增加神经元兴奋性,从而达到抗抑郁治疗作用^[19-20]。

本研究通过腹腔注射 LPS 的方式构建小鼠抑郁模型,“疏肝调神”针法干预,采用 OPT、SFT、SPT 等实验检测小鼠行为学变化,证实“疏肝调神”针法可显著改善 LPS 诱导的小鼠抑郁样行为。qPCR 实验显示肝脏组织 Mat1a mRNA 表达未见明显变化,模型组 Mat2a mRNA 表达降低,针刺可促进 Mat2a mRNA 表达。Western blot 结果显示模型组 Mat1a、Mat2a 蛋白表达显著降低,提示针刺可促进抑郁小鼠肝脏中 Mat1a、Mat2a 蛋白表达。其中,Mat1a 蛋白表达结果与 qPCR

结果不一致,这可能与针刺促进 Mat1a mRNA 翻译有关。此外,蛋白翻译后修饰,磷酸化、泛素化等会影响蛋白稳定性,从而影响蛋白表达。采用 ELISA 检测血清和前额叶皮质中 SAM 蛋白表达情况,结果显示模型组 SAM 蛋白表达均降低,而针刺可促进 SAM 的表达。检测前额叶皮质区 m6A 修饰水平发现,模型组 m6A 修饰减少,而针刺可促进 m6A 修饰水平。提示“疏肝调神”针法可通过促进肝脏 Mat1a、Mat2a 蛋白表达,促进 SAM 的合成, SAM 释放入血后透过血脑屏障进入前额叶皮质区,可促进前额叶皮质区 m6A 修饰水平,进而对前额叶皮质区进行调控,达到抗抑郁治疗作用。

m6A 是一种常见的表观遗传修饰,近期研究表明慢性压力应激可导致前额叶皮质 m6A 修饰水平降低^[7]。m6A 修饰水平降低可导致皮质神经干细胞增殖和分化能力减弱,神经再生减少。提高 m6A 修饰水平,则可以促进成熟神经元生成^[21-22]。神经再生减少是导致抑郁症发生发展的关键因素之一^[23-24]。可见,通过促进脑内 m6A 修饰,诱导神经再生,可达到抗抑郁治疗作用。

SAM 作为脑内甲基化的主要供体,可以调控 DNA、RNA 等的甲基化修饰^[25],外周 SAM 可通过血液循环穿透血脑屏障促进脑区 RNA 的 m6A 修饰^[26]。在欧洲, SAM 作为抗抑郁治疗的处方药物已有 20 多年历史,用于治疗抑郁症、骨关节炎等^[27-28]。此外, SAM 被作为营养补品销售,具有改善情绪、保养肝脏和舒适关节的功效^[29-30]。近年来, SAM 已经在临床试验中被广泛用于治疗各种精神类疾病^[31-33]。可见,通过促进血液中 SAM 表达具有潜在抗抑郁治疗价值。

MAT 主要包括 Mat1a 和 Mat2a, Mat1a、Mat2a 蛋白酶分别由 Mat1a、Mat2a 基因编码,是合成 SAM 的关键酶。Mat1a、Mat2a 蛋白酶主要在肝脏中合成,其缺乏

可导致肝脏合成 SAM 减少,进而引起脂肪性肝炎、肝癌等。肝脏正常分泌 SAM 对维持肝脏功能及减少肝脏损伤具有重要作用^[34]。肝脏功能的异常可加重神经炎症、神经毒性的产生^[35-37]。通过促进肝脏合成 SAM 可改善小鼠焦虑样行为^[7]。

综上,本研究从外周调控中枢的角度出发,发现“疏肝调神”针法可能通过“肝-脑”MAT/SAM/m6A 轴对抑郁小鼠进行调控,改善小鼠抑郁样行为。本研究为疏肝调神针法抗抑郁治疗机制提供了一种可能的解释,也为中医学“疏肝调神”理论的物质基础提供了科学解释。外周-中枢互作机制是脑研究较为广泛的领域。不同脏器分泌的激素、细胞因子、代谢产物等可以直接或间接对脑突触功能产生调控作用^[38],肝脏作为人体最大最重要的代谢器官,针对具体肝脏代谢因子的研究不断取得进展,科学家发现 Gpld1 这一由肝脏分泌的代谢酶可以响应运动干预,进而缓解脑衰老和认知减退^[39]。早期肝性脑病小鼠模型中存在的外周炎症因子,可造成运动皮层树突棘形成障碍,从而导致运动学习缺陷的机制^[40],提示肝脏的代谢稳态对脑功能健康至关重要。肝-脑轴调控情感认知功能领域中发现,运动后小鼠 SAM 在血清中含量快速增加,SAM 合成通路的关键限速酶 Mat1a 主要高表达在肝脏组织中。将小鼠的肝脏中 SAM 合成下调,其运动抗焦虑的效果被明显抑制^[7]。提示 SAM 可能是调控肝脑轴抗焦虑的关键因子。以上研究为本研究提出的“疏肝调神”针刺通过肝脑轴达到抗抑郁作用提供了理论支撑。

本研究也存在不足之处。首先,肝脏作为代谢最主要的器官,关于“肝-脑”轴的物质基础,除了 MAT/SAM/m6A 轴的调控作用,是否还存在其他调控途径尚不明确;其次,本研究未进行 SAM 补充实验以及抑制实验,以直接证明 SAM 是否为针刺的直接靶点;最后,本研究仅探讨了肝对脑的调控作用,而未针对“肝主疏泄”功能受到抑制为何会导致“神”的异常做出解释,该研究将会是课题组未来研究的重要方向之一。

参考文献

- [1] MARWAHA S, PALMER E, SUPPES T, *et al.* Novel and emerging treatments for major depression[J]. *Lancet*, 2023(10371):141-153.
- [2] COVID-19 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic[J]. *Lancet*, 2021(10312):1700-1712.
- [3] MALHI G S, MANN J J. Depression[J]. *Lancet*, 2018(392):2299-2312.
- [4] HE P C, WEI J, DOU X, *et al.* Exon architecture controls mRNA m6A suppression and gene expression[J]. *Science*, 2023(6633):677-682.
- [5] ENGEL M, EGGERT C, KAPLICK P M, *et al.* The role of m6A/m-RNA methylation in stress response regulation[J]. *Neuron*, 2018(2):389-403.
- [6] HUANG R, ZHANG Y, BAI Y, *et al.* N6-methyladenosine modification of fatty acid amide hydrolase messenger RNA in circular RNA STAG1-regulated astrocyte dysfunction and depressive-like behaviors[J]. *Biol Psychiatry*, 2020(5):392-404.
- [7] YAN L, WEI J A, YANG F, *et al.* Physical exercise prevented stress-induced anxiety via improving brain RNA methylation[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022(24):e2105731.
- [8] FAN L, FU W B, CHEN Z, *et al.* Curative effect of acupuncture on quality of life in patient with depression: a clinical randomized single-blind placebo-controlled study[J]. *J Tradit Chinese Med*, 2016(2):151.
- [9] FU W B, FAN L, ZHU X P, *et al.* Depressive neurosis treated by acupuncture for regulating the liver-a report of 176 cases[J]. *J Tradit Chinese Med*, 2009(2):83-86.
- [10] WEN X Y, WU Q, LIU J H, *et al.* Randomized single-blind multicenter trial comparing the effects of standard and augmented acupuncture protocols on sleep quality and depressive symptoms in patients with depression[J]. *Psychol Health Med*, 2018(4):375-390.
- [11] LI W, ALI T, HE K, *et al.* Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression[J]. *Brain Behav Immun*, 2021(92):10-24.
- [12] JI C, TANG Y, ZHANG Y, *et al.* Microglial glutaminase 1 deficiency mitigates neuroinflammation associated depression[J]. *Brain Behav Immun*, 2022(99):231-245.
- [13] 余曙光, 郭义. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2013.

- 版社, 2009:149-150.
- [14] ZHUANG H, YAO X, LI H, *et al.* Long-term high-fat diet consumption by mice throughout adulthood induces neurobehavioral alterations and hippocampal neuronal remodeling accompanied by augmented microglial lipid accumulation[J]. *Brain Behav Immun*, 2022(100):155-171.
- [15] 过伟峰, 曹晓岚, 盛蕾, 等. 抑郁症中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2020(2):141-148.
- [16] 睿徐. 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(9):5436-5440.
- [17] 王妍文, 符文彬, 韩冠先, 等. 整合针灸方案治疗轻中度抑郁症临床研究[J]. 新中医, 2019(10):249-252.
- [18] 黎庆连, 符文彬, 周鹏. 符文彬整合针灸方案治疗抑郁症经验[J]. 中华中医药杂志, 2020(12):6147-6150.
- [19] 高静, 赖名殷, 梅氏清心, 等. 电针对抑郁大鼠前额叶脑源性神经营养因子/哺乳动物雷帕霉素复合物 1 通路及突触可塑性的影响[J]. 针刺研究, 2022(1):15-20, 32.
- [20] JIANG L, ZHANG H, ZHOU J, *et al.* Involvement of hippocampal AMPA receptors in electroacupuncture attenuating depressive-like behaviors and regulating synaptic proteins in rats subjected to chronic unpredictable mild stress[J]. *World Neurosurg*, 2020(139):e455-e462.
- [21] YOON K J, RINGELING F R, VISSERS C, *et al.* Temporal control of mammalian cortical neurogenesis by m6A methylation[J]. *Cell*, 2017(4):877-889.
- [22] WANG Y, LI Y, YUE M, *et al.* N6-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications[J]. *Nat Neurosci*, 2018(2):195-206.
- [23] JUNG S, CHOE S, WOO H, *et al.* Autophagic death of neural stem cells mediates chronic stress-induced decline of adult hippocampal neurogenesis and cognitive deficits[J]. *Autophagy*, 2020(3):512-530.
- [24] BERGER T, LEE H, YOUNG A H, *et al.* Adult hippocampal neurogenesis in major depressive disorder and Alzheimer's disease[J]. *Trends Mol Med*, 2020(9):803-818.
- [25] WEICKHMANN A K, KELLER H, WURM J P, *et al.* The structure of the SAM/SAH-binding riboswitch[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019(5):2654-2665.
- [26] MOSCA P, ROBERT A, ALBERTO J M, *et al.* Vitamin B₁₂ deficiency dysregulates m6A mRNA methylation of genes involved in neurological functions[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021(17):e2100206.
- [27] THACHIL A F, MOHAN R, BHUGRA D. The evidence base of complementary and alternative therapies in depression[J]. *J Affect Disord*, 2007(1-3):23-35.
- [28] DE SILVA V, EL-METWALLY A, ERNST E, *et al.* Arthritis research uk working group on complementary and alternative medicines. evidence for the efficacy of complementary and alternative medicines in the management of osteoarthritis: a systematic review[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2011(5):911-920.
- [29] FREEMAN M P. Complementary and alternative medicine for perinatal depression[J]. *J Affect Disord*, 2009(1-3):1-10.
- [30] RONGEY C, KAPLOWITZ N. Current concepts and controversies in the treatment of alcoholic hepatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2006(43):6909-6921.
- [31] SHARMA A, GERBARG P, BOTTIGLIERI T, *et al.* S-Adenosylmethionine (SAME) for neuropsychiatric disorders: a clinician-oriented review of research[J]. *J Clin Psychiatry*, 2017(6):e656-e667.
- [32] SARRIS J, BYRNE G J, BOUSMAN C, *et al.* Adjunctive S-adenosylmethionine (SAME) in treating non-remittent major depressive disorder: an 8-week double-blind, randomized, controlled trial[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2018(10):1126-1136.
- [33] GAO J, CAHILL C M, HUANG X, *et al.* S-adenosyl methionine and transmethylation pathways in neuropsychiatric diseases throughout life[J]. *Neurotherapeutics*, 2018(1):156-175.
- [34] LU S C, MATO J M. S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer[J]. *Physiol Rev*, 2012(4):1515-1542.
- [35] MONDAL A, BOSE D, SAHA P, *et al.* Lipocalin 2 induces neuroinflammation and blood-brain barrier dysfunction through liver-brain axis in murine model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *J Neuroinflammation*,

- 2020 (1) :201.
- [36] WIĘCKOWSKA-GACEK A, MIETELSKA-POROWSKA A, CHUTORAŃSKI D, *et al.* Western diet induces impairment of liver-brain axding ziis accelerating neuroinflammation and amyloid pathology in Alzheimer's disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021 (13) :654509.
- [37] YIN K, WANG D, ZHAO H, *et al.* Polystyrene microplastics up-regulates liver glutamine and glutamate synthesis and promotes autophagy-dependent ferroptosis and apoptosis in the cerebellum through the liver-brain axis[J]. *Environ Pollut*, 2022 (307) :119449.
- [38] VINTS W A J, LEVIN O, FUJIYAMA H, *et al.* Exerkines and long-term synaptic potentiation: mechanisms of exercise-induced neuroplasticity[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2022 (66) :100993.
- [39] HOROWITZ A M, FAN X, BIERI G, *et al.* Blood factors transfer beneficial effects of exercise on neurogenesis and cognition to the aged brain[J]. *Science*, 2020 (6500) :167-173.
- [40] SATO S, DYAR K A, TREEBAK J T, *et al.* Atlas of exercise metabolism reveals time-dependent signatures of metabolic homeostasis[J]. *Cell Metab*, 2022 (2) :329-345.

收稿日期 2023-12-05

《上海针灸杂志》投稿须知

投稿要求

来稿应具有先进性、科学性和逻辑性,论点明确,资料可靠,文字精炼,层次清楚,数据准确,统计方法正确,书写工整规范,撰写格式符合本刊要求。来稿应注明无一稿两投、不涉及保密及署名无争议等事项。

稿件的要求与格式

- **题目**: 含义明确,言简意赅,并包含主要的关键词,字数一般不超过 20 个字。英文题目一般不超过 120 个字母和空格,尽量不用缩写。
- **摘要**: 300 字左右,说明目的、方法、结果(包括主要数据)与结论。
- **主题词**: 每篇至少中英文各 5 个关键词,尽量选用最新版《中国中医药学主题词表》和《Index Medicus》中 MeSH 所列的词。
- **基金资助**: 来稿若有课题资助,请脚注于文题页下方,需写明课题来源和编号。
- **引言**: 扼要论述研究的理论基础、前人已有工作、研究目的和意义。
- **材料和方法**: 写明研究对象。常规方法描述从简;创新方法或有较大改进的方法则应详述,以便他人重复。已发表但人们不太了解的方法应引用文献,简要描述。临床研究需标注伦理审批号。
- **研究设计**: 应交代研究设计的名称和主要做法。应围绕“重复、随机、对照、均衡”4 个基本原则作概要说明。
- **统计方法**: 应写明所用统计分析方法的具体名称和统计量的具体值。
- **结果**: 对原始资料作加工处理和必要的统计分析,写明统计结果、观察例数、统计值和 *P* 值。对所得的结果用文字、图表作有逻辑性的描述。
- **表**: 需附于正文第 1 次提到它的文字段后面,要有表格序号及标题,表格中数量值小数点后保留位数需一致。
- **图**: 图像分辨率要求大于 220 dpi,且格式为 jpg,需在图的下方注明图序号、图题和图注,图中涉及数量值的应标明数量值的计量单位。
- **参考文献**: 引用与文章直接有关的重要文献,以近 5 年发表文献为主。论著类文章不少于 20 条,综述类文章不少于 40 条。本刊一般不受理无参考文献的文章。参考文献著录标准参照《参考文献著录规则:GB/T7714—2015》的编写格式。