DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.04.014

针刺对抑郁模型大鼠海马 nNOS 与 PSD－95 共表达的影响

刘舰遥,王干一,吕琴,冯诗雨,马贤德,任路
(辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847)

摘要:目的 观察针刺治疗抑郁模型大鼠对海马中神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase,nNOS)与突触后致密蛋白－95(postsynaptic density－95,PSD－95)共表达的影响。方法 选择SPF级大鼠50只,随机分为正常组、模型组(腹腔注射利血平0.2 mg·kg^{-1}·d^{-1})、针刺组、ZL006组、针刺联合ANA－12组、8－OH－DPAT组共6组,正常组和模型组9只,余组各8只,观察体质量和肛温变化;采用旷场实验、糖水偏嗜实验、强迫游泳实验观察大鼠抑郁样行为;采用HE染色观察海马神经元形态变化;采用免疫荧光双标染色观察海马CA1区、CA3区神经元中nNOS与PSD－95、酪氨酸蛋白激酶受体B(tyrosine kinase receptor B,TrkB)与PSD－95的表达情况。结果 海马CA1区、CA3区神经元中nNOS与PSD－95、TrkB与PSD－95存在共表达,与模型组比较,针刺组和ZL006组抑郁样行为均显著改善($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$),CA3区nNOS与PSD－95的共表达水平显著下调($P<0.05$,$P<0.01$),CA3区TrkB与PSD－95的共表达水平显著上调($P<0.05$),海马神经元减少和损伤显著改善,针刺组海马CA1区nNOS的表达水平显著下调($P<0.01$),CA1区TrkB的表达水平显著上调($P<0.01$),8－OH－DPAT组CA1区nNOS的表达水平显著下调($P<0.01$);与针刺组比较,ANA－12组CA3区nNOS与PSD－95的共表达水平显著上调($P<0.05$),以上差异均有统计学意义。结论 针刺调节少阳枢机,可能通过上调海马CA3区神经元中nNOS与PSD－95的共表达水平参与发挥抗抑郁作用,该作用机制可能与CA3区TrkB受体有关。

关键词:针刺治疗;抑郁;nNOS;PSD－95
中图分类号:R245.31 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)04-0077-10

Effect of Acupuncture on Coexpressions of nNOS and PSD－95 in Hippocampus of Depression Model Rats

LIU Jianyao,WANG Ganyi,LYU Qin,FENG Shiyu,MA Xiande,REN Lu
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To observe the effect of acupuncture treatment on coexpression of neuronal nitric oxide synthase(nNOS) and postsynaptic dense－95(PSD－95) in the hippocampus of depression model rats. *Method* Fifty SPF grade rats were randomly divided into six groups:normal group,model group(intraperitoneal injection of 0.2 mg·kg^{-1}·d^{-1} of reserpine),acupuncture group,ZL006 group,acupuncture combined with ANA－12 group,8－OH－DPAT group. There were 9 rats in the normal group and model group,and 8 rats in each of the remaining groups. The changes in body weight and anal temperature were observed. Open field test,sucrose preference test and forced swimming test were applied to observe depression－like behaviors in rats. The morphological changes of hippocampal neurons were observe by HE staining. Immunofluorescence double staining was used to observe the positive expression of nNOS and PSD－95,as well as tyrosine kinase receptor B(TrkB) and PSD－95 in neurons of the hippocampal CA1 and CA3 regions. *Result* There were coexpressions of nNOS and PSD－95 as well as TrkB and PSD－95 in neurons of the hippocampal CA1 and CA3 regions. Compared with those in the model group,depression－like behaviors were significantly improved in the acupuncture group and ZL006 group($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$). The coexpression levels of nNOS and PSD－95 in the CA3 region were significantly down－regulated($P<0.05$,$P<0.01$),and the coexpression levels of TrkB and PSD－95 in the CA3 region were significantly up－regulated($P<0.05$). The reduction and damage of hippocampal neurons were significantly improved. The expression levels of nNOS in the hippocampal CA1 region were significantly down regulated($P<0.01$) and the expression levels of TrkB in the CA1 region were significantly up－regulated($P<0.01$) in the acupuncture group. The expression level of nNOS in the CA1 region of the 8－OH－DPAT group was significantly down－regulated ($P<0.01$). Compared with those in the acupuncture group,the coexpression levels of nNOS and PSD－95 in the CA3 region of the ANA－12 group were significantly up－regulated($P<0.05$),and the above differences were statistically significant.

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82374375,82274665);辽宁省特聘教授项目(辽教发〔2015〕153号);辽宁省高等学校创新团队项目(辽教函〔2018〕479号);辽宁省自然科学基金面上项目(2024－MS－125);辽宁省教育厅重点攻关项目(JYTZD2023195)

作者简介:刘舰遥(1989－),女,辽宁沈阳人,博士在读,研究方向:针灸治疗情志病机制。
通讯作者:任路(1966－),女,四川巴县人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医情志病基础与临床。E-mail:lnzyxkc@sina.com。
马贤德(1979－),男,辽宁朝阳人,正高级实验师,博士研究生导师,博士,研究方向:眼针活化肥大细胞的效应机制。E-mail:maxiande197@163.com。

Conclusion Acupuncture regulates Shaoyang pivot, which may participate in the antidepressant effect by up-regulating the coexpression levels of nNOS and PSD-95 in hippocampal CA3 neurons, and this mechanism of action may be related to TrkB receptors in the CA3 region.

Keywords: acupuncture treatment; depression; nNOS; PSD-95

抑郁症是以心境低落为主症的常见精神类疾病，其主症与中医“郁证”的“神颓志衰”类症状相似[1]，其病机与阳气亏虚相关。大量近期研究围绕神经炎症、神经营养因子缺失、功能连接异常等研究重点，是抑郁症发病相关重要机制[2]。有研究显示，N-甲基-D-天冬氨酸受体（N-methyl-D-aspartate receptor，NMDAR）、PSD-95、nNOS 通过 PDZ 结构域相互作用形成复合物，激活 nNOS 生成高水平一氧化氮（nitric oxide，NO），促进氧化应激和亚硝化反应[3]，能够负向调节神经结构可塑性[4]，在海马区可导致功能和结构异常，参与抑郁症发病[5]。针刺百会可通过参与降低海马 NMDA 亚基 NR2B 激活 nNOS 生成的 NO 水平，调节神经元突触结构可塑性，抑制兴奋性神经毒性以发挥抗抑郁作用[6]。本课题组前期研究显示，针刺能通过温补肾阳、通利督脉以促进肾精生髓以养脑神，上调海马单胺能神经保护相关蛋白以治疗肾阳虚型抑郁症[7]。《内经·玉机真藏篇》言：“移气于不足，神气乃得复”，少阳枢机在肾中阳气的温煦下枢转阳气，参与调节肾精与脑神互济。本研究拟通过观察抑郁模型大鼠海马神经元中 nNOS 与 PSD-95 蛋白阳性共表达水平的变化，探讨针刺通过调节少阳枢机改善抑郁样行为对蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 动物

实验用 SPF 级 8 周龄 SD 大鼠购自辽宁长生生物技术股份有限公司，许可证号：SYXK（辽）2019-0004，共 50 只，雌雄各 25 只，体质量（200±50）g。

1.2 药物

利血平（83580，默克 Sigma-Aldrich）；ZL006［4-（，5-二氯-2-羟基-苄基氨基）-2-羟基苯甲酸（Topchem Pharmaceuticals，Sligo，Ireland）］（HY-100456，MedChemExpress）；ANA-12（SF5332，Beyotime Biotechnology）；8-羟基-2-二丙基氨基四氢萘溴酸盐（8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide，8-OH-DPAT）（HY-112061，MedChemExpress）。

1.3 主要试剂及仪器

Goat Anti-Rabbit IgG H&L（FITC）（ab6717，abcam）；罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG（H+L）（ZF-0313，北京中杉金桥生物技术有限公司）；nNOS Rabbit Monoclonal Antibody（AF1819，Beyotime Biotechnology）；Rabbit Anti-TrkB antibody（bs-0175R，bioss）；PSD95（7E3）Mouse mAb（#36233，Cell Signaling Technology）；华佗牌针灸针（0.18 mm×25 mm，苏州医疗器械）；生物组织脱水机（KD-TS3A，KEDEE）；石蜡包埋机（EG1150，LEICA）；石蜡切片机（RM2235，LEICA）；正置荧光显微镜（BX-53，Olympus）。

1.4 分组及给药

大鼠随机分为正常组、模型组、针刺组、ZL006 组、针刺联合 ANA-12 组、8-OH-DPAT 组。正常组 9 只，雄鼠 5 只，雌鼠 4 只；模型组 9 只，雄鼠 4 只，雌鼠 5 只；余组各 8 只，雌雄各半；干预前正常组中 1 只雄鼠、模型组中 1 只雌鼠于干预前强迫游泳实验中死亡。除正常组外，余组均予腹腔注射利血平注射液 0.2 mg·kg^{-1}·d^{-1}，持续 28 d[8]。正常组予腹腔注射等体积 0.9% 氯化钠注射液。针刺组和针刺联合 ANA-12 组于造模第 15 天予毫针针刺，腧穴选取“百会”，位于大鼠顶骨正中，平刺 5 mm[9]；双侧“风池”位于大鼠颈后枕骨下胸锁乳突肌和斜方肌之间的凹陷处，向对侧眼球方向进针，深度约 3 mm[9]；“肾俞”位于大鼠背部，第 2 腰椎下旁开 5 mm 之两旁肋间[10]；“太冲”位于后肢足背第 1 与第 2 跖骨间凹陷处，直刺 1 mm[9]；留针 20 min，1 次/d，连续 14 d。末次行为学检测前 3 d 予 ZL006 组 nNOS-PSD-95 复合物抑制剂 ZL006 注射液腹腔注射 2.8 mg·kg^{-1}·d^{-1}，连续 3 d[11]。于取材前 24 h 予针刺联合 ANA-12 组 TrkB 拮抗剂 ANA-12 注射液皮下注射 0.14 mg·kg^{-1}[12]。予 8-OH-DPAT 组 5-HT1A 激动剂 8-OH-DPAT 腹腔注射 0.028 mg·kg^{-1}·d^{-1}，连续 28 d[13]。

2 方法

2.1 行为学检测

体质量和肛温于干预前和干预结束后检测，旷场实验、糖水偏嗜试验、强迫游泳实验于干预结束后检测。

2.1.1 体质量 将带盒电子秤去皮调零，将大鼠放于盒中记录质量数值。

2.1.2 肛温 在大鼠安静状态下将电子温度计探头缓慢探入大鼠肛门约 3 cm，1 min 左右后读取温度值。

2.1.3 旷场实验 用软件将 100 cm×100 cm 箱底划分为 4 cm×4 cm 等面积方格，将大鼠放于旷场箱自由活动 5 min，摄像头同步实时观察，记录大鼠穿越格子数、水平移动总距离、两前爪离地行为次数、穿越方格数和中央区域停留时间，水平运动得分=水平移动总距离/穿越格子数，垂直运动得分=两前爪离地行为次数[14]。

2.1.4 糖水偏嗜试验 检测前 24 h 适应性训练大鼠饮 1% 蔗糖水，检测开始则更改为等体积纯水和 1% 蔗糖水各 1 瓶，24 h 后观察糖水和纯水消耗量并计算糖水偏好率，糖水偏好率=蔗糖水消耗量/（蔗糖水消耗量+纯水消耗量）×100%，再次予同样糖水和纯水 2 瓶交换位置，24 h 后观察并计算，取两次测量结果的平均值。

2.1.5 强迫游泳实验 将大鼠单只放入高 60 cm、水深 40 cm、水温 25～28 ℃的塑料桶中，观察大鼠在水中游泳、爬壁和静止情况并记录静止状态累计时长作为不动时间。

2.2 标本采集及处理

行为学检测结束后予大鼠禁食 24 h 后 10% 水合氯醛麻醉取材，将大鼠断头取脑组织，PBS 清洗后置于 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h，根据海马在大脑皮层的定位沿冠状面分层切片，脱水后放于 60 ℃石蜡中包埋，将蜡块切为厚度 5 μm 和 7 μm 的组织切片。

2.3 苏木精-伊红（hematoxylin eosin，HE）染色

依次置于二甲苯和乙醇溶液中进行脱蜡至水，置于苏木素液中染 5 min，水洗和蓝化后置于伊红液中 5 min，水洗后脱水透明，用中性树胶封片，×200 倍镜下观察海马 CA1 和 CA3 区神经元形态变化。

2.4 免疫荧光双标染色

将海马切片脱蜡至水，0.01 mol/L PBS 溶液洗片 5 min×3 次。将 pH 6.0 的 0.01 mol/L 柠檬酸钠抗原修复液加热至 95

℃，恒温对切片进行抗原修复 20 min，冷却后 PBS 洗片 3 次，滴加 0.1% TritonX－100 溶液以增加通透性，PBS 洗片 3 次，滴加 5% BSA 溶液孵育 1.5 h 以完成封闭。分别滴加兔源 nNOS 抗体（1∶100）与小鼠源 PSD－95 抗体（1∶100）或兔源 TrkB 抗体（1∶100）与小鼠源 PSD－95 抗体（1∶100）以孵育一抗，置于 4 ℃冰箱过夜，次日取出后 PBS 洗片 6 次。避光滴加山羊抗兔源 FITC（1∶1000）与山羊抗小鼠源 TRITC（1∶100）全覆盖切片以孵育二抗，避光 37 ℃恒温孵育 2 h，PBS 洗片 6 次。避光滴加 DAPI 染色液孵育 10 min 以染核，PBS 洗片 3 次，滴加抗荧光淬灭剂封片。采用正置荧光显微镜 ×400 倍镜下观察海马 CA1 和 CA3 区的阳性神经元变化，各组每个脑区随机拍摄 6～8 张不重复视野的图片进行分析，Image J 软件统计阳性细胞计数比[15]。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据分析正态性、方差齐性后进行单因素方差分析或非参数检验，采用 LSD 或 Tamhane 或 Kruskal－Wallis One－ANOVA 进行两两比较，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 行为学结果

3.1.1 一般情况 干预结束后，与正常组相比，余组出现不同程度的弓背、蜷缩、进食减少、眯眼、倦怠少动、小便频、皮毛稀疏少泽。

3.1.2 体质量和肛温 如表 1。干预前各组未见明显差异（$P>0.05$），干预后各组大鼠体质量明显降低（$P<0.001$），除针刺组外余组大鼠肛温明显降低（$P<0.01$，$P<0.001$）。

表 1 各组大鼠干预前后体质量、肛温比较（$\bar{x} \pm s$） 单位：g

组别	n	体质量/(g)		肛温/(℃)	
		干预前	干预后	干预前	干预后
正常组	9	180.88±26.17	277.88±9.11	36.21±0.15	36.33±0.21
模型组	9	183.13±23.66	202.75±14.89$^{\#\#\#}$	36.25±0.12	35.84±0.15$^{\#\#\#}$
针刺组	8	182.38±25.29	221.50±16.34$^{\#\#\#}$	36.23±0.17	36.16±0.32
ZL006 组	8	175.88±26.26	210.25±10.74$^{\#\#\#}$	36.20±0.16	35.94±0.17$^{\#\#\#}$
针刺联合 ANA－12 组	8	200.38±18.81	206.50±9.81$^{\#\#\#}$	36.21±0.16	35.96±0.15$^{\#\#}$
8－OH－DPAT 组	8	193.25±23.13	201.38±10.14$^{\#\#\#}$	36.25±0.16	35.96±0.14$^{\#\#}$

注：##与正常组比较，$P<0.01$；###与正常组比较，$P<0.001$。

3.1.3 糖水偏嗜实验 如表 2。与正常组相比，模型组糖水偏好率明显下降（$P<0.001$）；与模型组相比，针刺组、ZL006 组和 8－OH－DPAT 组均有明显升高（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$）；与针刺组相比，针刺联合 ANA－12 组有所下降（$P<0.05$）。

3.1.4 强迫游泳实验 如表 2。与正常组相比，模型组游泳不动时间明显增加（$P<0.001$）；与模型组相比，针刺组、ZL006 组和 8－OH－DPAT 组均有明显减少（$P<0.001$）；与针刺组相比，针刺联合 ANA－12 组明显增加（$P<0.001$）。

3.1.5 旷场实验 如表 3。干预后与正常组相比，模型组的水平运动得分、垂直运动得分和中央格停留时间明显降低（$P<0.001$）；与模型组相比，针刺组和 ZL006 组 3 项均有明显增加（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$），8－OH－DPAT 组未见明显改变（$P>0.05$）；与针刺组相比，针刺联合 ANA－12 组上述 3 项均有明显减少（$P<0.01$，$P<0.001$）。

3.2 HE 结果

如插页 XVII 图 1。正常组大鼠海马 CA1、CA3 区可见相应脑区数量丰富、排列整齐、形态规则的神经元；与正常组相比，余组均有不同程度的神经元数减少，细胞形态欠规则，细胞核固缩，细胞质色不均，细胞皱缩，针刺组、ZL006 组、8－OH－DPAT 组、针刺联合 ANA－12 组神经元病理改变程度介于正常组和模型组之间，与针刺组相比，针刺联合 ANA－12 组病理改变更为明显。

表 2 各组大鼠糖水偏好率、游泳不动时间比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	糖水偏好率/(%)	游泳不动时间/(s)
正常组	9	78.89±8.67	28.63±6.05
模型组	9	32.02±11.54$^{\#\#\#}$	109.00±10.13$^{\#\#\#}$
针刺组	8	65.60±8.41***	68.38±6.59***
ZL006 组	8	58.91±6.85*	75.25±7.61***
针刺联合 ANA－12 组	8	53.65±12.29$^{\triangle}$	92.75±8.31$^{\triangle\triangle\triangle}$
8－OH－DPAT 组	8	49.20±8.53**	88.63±15.16***

注：###与正常组比较，$P<0.001$；＊与模型组比较，$P<0.05$；＊＊与模型组比较，$P<0.01$；＊＊＊与模型组比较，$P<0.001$；△与针刺组比较，$P<0.05$；△△△与针刺组比较，$P<0.001$。

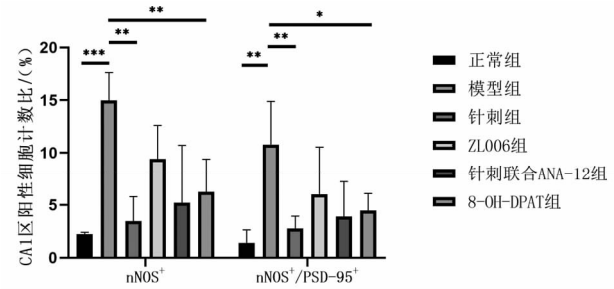
表 3 各组大鼠水平运动得分、垂直运动得分和中央格停留时间（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	水平运动得分/(分)	垂直运动得分/(分)	中央格停留时间/(s)
正常组	9	77.21±14.48	18.13±.42	9.45±1.38
模型组	9	14.12±12.27$^{\#\#\#}$	5.25±1.28$^{\#\#\#}$	4.44±0.57$^{\#\#\#}$
针刺组	8	28.37±11.71**	11.88±1.81***	8.89±1.56***
ZL006 组	8	26.85±6.45*	9.25±1.04***	8.77±0.64***
针刺联合 ANA－12 组	8	12.67±8.05$^{\triangle\triangle}$	5.25±1.04$^{\triangle\triangle\triangle}$	5.56±0.72$^{\triangle\triangle\triangle}$
8－OH－DPAT 组	8	13.57±6.23	6.00±1.51	4.94±0.68

注：###与正常组比较，$P<0.001$；＊与模型组比较，$P<0.05$；＊＊与模型组比较，$P<0.01$；＊＊＊与模型组比较，$P<0.001$；△△与针刺组比较，$P<0.01$；△△△与针刺组比较，$P<0.001$。

3.3 免疫荧光结果

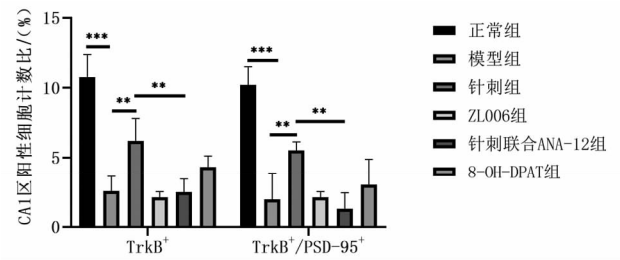
如插页 XVIII 图 2、图 3。海马 CA1 区存在共标的 nNOS 和 PSD－95 阳性神经元，与正常组相比，模型组的 nNOS 阳性细胞计数比、nNOS 与 PSD－95 共标阳性细胞计数比均明显升高（$P<0.01$，$P<0.001$）；与模型组相比，针刺组的 nNOS、nNOS 与 PSD－95 共标均明显降低（$P<0.01$），ZL006 组差异未见统计学意义（$P>0.05$），8－OH－DPAT 组的 nNOS、nNOS 与 PSD－95 共标均明显降低（$P<0.01$，$P<0.05$）。



注：＊$P<0.05$；＊＊$P<0.01$；＊＊＊$P<0.001$。

图 3 各组大鼠海马 CA1 区 nNOS 阳性细胞、nNOS 与 PSD－95 共标阳性细胞的表达

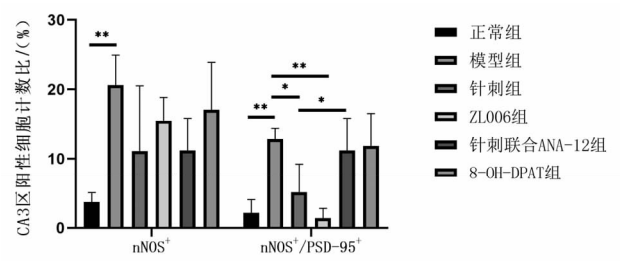
如插页 XIX 图 4、图 5。海马 CA1 区存在共标的 TrkB 和 PSD－95 阳性神经元，与正常组相比，模型组的 TrkB、TrkB 与 PSD－95 共标阳性细胞计数比均明显降低（$P<0.001$）；与模型组相比，针刺组的 TrkB、TrkB 与 PSD－95 共标均明显升高（$P<0.01$），ZL006 组和 8－OH－DPAT 组差异未见统计学意义（$P>0.05$）；与针刺组相比，针刺联合 ANA－12 组的 TrkB、TrkB 与 PSD－95 共标均明显降低（$P<0.01$）。



注：* *P<0.01；* * *P<0.001。

图 5 各组大鼠海马 CA1 区 TrkB 阳性细胞、TrkB 与 PSD－95 共标阳性细胞的表达

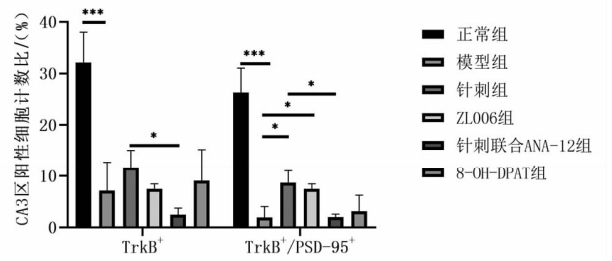
如插页 XX 图 6、图 7。海马 CA3 区存在共标的 nNOS 和 PSD－95 阳性神经元，与正常组相比，模型组的 nNOS 阳性细胞计数比、nNOS 与 PSD－95 共标阳性细胞计数比均明显升高（P<0.01）；与模型组相比，针刺组和 ZL006 组 nNOS 阳性细胞计数比差异未见统计学意义（P>0.05），nNOS 与 PSD－95 共标明显降低（P<0.05，P<0.01），8－OH－DPAT 组差异未见统计学意义（P>0.05）；与针刺组相比，针刺联合 ANA－12 组 nNOS 阳性细胞计数比差异未见统计学意义（P>0.05），nNOS 与 PSD－95 共标明显上升（P<0.05）。



注：* P<0.05；* * P<0.01。

图 7 各组大鼠海马 CA3 区 nNOS 阳性细胞、nNOS 与 PSD－95 共标阳性细胞的表达

如插页 XXI 图 8、图 9 海马 CA3 区存在共标的 TrkB 和 PSD－95 阳性神经元，与正常组相比，模型组的 TrkB、TrkB 与 PSD－95 共标阳性细胞计数比均明显降低（P<0.001）；与模型组相比，针刺组和 ZL006 组 TrkB 阳性细胞计数比差异未见统计学意义（P>0.05），TrkB 与 PSD－95 共标明显升高（P<0.05），8－OH－DPAT 组差异未见统计学意义（P>0.05）；与针刺组相比，针刺联合 ANA－12 组的 TrkB、TrkB 与 PSD－95 共标均明显降低（P<0.05）。



注：* P<0.05；* * *P<0.001。

图 9 各组大鼠海马 CA3 区 TrkB、TrkB－PSD－95 共标阳性细胞的表达

4 讨论

《千金要方·胆腑方》云："凡髓虚实之应，主于肝胆"，少阳为阳气转枢之处，肾精由阳气化髓并推动上行，经少阳转枢，行于三焦，部分上达清窍，充养脑髓，调理脑神。本课题组前期研究显示，命门火衰，则相火不足[16]，少阳失温煦而枢机不利，水火气机升降失常，阴精不升则脑髓失养，神机失用，阳火不降则头部气血壅滞、阴寒阻于下焦[6]，形成肾脑病理循环[17]，发为抑郁，属本虚标实证，针刺督脉经穴如百会、命门穴能温肾通督，协调阴阳气机升降以改善肾脑病理循环而发挥抗抑郁作用[6]。本研究针对病机中心环节阴阳枢机不利另选择以调节少阳枢机为主，配合温补少阴以温少阳相火，协调阴阳升降以维持肾脑互济。针刺头部少阳经风池穴可通利少阳、疏通脑髓气机壅滞，助百会通督脉、振奋阳气、醒脑宁神、共同协调阴阳气机升降，针刺风池向对侧眼球方向，可通过调节椎动脉的舒缩功能改善供血和血流速变化[18]。太冲调畅全身气机，肾俞补肾助阳益髓、临督脉以助百会升阳。四穴合用调节少阳枢机、醒脑调神，治疗阳虚气郁之郁证。单胺类递质耗竭剂利血平抑制囊泡再摄取 5－HT[19]，诱导大鼠体质量、体温减低，上睑无力下垂，抑郁样行为和海马结构损伤，是阳气气郁型抑郁模型的常用造模方法[7]。能诱导脑组织 NO 含量增高、5－HT 含量减少[20]，海马 5－HT1A 异源受体减少[21]。本研究针刺干预能升高模型大鼠肛温，明显抑制快感缺失和绝望感、促进大鼠自主运动和探索行为，说明针刺可能通过振奋、输布阳气，改善抑郁样行为。

nNOS 是 NMDA 受体下游信号分子，是 NO 生成的主要限速酶[22]。相关研究显示，抑郁情绪与海马和 PFC nNOS 的过度表达影响神经发生有关[23]。NO 双向调节中枢神经，高浓度时具有细胞毒性[7]。PSD－95 是位于兴奋性 Glu 能神经树突棘突触后膜的脚手架蛋白，参与突触传递功能，NMDA、nNOS 蛋白与 PSD95 相互作用并耦联形成复合物，可激活 nNOS 诱导的神经细胞毒作用[24]。下调海马 CA1、CA3 区 nNOS－PSD－95 复合物及 nNOS 的表达能抑制细胞凋亡[25]，ZL006 能够通过促进 nNOS－PSD－95 解耦联以改善抑郁样行为[11]，故选择 CA1 和 CA3 区为观察区观察各组神经元中 nNOS 与 PSD－95 蛋白的阳性共表达情况[26]。TrkB 与 PSD－95 相互作用有助于维持脑源性神经营养因子（brain－derived neurotrophic factor，BDNF）－TrkB 二聚体功能和结构完整性，使其正常调节下游通路[27]，ZL006 能够间接促进海马 CA3 区 PSD－95 与 TrkB 相互作用[28]，抑制氧化应激和炎症反应以发挥抗抑郁作用[29]，而 ANA－12 逆转了上述作用[28]。有研究显示，5－HT1A 受体是海马 nNOS 的内源性抑制因子，抑制脑内 NO 生成[30]，而抑制 nNOS 活性能助 5－HT1A 发挥抗抑郁作用[31]。8－OH－DPAT 能通过激活海马 5－HT1A 异源受体加强 5－HT 能神经传导，进而缓解抑郁样行为[32]。故本研究亦观察各组神经元中 TrkB 与 PSD－95 蛋白的阳性共表达情况，选择皮下注射 ANA－12 和腹腔注射 8－OH－DPAT 观察海马 TrkB 和 5－HT1A 受体对 nNOS 与 PSD－95 共表达的影响[33]。针刺相关研究显示，针刺少阳经穴配合督脉百会穴能够调节少阳枢机、充养脑髓，参与下调大鼠海马 nNOS 及下游信号通路，降低 NO 水平，调整微循环，抑制细胞凋亡[34]。

本研究镜下观察到海马 CA1、CA3 区神经元的 nNOS 和 PSD－95、TrkB 和 PSD－95 阳性表达存在共定位，针刺能有效下调 CA1 区 nNOS 的表达水平，降低 CA3 区 nNOS 与 PSD－95 的共表达水平，有效上调 CA1 区 TrkB 的表达水平，上调 CA3 区 TrkB 与 PSD－95 的共表达水平，改善神经元减少、变性和损伤。抑制 nNOS－PSD－95 耦联形成复合物有效下调 CA3 区 nNOS 与 PSD－95 的共表达水平，上调 CA3 区 TrkB 与 PSD－95 的共表达水平，激活 5－HT1A 受体能减少 CA1 区 nNOS 的表达水平，抑制 TrkB 受体能抑制针刺对 CA3 区 nNOS 与PSD－

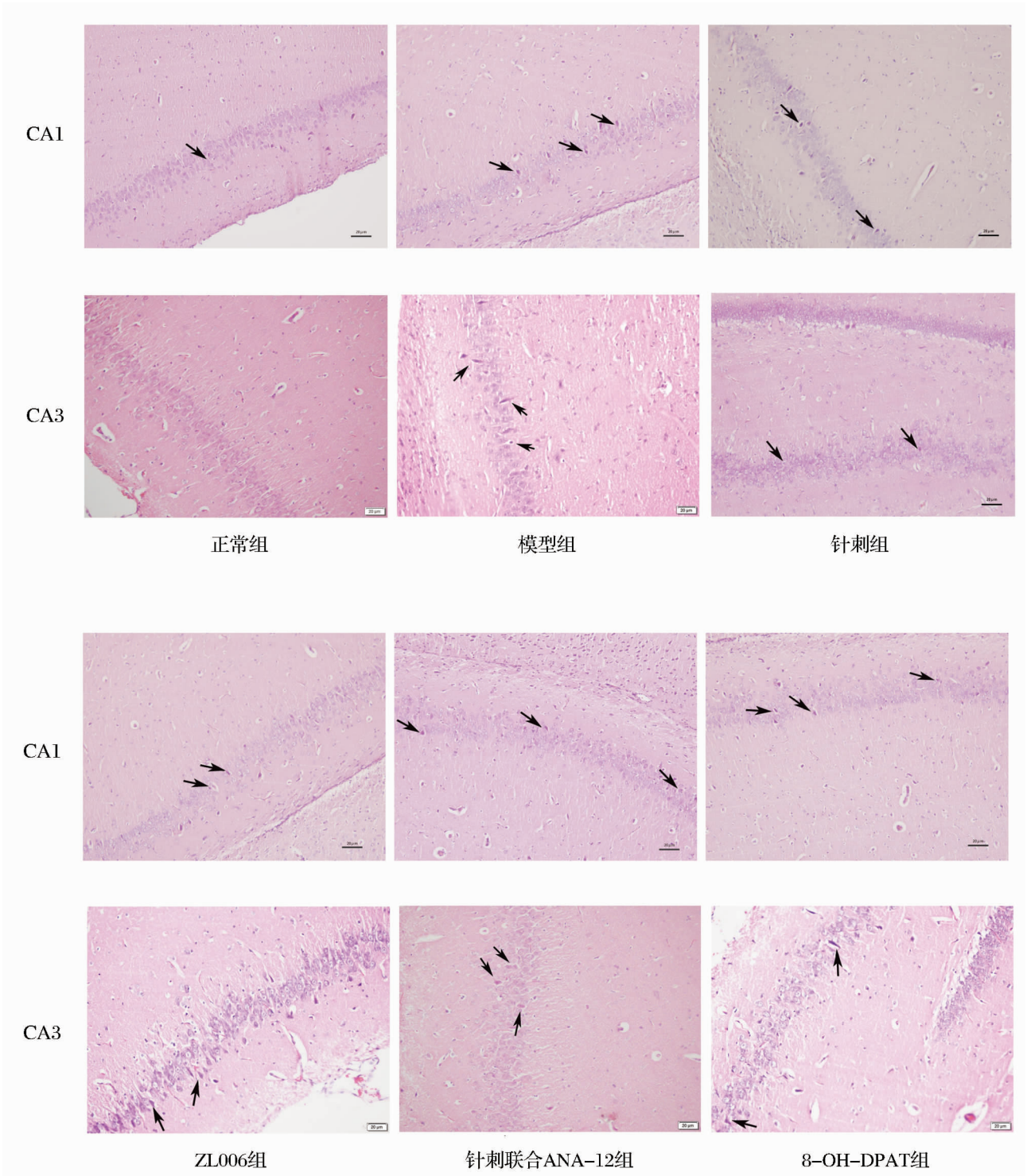
95 的共表达水平的调节作用。提示抑制 nNOS 与 PSD－95 蛋白相互作用可能诱导海马 CA3 区 nNOS 与 PSD－95 的共表达水平下调、TrkB 与 PSD－95 的共表达水平上调。针刺可能通过调节少阳枢机下调海马 CA3 区 nNOS 与 PSD－95 的共表达水平，该调节机制可能与缓解神经元结构性损伤进而发挥抗抑郁作用有关，可能与 CA3 区 TrkB 受体的表达水平有关。CA1 区 5－HT1A 受体可能通过下调 nNOS 的表达水平改善部分抑郁样行为。本研究仅观察针刺治疗抑郁症对海马神经元中 nNOS 与 PSD－95 蛋白共表达水平的影响，而针刺对 nNOS 与 PSD－95 蛋白相互作用的影响需进一步研究。目前尚缺乏大量针对中医针药调节 nNOS－PSD－95 复合物治疗抑郁的相关研究，其作用机制与方证特点缺乏充分的理论联系，仍需进一步探索。

参考文献

[1] 中华医学会精神科学会南京医科大学脑科医院. 中国精神疾病分类方案与诊断标准：CCMD－2－R[M]. 南京：东南大学出版社，1995：69－70.
[2] KIRAZ S，DEMIR E. Global scientific outputs of schizophrenia publications from 1975 to 2020：a bibliometric analysis[J]. Psychiatr Q，2021，92(4)：1725－1744.
[3] DOUCET M V，HARKIN A，DEV K K. The PSD－95/nNOS complex：New drugs for depression？[J]. Pharmacol Ther，2012，133(2)：218－229.
[4] LUO C X，ZHU D Y. Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase[J]. Neurosci Bull，2011，27(1)：23－35.
[5] ANTONIOU G，LAMBOURG E，STEELE J D，et al. The effect of adverse childhood experiences on chronic pain and major depression in adulthood：a systematic review and meta－analysis[J]. Br J Anaesth，2023，130(6)：729－746.
[6] 史榕荇. 电针对慢性应激模型大鼠 HPA 轴－Glu－NMDA 受体－NO 路径调节作用机理的研究[D]. 北京：北京中医药大学，2007.
[7] 曹灵修，任路. 基于痛敏化和红外热成像技术探讨抑郁症（肾阳虚证）督脉经穴反应[J]. 中华中医药杂志，2023，38(3)：1287－1291.
[8] 李亚慧. 抑郁症的文献研究与天心解郁方的实验研究[D]. 北京：中国中医科学院，2020.
[9] 郭义，方剑乔. 实验针灸学实验指导[M]. 3 版. 北京：中国中医药出版社，2012：47－48.
[10] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京：中国中医药出版社，2003：147.
[11] DOUCET M V，LEVINE H，DEV K K，et al. Small－molecule inhibitors at the PSD－95/nNOS interface have antidepressant－like properties in mice[J]. Neuropsychopharmacology，2013，38(8)：1575－1584.
[12] WANG X M，PAN W，XU N，et al. Environmental enrichment improves long－term memory impairment and aberrant synaptic plasticity by BDNF/TrkB signaling in nerve－injured mice[J]. Neurosci Lett，2019，694：93－98.
[13] SHI H J，WU D L，CHEN R，et al. Requirement of hippocampal DG nNOS－CAPON dissociation for the anxiolytic and antidepressant effects of fluoxetine[J]. Theranostics，2022，12(8)：3656－3675.
[14] 刘冉，张堃，王文礼，等. 基于定量蛋白质组学探讨针刺对慢性不可预测温和应激抑郁大鼠的作用机制[J]. 针刺研究，2023，48(6)：533－540，584.
[15] 沈爱国，高尚锋，程纯，等. 突触后密度蛋白 95 在大鼠脊髓损伤后的表达变化[J]. 解剖学杂志，2007，30(2)：160－164.
[16] 谷建军，任路. 肾阳虚证形成源流及其关键问题探讨[J]. 辽宁中医药大学学报，2021，23(12)：9－13.
[17] 吕琴，任路. 肾脑相关疗法治疗围绝经期抑郁症作用机制的研究概况[J]. 中华中医药杂志，2024，39(2)：852－857.
[18] 黄树航. 电项针结合孙氏腹针治疗慢性疲劳综合征的临床研究[D]. 北京：北京中医药大学，2023.
[19] NAGAKURA Y，OE T，AOKI T，et al. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression：a putative animal model of fibromyalgia[J]. PAIN，2009，146(1－2)：26－33.
[20] PAN X，WANG M，WU Y，et al. Identification of active ingredients in Wuzhuyu decoction improving migraine in mice by spectral efficiency association[J]. Mol Med Rep，2015，12(1)：1524－1534.
[21] LI S，HAN J，WANG D S，et al. Echinocystic acid reduces reserpine－induced pain/depression dyad in mice[J]. Metab Brain Dis，2016，31(2)：455－463.
[22] ZHANG J，LIU J，LI D，et al. Calcium antagonists for acute ischemic stroke[J]. Cochrane Database Syst Rev，2019，2：CD001928.
[23] 王萍. 神经型一氧化氮合酶对工业反式脂肪饮食的肥胖小鼠抑郁样行为的调节[D]. 汕头：汕头大学，2022.
[24] PONTING C P，PHILLIPS C. DHR domains in syntrophins，neuronal NO synthases and other intracellular proteins[J]. Trends Biochem Sci，1995，20(3)：102－103.
[25] 蔡明阳. 从 TRPV1/NMDAR 介导的兴奋性毒性探讨蒙药扎冲十三味丸对 AIS 的神经保护机制[D]. 北京：北京中医药大学，2023.
[26] UGALDE－TRIVIÑO L，DÍAZ－GUERRA M. PSD－95：an effective target for stroke therapy using neuroprotective peptides[J]. Int J Mol Sci，2021，22(22)：12585.
[27] YOSHII A，CONSTANTINE－PATON M. BDNF induces transport of PSD－95 to dendrites through PI3K－AKT signaling after NMDA receptor activation[J]. Nat Neurosci，2007，10：702－711.
[28] CAI C Y，CHEN C，ZHOU Y，et al. PSD－95－nNOS coupling regulates contextual fear extinction in the dorsal CA3[J]. Sci Rep，2018，8：12775.
[29] RASHEED M，WANG H，WANG C L，et al. Opposing manner of miR－455－3p against NR2B－PSD－95－nNOS complex in the cortex and hippocampus of depressive rats under simulated complex space environment[J]. J Neurochem，2023，165(3)：391－412.
[30] LOPEZ－TORRES B，ARES I，MARTÍNEZ M，et al. Neurotoxicity induced by the pyrethroid lambda－cyhalothrin：alterations in monoaminergic systems and dopaminergic and serotoninergic pathways in the rat brain[J]. Food Chem Toxicol，2022，169：113434.
[31] HIROAKI－SATO V A，SALES A J，BIOJONE C，et al. Hippocampal nNOS inhibition induces an antidepressant－like effect：involvement of 5HT1A receptors[J]. Behav Pharmacol，2014，25(3)：187－196.
[32] TZENG N S，CHUNG J Y，LIN C C，et al. Effects of subchronic buspirone treatment on depressive profile in socially isolated rats：implication of early life experience on 5－HT1A receptor－related depression[J]. Pharmaceuticals，2024，17(6)：717.
[33] 阚宇. 慢性痛大鼠海马 NO/cGMP/PKG 信号通路在针刺累积镇痛效应中的作用分析[D]. 北京：中国中医科学院，2013.
[34] 周钰，李秀娟，刘欢，等. 头针联合艾灸对缺血缺氧性脑损伤脑性瘫痪幼鼠记忆与学习能力及脑组织一氧化氮、谷胱甘肽过氧化物酶水平的影响[J]. 河北中医，2021，43(1)：107－110，153.

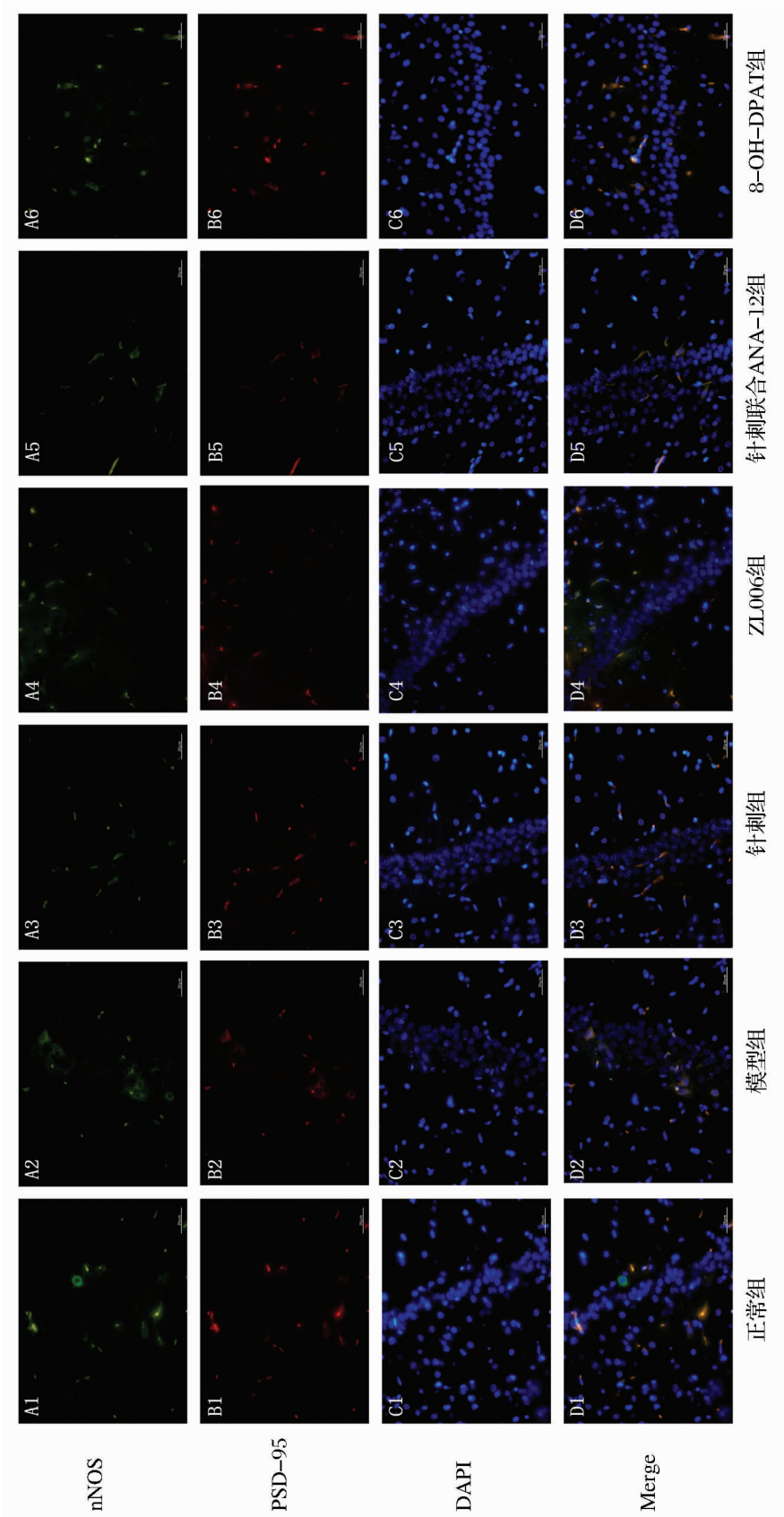
针刺对抑郁模型大鼠海马 nNOS 与 PSD－95 共表达的影响

（正文见 77－81 页）



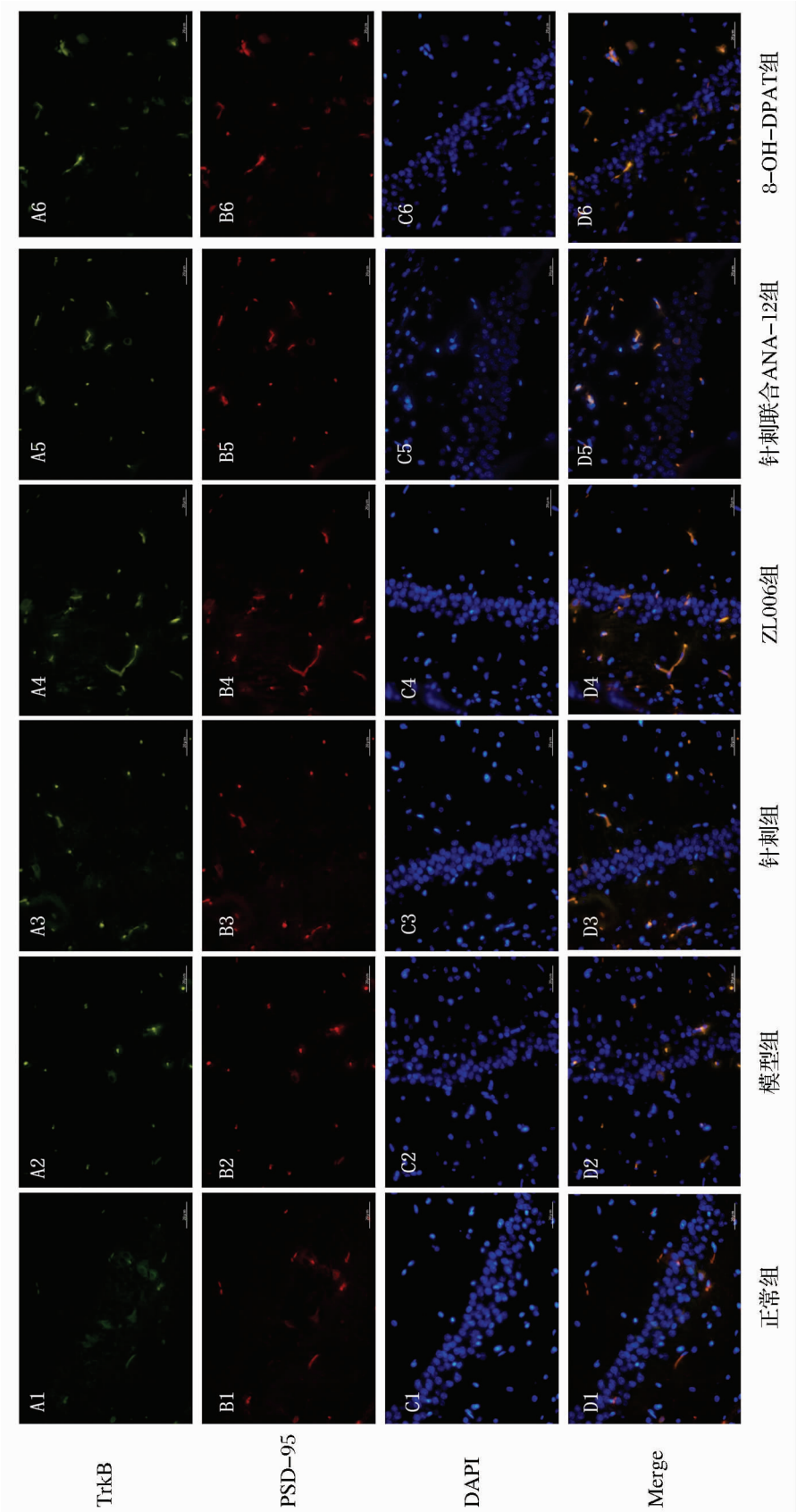
注：黑色箭头所指为固缩的细胞核、胞质浓染和细胞皱缩。

图 1　各组大鼠海马 CA1、CA3 区 HE 染色（×200；比例尺＝20 μm）



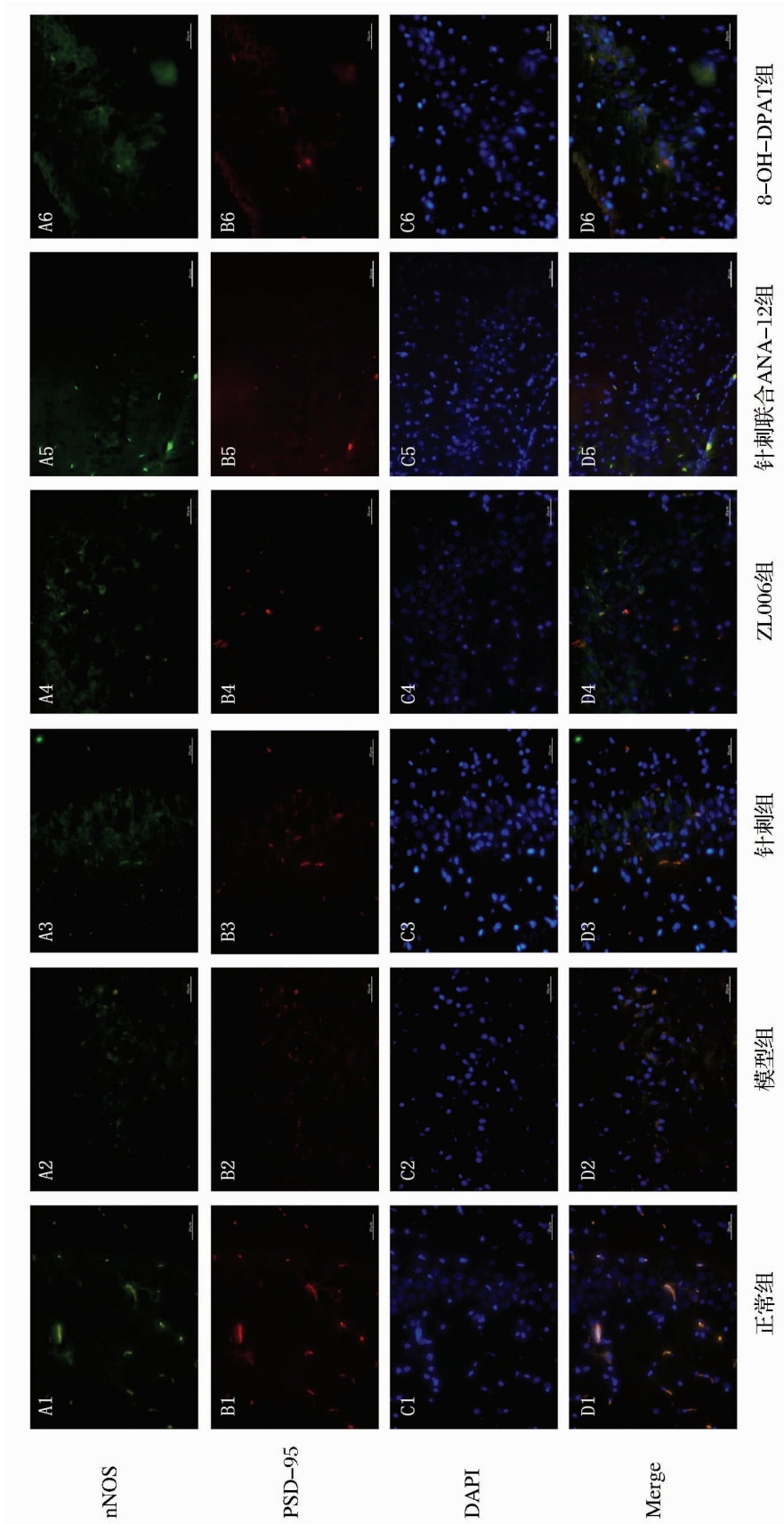
注：A1～6. nNOS 免疫染色；B1～6. PSD－95 免疫染色；C1～6. 细胞核染色；D1～6. nNOS 与 PSD－95 免疫荧光的重叠。

图 2　各组大鼠海马 CA1 区 nNOS 与 PSD－95 共标的免疫荧光染色（×400；比例尺 =20 μm）



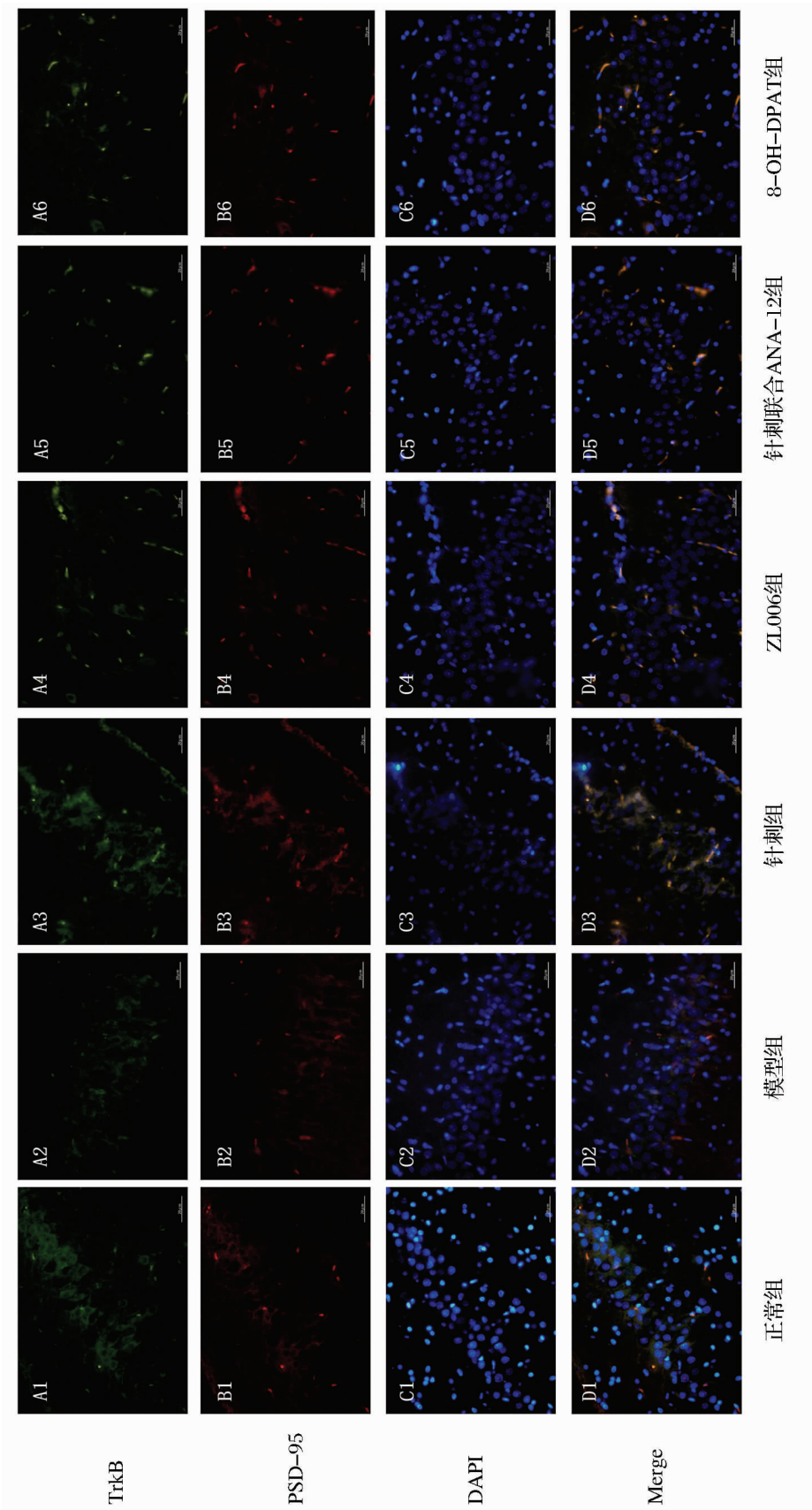
注：A1～6. TrkB 免疫染色；B1～6. PSD－95 免疫染色；C1～6. 细胞核染色；D1～6. TrkB 与 PSD－95 免疫荧光的重叠。

图 4　各组大鼠海马 CA1 区 TrkB 与 PSD－95 共标的免疫荧光染色（×400；比例尺＝20 μm）



注：A1～6. nNOS 免疫染色；B1～6. PSD－95 免疫染色；C1～6. 细胞核染色；D1－6. nNOS 与 PSD－95 免疫荧光的重叠。

图 6 各组大鼠海马 CA3 区 nNOS 与 PSD－95 共标的免疫荧光染色（×400；比例尺 =20 μm）



注：A1～6. TrkB 免疫染色；B1～6. PSD－95 免疫染色；C1～6. 细胞核染色；D1～6. TrkB 与 PSD－95 免疫荧光的重叠。

图 8　各组大鼠海马 CA3 区 TrkB－PSD－95 共标的免疫荧光染色（×400；比例尺＝20 μm）