

·基础研究·

四神聪电针预防急性睡眠剥夺大鼠海马神经元凋亡的机制及对焦虑行为的影响

焦博钰¹, 孟凡琪¹, 肖兴茹², 张菁芸², 裴文姬¹, 阮经文¹

(1. 中山大学附属第一医院针灸科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学中山医学院, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨四神聪电针预防急性睡眠剥夺大鼠海马神经元凋亡的机制及对焦虑行为的影响。【方法】将SD大鼠随机分为Sham组(对照组)、sleep deprivation (SD, 睡眠剥夺组)、EA+SD组(electroacupuncture, 电针干预组)。采用改良平台法对SD组、EA+SD组进行连续4天的急性睡眠剥夺,电针组在睡眠剥夺期间于四神聪穴位进行电针治疗,连续4 d,每天20 min。采用旷场实验检测大鼠探索能力以评估大鼠焦虑程度,并通过免疫荧光染色检测海马中CA1、CA2、CA3、DG1、DG2区域的神经元(NeuN阳性)和Cleaved Caspase-3的共标情况;采用免疫荧光标记海马中星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白(GFAP),通过sholl analysis分析星形胶质细胞形态变化,并检测分别与补体C3⁺、S100A⁺的共标情况,以了解海马中星形胶质细胞A1、A2分型情况。【结果】旷场实验发现:EA+SD组大鼠在中心停留时间的时间增加,在中心区域的运动速度下降;免疫荧光染色显示:EA+SD组大鼠在海马不同区域除CA3外,其余的CA1、CA2、DG1、DG2区神经元上Cleaved caspase-3较SD组大鼠表达减少($P < 0.05$);sholl analysis发现在12 μm 、15 μm 、18 μm 、21 μm 处EA+SD组星形胶质细胞与同心圆交点数目多于SD组,在海马区A1型星形胶质细胞(C3⁺GFAP⁺/GFAP⁺)比例低于SD组,A2型(S100A⁺GFAP⁺/GFAP⁺)所占比例高于SD组。【结论】四神聪电针对急性睡眠剥夺大鼠海马区神经元具有保护作用,其机制可能通过预防星形胶质细胞形态损伤,减少海马区A1型星形胶质细胞,增加A2型星形胶质细胞表达,降低急性睡眠剥夺导致的细胞毒性,减少神经元凋亡数而实现;同时,四神聪电针还能预防或降低急性睡眠剥夺对大鼠探索性行为的影响。

关键词:睡眠剥夺;电针;神经元凋亡;星形胶质细胞;旷场实验

中图分类号:R245

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)06-0958-09

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0611

Mechanism of Electroacupuncture on Preventing Apoptosis of Hippocampal Neurons in Rats with Acute Sleep Deprivation and Its Effect on Anxiety

JIAO Bo-yu¹, MENG Fan-qi¹, XIAO Xing-ru², ZHANG Jing-yun², PEI Wen-ya¹, RUAN Jing-wen¹

(1. Department of Acupuncture and Moxibustion, The First Affiliated hospital Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: RUAN Jing-wen; E-mail: ruanjw@163.com

Abstract:【Objective】To investigate the mechanism of Sishencong electroacupuncture on preventing the apoptosis of hippocampal neurons in rats with acute sleep deprivation and its effect on anxiety behavior.【Methods】Adult Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into Sham group (control group), SD group (sleep deprivation group), and EA+SD group (electroacupuncture group). Modified multiple platform method was used to induce sleep deprivation for 4 days. EA+

收稿日期:2022-07-19

基金项目:广东省中医药管理局面上项目(20201067);广东省自然科学基金(2022A1515010729);广州市基础研究计划基础与应用基础研究项目(202201011103)

作者简介:焦博钰,硕士生,研究方向:电针对睡眠剥夺的机制研究, E-mail: 97986575@qq.com;阮经文,通信作者,主任医师, E-mail: ruanjw@163.com

SD group received Sishencong electroacupuncture in each day during sleep deprivation with 20 minutes needling for 4 days. The open field test was used to detect the exploration of rats to evaluate the degree of anxiety, and the co-labeling of NeuN⁺ and Cleaved Caspase-3 in different regions of the hippocampus was detected by immunofluorescence staining; the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampus was labeled by immunofluorescence. GFAP and the morphological changes of astrocytes were analyzed by Sholl analysis, and the co-labeling with C3+ and S100A+ were detected to analyze the A1 and A2 types of astrocytes in the hippocampus.【Results】Open field test showed that the time spent in the center of rats was increased in EA+SD group, but the movement speed was decreased compared with SD group. Immunofluorescence staining confirmed that the expression of Cleaved caspase-3 on neurons in different regions of the hippocampus (CA1, CA2, CA3, DG1, DG2) in the EA+SD group was lower than that of the SD group ($P<0.05$). The number of intersections of astrocytes and concentric circles in the EA+SD group at 12 μm , 15 μm , 18 μm and 21 μm were higher than those of the SD group. Immunofluorescence showed that electroacupuncture could regulate the proportion of C3⁺/GFAP⁺ and S100A⁺/GFAP⁺ in the hippocampus of rats during sleep deprivation.【Conclusion】: Electroacupuncture could improve the exploration during sleep deprivation by reducing the apoptosis of neurons in the hippocampus, repairing the morphological damage of astrocytes and balancing the proportion of A1 and A2 astrocytes in the hippocampus.

Key words: sleep deprivation; electroacupuncture; neuronal apoptosis; astrocytes; open field test

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(6): 958-966]

研究表明剥夺睡眠可导致大脑形态结构的改变及神经系统退行性病变^[1-2],影像学结果显示,24 h的睡眠剥夺即可导致受试者大脑海马区、部分皮层区域活动下降^[3]。基础研究进一步证明^[4]:睡眠剥夺可通过影响神经元过度自噬和凋亡的方式损害相关脑区形态结构,导致动物海马和前额叶皮层神经元的数量减少、扰乱相应脑区递质表达水平而致该脑区行为功能发生异常。由此可见,睡眠剥夺主要通过影响中枢神经元凋亡内稳态的方式令相应脑区结构受损,若能预防睡眠剥夺对神经元凋亡的影响,就极有可能实现睡眠剥夺对相应脑区结构与功能损害的预防。我们前期临床研究及相关文献表明,给予慢性失眠患者针灸治疗不仅可以改善睡眠质量,还可以有效改善失眠伴随的焦虑状态^[5-8]。同时前期实验研究还发现,四神聪电针通过促进海马神经元存活、调控突触可塑性可以预防睡眠剥夺对大鼠学习记忆能力损害^[9-10]。但四神聪电针是如何实现对神经元凋亡的调控以及预防性四神聪电针能否减少急性睡眠剥夺对大鼠焦虑行为的影响值得探讨。本研究将通过改良平台建立急性睡眠剥夺模型,并从神经元凋亡、星形胶质细胞形态角度,探讨预防性四神聪电针对急性睡眠剥夺大鼠海马神经元的保护机制及对焦虑行为的影响,为临床上应用电针预防治疗睡眠障碍及伴发的焦虑行为提供了坚实的理论和实验依据,为电针

对睡眠障碍的基础研究到临床治疗的转化提供可能的理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

1.1.1 实验动物 本研究采用SPF级Sprague-Dawley (SD)雄性大鼠,体质量在(200±20)g。实验动物均来自中山大学东校区实验动物中心,实验动物许可证号为【SYXK(粤)2019-0209】。大鼠置于安静环境下饲养,房间采用12 h明-暗交替且保持恒温(22±0.5)°C、恒湿(55±10)%,保证大鼠自由饮食。实验过程中对动物的处置符合《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892-2018)》以及中山大学动物实验中心伦理委员会的要求。

1.1.2 试剂与耗材 戊巴比妥钠, PBS(中杉金桥),多聚甲醛(麦克林)、OCT包埋剂(Sakura),粘附性载玻片(世泰),盖玻片(世泰),封片剂(SouthernBiotech 0100-01), BSA (Biotopped, A6020), Triton, Mouse-anti-NeuN antibody (Abcam, ab104224), Rabbit-caspase-3 antibody (Cell signaling, #9661), Mouse-S100A10 monoclonal antibody (Invitrogen, MA5-24769), Chicken-Anti-GFAP antibody (Abcam, ab4674), Rabbit-Anti-C3 antibody (Abcam, ab11887), DAPI (Cell Signaling #4083), 羊抗小鼠

Alexa Fluor488 (Abcam, ab150113), 羊抗兔 Alexa Fluor555 (Abcam, ab150078), 羊抗小鼠 Alexa Fluor555 (Abcam, ab150114), 羊抗鸡 Alexa Fluor488 (Abcam, ab150169), 注射器, 手术器械。

1.1.3 主要仪器 整合型行为识别分析系统(PhenoScan, 美国), 切片机(ThermoFisher NX50, 美国), 全自动倒置荧光显微镜(Leica, DM6B, 德国), 激光共聚焦显微镜(Zeiss, LSM800, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 急性睡眠剥夺动物模型的建立及分组 采用改良多平台水环境法建立大鼠睡眠剥夺模型, 对大鼠进行24 h连续4 d的睡眠剥夺(每天给睡眠剥夺箱换水时, 大鼠有一些非剥夺时间), 期间给予正常喂食及饮水及光照, 定时对水平台进行清洗及用水更换。多平台水环境具体如下: 睡眠剥夺箱50 cm × 40 cm × 40 cm, 内有6个平台, 高8.0 cm, 直径6 cm, 平台之间间隔8 cm, 平台周边注满水, 水面距平台面约1.0 cm, 水温保持在(20±3)°C左右。大鼠进入快动眼睡眠(REM睡眠)时, 由于骨骼肌的松弛使大鼠失去支撑掉入水中而惊醒, 如此反复, 造成睡眠剥夺。环境对照组则是在原有平台上放置总长40 cm, 总宽28 cm的不锈钢网格, 网格大小为1.2 cm×1.2 cm, 动物能够进入睡眠, 每天更换睡眠剥夺箱中的水。

分组: 将SD成年雄性大鼠随机分为Sham组(对照组)、Sleep deprivation group组(SD, 睡眠剥夺组)、EA+SD组(Electroacupuncture group, 电针干预组)。

1.2.2 四神聪电针干预方法 在造模的同时给予电针刺激。取穴: 四神聪。具体定位: 参考《实验针灸学》中的“实验动物穴位图”^[11]。电针操作: 取0.25 mm×25 mm无菌针灸针斜刺穴位, 接低频电子脉冲治疗仪(G6805-2, 上海华宜医用仪器有限公司)的输出线末端的电极连接。刺激强度以观察到轻微颤动为度, 电流≤1 mA, 留针时间为20 min。每天1次, 干预4 d。

1.2.3 旷场实验 在实验开始前5 d实验操作者应每天抚摸大鼠10 min, 使大鼠熟悉实验操作者的气味。在实验当日先将大鼠放入实验操作的房间适应1 h, 减少外界环境因素对大鼠的影响。旷场反应箱是长宽高分别为100 cm×100 cm×30 cm的正方形容器, 反应箱上方有摄像头记录实验动物的活动。在其内中心位置设置一边长为50 cm正方形

区域作为中心区, 实验开始后把大鼠于固定位置放入箱中, 使大鼠在反应箱内自由探索5 min。记录大鼠的运动轨迹、运动距离、中心停留时间等。每只大鼠实验结束后均清洁容器。

1.2.4 动物灌注固定、取材及切片 采用质量分数1%戊巴比妥钠以0.4 mL/100 g剂量将大鼠进行麻醉。打开胸腔, 暴露心脏与主动脉, 用灌注针从左心室心尖部插至主动脉后, 剪开右心耳灌注PBS直至从右心耳流出清澈的液体, 再慢速灌注40 g/L多聚甲醛约300 mL进行固定, 灌注完成后快速完整取出脑组织, 置于40 g/L多聚甲醛中后固定, 30%蔗糖脱水, 待脑组织完全沉底后使用OCT包埋后沿冠状面进行冰冻切片, 厚度为30 μm。

1.2.5 免疫荧光组织化学染色 将组织切片用0.01 mol/L PBS反复洗3次, 每次10 min, 10 g/L牛血清在常温环境中进行封闭, 弃去牛血清后将一抗按照比例稀释至0.5% Triton中(Triton用0.01 mol/L PBS配置)配制成一抗, 阴性对照用0.01 mol/L PBS代替一抗, 每张玻片上加入150~200 μL一抗, 4 °C过夜。第二天取出后复温30 min, 0.01 mol/L PBS清洗三次, 每次10 min。将二抗稀释至0.5% Triton中, 加入二抗后置于37 °C温箱2 h, 二抗孵育完成, 弃去二抗每张玻片上加入DAPI进行染核, 10 min后用0.01 mol/L PBS清洗3次。防荧光淬灭封片剂进行封片。激光共聚焦显微镜下观察拍照, 并计数。

1.2.6 Sholl分析星形胶质细胞形态变化 对海马组织采用星形胶质细胞标记物(GFAP)免疫荧光染色后, 使用激光共聚焦显微镜进行拍摄。然后在Image中导入图像并处理, 自动提取背景, 随机裁剪图像后提取300 dpi样本, 并将图像转换为8-bit, 进行细胞骨架化处理然后进行sholl分析。

1.3 统计学分析

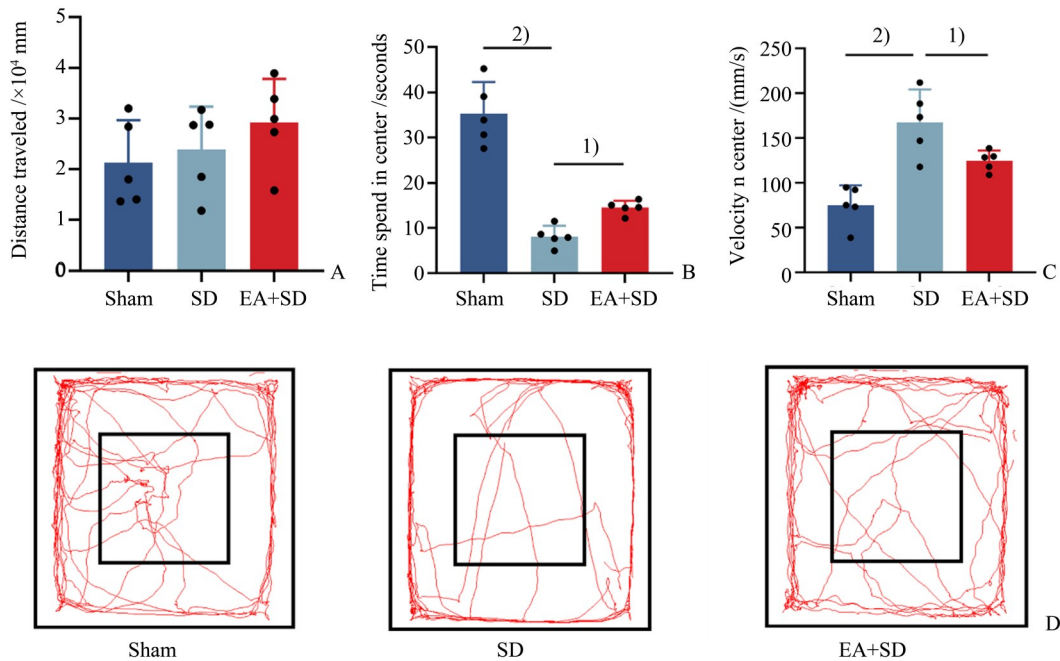
实验数据用SPSS 25.0进行分析, 连续计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。Shapiro-Wilk检验数据是否符合正态分布。多组数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 采用LSD-t检验进行多样本均数间两两比较, 若方差不齐则采用非参数检验(Kruskal-Wallis检验)。检验水准为0.05, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。用Graphpad Prism 8软件绘制统计图。

2 结果

2.1 旷场实验

旷场实验结果表明,三组大鼠总运动路程无明显差异(图1A, $P=0.355$, $F_{(2,12)}=1.132$),证明各组老鼠运动能力相同。单因素方差分析显示三组大鼠在中心区域运动的时间和速度均有统计学意义(图1B, C; $F_{(2,12)}=53.153$, $P<0.001$; $F_{(2,12)}=16.465$, $P<$

0.001)。与Sham组相比,SD组大鼠在中心区停留时间短,移动速度快,在中心区域探索行为减少,焦虑性特征更明显(图1B, C; $P<0.001$; $P<0.001$);而EA+SD组大鼠较SD组大鼠在中心区域探索时间长,移动速度慢,焦虑程度更低(图1B, C; $P=0.039$; $P=0.021$)。以上结果证明急性睡眠剥夺可以减少大鼠对陌生区域的探索性行为,提示焦虑程度上升,电针干预可以预防急性睡眠剥夺造成的行为学影响。



A. The total distance of movement of each group in the open field test; B. Time spend in center of each group; C. Velocity in center of each group; D. Representative tracks of movement patterns of rats in an open field box. Data are presented as the Means \pm SD. ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; One-way ANOVA; $n=5$.

图1 旷场实验比较各组大鼠的焦虑水平

Fig. 1 The anxiety of rats in each group were compared by open field test

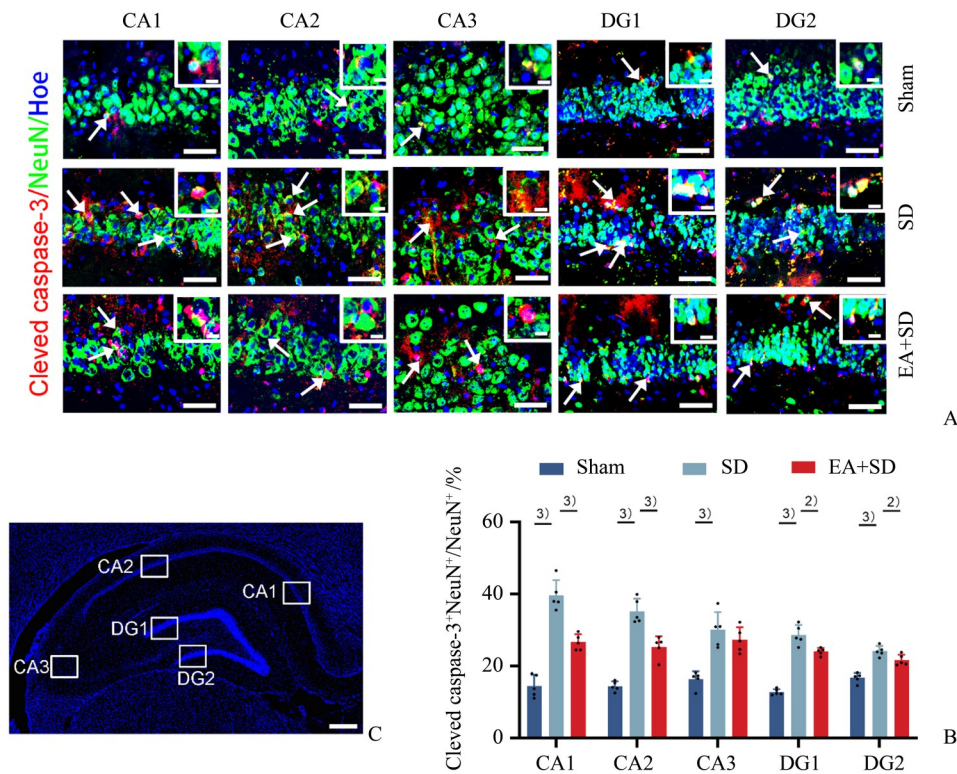
2.2 细胞凋亡情况

通过NeuN以及Cleaved Caspase-3的双标免疫荧光染色,观察在海马不同区域(CA1、CA2、CA3、DG1、DG2)细胞凋亡情况。通过单因素方差分析显示三组大鼠在CA1、CA2、CA3、DG2均有统计学意义(图2B; $F_{(2,72)}=66.636$, $P<0.001$; $F_{(2,72)}=83.769$, $P<0.001$; $F_{(2,72)}=37.089$, $P<0.001$; $F_{(2,72)}=32.328$, $P<0.001$)。使用Kruskal-Wallis非参数检验分析三组大鼠在DG1区有统计学意义(图2B; $\chi^2=53.903$, $P<0.001$)。如图所示,急性睡眠剥夺后,Cleaved Caspase-3在海马CA1、CA2、CA3、DG1、

DG2区域神经元中表达比例均有上升,且有统计学意义($P<0.001$; $P<0.001$; $P<0.001$; $P<0.001$; $P<0.001$)。电针后Cleaved Caspase-3表达在海马各个区域可减少,其中在CA1、CA2、DG1、DG2($P<0.001$; $P<0.001$; $P=0.001$; $P=0.009$)中这种变化具有统计学意义,在CA3区无统计学意义($P=0.1$)。证明电针能减少海马部分区域神经元凋亡,起到保护神经元的作用。

2.3 星形胶质细胞形态变化及分型情况

星形胶质细胞的功能与其形态关系密切,采用sholl analysis分析星形胶质细胞形态变化,以胞体



A: The immunofluorescence image of Cleaved caspase-3 (red), NeuN (green) and cell nucleus (blue) expression in different sub-regions of the hippocampus, scale bar = 50 μm , magnified image bar = 10 μm ; B: Schematic illustration of different regions of the hippocampus. Scale bar = 100 μm . C: The percentage of Cleaved caspase-3⁺NeuN⁺/NeuN⁺ in different zones of the hippocampus. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ CA1, CA2, CA3, DG2; One-way ANOVA, $n=5$; DG1: Kruskal-Wallis test, $n=5$.

图2 不同组别大鼠海马不同亚区神经元凋亡情况

Fig. 2 Neuronal apoptosis in different sub-regions of the hippocampus in each group

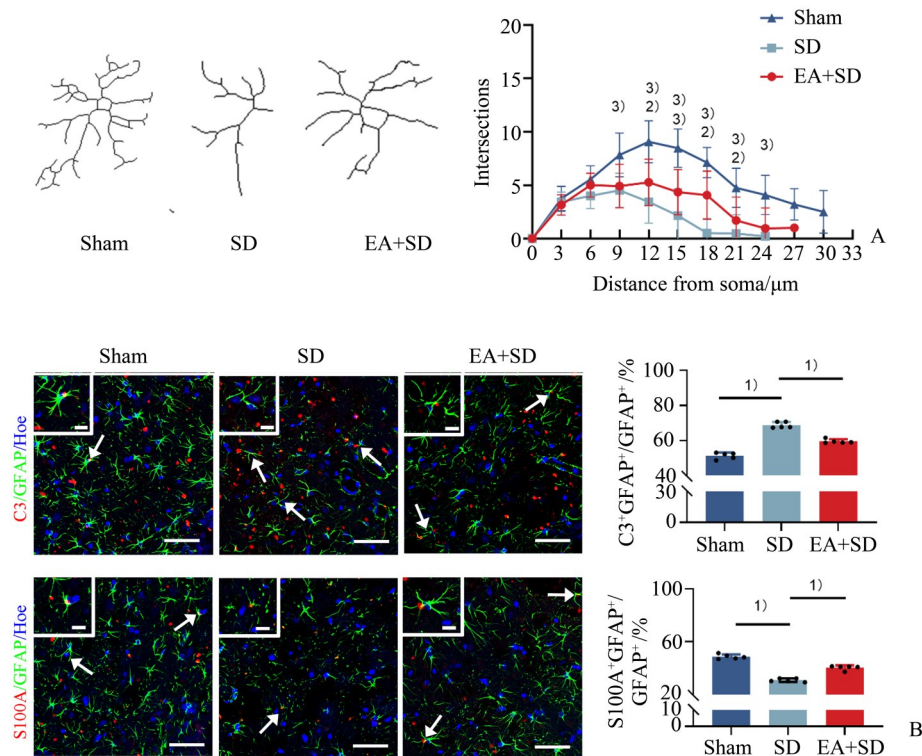
为中心画间隔为 3 μm 的同心圆,观察不同星形胶质细胞突起与圆的交点数目以判断星形胶质细胞复杂程度。使用 Kruskal-Wallis 检测分析三组大鼠在 9 μm 、12 μm 、15 μm 、18 μm 、21 μm 处有统计学意义(图 3A; $\chi^2=27.510$, $P < 0.001$; $\chi^2=42.611$, $P < 0.001$; $\chi^2=45.594$, $P < 0.001$; $\chi^2=53.286$, $P < 0.001$; $\chi^2=39.222$, $P < 0.001$; $\chi^2=35.012$, $P < 0.001$)。研究结果表明在距离中心 9 μm 至 24 μm , SD 组与圆的焦点数目少于 Sham 组 ($P < 0.001$; $P < 0.001$; $P < 0.001$; $P < 0.001$; $P < 0.001$)。在 12 μm 、15 μm 、18 μm 、21 μm 处 EA+SD 组星形胶质细胞与同心圆交点数目多于 SD 组 ($P=0.004$; $P=0.003$; $P < 0.001$; $P=0.007$)。

采用免疫荧光染色 GFAP⁺ 抗体标记反应性星形胶质细胞,使用 C3⁺ 和 S100A⁺ 抗体分别标记 A1 型和 A2 型星形胶质细胞,通过 C3⁺GFAP⁺/GFAP⁺ 以及 S100A⁺GFAP⁺/GFAP⁺ 比较 A1 型和 A2 型星形胶质细胞所占比例,观察在海马组织内星形胶质细胞 A1/

A2 转化情况。通过单因素方差分析显示三组大鼠的 A1、A2 型星形胶质细胞比例具有差异且有统计学意义(图 3B; $F_{(2,72)}=264.95$, $P < 0.001$; $F_{(2,72)}=264.95$, $P < 0.001$)。如图 3 所示,急性睡眠剥夺后海马体内 A1 型星形胶质细胞比例增加, A2 型比例下降,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$); 与 SD 组相比,电针组 A1 型星形胶质细胞比例上升, A2 型比例下降 ($P < 0.001$),说明电针可以调节反应性星形胶质细胞中 A1、A2 型比例。

3 讨论

研究显示 8 h 的睡眠剥夺即可导致青年男性出现主观情绪变化, 16 ~ 20 h 开始出现明显的焦虑、抑郁等负性情绪行为,说明睡眠剥夺与焦虑显著相关^[12]。现代研究已证实大脑通过海马、杏仁核、终纹核、内侧前额叶皮质等脑区构成的神经环路调节焦虑行为^[13],海马在焦虑行为的中枢调控中扮演



A: Astrocyte skeleton diagram of each group; Sholl analysis of the morphology of astrocytes; 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test $n=5$. B: The immunofluorescence image of astrocyte A1 (C3⁺GFAP⁺/GFAP⁺) and A2 (S100A⁺GFAP⁺/GFAP⁺) expression. Scale bar = 50 μm. ¹⁾ $P < 0.001$, One-way ANOVA, $n=5$.

图3 不同组别大鼠海马区域星形胶质细胞形态结构及分型

Fig. 3 Morphology and subtype ratio of astrocytes in the hippocampus region of rats in each group

关键角色,是掌控焦虑的神经心理中心结构^[14-15],相关临床影像学研究也显示失眠患者海马神经解剖结构发生改变即双侧海马体积明显减小^[16]。因此,睡眠剥夺不仅损伤海马结构,还会对其调控焦虑行为水平产生影响。本研究通过采用旷场实验观察电针对于急性睡眠剥夺的影响,结果表明,睡眠剥夺后在旷场实验中,大鼠在中心区域停留时间减少,在中心区域移动速度增快,倾向于在箱体角落及四周停留,而目前将旷场实验大鼠在中心区域停留时间比例作为评判大鼠焦虑程度的重要指标,即焦虑程度低的老鼠倾向于向中心区域进行探索,在中心区域停留时间较长。由此可见,睡眠剥夺可导致大鼠焦虑水平变化,而四神聪电针可以逆转其行动轨迹变化。

细胞凋亡是为了维持内环境稳态细胞自我死亡的过程,caspase-3通过线粒体途径、死亡受体途径和细胞毒性T淋巴细胞介导的颗粒酶B途径参与到细胞凋亡过程中,其表达量与细胞凋亡程度成正比^[17-18]。课题组前期研究显示:四神聪电针可以

预防睡眠剥夺导致大鼠海马区神经元过度自噬和凋亡的问题,使得海马区主宰的学习记忆、情绪调节功能得到较好保护^[8-10]。但四神聪电针是通过什么途径、靶区实现预防海马区神经元过度自噬和凋亡的?对海马不同亚区是否有不同影响尚不清楚。

我们的研究结果显示:在海马各个区域(CA1、CA2、CA3、DG1、DG2)中,急性睡眠剥夺均可以使Cleaved caspase-3表达量上升,而在CA1、CA2、DG1、DG2四神聪电针可以降低其表达,但在CA3区未观察到明显变化,可能因为CA3区主要负责编码以秒、小时为单位的短期空间记忆,主要在快速编码、探索新鲜事物、形成一过性短期记忆的过程中发挥作用^[19-21],而四神聪电针的主要作用可能体现在保护长时程情绪相关记忆中^[9,22]。因此,以上结果表明四神聪电针主要作用靶区为CA1、CA2、DG1、DG2,并极有可能通过下调CA1、CA2、DG1、DG2靶区的Cleaved caspase-3表达,减少急性睡眠剥夺造成的海马神经细胞凋亡,预防海马神经元受损从而起到保护长时程情绪记忆的作用。

早有研究表明神经元-胶质细胞网络在情绪的调节中的重要作用^[23],对焦虑抑郁症患者死后的大脑进行研究,发现其海马区星形胶质细胞数量减少^[24]。使用慢性应激方法造模后的焦虑抑郁模型小鼠 A1 型星形胶质细胞比例增高,氟西汀可降低 A1 型标记物的表达水平,神经元突触形态及树突棘密度改善^[25]。星形胶质细胞的作用与其形态密切相关,有研究发现电针可通过保护线粒体功能修复星形胶质细胞形态损伤,促进星形胶质细胞的增殖^[26-27]。通过 sholl analysis 发现,睡眠剥夺后大鼠海马区域星形胶质细胞分支数减少,突起变短,复杂程度降低,电针可以缓解睡眠剥夺造成的星形胶质细胞形态的破坏。除形态影响以外,外界刺激可使星形胶质细胞分化为两种具有完全相反性质的反应性星形胶质细胞^[28],A1 型星形胶质细胞会失去正常胶质细胞功能并产生神经毒性,A2 型星形胶质细胞可上调神经营养因子,促进神经元生长及突触修复,对中枢神经系统具有保护作用^[28-29]。我们的研究结果显示,四神聪电针可以保护星形胶质细胞形态,使 A1 型星形胶质细胞表达量减少,A2 型表达量增多,逆转睡眠剥夺对星形胶质细胞的影响。星形胶质细胞-神经元网络系统的连接对神经系统功能非常重要,研究表明海马区星形胶质细胞可合成并释放神经营养因子、神经递质或细胞因子促进海马神经元再生及记忆巩固^[30-31],当中枢神经系统疾病中神经元受损时,星形胶质细胞可向受损神经元传递功能性线粒体增强二者间电信号联系^[32]。我们在此次实验中发现电针对神经元凋亡及星形胶质细胞形态、分型均有影响,推测电针的治疗作用可能在于增强星形胶质细胞与神经元之

间的沟通连接,发挥保护神经元的作用,进而缓解急性睡眠剥夺对焦虑行为的影响。

电针作为传统针灸与现代电刺激相结合的技术,已被临床广泛应用于治疗各种疾病状态下的焦虑和抑郁,如失眠、面瘫、性腰痛患者导致的焦虑情绪等,其有效性已被我们前期研究和文献证实^[33-35],结合其他人的研究结果显示,电针靶向海马区是其抗焦虑的主要机制之一,如林俊言等研究表明,电针改善 CFA 大鼠的疼痛及其相关焦虑行为,可能与增加大鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区 NPY 的阳性细胞表达有关^[36];又如电针预处理和后处理对不同时间-应激中和应激后焦虑样行为大鼠均具有明显抗焦虑作用,可能与其对海马内 nNOS 的表达调节相关^[37]。

由上可见,四神聪电针可能参与到星形胶质细胞-神经元网络中,保护星形胶质细胞形态,诱导海马区星形胶质细胞形态向 A2 型转化发挥营养神经的作用,减少 A1 型星形胶质细胞释放细胞毒性,并减少海马区神经元细胞凋亡,从而起到保护海马区调节情绪的功能。目前对于针灸治疗机制的研究多为临床试验即对临床效果的观察,观察发现电针可治疗失眠、睡眠紊乱以及并发症如焦虑、抑郁、认知障碍等。研究发现四神聪电针可以调节神经递质如 5-HT、GABA 等的数量,减少通路下游 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的表达^[38]。在神经环路相关的研究中集中于对神经元的研究,如电针可增强神经元突触可塑性,减少海马神经元凋亡及自噬^[39]。但大脑中其他胶质细胞对中枢神经系统疾病也起到关键作用,因此需要进一步探究电针在大脑其他类型细胞中的作用机制及相应通路。

参考文献

- [1] Qiu H, Zhong R, Liu H, et al. Chronic sleep deprivation exacerbates learning-memory disability and alzheimer's disease-like pathologies in A β PP (swe)/PS1 (DeltaE9) Mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 50 (3): 669-685.
- [2] 岳宇娇,徐平.睡眠剥夺相关血液生物学指标研究进展[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2020, 46(6): 376-379.
Yue YJ, Xu P. Research progress of blood biological indexes related to sleep deprivation [J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2020, 46(6): 376-379.
- [3] Zhao R, Zhang X, Fei N, et al. Decreased cortical and subcortical response to inhibition control after sleep deprivation [J]. *Brain Imaging Behav*, 2019, 13 (3): 638-650.
- [4] Li Y, Zhang W, Liu M, et al. Imbalance of autophagy and apoptosis induced by oxidative stress may be involved in thyroid damage caused by sleep deprivation in rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5645090.
- [5] 李阿慧,孙培养.“通督调神”针法治疗广泛性焦虑障碍疗效观察[J]. *亚太传统医药*, 2022, 18(1):

- 91-93.
- Li AH, Sun PY. Observation of "Tondu Tiaoshen"acupuncture therapy on general anxiety disorder [J]. *Asia-Pac Tradit Med*, 2022, 18(1): 91-93.
- [6] 刘萍. 电针对失眠大鼠焦虑抑郁情绪及交感-肾上腺髓质系统的影响研究[D]. 成都中医药大学, 2014: 38-40.
- Liu P. Research on the effects of electric acupuncture regulating the sympathetic adrenal medullary system and anxiety, depression emotion of insomnia rats [D]. *Chengdu Univ of Tradit Chin Med*, 2014:38-40.
- [7] 文培培. 电针“神门”、“三阴交”对CRH注射失眠模型大鼠HPAA功能的影响研究[D]. 成都中医药大学, 2016:52-54.
- Wen PP. The research of on HPA axis function about CRH injects model rats with electric acupuncture in shenmen and sanyinjiao[D]. *Chengdu Univ Chin Med*, 2016:52-54.
- [8] 阮经文, 胡跃华, 饶忠东, 等. 失眠患者焦虑抑郁程度与针灸疗效的关系[J]. *中国针灸*, 2006(03): 186-188.
- Ruan JW, Hu YH, Rao ZD, et al. Effects of the degrees of anxiety and depression on the therapeutic effect of acupuncture in the patient of insomnia [J]. *Chin Acupunct & Moxibusion*, 2006(03): 186-188.
- [9] 顾媛, 李志铃, 汪燕玲, 等. 长时程睡眠剥夺对大鼠行为记忆和海马区递质的影响及四神聪电针的预防作用[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2018, 39(1): 54-60.
- Gu Y, Li ZL, Wang YL, et al. Effects of long-term sleep-deprivation on rats' learning and memory behavior and neurotransmitters in hippocampus and the effects of prevention of electro-acupuncture on the Sishencong acupoints [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2018, 39(1): 54-60.
- [10] Pei W, Meng F, Deng Q, et al. Electroacupuncture promotes the survival and synaptic plasticity of hippocampal neurons and improvement of sleep deprivation-induced spatial memory impairment[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(12): 1472-1482.
- [11] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 中国中医药出版社, 2007: 257-263.
- Li ZR. *Experimental acupuncture*[M]. China Press of Tradit Chin Med, 2007:257-263.
- [12] 刘佳佳, 王进, 郭琳, 等. 24h完全睡眠剥夺对青年男性主观情绪体验及疲劳感的影响[J]. *军事医学*, 2020, 44(3): 215-218.
- Liu JJ, Wang J, Guo L, et al. Effects of 24 hours of total sleep deprivation on subjective emotional feelings and fatigue in young males[J]. *Mil Med Sci*, 2020, 44(3): 215-218.
- [13] Micheli L, Ceccarelli M, D'Andrea G, et al. Depression and adult neurogenesis: positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 143: 181-193.
- [14] Jing W, Zhang T, Liu J, et al. A circuit of COCH neurons encodes social-stress-induced anxiety via MTF1 activation of Cacna1h[J]. *Cell Rep*, 2021, 37(13): 110177.
- [15] Jimenez JC, Su K, Goldberg AR, et al. Anxiety cells in a hippocampal-hypothalamic Circuit [J]. *Neuron*, 2018, 97(3): 670-683.
- [16] Riemann D, Voderholzer U, Spiegelhalder K, et al. Chronic insomnia and MRI-measured hippocampal volumes: a pilot study [J]. *Sleep*, 2007, 30(8): 955-958.
- [17] 于丰铭, 徐扬. Caspase-3的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(11): 2072-2078.
- Yu FM, Xu Y. Research progress of caspase-3 [J]. *Chin J Cell Biol*, 2020, 42(11): 2072-2078.
- [18] 李丹丹, 马芮, 王少朋, 等. 早期母子分离对大鼠成年后认知功能及海马区神经型一氧化氮合酶表达的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2018, 44(11): 662-667.
- Li DD, Ma R, Wang SP, et al. Effect of early maternal fetal separation on cognitive function and expression of neuronal nitric oxide synthase in hippocampus of adult rats [J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2018, 44(11): 662-667.
- [19] Cao Y, Li Q, Liu L, et al. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(9): 1282-1297.
- [20] Rebola N, Carta M, Mulle C. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(4): 208-220.
- [21] Prince L Y, Bacon T, Humphries R, et al. Separable actions of acetylcholine and noradrenaline on neuronal ensemble formation in hippocampal CA3 circuits [J]. *PLoS Comput Biol*, 2021, 17(10): e1009435
- [22] 孙倩倩, 陈义书, 郭新毅, 等. 电针对大鼠在体海马长时程增强急性效应的影响[J]. *康复学报*, 2017, 27(6): 29-34.
- Sun QQ, Chen YS, Guo XY, et al Effect of electroacupuncture on acute effect of long-term potentiation of hippocampus in rats [J] *J Rehabil*, 2017, 27(6): 29-34.
- [23] Wahis J, Baudon A, Althammer F, et al. Astrocytes mediate the effect of oxytocin in the central amygdala

- on neuronal activity and affective states in rodents[J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(4): 529-541.
- [24] Rapp M A, Schnaider-Beeri M, Grossman H T, et al. Increased hippocampal plaques and tangles in patients with Alzheimer disease with a lifetime history of major depression[J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2006, 63(2): 161-167.
- [25] 李杉杉. NLRP3炎症小体调节抑郁症中星形胶质细胞A1/A2表型的作用及机制研究[D]. 南京中医药大学, 2020:44-47.
- Li SS. The role and mechanism of 11TLRP3 inflammasome in regulating the A1/A2 phenotype of astrocytes in depression [D]. *Nanjing Univ Chin Med*, 2020: 44-47.
- [26] 姜硕, 黄彬, 樊凌, 等. 电针四关穴对抑郁大鼠海马星形胶质细胞形态的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(1): 216-218.
- Jiang S, Huang B, Fan L, et al. Influence of electroacupuncture at Si-guan on the morphology of hippocampal astrocytes in depressive rats[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2015, 30(1): 216-218.
- [27] 肖瑶. 针刺对抑郁大鼠星形胶质细胞谷氨酸功能影响的研究[D]. 广州中医药大学, 2014:26-39.
- Xiao Y. The research based on glutamate impact of astrocytes in rat after experimental depression of the acupuncture [D]. *Guangzhou Univ Chin Med*, 2014: 26-39.
- [28] Zamanian J L, Xu L, Foo L C, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(18): 6391-6410.
- [29] Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.
- [30] Casse F, Richetin K, Toni N. Astrocytes' contribution to adult neurogenesis in physiology and alzheimer's disease[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 432.
- [31] Liu J H, Zhang M, Wang Q, et al. Distinct roles of astroglia and neurons in synaptic plasticity and memory [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(2): 873-885.
- [32] Hayakawa K, Esposito E, Wang X, et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke [J]. *Nature*, 2016, 535(7613): 551-555.
- [33] 杜莉, 宋孝军, 李仲文, 等. 神门、三阴交穴位配伍改善失眠症患者焦虑、抑郁状态: 随机对照研究[J]. *中国针灸*, 2022, 42(1): 13-17.
- Du L, Song XJ, Li ZW, et al. Combined use of Shenmen (HT 7) and Sanyinjiao (SP 6) to improve the anxiety and depression in patients with insomnia: a randomized controlled trial[J]. *Chin Acupunc & Moxibusion*, 2022, 42(1): 13-17.
- [34] 代安洪, 冯斯峰, 浦晶晶, 等. 电针刺激对周围性面瘫急性期患者心理状态的影响[J]. *云南中医中药杂志*, 2021, 42(10): 64-68.
- Dai AH, Feng SF, Pu JJ, et al. Effect of electroacupuncture stimulation on psychological state of patients with peripheral facial paralysis in acute stage[J]. *Yunnan J Tradit Chin Med and Mater Med*, 2021, 42(10): 64-68.
- [35] 余世亮, 王建斌, 杨庆镗. 电针华佗夹脊穴对慢性腰痛患者焦虑情绪和疲劳程度的影响[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2020, 18(24): 106-108.
- Yu SL, Wang JB, Yang QT. Effect of electroacupuncture at Huatuo Jiaji Point on anxiety and fatigue in patients with chronic low back pain [J] *Chin Med Mod Distance Educ China*, 2020, 18(24): 106-108
- [36] 林俊言, 何金霞, 郑千姿, 等. 电针干预慢性炎性痛及其焦虑情绪与海马不同区域GABA相关机制研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2022, 46(9): 945-956.
- Lin JY, He JX, Zheng QZ, et al. Mechanism of gamma-aminobutyric acid in different hippocampal regions and chronic inflammatory pain and related anxiety by electroacupuncture intervention [J] *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2022, 46(9): 945-956.
- [37] 汪婷婷, 耿婷婷, 姜劲峰, 等. 电针对不同时程焦虑样行为大鼠海马神经元型一氧化氮合酶的影响[J]. *针刺研究*, 2016, 41(4): 308-313.
- Wang TT, Geng TT, Jiang JF, et al. Effect of electroacupuncture on hippocampal nNOS expression in rats with anxiety like behavior [J] *Acupunct Res*, 2016, 41(4): 308-313
- [38] 吴北峰. 电项针对大鼠睡眠剥夺及其诱发氧化应激反应影响机制的实验研究[D]. 黑龙江中医药大学, 2008:44-50.
- Wu BF. Experimental research on electro-nape-acupuncture mechanism of sleep deprivation and it-induced oxidative stress rat[D]. *Heilongjiang Univ Chin Med*, 2008:44-50.
- [39] 王俊英. 电针镇痛的累积效应与海马神经元可塑性及胞内MAPK/ERK信号通路活动关系分析[D]. 中国中医科学院, 2013:48-58.
- Wang JY. Analysis on interrelation between electroacupuncture-induced cumulative analgesic effect and neuronal plasticity and MAPK/ERK signal pathway in the hippocampus [D]. *China Academ Chin Med Sci*, 2013:48-58.

(编辑 祁方昉)