

针刺对抑郁模型大鼠行为学及海马氨基酸类神经递质的影响

刘海静 何新芳 陈兴华

摘要 **目的** 通过观察针刺后抑郁模型大鼠行为学及海马氨基酸类神经递质含量的变化,探讨针刺的抗抑郁机制。**方法** 30 只成年雌雄各半的 SD 大鼠随机分为健康对照组、抑郁模型组和针刺组,每组 10 只。后两组采用孤养和长期不可预见的中等强度应激制作大鼠抑郁模型,针刺组在模型基础上对大鼠进行相应的针刺治疗,以开场试验检测大鼠自主活动,用高效液相色谱-荧光检测法测定大鼠海马氨基酸类神经递质含量。**结果** 与健康对照组相比,模型组大鼠自主活动显著减少,海马谷氨酸(Glu)含量显著升高($P < 0.01$), γ -氨基丁酸(GABA)含量显著降低($P < 0.01$)。而针刺组大鼠所测各项指标与健康对照组相比无显著性差异($P > 0.05$)。**结论** 针刺可逆转抑郁模型大鼠的抑郁样行为,其抗抑郁作用与其对海马内氨基酸类递质的调整相关。

关键词 针刺 抑郁症/针灸疗法 海马氨基酸/代谢 神经递质类/代谢

Effects of Acupuncture on Praxiology and Hippocampal Amino – neurotransmitter in Rats Treated with Chronic Stress. Liu Haijing, He Xinfang, Chen Xinghua. Yunnan University of TCM, Yunnan 650200, China

Abstract Objective To study the anti – depressive mechanisms of acupuncture by investigating the effects of acupuncture on depressive behaviors and amino – neurotransmitter in hippocampus in rats treated with chronic mild unpredictable stresses. **Methods** Thirty adult SD rats were randomly divided into a normal group, a depressive model group and an acupuncture group, with 10 rats in each group. Separated feeding, long – term unpredictable and middle stimulation stress were used for development of depression rat model. At the same time, the third group was treated by acupuncture. Autonomic behavior was measured with Open Field test and concentration of amino – neurotransmitter in hippocampus was measured by high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. **Results** Compared with the normal group, autonomic activity of the rats and the concentration of GABA were significantly reduced in the model group, while the concentration of Glu was significantly increased($P < 0.01$), but the change of acupuncture group was not significant($P > 0.05$). **Conclusion** Acupuncture could reverse the depressive behaviors of rats caused by middle stimulation stress, and its anti – depressive mechanisms is related to the function of regulating the concentration of amino – neurotransmitter in hippocampus.

Key words Acupuncture; Depression/amther; Amino – neurotransmitter/metab; Neurotransmitters/metab

近 10 多年来,针灸在治疗抑郁症方面取得了很大进展,但其机制研究多集中在生物胺或生物胺神经通路功能及神经内分泌等方面(如 HPA 轴等)。近年来,研究者们开始注意到氨基酸类神经递质在情感障碍疾病的病理机制中的作用。研究发现,兴奋性/抑制性氨基酸失衡可导致抑郁行为的发生^[1,2]。本实验通过观察针刺对抑郁模型大鼠自主活动及海马氨基酸类神经递质含量的变化,从氨基酸类神经递质的角度探讨针刺抗抑郁作用的可能机制,现将研究结果报道如下。

材料与方法

1. 实验动物:成年 SD 大鼠 30 只,体重 220 ~ 290g,雌雄各

半(由广州中医药大学动物中心提供,SPF 级)。

2. 主要实验仪器及试剂:美国惠谱 HP1050 型高效液相色谱仪,由四元梯度泵、自动进样器、柱温箱和 HP1046A 荧光检测器组成;日立 GL20A 全自动 20000 rpm 高速冷冻离心机;温水浴;手动匀浆器。谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(ASP)、 γ -氨基丁酸(GABA)和甘氨酸(Gly)标准品,批号分别为 34H0863、64H0332、107H05602、84H0541,均为 SIGMA 公司产品;衍生试剂 OPA(phthaldialdehyde)和 3 – Mercaptopropionic acid,批号分别为 014K0687 和 08529DC – 016, SIGMA 公司产品;乙腈、甲醇和乙醇色谱纯为 B&J 公司产品。Hypersil ODS 色谱柱,批号:PN 799260D – 564,为 Agilent 公司产品。

3. 抑郁模型制备:按照文献[3]方法进行抑郁模型大鼠的复制。模型组和睡眠剥夺组每笼饲养 1 只,接受 21 天各种不同的应激刺激,包括断水 24h;断食 24h;夹尾 1min;10℃ 冰水游泳 5min;摇晃每秒 1 次,5min;昼夜颠倒;电击足底,电压 50mV,每 5s 刺激 1 次,间歇 5s,共刺激 10 次。每天随机选择

基金项目:广州中医药大学健桥基金项目(K6R05006)

作者单位:650200 昆明,云南中医学院临床医学院(刘海静);
510405 广州中医药大学(何新芳、陈兴华)

一种刺激,每种刺激平均使用3次。

4. 动物的分组及处理方法:利用随机数字表法将30只大鼠随机分为健康对照组、抑郁模型组及针刺组,每组10只。抑郁模型组和针刺组均孤养并给予连续21天不可预见性刺激,针刺组同时接受针刺治疗,参照《实验针灸学》^[4](全国协编教材)大鼠穴位定位,取“百会”、“内关”、“三阴交”穴,以30号、1寸毫针进行针刺,“百会”平刺2~5mm,“内关”、“三阴交”直刺1~3mm。每次留针30min,每日1次,共21天。

5. 指标检测:(1)Open-Field法(OFT)测定大鼠自主行为^[5]:以动物穿越敞箱底面块数为水平活动(crossing)得分,以直立次数为垂直活动(rearing)得分。每次测定时间为3min。实验大鼠随机分组后进行首次OFT实验,实验结束后对3组大鼠进行第2次OFT实验。(2)大鼠海马氨基酸类神经递质含量的测定:取材及处理:各组大鼠在第2次OFT实验后即断头取海马,方法如下:以10%水合氯醛(0.3ml/100g体重)大鼠腹腔注射麻醉,暴露心脏。先以生理盐水100ml经主动脉搏冲洗,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)200ml,再持续滴注40min,断头取脑,迅速分离出左侧海马,称重,-80℃冰箱保存。待侧海马组织置匀浆器中,加适量90%乙醇冷冻环境下进行匀浆3min,离心取上清液,将沉淀物重复以上方法匀浆2次,合并上清液。将上清液在80℃水浴中蒸干,用0.1mol/L HCL定容至5ml。1000r/min离心10min,上清液经0.45μm滤膜过滤,待测氨基酸类神经递质含量。

氨基酸类神经递质含量测定:采用高效液相色谱-荧光检测法检测,①色谱条件:Hypersil ODS色谱柱柱,4.0×125mm,粒径5μm;柱温40℃。检测波长:激发波长340nm,发射波长450nm;②流动相包括A液和B液:流动相(A):10mmol/L Na₂HPO₄ pH值7.2缓冲液(PB);流动相(B):PB+甲醇+乙腈(50+35+15)。线性梯度:在0~25min内,流动相B以线性从0%上升到100%。流量:1.0ml/min。

6. 统计学方法:用SPSS11.0统计软件进行分析处理。采用配对t检验进行大鼠自身前后行为学成绩比较;采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间行为学成绩和海马氨基酸递质含量比较。

结 果

1. 慢性应激和针刺对大鼠自主活动的影响:应激前(第1次OFT实验)3组大鼠的自主活动差异无显著性($P>0.05$);在接受慢性应激后(第2次OFT实验)模型组大鼠自主活动较健康对照组均显著减少($P<0.01$),而针刺组大鼠的自主活动和健康对照组间差异无显著性($P>0.05$,表1)。

表1 3组动物Open-Field实验结果比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	第1次OFT	第2次OFT
健康对照组	10	96.80 ± 8.64	100.30 ± 9.37
抑郁模型组	10	98.43 ± 7.59	36.80 ± 9.31*
针刺组	10	99.30 ± 7.10	102.35 ± 7.24*

与正常组比较,* $P<0.01$

2. 慢性应激和针刺对大鼠海马Glu、Asp、GABA、Gly含量的影响:(1)对3组大鼠海马内兴奋性氨基酸Glu、Asp含量的影响:抑郁模型组大鼠海马谷氨酸(Glu)含量较健康对照组显著增高($P<0.01$),针刺组大鼠海马的Glu含量较模型组显著下降($P<0.01$),而与健康对照组相比无显著性差异($P>0.05$)。3组间天冬氨酸(ASP)的含量均无显著性差异($P>0.05$,表2)。(2)对3组大鼠海马内抑制性氨基酸GABA、Gly含量的影响:抑郁模型组大鼠海马γ-氨基丁酸(GABA)含量较健康对照组显著降低($P<0.01$),而针刺组大鼠海马GABA含量较模型组显著升高($P<0.01$),而与健康对照组比较无显著差异($P>0.05$)。3组间的甘氨酸(Gly)含量均无显著差异($P>0.05$,表3)。

表2 3组大鼠海马内兴奋性氨基酸含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Glu(mg/g)	Asp(mg/g)
健康对照组	10	1.02 ± 0.20	1.47 ± 0.43
抑郁模型组	10	1.68 ± 0.21*	1.61 ± 0.29
针刺组	10	1.07 ± 0.41	1.64 ± 0.33

与正常组比较,* $P<0.01$

表3 3组大鼠海马内抑制性氨基酸含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GABA(mg/g)	Gly(mg/g)
健康对照组	10	1.77 ± 0.65	0.28 ± 0.09
抑郁模型组	10	1.17 ± 0.59*	0.29 ± 0.10
针刺组	10	1.71 ± 0.38	0.30 ± 0.51

与正常组比较,* $P<0.01$

讨 论

在抑郁症的发病机制及抗抑郁机制的研究中,脑内单胺类递质,如NE、5-HT和DA等受到的关注最多,但近年来,研究者们开始注意到氨基酸类神经递质在情感障碍疾病的病理机制中的作用。在生理状态下,神经细胞间隙内存在适量的兴奋性氨基酸介导神经元之间的兴奋传递而维持大脑正常的兴奋性;同时也存在适量的抑制性氨基酸来抑制兴奋性神经递质的释放而产生抑制效应^[6]。谷氨酸(Glu)是中枢神经系统中最主要的兴奋性递质(EAA),天冬氨酸(Asp)也是脑内重要的EAA;抑制性神经递质(IAA)包括甘氨酸(Gly)、γ-氨基丁酸(GABA)、牛磺酸、丙氨酸、脯氨酸等。其中GABA是中枢神经系统中最主要的抑制性递质。GABA不能透过血脑屏障,脑组织中的GABA均由GLU经谷氨酸脱羧酶脱羧而生成,两者代谢的平衡改变可导致中枢神经系统功能改变。

本研究综合了孤养与中等强度的不可预见的应激刺激诱导建立了抑郁大鼠模型,采用目前使用最广

泛的 OFT 实验考察大鼠行为学改变,并观察针刺对抑郁模型大鼠海马 γ -氨基丁酸 (GABA)、甘氨酸 (Gly)、谷氨酸 (Glu) 和天冬氨酸 (Asp) 含量的影响。本实验结果显示:与健康对照组相比,抑郁模型大鼠的自主行为活动和海马 γ -氨基丁酸 (GABA) 的含量显著降低 ($P < 0.01$),而海马谷氨酸 (Glu) 含量显著增加 ($P < 0.01$)。而针刺组大鼠的自主行为活动和海马谷氨酸 (Glu) 含量和 γ -氨基丁酸 (GABA) 的含量与健康对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),提示针刺可有效改善抑郁大鼠的抑郁行为,同时可逆转抑郁模型大鼠海马 Glu, GABA 含量的改变。综上所述,针刺对海马氨基酸类神经递质 Glu 和 GABA 含量的调整,可能是其抗抑郁的神经生物学机制之一。

本研究仅从针刺对海马氨基酸类神经递质影响的角度初步探讨其抗抑郁机制的一个方面,针灸抗抑郁的作用是多层次多靶点的,其抗抑郁的机制还有待进一步的深入研究。

参考文献

- 1 李晓白,黄继忠,王祖承. 抑郁症与谷氨酸传导[J]. 中国新药与临床杂志,2005,24:601-604
- 2 陈运平,孙圣刚,梅元武,等. 低频重复经颅磁刺激对抑郁模型大鼠游泳及海马内氨基酸递质的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2006,28(8):507-509
- 3 Willner P, Towell A, Sampson D, *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 1987,93(3):358
- 4 林文注,王佩. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994:286
- 5 Blokland A, Lieben C, Deutz NE. Anxiogenic and depressive-like effects, but no cognitive deficits, after repeated moderate tryptophan depletion in the rat[J]. *J Psychopharmacol*, 2002, 16: 39-49
- 6 Zobel, AW. Effects of the high-affinity corticotrophin releasing hormone receptor 1 antagonist 8121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J. Psychiatr. Res*,2003,37:171-181

(收稿:2009-11-24)

(修回:2009-12-15)

CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节 T 细胞在非霍奇金淋巴瘤中的表达

李丽娟 王 晶 景红梅 胡小舟 王小林 克晓燕

摘 要 **目的** 研究 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节 T 细胞 (Tregs) 在非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 外周血中的表达,初步探讨 Tregs 的表达与 NHL 常用预后相关因素的关系。**方法** 选择 58 例 NHL 患者,流式细胞术检测外周血中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Tregs 百分比,分析 NHL 组与健康对照组,初发组与化疗后组 Tregs 比例有无差异,并将 Tregs 比例与年龄、性别、临床分期、病理类型、LDH、IPI 和 β_2 -微球蛋白等常规预后指标进行相关性分析。**结果** ①B 细胞 NHL(B-NHL)组 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Tregs 的百分比为 $(3.89 \pm 2.49)\%$,明显高于健康对照组 ($P = 0.003$);②B-NHL 组中,侵袭性淋巴瘤 (DLBCL, MCL) 组与非侵袭性淋巴瘤组 (FL 和边缘区淋巴瘤等) Tregs 表达差异具有统计学意义 ($P = 0.002$);T 细胞 NHL(T-NHL)组中,高度侵袭性淋巴瘤组 (T-LBL 和 NK/TCL 组)与侵袭性淋巴瘤组 (ALCL 和 PTLL 组) Tregs 表达差异具有统计学意义 ($P = 0.006$);③B-NHL 中,初发组 Tregs 的百分比为 $(5.73 \pm 2.77)\%$,明显高于健康对照组 ($P = 0.004$) 和化疗后组 [$(2.63 \pm 1.33)\%$, $P = 0.034$],化疗后组与健康对照组相比无统计学意义;④B-NHL 初发组患者 Tregs 比例与患者国际预后指数、 β_2 -微球蛋白和乳酸脱氢酶之间具有相关性 (P 值分别为 0.003, 0.003 和 0.038),但与年龄、性别、PS 状态、临床分期、病理类型之间相关性不具有统计学意义。**结论** B-NHL 患者尤其初发组患者外周血 Tregs 比例明显升高,检测其水平对于判断 NHL 的预后可能有一定的临床价值。

关键词 非霍奇金淋巴瘤 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} T 细胞 调节性 T 细胞

The Expression and Clinical Significance of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T cell in Non-Hodgkin's Lymphoma. Li Lijuan, Wang Jing, Jing Hongmei, Hu Xiaozhou, Wang Xiaolin, Ke Xiaoyan. Department of Hematology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Abstract Objective To evaluate the expression of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} regulatory T cells (Tregs) in the peripheral blood of the patients with NHL and discuss the relationship between expression of Tregs and prognostics factors of NHL. **Methods** 58 NHL patients

作者单位:100191 北京大学第三医院血液科(李丽娟、王晶、景红梅、克晓燕);100191 北京大学第三医院检验科(胡小舟、王小林)

通讯作者:克晓燕,电子信箱:xiaoyank@yahoo.com