

电针调控下丘脑室旁核促肾上腺皮质激素释放激素神经元活动改善慢性束缚应激小鼠抑郁样行为

林德荣^{1,2}, 李 声³, 黄键澎³, 罗树雄¹, 刘健华³, 薛爱国¹

(¹广州中医药大学东莞医院, 广东东莞 523000; ²广州中医药大学第九临床医学院, 广东东莞 523000; ³广州中医药大学第二附属医院, 广州 510120)

【摘要】 目的:观察电针“合谷”“太冲”对慢性束缚应激(CRS)小鼠抑郁样行为及下丘脑室旁核(PVN)促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)神经元相关活动的影响,并探讨其可能机制。**方法:**雄性C57BL/6J小鼠和CRH-Cre小鼠按实验目的分队列检测。采用CRS建立抑郁样行为模型。电针组给予电针双侧“合谷”“太冲”干预。采用强迫游泳、悬尾和旷场实验评价行为学变化,ELISA法检测血清CRH、促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质酮(CORT)水平,免疫荧光法及c-Fos/mCherry共标法检测PVN区神经元激活及mCherry标记的PVN CRH神经元中c-Fos阳性比例,以光纤钙成像记录PVN区CRH神经元事件相关钙活动;采用氯氮平-N-氧化物激活PVN区CRH神经元,观察阈下应激小鼠行为学变化及电针效应。**结果:**与空白组比较,模型组强迫游泳和悬尾不动时间延长($P<0.01$, $P<0.001$),旷场周围行程增加($P<0.001$),血清CRH、ACTH和CORT水平升高($P<0.0001$, $P<0.001$),PVN区c-Fos阳性细胞数及c-Fos/mCherry双阳性细胞占mCherry阳性细胞百分比上升($P<0.05$)。与模型组比较,电针组强迫游泳和悬尾不动时间缩短($P<0.05$),旷场周围行程减少($P<0.001$),血清ACTH和CORT水平下降($P<0.05$, $P<0.0001$),PVN区c-Fos阳性细胞数及c-Fos/mCherry双阳性细胞占mCherry阳性细胞百分比下降($P<0.05$),血清CRH水平呈降低趋势但差异无统计学意义。与针刺前比较,针刺期间和针刺后PVN区CRH神经元0~5 s时间窗内 $\Delta F/F$ 曲线下面积和峰值 $\Delta F/F$ 降低($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.0001$)。阈下应激条件下,化学遗传学激活PVN区CRH神经元可延长强迫游泳实验和悬尾实验的不动时间($P<0.0001$, $P<0.001$),减少旷场实验的周围行程($P<0.05$, $P<0.001$),电针干预可减轻上述改变($P<0.001$, $P<0.0001$, $P<0.05$)。**结论:**电针“合谷”“太冲”可改善CRS小鼠抑郁样行为,其作用可能与降低下丘脑-垂体-肾上腺轴相关激素反应、减弱PVN区神经元激活、降低PVN区CRH神经元中c-Fos阳性比例及调节PVN区CRH神经元事件相关钙活动有关。

【关键词】 电针;慢性束缚应激;抑郁样行为;下丘脑室旁核;促肾上腺皮质激素释放激素;光纤钙成像;化学遗传学

Electroacupuncture ameliorates chronic restraint stress-induced depression-like behavior by modulating paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone neuron activity in mice

Lin Derong^{1,2}, Li Sheng³, Huang Jianpeng³, Luo Shuxiong¹, Liu Jianhua³, Xue Aiguo¹ (¹Dongguan Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523000, Guangdong Province, China; ²The Ninth Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523000, Guangdong Province; ³The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the effect of electroacupuncture (EA) at “Hegu” (LI4) and “Taichong” (LR3) on depressive-like behaviors and corticotropin-releasing hormone (CRH) neuron-related activity in paraventricular nucleus (PVN) in mice exposed to chronic restraint stress (CRS), so as to explore its possible

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260563

引用格式:林德荣,李声,黄键澎,等.电针调控下丘脑室旁核促肾上腺皮质激素释放激素神经元活动改善慢性束缚应激小鼠抑郁样行为[J].针刺研究,2026,51(10):1-10.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82474632,82104979);广东省中医药局科研项目(No.20261163);广东省中医院中医特色疗法专项(No.YN2025TS041)

通信作者:薛爱国, E-mail: xueaiguo@126.com

mechanism. **Methods** Male C57BL/6J mice and CRH-Cre mice were used in the separate experimental cohorts of this study. A CRS-induced depressive-like behavior model was established and treated with bilateral EA at LI4 and LR3 (2 Hz, 0.5 mA, 30 min in duration of stimulation, once daily for 7 d). Behavioral changes were evaluated using forced swimming, tail suspension and open-field tests. Serum CRH, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) levels were measured using ELISA. The PVN neuronal activation and the proportion of c-Fos-positive cells among mCherry-labeled PVN CRH neurons were evaluated using immunofluorescence staining and c-Fos/mCherry co-labeling. Event-related PVN CRH neuron calcium activity was recorded by using fiber photometry. Chemogenetic activation with clozapine-N-oxide (CNO) was further used to observe the behavioral changes under subthreshold stress and EA intervention effect. **Results** Compared with the blank group, the model group showed a significant increase in the immobility time in the forced swimming and tail suspension tests ($P<0.01$, $P<0.001$), distance traveled in the peripheral zone in the open-field test ($P<0.001$), contents of serum CRH, ACTH and CORT ($P<0.0001$, $P<0.001$), number of c-Fos positive cell in the PVN ($P<0.05$), and the percentage of c-Fos/mCherry double-positive cells among the mCherry-positive cells ($P<0.05$). Compared with the model group, EA shortened the immobility time in the forced swimming and tail suspension tests ($P<0.05$), decreased the distance traveled in the peripheral zone of the open-field test ($P<0.001$), reduced the contents of serum ACTH and CORT ($P<0.05$, $P<0.0001$), and decreased the number of PVN c-Fos-positive cell and the percentage of c-Fos/mCherry double-positive cells among the mCherry-positive cells ($P<0.05$), while serum CRH presented a lowering trend without statistically significant difference. The $\Delta F/F$ area under the curve and peak $\Delta F/F$ within the 0—5 s time window were considerably lower during and after EA than EA pre-treatment ($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.0001$). Under the subthreshold stress, chemogenetic activation of PVN CRH neurons prolonged the immobility time in the forced swimming and tail suspension tests ($P<0.0001$, $P<0.001$) and reduced the distance traveled in the peripheral zone in the open-field test ($P<0.001$); after EA, these behavioral changes were reversed ($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.0001$). **Conclusion** EA at LI4 and LR3 can ameliorate CRS-induced depressive-like behavior by down-regulating hypothalamic-pituitary-adrenal axis-related hormone responses, reducing PVN neuronal activation, decreasing the proportion of c-Fos-positive cells among the mCherry-labeled PVN CRH neurons, and modulating event-related PVN CRH neuron calcium activity.

[KEYWORDS] Electroacupuncture; Chronic restraint stress; Depressive-like behavior; Paraventricular nucleus; Corticotropin-releasing hormone; Fiber photometry; Chemogenetics

抑郁障碍是常见精神疾病之一,疾病负担较重,且常伴随多维度功能损害^[1-2]。现有药物和心理治疗虽可使部分患者获益,但起效延迟、病情复发和个体反应差异等问题仍较突出,寻找可解释、可干预的应激相关神经生物学靶点仍具有重要意义^[3]。针刺和电针治疗抑郁相关症状已有较多临床研究 and 系统评价报道,其作用可能涉及情绪、睡眠和躯体症状等多个维度^[4-6]。低强度电针可通过特定躯体感觉-自主神经通路调节内脏和应激反应,为针刺效应的神经解剖学解释提供依据^[7]。光纤钙成像和病毒介导的细胞群标记可用于在体观察特定神经元群活动,为行为学和分子检测提供时间动态证据^[8]。下丘脑室旁核(PVN)是下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴启动和应激整合的重要脑区^[9-10]。其中,促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)神经元既参与 CRH-促肾上腺皮质激素(ACTH)-皮质酮(CORT)级联反应,也可通过脑内投射影响防御、探索 and 适应性行为^[11]。以 hM3Dq 为代表的兴奋性化

学遗传学工具可在 Cre 依赖性条件下提高特定神经元群活动,用于分析特定细胞群激活是否足以诱发相关生理或行为效应^[12-13]。目前,针刺抗抑郁机制研究已涉及胶质细胞、炎症因子、神经递质、脑网络及自主神经调控等方面^[14-15],但电针“四关”是否通过下丘脑应激相关神经元群调节慢性应激后的情绪相关行为,仍缺乏从行为学、内分泌、在体神经元活动及细胞群功能操控层面的连续证据。基于此,本研究以慢性束缚应激(CRS)小鼠为对象,结合行为学、ELISA 法、PVN 区 c-Fos 免疫荧光及 c-Fos/mCherry 共标检测、CRH-Cre 小鼠 PVN 区 CRH 神经元光纤钙成像和化学遗传学激活实验,观察电针“合谷”“太冲”对 PVN 区 CRH 神经元相关活动及抑郁样行为的影响,为阐明电针调节慢性应激相关情绪行为的中枢机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠和 CRH-Cre 转

基因小鼠,8周龄,体质量18~20 g,购自广东至远生物医药科技有限公司,动物生产许可证号为SCXK(粤)2023-0066。动物饲养于广州中医药大学华南针灸研究中心,SPF级实验动物饲养设施,实验动物使用许可证号为SYXK(粤)2022-0179;饲养环境为温度(24±2)℃、相对湿度50%~60%、12 h/12 h明暗周期,自由摄食、饮水。按实验目的设置行为学/ELISA、免疫荧光、光纤钙成像和化学遗传学独立队列,随机分组,行为学评分、图像采集和定量分析均采用盲法。行为学实验每组8只;行为学检测完成后采血,每组7份符合检测质量要求的血清样本纳入ELISA法检测血清CRH、ACTH和CORT水平;c-Fos单标免疫荧光和c-Fos/mCherry共标实验均为5只/组;光纤钙成像实验最终纳入5只小鼠。化学遗传学实验待病毒表达稳定后分为对照组、阈下应激组、阈下应激+CNO组和阈下应激+CNO+电针组,每组8只。本实验通过广州中医药大学动物实验伦理委员会审查,伦理审批号为20250417003。

1.2 主要仪器和试剂

华佗牌一次性无菌针灸针(0.16 mm×7 mm,苏州医疗用品厂),HANS-200A电针仪(南京济生),R550型动物麻醉机、HOYI型单臂数显脑立体定位仪、R821型三色多通道光纤记录系统、FS800型冷冻切片机(深圳瑞沃德),NEXCOPE NCF1000激光共聚焦显微镜(宁波永新),EL×800型酶标仪(美国BioTek)。

异氟烷(100 mL/瓶,山东安特),1.25%即用型三溴乙醇溶液(南京爱贝),DAPI染色试剂、抗荧光淬灭封片剂、c-Fos一抗、CY3标记山羊抗小鼠IgG二抗及相应绿色荧光标记二抗(武汉赛维尔),小鼠CRH、ACTH、CORT ELISA试剂盒(上海江莱),PT-0196 rAAV-CAG-DIO-GCaMP6s-WPRE-hGH pA、PT-0115 rAAV-hSyn-DIO-mCherry-WPRE-hGH pA、AAV2/9-EF1α-DIO-hM3Dq-mCherry、CNO(武汉枢密)。

1.3 造模方法

采用CRS法建立抑郁样行为模型^[16]。模型组及电针组小鼠每日置于50 mL锥形离心管中6 h,束缚管内径约2.5 cm、长度约10 cm,并设置通气孔以保证呼吸通畅,连续21 d。每次束缚结束后将小鼠放回原饲养笼,自由摄食、饮水。每日使用75%乙醇消毒束缚管,待充分挥发后使用。空白组不接受束缚,仅在相同时间段接受同样的抓取和环境暴

露。造模成功标准主要依据CRS结束后模型动物总体状态改变及组水平行为学表现判定:模型动物出现活动减少、被毛欠光泽、反应迟缓或易激惹等应激后表现,并较正常小鼠表现为强迫游泳和悬尾不动时间延长、旷场活动模式异常,即判定模型建立成功。

1.4 干预方法

空白组和模型组在相同时间段采用与电针组相同的麻醉处理及固定方式,不予针刺和电刺激。

电针组于CRS结束后接受双侧“合谷”“太冲”电针干预。按照《实验针灸学》第9版常用实验动物针灸穴位附图并结合小鼠解剖定位,“合谷”位于前肢第1、第2掌骨之间,“太冲”位于后肢第1、第2跖骨结合部前方凹陷处。采用一次性无菌针灸针(0.16 mm×7 mm)浅刺,进针深度约2 mm;同侧“合谷”“太冲”连接电针仪一对输出电极,采用连续波,频率2 Hz、电流0.5 mA,以局部轻微颤动且无明显挣扎为宜,留针并通电30 min,每日1次,连续7 d^[17-18]。

化学遗传学实验中,除对照组外,其余3组均接受连续3 d阈下束缚应激。对照组和阈下应激组腹腔注射等体积0.9%氯化钠溶液,阈下应激+CNO组和阈下应激+CNO+电针组腹腔注射CNO(0.5 mg/kg)。CNO或0.9%氯化钠溶液均于每日干预前30 min注射,每日1次,连续7 d;阈下应激+CNO+电针组随后接受30 min电针干预,参数同上,其余各组同期固定30 min但不予电针。连续7 d干预结束后次日起,按旷场、悬尾和强迫游泳顺序连续3 d进行行为学检测,各实验间隔约24 h。

1.5 观察指标与检测方法

行为学检测情绪相关行为^[19]:于末次电针干预后连续3 d、每日9:00—15:00固定时间段进行,测试顺序为旷场实验、悬尾实验和强迫游泳实验,各实验间隔约24 h。测试前小鼠在行为实验室适应至少1 h。旷场实验用于观察自主活动及新异环境探索,将小鼠置于旷场中央自由活动10 min,记录后5 min的总行程、中心区和周围区相关指标。本研究结合图像轨迹和统计结果,选取周围行程作为主要分析指标。悬尾实验中将小鼠尾端固定后悬挂6 min,记录后5 min不动时间。强迫游泳实验用于评价行为绝望样表现,将小鼠置于装有清水的圆柱形容器中,测试6 min,记录后5 min不动时间。每次测试后清洁装置并去除气味干扰。

ELISA检测:行为学队列完成行为学检测后,

在上午固定时间段采用异氟烷吸入麻醉,经眼眶后静脉丛采血 0.5~1.0 mL。血液室温静置后于 4℃、 $2\,500\times g$ 离心 15 min,分离血清。各组采血时间和处理流程保持一致,每组 7 份符合检测质量要求的血清样本纳入分析。按试剂盒说明书检测血清 CRH、ACTH 和 CORT 含量,于酶标仪 450 nm 波长下读取吸光度值,并根据标准曲线计算样本浓度。

PVN 区 c-Fos 免疫荧光检测:免疫荧光队列小鼠于末次干预结束后 1 h 取材。小鼠采用异氟烷吸入麻醉(3% 诱导,1.5%~2.0% 维持,氧流量 0.5~1.0 L/min)后,经心脏依次灌注 0.9% 氯化钠溶液和 4% 多聚甲醛溶液。灌注结束后取脑,置于 4% 多聚甲醛溶液中后固定,再经 30% 蔗糖溶液脱水至组织沉底。参照小鼠脑图谱选取包含 PVN 的脑组织,采用 FS800 型冷冻切片机制备 40 μm 冠状冰冻切片。脑片经 PBS(pH7.4)清洗后,在含 5% BSA 和 0.3% Triton X-100 的 PBS 中室温封闭 60 min;加入 c-Fos 一抗(1:100)4℃ 孵育过夜,次日清洗后加入相应荧光二抗(1:300)避光室温孵育 50 min,经 DAPI 复染和抗荧光淬灭封片剂封片后,采用 NEXCOPE NCF1000 激光共聚焦显微镜采集 PVN 区图像。各组图像均采用相同采集参数获取;每只小鼠选取同一前后位点附近、包含 PVN 的 1 张冠状切片,在单侧 PVN 脑区定义相同面积的感兴趣区域(ROI),由不知晓分组的实验人员使用 ImageJ 软件计数 ROI 内 c-Fos 阳性细胞数,作为该动物的统计值。

c-Fos/mCherry 共标检测:雄性 CRH-Cre 小鼠,每组 5 只,使用脑立体定位仪于右侧 PVN 区注射 rAAV-hSyn-DIO-mCherry-WPRE-hGH pA(AAV2/9, 5.54×10^{12} vg/mL),坐标为 AP: -0.79 mm, ML: +0.25 mm, DV: -4.75 mm,注射量 150 nL。病毒表达稳定后进行 CRS 造模和电针干预。mCherry 红色荧光用于标记 CRH-Cre 小鼠 PVN 区 Cre 依赖性病毒介导表达的 CRH 神经元, c-Fos 采用绿色荧光通道显示, DAPI 复染细胞核。各组采用相同激光强度、曝光时间和增益参数采集 $100\times$ 油浸物镜激光共聚焦图像。每只小鼠选取病毒表达定位清晰、无切边或明显过曝光的右侧 PVN 视野 1 个,用 ImageJ 软件计数 mCherry 阳性细胞、c-Fos 阳性细胞及 c-Fos/mCherry 双阳性细胞,并计算双阳性细胞占 mCherry 阳性细胞的百分比。

PVN CRH 神经元光纤钙成像:用于观察 21 d CRS 后小鼠在针刺前、针刺期间和针刺后(取针后即时)PVN 区 CRH 神经元事件相关钙信号变化。

光纤钙成像方法参考既往电针和神经环路研究^[8,20-21],PVN 区 CRH 神经元功能分析参考相关研究^[11,22]。CRH-Cre 小鼠于右侧 PVN 区注射 PT-0196 rAAV-CAG-DIO-GCaMP6s-WPRE-hGH pA (5.06×10^{12} vg/mL),坐标同上。病毒表达稳定并确认光纤位置后进行 21 d CRS 处理,随后进行电针干预。记录当日先连接光纤并待信号稳定,记录针刺前稳定基线 5 min;随后给予双侧“合谷”“太冲”电针 30 min 并同步记录针刺期间信号;取针后立即继续记录 30 min,作为针刺后早期信号,反映电针结束后的短时延续状态。记录过程中以 410 nm 为等吸收对照通道、470 nm 为 GCaMP6s 信号通道,采样帧率为 60 帧/s,采用偏最小二乘法(PLS)拟合进行基线校正。每只小鼠在同一记录时段导出 2 次事件标记,提取事件起点 0 s 前后信号;对同一小鼠同一时段 2 次事件结果取均值,以动物为分析单位,比较针刺前、针刺期间和针刺后 0~5 s 时间窗内 $\Delta F/F$ 曲线下面积、峰值 $\Delta F/F$ 及相应 Z-score 指标。

PVN 区 CRH 神经元化学遗传学激活实验:CRH-Cre 小鼠于右侧 PVN 区注射 AAV2/9-EF1 α -DIO-hM3Dq-mCherry,坐标同上。分组后干预方法见上文。连续 7 d 干预结束后次日起,依次进行旷场、悬尾和强迫游泳实验,各实验间隔约 24 h。实验结束后通过 mCherry 荧光信号验证病毒表达及 PVN 定位。

1.6 统计学处理

采用 R 语言及 GraphPad Prism 进行统计分析和作图。计量资料先采用 Shapiro-Wilk 检验判断正态性, Levene 检验判断方差齐性。符合正态分布且方差齐的数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用 Tukey 法;不符合正态分布的数据以中位数(上下四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示,非参数数据先采用 Kruskal-Wallis 检验进行总体比较;常规多组探索性两两比较采用 Dunn-Bonferroni 校正;对于预先设定的关键机制指标比较,采用 Bonferroni 校正后的 Mann-Whitney U 检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 电针改善 CRS 小鼠抑郁样行为

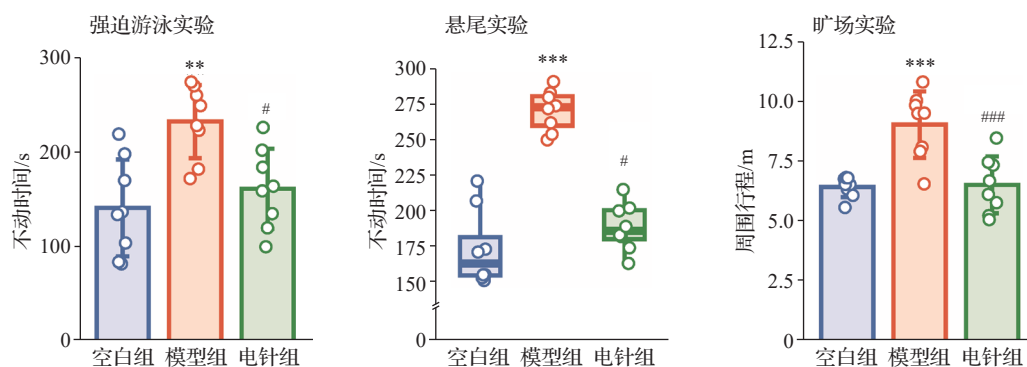
与空白组比较,模型组强迫游泳和悬尾不动时间延长($P<0.01$, $P<0.001$),旷场实验周围行程增加($P<0.001$);与模型组比较,电针组强迫游泳和悬

尾不动时间缩短($P<0.05$),旷场实验周围行程减少($P<0.001$)。见图1。

2.2 电针降低CRS小鼠HPA轴相关激素水平

与空白组比较,模型组血清CRH、ACTH、

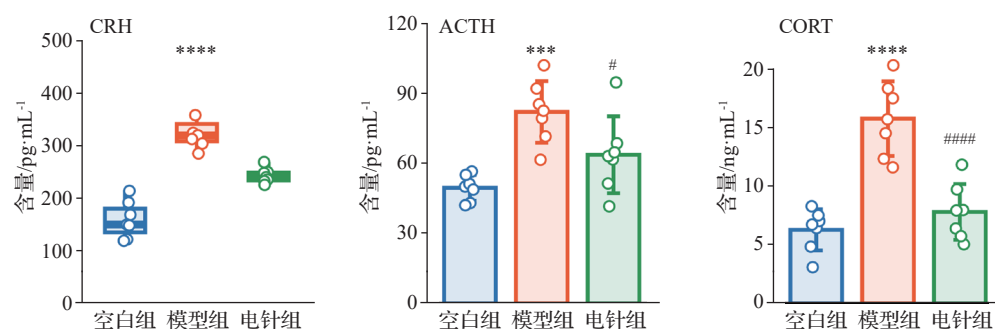
CORT水平升高($P<0.0001$, $P<0.001$)。与模型组比较,电针组ACTH、CORT水平降低($P<0.05$, $P<0.0001$);CRH水平较模型组有所降低,但差异无统计学意义。见图2。



注:强迫游泳实验和旷场实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;悬尾实验数据以 $M(Q1, Q3)$ 表示。与空白组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与模型组比较, # $P<0.05$, ### $P<0.001$ 。

图1 电针对慢性束缚应激小鼠抑郁样行为的影响(8只鼠/组)

Fig. 1 Effect of electroacupuncture on depressive-like behavior in chronic restraint stress mice (8 mice/group)



注:CRH为促肾上腺皮质激素释放激素,ACTH为促肾上腺皮质激素,CORT为皮质酮。CRH数据以 $M(Q1, Q3)$ 表示,ACTH和CORT数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。与空白组比较, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$;与模型组比较, # $P<0.05$, #### $P<0.0001$ 。

图2 电针对慢性束缚应激小鼠血清下丘脑-垂体-肾上腺轴相关激素水平的影响(7只鼠/组)

Fig. 2 Effect of electroacupuncture on serum hypothalamic-pituitary-adrenal axis-related hormone levels in chronic restraint stress mice (7 mice/group)

2.3 电针减轻CRS小鼠PVN区神经元激活并降低CRH神经元中c-Fos阳性比例

与空白组比较,模型组PVN区c-Fos阳性细胞数及c-Fos/mCherry双阳性细胞百分比上升($P<0.05$);与模型组比较,电针组c-Fos阳性细胞数及c-Fos/mCherry双阳性细胞百分比下降($P<0.05$)。见图3。

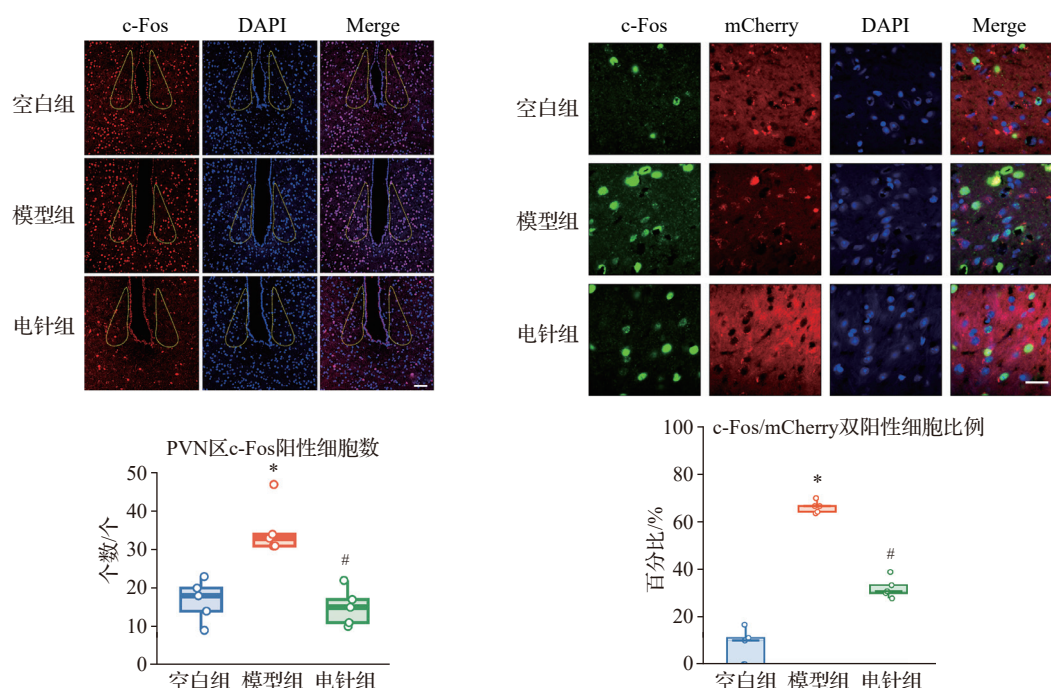
2.4 电针降低CRS小鼠PVN区CRH神经元事件相关钙活动

光纤钙成像显示,同一批CRH-Cre小鼠在针刺前、针刺期间和针刺后均可见事件相关 Ca^{2+} 信号变化,但反应幅度不同。热图和平均动力学曲线显示,针刺前 $\Delta F/F$ 事件相关反应较强,针刺期间和针

刺后反应减弱;Z-score标准化后呈相似趋势。在0~5 s时间窗内,比较针刺前、针刺期间和针刺后 $\Delta F/F$ 曲线下面积。与针刺前比较,针刺期间和针刺后 $\Delta F/F$ 曲线下面积均降低($P<0.001$, $P<0.05$);针刺期间与针刺后比较差异无统计学意义。与针刺前比较,针刺期间和针刺后峰值 $\Delta F/F$ 均降低($P<0.0001$);与针刺后比较,针刺期间峰值 $\Delta F/F$ 更低($P<0.01$)。见图4。

2.5 化学遗传学激活PVN区CRH神经元诱导的阈下应激小鼠行为学改变及电针效应

与对照组比较,阈下应激组强迫游泳实验和悬尾实验的不动时间、旷场实验的周围行程差异均无统计学意义。与对照组和阈下应激组比较,阈下应



注:左上图比例尺=50 μm ,所有图片标尺相同;左下图比例尺=25 μm ,所有图片标尺相同。与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图3 各组小鼠PVN区c-Fos阳性细胞数及c-Fos/mCherry双阳性细胞比例比较[免疫荧光法, $M(Q1, Q3)$,5只鼠/组]

Fig. 3 Comparison of the number of positive cells of c-Fos and the proportion of c-Fos/mCherry double-positive cells in the PVN of mice in the 3 groups (immunofluorescence, $M[Q1, Q3]$, 5 mice/group)

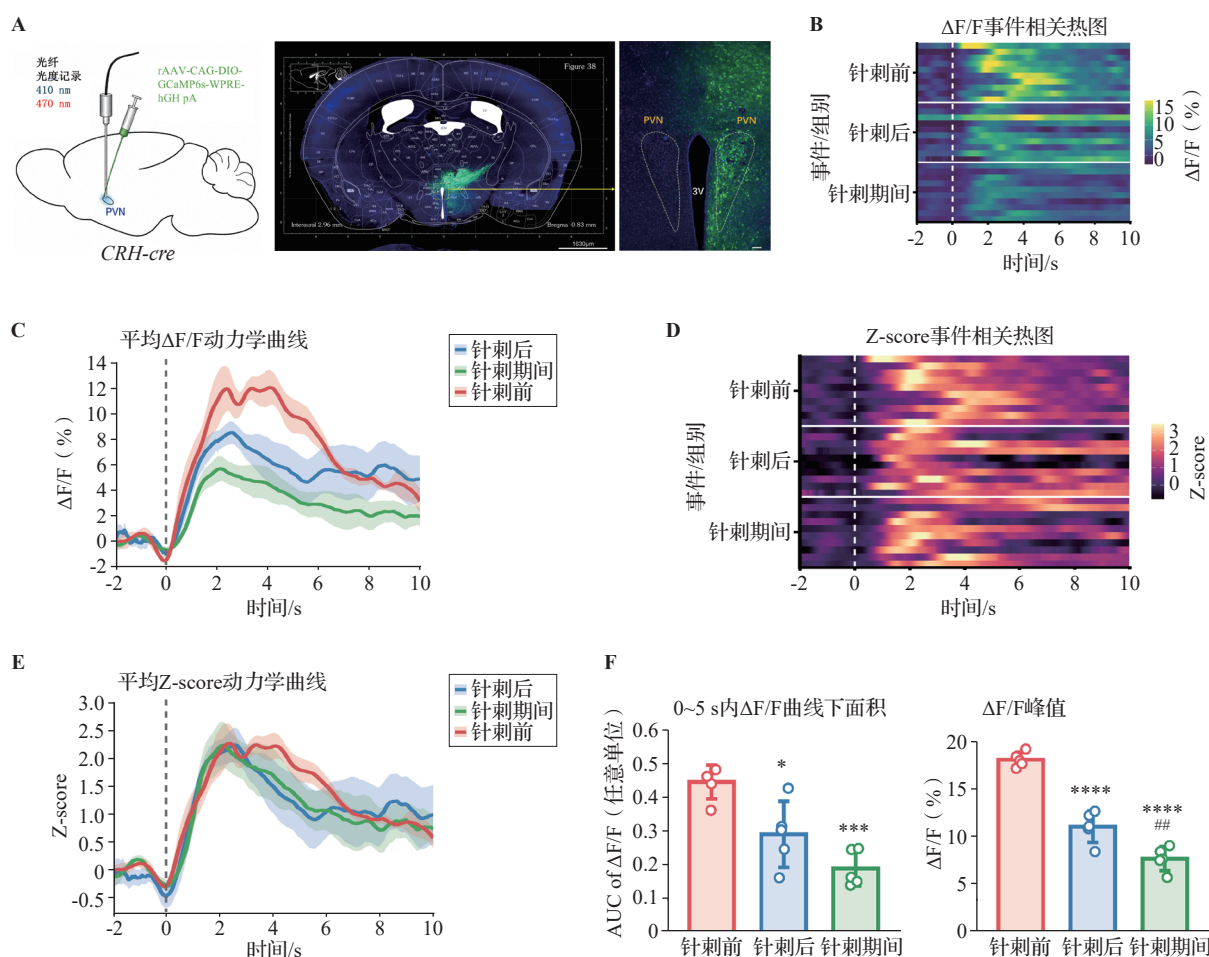
激+CNO组强迫游泳实验和悬尾实验的不动时间延长($P<0.0001$, $P<0.001$, $P<0.05$),旷场实验的周围行程减少($P<0.05$, $P<0.001$)。与阈下应激+CNO组比较,阈下应激+CNO+电针组强迫游泳实验和悬尾实验的不动时间缩短($P<0.001$, $P<0.001$),旷场实验的周围行程增加($P<0.05$)。见图5。

3 讨论

本研究围绕“慢性应激-HPA轴-PVN CRH神经元-抑郁样行为”这一主线,采用行为学、ELISA法、c-Fos免疫荧光、c-Fos/mCherry共标检测、光纤钙成像和化学遗传学激活实验,观察电针“合谷”“太冲”对CRS小鼠抑郁样行为及PVN区CRH神经元相关活动的影响。结果显示,CRS后小鼠强迫游泳和悬尾不动时间延长、旷场周围行程增加,伴随血清ACTH和CORT水平升高、PVN区c-Fos阳性细胞数增加及mCherry标记PVN区CRH神经元中c-Fos阳性比例升高;电针干预后上述行为学、内分泌和细胞标记指标总体向空白组方向回调。光纤钙成像显示,针刺期间和针刺后PVN区CRH神经元事件相关 $\Delta F/F$ 曲线下面积及峰值低于针刺

前;化学遗传学实验表明,在阈下应激条件下增强PVN CRH神经元活动可诱导抑郁样行为相关改变,电针可减轻该变化。上述结果说明PVN区CRH神经元相关活动可能参与CRS后行为异常及电针调节过程。

合谷、太冲为“四关”配伍,是针刺治疗情志相关病证的常用取穴组合。本研究中,电针可缩短CRS小鼠强迫游泳和悬尾实验不动时间,并使旷场周围行程接近空白组水平,说明电针对慢性应激后行为绝望样表现和异常活动模式具有调节作用。强迫游泳和悬尾实验主要反映动物在不可逃避应激情境下的不动行为,旷场实验更多反映自主活动、趋边行为及新异环境探索等变化。这些指标可从不同侧面描述慢性应激后的情绪相关行为,但不能直接等同于人类抑郁症状^[19]。本研究选择周围行程作为旷场主要分析指标,是基于CRS后小鼠活动轨迹更多分布于周边区域,且其变化趋势与强迫游泳、悬尾实验结果相互呼应,该指标仍需与不动时间及其他行为学结果综合解释。临床研究和系统评价显示,针刺及电针可改善抑郁相关情绪、睡眠和躯体症状^[23-27];机制研究提示,针刺抗抑郁相关作用可能涉及星形胶质细胞、炎症因子、神经递质及



注:PVN为下丘脑室旁核,CRH为促肾上腺皮质激素释放激素,AUC为曲线下面积。A为PVN区病毒注射、GCaMP6s表达及光纤位置验证示意图;B、D为事件层面显示,每只动物同一记录时段导出2次事件;C、E曲线为同一动物2次事件取均值后计算的组均值,阴影表示均值标准误;F为针刺前后 $\Delta F/F$ 曲线下面积和峰值的统计图。与针刺前比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;与针刺后比较,# $P < 0.01$ 。

图4 电针对慢性束缚应激小鼠PVN区CRH神经元事件相关钙活动的影响
(光纤钙成像, $\bar{x} \pm s$,5只鼠)

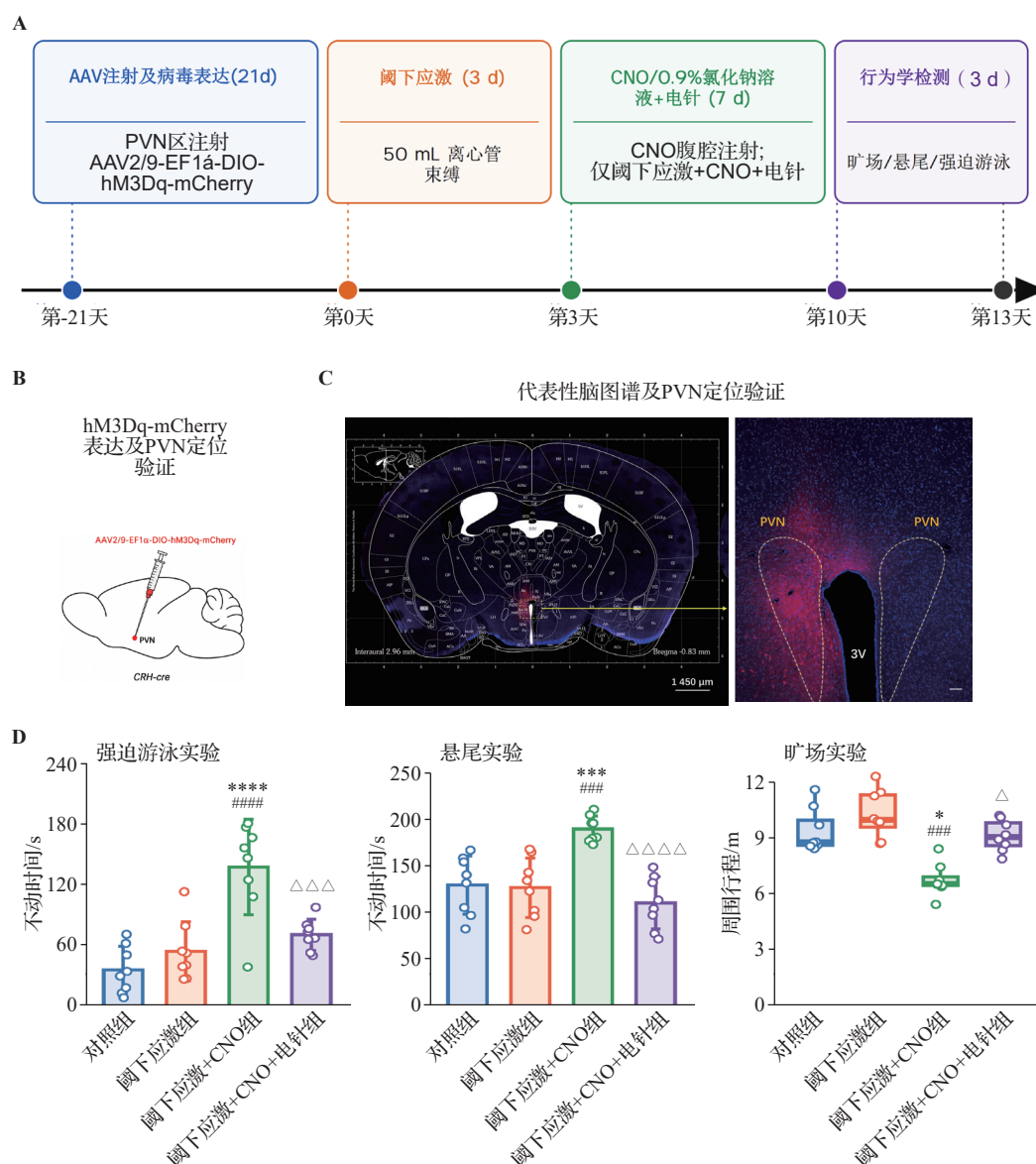
Fig. 4 Effect of electroacupuncture on event-related calcium activity of CRH neurons in the PVN of chronic restraint stress mice (fiber photometry, $\bar{x} \pm s$, 5 mice)

脑网络调节等多个环节^[14-15,26]。本研究从PVN区应激相关神经元群角度补充了“四关”穴电针调节慢性应激相关行为的实验依据。

慢性应激可伴随HPA轴调节异常,并与抑郁样行为改变相关^[28]。本研究显示,CRS后小鼠血清CRH、ACTH和CORT水平均升高,说明应激内分泌反应被激活;电针干预后ACTH和CORT水平下降,CRH水平呈降低趋势但差异无统计学意义。该结果表明,电针对CRS后HPA轴反应具有调节作用,但其对CRH水平的影响在本实验样本量和检测条件下尚未达到统计学差异。PVN是HPA轴上游整合的重要脑区,CRH神经元参与应激激素分泌和情绪相关行为调节^[9-11]。本研究中,CRS后PVN区

c-Fos阳性细胞数增加,电针干预后减少,说明电针可降低慢性应激后的PVN区神经元激活水平。进一步采用CRH-Cre小鼠和Cre依赖性mCherry标记进行c-Fos/mCherry共标检测,结果显示模型组mCherry标记的PVN CRH神经元中c-Fos阳性比例升高,电针组降低,从细胞类型层面补充支持PVN CRH神经元参与CRS及电针调节过程。

光纤钙成像为观察特定神经元群在体活动变化提供了时间分辨率较高的证据^[29]。本研究在同一批CRH-Cre小鼠中记录针刺前、针刺期间和针刺后(取针后即时)PVN区CRH神经元事件相关钙信号,结果显示针刺期间和针刺后 $\Delta F/F$ AUC及峰值低于针刺前,变化方向与ACTH、CORT及



注:PVN为下丘脑室旁核,CRH为促肾上腺皮质激素释放激素,3V为第3脑室。A为实验流程图,B为hM3Dq-mCherry表达及PVN定位验证示意图,C为代表性脑图谱及PVN定位验证,D为各组小鼠强迫游泳实验、旷场实验和悬尾实验行为学比较。强迫游泳实验和悬尾实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;旷场实验周围行程数据以 $M(Q1, Q3)$ 表示。与对照组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;与阈下应激组比较,### $P < 0.001$,#### $P < 0.0001$;与阈下应激+CNO组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.001$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.0001$ 。

图5 化学遗传学激活PVN区CRH神经元诱导的阈下应激小鼠行为学改变及电针效应(8只鼠/组)

Fig. 5 Effect of chemogenetic activation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone neurons on behavioral changes in mice under subthreshold stress and the effect of electroacupuncture (8 mice/group)

c-Fos/mCherry共标检测结果一致。PVN CRH神经元接受应激相关输入,并受局部网络、上游脑区投射及外周激素反馈共同调节^[9-10]。既往研究也显示,该细胞群参与束缚应激后的觉醒、外周免疫反应和应激相关行为调控^[30-31]。此外,其他疾病模型研究提示电针可能通过PVN区CRH神经元相关通路参与机体功能调节^[32]。因此,本研究观察到的钙活动下降更适合解释为电针作用过程中PVN区CRH神经元事件相关反应幅度减弱,而不宜简单

等同于神经元整体兴奋性的持续性降低。需要注意的是,Z-score标准化后的AUC和峰值未达到统计学意义(结果未展示),提示钙信号结果仍应结合原始 $\Delta F/F$ 、细胞标记和行为学结果综合判断。

化学遗传学实验用于从细胞群功能层面补充分析PVN区CRH神经元活动增强与行为改变之间的关系。既往研究表明,Cre依赖性hM3Dq系统可用于提高特定CRH神经元群活动,并观察其生理或行为效应^[12-13]。本研究采用3d束缚作为阈下应激

处理,在单独应激不足以诱导稳定行为学异常的背景下,观察CNO激活hM3Dq标记PVN CRH神经元后的行为改变。结果显示,阈下应激组与对照组比较差异无统计学意义,而阈下应激+CNO组出现强迫游泳和悬尾不动时间延长、旷场周围行程降低;阈下应激+CNO+电针组上述指标向对照方向回调。化学遗传学实验中,阈下应激+CNO组周围行程降低,与21 d CRS模型中的变化方向不同。考虑到处理因素不同,且周围行程受自主活动、趋边及新异环境探索等因素影响,该结果需结合强迫游泳和悬尾实验结果综合解释,具体原因有待于后续深入研究。该结果说明,PVN CRH神经元活动增强可提高阈下应激背景下的行为易感性,电针可在一定程度上减轻该细胞群激活伴随的行为学改变。但该实验采用激活策略,主要支持“活动增强足以导致相关行为改变”的可能性,尚不能证明PVN CRH神经元活动降低是电针发挥作用的必要条件。

综合上述结果,电针“合谷”“太冲”改善CRS小鼠抑郁样行为并非源于单一环节,而可能涉及外周躯体感觉输入、中枢应激整合和HPA轴反应的多层级调节。低强度电针可通过特定躯体感觉-自主神经通路影响内脏和应激反应^[7],PVN区CRH神经元则处于应激内分泌和情绪行为调节的关键节点^[9-11]。本研究结果证实,电针可能通过降低慢性应激后PVN区神经元激活水平、减少mCherry标记的PVN CRH神经元中c-Fos阳性比例,并调节PVN CRH神经元事件相关钙活动,从而参与HPA轴反应和行为学改变的回调。与此同时,CRS小鼠抑郁样行为的形成还涉及慢性应激负荷、奖赏加工、炎症免疫和多脑区网络等多种因素^[33]。临床抑郁症状亦具有情绪低落、快感缺失和躯体症状等多维特征^[34],针刺治疗抑郁及相关症状的作用可能涉及神经免疫和多系统调节^[35]。因此,PVN CRH神经元相关活动应被理解为电针调节慢性应激相关行为的潜在中枢环节之一,而非唯一机制。

本研究结果显示,电针“合谷”“太冲”可改善CRS小鼠抑郁样行为并降低HPA轴相关激素水平,其作用可能与减弱PVN区神经元激活、降低mCherry标记的PVN CRH神经元中c-Fos阳性比例及调节PVN CRH神经元事件相关钙活动有关。化学遗传学激活实验表明,PVN区CRH神经元活动增强可参与阈下应激背景下的行为易感性,电针干预可减轻该变化。但本研究仍存在一定局限。首先,行为学、ELISA、免疫荧光、光纤钙成像和化

学遗传学实验采用不同动物队列,尚不能在同一动物个体内分析行为、激素和神经元活动之间的相关性。其次,c-Fos/mCherry共标检测基于Cre依赖性mCherry标记及PVN脑区定义的ROI内阳性细胞计数,能够反映mCherry标记PVN CRH神经元中的c-Fos阳性比例变化,但不能替代CRH蛋白表达检测或投射特异性功能验证。再次,光纤钙成像未设置正常小鼠基线对照和CRS未针刺对照,针刺后记录反映取针后早期状态,不能说明针刺效应已经完全消退;同时,Z-score标准化指标未达到统计学意义,提示相关结果仍需扩大样本量并结合更多钙瞬变参数进一步验证。最后,化学遗传学实验仅采用激活策略,尚不能判断PVN区CRH神经元活动对电针效应的必要性。后续研究可结合CRH蛋白免疫标记、细胞类型特异性双向操控、投射特异性分析及同一动物内多指标关联分析,进一步阐明电针调节慢性应激相关行为的PVN环路机制。

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

参考文献

- [1] Marx W, Penninx B W J H, Solmi M, et al. Major depressive disorder[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9: 44.
- [2] GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet Psychiatry, 2022, 9 (2): 137-150.
- [3] Marwaha S, Palmer E, Suppes T, et al. Novel and emerging treatments for major depression [J]. Lancet, 2023, 401 (10371): 141-153.
- [4] Chen B L, Wang C C, Lee K H, et al. Efficacy and safety of acupuncture for depression: a systematic review and meta-analysis[J]. Res Nurs Heal, 2023, 46(1): 48-67.
- [5] Tan Y W, Duan R Q, Wen C B. Efficacy of acupuncture for depression: a systematic review and meta-analysis[J]. Front Neurosci, 2024, 18: 1347651.
- [6] Gao Y, Li T, Lu Q, et al. Electroacupuncture for treating depression-related insomnia: a systematic review and meta-analysis[J]. Front Psychiatry, 2025, 16: 1610107.
- [7] Liu S B, Wang Z F, Su Y S, et al. A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal-adrenal axis [J]. Nature, 2021, 598(7882): 641-645.
- [8] Li S, Liu Y, Zhang N, et al. Perspective of calcium imaging technology applied to acupuncture research[J]. Chin J Integr Med, 2024, 30(1): 3-9.
- [9] Rasiah N P, Loewen S P, Bains J S. Windows into stress: a glimpse at emerging roles for CRH^{PVN} neurons [J]. Physiol Rev, 2023, 103(2): 1667-1691.

- [10] Iremonger K J, Power E M. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: a key node in the control of behavioural states[J]. *J Physiol*, 2025, 603(8): 2231-2243.
- [11] Xu X L, Zheng S D, Ren J Y, et al. Hypothalamic CRF neurons facilitate brain reward function[J]. *Curr Biol*, 2024, 34(2): 389-402.
- [12] Montgomery K R, Bridi M S, Folts L M, et al. Chemogenetic activation of CRF neurons as a model of chronic stress produces sex-specific physiological and behavioral effects [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2024, 49(2): 443-454.
- [13] Yu J R, Li X F, Tsaneva-Atanasova K, et al. Chemogenetic activation of PVN CRH neurons disrupts the estrous cycle and LH dynamics in female mice[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1322662.
- [14] Lin S S, Zhou B, Chen B J, et al. Electroacupuncture prevents astrocyte atrophy to alleviate depression [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(5): 343.
- [15] Wu X T, Tu M Q, Yu Z L, et al. The efficacy and cerebral mechanism of intradermal acupuncture for major depressive disorder: a multicenter randomized controlled trial [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2025, 50(7): 1075-1083.
- [16] Mao Y, Xu Y K, Yuan X. Validity of chronic restraint stress for modeling anhedonic-like behavior in rodents: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Int Med Res*, 2022, 50(2): 3000605221075816.
- [17] Wang Y, Hu W, Han J, et al. Electroacupuncture alleviates perioperative hypothalamus-pituitary-adrenal axis dysfunction via circRNA-miRNA-mRNA networks [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1115569.
- [18] Zheng J Y, Wang Y, Zhang C, et al. Electroacupuncture negatively regulates the Nesfatin-1/ERK/CREB pathway to alleviate HPA axis hyperactivity and anxiety-like behaviors caused by surgical trauma[J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 108.
- [19] Gencturk S, Unal G. Rodent tests of depression and anxiety: Construct validity and translational relevance[J]. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 2024, 24(2): 191-224.
- [20] Gao F, Yuan W H, Wu S B, et al. Electroacupuncture in the treatment of IBS in rats: investigation of the mechanisms of CRH⁺ neurons in the paraventricular nucleus [J]. *J Neurophysiol*, 2023, 130(2): 380-391.
- [21] Wang X Y, Chen X Q, Wang G Q, et al. A neural circuit for gastric motility disorders driven by gastric dilation in mice[J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1069198.
- [22] Zhou J, Zhang B, Zhou X, et al. Electroacupuncture pretreatment mediates sympathetic nerves to alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury via CRH neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 43.
- [23] Yin X, Li W, Liang T T, et al. Effect of electroacupuncture on insomnia in patients with depression: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(7): e2220563.
- [24] 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.
- [25] Yang K Q, Tiwari S, Liu D Z, et al. Acupuncture and escitalopram for treating major depression clinical study (AE-TMDCS): protocol for a factorial randomised controlled trial [J]. *BMJ Open*, 2024, 14(9): e091214.
- [26] Guo Z Y, Ren Z Y, Yao J P, et al. Does acupuncture treatment modulate inflammatory cytokines in rodent models of depression? A systematic review and meta-analysis [J]. *Front Behav Neurosci*, 2024, 18: 1329638.
- [27] Hu Z C, Ching L W, Li H J, et al. A network meta-analysis on the effectiveness and safety of acupuncture in treating patients with major depressive disorder[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 10384.
- [28] Wang J, Sun L, You J, et al. Role and mechanism of PVN-sympathetic-adipose circuit in depression and insulin resistance induced by chronic stress[J]. *EMBO Rep*, 2023, 24(12): e57176.
- [29] Zhou Z C, Gordon-Fennell A, Piantadosi S C, et al. Deep-brain optical recording of neural dynamics during behavior[J]. *Neuron*, 2023, 111(23): 3716-3738.
- [30] Li H, Liu T, Wang Y, et al. Paraventricular nucleus CRH neurons regulate acute lung injury via sympathetic nerve-neutrophil axis[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 8870.
- [31] Li S B, Borniger J C, Yamaguchi H, et al. Hypothalamic circuitry underlying stress-induced insomnia and peripheral immunosuppression[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(37): eabc2590.
- [32] Xu W Y, Guo Y J, Wang J Y, et al. Electroacupuncture ameliorates chronic heart failure: the role of CRH neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus [J]. *Front Neurosci*, 2026, 20: 1741523.
- [33] Fang X, Jiang S J, Wang J G, et al. Chronic unpredictable stress induces depression-related behaviors by suppressing AgRP neuron activity [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(6): 2299-2315.
- [34] Wu C C, Mu Q L, Gao W J, et al. The characteristics of anhedonia in depression: a review from a clinically oriented perspective[J]. *Transl Psychiatry*, 2025, 15(1): 90.
- [35] Liao H Y, Satyanarayanan S K, Lin Y W, et al. Clinical efficacy and immune effects of acupuncture in patients with comorbid chronic pain and major depression disorder: a double-blinded, randomized controlled crossover study [J]. *Brain Behav Immun*, 2023, 110: 339-347.

收稿日期:2026-05-11 修回日期:2026-07-13