

电针对脑卒中后抑郁大鼠谷氨酸类神经递质及其受体的表达影响

严嘉宁, 赵立峰, 余 涛, 陆方琴, 傅润熹, 韦登明*

(宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 观察电针对脑卒中后抑郁(PSD)大鼠的脑部氨基酸类神经递质表达的影响, 探讨电针治疗脑卒中后抑郁的分子机理. 将 Wistar 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组和电针治疗组, 采用夹闭颈总动脉和再通方法建立脑卒中模型. 7 d 后根据文献[1]方法建立 PSD 模型, 电针“百会”“大椎”穴, 留针 20 min, 1 次·d⁻¹ 共持续 15 d. 旷场试验观察其行为学表现, 免疫组织化学技术检测大鼠脑谷氨酸类神经递质的表达变化结果. 与模型组相比, 行为学实验发现电针治疗组大鼠旷场穿线抬壁次数明显增多, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 免疫组化检测发现谷氨酸及其受体 NMDA/AMPA 积分光密度值明显下降, 差异具有统计学意义($P<0.01$). 表明电针可抑制脑卒中后抑郁大鼠脑 NMDA/AMPA 的表达, 这可能是电针治疗脑卒中后抑郁的分子机理之一.

关键词: 脑卒中后抑郁; 电针; 谷氨酸; NMDA; AMPA

中图分类号: R395

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2018) 03-0072-04

脑卒中后抑郁(PSD)在临床上较为常见, 但其发病和治疗机制尚不完全清楚. 研究表明, 普通抑郁症的发病与谷氨酸和 γ -氨基丁酸(GABA)及其受体变化有关; 抑郁患者海马体积减少, 并可被抗抑郁药逆转. 但 PSD 的发病及电针治疗机制是否与氨基酸类递质及其受体的变化有关, 尚未见报道. 已有研究报道^[2-3], 电针对 PSD 有治疗效果. 本文目的是通过检测电针对 PSD 大鼠脑中谷氨酸及其受体以及各种生长因子的含量变化, 研究其对 PSD 的治疗效果和相关机制.

1 材料和方法

1.1 对实验动物进行分组

准备成年无特定病原体级 Wistar 大鼠 40 只, 从浙江大学医学院实验动物中心购得, 合格证号 0102016. 均为雄性, 体重 250~300 g, 饮食自由. 大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为正常组、假手术组、模型组和电针治疗组, 每组 10 只.

1.2 购买试剂与仪器

购买或准备 G6805 电针仪(上海华谊仪器制造厂)^[4], 旷场及记录仪(上海移数动物学系统), 二抗兔抗大鼠的谷氨酸、NMDA 受体多克隆抗体、生物素化羊抗兔 IgG、SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), JD801 形态学图像分析系统(江苏捷达科技发展有限公司), BM-VII 包埋机(宏业医用仪器公司), HM-325 石蜡切片机(德国 LEICA 公司), CX40 生物显微镜(日本 Olympus 公司).

1.3 模型制备

10%水合氯醛按 0.3 mL·dg⁻¹ 剂量, 腹腔注射麻醉大鼠. 大鼠仰卧固定于手术台上, 颈部正中切开皮肤, 暴露双侧颈总动脉(CCA)和迷走神经. 将 CCA 用动脉夹夹闭 10 min, 通 20 min 后, 再夹闭 10 min. 以青霉素局部消毒后再缝合, 放回鼠笼中以保温饲养. 假手术组麻醉及手术过程同上, 但不夹闭颈总动脉. 每只大鼠连续 3 d 肌肉注射青霉素 16 万单位. 饲养 7 d 后, 进行行为学检测.

收稿日期: 2017-05-28.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 宁波市重大精神疾病转化医学研究项目 (2015C110026).

第一作者: 严嘉宁 (1996—), 男, 浙江嘉兴人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 脑缺血性疾病防治分子机制. E-mail: 419503527@qq.com

*通信作者: 韦登明 (1963—), 男, 贵州贵定人, 博士/教授, 主要研究方向: 脑缺血性疾病防治分子机制. E-mail: 1760947688@qq.com

参照并改进文献[1]的 CUMS 方法,对卒中模型成功大鼠予以孤养、慢性不可预见的温和性应激(CUMS)制备 PSD 模型。具体操作如下:(1)禁食禁水 20 h;(2)禁水 17 h;(3)倾斜鼠笼(45°)17 h;(4)持续光照 17 h;(5)湿笼(100 g 锯屑+200 mL 水)21 h;(6)4 °C 强迫游泳 5 min;(7)水平摇晃 5 min;(8)行为限制(束缚)2 h;(9)夹尾 1 min。9 种刺激每日随机采取 1 种,共 21 d,单笼饲养。21 d 饲养结束后,再次进行行为学检测。

1.4 电针治疗方法

PSD 模型成功后,电针“百会”“大椎”穴,施以连续波,频率 50 Hz,强度以大鼠安静耐受为度(约 2.0 rflA),每天电针 1 次,留针 20 min,连续治疗不同的时间周期,共 15 d。针刺穴位:“百会”位于顶骨正中,“大椎”在第 7 颈椎与第 1 胸椎间,背部正中。

1.5 检测方法

1.5.1 行为学检测

采用旷场试验(open-field)法^[5]:用小动物行为学分析系统测定分析 5 min 内分析箱内大鼠穿格次数和抬壁次数。其中第 1 分钟不计,使大鼠适应环境,保持环境安静与黑暗。

1.5.2 脑组织谷氨酸类神经递质及生长因子免疫组织化学染色方法观察

用质量分数(文中均指质量分数)为 10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠(0.3 mL·dg⁻¹ 体重)并暴露心脏,先用生理盐水 100 mL 冲洗主动脉,继灌注由 4%多聚甲醛与 1%戊二醛组成的磷酸缓冲液(pH 值 7.4)200 mL,持续滴注共计 40 min,断头取脑。石蜡包埋切片后进行免疫组织化学染色。切片经常规脱腊、脱水、3% H₂O₂ 灭活内源性酶、微波抗原修复、冲洗,正常山羊血清封闭,滴加谷氨酸(Glu)及其神经递质受体(NMDAR)一抗(浓度 1:300),湿盒中 4 °C 冰箱过夜。滴加相应二抗, SABC 反应, DAB 显色。分色、脱水、透明、封片、光学显微镜下观察免疫组化染色结果。阴性对照用 PBS 代替一抗。其阳性区域为胞浆呈棕黄色。400 倍光镜下,每张切片随机选取 4 个视野检测,计算平均积分光密度。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13 统计软件进行单因素方差分析,组间用 LSD 方法进行检验

并比较,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为检验水准。

2 结果

2.1 电针对各组大鼠行为学表现的影响

由表 1 数据可见,正常组与假手术组穿线抬壁次数、抬壁次数的差异没有显著的统计学意义($P > 0.05$),但模型组的穿线次数、抬壁次数较正常组和假手术组明显减少,差异具有显著的统计学意义($P < 0.05$);而电针治疗后,电针组较模型组的穿线次数、抬壁次数明显提高,差异具有显著的统计学意义($P < 0.05$)。结果显示,电针对 PSD 大鼠的抑郁有改善作用。

表 1 电针治疗后对大鼠行为学表现的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) 次

组别	穿线数	抬壁数
正常组	17.1 ± 4.90	14.1 ± 3.41
假手术组	13.6 ± 3.43 ¹⁾	12.3 ± 3.71 ¹⁾
模型组	8.29 ± 2.75	5.71 ± 1.80
电针治疗组	9.36 ± 4.39 ²⁾	7.10 ± 5.15 ²⁾

注:正常组与假手术组比较:1) $P > 0.05$;电针治疗组与模型组比较:2) $P < 0.05$; n 为每组动物数目,下表同。

2.2 电针对各组大鼠脑组织 Glu、NMDAR 和 AMPA 表达的影响

由表 2 数据和图 1 的组织染色情况可见,模型组 Glu、NMDAR 和 AMPA 的表达较假手术组明显升高,海马区域呈现强阳性表现;治疗组 Glu、NMDAR 和 AMPA 的表达与模型组比较均呈现明显下降趋势,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果提示,电针可抑制 PSD 大鼠脑 Glu、NMDAR 和 AMPA 的表达。

表 2 电针对大鼠脑组织谷氨酸类神经递质及受体的表达影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	GLU 积分光密度	NMDA 积分光密度	AMPA 积分光密度
正常组	5 621 ± 1 634	11 056 ± 1 801	7 760 ± 737
假手术组	5 342 ± 1 650	7 981 ± 1 332	6 126 ± 663
模型组	12 990 ± 1 644	14 896 ± 2 055	12 191 ± 1 153
电针治疗组	5 990 ± 867	9 511 ± 894	8 980 ± 588

3 讨论

脑卒中的发生与兴奋性氨基酸毒性作用有关。

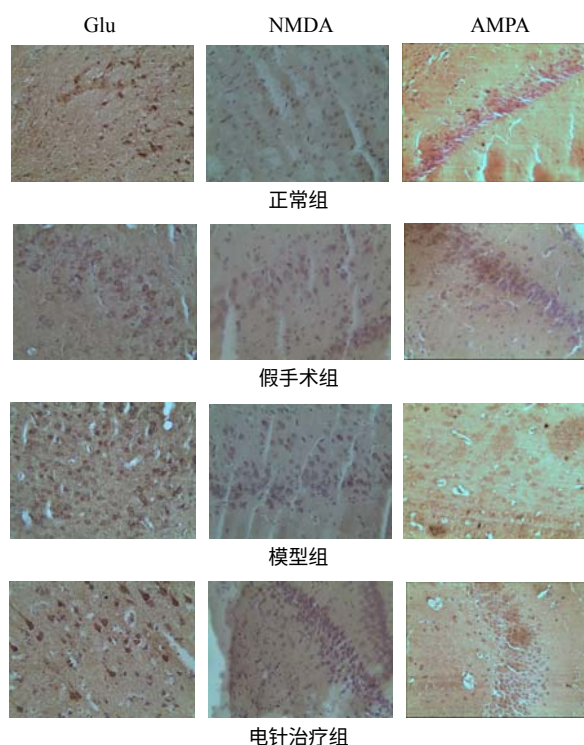


图1 免疫组化GLU、NMDA、AMPA不同组别的组织染色情况($\times 400$)

脑的缺血、缺氧会导致兴奋性氨基酸毒性加强, 出现一系列缺血性连锁反应, 如炎症反应、钙过量内流、自由基反应、细胞死亡等^[6]。脑缺血引起神经元大量释放谷氨酸(Glu), Glu受体如N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA)、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPA)的兴奋, 加重了Glu神经元毒性作用和神经胶质细胞死亡^[7], 并出现钙离子超载, 而钙离子可进一步促进谷氨酸释放, 导致恶性循环。研究表明, 神经元变性、死亡与谷氨酸及其受体的高表达和过度活化有关^[8-9]。

脑卒中后抑郁(PSD)是指脑卒中所引发的抑郁症, 是脑血管病常见的并发症。目前西药在PSD的治疗中明显存在副作用严重、起效慢、价格昂贵等问题, 而在中药方面, 陈德仁尝试用丹栀逍遥散加减治疗PSD, PSD得到了明显的改善, 有抗焦虑镇静作用, 生活自理能力有所提高^[10]。针刺作为中医治疗的一种手段, 对此疾病的治疗具有安全、无毒、疗效显著等优点。经过比较发现, 针刺治疗PSD的疗效与口服盐酸氟西汀胶囊相当, 且具有起效快、副反应小、明显提高患者生存质量的优越性。然而, 针刺治疗PSD机制尚不十分清楚, 也就

进一步限制了针灸疗效的提高。百会穴位居巅顶, 与大椎穴均为诸阳之会, 刺之可调动一身之阳气。乔瑞瑞的实验说明电针此两穴, 对慢性抑郁确有疗效, 有显著的统计学差异^[11]。

本研究结果表明, 未治疗的模型组大鼠行动较为迟缓, 电针对脑卒中后抑郁大鼠的行为表现有改善作用, 其穿线抬壁次数均有提高, 结果提示电针对PSD大鼠的抑郁有一定的治疗效果。

PSD的发生机制与谷氨酸结合受体有明显关联, 其机制可能如下: 谷氨酸大量释放激活其受体NMDA、AMPA, 谷氨酸与NMDA的结合可以改变大鼠的执行控制能力^[12]; 谷氨酸与AMPA型受体结合后, 通过钠离子内流可导致快突触传递反应, 从而对谷氨酸更加敏感; 其慢突触反应则可由活化AMPA或NMDA受体而产生缓慢而持久的EPSP, 从而增加细胞内的钙离子浓度, 导致钙超载造成神经元损坏^[13]。

本实验的Glu与NMDA受体(NMDAR)的免疫组织化学染色结果显示, 模型组Glu、NMDAR和AMPA的表达较假手术组明显升高, 结果提示谷氨酸(Glu)与NMDA受体(NMDAR)的高表达参与了PSD大鼠脑损伤的发病过程, 而治疗组Glu、NMDAR和AMPA的表达与模型组比较均呈明显下降趋势, 电针可抑制PSD大鼠脑Glu、NMDAR和AMPA的表达, 我们由此认为电针对PSD治疗机制可能与电针可抑制PSD大鼠脑Glu、NMDAR和AMPA的表达有关, 通过抑制PSD大鼠脑Glu、NMDAR和AMPA的表达, 减轻脑卒中后的脑损伤, 最终改善PSD大鼠的抑郁状态, 但其具体机制有待进一步研究加以明确。

参考文献:

- [1] 邢志强, 李海红, 方泽漫, 等. 慢性不可预见性应激和氟西汀治疗对雌鼠类抑郁样和焦虑样行为的影响[J]. 汕头大学医学院学报, 2010, 23(3):145-148.
- [2] 王非, 潘微, 李云芳. 针刺配合耳穴电针治疗中风后抑郁疗效观察及其对生活质量的影响[J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(4):1033-1035.
- [3] 周媛, 靳建宏, 周国赢. 电针治疗中风后抑郁145例[J]. 陕西中医学院学报, 2010, 33(4):78-80.
- [4] 韦登明, 贾学敏, 尹向旭, 等. 电针改善血管性痴呆大鼠学习记忆及其与海马神经细胞谷氨酸、NMDAR表达的关系[J]. 中国老年学杂志, 2013, 31(2):3738-3740.

- [5] 林晓春, 李云鹏, 卞艳芳, 等. 大鼠旷场实验指标检测及参考值的探讨[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(3):224-225.
- [6] 李国青, 任长虹, 孟然, 等. 慢性脑缺血致脑损伤的机制及治疗研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14(5):554-556
- [7] Dhawan J, Benveniste H, Nawrocky M, et al. Transient focal ischemia results in persistent and widespread neuroinflammation and loss of glutamate NMDA receptors[J]. *Neuroimage*, 2010, 51(2):461-465
- [8] 张奕翠, 谢娟, 龙威, 等. 血清谷氨酸预测老年进展性缺血性脑梗死的价值[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(6): 727-728.
- [9] 党连生, 徐燕, 王晓霞, 等. 谷氨酸与缺血性脑卒中早期进展关系的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013, 15(1):57-59.
- [10] 陈德仁. 丹栀逍遥散加减治疗脑卒中后抑郁症 28 例观察[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(9):591-592.
- [11] 乔瑞瑞, 燕平, 刘明菲, 等. 电针“百会”“神门”“太冲”穴对慢性应激抑郁模型大鼠血清 ACTH、CORT 的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(2):156-158.
- [12] 李敏, 黎海蒂, 汪涛. 谷氨酸及其 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 在大鼠前额叶执行控制中的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2003, 7(31):4202-4203.
- [13] 李淑兰, 刘凤莲, 王学斌, 等. 谷氨酸及其受体在脑内的存在作用与谷氨酸的神经毒性[J]. 中国组织工程研究, 2004, 8(22):4553-4555.

Effects of electroacupuncture on glutamate (Glu) and N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) in hippocampal of PSD rats

YAN Jia-ning, ZHAO Li-feng, YU Tao, LU Fang-qin, FU Run-xi, WEI Deng-ming*

(Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The current study was aimed to determine the effect of electroacupuncture (EA) on glutamate (Glu) and N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) levels in rats with post-stroke depression (PSD). Wistar rats were randomly divided into control, sham, PSD and EA+PSD groups. PSD rat model was established by repeated ischemia/reperfusion and pretreated with sodium nitroprusside. One 20 min session of EA was daily applied to “Baihui”(GV20), “Dazhui”(DU14) in EA group for 15 days. OPEN-FIELD test was performed to detect the rats’ locomotion. Glu, AMPAR and NMDAR produced in hippocampal tissue were examined with immunohistochemical assay. Compared with PSD group, both target-platform crossing and lifting times were significantly increased in EA group ($P<0.05$). Glu, AMPAR and NMDAR positive cells were remarkably decreased in EA-treated rats ($P<0.01$). It was therefore concluded that EA enabled to decrease the expressions of Glu, AMPAR and NMDAR in PSD rats.

Key words: post-stroked depression (PSD); electroacupuncture (EA); glutamate (Glu); N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR); α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA)

(责任编辑 章践立)