

☆ XXXX ☆

电针改善围绝经期抑郁模型小鼠内侧前额叶皮层 Glu/GABA平衡介导的突触可塑性

黄楚瑶¹, 张祉思², 陈淑敏³, 毛悦影², 张可兴⁴, 刘文浩⁴, 黄键澎⁵, 刘健华⁵, 符文彬⁵, 王 聪⁵
(¹广州市荔湾中心医院, 广州 510000; ²广州中医药大学国际中医药转化医学研究所, 广州 510405; ³广东省老干部事务中心温泉医院, 广州 510900; ⁴广州中医药大学针灸康复临床医学院, 广州 510405; ⁵广州中医药大学第二附属医院, 广州 510405)

【摘要】 目的:观察电针对围绝经期抑郁模型小鼠抑郁样行为、性激素水平的影响,探讨电针对其内侧前额叶皮层(mPFC)中谷氨酸(Glu)/ γ -氨基丁酸(GABA)平衡的调节作用及其对mPFC突触结构和功能可塑性的影响。方法:雌性C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组、雌二醇(E₂)组和电针组,每组14只。采用乙炔基二氧化环己烯联合慢性不可预测应激建立围绝经期抑郁模型。电针组电针“肾俞”“三阴交”“百会”“印堂”,每次30 min, E₂组给予E₂(10 μ g·kg⁻¹·d⁻¹)皮下注射,两组均1次/d,共28 d。采用旷场实验(OFT)、强迫游泳实验(FST)、糖水偏好实验(SPT)对小鼠进行行为学评估;ELISA法检测小鼠血清性激素水平;高尔基染色观察mPFC中锥体神经元分支数量和长度并评估其形态变化;Western blot法及脑片全细胞膜片钳电生理技术检测mPFC囊泡型谷氨酸转运蛋白1(VGLUT1)和锥体神经元的微小兴奋性突触后电流(mEPSC)的频率以评估突触前的Glu的水平,突触后密度蛋白95(PSD95)、N-甲基D-天冬氨酸受体亚型2B(NMDAR2B)、N-甲基D-天冬氨酸受体亚型2A(MDAR2A)、Glu的 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPA)及mEPSC的幅度以评估突触后的Glu活性情况,突触前的谷氨酸脱羧酶(GAD-65/67)、囊泡GABA转运蛋白(VGAT)及mPFC中锥体神经元的微小抑制性突触后电流(mIPSC)的频率以评估突触前GABA的水平,突触后的GABA_A受体亚基 γ -2(GABA_AR γ ²)、GABA的突触后锚定蛋白桥尾蛋白(Gephyrin)及mIPSC的幅度以评估突触后的GABA活性情况,并评估Glu/GABA平衡。结果:与空白组小鼠相比,模型组小鼠OFT中央区探索时间和距离减少($P < 0.001$),SFT静止时间增加($P < 0.05$),糖水偏好率降低($P < 0.05$)。与模型组比较,E₂组和电针组的OFT中央区探索距离和时间增加($P < 0.001, P < 0.05$),FST静止时间缩短($P < 0.01, P < 0.05$),糖水偏好率增加($P < 0.001$)。与空白组比较,模型组的血清E₂、孕酮(PROG)含量降低($P < 0.01$),血清FSH含量升高($P < 0.01$)。与模型组比较,E₂组血清E₂、PROG含量升高($P < 0.01$),血清FSH含量降低($P < 0.01$),电针组差异无统计学意义。与空白组相比,模型组mPFC锥体神经元树突分支数量和总长度、同心圆半径和交点数减少($P < 0.001, P < 0.05$)。与模型组比较,E₂组和电针组的树突分支数量和总长度、同心圆半径和交点数增多($P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05$)。与空白组相比,模型组mPFC中PSD95、NMDAR2A、GABA_AR γ ²蛋白表达升高($P < 0.05$),VGLUT1、NMDAR2B、GAD65/67、Gephyrin、VGAT蛋白表达降低($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,电针组和E₂组的PSD95和NMDAR2A表达降低($P < 0.05, P < 0.001$),VGLUT1、GAD-65/67、Gephyrin、VGAT的蛋白表达升高($P < 0.05, P < 0.01$),电针组的NMDAR2B蛋白表达升高($P < 0.01$),电针组GABA_AR γ ²蛋白表达降低($P < 0.05$)。与空白组相比,模型组mEPSC振幅、mEPSC/mIPSC频率比值升高($P < 0.05, P < 0.01$),mIPSC频率降低($P < 0.001$)。与模型组比较,电针组、E₂组的mEPSC振幅、mEPSC/mIPSC频率比值下降($P < 0.05$),mIPSC频率升高($P < 0.01$)。结论:电针可改善mPFC锥体神经元的形态和连接,调节Glu/GABA平衡介导的突触结构和功能可塑性,从而在围绝经期抑郁症中发挥治疗效应。

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250806

引用格式:黄楚瑶,张祉思,陈淑敏,等.电针改善围绝经期抑郁模型小鼠内侧前额叶皮层Glu/GABA平衡介导的突触可塑性[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-10.

项目来源:广东省自然科学基金项目(No.2021A1515011464);国家自然科学基金项目(No.82104979);符文彬广东省名中医工作室(No.粤中医办函[2020]1号)

通信作者:王聪,E-mail:wangcong28@vip.126.com

【关键词】 围绝经期抑郁;电针;谷氨酸/ γ -氨基丁酸平衡;突触可塑性

Electroacupuncture improves synaptic plasticity mediated by Glu/GABA balance in the medial prefrontal cortex of mice with perimenopausal depression

Huang Chu-yao¹, Zhang Zhi-si², Chen Shu-min³, Mao Yue-ying², Zhang Ke-xing⁴, Liu Wen-hao⁴, Huang Jian-peng⁵, Liu Jian-hua⁵, Fu Wen-bin⁵, Wang Cong⁵ (¹Guangzhou Liwan Central Hospital, Guangzhou 510000, China; ²International Institute for Translational Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405; ³Warm Spring Hospital of Guangdong Provincial Bureau of Veteran Cadres Affairs, Guangzhou 510900; ⁴Clinical Medical College of Acupuncture, Moxibustion and Rehabilitation, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405; ⁵The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) on depressive-like behaviors and sex hormone levels in perimenopausal depression mice, so as to explore its regulatory role in the glutamate (Glu)/ γ -aminobutyric acid (GABA) balance in the medial prefrontal cortex (mPFC) and its impact on the structural and functional plasticity of mPFC synapses. **Methods** Female C57BL/6J mice were randomly divided into control, model, estradiol (E_2), and EA groups, with 14 mice in each group. The perimenopausal depression model was established using vinylcyclohexene dioxide (VCD) combined with chronic unpredictable mild stress (CUMS). Mice in the EA group received EA at “Shenshu” (BL23), “Sanyinjiao” (SP6), “Baihui” (GV20), and “Yintang” (GV24⁺) for 30 min. The E_2 group was subcutaneously injected with E_2 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Both interventions were performed once daily for 28 days. Behavioral assessments were conducted using the open field test (OFT), forced swimming test (FST), and sucrose preference test (SPT). Serum sex hormone levels were detected by ELISA. Golgi staining was used to observe the number and length of pyramidal neuron branches and assess their morphological changes in the mPFC. Western blot and whole-cell patch-clamp electrophysiology were used to detect the protein expression of vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) and the frequency of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) of pyramidal neurons in the mPFC to evaluate presynaptic Glu levels; the amplitude of postsynaptic density protein 95 (PSD95), N-methyl-D-aspartate receptor subtype 2B (NMDAR2B), N-methyl-D-aspartate receptor subtype 2A (NMDAR2A), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA), and mEPSC amplitude to evaluate postsynaptic Glu activity; presynaptic glutamic acid decarboxylase (GAD-65/67), vesicular GABA transporter (VGAT), and the frequency of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSC) of pyramidal neurons in the mPFC to evaluate presynaptic GABA levels; and postsynaptic GABA type A receptor subunit γ -2 (GABAAR γ^2), Gephyrin, and mIPSC amplitude to evaluate postsynaptic GABA activity, thereby assessing the Glu/GABA balance. **Results** Compared with the control group, the exploration time and distance in the central zone of the OFT ($P<0.001$), the SPT index ($P<0.001$), the serum levels of E_2 and progesterone (PROG) ($P<0.01$), the number of dendritic branches, total dendritic length, Sholl radius, the number of intersections of mPFC pyramidal neurons ($P<0.001$, $P<0.05$), the protein expression levels of VGLUT1, NMDAR2B, GAD-65/67, Gephyrin, and VGAT ($P<0.05$, $P<0.01$), and the frequency of mIPSC ($P<0.001$) were all decreased in the model group. In contrast, the immobility time in the FST ($P<0.05$), the serum FSH level ($P<0.01$), the protein expression levels of PSD95, NMDAR2A, and GABAAR γ^2 in the mPFC ($P<0.05$), and the amplitude of mEPSC and frequency ratio of mEPSC/mIPSC ($P<0.05$, $P<0.01$) were significantly increased. Compared with the model group, the exploration time and distance in the central area of the OFT ($P<0.001$, $P<0.05$), SPT index ($P<0.001$), number of dendritic branches, total dendritic length, radius of concentric circles and number of intersections ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$), protein expression levels of VGLUT1, GAD-65/67, Gephyrin, and VGAT ($P<0.05$, $P<0.01$), and mIPSC frequency ($P<0.01$) were significantly increased in the E_2 and EA groups. Conversely, the FST immobility time ($P<0.01$, $P<0.05$), expression levels of PSD95 and NMDAR2A ($P<0.05$, $P<0.001$), as well as the mEPSC amplitude and mEPSC/mIPSC frequency ratio ($P<0.05$) were decreased in both groups. In the E_2 group, the serum E_2 and PROG levels increased ($P<0.01$), while the serum FSH level decreased ($P<0.01$); in the EA group, the protein expression of NMDAR2B increased ($P<0.01$), and the protein expression of GABAAR γ^2 decreased ($P<0.05$). **Conclusion** EA can improve the morphology and connectivity of pyramidal neurons in the mPFC and regulate synaptic structural and functional plasticity mediated by the Glu/GABA balance, thereby exerting a therapeutic effect on perimenopausal depression.

【KEYWORDS】 Perimenopausal depression; Electroacupuncture; Glutamate/ γ -aminobutyric balance; Synaptic plasticity

重度抑郁症(MDD)是一种常见的精神障碍,女性患病率(5.1%)明显高于男性(3.6%),围绝经期抑郁症的发生率是绝经前的2.5倍^[1-2],且抑郁症状的加重率在围绝经期(45%~68%)比围绝经期前(28%~31%)更为普遍^[3],围绝经期抑郁症患者常伴发绝经综合征(躯体+情绪症状),这些症状与抑郁症状重叠,使抑郁症状复杂化^[3],加大了临床治疗的难度。有研究提示围绝经期抑郁症发病机制与卵巢激素主要是雌二醇(E_2)和孕酮(PROG)的剧烈波动有关^[4]。谷氨酸(Glu)和 γ -氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统中主要的兴奋性和抑制性神经递质,它们之间的动态平衡对维持神经元兴奋性、突触可塑性和认知功能等有重要作用^[5]。既往研究显示,MDD患者的多个脑区的Glu和GABA水平改变,海马、前额叶皮层(PFC)的突触可塑性(结构可塑性和功能可塑性)受损^[6-7],提示Glu/GABA即兴奋/抑制(E/I)平衡异常、突触可塑性受损是MDD的重要病理机制。研究表明 E_2 、PROG及其代谢产物对大脑中Glu和GABA的水平和功能有调节作用^[8],而围绝经期 E_2 的波动和PROG的缺乏会改变大脑中Glu和GABA的水平,最终引起大脑Glu/GABA平衡异常,进而导致抑郁症发病或抑郁症状的加重^[8-9]。 E_2 被认为是突触可塑性的关键神经调节剂^[10-11],是2018年美国围绝经期抑郁症指南推荐的治疗药物之一^[3],其对Glu和GABA的调节作用可能是其治疗围绝经期抑郁症的重要的机制^[12]。然而, E_2 替代疗法能否作为治疗围绝经期抑郁症的高质量证据仍存在争议^[13]。此外,补充 E_2 可能会增加女性患卵巢癌和雌激素受体阳性乳腺癌的风险^[14]。针刺是治疗原发性和继发性抑郁症的有效方法,其机制与改善海马、PFC和神经网络的可塑性及神经炎症反应有关^[15-16]。因此,本研究通过评估突触结构和功能可塑性探讨电针对围绝经期抑郁模型小鼠内侧前额叶皮层(mPFC)中Glu/GABA平衡的调节机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

8周龄成熟雌性C57BL/6J小鼠,体质量(20±2)g,购自广东省医学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2022-0002。实验环境温度为25℃,相对湿度为45%~50%,通风良好。小鼠在饲养过

程中自由摄食饮水。所有实验程序均经广东省中医院动物实验伦理委员会(No.2020087)批准,并按照《实验动物护理和使用指南》进行。适应性饲养1周后,按完全随机方法将小鼠随机分为空白组、模型组、 E_2 组和电针组,每组14只。

1.2 主要试剂与仪器

E_2 、乙烯基二氧化环己烯(VCD,美国Sigma Aldrich),芝麻油(上海源叶生物), E_2 、PROG、促卵泡激素(FSH)ELISA测定试剂盒(武汉华美生物),N-甲基D-天冬氨酸受体亚型2B(NMDAR2B)、GABA囊泡转运蛋白(VGAT)一抗(美国Cell Signaling Technology),GAPDH、Glu囊泡转运蛋白1(VGLUT1)、小鼠突触后密度蛋白95(PSD95)、突触后锚定蛋白桥尾蛋白(Gephyrin)、谷氨酸脱羧酶(GAD-65/67)一抗(美国Santa Cruz Biotechnology),兔GABAA受体亚基 γ -2($GABA_A R\gamma^2$)、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPA)、NMDAR2A一抗(英国Abcam),山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠IgG(美国Signalway Antibody),ECL发光试剂盒(安徽白鲨生物),PVDF膜(美国Millipore),FD快速高尔基染色试剂盒(美国FD Neuro Technologies),改良吉姆萨染色液(上海碧云天)。

旷场实验视频分析系统、强迫游泳实验视频分析系统(上海吉量),一次性无菌针灸针(0.18 mm×10 mm,苏州华佗),酶标仪(美国热电),双向电泳系统、Chemidoc XRS+化学发光成像系统(美国Bio-rad),组织切片数字扫描仪(匈牙利3DHISTECH),振动切片机(德国Lecia),倒置显微镜(日本Nikon),数字模拟器、Axon放大器(美国Molecular Devices),三维电动微操、玻璃电极水平拉制仪(美国Sutter),玻璃电极垂直拉制仪(日本Narishiga),硼酸玻璃毛细管(美国WPI)。

1.3 造模方法

采用乙烯基二氧化环己烯(VCD)联合慢性不可预测应激(CUMS)建立小鼠围绝经期伴抑郁模型。既往研究^[17]表明,VCD诱导的卵巢功能早衰与人类围绝经期的激素水平变化相似,故本研究采用腹腔注射VCD 160 mg·kg⁻¹·d⁻¹进行造模,空白组注射等量芝麻油,连续注射20 d。小鼠出现动情周期紊乱,血清 E_2 和PROG含量下降,FSH上升为造模成功^[18]。

本研究选取13种应激刺激进行CUMS,包括倾鼠鼠笼、潮湿垫料、足底电击、24 h禁食、24 h禁水、冷热应激、昼夜颠倒、白噪音、夹尾1 min、4℃冰水游泳5 min、束缚应激2 h、频闪灯刺激(180次/min, 12 h)、通宵照明(24 h)。刺激方案通过随机数法生成。每天使用2~3种刺激的组合,并对相邻刺激进行调整,最好是短期和长期刺激的组合,刺激持续28 d^[19]。抑郁症造模成功标准^[20]:经CUMS干预后,与空白组相比,旷场实验中央区探索路程和时间、蔗糖偏好率下降,强迫游泳实验的静止不动时间增加。

1.4 各组处理方法

造模成功后,电针组和药物组给予相应的干预。干预期间,各组每天仍进行CUMS。

电针组:肾俞和三阴交是常用的补肾穴位^[21],百会和印堂是治疗情绪相关疾病的常用穴位^[22-23]。因此,本研究选取这4个穴位。穴位定位参考文献^[24],"肾俞"位于第2腰椎水平,背中线旁3 mm;"三阴交"位于内踝尖以上5 mm;"百会"位于顶骨中心;"印堂"位于眉间线的中点。"百会""印堂"沿皮肤斜刺2 mm,"肾俞""三阴交"每次均单侧直刺3 mm,隔日更换。"百会""印堂"和"肾俞""三阴交"分别连接一对电极,疏密波,2 Hz/50 Hz,强度为0.8~1 mA,每日1次,每次30 min,共28 d。

药物组:皮下注射 $E_2(10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1})$,1次/d,连续注射28 d。

1.5 观察指标及检测方法

强迫游泳实验(FST)评价小鼠的绝望行为:干预结束后进行检测,每组取8只小鼠的行为学结果进行统计。FST采用直径为25 cm,高度为40 cm的透明有机玻璃水箱,水深25 cm,温度25℃。总测试时间为6 min,小鼠适应1 min后,在5 min内测量小鼠的静止不动时间。肢体停止运动记录为不动,除了漂浮平衡所必需的微小运动。

蔗糖偏好实验(SPT)评价小鼠的快感缺失行为:干预结束后进行检测,每组取8只小鼠的行为学结果进行统计。SPT实施前,每笼给予2瓶10 g/L蔗糖溶液以适应环境,随后24 h禁水禁食。开始测试时,给小鼠一瓶10 g/L的蔗糖溶液和一瓶纯净水,2 h后测量两种溶液的摄取量,计算蔗糖偏好率。蔗糖偏好率(%)=蔗糖溶液摄入量÷(蔗糖溶液摄入量+纯净水摄入量)×100%。

旷场测试(OFT):主要用于评价小鼠的自发活动能力和探索欲。干预结束后进行检测,每组取

8只小鼠的行为学结果进行统计。OFT采用一个40 cm×40 cm的正方形盒子,壁高50 cm,画线将底部分成16个相等的正方形。4个中心广场被认为是中央区。将每只小鼠轻轻置于中央区域后,允许其自由探索5 min,记录总路程、中央区探索时间和距离,中央区探索的路程比=中央区探索的路程÷总路程,中央区探索的时间比=中央区探索的时间÷总时间。在对每只动物进行测试后,研究人员从盒子里取出粪便,并用75%乙醇擦拭底部,以减少气味干扰。

动情周期检测:VCD诱导后每日09:00~10:00观察小鼠阴道脱落细胞形态。小鼠仰卧位固定,用移液枪吸取20 μL的0.9%氯化钠溶液并插入小鼠阴道内反复抽吸多次,涂抹在载玻片上。涂片干燥后用95%乙醇固定3 min,随后用瑞氏染液染色5 min,冲洗后立即用吉姆萨染色5 min。最后用PBS溶液冲洗,待干燥后在显微镜下观察细胞形态和分期。VCD诱导后连续5 d逐只进行阴道涂片检查,以动情周期紊乱为造模成功。

ELISA法检测小鼠血清 E_2 、PROG、FSH含量:行为学检测结束后,使用异氟烷麻醉小鼠,眼眶静脉取血,室温放置4 h,4℃离心10 min,提取上清液,于-80℃冰箱保存。将各种试剂移至室温平衡至少30 min;将酶标板取出,每孔加入待测样本50 μL,随后每孔加入酶结合物混合液50 μL(空白对照孔除外),充分混匀,贴上不干胶封片,37℃温育1 h;弃去孔内液体,将洗液工作液按200 μL/孔注入孔内,静置10 s甩干,重复3次后拍干;每孔加显色剂A液50 μL,显色剂B液50 μL,振荡混匀后,37℃避光显色15 min,每孔加终止液50 μL,用酶标仪在450 nm波长依序测量各孔的吸光度值,绘制标准品标准曲线后得到回归方程,并根据回归方程计算血清 E_2 、PROG、FSH含量。

Western blot法检测小鼠mPFC的突触相关蛋白表达:采用异氟烷麻醉后采用0.9%氯化钠溶液对小鼠进行心脏灌注,每组取3只小鼠mPFC组织置于-80℃冰箱冻存。称取20~30 mg的mPFC组织,加入10倍体积的匀浆混合物,在低温组织匀浆机中粉碎组织,离心提取上清液。用BCA试剂盒测定蛋白浓度,最终浓度用RIPA缓冲液和5×上样缓冲液平衡。最后,在100℃下加热10 min后,变性蛋白在-80℃保存。20~30 μg的蛋白样品通过6%~10%的SDS-PAGE电泳分离,然后转移到PVDF膜上。与5%脱脂奶粉在室温下孵育2 h,随后与一

抗(1:1 000)在4℃下孵育过夜。PVDF膜用TBST洗涤,室温下用二抗(1:10 000)孵育1 h。通过Bio-Rad化学发光成像系统可视化蛋白表达,并通过Image Lab检测蛋白的灰度值,以GAPDH作为内参,以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

高尔基染色分析mPFC中锥体神经元形态:每组取3只小鼠采用异氟烷麻醉,采用0.9%氯化钠溶液对小鼠进行心脏灌注,尽快地从颅骨中取出脑组织。用双蒸水快速冲掉组织表面的血液后,使用FD快速高尔基染色试剂盒对新鲜脑进行高尔基染色。把组织浸泡在溶液A和B等体积混合的浸渍液中,室温下避光保存两周,每6 h更换新的浸渍液。随后转移组织到溶液C中室温环境下放置至少72 h,用冷冻切片机将组织切成150 μm厚的薄片。参考小鼠脑立体坐标切片图以用于分析mPFC中单个锥体神经元,其区域包括前边缘皮层(PrL)、边缘下皮层(IL)和扣带皮层1区(Cg1)^[25]。神经元的选择标准如下:相对“独立”,与其他神经元重叠较少,神经元突的分支不被切断。在40倍物镜下,利用ImageJ软件的NeuronJ插件对锥体神经元的树突分支轨迹进行跟踪,并分析其数量和长度。然后,采用Sholl分析法分析每10 μm长的锥体神经元与同心圆之间的交叉点个数,计算出交叉点总数。

脑片全细胞膜片钳电生理技术检测mPFC锥体神经元突触功能:每组选取3只小鼠麻醉后灌注预冷人工脑脊液(ACSF)。ACSF的配方为:d-葡萄糖25 mmol/L、碳酸氢钠25 mmol/L、磷酸氢二钠1.25 mmol/L、氯化钾2.5 mmol/L、氯化镁0.1 mmol/L、氯化钠127 mmol/L、氯化钙2 mmol/L。取新鲜脑组织后立即置于含有95% O₂和5% CO₂的预冷ACSF中。采用徕卡VT1200S振动切刀切取280 μm厚的冠状切片,在34℃充氧ACSF中孵育30 min,室温孵育至少1 h。切片转移到记录槽中,在34℃含氧ACSF中以2 mL/min的流速浸泡。在mPFC中找到锥体神经元并使用多钳位700b放大器记录电生理信号,电极的电压和电阻分别为-70 mV和5~8 MΩ。给予0.2 mL电极正压,下移电极,使电极尖端接触封接锥体神经元,撤除正压后给予负压破细胞膜,待细胞破膜稳定后记录电生理信号。记录抑制性突触后电流(mIPSC)或兴奋性突触后电流(mEPSC)时则采用氯化铯溶液作为填充液并在添加阻滞剂后进行记录,mEPSC阻滞剂为1 μmol/L TTX和20 μmol/L BMI,mIPSC阻滞剂为1 μmol/L

TTX、100 μmol/L AP5和20 μmol/L CNQX。在-70 mV电压下进行记录,收集每个神经元的mEPSC、mIPSC频率及mEPSC和mIPSC幅值,并计算mEPSC频率或幅值与mIPSC频率或幅值的比值以评估E/I平衡。

1.6 统计分析

采用SPSS23.0软件进行数据统计。正态分布的数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,不符合正态分布的数据表示为中位数(上下四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]。符合正态分布的数据多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD或Dunnett's T3检验;不符合正态分布,则使用非参数检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组小鼠的抑郁样行为评估比较

与空白组小鼠相比,模型组小鼠OFT中央区探索时间和路程减少($P<0.001$),SFT静止时间增加($P<0.05$),糖水偏好率降低($P<0.05$)。与模型组相比,E₂组和电针组的OFT中央区区域的探索路程和时间增加($P<0.001, P<0.05$),FST的静止时间缩短($P<0.01, P<0.05$),糖水偏好率增加($P<0.001$)。见图1。

2.2 各组小鼠血清E₂、FSH、PROG含量比较

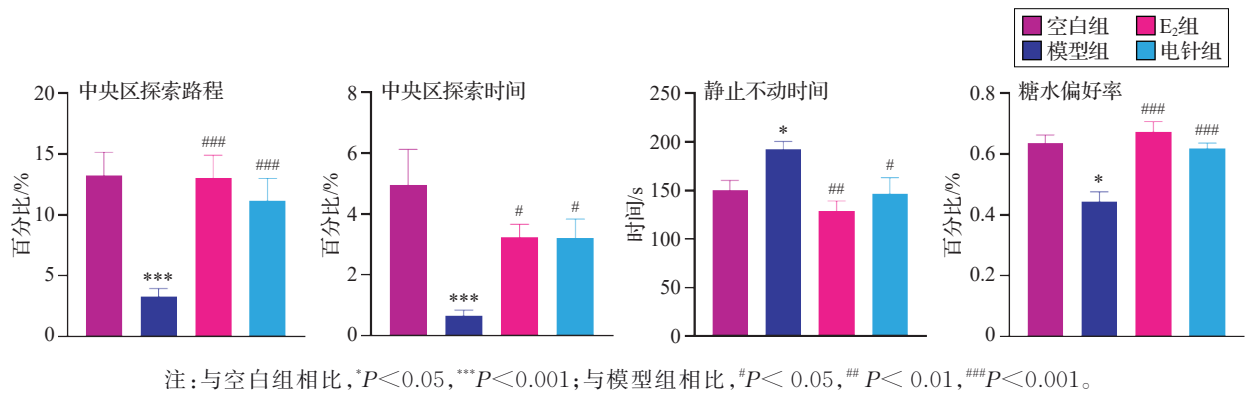
与空白组比较,模型组E₂、PROG含量降低($P<0.01$),FSH含量升高($P<0.01$),与围绝经期的激素特征一致。与模型组比较E₂组血清E₂、PROG含量升高($P<0.01$),FSH含量降低($P<0.01$),电针组与模型组比较差异无统计学意义。见图2。

2.3 各组小鼠mPFC锥体神经元的形态学比较

模型组的树突分支数量和总树突长度明显低于空白组($P<0.001$)。E₂组和电针组的树突分支数量和树突总长度较模型组增加($P<0.001$)。通过在体细胞周围画等距同心圆来验证树突的长度。随后计算树突与同心圆相交点的数量,这样相交点的数量可以间接反映树突的长度和分支的数量。模型组小鼠的同心圆半径和交点数低于空白组($P<0.05, P<0.001$),E₂组和电针组的同心圆半径和交点数大于模型组($P<0.01, P<0.05, P<0.001$)。见图3。

2.4 各组小鼠mPFC中Glu能和GABA能突触相关蛋白的表达比较

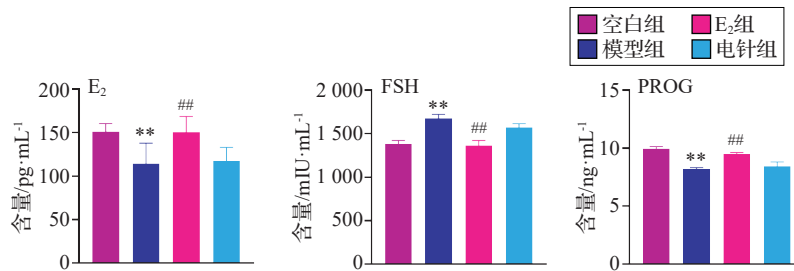
与空白组相比,模型组mPFC中Glu能突触相



注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图1 各组小鼠旷场实验、强迫游泳实验、糖水偏好实验结果的比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

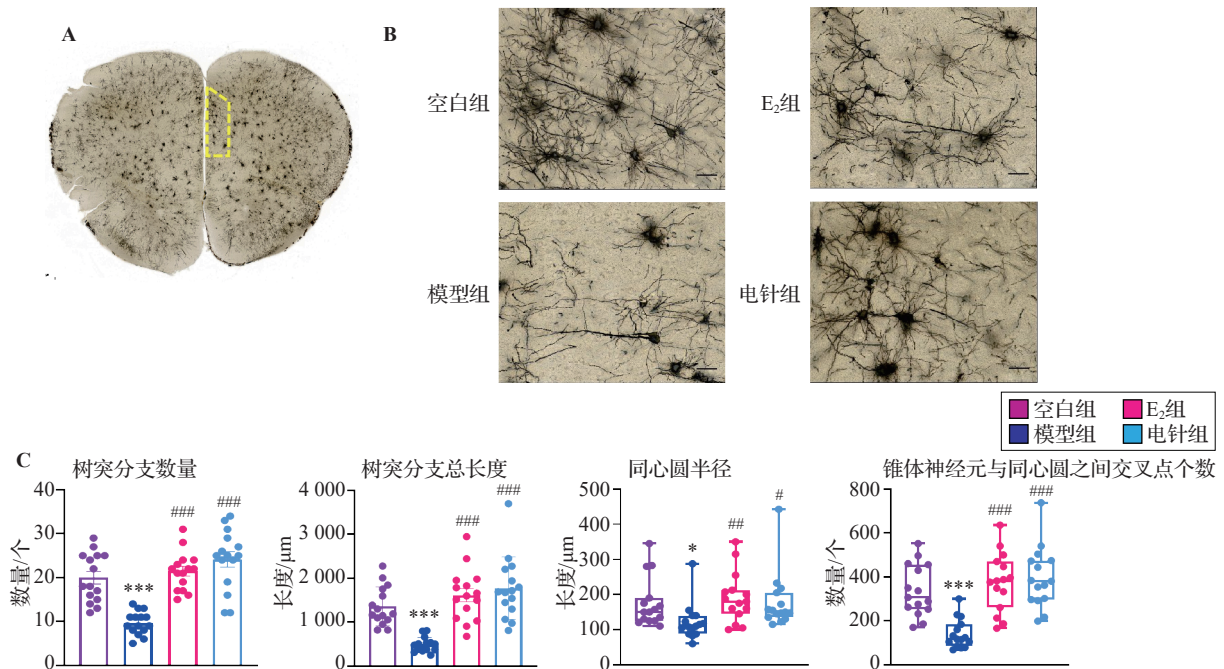
Fig. 1 Comparison of open field test, forced swimming test and sucrose preference test results of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 8 mice/group)



注:E₂为雌二醇,FSH为促卵泡激素,PROG为孕酮。与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

图2 各组小鼠血清E₂、FSH、PROG的含量比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of the contents of E₂, FSH and PROG in the serum of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 8 mice/group)



注:mPFC为前额叶皮层。A为小鼠mPFC切片高尔基染色图片,黄色框区域为目标分析区域;B为mPFC锥体神经元形态,标尺=50 μm;C为mPFC锥体神经元分支的数量、长度、同心圆半径和交叉数比较[$\bar{x} \pm s, M(P_{25}, P_{75})$, 15个锥体神经元/组]。

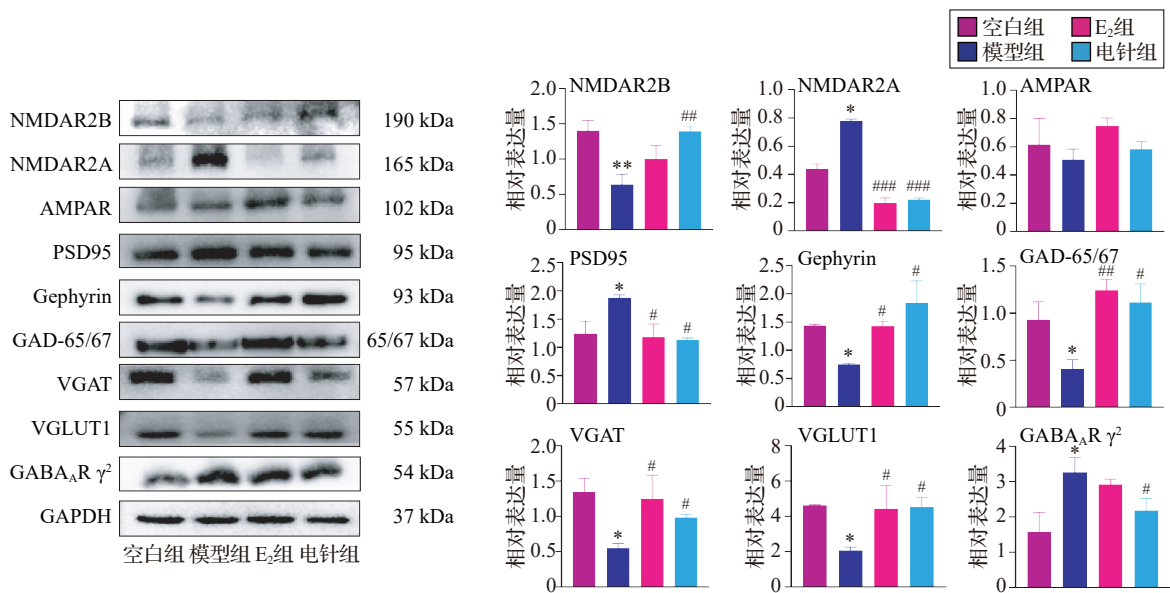
与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图3 各组小鼠mPFC锥体神经元形态比较

Fig. 3 Comparison of the morphological characteristics of pyramidal neurons in the prefrontal cortex of mice in the 4 groups

关蛋白 PSD95 和 NMDAR2A 的表达升高 ($P < 0.05$), VGLUT1 和 NMDAR2B 的表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 模型组 mPFC 中 GABA 能突触相关蛋白 GAD-65/67、Gephyrin、VGAT 的表达降低 ($P < 0.05$), GABA_AR γ^2 的表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 电针组和 E₂ 组的 PSD95 和 NMDAR2A

表达降低 ($P < 0.05, P < 0.001$), VGLUT1 的表达升高 ($P < 0.05$); 电针组的 NMDAR2B 表达较模型组升高 ($P < 0.01$)。电针组和 E₂ 组 GAD-65/67、Gephyrin、VGAT 的表达升高 ($P < 0.01, P < 0.05$), 电针组的 GABA_AR γ^2 的表达下降 ($P < 0.05$)。见图 4。



注: mPFC 为前额叶皮层, NMDAR2B 为 N-甲基 D-天冬氨酸受体亚型 2B, NMDAR2A 为 N-甲基 D-天冬氨酸受体亚型 2A, AMPAR 为 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体, PSD95 为突触后密度蛋白 95, Gephyrin 为突触后锚定蛋白桥尾蛋白, GAD-65/67 为谷氨酸脱羧酶, VGAT 为 GABA 囊泡转运蛋白, VGLUT1 为 Glu 囊泡转运蛋白 1, GABA_AR γ^2 为 GABA_A 受体亚基 γ -2。与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 4 各组小鼠 mPFC 中 NMDAR2B、NMDAR2A、AMPA、PSD95、Gephyrin、GAD-65/67、VGAT、VGLUT1、GABA_AR γ^2 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, 3$ 只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of protein expression levels of NMDAR2B, NMDAR2A, AMPAR, PSD95, Gephyrin, GAD-65/67, VGAT, VGLUT1, and GABA_AR γ^2 in mPFC of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s, 3$ mice/group)

2.5 各组小鼠 mPFC 锥体神经元 Glu/GABA 突触后的电流平衡比较

为进一步探讨电针对突触可塑性的作用, 本研究利用脑片全细胞膜片钳技术记录突触传递过程中的微小突触后电流, 分析突触传递过程中的 Glu 能和 GABA 能的传递情况。微型突触后电流的频率和振幅分别反映了突触前兴奋性/抑制性神经递质的释放和突触后的受体的数量。在 mEPSC 频率比较中, 各组间差异无统计学意义; 模型组 mEPSC 振幅高于空白组 ($P < 0.01$), 电针组、E₂ 组低于模型组 ($P < 0.01$)。在 mIPSC 频率的比较中, 模型组低于空白组 ($P < 0.001$), 电针组、E₂ 组高于模型组 ($P < 0.01, P < 0.001$), 而 mIPSC 的振幅在各组间差异无统计学意义。模型组 mEPSC/mIPSC 频率比值较空白组升高 ($P < 0.01$), 而电针组、E₂ 组较模型

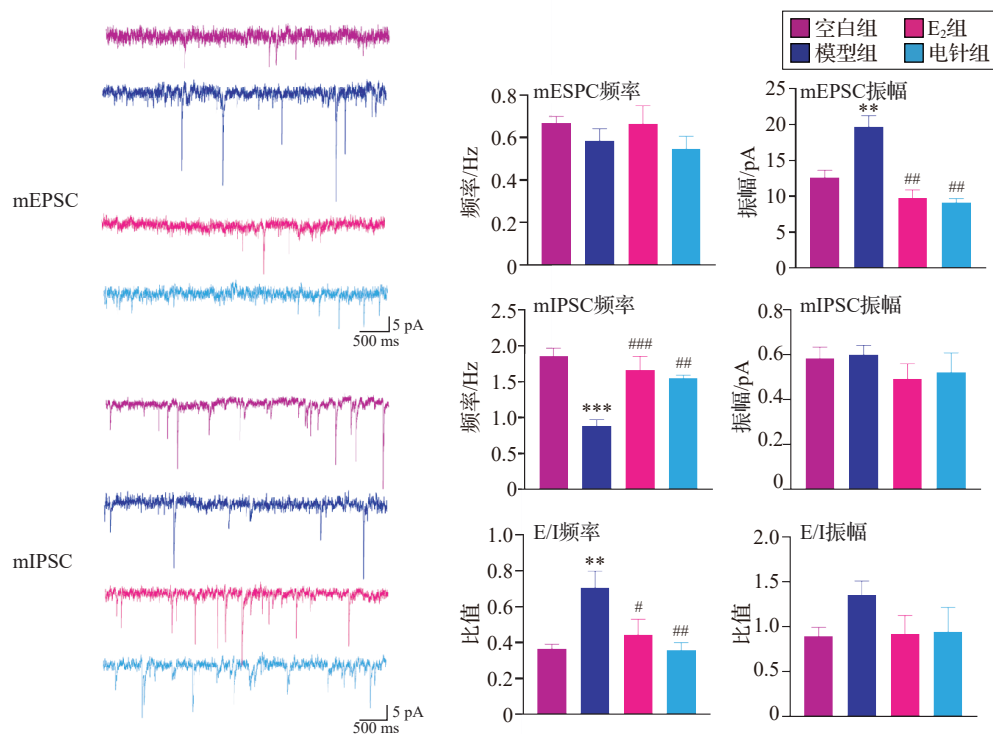
组下降 ($P < 0.01, P < 0.05$)。mEPSC/mIPSC 振幅比值各组间比较差异无统计学意义。见图 5。

3 讨论

既往研究提示 PFC 中 Glu 能及 GABA 能神经传导异常致 Glu/GABA (即 E/I) 平衡失调进而导致突触的功能和结构可塑性受损是抑郁症的重要发病机制^[26]。本研究从 Glu/GABA 平衡介导的突触可塑性的角度阐明围绝经期抑郁症的发病机制, 并揭示电针治疗的作用可能靶点。本研究结果显示电针从以下几方面影响围绝经期抑郁模型小鼠 mPFC, 从而起到抗抑郁的治疗作用。

3.1 电针改善围绝经期抑郁症的机制不依赖于调整性激素水平

VCD 诱导卵巢功能下降后阴道涂片显示未见



注:mPFC为前额叶皮层,mEPSC为兴奋性突触后电流,mIPSC为抑制性突触后电流,E/I为mEPSC/mIPSC。与空白组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组相比,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图5 各组小鼠mPFC中锥体神经元的微小突触后电流比较($\bar{x} \pm s$, 8个锥体神经元/组)

Fig. 5 Comparison of mini postsynaptic currents of pyramidal neurons in mPFC of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 8 pyramidal neurons/group)

成熟脱落细胞,连续5 d无动情周期变化;性激素水平检测中,VCD注射后小鼠表现出E₂、PROG含量下降,FSH上升,提示VCD成功诱导围绝经期模型。SPT用于评估小鼠的行为绝望状态,记录动物产生绝望的不动状态过程中的一系列参数;SPT用于评估快感缺乏样行为;OFT用于测量小鼠的活动水平和探索行为评估其情绪应激反应。CUMS造模后,小鼠表现为在OFT中央区探索时间和距离减少,SFT静止时间增加,SPT偏好率降低,提示围绝经期小鼠表现出抑郁样行为。有趣的是,电针组的性激素水平与模型组比较未见统计学差异,但电针组的OFT中心区域的探索时间和距离增加,FST的静止时间缩短,SPT偏好率增加,提示电针可以改善围绝经期抑郁样行为,该机制不依赖于调整性激素水平。

3.2 电针重塑突触结构可塑性

突触可塑性是抑郁症发病的重要病理机制^[27]。在暴露于慢性应激的雄性啮齿动物中,PFC中的神经元表现出树突状萎缩,从而降低前额叶活动和可塑性^[28-29]。PFC活动减少会影响其功能,导致情绪障碍^[27]。在本研究中,围绝经期抑郁症小鼠mPFC

中突触树突分支和锥体神经元密度的减少,树突分支数量的减少和总树突长度缩短减少了锥体神经元间的相互连接,影响了神经递质Glu和GABA的传递。电针干预显著促进了树突结构的复杂性恢复。这种结构重塑是神经环路功能恢复的物质基础,为后续突触功能改善提供了结构支撑。

3.3 电针纠正围绝经期抑郁模型小鼠mPFC的突触相关蛋白表达失衡

突触结构可塑性与突触相关蛋白的表达有关,突触相关蛋白参与Glu和GABA的合成、释放和传递,最终影响突触信号传递。VGLUT1可反映突触前的Glu的转运和释放水平,PSD95和Glu受体的表达情况(本研究检测与抑郁症关系较为密切的Glu受体AMPA、NMDAR2A和NMDAR2B)可反映Glu在突触后的活性;GAD-65/67可反映GABA的突触前的合成情况,VGAT可反映突触前的GABA的转运和释放水平。GABA的突触后锚定蛋白Gephyrin、GABA受体(本研究检测与抑郁症密切相关的GABA_AR γ^2)可反映GABA在突触后的活性。电针对围绝经期抑郁模型小鼠mPFC的突触相关蛋白有以下的作用:(1)Glu能系统:围

绝经期抑郁模型小鼠表现出突触前的Glu释放减少(VGLUT1下调)和突触后的信号异常增强(PSD95、NMDAR2A上调,NMDAR2B下调)的矛盾现象,提示突触前的功能缺陷可能触发突触后的代偿性改变(如PSD95、NMDAR2A增多)。电针干预有效上调了VGLUT1和NMDAR2B的表达,同时下调了PSD95和NMDAR2A的表达,表明其能双向调节Glu能突触前的释放能力和突触后的受体组成,恢复Glu能信号稳态。(2)GABA能系统:围绝经期抑郁模型小鼠mPFC存在显著的GABA能传递缺陷,表现为GAD-65/67、VGAT及Gephyrin等的表达显著降低,同时伴随GABA受体(GABA_AR γ^2)的代偿性上调。这反映了GABA合成与释放减少,突触后通过增加受体表达试图代偿性接收更多信号。电针干预有效上调了GAD-65/67、VGAT和Gephyrin的表达,同时下调了GABA_AR γ^2 的表达,表明电针直接促进了GABA的合成、囊泡装载/释放及突触后致密区的有效锚定,从而恢复了GABA能抑制性张力,并逆转了受体代偿性变化。

3.4 电针恢复突触功能可塑性(Glu/GABA平衡)

(1)Glu能功能:围绝经期抑郁模型小鼠mPFC中锥体神经元的mEPSC振幅显著增大,而频率无变化,这与上述分子水平发现的突触后蛋白(PSD95、NMDAR2A)过度表达一致,表明突触后的神经元对Glu的反应性异常增强以代偿应对未变的突触前Glu释放频率。(2)GABA能功能:围绝经期抑郁模型小鼠mPFC中锥体神经元的mIPSC频率显著降低,而振幅无变化,这与分子水平发现的突触前的蛋白(GAD65/67, VGAT)表达下降高度吻合,表明突触前的GABA释放减少是核心缺陷,突触后对GABA的反应性相对正常。(3)Glu/GABA(E/I)平衡失调与电针修复:围绝经期抑郁模型小鼠mPFC存在Glu/GABA平衡显著失调:Glu能突触前的释放减少而突触后的反应亢进(E \uparrow)伴随GABA能突触前的释放抑制(I \downarrow),这种双重失衡导致皮层网络兴奋性异常,与抑郁病理高度相关。电针干预有效降低了mEPSC振幅(减轻Glu能突触后的反应亢进),同时显著提高了mIPSC频率(恢复GABA能突触前的释放),这一结果在功能层面直接证实了电针通过协同调控Glu能和GABA能系统,有效逆转了围绝经期抑郁模型小鼠mPFC中的Glu/GABA(E/I)平衡失调。

综上所述,本研究发现电针通过多靶点作用,同步调节mPFC中Glu能和GABA能神经元的突

触可塑性。在结构层面,电针促进mPFC锥体神经元树突复杂性恢复,为功能性突触重建提供基础。在分子层面,电针双向调节Glu能(上调VGLUT1,下调PSD95及NMDAR2A,上调NMDAR2B)和GABA能(上调GAD65/67、VGAT、Gephyrin,下调受体GABA_AR γ^2)突触相关蛋白的表达,纠正围绝经期抑郁模型小鼠mPFC中相关的蛋白表达紊乱。在功能层面,电针最终表现为降低Glu能突触后的反应性(mEPSC振幅 \downarrow)并增强GABA能突触前的抑制性递质释放(mIPSC频率 \uparrow),从而有效恢复围绝经期抑郁模型小鼠mPFC神经网络关键的E/I平衡。

本研究首次从“结构-分子-功能”多维度系统阐明了电针改善围绝经期抑郁模型小鼠mPFC突触可塑性的核心机制在于恢复Glu/GABA介导突触可塑性。这不仅深化了对围绝经期抑郁神经生物学机制的理解(特别是突出了GABA能缺陷和Glu/GABA平衡失调的关键作用),更从突触可塑性角度为电针治疗围绝经期抑郁症提供了坚实的科学依据。电针展现出的多靶点、双向调节优势,提示其在调节复杂神经网络平衡方面具有独特潜力。未来研究可进一步探索电针调控这些分子靶点和神经环路的上游信号通路(如神经甾体、神经营养因子等),并评估该机制在临床围绝经期抑郁症患者中的适用性,为开发更精准有效的非药物抗抑郁策略提供方向。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。刘健华为本刊编委,但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] Freeman E W, Sammel M D, Lin H, et al. Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with No history of depression [J]. Arch Gen Psychiatry, 2006, 63(4): 375.
- [2] Williams K. Perimenopausal depression: review of recent findings and implications for future research [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2023, 35(2): 150-153.
- [3] Maki P M, Kornstein S G, Joffe H, et al. Guidelines for the evaluation and treatment of perimenopausal depression: summary and recommendations [J]. Menopause, 2018, 25(10): 1069-1085.
- [4] Joffe H, de Wit A, Coborn J, et al. Impact of estradiol variability and progesterone on mood in perimenopausal women with depressive symptoms [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(3): e642-e650.
- [5] Samardzic J, Jadzic D, Hencic B, et al. Introductory chapter: GABA/glutamate balance: a key for normal brain functioning

- [M]//GABA And Glutamate - New Developments In Neurotransmission Research. InTech2018.
- [6] Duman R S, Sanacora G, Krystal J H. Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments[J]. *Neuron*, 2019, 102(1): 75-90.
- [7] Godfrey K E M, Gardner A C, Kwon S, et al. Differences in excitatory and inhibitory neurotransmitter levels between depressed patients and healthy controls: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Psychiatr Res*, 2018, 105: 33-44.
- [8] Del Río J P, Alliende M I, Molina N, et al. Steroid hormones and their action in women's brains: the importance of hormonal balance[J]. *Front Public Health*, 2018, 6: 141.
- [9] Gordon J L, Girdler S S, Meltzer-Brody S E, et al. Ovarian hormone fluctuation, neurosteroids, and HPA axis dysregulation in perimenopausal depression: a novel heuristic model[J]. *Am J Psychiatry*, 2015, 172(3): 227-236.
- [10] Brann D W, Lu Y J, Wang J, et al. Neuron-derived estrogen-a key neuromodulator in synaptic function and memory[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13242.
- [11] Baudry M, Bi X, Aguirre C. Progesterone-estrogen interactions in synaptic plasticity and neuroprotection [J]. *Neuroscience*, 2013, 239: 280-294.
- [12] Bredemann T M, McMahon L L. 17 β Estradiol increases resilience and improves hippocampal synaptic function in helpless ovariectomized rats [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2014, 42: 77-88.
- [13] Rubinow D R, Johnson S L, Schmidt P J, et al. Efficacy of estradiol in perimenopausal depression: so much promise and so few answers[J]. *Depress Anxiety*, 2015, 32(8): 539-549.
- [14] Johansson Å, Schmitz D, Höglund J, et al. Investigating the effect of estradiol levels on the risk of breast, endometrial, and ovarian cancer[J]. *J Endocr Soc*, 2022, 6(8): bvac100.
- [15] Zhao F Y, Zheng Z, Fu Q Q, et al. Acupuncture for comorbid depression and insomnia in perimenopause: a feasibility patient-Assessor-blinded, randomized, and sham-controlled clinical trial [J]. *Front Public Health*, 2023, 11: 1120567.
- [16] Yang N N, Lin L L, Li Y J, et al. Potential mechanisms and clinical effectiveness of acupuncture in depression [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2022, 20(4): 738-750.
- [17] Fernandes R D, Hall A, Ferguson M, et al. Cardiac changes during the peri-menopausal period in a VCD-induced murine model of ovarian failure[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2019, 227(1): e13290.
- [18] 李修恒, 汤玲, 孙天琳, 等. 更欣汤对围绝经期失眠模型小鼠下丘脑结节状乳头体核雌激素受体和食欲素 A 的影响 [J]. *中医杂志*, 2024, 65(23): 2461-2467.
- Li X H, Tang L, Sun T L, et al. Effects of Gengxin decoction (更欣汤) on oestrogen receptors and orexin A in the nucleus accumbens of the hypothalamus nodularis papillaris in perimenopausal insomnia model mice (in Chinese) [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 65(23): 2461-2467.
- [19] Liu R L, Zhou H, Qu H L, et al. Effects of aerobic exercise on depression-like behavior and TLR4/NLRP3 pathway in hippocampus CA1 region of CUMS-depressed mice [J]. *J Affect Disord*, 2023, 341: 248-255.
- [20] 易佳, 张涌, 孙易娜, 等. 鹿角胶-酸枣仁调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对 CUMS 大鼠神经保护的机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(10): 1864-1869.
- Yi J, Zhang Y, Sun Y N, et al. A mechanism study on the neuroprotective effects of *Colla cornus Cervi-Semen Ziziphi Spi-nosae* via regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in CUMS rats (in Chinese) [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2025, 36(10): 1864-1869.
- [21] Wang Y P, Yu Q. The treatment of menopausal symptoms by traditional Chinese medicine in Asian countries [J]. *Climacteric*, 2021, 24(1): 64-67.
- [22] Yamamoto T, Kawanokuchi J, Nagaoka N, et al. Antidepressant effects of acupuncture in a murine model: regulation of neurotrophic factors [J]. *Acupunct Med*, 2023, 41(1): 38-47.
- [23] Liu C Y, Zhao Y N, Qin S, et al. Randomized controlled trial of acupuncture for anxiety and depression in patients with chronic insomnia [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(18): 1426.
- [24] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第 3 部分: 小鼠 [J]. *针刺研究*, 2021, 46(5): 445-446.
- China Association of Acupuncture and Moxibustion. Nomenclature and location of acupuncture points for laboratory animals. Part 3: mice [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(5): 445-446.
- [25] George Paxinos, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates: second edition [M]. USA: A Harcourt Science and Technology Company, 2001.
- [26] Xu A P, Cui S, Wang J H. Incoordination among subcellular compartments is associated with depression-like behavior induced by chronic mild stress [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2016, 19(5): pyv122.
- [27] Negrón-Oyarzo I, Aboitiz F, Fuentealba P. Impaired functional connectivity in the prefrontal cortex: a mechanism for chronic stress-induced neuropsychiatric disorders [J]. *Neural Plast*, 2016, 2016: 7539065.
- [28] Radley J J, Rocher A B, Miller M, et al. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex [J]. *Cereb Cortex*, 2006, 16(3): 313-320.
- [29] Cook S C, Wellman C L. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex [J]. *J Neurobiol*, 2004, 60(2): 236-248.

收稿日期: - - 修回日期: - -