

·基础研究·

针刺对抑郁症睡眠障碍大鼠行为学 and 海马 5-羟色胺受体表达水平的影响

甄君^{1a}, 范建中², 姚晓黎³, 舒晓春^{1b}, 杨艳杰^{1a}, 孔梅^{1b}

摘要 目的 观察针刺治疗抑郁症睡眠障碍(SDD)的分子机制。方法 将Open-Field法评分相近的36只Wistar大鼠随机分为3组:正常组、模型组和针刺组,每组12只。除正常组外,其余各组均接受18 d不同的应激。应激18 d后,再进行72 h快眼动睡眠剥夺造模。针刺组每天在应激前1 h进行针刺,连续21 d。21 d后,计算行为得分,取大鼠海马检测5-HT_{1A}受体、5-HT_{2A}受体mRNA水平。结果 模型组大鼠自主活动较正常组明显减少($P<0.01$);针刺组大鼠的自主活动较模型组明显增加($P<0.01$)。与正常组相比,模型组大鼠海马5-HT_{1A}受体mRNA表达明显下降,5-HT_{2A}受体mRNA表达明显上升(均 $P<0.01$);与模型组相比,针刺组大鼠海马5-HT_{1A}受体mRNA表达上升、5-HT_{2A}受体mRNA表达下降($P<0.05$)。结论 针刺可能通过调整5-HT受体间不平衡而发挥治疗SDD效应。

关键词 抑郁症睡眠障碍; 5-羟色胺; 受体; 针刺; 大鼠

Effects of Acupuncture on Behaviors and Expression of 5-Hydroxytryptamine Receptor in Hippocampus in Sleep Deprivation Depression Rats ZHEN Jun, FAN Jian-zhong, YAO Xiao-li, et al. Department of Rehabilitation Medicine, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai 519000, Guangdong, China

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of acupuncture on sleep deprivation depression (SDD). **Methods** 36 Wistar rats with similar Open-Field score were divided into normal group, model group, and acupuncture group, 12 rats in each group. Except normal group, the other groups received different stress for 18 d, and then were deprived rapid eye sleep for 72 h. Acupuncture group received acupuncture 1 h/d before the stress for 21 d. Their behaviors were observed and the levels of 5-hydroxytryptamine 1A and 2A receptors (5-HT_{1A}R and 5-HT_{2A}R) mRNA in hippocampus were determined. **Results** There was significant decrease in the autonomic-behavior in the model group compared with the normal group ($P<0.01$). The autonomic-behavior in acupuncture group increased compared with the model group ($P<0.01$). The expression of 5-HT_{1A}R mRNA in hippocampus of model group decreased and the 5-HT_{2A}R mRNA increased compared with the normal group ($P<0.01$). The expression of 5-HT_{1A}R mRNA increased and the 5-HT_{2A}R mRNA decreased in the hippocampus of acupuncture group compared with model group ($P<0.05$). **Conclusion** Acupuncture is effective on SDD by re-balance the function of 5-HT receptors.

Key words: sleep deprivation depression; 5-hydroxytryptamine; receptors; acupuncture; rats

[中图分类号] R749.7 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2011)07-0625-03

[本文著录格式] 甄君, 范建中, 姚晓黎, 等. 针刺对抑郁症睡眠障碍大鼠行为学 and 海马 5-羟色胺受体表达水平的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(7): 625—627.

睡眠障碍是抑郁症状群的重要组成部分, 是抑郁症最早和最常见的症状之一, 以入睡困难、睡眠不深及早醒为特征。睡眠障碍可加重抑郁症的病情, 延缓抑郁症的康复进程。严重的抑郁症睡眠障碍和自杀有关, 而且对多种抗抑郁药物治疗反应差。在抑郁症的治疗中, 不仅要关注抑郁症状的缓解, 也应重视睡眠障碍的改善。抑郁症睡眠障碍(sleep deprivation depression, SDD)的研究已成为人们关注的焦点。以往研究提示, 5-羟色胺受体(5-HTR)参与人类情感、认知

及感觉等行为, 尤其是海马5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R表达变化与抑郁睡眠障碍密切相关^[1-2]。本研究观察针刺对SDD大鼠海马5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R的影响, 以期能为针刺治疗SDD提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 健康清洁级Wistar大鼠36只, 体重200~250 g, 雌雄各半(广东省动物实验中心提供, 实验动物批号: SCXK(粤)2008-0002)。

首先用Open-Field法^[3]进行行为学评分, 选择得

作者单位: 1. 中山大学附属第五医院, a. 康复医学科; b. 检验科, 广东珠海市 519000; 2. 南方医科大学南方医院康复医学科, 广东广州市 510515; 3. 中山大学附属第一医院神经内科, 广东广州市 510000。作者简介: 甄君(1971-), 女, 河北定州市人, 硕士, 主治医师、讲师, 主要从事中西医结合治疗脑病的基础与临床研究。通讯作者: 孔梅。

分相近的36只大鼠,适应性喂养1周后,随机分为正常组、模型组与针刺组,每组12只。正常组每笼饲养6只,其余各组动物每笼1只孤养。

1.2 主要实验仪器与试剂 BDC-280e超低温冰箱:长沙伊来克斯;5417R型高速冷冻离心机:德国EPENDORF公司;Real-time PCR检测仪:7300Sequence Detection System ABI-7500,美国ABI公司;大鼠5-HT_{1A}、5-HT_{2A}、β-actin基因引物:上海生工生物技术有限公司合成;SYBRGreen PCR试剂盒:广州达晖生物公司。

1.3 抑郁模型及睡眠剥夺干预 参考文献^[4]制作抑郁模型大鼠。除正常组外,其余各组每日随机安排1种应激,包括:行为限制2h、电击足底(36V交流电,每隔1min刺激1次,每次刺激10s,共30次)、冰水游泳(4℃,5min)、热应激(45℃,5min)、摇晃(1/s,共15min)、鼠笼倾斜45°24h、夹尾1min、禁水24h、禁食48h、明暗颠倒、潮湿垫料10h、空瓶放置1h。连续18d。从第19天开始,连续72h快速动眼相睡眠剥夺,采用小平台水环境法^[5]。剥夺箱为30×30×40cm的玻璃水箱,正中立一个直径6cm圆形平台,箱中注满水,水面距平台面约1cm。大鼠在平台上可自由进食进水;如果睡眠,会因为肌张力松弛而

落入水中。造模期间持续灯光照射,室内温度控制在18.0℃~22.0℃,水温保持在20℃左右。

1.4 干预方法 正常组:常规饲养,不接受任何刺激与处置。模型组:不予任何治疗。针刺组:根据《实验针灸学》^[6]大鼠穴位定位方法取百会、神庭和内关。穴位常规消毒,采用苏州医疗用品厂生产的华佗牌0.25×25mm针灸针进行针刺。百会、神庭向尾部斜刺,进针深度约为2mm,内关直刺1mm,每穴均匀捻转刺激30s,留针15min。每天在安排应激前1h开始进行针刺,每日1次,连续21d。

1.5 行为学测定 使用Open-Field法评分,以大鼠在3min内的水平运动得分和垂直运动得分之和为大鼠总的自主活动量,于分组前和造模21d后进行。

1.6 海马5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R mRNA检测 造模21d,于进行行为学评分后处死大鼠,取大鼠海马置液氮中待检。5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R引物序列、扩增长度及PCR反应条件见表1,以β-actin为内参。Trizol试剂一步法抽提总RNA后,取RNA产物1.0μg,用M-MLV逆转录酶合成cDNA,然后用PCR扩增仪进行PCR反应。用2%琼脂糖电泳,电泳结束后置凝胶成像系统中进行分析,计算与内参β-actin的比值用以校正。

表1 5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R、β-actin引物序列、扩增长度

基因	引物序列	产物长度(bp)	退火温度(℃)
β-actin	上游引物:5'-TGTGATGGTGGGTATGGGTCAGAAG-3'	207	55
	下游引物:3'-TCACGGTTGGCCTTAGGGTTCAGAG-5'		
5-HT _{1A} R	上游引物:5'-GCAAACGAATCAGCAGTAGCAT-3'	475	50
	下游引物:3'-GACTGCATCAGAGTGTCGTTTGA-5'		
5-HT _{2A} R	上游引物:5'-TGACCAAATCAAGGAGGCAAT-3'	412	55
	下游引物:3'-GGGTCTTCGGGCGATTCT-5'		

1.7 统计学方法 采用SPSS 11.5统计软件,所有数据用($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布资料采用单因素方差分析,非正态分布资料采用Mann-Whitney U秩和检验。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 自主活动 应激前各组大鼠的自主活动无显著性差异($P>0.05$)。接受应激21d后,模型组自主活动较正常组明显减少($P<0.01$)。与模型组比较,针刺组在治疗后大鼠自主活动明显增加($P<0.01$)。见表2。

2.2 海马5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R mRNA表达 与正常组比较,模型组大鼠海马5-HT_{1A}R mRNA表达水平明显下降、5-HT_{2A}R mRNA表达水平明显上升(均 $P<0.01$);与模型组比较,针刺组大鼠海马5-HT_{1A}R mRNA表达

水平上调,5-HT_{2A}R mRNA表达水平下降(均 $P<0.05$)。见表3。

3 讨论

睡眠具有维持个体生存、促进生长发育、调整和恢复体力、促进学习、形成记忆的功能。睡眠剥夺可引起情绪、学习记忆、免疫功能等一系列变化^[7],对人们的身心健康、日常生活与工作有很大影响。睡眠障碍不但是抑郁症的症状之一,同时也是导致抑郁症的主要因素之一;睡眠障碍的改善对抑郁症的缓解与康复有促进作用。抑郁症睡眠障碍的发病机制至今未彻底阐明。一般认为,抑郁症除了与心理、社会因素和遗传因素有关外,主要还与中枢去甲肾上腺素(NE)、5-HT等单胺类神经递质减少、受体敏感性改变

以及递质间失衡等因素有关。有研究提示, 抑郁症的睡眠障碍与抑郁症发病机制有关^[8]。作为脑边缘系统重要组成部分的海马与抑郁症关系十分密切^[9]。海马区域 5-HT 含量或功能异常可能与精神疾病、睡眠障碍等多种疾病有关。

表2 各组大鼠自主活动量的变化

组别	n	造模前	造模 21 d
正常组	12	96.35±9.21	98.78±8.78
模型组	12	98.59±8.69	37.45±9.14 ^a
针刺组	12	96.68±9.23	95.93±8.91 ^b

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

表3 各组大鼠海马 5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}R mRNA 的表达

组别	n	5-HT _{1A} R	5-HT _{2A} R
正常组	12	2.29±0.19	1.55±0.12
模型组	12	0.67±0.11a	3.50±0.09 ^a
针刺组	12	2.03±0.14b	1.75±0.13 ^b

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

分子生物学与药理学的研究结果显示, 目前人类 5-HTR 至少存在 7 种亚型, 其中 5-HT_{1R} 和 5-HT_{2R} 家族与抑郁症关系密切。5-HTR 中含量最丰富的是 5-HT_{1A}R, 按其分布位置可以分为突触前膜受体和突触后膜受体两类, 两者共同作用调节 5-HT 的释放^[10]。突触后膜受体广泛分布于 5-HT 能神经传入的前脑区, 尤其是皮质、海马、中隔、杏仁体及下丘脑, 定位于神经元的轴突上, 被激活后引起突触后膜超极化, 抑制神经元的兴奋性^[11]。研究表明, 5-HT_{2A}R 及 5-HT_{1A}R 的表达与睡眠障碍相关^[12], 拮抗 5-HT_{2A}R 上调具有明确改善睡眠障碍的效应。

针刺是我国传统中医疗法, 在治疗抑郁方面与药物比较具有起效快、整体调节、多靶点作用、安全性高、无副作用等优点。实验研究证实, 针刺治疗可以改善抑郁症模型大鼠的行为学异常, 起效快, 且能够通过改善前额皮质区单胺类神经递质含量而发挥抗抑郁作用^[13]。

古代文献中有很多关于将百会、神庭、内关穴用于调神和治疗情志病的记载。百会、神庭为督脉经穴, 督脉上行入脑, 且百会位居巅顶, 为百脉聚会之处, 可清利头目、疏通脑络, 健脑宁神, 此 2 穴合用, 具有调节脑神、安神镇静的作用。内关为手厥阴心包经之络穴, 通阴维脉, 别走手少阳三焦经, 三焦主气, 有宽胸理气、疏通气血、养心安神之效。

本研究综合孤养与不可预见的慢性应激刺激诱导建立抑郁大鼠模型, 同时应用小平台水环境法对抑郁模型大鼠进行 72 h 的连续快速动眼相睡眠剥夺。结果显示, 针刺对 SDD 大鼠具有良性的整体调节作用, 可能通过上调海马 5-HT_{1A}R、下调 5-HT_{2A}R 表达来调整 5-HT 受体间不平衡, 从而发挥治疗效应。

由于针刺治疗具有整体调节、多靶点作用等特点, 关于针刺治疗 SDD 的确切机制还有待于今后进行更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Wei H, Ma A, Wang YX, et al. Role of spinal 5-HT receptors in cutaneous hypersensitivity induced by REM sleep deprivation[J]. *Pharmacol Res*, 2008, 57(6):469-475.
- [2] Landolt HP, Wehrle R. Antagonism of serotonergic 5-HT_{2A/2C} receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood? [J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29(9):1795-1809.
- [3] de Oliveira RA, Cunha GM, Borges KD, et al. The effect of venlafaxine on behaviour, body weight and striatal monoamine levels on sleep-deprived female rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004, 79(3):499-506.
- [4] de Vasconcelos CA, De Oliveira JA, De Oliveira Costat LA, et al. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpin[J]. *Nutr Neurosci*, 2004, 7(3):163-170.
- [5] Lopez-Rodriguez F, Kim J, Poland RE. Total sleep deprivation decreases immobility in the forced-swim test[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29(6):1105-1111.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003:360.
- [7] Bueno OF, Lobo LL, Olive drab MG, et al. Dissociated paradoxical sleep deprivation effect soninhibiting avoidance and conditioned fear[J]. *Physiol Behav*, 1994, 56(4):775-779.
- [8] 余海英, 崔庶, 王宏, 等. 抑郁症患者睡眠行为及睡眠生理障碍的研究[J]. *中华精神科杂志*, 2000, 33(1):23-25.
- [9] Shirayama Y, Chen A. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(8):3251-3261.
- [10] Alexandre C, Popa D, Fabre V, et al. Early life blockade of 5-hydroxytryptamine 1A receptors normalizes sleep and depression-like behavior in adult knock-out mice lacking the serotonin transporter[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(20):5554-5564.
- [11] Novati A, Roman V, Cetin T, et al. Chronically restricted sleep leads to depression-like changes in neurotransmitter receptor sensitivity and neuroendocrine stress reactivity in rats[J]. *Sleep*, 2008, 31(11):1579-1585.
- [12] Pozzi L, Greco B, Sacchetti G, et al. Blockade of serotonin 2A receptors prevents PCP-induced attentional performance deficit and CREB phosphorylation in the dorsal striatum of DBA/2 mice[J]. *Psychopharmacology*, 2010, 208(3):387-399.
- [13] 张建斌, 王玲玲, 吕梅, 等. 针刺对抑郁症模型大鼠前额皮质单胺类神经递质的影响[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(15):129-131.

(收稿日期: 2011-03-18)