

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2017)03 - 0205 - 04

## 电针联合氟西汀抑制慢性应激抑郁大鼠额叶皮质 nNOS、c-Fos 上调和 SYP 下调

田丽园<sup>1</sup>, 陈 鹏<sup>1</sup>, 高月倩<sup>1</sup>, 郭 飞<sup>1</sup>, 贾一凡<sup>1</sup>, 刘 强<sup>1</sup>, 龚 鑫<sup>2</sup>

(皖南医学院 1. 临床医学院; 2. 人体解剖学教研室, 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 观察电针联合氟西汀对慢性应激抑郁模型大鼠额叶皮质神经型一氧化氮合酶(nNOS)、基因片段(c-Fos)和突触素(SYP)表达的作用。方法: SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、电针组、氟西汀组和电针+氟西汀组。对大鼠进行21 d的应激刺激建立慢性应激抑郁模型。按分组给予电针刺激百会、神庭穴30 min, 氟西汀灌胃, 每天1次, 持续21 d, 旷场实验检测大鼠行为学。免疫组织化学法检测额叶皮质nNOS、c-Fos和SYP的表达。结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠额叶皮质nNOS和c-Fos阳性神经元表达增加( $P < 0.05$ ), SYP阳性神经元表达减少( $P < 0.05$ ), 大鼠行为学指标降低; 与模型组比较, 电针组、氟西汀组和电针+氟西汀组大鼠额叶皮质nNOS和c-Fos阳性神经元表达减少( $P < 0.05$ ), SYP阳性神经元表达增加( $P < 0.05$ ), 大鼠行为学指标提高; 与电针组、氟西汀组比较, 电针+氟西汀组大鼠额叶皮质nNOS和c-Fos阳性神经元表达减少( $P < 0.05$ ), SYP阳性神经元表达增加( $P < 0.05$ ), 大鼠行为学指标提高。结论: 电针联合氟西汀可发挥协同作用, 可能通过抑制慢性应激抑郁对额叶皮质nNOS、c-Fos的上调和SYP的下调, 更好地达到抗抑郁的作用。

**【关键词】**抑郁; 电针; 氟西汀; 一氧化氮合酶; c-Fos; 突触素

**【中图分类号】**R 749.4 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2017.03.001

## Effects of electroacupuncture combined with fluoxetine on nNOS, c-Fos and SYP expression in the frontal cortex of chronic stress depression rats

TIAN Liyuan, CHEN Peng, GAO Yueqian, GUO Fei, JIA Yifan, LIU Qiang, GONG Xin

School of Clinical Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To observe the effects of electroacupuncture combined with fluoxetine on regulating the expressions of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), c-Fos and synaptophysin (SYP) in frontal cortex of depressed rats from chronic stress. **Methods:** SD rats were randomized into normal control group, model group, electroacupuncture group, fluoxetine group and electroacupuncture plus fluoxetine group, and subjected to stress stimulation for 21 days to establish chronic stress depression model. Then the rats were given electroacupuncture stimulation via acupoint at Baihui and Shenting for daily 30 min plus fluoxetine once per day for consecutive 21 days by groups. Open field test was performed to observe the behavior of the rats, and immunohistochemistry was used to detect nNOS, c-Fos and SYP expression in the frontal cortex of the experimental animals. **Results:** Compared with the normal control group, expression of nNOS and c-Fos-positive neurons was increased in the frontal cortex of rats in model group ( $P < 0.05$ ), yet the expression of SYP-positive neurons was decreased ( $P < 0.05$ ) and scoring of behavior index was also decreased. Rats in electroacupuncture group, fluoxetine group and electroacupuncture plus fluoxetine group had decreased expression of nNOS and c-Fos-positive neurons and increased SYP-positive neurons in their frontal cortex, and had higher scores in behavioral index than those in the model group ( $P < 0.05$ ). By comparison with the electroacupuncture group and fluoxetine group, rats in the electroacupuncture plus fluoxetine group had decreased expression of nNOS and c-Fos-positive neurons and increased SYP-positive neurons in the frontal cortex, and improved behavioral index measurement ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Electroacupuncture plus fluoxetine can produce synergistic effects on the neurons in the frontal cortex of rats, and lead to better antidepressant effect via inhibiting up-regulation of nNOS and c-Fos as well as down-regulation of SYP down-regulation.

**【Key words】** depression; electroacupuncture; fluoxetine; nNOS; c-Fos; synaptophysin

基金项目: 安徽省大学生创新创业训练计划项目(AH201510368067); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201410368017)

收稿日期: 2016-10-04

作者简介: 田丽园(1994-), 女, 2013级临床医学本科生, (电话)18325387651, (电子信箱)501732272@qq.com;

陈 鹏(1995-), 男, 2013级临床医学本科生, (电话)18375348321, (电子信箱)457795298@qq.com, 共同第一作者;

龚 鑫, 男, 副教授, (电子信箱)416074616@qq.com, 通信作者。

近年来抑郁症的发病率不断上升,严重影响着人们的身心健康。研究表明 nNOS、c-Fos 和 SYP 在抑郁症的形成和发展中起重要作用<sup>[1-3]</sup>。关于抑郁症的治疗,近年来发展了以百优解(盐酸氟西汀)为代表的抗抑郁药。同时,电针具有改善认知,促进神经生长的功能<sup>[4]</sup>,针刺百会、神庭等穴位,可以改善抑郁状态<sup>[5]</sup>。本实验采用电针联合氟西汀对慢性应激抑郁模型大鼠进行治疗,旨在探讨电针联合氟西汀对慢性应激抑郁模型大鼠额叶皮质 nNOS、c-Fos 和 SYP 表达的影响。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 SD 雄性大鼠 60 只,体质量(200 ± 20)g。随机分为正常对照组、模型组、电针组、氟西汀组和电针 + 氟西汀组,每组 12 只。

1.2 主要试剂及仪器 盐酸氟西汀软胶囊(礼来苏州制药有限公司),c-Fos、nNOS 和 SYP 抗体(北京博奥森生物技术有限公司),SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),DAB 显色试剂盒(天根生化科技有限公司),华佗牌电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司)。

1.3 大鼠行为学观察 旷场试验:敞箱(长 100 cm,宽 100 cm,高 50 cm),内侧周壁及底面均为黑色,底面用白线划分为面积相等的 25 块。将大鼠置于中心方格内,观察大鼠 5 min 内穿越格数(四爪均进入的方格方可记数)记为水平运动次数,后肢直立次数(两前爪腾空或攀附箱壁)记为垂直运动次数。运用旷场试验测定造模前后以及治疗后的水平运动和垂直运动次数。

1.4 造模方法 模型组、氟西汀组、电针组和电针 + 氟西汀组均进行慢性应激刺激结合孤养(每笼饲养 1 只)。连续 21 d 各种不同的应激,包括冰水游泳(4℃,5 min)、热应激(45℃,5 min)、禁水(24 h)、夹尾(1 min)、电击足底(电压 50 mV,每隔 15 s 刺激 1 次,每次持续 10 s,共 15 次)、摇晃(1 次/秒,5 min)、禁食(24 h)和昼夜颠倒等刺激,平均每种刺激各 3 次。依据文献[6],慢性应激结束后对各组大鼠进行行为学测定造模是否成功,选取造模成功大鼠进行实验。

### 1.5 治疗方法

1.5.1 正常对照组 不做处理。

1.5.2 模型组 不做处理。

1.5.3 电针组 根据《大鼠穴位图谱的研制》,取百会、神庭穴,每天电针 1 次,频率为 2 Hz,每次 30 min,共电针 21 d。

1.5.4 氟西汀组 按照 1.8 mg/kg 给予氟西汀,将药物溶解于生理盐水中灌胃,每天 1 次,连续 21 d。

1.5.5 电针 + 氟西汀组 电针方法同电针组,灌胃方法及剂量同氟西汀组,连续 21 d。

1.6 标本取材 治疗结束后,各组大鼠均用戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后开胸,经左心室-升主动脉灌注 150 mL 生理盐水,再灌注 300 mL 多聚甲醛。取脑放置甲醛溶液中固定 4 ~ 6 h,取材,脱水,石蜡包埋。

1.7 免疫组织化学方法观察检测 组织连续切片,片厚 5 μm,切片分 3 套。切片按 SABC 免疫组织化学试剂盒说明书步骤进行,封片后在显微镜下进行观察,选取相同部位利用图像分析系统在 400 倍视野下进行计数。

1.8 统计分析 用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,数值变量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组之间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 SNK 法(*q* 检验)。以  $\alpha = 0.05$  作为检验水准, $P < 0.05$  作为判定有统计学意义的依据。

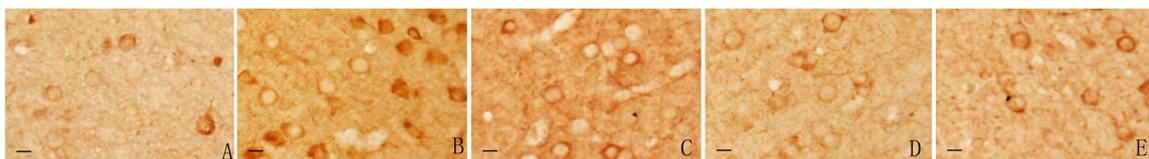
### 2 结果

与正常对照组比较,模型组大鼠行为学指标降低( $P < 0.05$ ),大鼠额叶皮质 nNOS、c-Fos 阳性神经元数量增加( $P < 0.05$ ),SYP 阳性神经元数量减少( $P < 0.05$ );与模型组比较,电针组、氟西汀组和电针 + 氟西汀组大鼠行为学指标提高( $P < 0.05$ ),大鼠额叶皮质 nNOS、c-Fos 阳性神经元数量减少( $P < 0.05$ ),SYP 阳性神经元数量增加( $P < 0.05$ );与电针组、氟西汀组比较,电针 + 氟西汀组大鼠行为学指标提高( $P < 0.05$ ),大鼠额叶皮质 nNOS、c-Fos 阳性神经元数量减少( $P < 0.05$ ),SYP 阳性神经元数量增加( $P < 0.05$ )。见表 1、2,图 1 ~ 3。



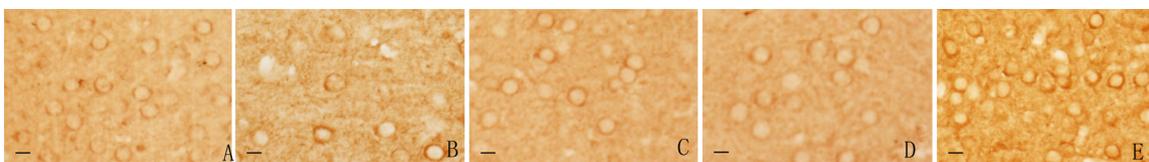
A: 正常对照组; B: 模型组; C: 氟西汀组; D: 电针组; E: 电针 + 氟西汀组; 标尺 = 20 μm。

图 1 各组大鼠额叶皮质 c-Fos 的表达(SABC 法 × 400)



A:正常对照组;B:模型组;C:氟西汀组;D:电针组;E:电针+氟西汀组;标尺=20 μm。

图2 各组大鼠额叶皮质 nNOS 的表达(SABC 法 ×400)



A:正常对照组;B:模型组;C:氟西汀组;D:电针组;E:电针+氟西汀组;标尺=20 μm。

图3 各组大鼠额叶皮质 SYP 的表达(SABC 法 ×400)

表1 各组大鼠旷场试验比较( $\bar{x} \pm s$  n=12)

组别	水平运动	垂直运动
正常对照组	68.92 ± 3.34	14.17 ± 2.37
模型组	24.17 ± 3.81*	4.58 ± 1.31
电针组	43.42 ± 2.94* #Δ	9.75 ± 1.60* #Δ
氟西汀组	45.50 ± 2.75* #Δ	9.83 ± 1.95* #Δ
电针+氟西汀组	55.42 ± 5.78* #	13.25 ± 1.42* #
F	216.658	54.302
P	0.000	0.000

注:与正常对照组比较,\* P<0.05;与模型组比较,#P<0.05;与电针+氟西汀组比较,ΔP<0.05。

表2 各组大鼠额叶皮质 nNOS、c-Fos 和 SYP 阳性神经元细胞数( $\bar{x} \pm s$  n=12) 个/高倍视野

组别	nNOS	c-Fos	SYP
正常对照组	7.17 ± 1.64	10.08 ± 1.78	22.17 ± 2.69
模型组	15.83 ± 2.37*	23.75 ± 3.33*	8.83 ± 1.75*
电针组	11.17 ± 2.25* #Δ	14.17 ± 2.04* #Δ	14.75 ± 2.14* #Δ
氟西汀组	11.25 ± 2.67* #Δ	14.00 ± 1.71* #Δ	14.92 ± 2.43* #Δ
电针+氟西汀组	8.50 ± 1.57* #	10.00 ± 1.76* #	20.08 ± 1.78* #
F	28.886	77.107	68.079
P	0.000	0.000	0.000

注:与正常对照组比较,\* P<0.05;与模型组比较,#P<0.05;与电针+氟西汀组比较,ΔP<0.05。

### 3 讨论

额叶皮质是人类情感和认知的解剖学基础,抑郁症等情感障碍性疾病存在额叶皮质代谢异常<sup>[7]</sup>。nNOS 催化产生的神经递质一氧化氮(NO)具有神经毒性作用,对神经元再生过程起到抑制作用<sup>[8]</sup>,本实验发现模型组大鼠额叶皮质 nNOS 表达呈上调

现象,提示过量的 nNOS 可能通过抑制神经元再生,从而在抑郁症的发生发展中发挥重要作用。c-Fos 在正常情况下呈低水平表达,当机体受到心理或病理刺激时其表达显著增强<sup>[9-10]</sup>,本实验慢性应激后大鼠额叶皮质 Fos 蛋白大量表达,进一步表明 c-Fos 可能参与了慢性应激状态下抑郁的产生。SYP 是一种特异性分布于突触前囊泡膜上的钙结合糖蛋白,与突触结构和功能密切相关。SYP 表达受中枢神经系统结构和功能的变化而变化,当机体处于抑郁状态,神经元突触数量减少,其可塑性减小<sup>[3]</sup>。本实验结果显示模型组大鼠额叶皮质 SYP 的表达较正常对照组明显减少,电针及药物治疗后额叶皮质 SYP 表达增加,提示可能通过上调大鼠额叶 SYP 的表达发挥抗抑郁作用。

氟西汀为抗抑郁常用药,临床上已证实其疗效。针刺可以改善大脑应激所致的病理损伤,有助于促进脑高级功能的恢复<sup>[11]</sup>。本实验采用百会、神庭作为治疗穴位,这两个穴位均为督脉经穴,具有调节情绪、安神定志等作用,是调节大脑功能的要穴<sup>[12]</sup>。本实验结果显示:与电针组、氟西汀组比较,电针+氟西汀组大鼠行为学指标提高,额叶皮质 nNOS、c-Fos 和 SYP 表达更接近于正常对照组。提示电针联合氟西汀在抑郁模型大鼠治疗中具有协同作用,推测可能是通过抑制慢性应激抑郁模型大鼠额叶皮质 nNOS、c-Fos 表达的上调和 SYP 表达的下调,从而达到抗抑郁的作用。但额叶皮质中这三种神经元之间是否存在相互联系尚不清楚,有待进一步研究。

针药结合治疗疾病具有多层次、多途径、多因素综合作用的优势。通过本实验提示我们可以对其机制进行更深入研究,并通过临床实验进行实践应用。

(下转第 214 页)

RhoA/Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase-dependent mitogen-activated protein kinase pathway activation [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 2011, 339(3):746-756.

[6] CRESPO J, JAVIER MD, RIVERO *et al.* Plasma Leptin and TNF- $\alpha$  Levels in Chronic Hepatitis C Patients and Their Relationship to Hepatic Fibrosis [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2002, 47:1604-1610.

[7] HILZENDEGER AM, MORGAN DA, BROOKS L *et al.* A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012, 303(2):197-206.

[8] KIM S, WHELAN J, CLAYCOMBE K *et al.* Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism [J]. *J Nutr* 2002, 132(6):1135-1140.

[9] 杨利才, 张道友, 朱新俭 等. 缬沙坦及苯那普利对慢性肾功能衰竭大鼠左室肥厚的影响 [J]. *中国病理生理杂志* 2007, 23(7):1426-1428.

[10] RAIJ L, AZAR S, KEANE W. Mesangial immune injury, hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats [J]. *Kidney Int* 1984, 26:137-143.

[11] BUYAN N, BIDECI A, OZKAYA O *et al.* Leptin and resistin levels and their relationships with glucose metabolism in children with chronic renal insufficiency and undergoing dialysis [J]. *Nephrology (Carlton)* 2006, 11(3):192-196.

[12] CUMIN F, BAUM HP, LEVENS N. Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney [J]. *J Endocrinol*, 1997, 155:577-585.

[13] SHIN HJ, OH J, KANG SM *et al.* Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 329:18-24.

[14] RAJAPUROHITAM V, GAN XT, KIRSCHENBAUM LA. The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes [J]. *Circ Res* 2003, 93:277-279.

[15] HAN DC, JISONO M, CHEN S *et al.* Leptin stimulates type I collagen production in db/db mesangial cells: glucose uptake and TGF- $\beta$  type II receptor expression [J]. *Kidney Int* 2001, 59:1315-1323.

[16] KIM S, SOLTANI-BEJNOOD M, QUIGNARD-BOULANGE A *et al.* The adipose Renin-Angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal Renin-Angiotensin system [J]. *J Biomed Biotechnol* 2006, 5:27012.

[17] KIM S, WHELAN J, CLAYCOMBE K *et al.* Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism [J]. *J Nutr* 2002, 132(6):1135-1140.

[18] SANTOS EL, DE PICOLI SOUZA K, GUIMARÃES PB. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats [J]. *Immunopharmacol*, 2008, 8(2):247-253.

(上接第 207 页)

【参考文献】

[1] 田旭升, 胡妮娜, 宋琳 等. 酸枣仁汤对抑郁症模型大鼠海马 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 c-fos 表达的影响实验研究 [J]. *中医药学报*, 2013, 41(2):44-46.

[2] 李庆娇, 安书成. 海马 NMDA 受体和 NOS 在慢性应激性抑郁发生中的作用及相互关系 [J]. *动物学研究* 2009, 30(6):653-661.

[3] 华冰, 程瑞凤, 景晶 等. 甘草总黄酮抗大鼠应激抑郁作用及对突触可塑性关键蛋白 SYP/PSD-95 的调节作用 [J]. *中国新药杂志* 2014, 23(10):1180-1186.

[4] LI X, GUO F, ZHANG Q *et al.* Electroacupuncture decrease cognitive impairment and promotes neurogenesis in the APP/PS1 transgenic mice [J]. *BMC Complement Altern Med* 2014, 14:37-47.

[5] 刘述霞, 王秀花, 刘秀丽 等. 电针治疗抑郁症 118 例 [J]. *中医研究* 2010, 23(9):76-77.

[6] 李昱颖, 莫雨平, 邓晓丰 等. 电针预处理对慢性应激抑郁模型大鼠海马内 5-HT 及 5-HT 转运体表达的影响 [J]. *针灸临床杂志* 2014, 30(7):57-60.

[7] 莫雨平, 宋洪涛, 姚海江 等. 不同电针对慢性应激抑郁模型大鼠不同脑区神经肽 Y mRNA 表达的影响 [J]. *中国中医药科技* 2014, 21(6):604-607.

[8] 高莉, 关宿东, 祝延. 浸水急性冷应激对大鼠脑皮质神经元一氧化氮释放量的影响 [J]. *蚌埠医学院学报* 2006, 31(1):7-8.

[9] 李凯, 张平, 周杰. 益气活血补肾方对大鼠脑缺血损伤后 c-Fos、c-Jun 表达影响的实验研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2015, 10(1):27-29.

[10] SNG JG, TANIURA H, YONEDA Y. A tale of early response genes [J]. *Biol Pharm Bull* 2004, 27(5):606-612.

[11] 徐玲玲, 刘儒鹏, 高昕妍 等. 针灸治疗抑郁症的神经生物化学机制研究进展 [J]. *针刺研究* 2011, 36(9):384-385.

[12] LEUNG MCP, YIP KK, HO YS *et al.* Mechanisms underlying the effect of acupuncture on cognitive improvement: a systematic review of animal studies [J]. *Journal of neuroimmune Pharmacology*, 2014, 9(4):492-507.