

· 基础研究 ·

低频重复经颅磁刺激对抑郁模型大鼠游泳及海马内氨基酸递质的影响

陈运平 孙圣刚 梅元武 张允建 包敏

【摘要】目的 观察低频重复经颅磁刺激(rTMS)对慢性应激抑郁模型大鼠强迫游泳试验及海马内氨基酸递质含量的影响,探讨低频 rTMS 对抑郁症的治疗作用及其机制。**方法** 选用 12 只 SD 雄性大鼠制备慢性不可预见性温和应激抑郁模型,造模后随机分为磁刺激组和抑郁模型组,磁刺激组给予低频 rTMS 治疗,并与正常对照组比较。各组大鼠于磁刺激前、后进行强迫游泳试验,并采用高效液相色谱法检测大鼠海马内氨基酸递质的含量。**结果** 抑郁模型组大鼠模拟磁刺激后,强迫游泳试验中不动时间与模拟磁刺激前比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而与正常对照组比较显著增高($P < 0.01$)。磁刺激组大鼠磁刺激后,强迫游泳试验中不动时间与磁刺激前比较明显降低($P < 0.01$);与抑郁模型组模拟磁刺激后比较,也明显降低($P < 0.01$);与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。抑郁模型组大鼠海马内谷氨酸含量明显低于正常对照组和磁刺激组($P < 0.05$);磁刺激组大鼠海马内谷氨酸含量与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 低频 rTMS 能明显改变慢性应激抑郁模型大鼠的抑郁行为;对海马内氨基酸递质水平的调节作用是低频 rTMS 的抗抑郁机制之一。

【关键词】 低频重复经颅磁刺激; 应激; 抑郁; 氨基酸

Effects of low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on forced swimming and amino acid neurotransmitters in the hippocampus in a rat model of chronic depressive stress CHEN Yun-ping, SUN Sheng-gang, MEI Yuan-wu, ZHANG Yun-jian, BAO Min. Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Objective To observe any changes in forced swimming and in the amino acid neurotransmitters in the hippocampus of rats subjected to chronically depressive stress after low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation(rTMS), and to study the therapeutic effects and the mechanism of low frequency rTMS in treating depression. **Methods** Twelve male Sprague-Dawley rats were exposed to an unpredictable sequence of mild stressors to establish a model of depression. The depressed rats were then randomly allocated into two groups: a depressed control group, and a magnetic stimulation group. Another 6 normal rats served as normal controls. Before and after the repetitive transcranial magnetic stimulation treatment, the rats were evaluated in terms of their behavior on a forced swimming test, and the concentrations of amino acid neurotransmitters in the hippocampuses of the rats in all three groups were measured. **Results** Rats in the depressed control group showed no significant difference in immobility time on the forced swimming test pre-and post-treatment, but their immobility time was significantly different from that of the control group ($P < 0.01$). The rats in the magnetic stimulation group showed a significant reduction in immobility time compared with both their pre-treatment times and the times of the depressed control group ($P < 0.01$). The times for the rats in the magnetic stimulation group were not significantly different from those of the normal controls. The level of glutamate in the hippocampus in the depressed controls was lower than that in the normal controls ($P < 0.05$). The level of glutamate in the hippocampus in the magnetic stimulation group was higher than that in the depressed control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in glutamate levels between the magnetic stimulation group and the normal controls. **Conclusions** Low frequency rTMS can change the depressive behavior of rats with experimentally induced depression. Regulating the level of amino acid neurotransmitters in the hippocampus might be one of the antidepressive mechanisms of low frequency rTMS.

【Key words】 Transcranial magnetic stimulation; Stress; Depression; Amino acids

重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)作为一种新的神经电生理技术已广泛应用于抑郁症、帕金森病等神经精神疾病的治疗。有

研究表明,高频 rTMS 能兴奋大脑皮质中水平走向的联接神经元,并可导致大脑皮质局部代谢水平增高,有明显抗抑郁作用;而低频 rTMS 对抑郁症的治疗作用有不同的报道^[1,2],但国内相关文献较少。为此,我们应用低频 rTMS 治疗慢性应激抑郁模型大鼠,观察其在强迫游

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科

泳试验前、后海马内氨基酸递质含量的变化,旨在探讨低频 rTMS 对抑郁症的治疗作用及机制。

材料和方法

一、实验动物

SD 健康雄性大鼠 18 只,体重 180 ~ 220 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

二、抑郁模型的制备及动物分组

选用 12 只大鼠,采用慢性不可预见性的温和应激法结合孤养法制备大鼠抑郁模型,具体方法按照文献[3-5]并略加改进。12 只大鼠单笼饲养,并接受 3 周的随机刺激,包括禁食 24 h、禁水 24 h、夹尾 1 min、昼夜颠倒 24 h、电击足底(电压 30 mV,每隔 30 s 刺激 1 次,每次持续 10 s,共 20 次)、4℃冷水游泳 5 min、潮湿垫料 24 h,这 7 种刺激每天随机采用一种,同一种刺激不能连续出现,使大鼠无法预料刺激的发生。另外 6 只大鼠采用群养,正常饮水饮食,不给予任何应激,作为正常对照组。3 周后将慢性不可预见性的温和应激抑郁模型大鼠随机分为磁刺激组和抑郁模型组,每组 6 只。

三、低频 rTMS 治疗

磁刺激组大鼠造模成功后给予低频 rTMS 治疗。采用丹麦 Dantec 公司生产的 Maglite Compact 磁刺激器,线圈直径为 12 cm,峰值刺激强度为 1.2 T,脉冲时限为 100 μ s。治疗方法:频率为 0.5 Hz,以 60% 的最大刺激强度(0.72 T)刺激大鼠双侧前额叶,每侧刺激 30 次为 1 个序列,每日 1 个序列,连续治疗 10 次为 1 个疗程。抑郁模型组及正常对照组大鼠均模拟磁刺激环境,但不给予低频 rTMS 治疗。

四、强迫游泳试验

3 组大鼠于磁刺激前和磁刺激结束后 24 h 分别进行强迫游泳试验^[6]。取一圆筒状容器(高 40 cm,直径 20 cm),内注清水(水深 18 cm,水温 25℃)。分别将大鼠单只放入容器中 5 min,记录每只大鼠在水中保持“不动状态”的时间总和。强迫游泳试验中不动状态时间反映了大鼠的绝望程度。

五、脑组织的处理

大鼠于末次低频 rTMS 治疗后 24 h 给予 10% 水合氯醛深度麻醉(800 mg/kg 体重),经心脏注入含 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 值 = 7.4)进行灌注。25 min 后将大鼠迅速断头取脑。在冰盘上分离海马, -80℃ 冰箱中保存。冰冻环境下称取 100 mg 海马组织,用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液在冰上制备脑组织匀浆,再用 0.4 mol/L 过氯酸除去蛋白,离心沉淀,上清即用来测定氨基酸类神经递质含量。正常对照组和抑郁模型组大鼠断头取脑的时间相同。

六、海马氨基酸递质含量测定

采用 Gilson 116 型高效液相色谱仪, C18 反相柱 4.6 mm $\times$ 100 mm, 粒度 5 μ m, 荧光检测器。

邻苯二甲醛(ortho-phthalaldehyde, OPA)、L-谷氨酸(glutamate, Glu)、L-天门冬氨酸(Aspartate, Asp)、L-甘氨酸(Glycin, Gly)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、内标(高丝氨酸, homoserine)均购自 Sigma 公司;甲醇为色谱级,其余试剂均为 AR 规格。试剂用水均为亚沸重蒸馏水。样品衍生:氨基酸标准混合液(约为每种氨基酸 40 pmol/ μ l)20 μ l 和 OPA 液 100 μ l 在室温下反应, 2 min 后即进样 10 μ l。色谱条件:以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 = 6.8)和甲醇为流动相,开始洗脱时甲醇为 35%,每 min 递增 2%;流速为 1 ml/min,约 20 min 洗脱结束,打印出洗脱曲线。流动相试剂在用前经 0.45 μ m 孔径滤膜过滤并脱气处理。

七、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,所得各组数据采用方差分析法进行统计学处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、低频 rTMS 对抑郁模型大鼠强迫游泳试验的影响

建模后,抑郁模型组大鼠强迫游泳试验中不动时间与正常对照组比较显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明抑郁模型成功;磁刺激前 2 组抑郁大鼠强迫游泳试验中不动时间的差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 2 组有可比性。模拟磁刺激 10d 后,抑郁模型组大鼠强迫游泳试验中不动时间与模拟磁刺激前比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但仍然高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明抑郁大鼠强迫游泳试验中不动时间在模拟磁刺激前、后无变化。磁刺激 10 d 后,磁刺激组大鼠强迫游泳试验中不动时间与磁刺激前、抑郁模型组模拟磁刺激后比较显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),而与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),说明磁刺激后抑郁大鼠强迫游泳试验中不动时间恢复正常。具体情况见表 1。

表 1 低频重复经颅磁刺激治疗对大鼠强迫游泳试验的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	刺激前	刺激后
正常对照组	6	37.43 $\pm$ 2.13	37.18 $\pm$ 2.64
抑郁模型组	6	78.68 $\pm$ 8.18 *	79.80 $\pm$ 8.20 *
磁刺激组	6	79.18 $\pm$ 8.57 *	38.58 $\pm$ 2.94 $^{\# \Delta}$

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与抑郁模型组比较, $^{\#} P < 0.01$;与刺激前比较, $^{\Delta} P < 0.01$

二、低频 rTMS 对抑郁模型大鼠海马内氨基酸递质含量的影响

所测试的 4 种氨基酸中,3 组间仅 Glu 的差异有统计学意义(F 值 = 67.25, $P < 0.01$),进一步 q 检验发现抑郁模型组与正常对照组比较 Glu 显著降低,差异有统计学意义($q = 3.59, P < 0.05$);与磁刺激组比较 Glu 也显著降低,差异有统计学意义($q = 3.74, P < 0.05$);但磁刺激组与正常对照组比较, Glu 的差异无统计学意义($q = 0.16, P > 0.05$),说明仅是抑郁模型组 Glu 低于正常,但经磁刺激后抑郁模型大鼠海马内 Glu 与正常一致。其它 3 种氨基酸天门冬氨酸、甘氨酸、 γ -氨基丁酸在 3 组间的差异无统计学意义(F 值分别为 0.33, 0.92, 0.51, $P > 0.05$),说明磁刺激对大鼠海马内天门冬氨酸、甘氨酸、 γ -氨基丁酸无影响。具体情况见表 2。

表 2 3 组大鼠海马氨基酸类神经递质的变化
($\mu\text{mol/g}$ 湿脑重, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	Glu	Asp	Gly	GABA
正常对照组	6	5.23 $\pm$ 0.47	1.64 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.11	5.48 $\pm$ 0.63
抑郁模型组	6	2.73 $\pm$ 0.38*	1.66 $\pm$ 0.06	0.71 $\pm$ 0.14	5.78 $\pm$ 0.82
磁刺激组	6	5.34 $\pm$ 0.46#	1.67 $\pm$ 0.05	0.69 $\pm$ 0.15	5.92 $\pm$ 0.82

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与抑郁模型组比较, # $P < 0.05$

讨 论

有研究发现, rTMS 能改变抑郁大鼠的抑郁行为。Sachdev 等^[2]对抑郁模型大鼠使用 1~25 Hz 之间不同频率的 rTMS 治疗,结果发现高频与低频 rTMS 治疗均能显著减少大鼠强迫游泳不动的时间,二者之间差异无统计学意义,表明频率为 1~25 Hz 之间的 rTMS 治疗有显著的抗抑郁作用。Tsutsumi 等^[7]也发现, rTMS 能显著缩短大鼠强迫游泳试验中固定不动的时间,表明 rTMS 治疗具有抗抑郁效应。本研究结果也显示:磁刺激组大鼠接受 rTMS 后强迫游泳试验中不动时间较刺激前及抑郁模型组模拟磁刺激后均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。这提示低频 rTMS 能有效改善抑郁大鼠的抑郁行为,对抑郁症具有治疗作用。

研究发现,抑郁症的发生除与单胺神经递质有关外,谷氨酸等氨基酸递质在其中也扮演了重要角色,兴奋性/抑制性氨基酸失衡可导致抑郁行为的发生^[8,9]。研究发现反复心理应激模型大鼠海马内 Glu 明显下降^[10],质子磁共振影像研究也显示,抑郁症患者在前扣带回的谷氨酸水平降低^[8]。本研究结果证明:抑郁模型组大鼠海马内 Glu 较正常对照组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明大鼠抑郁行为的发生与脑内氨基酸递质 Glu 的降低有明显关系。

rTMS 治疗抑郁症的确切机制尚不清楚,但有研究显示其可能与脑内氨基酸递质水平的改变有关^[11,12]。有文献报道,高频 rTMS 对刺激点附近的额叶及较远

的脑区皮质 Glu 水平有明显影响,而且刺激前皮质 Glu 水平愈低,刺激后皮质 Glu 水平愈高^[11]。Zangen 等^[12]的研究发现,经颅磁刺激刺激前额皮质后复核多巴胺和谷氨酸水平显著增高,提示多巴胺和谷氨酸水平的改变可能在经颅磁刺激的抗抑郁效应中发挥重要作用。本研究结果证明:磁刺激组大鼠海马内 Glu 较抑郁模型组增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示低频 rTMS 能调节抑郁模型大鼠海马内 Glu 水平,使兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸达到新的平衡,这可能是 rTMS 治疗抑郁症的机制之一。

综上所述,低频 rTMS 治疗能显著改变慢性应激抑郁模型大鼠的抑郁行为;大鼠抑郁行为的发生与海马内氨基酸类递质改变有密切关系;对海马内氨基酸递质(主要是 Glu)水平的调节作用是低频 rTMS 抗抑郁作用的机制之一。

参 考 文 献

- 1 王晓明,杨德本,谢建平,等. 重复经颅磁刺激治疗抑郁症的初步探讨. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26:428-429.
- 2 Sachdev PS, McBride R, Loo C, et al. Effects of different frequencies of transcranial magnetic stimulation (TMS) on the forced swim test model of depression in rats. Biol Psychiatry, 2002, 51:474-479.
- 3 李晓秋,许晶. 抑郁动物模型的研究进展. 中华精神科杂志, 2002, 35:184-186.
- 4 许晶,李小秋. 慢性应激抑郁模型的建立及评价. 中国行为医学科学, 2003, 12:14-17.
- 5 唐启盛,裴清华,侯秀娟,等. 脑卒中后抑郁状态动物模型的建立. 北京中医药大学学报, 2004, 27:33-36.
- 6 洪华,黄如训,王庭槐,等. 脑卒中后抑郁大鼠模型的建立. 中国临床康复, 2002, 6:1266-1267.
- 7 Tsutsumi T, Fujiki M, Akiyoshi J, et al. Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on forced swimming test. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2002, 26:107-111.
- 8 李晓白,黄继忠,王祖承. 抑郁症与谷氨酸传导. 中国新药与临床杂志, 2005, 24:601-604.
- 9 王天芳,刘雁峰,张倩,等. 复合应激因素致大鼠疲劳模型海马氨基酸含量的变化及中药的调节作用. 北京中医药大学学报, 2000, 23:24-26.
- 10 李艳,严灿,徐志伟,等. 调肝、健脾、补肾治法及人参总皂甙对反复心理应激大鼠下丘脑及海马氨基酸含量的影响. 中药药理与临床, 2003, 19:1-3.
- 11 Michael N, Gosling M, Reutemann M, et al. Metabolic changes after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) of the left prefrontal cortex: a sham-controlled proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS) study of healthy brain. Eur J Neurosci, 2003, 17:2462-2468.
- 12 Zangen A, Hyodo K. Transcranial magnetic stimulation induces increases in extracellular levels of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens. Neuroreport, 2002, 13:2401-2405.

(修回日期:2006-04-14)

(本文编辑:阮仕衡)