

电针通过 Bcl-2/Bax/caspase-3 信号通路修复海马线粒体损伤改善创伤后应激障碍大鼠的焦虑症状

马丹丹¹, 程洁¹, 张虹¹, 刘广¹, 宋凯²

¹成都中医药大学针灸推拿学院, 四川 成都 610000; ²四川卫生康复职业学院, 四川 自贡 643000

摘要:目的 观察电针治疗对创伤后应激障碍(PTSD)大鼠海马线粒体超微结构及 Bcl-2、Bax、caspase-3 基因和蛋白表达的影响, 探讨其治疗作用及机制。方法 40 只 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为空白对照组、模型组、假针刺组、帕罗西汀组、电针组, 8 只/组。采用连续单一应激联合足底电刺激建立 PTSD 模型, 空白组和模型组不予以治疗, 电针组针刺“百会”“神庭”及双侧“肝俞”“肾俞”, 假针刺组大鼠浅刺膻穴旁开 5 mm 处, 不连接电针仪, 15 min/次, 5 次/周, 持续 3 周。帕罗西汀组给予帕罗西汀混悬液(10 mg/kg)灌胃, 5 次/周, 持续 3 周。治疗后通过旷场实验和高架十字迷宫实验评估行为学变化, HE 染色和尼氏染色观察海马病理及神经细胞变化, 电镜观察线粒体超微结构, 实时荧光定量 PCR 和免疫荧光检测 Bcl-2、Bax、caspase-3 的 mRNA 及蛋白表达。结果 与空白组相比, 模型组大鼠旷场活动总距离、高架十字迷宫开臂区域活动路程及时间明显减少($P < 0.05$); 海马神经细胞数量减少, 细胞皱缩、空泡增多、血管周围水肿, 线粒体肿胀、膜破损、嵴减少; 海马神经细胞数量明显减少($P < 0.0001$); Bcl-2 表达下降, Bax、caspase-3 表达上升($P < 0.0001$); 与模型组相比, 帕罗西汀组和电针组旷场活动总距离、高架十字迷宫开臂区域路程明显增加($P < 0.01$); 尼氏染色神经细胞数量增加($P < 0.05$); 海马神经元皱缩减少, 细胞形态更规则、排列更整齐, 且神经元结构染色较均匀; 线粒体结构较为完整; Bcl-2 表达上升, Bax、caspase-3 表达下降($P < 0.001$); 帕罗西汀组高架十字迷宫开臂区域活动时间增加, 电针组仅呈上升趋势($P > 0.05$); 假针刺组无明显改善。结论 电针可能通过上调 Bcl-2、下调 Bax 和 caspase-3, 改善海马线粒体损伤, 发挥对 PTSD 大鼠的治疗作用。

关键词: 创伤后应激障碍; 电针; 线粒体; 神经细胞; caspase-3; 焦虑障碍

Electroacupuncture improves post-traumatic stress disorder in rats by alleviating hippocampal mitochondrial injury via regulating Bcl-2/Bax/caspase-3 signaling

MA Dandan¹, CHENG Jie¹, ZHANG Hong¹, LIU Guang¹, SONG Kai²

¹College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610000, China; ²Sichuan Health and Rehabilitation Vocational College, Zigong 643000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism underlying the therapeutic effect of electroacupuncture (EA) on post-traumatic stress disorder (PTSD) in rats. **Methods** Forty male SD rats were randomized equally into blank control group, PTSD model group, sham-acupuncture group, paroxetine group, and EA group. In the latter 3 groups, the rat models of PTSD, induced by continuous single-prolonged stress and plantar electrical stimulation, were treated with EA at GV20, GV24, BL18 and BL23 acupoints for 15 min (5 times a week for 3 weeks), sham-acupuncture without electrical stimulation, or gavage with paroxetine suspension on the same schedule. Behavioral changes of the rats were evaluated using open field test (OFT) and elevated plus maze (EPM) test. Hippocampal pathologies and neuronal changes were examined with HE and Nissl staining, and mitochondrial ultrastructure was examined using electron microscopy. The mRNA and protein expression levels of Bcl-2, Bax, and caspase-3 were detected by RT-qPCR and immunofluorescence staining. **Results** The rat models of PTSD showed significantly reduced total distance traveled in OFT and distance and time spent in the open arms of the EPM, with decreased hippocampal neurons, obvious neuronal and mitochondrial pathologies, decreased hippocampal expression of Bcl-2, and increased Bax and caspase-3 expressions. Treatments with paroxetine and EA both significantly improved behavioral changes of the rat models, increased the number of Nissl-stained neurons, obviously alleviated pathologies in the hippocampal neurons and mitochondrial ultrastructure, increased hippocampal Bcl-2 expression, and lowered caspase-3 expressions. Paroxetine showed significantly better effect than EA for improving performance of the rats in EPM test, whereas sham-acupuncture did not produce any significant improvement. **Conclusion** EA alleviates PTSD in rats possibly by upregulating Bcl-2 and downregulating Bax and caspase-3, thereby ameliorating hippocampal mitochondrial damage.

Keywords: post-traumatic stress disorder; electroacupuncture; mitochondria; neurons; caspase-3; anxiety disorder

创伤后应激障碍(PTSD)是个体在经历、目睹或遭遇到严重的恐怖事件、战争、自然灾害等事故后,延迟出

现或持续存在的一类精神障碍疾病。个体在创伤事件中的发生率在 60%~80%, 经历创伤事件后 PTSD 的终身患病高达 8.8%^[1,2]。目前 PTSD 的治疗以心理治疗、暴露疗法、药物治疗为主, 国际上以舍曲林和帕罗西汀为一线治疗药物, 但单独的药物治疗效果并不明显, 还需与其他治疗手段如心理治疗等相结合^[3]。研究^[4]显示, 海马体积缩小是 PTSD 的病理特征。研究^[5]表

收稿日期: 2025-06-07

基金项目: 国家中医药管理局专项经费(500006007); 全国名老中医药专家张虹传承工作室项目; 四川省自然科学基金(2023NSFSC1821)

作者简介: 马丹丹, 在读硕士研究生, E-mail: 1173545463@qq.com

通信作者: 宋凯, 博士, 讲师, E-mail: mrsongkai@163.com

明, PTSD发病过程中海马的神经细胞明显发生凋亡, 这可能是导致 PTSD 海马体积异常的原因之一。早期对 PTSD 焦虑症状的研究主要集中在杏仁核, 但最近的研究发现^[6], 海马在调节情绪行为, 尤其是焦虑状态中起到重要作用, 海马活动增加与焦虑增强也息息相关。动物实验研究表明^[7, 8], 在 PTSD 发病过程中, 海马神经元的凋亡常伴有焦虑障碍的发生, 神经元凋亡与焦虑情绪呈正相关。

Bcl-2/Bax/caspase-3 信号通路是神经元凋亡的关键调控通路, 与 PTSD 的发生和发展密切相关。研究表明^[9, 10], PTSD 患者及动物模型中, Bcl-2/Bax 比值失衡以及 caspase-3 的激活, 均与神经元凋亡的增加有关, 进而导致海马等脑区的结构和功能损伤, 加剧焦虑障碍。最新发表在 JAMA 上的一项临床研究表明, 针刺干预对 PTSD 患者核心症状的改善明显^[11]。因此进一步探索针灸疗效优势及其作用机制对于完善循证决策依据至关重要。研究表明, 针刺调节 PTSD 焦虑症状的可能作用机制是通过抑制 miR-153 表达以降低神经元细胞凋亡^[12]; 针刺通过降低内质网应激相关分子 GRP78、CHOP、caspase-12 的表达改善 PTSD 焦虑症状^[13]; 针刺能够改善慢性应激大鼠焦虑抑郁行为的作用机制可能与抑制海马 NLRP3 炎症小体有关^[14]; 针刺缓解慢性应激大鼠焦虑症状可能与抑制前额叶皮层小胶质细胞的活化, 增强 TREM2 表达减少促炎性细胞因子相关^[15]; 但目前尚不确定电针对调控海马 CA1 区域 PTSD 凋亡相关 Bcl-2/Bax/caspase-3 信号通路的作用。因此本实验以帕罗西汀和假针刺作为阳性对照组, 观察电针对焦虑障碍大鼠海马 Bcl-2/Bax/caspase-3 凋亡通路的影响, 探讨电针治疗 PTSD 的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物和分组

体质量 180~220 g 的 SpragueDawley (SD) 雄性大鼠 40 只, 清洁级。经 1 周适应期后将实验动物完全随机分为 5 组: 空白对照组、模型组、针刺组、假针刺组、帕罗西汀组 (8 只/组)。于安静环境下饲养, 自由摄食饮水, 自然光照, 温度 22~26℃。动物在进行实验前先适应 10 d (自购入之日算起), 在此期间实验者每天抚摸大鼠 5 min 以使动物适应实验者的操作。本实验经成都中医药大学实验动物福利伦理委员会批准 (伦理批号: 2024113)。实验中对大鼠的各项处理均遵照科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》执行。

1.2 PTSD 大鼠模型建立

本实验采用改良的单一连续应激 (SPS&S) 法^[16]进行 PTSD 大鼠造模。该方法是在连续单一应激 (SPS) 模型基础之上, 增加足底电刺激 (FS)。研究证明 SPS&S 法相较于传统 SPS 法对大鼠 PTSD 模型焦虑的影响更

为明显^[17, 18]。首先将大鼠放入自制塑料水瓶中, 头部朝向瓶口, 并用透明胶带将其绑紧后水平放置 2 h; 取出被禁锢后的大鼠立即放入水深约 60 cm, 水温 25℃ 的水桶中进行 20 min 强迫游泳; 强迫游泳结束后取出大鼠吹干并放回饲养笼中休息 15 min; 放入密闭玻璃缸中使大鼠通过吸入异氟烷麻醉直至意识丧失; 等待大鼠苏醒后使用电针仪对大鼠足底施加强度为 1 mA, 持续 4 s 的电击。休息 15 s 后以大鼠出现警觉性增高、易激惹、毛发竖立、聚集蜷缩等应激反应现象为造模成功标准。

1.3 主要实验设备及实验仪器

RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒、Dapi 染色剂、Bcl-2、Bax、Caspase-3 抗体、环保型脱蜡透明液、柠檬酸抗原修复液、PBST 漂洗缓冲液、抗荧光淬灭封片剂 (武汉塞维尔生物科技有限公司), HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 盐酸帕罗西汀片 (北京万生药业有限公司); SDZ-II 型华佗牌电针治疗仪 (tlwato); 华佗牌一次性无菌针灸针: 常规“0.25×25 mm”。

倒置荧光显微镜 (重庆奥特光学公司、BDS400-FL)、旷场实验箱、高架十字迷宫 (上海欣软信息科技有限公司、XR-XZ301、XR-XG201)、荧光定量 PCR 仪 (NextGene Q196)、透射电子显微镜 (Hitachi, HT7800 型)。

1.4 干预方法

电针组参照《实验针灸学》及中国针灸学会最新发布实验动物常用穴位名称与定位^[19]选取“百会” (顶骨正中)、“神庭” (前正中线上, 额顶骨缝交界线前方处)、肝俞 (双侧) (第 9 胸椎棘突下左右旁开 7 mm)、肾俞 (双侧) (第 2 腰椎棘突下左右各旁开 7 mm), 从造模结束后次日开始电针治疗, “百会”、“神庭”向鼻尖方向平刺, 均进针 3 mm, 肝俞 (双侧)、肾俞 (双侧) 直刺 5 mm; 左肾俞、肝俞为一组电针, 右肾俞、肝俞为一组电针, 频率 2/100 Hz, 疏密波, 1 mA^[20-22]; 1 次/d, 15 min/次, 共治疗 3 周, 5 次/周; 假针刺组浅刺膻穴旁开 5 mm 处, 不连接电针仪^[23]。20 min/次, 共治疗 3 周, 5 次/周; 帕罗西汀从造模结束后次日开始给予帕罗西汀混悬液 (10 mg/kg) 灌胃, 连续 3 周, 5 次/周。正常组和模型组不进行任何治疗。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 旷场实验 旷场实验在黑色开口正方形旷场箱中进行, 设备中心上方安装有视频采集装置, 在实验开始前使用配套的视频分析软件设置好中心区域、标尺长度等以便于后续数据收集。分别将每组 8 只老鼠放入设备箱中 5 min, 在安静无外界因素干扰的前提下, 记录每只大鼠在 5 min 内的总距离、进入中心区域的距离和中心区域停留时间, 大鼠进入中央区域时间越短越焦虑。在每只大鼠测试结束后用 75% 的乙醇清理旷场箱中的二便, 待气味消失后进行下一只的实验。

1.5.2 高架十字迷宫实验 高架十字迷宫实验在由开放臂和闭臂交叉组成的十字架上进行,该十字架距离地面50 cm,支撑点在两臂交点处,同时中心区域也是二者交叉区域,在其上方有安装好的视频采集装置。开始检测前设置好中心区域、开臂和闭臂的位置等。分别将每组8只老鼠放入实验设备中,分别记录其在开放臂和闭臂的次数和停留时间,计算开臂停留时间百分比(OT%)和开臂进入次数百分比(OE%);其中,OE%=进入开臂次数/(进入开臂次数+进入闭臂次数)×100%;OT%=开臂停留时间/(开臂停留时间+闭臂停留时间)×100%。每只大鼠测试结束后用75%的乙醇清理每个区域中的二便,待气味消失后进行下一只的实验,以防对后续进实验的大鼠造成干扰。

1.5.3 HE染色 取大鼠海马组织石蜡切片依次放入二甲苯梯度脱蜡,乙醇梯度脱水;滴加苏木素染液染色5 min,蒸馏水冲去浮色;滴加分化液3 min,自来水冲洗2次,2 min/次;滴加伊红染液30 s,蒸馏水冲去浮色;梯度乙醇脱水,梯度二甲苯透明;中性树胶和二甲苯混匀封片,显微镜下观察海马病理改变情况。

1.5.4 尼氏染色 取脱脂石蜡包埋的海马组织切片置于二甲苯中脱蜡5~10 min,共3次;无水乙醇5 min,90%乙醇2 min,70%乙醇2 min,蒸馏水2 min进行水化操作;将切片置于焦油紫染色液中,50℃恒温箱染色1 h;蒸馏水洗3次,每次20 s;70%酒精分色1~2 min;依次进入70%酒精、80%酒精、95%酒精中,各2 min,无水乙醇2次,5 min/次进行脱水中性处理;二甲苯浸泡2次,10 min/次使组织透明;中性树脂封片,显微镜下观察并拍照。应用Image-Pro Plus软件阳性面积光密度值并分析。

1.5.5 透射电镜 取1 mm×1 mm×1 mm海马组织1~3 min内放入4℃预冷电镜固定液中,避光固定2 h;0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH值7.2)漂洗3次,每次15 min;0.1 mol/L锇酸+0.1 mol/L磷酸盐缓冲液20℃固定2 h;0.1 mol/L磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次15 min;样品经乙醇梯度脱水,每次20 min;渗透剂以此为丙酮:环氧树脂(2:1)、丙酮:环氧树脂(1:1)、环氧树脂,37℃恒温箱内,每次渗透8 h;将渗透好的样品放入包埋板中,加入包埋剂环氧树脂,60℃恒温箱中聚合48 h;切片机制备80~100 mm超薄切片;2%醋酸铀饱和水溶液-枸橼酸铅双染色,室温染色15 min;切片室温干燥过夜,透射电镜下观察海马神经元超微结构。

1.5.6 实时荧光定量PCR检测 Bcl-2、Bax、caspase-3 的 mRNA 表达 取各组待检测的海马组织转移至预冷的研钵中加液氮研磨,按照试剂盒所命书提取RNA后,检测其纯度及浓度后将RNA反转录为cDNA,然后进行扩增。反应条件:50℃预变性5 min;95℃变性10 min,

55℃退火15 s,60℃延伸30 s,共40循环。结果分析,以GAPDH为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组目的mRNA的表达量。PCR引物序列、产物长度见表1。

表1 引物序列、产物长度

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR and product lengths

Target gene	Primer sequences	Product Length (bp)
Bcl-2	CTGGTGGACAACATCGCTCT(F) GCATGCTGGGGCCATATAGT(R)	115
Bax	CAACATGGAGCTGCAGAGGA(F) GGAAAGGAGGCCATCCCAG(R)	274
Caspase-3	GAGCTTGAACGCGAAGAAA(F) TTGCGAGCTGACATTCCAGT(R)	221
GAPDH	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG(F) TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT(R)	133

1.5.7 免疫荧光检测 Bcl-2、Bax、caspase-3 的蛋白表达 将大鼠海马组织切片放入70℃恒温箱2 h;二甲苯梯度脱蜡,乙醇梯度脱水;PBS清洗3次,5 min/次;放入烤箱中以高火-中高火-常温冷却的顺序进行抗原修复;PBS清洗3次,5 min/次;3%BSA37℃封闭40 min;沥干切片后加入一抗4℃孵育过夜;PBS洗3次,5 min/次;加入山羊抗兔II抗和山羊抗小鼠II抗(1:5000稀释),室温避光孵育60 min;PBS洗3次,5 min/次;采用DAPI室温避光染核封片,400倍荧光显微镜下拍照。

1.6 统计学分析

数据以均数±标准差表示,采用GraphPad Prism 10统计软件进行处理。若数据服从正态分布且方差齐,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD检验,方差不齐选用Tamhane's T₂检验;若数据不符合正态分布,用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠PTSD相关行为学检测结果

2.1.1 各组大鼠旷场实验结果 各组大鼠旷场实验结果显示:与空白对照组大鼠比较,模型组大鼠活动总距离明显减少($P<0.0001$);而与模型组比较,帕罗西汀组及电针组活动总距离均增加($P<0.0001$,图1)。

2.1.2 各组大鼠高架十字迷宫结果 各组大鼠高架十字迷宫实验结果(图2)显示,与空白对照组大鼠比较,模型组大鼠开臂区域活动的总路程及时间均显著下降($P<0.0001$ 或 $P<0.05$);而与模型组比较,帕罗西汀组及电针组在开臂区域活动的总路程显著上升($P<0.0001$ 或 $P<0.01$);而在开臂区域活动总时间上,帕罗西汀组显著上升($P<0.01$),电针组仅有上升趋势(模型组:5.324±5.502 s;电针组:70.88±96.87 s; $P>0.05$)。

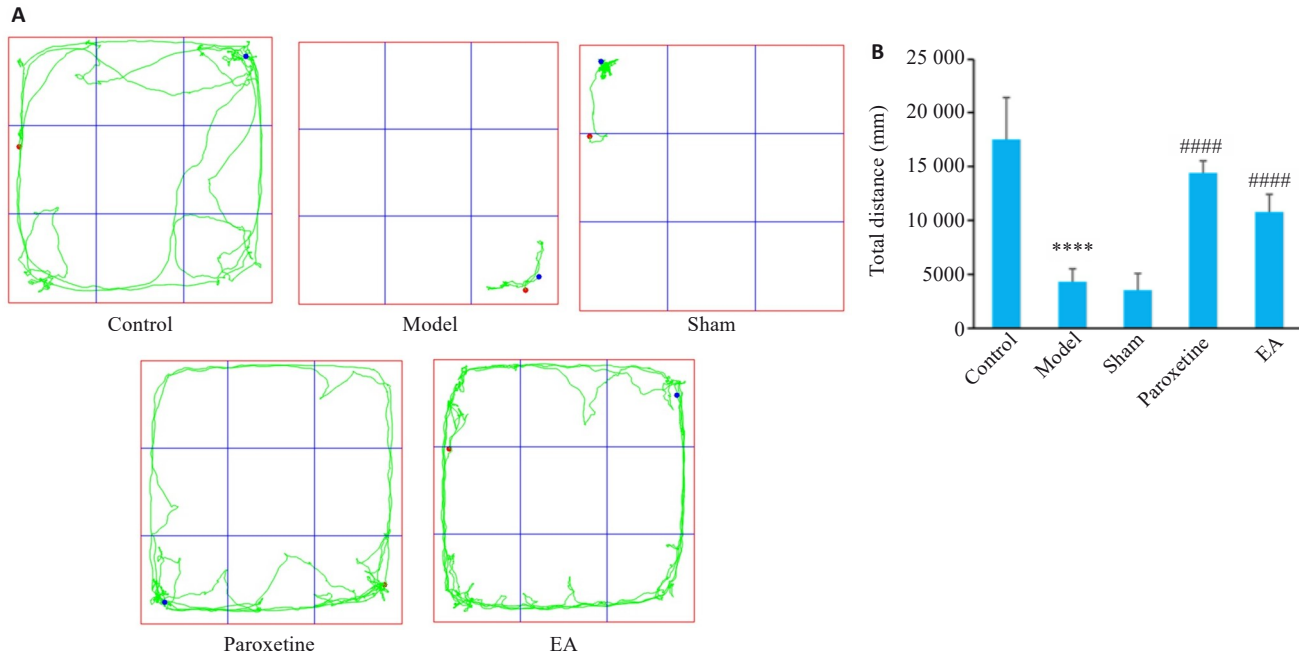


图1 各组大鼠焦虑行为学比较

Fig.1 Anxiety-like behaviors of the rats in the 5 groups (Mean±SD, n=8). A: Motion trajectory in open field test. B: Statistics of total distance traveled. ****P<0.0001 vs Control group;####P<0.0001 vs Model group.

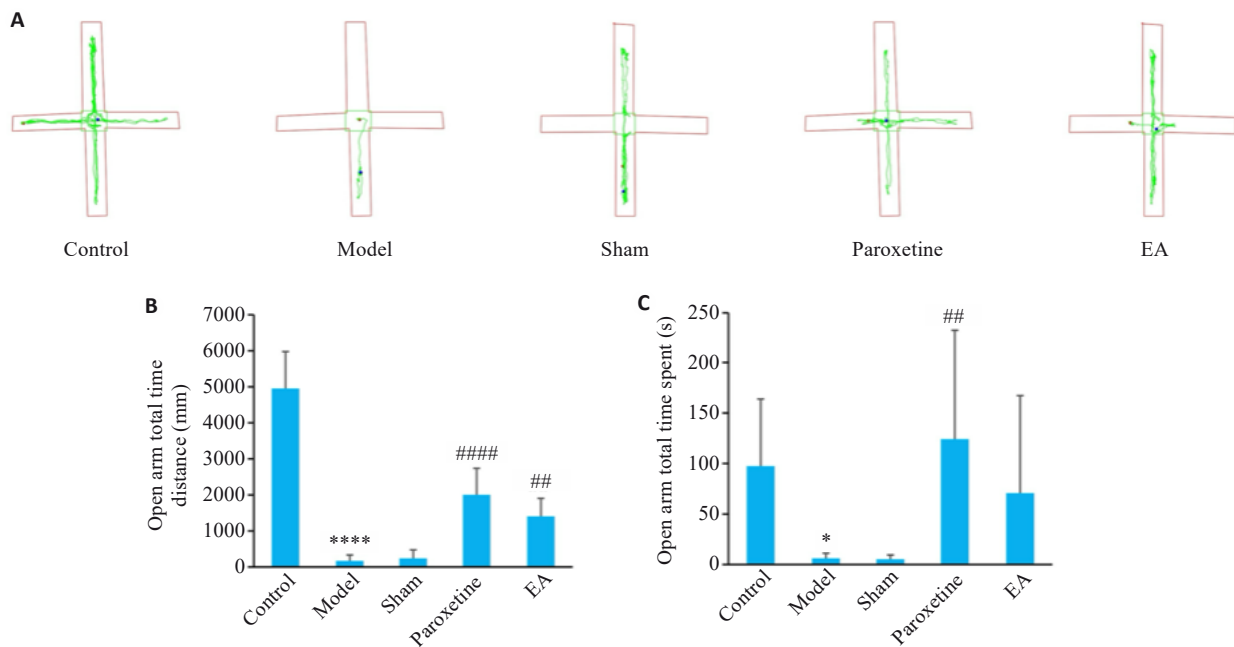


图2 各组大鼠焦虑行为学比较

Fig.2 Anxiety-like behaviors of the rats in the 5 in elevated plus maze test (Mean±SD, n=8). A: Representative movement trajectories in the elevated plus maze test. B: Statistics of open arm total distance. C: Open arm total time. *P<0.05, ****P<0.0001 vs Control group; ##P<0.01, ####P<0.0001 vs Model group.

2.2 各组大鼠海马区 HE 染色结果

各组大鼠海马区 HE 染色结果(图3)显示,与空白对照组比较,模型组海马可见大量神经细胞皱缩,细胞形态不规则,体积减小,嗜碱性强;同时可见较多量体积微小的空泡;少量血管周围水肿,间隙增宽。而与模型组比较,帕罗西汀组海马神经细胞形态规则,排列整齐密集,胞核大而圆,染色质少,核仁明显;仅可见少量椎体细胞皱缩,细胞形态不规则,体积减小,嗜碱性强。而电针组

海马神经细胞形态规则,排列整齐密集,胞核大而圆,染色质少,核仁明显;少量椎体细胞皱缩,细胞形态不规则,体积减小,嗜碱性强;海马可见较多体积微小的空泡。

2.3 各组大鼠海马区尼式染色结果

各组大鼠海马区尼式染色结果显示(图4):与空白对照组比较,模型组海马神经细胞数量明显减少(P<0.0001),与模型组比较,帕罗西汀组及电针组海马神经细胞数量均明显增加(P<0.05)。

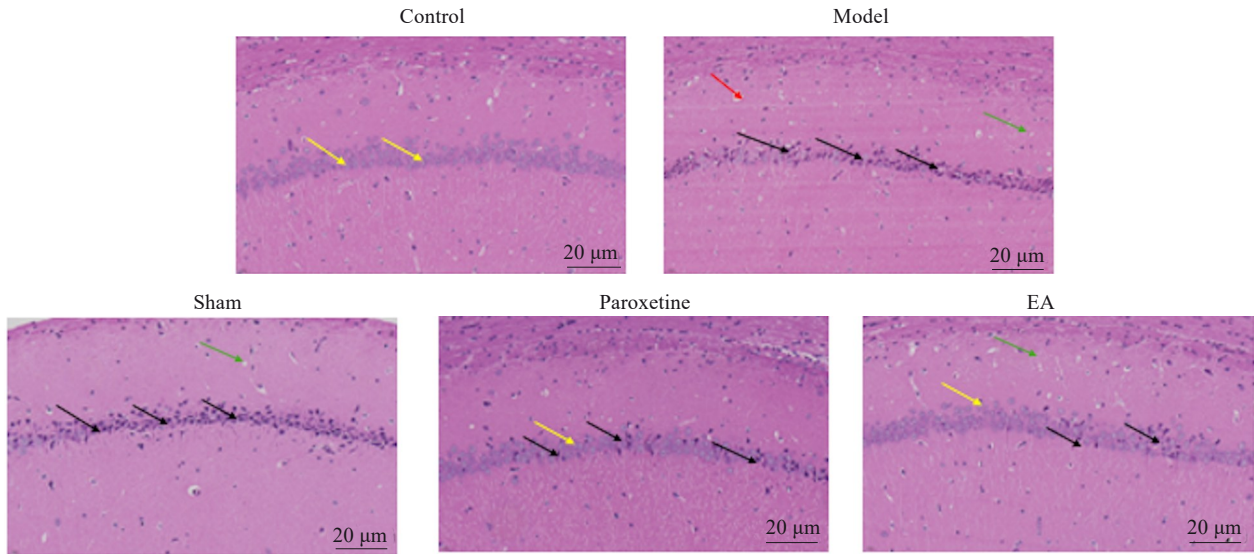


图3 各组大鼠海马神经元病理形态特征比较

Fig.3 Pathological and morphological characteristics of hippocampal neurons of the rats in the 5 rats (HE staining, scale bar=20 μm). Yellow arrows: Normal neurons; Black arrows: Shrunken neurons; Green arrows: Vacuoles; Red arrows: Perivascular edema.

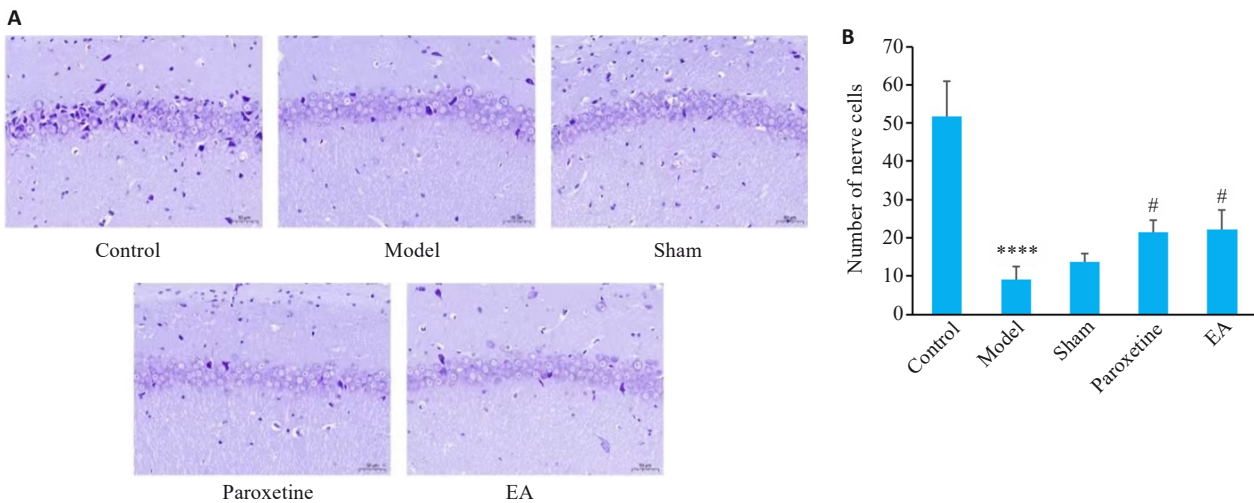


图4 各组大鼠海马区尼式染色结果

Fig.4 Comparison of neuronal structure in the hippocampal region of the rats among the 5 groups (Nissl staining, scale bar=50 μm). A: Representative photomicrographs. B: Neuronal cell count (n=3). ****P<0.0001 vs Control group; #P<0.05 vs Model group.

2.4 各组大鼠海马区线粒体超微结构变化情况

各组大鼠海马区线粒体超微结构变化显示,与空白对照组比较,模型组海马线粒体(红色箭头)大多略显肿胀,膜模糊、破损,基质略浅,嵴扩张、减少;与模型组比较,假针刺组并无明显好转,帕罗西汀组线粒体(红色箭头)略显损伤,膜完整,膜内基质均匀,嵴断裂、减少,而电针组线粒体(红色箭头)大多略显固缩,膜完整,膜内基质浓缩,嵴断裂、减少(图5)。

2.5 各组大鼠海马 Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA 表达情况

与空白对照组比较,模型组Bcl-2的mRNA表达明显下降(P<0.0001)、Bax、caspase-3的mRNA表达明显上升(P<0.0001);与模型组比较,帕罗西汀组及电针组

Bcl-2的mRNA表达明显上升(P<0.0001)、Bax、caspase-3的mRNA表达明显下降(P<0.0001,图6)。

2.6 各组大鼠海马区 Bcl-2、Bax、caspase-3 平均荧光强度表达情况

各组大鼠海马区 Bcl-2、Bax、caspase-3 平均荧光强度表达情况结果显示:与空白对照组比较,模型组Bcl-2的平均荧光强度表达明显下降(P<0.001)、Bax、caspase-3的平均荧光强度表达明显上升(P<0.001);与模型组比较,帕罗西汀组Bcl-2的平均荧光强度表达明显上升(P<0.05),电针组Bcl-2平均荧光强度表达同样呈上升趋势(P>0.05),帕罗西汀组及电针组Bax、caspase-3的平均荧光强度表达均明显下降(P<0.01或P<0.05,图7)。

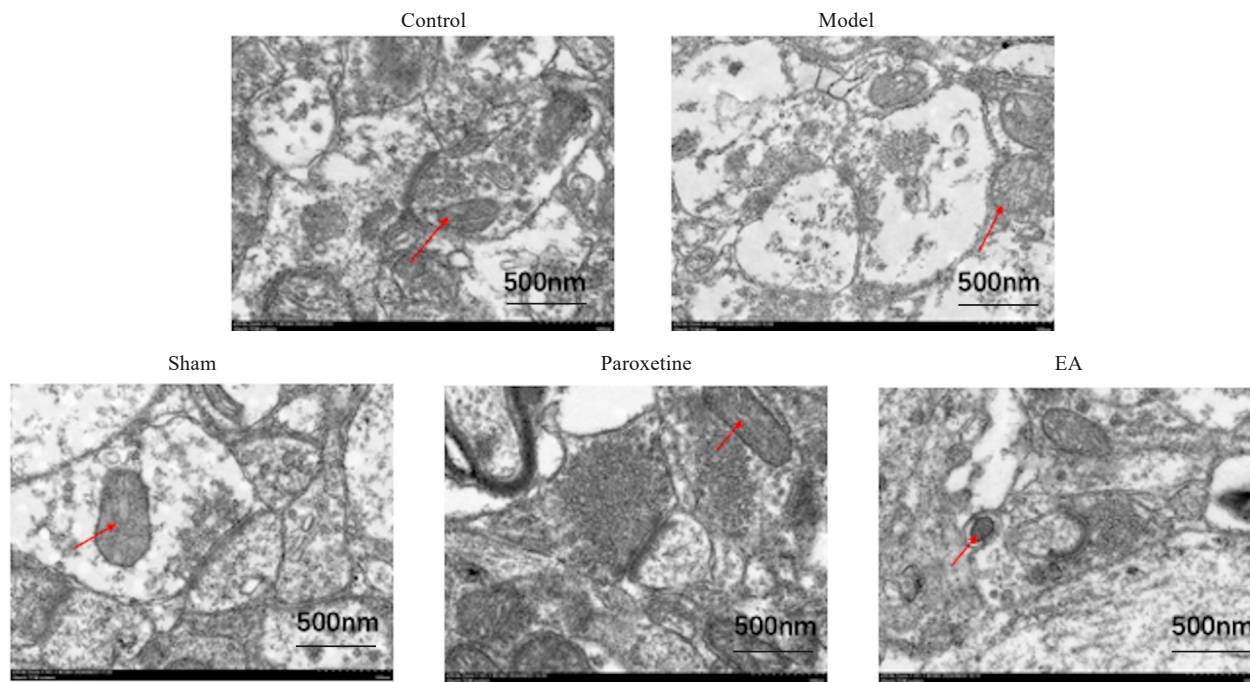


图5 各组大鼠海马神经元线粒体形态比较

Fig. 5 Comparison of mitochondrial morphology in the hippocampal neurons among the 5 groups (scale bar=500 nm). Red arrows indicate mitochondria.

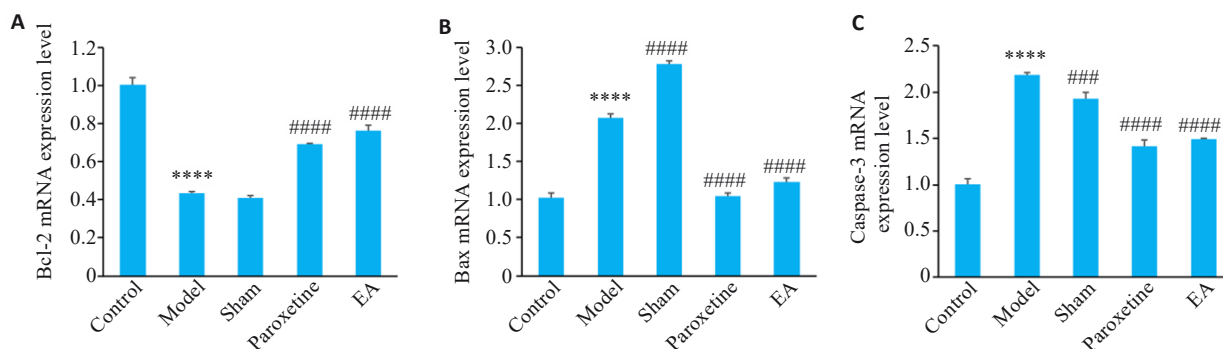


图6 各组大鼠海马 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 表达情况

Fig. 6 Expression levels of Bcl-2 (A), Bax (B), and caspase-3 (C) mRNA in the hippocampus of the rats in the 5 groups (Mean±SD, n=3). ****P<0.0001 vs Control group; ###P<0.001, ####P<0.0001 vs Model group.

3 讨论

中医现多将 PTSD 归属于身心疾病和情志疾病的范畴^[24],其发生主要是由于大惊大恐导致的脏腑功能失调,而“恐伤肾”,对肾气和肾精造成直接损伤;PTSD 出现的焦虑、抑郁、失眠等症状是由于“惊伤肝”,肝失疏泄,肝气运行不畅导致,因此,“肝主疏泄”功能在应激中起着决定性作用,也是调节应激反应的核心。脑主神明,作为“元神之府”与肝共同调节人的精神情志活动;故“脑神失养,肾精不足,肝失疏泄”为主要病机,基于此,本课题组提出了“醒脑安神,补肾益精,疏肝理气”的治疗原则,选取督脉的“百会”“神庭”,取其宁神定惊,解郁开窍之功。肝俞和肾俞,为足太阳肝、肾经气输注的部位,通过刺激肝俞和肾俞可以疏通肝气,补肾益精。四穴合用,肝肾脑同调,疏调气机。在前期的实验研究

中也证实了电针可改善 PTSD 的焦虑、抑郁情绪^[25, 26]。

本研究通过旷场实验和高架十字迷宫实验评估了电针治疗对 PTSD 大鼠行为学的影响。结果显示,模型组大鼠在旷场实验中的活动总距离显著减少,在高架十字迷宫实验中开臂区域的活动路程和时间也显著下降,表明 PTSD 模型大鼠表现出明显的焦虑样行为和活动能力下降。这与 PTSD 的典型行为学特征一致,即回避行为、焦虑水平升高及活动能力受限^[27, 28]。相比之下,电针组和帕罗西汀组在活动总距离和开臂区域活动路程上均显著改善,提示电针与帕罗西汀均能有效缓解 PTSD 大鼠的焦虑样行为和活动受限。然而,帕罗西汀组在开臂区域活动时间上表现出显著改善,而电针组仅呈现上升趋势,差异未达统计学显著性。这一结果可能与电针和帕罗西汀的作用机制差异有关。帕罗西汀作

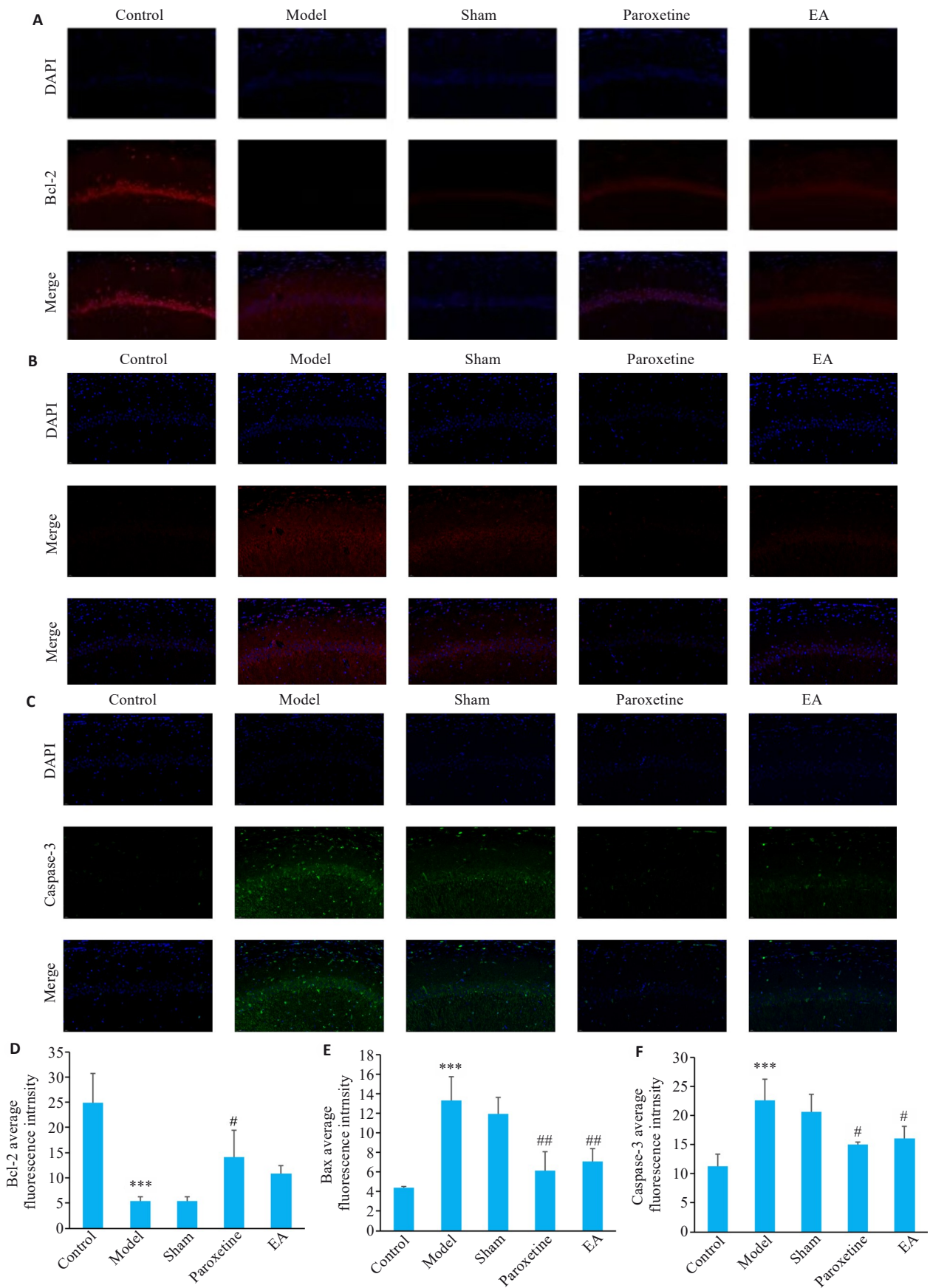


图7 各组大鼠海马区Bcl-2、Bax、caspase-3平均荧光强度表达情况

Fig.7 Mean fluorescence intensity of Bcl-2, Bax, and caspase-3 in the hippocampal region of the rats in the 5 group (Original magnification: $\times 400$). A: Hippocampal Bcl-2 fluorescence intensity. B: Hippocampal Bax fluorescence intensity. C: Hippocampal caspase-3 fluorescence intensity. D: Quantitative analysis of hippocampal Bcl-2 fluorescence intensity. E: Quantitative analysis of hippocampal Bax fluorescence intensity. F: Quantitative analysis of hippocampal caspase-3 fluorescence intensity. *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Model group.

为选择性血清素再摄取抑制剂,通过调节5-羟色胺系统直接影响情绪和焦虑水平,可能在短期内对开臂时间等特定行为指标的改善更为显著^[29,30]。而电针可能通过多靶点、多途径的神经调节作用,逐步改善整体行为表现,但对某些指标(如开臂时间)的效应需要更长时间或更强的刺激强度来显现^[31]。值得注意的是,假针刺组在行为学指标上无明显改善,提示电针的疗效并非单纯由针刺的非特异性效应引起,而是与特定穴位的刺激及电针参数密切相关^[32]。本研究选用的穴位“百会”“神庭”及双侧“肝俞”“肾俞”,在传统中医理论与中调神、疏肝、补肾相关,可能通过调节中枢神经系统的应激反应和内分泌功能,改善PTSD相关行为^[33,34]。

海马是大脑边缘中的重要组成部分,是应激介质的主要作用靶点,与焦虑调节密切相关。PTSD所导致的海马损伤包括结构改变和功能受损,研究表明^[35]在创伤事件发生后PTSD患者大脑海马灰质体积明显缩小,而海马神经元的凋亡增加可能是导致其体积缩小原因之一,从而进一步影响情绪调节如焦虑症状的出现。动物实验进一步证明海马神经元凋亡与焦虑样行为之间存在显著相关性,抑制海马神经元凋亡可以减轻焦虑行为^[36]。此外,海马与杏仁核、前额叶皮质等脑区之间的神经环路连接在情绪调节和应激反应中起着重要作用,而海马神经元凋亡可能破坏这些神经环路的正常功能,从而加剧PTSD焦虑障碍的发生和发展^[37,38]。本研究通过HE染色和尼式染色发现模型组大鼠海马区出现神经细胞皱缩、空泡增多、血管周围水肿及神经细胞数量显著减少,反映了PTSD诱导的神经退行性变和细胞损伤。这与既往研究一致,相比之下,电针组和帕罗西汀组海马神经细胞形态趋于规则,排列整齐,细胞核大而圆,染色质少,核仁明显,神经细胞数量显著增加,提示两者均具有神经保护作用。电针组虽仍可见少量细胞皱缩和空泡,但整体病理改善程度与帕罗西汀组相当,表明电针在修复海马病理损伤方面具有与药物治疗相似的效果。电针的神经保护作用可能与其对海马神经环境的整体调控有关。研究表明,针刺可通过促进脑源性神经营养因子表达、抑制炎症反应和氧化应激来保护神经元^[39]。本研究中,电针组和帕罗西汀组均显著增加了海马神经细胞数量,提示两者可能通过不同途径共同作用于神经元存活和修复。例如,帕罗西汀可能通过5-HT系统上调BDNF表达,而电针可能通过激活内源性抗氧化系统或调控神经递质平衡来发挥作用^[40-42]。

线粒体是细胞能量代谢和凋亡调控的核心细胞器,其功能障碍与PTSD的神经病理密切相关。本研究电镜结果显示,模型组大鼠海马线粒体出现肿胀、膜破损、基质变浅及嵴减少,提示PTSD诱导了线粒体结构和功能的显著损伤。与模型组相比,电针组线粒体膜完整,

基质浓缩,嵴断裂和减少程度减轻,表现出明显的保护作用。帕罗西汀组线粒体损伤也有所改善,但电针组在基质浓缩和膜完整性方面的效果似乎更优,提示电针可能通过特异性机制保护线粒体。线粒体损伤是PTSD中氧化应激和细胞凋亡的重要驱动因素。电针可能通过调节线粒体内抗氧化酶活性或减少活性氧生成,改善线粒体超微结构^[43]。此外,针刺可能通过激活PI3K/Akt信号通路,增强线粒体膜电位稳定性,从而减少嵴断裂和基质流失^[44,45]。相比之下,帕罗西汀可能通过间接调节神经递质系统影响线粒体功能,其作用路径可能不如电针直接。假针刺组线粒体无明显改善,进一步证实了电针疗效的特异性。

线粒体不仅为细胞的各种生命活动提供能量,在细胞凋亡中也起关键作用,是死亡信号的感受器和放大器^[46]。Bcl-2/Bax/caspase-3通路是线粒体凋亡的经典信号通路,细胞凋亡的主要途径都受到半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶、Bcl-2家族蛋白在内的抗凋亡和促凋亡效应分子的严格调控,其中Bcl-2和Bax的特性最好,Bcl-2抑制线粒体通透性转变孔的开放,减少细胞凋亡;Bax过度表达可导致线粒体膜电位下降,细胞凋亡加速;caspase-3又是凋亡的关键执行蛋白酶^[47,48]。有研究显示^[49],在PTSD发生发展过程中随着应激时间不断增加,Bcl-2作为抗凋亡蛋白只在初期大量释放后逐渐降低,而中后期诱发促凋亡因子Bax的大量释放,说明应激条件下可能发生了神经元细胞的凋亡;电针治疗可改善PTSD大鼠学习记忆能力,可能与下调海马组织CA1区Bcl-2/Bax蛋白表达有关^[50]。SPS刺激后激活caspase-3从而诱发细胞凋亡,同时线粒体中调控细胞凋亡的重要蛋白CytC表达水平明显增加,二者共同参与了PTSD大鼠海马神经元凋亡的调控^[51];我们猜测线粒体通路的激活参与了PTSD大鼠海马神经元的调控。本研究中,模型组大鼠海马Bcl-2 mRNA和蛋白表达显著下降,Bax和caspase-3表达显著上升,表明PTSD诱导了促凋亡信号的激活。电针组和帕罗西汀组均显著上调Bcl-2表达,下调Bax和caspase-3表达,提示两者通过调节该通路抑制海马神经元凋亡。

综上所述,本研究在前期研究的基础上,深入观察电针对海马神经元线粒体结构及功能的影响,结果显示电针改善PTSD大鼠焦虑障碍的机制可能是通过调控Bcl-2/Bax/caspase-3信号通路,恢复神经元线粒体的正常功能,从而修复海马病理损伤。其疗效与帕罗西汀相当,且具有更高的安全性,为PTSD的非药物治疗提供了新思路。在后续研究中,还应对线粒体功能的关键指标,如ATP生成水平、线粒体膜电位等进行进一步检测,以更深入的阐明电针抗PTSD焦虑的神经分子机制。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Li FH, Cui YH, Li Y, et al. Prevalence of mental disorders in school children and adolescents in China: diagnostic data from detailed clinical assessments of 17, 524 individuals[J]. *J Child Psychol Psychiatry*, 2022, 63(1): 34-46.
- [2] Romaniuk M, Xia Y, Fisher G, et al. The relationship between chronic PTSD, cortical volumetry and white matter microstructure among Australian combat veterans[J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 50.
- [3] Fortney JC, Rajan S, Reisinger HS, et al. Deploying a telemedicine collaborative care intervention for posttraumatic stress disorder in the U.S. Department of Veterans Affairs: a stepped wedge evaluation of an adaptive implementation strategy[J]. *Gen Hosp Psychiatry*, 2022, 77: 109-17.
- [4] Ressler KJ, Berretta S, Bolshakov VY, et al. Post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits[J]. *Nat Rev Neurol*, 2022, 18(5): 273-88.
- [5] Chen YL, Tong L, Chen Y, et al. miR-153 downregulation alleviates PTSD-like behaviors and reduces cell apoptosis by upregulating the Sigma-1 receptor in the hippocampus of rats exposed to single-prolonged stress[J]. *Exp Neurol*, 2022, 352: 114034.
- [6] Shi HJ, Wang S, Wang XP, et al. Hippocampus: molecular, cellular, and circuit features in anxiety[J]. *Neurosci Bull*, 2023, 39(6): 1009-26.
- [7] Nie PY, Tong L, Li MD, et al. miR-142 downregulation alleviates rat PTSD-like behaviors, reduces the level of inflammatory cytokine expression and apoptosis in hippocampus, and upregulates the expression of fragile X mental retardation protein[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 17.
- [8] 王庆阁, 赵晓慧, 何宇轩, 等. 芪苈左归颗粒通过上调BDNF/TrkB通路提高衰老大鼠突触可塑性[J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(8): 1589-98.
- [9] 刘倩汝, 王丽, 祁鸣, 等. 电针对PTSD样大鼠学习记忆及海马CA1区Bcl-2/Bax表达的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(3): 340-4.
- [10] Cai MD, Park HR, Yang EJ. Electroacupuncture modulates glutamate neurotransmission to alleviate PTSD-like behaviors in a PTSD animal model[J]. *Transl Psychiatry*, 2023, 13(1): 357.
- [11] Hollifield M, Hsiao AF, Smith T, et al. Acupuncture for combat-related posttraumatic stress disorder: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Psychiatry*, 2024, 81(6): 545-54.
- [12] 陈育路. 抑制miR-153通过上调Sigma-1受体及降低海马神经元凋亡改善SPS大鼠PTSD样行为的机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- [13] 孙一萍, 李晓艳, 邵瑞洁, 等. 针刺对创伤后应激障碍大鼠海马内质网应激相关分子的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(3): 224-30.
- [14] 魏高文, 郭继红, 王红梅, 等. 针刺对慢性应激抑郁大鼠海马NLRP3炎性小体和炎性细胞因子的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2023, 46(3): 427-34.
- [15] 李晓艳, 王红梅, 赵雅, 等. 针刺对慢性应激抑郁大鼠前额叶皮层小胶质细胞活化的影响[J]. *针刺研究*, 2021, 46(1): 52-7.
- [16] Wang J, Gao F, Cui S, et al. Utility of 7, 8-dihydroxyflavone in preventing astrocytic and synaptic deficits in the hippocampus elicited by PTSD[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 176: 106079.
- [17] 何存宝, 杨绍杰, 朱国旗. 4-(芳基乙炔基)-吡咯并[2, 3-d]嘧啶通过抑制mGluR5调控ERK1/2-SGK1信号通路改善小鼠创伤后应激障碍[J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(4): 765-73.
- [18] Xie P, Chen LX, Wang J, et al. Polysaccharides from *Polygonatum cyrtoneema* Hua prevent post-traumatic stress disorder behaviors in mice: Mechanisms from the perspective of synaptic injury, oxidative stress, and neuroinflammation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 1): 117165.
- [19] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第2部分: 大鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(4): 351-2.
- [20] 楼喜强, 刘襄, 刘春花, 等. 头针调衡电刺激治疗脑梗死后运动性失语疗效观察[J]. *中国针灸*, 2021, 41(11): 1211-5.
- [21] 宋凯, 王亚婷, 熊凡捷, 等. 电针对创伤后应激障碍大鼠行为学及海马SYN、PSD95表达的影响[J]. *世界针灸杂志: 英文版*, 2023, 33(2): 135-41.
- [22] 刘敏琦, 高明威, 褚晓蕾, 等. 不同频率电刺激促进周围神经损伤的恢复[J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(14): 3061-9.
- [23] 沈乎醒, 郑晓骏, 金拓, 等. 电针对干眼豚鼠眼表感觉神经痛及P2X₃受体和蛋白激酶C表达的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(5): 393-400.
- [24] 王永蕊, 郑先丽, 严兴科. “疏肝调神”法针刺对创伤后应激障碍大鼠焦虑样行为及终纹床核PKC/ERK/CREB通路的影响[J]. *中国针灸*, 2024, 44(11): 1281-8.
- [25] 李吉鑫, 邢文龙, 姜俊秀, 等. 创伤后应激障碍模型小鼠海马和前额叶皮质的NLRP3表达增加[J]. *神经解剖学杂志*, 2024, 40(5): 549-57.
- [26] 李秘, 李凯, 丁宁, 等. 电针对创伤后应激障碍大鼠杏仁核及海马区环磷腺苷效应元件结合蛋白的表达及与突触蛋白结合能力的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(7): 517-23.
- [27] Taylor KM, Mackelprang JL, Meyer D, et al. Substance use and posttraumatic stress disorder: 12-month outcomes among adults experiencing chronic homelessness in Australia[J]. *Drug Alcohol Rev*, 2023, 42(2): 439-49.
- [28] 吕涛, 吴玉梅. 针刺改善创伤后应激障碍海马损伤的机制研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(3): 147-53.
- [29] Bu JJ, Liu Y, Zhao YF, et al. Paroxetine ameliorates corticosterone-induced myelin damage by promoting the proliferation and differentiation of oligodendrocyte precursor cells[J]. *Neuroscience*, 2025, 573: 344-54.
- [30] Collins HM, Gullino LS, Ozdemir D, et al. Rebound activation of 5-HT neurons following SSRI discontinuation[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2024, 49(10): 1580-9.
- [31] 孙秀颀, 蔡静, 张安邦, 等. 电针预处理通过抑制NF- κ B/NLRP3信号通路介导炎症和凋亡改善大鼠脑卒中后痉挛[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(11): 2102-9.
- [32] 林如辉, 夏金言, 马小涵, 等. 电针通过促进突触再生改善脑缺血再灌注损伤大鼠的学习记忆功能[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(12): 2317-26.
- [33] 宋凯, 张虹. 电针调控杏仁核神经信号通路对创伤后应激障碍大鼠恐惧消退的影响[J]. *世界中医药*, 2024, 19(23): 3619-24, 3631.
- [34] 栗文静, 白艳杰. 针刺调节BDNF/TrkB信号通路改善中枢神经系统疾病的研究进展[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2024, 45(4): 530-8.
- [35] 张安邦, 孙秀颀, 庞博, 等. 电针预处理通过调节肠道-大脑轴及Nrf2/HO-1信号通路抑制铁死亡减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 南

- 方医科大学学报, 2025, 45(5): 911-20.
- [36] 周桐宇, 曹秋实, 孙雅琴, 等. 抑肝散防治急性应激障碍向创伤后应激障碍发展的作用与机制研究[J]. 时珍国医国药, 2025, 36(3): 419-26.
- [37] Iqbal J, Huang GD, Xue YX, et al. The neural circuits and molecular mechanisms underlying fear dysregulation in posttraumatic stress disorder[J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1281401.
- [38] Blidy KP, Bustos N, Spalten J, et al. Oxytocin moderates fMRI connectivity and response to implicit threat processing in cocaine use disorder[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2025, 171: 107217.
- [39] 卢志刚, 杨昌明, 孔祥辉, 等. 醒脑开窍中药治疗脑缺血再灌注损伤作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(24): 235-42.
- [40] 李京儒, 赵晋莹, 孙巧悦, 等. 近10年电针疗法治疗慢性失眠的机制概况[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(9): 2235-8.
- [41] 邓楚玉, 王雪莹, 甘立祥, 等. 电针足三里改善高脂血症小鼠的血脂紊乱: 基于肠道菌群结构的改善[J]. 南方医科大学学报, 2025, 45(8): 1633-42.
- [42] Jin YH, Yu LM, Li Y. Paroxetine effect on nerve growth factor, human neurotrophin-4, brain-derived neurotrophic factor levels in post-stroke depression[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(10): 7890-7.
- [43] 康吉良, 胡可, 卢俊樾, 等. 经皮穴位电刺激通过PGC-1 α 介导的线粒体生物生成和抗氧化应激改善血管性痴呆大鼠的认知功能[J]. 生物化学与生物物理进展, 2024, 51(5): 1191-202.
- [44] 陈玉竹, 魏玉婷, 肖敏, 等. PI3K/AKT通路在阿尔茨海默病中的机制及针刺干预的研究进展[J]. 针刺研究, 2025, 50(8): 965-73.
- [45] 李德坤, 姚长风, 单自亮, 等. 基于PI3K/Akt/mTOR信号通路探讨针刺对膝关节炎模型大鼠膝关节软骨自噬的影响[J/OL]. 中国针灸, 2025: 1-14. (2025-03-14). <https://link.cnki.net/doi/10.13703/j.0255-2930.20241026-k0002>.
- [46] 展俊平, 黄硕, 孟庆良, 等. 缺氧微环境下补还五汤通过抑制BNIP3-PI3K/Akt通路抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的线粒体自噬[J]. 南方医科大学学报, 2025, 45(1): 35-42.
- [47] 刘芳, 彭岚竹, 席菁乐. 高表达MYH9通过激活AKT/c-Myc通路抑制非小细胞肺癌细胞凋亡[J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(4): 527-36.
- [48] 陈桂玲, 廖晓凤, 孙鹏涛, 等. 澳洲茄碱通过调控Bcl-2/Bax/caspase-3信号通路促进非小细胞肺癌发生凋亡[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(6): 1109-16.
- [49] 孔凡镇, 韩芳, 石玉秀. p38、CHOP和细胞凋亡相关因子Bcl-2、Bax在PTSD大鼠中缝背核的表达[J]. 解剖科学进展, 2017, 23(6): 593-7.
- [50] 刘倩汝, 王丽, 祁鸣, 等. 电针对PTSD样大鼠学习记忆及海马CA1区Bcl-2/Bax表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(3): 340-4.
- [51] 李晓明, 韩芳, 石玉秀. 线粒体凋亡途径参与创伤后应激障碍大鼠海马神经元凋亡的调控[J]. 解剖学报, 2010, 41(2): 201-5.

(编辑:吴锦雅)