

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.07.007
文章编号: 1005-8982 (2022) 07-0037-05

实验研究·论著

电针对慢性应激抑郁大鼠犬尿氨酸代谢途径的影响*

宋洪涛¹, 武忠¹, 赛音朝克图², 罗彤³, 赵俊³

(1. 内蒙古自治区人民医院, 内蒙古 呼和浩特 010010; 2. 内蒙古国际蒙医医院, 内蒙古 呼和浩特 010065; 3. 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 100029)

摘要: 目的 观察慢性应激抑郁模型大鼠海马区犬尿喹啉酸(KYNA)、喹啉酸(QUIN)、犬尿氨酸-3-单加氧酶(KMO)、3-羟基邻氨基苯甲酸3,4-双加氧酶(3-HAO)、犬尿氨酸转氨酶(KAT)的变化及电针的干预作用, 探讨电针抗抑郁的作用机制。**方法** 按照随机数字表法将24只SD大鼠分成空白组、模型组、氟西汀组、电针组, 每组6只。空白组不进行任何干预, 其他3组通过慢性温和不可预知性应激刺激结合孤养的方法复制慢性应激抑郁模型; 采用开野试验观察大鼠的行为学变化; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组大鼠海马区KYNA、QUIN的变化; 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组大鼠海马区KMO mRNA、3-HAO mRNA、KAT mRNA相对表达量。**结果** 大鼠开野试验中, 模型组大鼠应激前的水平运动次数、垂直运动次数与应激后比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 应激21 d后模型组大鼠水平运动次数、垂直运动的次数较应激前减少, 而氟西汀组和电针组可逆转此变化。模型组大鼠海马KYNA含量较空白组降低($P < 0.05$), 电针组大鼠海马KYNA含量较模型组升高($P < 0.05$); 模型组大鼠海马QUIN含量较空白组升高($P < 0.05$), 氟西汀组和电针组大鼠海马QUIN含量较模型组降低($P < 0.05$)。模型组大鼠海马KMO mRNA、3-HAO mRNA、KAT mRNA相对表达量较空白组升高($P < 0.05$), 氟西汀组和电针组较模型组降低($P < 0.05$)。**结论** 电针可能通过调节犬尿氨酸代谢途径的异常来达到抗抑郁作用。

关键词: 抑郁; 电针; 慢性应激; 犬尿氨酸代谢; 大鼠

中图分类号: R749

文献标识码: A

Effect of electro-acupuncture on kynurenine pathway in chronicity stress depression model rats*

Hong-tao Song¹, Zhong Wu¹, Chaoketu Saiyin², Tong Luo³, Jun Zhao³

(1. Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China; 2. Inner Mongolia International Mongolian Hospital, Hohhot, Inner Mongolia 010065, China; 3. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective To observe the changes of KYNA, QUIN, KMO, 3-HAO, KAT in hippocampus of rats with depression, and to reveal the biological mechanisms of electro-acupuncture treating depression. **Method** Totally 24 SD rats were randomly divided into 4 groups (blank group, model group, fluoxetine group, and electroacupuncture group). The blank group did not receive any intervention, and the other three groups replicated the model of chronic stress depression by chronic mild unpredictable stress stimulation combined with orphanage. The locomotor activity of rats in every group by open-field experiment was observed. Hippocampus were collected, and the level of KYNA, QUIN was detected with Elisa. The KMO mRNA, 3-HAO mRNA, and KAT mRNA were

收稿日期: 2021-10-21

* 基金项目: 内蒙古自治区人民医院博士科研启动资金(No: BS201806)

detected with real-time PCR. **Result** In the open field test of rats, there was significant difference in the number of horizontal and vertical movements of rats in the model group before and after stress ($P < 0.05$). After 21 days of stress, the number of horizontal and vertical movements of rats in the model group decreased compared with that before stress, while this change was reversible in fluoxetine group and electroacupuncture group. The content of KYNA in hippocampus of model group was lower than that of blank group ($P < 0.05$), and the content of KYNA in hippocampus of electroacupuncture group was higher than that of model group ($P < 0.05$); The content of QUIN in hippocampus of model group was higher than that of blank group ($P < 0.05$), and the content of QUIN in hippocampus of fluoxetine group and electroacupuncture group was lower than that of model group ($P < 0.05$). The relative expressions of kmo mRNA, 3-hao mRNA and Kat II mRNA in hippocampus of model group were higher than those in blank group ($P < 0.05$), while those in fluoxetine group and electroacupuncture group were lower than those in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture may relieve depression through adjusting the abnormal of kynurenine pathway.

Keywords: depression; electro-acupuncture; chronic stimulation; kynurenine pathway; rat

抑郁症作为一种情绪障碍疾病,多表现为情绪改变、兴趣低下、自卑感、不愿与他人交流及自杀倾向。研究证实,大脑各个区域的5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)水平的降低与抑郁症的发生具有相关性^[1-2]。临床上多种抗抑郁药的作用机制多基于抑郁症的单胺假说,但是三分之一的患者对常规药物治疗没有明显效果^[3],因此有必要进一步阐明抑郁症的生物学机制。近年来,学者发现犬尿氨酸途径代谢异常在抑郁症的发生、发展中发挥着作用^[4-5]。中枢神经系统中,犬尿氨酸代谢分为两个主要途径,一方面,犬尿氨酸被犬尿氨酸转氨酶(kynurenine aminotransferase, KAT)催化生成犬尿喹啉酸(kynurenic acid, KYNA),KYNA具有神经保护作用;另一方面,犬尿氨酸在犬尿氨酸-3-单加氧酶(kynurenine-3-monooxygenase, KMO)、3-羟基邻氨基苯甲酸3,4-双加氧酶(3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase, 3-HAO)的作用下转换为喹啉酸(quinolinic acid, QUIN),QUIN可引起神经元的损害。具有神经毒性和神经保护作用的代谢物含量之间的不平衡可能是抑郁症的主要驱动因素。本次研究采用普遍认可的慢性温和不可预测性应激刺激结合孤养方法复制大鼠抑郁模型,基于犬尿氨酸途径探讨抑郁症的发病机制,以明确电针在治疗抑郁症中的生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级雄性SD大鼠,体重(200±10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产

许可证号:SCXK(京)2016-0006]。购进大鼠后实验室饲养1周,使其适应实验室环境,通过敞箱试验进行行为学评分,剔除不符合实验要求的大鼠(行为静止或过于活跃)。选取24只大鼠,按照随机数字表法分成空白组、模型组、氟西汀组、电针组,每组6只。

1.2 仪器与试剂

7500 Real-Time PCR仪、稳压稳流电泳仪(美国Bio-Rad公司),数码凝胶成像系统(中国BINTA公司),Image-Pro Plus Analysis Software计算机图像分析仪(美国Bio-Rad公司),低温高速离心机(美国Thermo Scientific公司),电子天平BS224S(德国Sartorius公司),核酸紫外分光光度计(德国Biophotometer公司),LH202型韩氏穴位神经刺激仪(北京华卫产业有限公司)。QUIN ELISA试剂盒(货号:L190408618)购自北京奇景融生物技术有限公司,KYNA ELISA试剂盒(货号:L190408621)购自北京奇景融生物技术有限公司。

1.3 慢性应激抑郁模型的复制

采用慢性温和不可预测性应激结合孤养的方式进行抑郁模型复制^[6-7]。应激刺激方法:24 h禁食、禁水,5 min 4℃冰水游泳,24 h潮湿环境、昼夜颠倒,3 min夹尾(距离尾尖2 cm),3 h束缚。模型复制共进行21 d,按照随机抽签顺序,保证每种应激平均应用3次,每天应用1种应激方式。

1.4 各组大鼠干预方法

空白组:正常群养,不采取任何干预措施;模型组:单笼孤养结合模型复制应激;氟西汀组:单笼孤养结合模型复制应激,应激前1 h予灌胃给

药(盐酸氟西汀以生理盐水配制成1 mg/mL浓度,2 mg/kg给药);电针组:单笼孤养结合模型复制应激,应激前1 h予电针百会穴和印堂穴(频率为2 Hz,电流强度为1 mA,20 min/次,1次/d)。

1.5 开野试验

对各组大鼠进行行为学检测,箱体规格为80 cm × 80 cm × 40 cm,箱体内部均涂成黑色,箱底用白线划分成25个等边方格。检测时,捏提大鼠尾端,待大鼠情绪稳定后,轻置于中心方格内,统计5 min内大鼠穿过等边方格的次数(水平运动次数)和大鼠后肢直立次数(垂直运动次数),开野试验^[8]分别在实验前1天以及实验第22天各进行1次。

1.6 标本制备及检测方法

1.6.1 大鼠海马KYNA、QUIN含量检测 各组大鼠腹腔注射麻醉(10%水合氯醛,380 mg/kg),迅速断头,在超净台冰上剥离取海马组织,放入灭菌离心管中,置入-80℃保存。严格按照试ELISA试剂盒说明书对大鼠海马区KYNA、QUIN进行检测。

1.6.2 qRT-PCR检测大鼠海马KMO mRNA、3-HAO mRNA、KAT mRNA相对表达量 取20 mg海马组织,置于加入液氮的研钵中快速研磨,将粉末装入EP管;加入1 mL Trizol液,用枪头吹打混匀,室温放置5 min;以1:1 Trizol液的比例加入氯仿,振荡离心管15 s,室温放置2~3 min;4℃12 000 r/min离心15 min,取上层水,按1:2 Trizol液的比例加入异丙醇,室温放置20 min;4℃12 000 r/min离心10 min,弃上清,按1:1 Trizol液的比例加入75%乙醇(DEPC配制);4℃7 500 r/min离心5 min,弃上清,室温干燥3 min;DEPC水溶解沉淀得总RNA;通过核酸紫外光谱法测定RNA浓度,在20 μL系统中将RNA逆转录成cDNA。配制逆转录体系:RNA 5 μL、Oligo(dT) 2 μL、ddH₂O (DEPC处理) 4.5 μL,首先70℃孵育5 min,然后迅速放在冰上。5×Buffer 5 μL、dNTP (10 mmol) 2 μL、Ribonuclease inhibitor 0.5 μL、M-MLV RT 1 μL。42℃孵育60 min,然后70℃10 min;用所得的cDNA构建qRT-PCR体系:cDNA 2 μL、引物1 (10 pmol/μL) 0.5 μL、引物2 (10 pmol/μL) 0.5 μL、SYBR mix 10 μL、dd H₂O 7 μL。扩增反应条件:94℃预变性2 min,94℃变性5 s,60℃退火30 s,72℃延伸10 min,共40个循环。绘制溶解曲线,采用相对定量2^{-ΔΔCt}法分析结果。KMO引物:正向5'-

TCCCTTCCACCTGAAGTCAC-3',反向5'-AGTCTTCA AAGCCCGCATTC-3';3-HAO引物:正向5'-AGGTGA CAATGGGAGGACAG-3',反向5'-TTACAGGCAGGGT CTTGTGT-3'。KAT引物:正向5'-GCCTTGTTACAG CCTTTC-3',反向5'-ACCTCCAGCCATCATTGTCA-3';GAPDH引物:正向5'-CAACTCCCTCAAGATTGT CAGCAA-3',反向5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA -3'。采用2^{-ΔΔCt}法计算KMO mRNA、3-HAO mRNA、KAT mRNA相对表达量。

1.7 统计学方法

数据分析采用SPSS 21.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,进一步两两比较用LSD-*t*法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠抑郁行为学变化

模型组大鼠应激前的水平运动次数、垂直运动次数与应激后比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);空白组、氟西汀组、电针组大鼠应激前的水平运动次数、垂直运动次数与应激后比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);应激前4组大鼠水平运动次数、垂直运动次数比较,经方差分析,差异无统计学意义($P > 0.05$);应激刺激21 d后4组大鼠水平运动次数、垂直运动次数比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组大鼠的水平运动次数、垂直运动次数较空白组减少($P < 0.05$),氟西汀组、电针组大鼠的水平运动次数、垂直运动次数较模型组升高($P < 0.05$)。见表1。

2.2 各组大鼠KYNA、QUIN比较

4组大鼠KYNA含量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组大鼠海马KYNA含量较空白组降低($P < 0.05$),电针组大鼠海马KYNA含量较模型组升高($P < 0.05$);4组大鼠QUIN含量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组大鼠海马QUIN含量较空白组升高($P < 0.05$),氟西汀组和电针组大鼠海马QUIN含量较模型组降低($P < 0.05$)。见表2。

2.3 各组大鼠海马KMO mRNA、3-HAO mRNA、KAT mRNA相对表达量的比较

4组大鼠海马KMO mRNA、3-HAO mRNA相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义

表 1 各组大鼠开野试验水平运动及垂直运动次数比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	水平运动				垂直运动			
	应激前	应激后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	应激前	应激后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
空白组	71.66 ± 7.31	61.33 ± 19.36	0.000	0.239	11.5 ± 4.59	17.33 ± 2.50	0.000	0.058
模型组	75.66 ± 11.11	41.83 ± 5.56 ^①	0.000	0.002	13.67 ± 6.53	6.50 ± 2.66 ^①	0.000	0.030
氟西汀组	72.16 ± 16.63	58.33 ± 6.71 ^②	0.000	0.181	12.83 ± 4.70	12.33 ± 2.06 ^②	0.000	0.822
电针组	72.00 ± 13.41	67.67 ± 15.02 ^②	0.000	0.567	14.5 ± 4.41	12.66 ± 2.94 ^②	0.000	0.493
<i>F</i> 值	0.133	4.182			0.652	17.970		
<i>P</i> 值	0.939	0.019			0.774	0.000		

注：①应激后与空白组比较， $P < 0.05$ ；②应激后与模型组比较， $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠 KYNA、QUIN 比较

($n=6, \text{ng/mL}, \bar{x} \pm s$)

组别	KYNA	QUIN
空白组	51.91 ± 5.34	4.82 ± 0.43
模型组	43.79 ± 3.94	5.98 ± 0.86
氟西汀组	46.09 ± 4.86	5.01 ± 0.44
电针组	50.23 ± 4.21	5.27 ± 0.44
<i>F</i> 值	3.902	4.702
<i>P</i> 值	0.024	0.012

($P < 0.05$)，模型组大鼠较空白组升高 ($P < 0.05$)，氟西汀组和电针组较模型组降低 ($P < 0.05$)；4 组大鼠海马 KAT mRNA 相对表达量比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，模型组较空白组降低 ($P < 0.05$)，氟西汀组和电针组较模型组升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠海马 KMO mRNA、3-HAO mRNA、KAT mRNA 相对表达量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	KMO mRNA	3-HAO mRNA	KAT mRNA
空白组	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.18	2.00 ± 0.34
模型组	2.04 ± 0.38	2.32 ± 0.16	1.58 ± 0.46
氟西汀组	1.55 ± 0.46	1.73 ± 0.34	2.55 ± 0.23
电针组	0.98 ± 0.28	1.62 ± 0.18	2.38 ± 0.24
<i>F</i> 值	13.210	32.907	10.437
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

3 讨论

色氨酸是一种用于蛋白质生物合成的必需氨基酸，也是 5-HT 和犬尿氨酸的前体。5-HT 的减少

和抑郁症关系密切；同时犬尿氨酸代谢途径是色氨酸分解代谢的主要途径。在中枢神经系统中，犬尿氨酸代谢途径是由吲哚氨-2,3-双加氧酶 (Indoleamine-2,3-dioxygenases, IDO) 降解色氨酸引发的。当 IDO 被激活后，犬尿氨酸代谢途径分为两个主要途径，一个涉及神经保护作用的 Trp-KYNA 途径，即犬尿氨酸被 KAT 催化生成 KYNA；另一个涉及神经毒性的 Trp-NAD⁺ 途径，即犬尿氨酸在 KMO、3-HAO 的作用下转换为 QUIN^[9-10]。在生理条件下，色氨酸分别在 5-羟色胺能神经元中代谢为 5-HT，在星形胶质细胞中代谢为 KYNA，作为 NMDA 和 α7nACh 受体拮抗剂，KYNA 可以发挥抗兴奋和抗惊厥作用，从而提供神经保护作用^[11-12]。而在心理压力和 LPS 诱导的炎症反应下，小胶质细胞中犬尿氨酸途径中神经毒性分支的 KMO、3-HAO 过度激活，生成 3-HK 和 QUIN，其中 QUIN 具有神经毒性的作用^[13-16]。

慢性不可预知性应激结合孤养的方法是目前被国内外研究人员广泛认可的抑郁症模型复制方法。本次实验中，大鼠在经过 21 d 的应激后，水平活动和垂直活动次数较空白组减少，提示抑郁模型大鼠复制成功。氟西汀及电针治疗可增加慢性应激大鼠的水平活动和垂直活动次数，证明了氟西汀及电针具有抗抑郁作用。

实验表明，慢性应激可以导致大鼠海马区 KYNA 的含量降低，QUIN 的含量升高，KMO mRNA、3-HAO mRNA 的相对表达量升高，而 KAT mRNA 的相对表达量降低，提示慢性应激可以过度激活犬尿氨酸代谢途径中的具有神经毒性的 Trp-NAD⁺ 途径，而具有神经保护作用的 Trp-KYNA 途径则被抑制，说明慢性应激诱导大鼠的抑郁行为与大鼠机体的

犬尿酸代谢途径出现紊乱导致大鼠中枢神经系统损伤密切相关。氟西汀组和电针组大鼠KYNA含量较模型组升高,QUIN的含量降低,KMO mRNA、3-HAO mRNA相对表达量降低,KAT mRNA相对表达量升高,说明两种干预措施均可改变抑郁大鼠的犬尿酸代谢异常。

“百会”“印堂”两穴,均为督脉要穴。中医学认为:“病变在脑,首取督脉”,“百会”“印堂”的抗抑郁作用也被多数学者验证^[17]。本次研究结果表明,电针“印堂”“百会”在缓解抑郁的同时也对抑郁模型大鼠的犬尿酸代谢紊乱产生一定的作用,这可能也是其发挥抗抑郁作用的一个机制。可以说,抑郁与犬尿酸通路异常存在着密切关联。电针可以缓解抑郁,改变犬尿酸通路异常,且对机体无明显不良作用,安全有效,值得在临床进一步推广。

本研究显示抑郁模型大鼠海马区犬尿酸相关代谢产物KYNA、QUIN、KMO、3-HAO、KAT的变化,说明抑郁状态下大鼠的犬尿酸途径异常,进而可能导致海马神经损害,电针及氟西汀通过改善犬尿酸代谢异常以缓解海马区神经损害。但本次研究中未直接检测大鼠海马区神经元结构及相关指标变化,不能强有力地证明犬尿酸代谢异常对抑郁模型大鼠中枢神经系统损伤的影响。在下一步的实验中,仍需完善相关数据,以深入明确电针抗抑郁的机制。

参 考 文 献 :

- [1] BANSAL Y, SINGH R, PARHAR I, et al. Quinolinic acid and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in depression: role in neuroprogression[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 452.
- [2] COWEN P J, BROWNING M. What has serotonin to do with depression[J]. *World Psychiatry*, 2015, 14(2): 158-160.
- [3] VANCASSEL S, CAPURON L, CASTANON N. Brain kynurenine and BH4 Pathways: relevance to the pathophysiology and treatment of inflammation-driven depressive symptoms[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 499.
- [4] HAROON E, WELLE J R, WOOLWINE B J, et al. Associations among peripheral and central kynurenine pathway metabolites and inflammation in depression[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2020, 45(6): 998-1007.
- [5] COLLE R, MASSON P, VERSTUYFT C, et al. Peripheral tryptophan, serotonin, kynurenine, and their metabolites in major depression: A case-control study[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*,

2020, 74(2): 112-117.

- [6] 许晶, 李晓秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价[J]. *中国行为医学科学*, 2003, 12(1): 14-17.
- [7] KATZ R J, BALDRIGHI G. A further parametric study of imipramine in an animal model of depression[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982, 16(6): 969-972.
- [8] 贾宝辉, 李志刚, 卢峻, 等. 电针抗抑郁研究的模型探讨[J]. *针刺研究*, 2005, 30(1): 22-25.
- [9] ARAQUE A, CARMIGNOTO G, HAYDON P G, et al. Gliotransmitters travel in time and space[J]. *Neuron*. 2014, 81(4): 728-739.
- [10] BAXTER P S, HARDINGHAM G E. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 100: 147-152.
- [11] GARRISON A M, PARROTT J M, TUÑON A, et al. Kynurenine pathway metabolic balance influences microglia activity: Targeting kynurenine monooxygenase to dampen neuroinflammation[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, 94: 1-10
- [12] MORONI F, COZZI A, CARPENDO R, et al. Kynurenine 3-mono-oxygenase inhibitors reduce glutamate concentration in the extracellular spaces of the basal ganglia but not in those of the cortex or hippocampus[J]. *Neuropharmacology*, 2005, 48(6): 788-795.
- [13] WILSON K, AUER M, BINNIE M, et al. Overexpression of human kynurenine-3-mono-oxygenase protects against 3-hydroxykynurenine-mediated apoptosis through bidirectional nonlinear feedback[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(4): e2197.
- [14] LI X W, GUO M, FAN J, et al. Crystal structure of 3-hydroxyanthranilic acid 3,4-dioxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*: a special subgroup of the type III extradiol dioxygenases[J]. *Protein Sci*, 2006, 15(4): 761-773.
- [15] BIRNER A, PLATZER M, BENGESSER S A, et al. Increased breakdown of kynurenine towards its neurotoxic branch in bipolar disorder[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172699.
- [16] YOSHIDA Y, FUJIGAKI H, KATO K, et al. Selective and competitive inhibition of kynurenine aminotransferase 2 by glycyrrhizic acid and its analogues[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10243.
- [17] 宋洪涛, 武忠, 张瑞霞, 等. 慢性应激对大鼠凝血功能和血小板活化的影响及电针的干预作用[J]. *中国康复理论与实践*, 2017, 23(3): 304-307.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 宋洪涛, 武忠, 赛音朝克图, 等. 电针对慢性应激大鼠犬尿酸代谢途径的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(7): 37-41.

Cite this article as: SONG H T, WU Z, SAIYIN C K T, et al. Effect of electro-acupuncture on kynurenine pathway in chronicity stress depression model rats[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(7): 37-41.