基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003570

跑步对抑郁大鼠内侧前额叶皮质兴奋性突触的影响

杨雯宇[1]，肖　倩[2]，秦　露[3]，黄杜娟[3]，邓宇辉[3]，周　梅[1]，王　舜[3]，唐　勇[3]，黄春霞[1]
（重庆医科大学基础医学院 1.生理学教研室；2.放射医学教研室；3.组织学与胚胎学教研室，重庆　400016）

【摘　要】目的：精确定量研究跑步锻炼对慢性束缚应激（chronic restraint stress，CRS）诱导的抑郁模型大鼠内侧前额叶皮质（medial prefrontal cortex，mPFC）内 Sp^+ 兴奋性突触数量的影响。**方法：**选取雄性 SD 大鼠（54 只），经过适应性喂养和糖水基线调整，在 CRS 模型建立成功后随机分为对照组、抑郁模型组和模型跑步组，其中模型跑步组大鼠在束缚的第 5 周开始进行为期 4 周的跑步锻炼干预。最后，对各组大鼠进行行为学测试，并运用免疫组织化学技术结合现代体视学方法对各组大鼠 mPFC 内 Sp^+ 兴奋性突触变化进行精确定量研究。**结果：**与对照组［(97.14 ± 2.64)%］相比，抑郁模型组和模型跑步组大鼠糖精偏好百分比［(89.62 ± 6.05)%］减少（P=0.002），体质量的增长减缓，强迫游泳实验中大鼠的不动时间和新环境进食抑制实验的进食潜伏期增加。4 周的跑步锻炼可以有效减缓抑郁模型组大鼠糖精偏好百分比的下降［(89.30 ± 5.06)% vs. (97.30 ± 2.08)%，P=0.018］，降低强迫游泳实验中抑郁大鼠的不动时间，并在新环境进食抑制实验中缩短抑郁大鼠的进食潜伏期。体视学精确定量分析结果显示，抑郁模型组大鼠 mPFC 内的 Sp^+ 兴奋性突触总量［(9.98 ± 0.35)×10^8 个］低于对照组［(11.50 ± 1.27)×10^8 个，P=0.013］。而跑步锻炼则可以逆转抑郁大鼠 mPFC 内的 Sp^+ 兴奋性突触总数的减少［模型跑步组(11.30 ± 1.21)×10^8 个，P=0.003］。**结论：**跑步锻炼干预后 CRS 抑郁模型大鼠 mPFC 的 Sp^+ 兴奋性突触数量的改变可能是跑步锻炼发挥抗抑郁作用的神经生物学基础之一。

【关键词】跑步锻炼；抑郁症；兴奋性突触；内侧前额叶皮质；体视学
【中图分类号】R329.4；R749.4+1　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-10-07

Effects of running on excitatory synapses in medial prefrontal cortex in rat model of depression

Yang Wenyu[1], Xiao Qian[2], Qin Lu[3], Huang Dujuan[3], Deng Yuhui[3], Zhou Mei[1], Wang Shun[3], Tang Yong[3], Huang Chunxia[1]
(1. Department of Physiology; 2. Department of Radiology; 3. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To precisely and quantitatively study the effects of running exercise on the number of spinophilin (Sp^+) excitatory synapses in the medial prefrontal cortex (mPFC) in a rat model of depression induced by chronic restraint stress (CRS). ***Methods*:** After adaptive feeding and baseline saccharin preference testing, 54 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: control group, CRS depression model group, and model+running group. The model+running group had 4-week running exercise since the 5th week of restraint. Then behavioral tests were performed for each group. The changes in Sp^+ excitatory synapses in mPFC were measured quantitatively and precisely by immunohistochemistry and modern stereology. ***Results*:** Compared with the control group, the depression model group showed a significantly lower saccharin preference［(97.14 ± 2.64)% vs. (89.62 ± 6.05)%, P=0.002］, a significantly slower increase in body weight, a significantly longer immobility time in the forced swimming test, and a significantly longer latency to eat in the novelty-suppressed feeding test. Compared with the depression model group, 4-week running significantly increased saccharin preference［(89.30 ± 5.06)% vs. (97.30 ± 2.08)%, P=0.018］, and significantly shortened the immobility time of the forced swimming test and the latency to eat in the novelty-suppressed feeding test. The stereology results revealed a significantly less total number of Sp^+ excitatory synapses in mPFC in the depression model group than in the control group［(9.98 ± 0.35)× 10^8 vs. (11.50 ± 1.27)×10^8, P=0.013］; and running exercise significantly reversed the decrease in the total number of Sp^+ excitatory synapses in mPFC in depressive rats［(11.30 ± 1.21)×10^8, P=0.003］. ***Conclusion*:** Modulating the number of Sp^+ excitatory synapses in mPFC may be one of the neurobiological bases for running to relieve depression.

【Key words】running exercise; depression; excitatory synapse; medial prefrontal cortex; stereology

作者介绍：杨雯宇，Email：3365213527@qq.com，
研究方向：抑郁症改变及抗抑郁治疗的机制研究。
通信作者：黄春霞，Email：huangchunxia@cqmu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金青年基金资助项目（编号：81501156）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.r.20240819.0948.036
（2024-08-19）

抑郁症是一种常见的精神性疾病，不仅严重危害人类健康，而且给家庭和社会也带来了极大的经济负担[1]。然而目前针对抑郁症的治疗药物仍然存在起效慢，不良反应大等很多不足，甚至可能存在增加自杀概率的风险[2]。因此，探寻抑郁症的发病机制，寻找更加安全有效的抗抑郁治疗手段，就变得尤为重要。

内侧前额叶皮质（medial prefrontal cortex，mPFC）是抑郁症受累的主要脑区[3-4]。既往临床研究及本团队前期动物实验结果显示，抑郁患者及抑郁模型动物均存在 mPFC 体积的萎缩，提示 mPFC 结构的改变可能与抑郁症的发病密切相关[5-6]。而突触结构作为中枢神经系统神经传递的基本结构和功能单元，在多种精神和神经疾病中均伴有突触可塑性异常[7]。Kang HJ 等[8]发现，重度抑郁症患者大脑中突触功能相关基因表达降低，突触数量也相应减少。此外，研究者在重度抑郁症患者以及抑郁模型大鼠的大脑前额叶皮质内均发现有突触相关蛋白表达的下降[9]。这些研究表明，突触可塑性的改变可能参与了抑郁症患者的中枢神经系统神经网络连通性下降的过程，进而引起抑郁相关的情绪失调[10]。另一方面，研究者在复杂神经网络的活动过程中广泛观察到了兴奋性神经活动和抑制性神经调节的协同作用以及兴奋/抑制突触比相对的恒定[11]。体内延时成像结果证明，兴奋性突触的丢失对兴奋性神经元的树突发育和经验依赖的神经结构可塑性有明显的影响，那么兴奋性突触功能障碍可能导致中枢神经系统神经环路完整性损害，并产生相应抑郁行为学表现[12]。因此，推测抑郁症内侧前额叶皮质内兴奋性突触的变化可能是抑郁症发病机制的重要结构基础。然而，以往对抑郁症大脑突触变化的研究仅限于突触相关蛋白，关于抑郁症内侧前额叶皮质内突触，特别是兴奋性突触的三维定量研究目前尚未见研究报道。假设兴奋性突触改变参与了抑郁症发病过程，那么改善内侧前额叶皮质兴奋性突触能否出现相应的抗抑郁作用目前也并不清楚。

近十年来，越来越多的临床研究表明，体育锻炼可以减轻重度抑郁症的症状[13-15]。本团队发现跑步运动可以改善慢性不可预知应激模型大鼠的快感缺乏[16]，然而对运动如何改善抑郁症状的诠释仍然不全面。Stranahan AM 等[17]指出长期跑步锻炼可以增加正常大鼠大脑内嗅皮质内突触密度。另有研究报道 8 个月的跑步锻炼可减轻 TgF344-AD 模型大鼠的抑郁样行为，并改善 TgF344-AD 模型大鼠皮质树突棘密度、突触和突触前囊泡相对数量的减少[18]。上述研究均提示跑步锻炼对中枢神经系统内突触可能具有保护作用，可是关于跑步锻炼对抑郁模型动物 mPFC 内突触的作用，尤其是对 mPFC 兴奋性突触的作用，仍有待研究。突触后密度蛋白-95（PSD-95）是一种支架蛋白，作为树突棘中兴奋性突触后密度的丰富成分，将谷氨酸受体聚集在树突棘中[19]。树突棘素是一种磷酸酶结合蛋白，约 93% 的兴奋性突触被其标记[20]。本研究将结合现代体视学技术和免疫组织化学方法，探讨抑郁模型大鼠内侧前额叶皮质内兴奋性突触数量的改变，为寻找跑步锻炼防治抑郁症的机制探索提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取雄性 Squrague-Dawley（SD）大鼠 6~8 周龄，体质量（150 ± 10）g，54 只，由重庆医科大学动物实验中心提供。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.2 主要试剂及仪器

兔抗树突棘素单克隆抗体购自于美国 Cell Signaling Technology 公司；胶体金（colloidal gold，CG）标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Electron Microscopy Science 公司；体视学仪器购自丹麦 Glostrup 公司，大鼠束缚装置和行为学测试装置均由本实验室自制。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 先常规饲养以适应环境，每笼 5~6 只大鼠，其间保证自由进食进水。正式实验开始后对大鼠进行糖精基线调整测试，在基线调整期后，将大鼠随机分为空白对照组（n=22）和应激模型组（n=32）。之后对应激模型组进行为期 4 周的慢性束缚应激，在应激 4 周末根据糖精偏好实验的结果将应激模型组进行随机分为抑郁模型组（n=18）和模型跑步组（n=14），且从束缚第 5 周开始对模型跑步组大鼠进行 4 周的跑步锻炼，在应激 8 周末跑步锻炼结束。

1.3.2 慢性束缚应激模型（chronic restraint stress，CRS）建立 将大鼠置于圆筒状的束缚装置中，每日束缚 6 h（均在每日 9:30~14:30），每周连续束缚 5 d[21]。束缚期间保持禁食禁饮，持续束缚 8 周。

1.3.3 跑步锻炼方案 束缚第 5 周开始，给予大鼠跑步锻炼干预。跑步时长为 20 min/d，每周连续跑步 5 d。第 1 天跑步速度为 10 m/min，之后每天增加 2 m/min 直至速度增至 20 m/min 后恒定跑步速度。

1.3.4 体质量测定 各组大鼠体质量在每周日上午固定时

间进行测定。

1.3.5 行为学检测

1.3.5.1 糖精偏好实验 采用糖精偏好实验（saccharin preferences test，SPT）对大鼠的快感缺失程度进行评估[22]。为避免大鼠代谢水平受到影响，本实验使用糖精替代蔗糖进行糖精偏好实验[23]。给每只大鼠提供相同规格的1瓶0.03%糖精溶液[24]和纯水，瓶子位置随机放置，在24 h后分别称量糖精溶液和纯水的重量，计算大鼠24 h内的摄入量。按公式：糖精偏好百分比=摄入糖精溶液量/摄入液体总量×100%，计算大鼠的糖精偏好。

1.3.5.2 强迫游泳实验 采用强迫游泳实验（forced swimming test，FST）评估大鼠的行为绝望程度[25]。将大鼠单独放置于有水的透明树脂圆筒（直径20 cm，高度40 cm）中，水温为23~25 ℃，水深45 cm，测试时间为6 min，计数测试时间后4 min内大鼠在水中的不动时间。

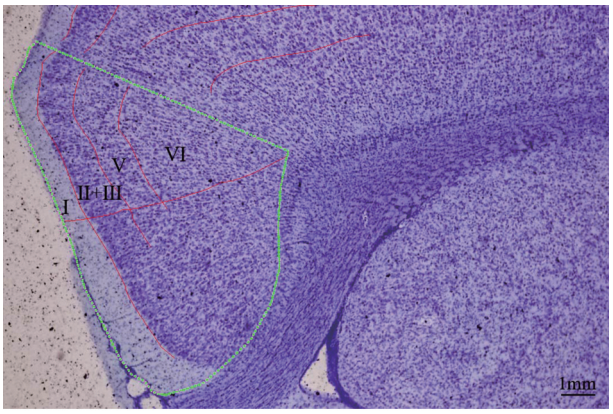
1.3.5.3 新环境进食抑制实验 采用新环境进食抑制实验（novelty suppressed feeding test，NSFT）评估抗抑郁药物和跑步锻炼等的抗抑郁效果[26]。使用边长50 cm、高40 cm且箱底为黑色的试验箱。箱底中央放置小块食物于白纸上。实验前动物禁食24 h，实验时从任意的箱角放大鼠入箱内，通过摄像系统观察5 min，记录大鼠的活动量，同时计算由放入大鼠到大鼠前肢抱起食物进食的时间。大鼠的活动量和进食时间的长短反映了动物的抑郁程度，随后将动物放回笼中记录5 min内食物消耗量即后5 min进食量，以排除食欲差异对进食时的影响。

1.3.6 标本固定、取材和切片制备 每组随机选择5只大鼠，用1%戊巴比妥钠（40 mg/kg）腹腔注射麻醉后，依次灌注生理盐水和4%多聚甲醛。剖开大鼠颅骨，取出完整脑组织后浸泡于组织固定液中24 h以上，再放于4 ℃冰箱保存。切片前将固定好的脑组织取出，沿脑裂分为左右半脑，随机抽取一侧浸泡于0.1 mol/L磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）配置的蔗糖溶液中。按10%、20%、30%浓度梯度进行脱水处理。脱水后用冰冻切片机进行50 μm等距离切片，切片按1/6比例进行抽样，每侧半脑可得6组切片。

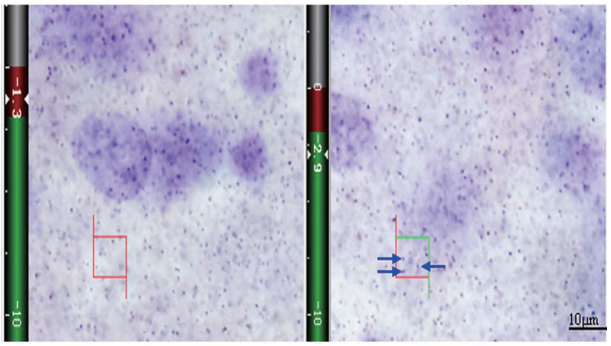
1.3.7 尼氏染色 为便于后期对mPFC进行分区，从上述制备的冰冻切片中取每只大鼠第1组的连续等距切片进行尼氏染色。将组织切片在室温下复温30 min，之后将切片贴附于载玻片上，完全晾干后使用免疫组化笔沿切片周围2~3 mm处画封闭的线圈。之后将组织切片放入0.01 mol/L的PBS溶液中浸泡20 min，换用去离子水洗涤5 min，弃去水分。将载玻片正面朝上横置于湿盒内，在组织切片上滴加45 ℃预热的尼氏（Nissl）染色液，45 ℃水浴箱内孵育40 min，去离子水漂洗2 min后95%乙醇脱色30 s×4次，无水乙醇脱水2 min×2次，二甲苯透明后中性树脂封片，室温下晾干。

1.3.8 免疫组织化学染色 每只动物均从6组切片中随机抽取1组，依次在0.01 mol/L的PBS和含有0.1%Tween-20的PBS中漂洗3次，每次10 min。之后将切片放于含有10%山羊血清的封闭液中，37 ℃下封闭2 h，之后用封闭液做底液配制兔抗Sp^+一抗（1∶1 000），4 ℃下孵育80 h。充分洗涤后，将切片放于胶体金标记的山羊抗兔IgG二抗（1∶200），37 ℃下孵育3 h。漂洗后在2%戊二醛中固定10 min，银增强避光显色30 min，再次漂洗后贴片风干，苏木素复染。最后用梯度乙醇逐级脱水，并用二甲苯透明后中性树脂封片，室温下晾干。

1.3.9 体视学分析 利用体视学仪器对各组大鼠mPFC内Sp^+树突棘数目进行定量分析。将制备好的切片放置于光学显微镜下，在4×镜下依据大鼠脑图谱利用体视学分析软件勾画出mPFC边界（图1A）。大鼠的mPFC主要包括PL、IL和ACC 3个部分，且3个部分在组织结构和层次分化上依次向腹侧迁移。由于动物存在个体差异，因此多采用细胞构筑法进行mPFC边界的划分[6]。mPFC天然缺失第Ⅳ层，分区时主要根据大鼠脑图谱参照第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ层之间的区别进行划分[27]。100×油镜下依据以下参数对Sp^+树突棘进行计数（图1B）：切片面积抽样分数为0.02%，计数框面积设置为4.75 μm^2，保护高度设置为3 μm，体视框高度为10 μm。按照禁线法则计数第一次清晰聚焦于体视框高度内的Sp^+树突棘，并根据光学分合法公式计数大鼠mPFC内Sp^+树突棘的总数目：$N = \sum Q^- \times 1/ssf \times 1/asf \times 1/hsf$，其中$\sum Q^-$为样本中实际计数的树突棘总数，*ssf*为切片抽样分数，*asf*为面积抽样分数，*hsf*为高度抽样分数。



A. 4倍镜下尼氏染色后大鼠脑组织切片中mPFC的边界示意图



注：左边保护高度内的Sp^+兴奋性突触不被计数，右边保护高度以下的Sp^+兴奋性突触被计数；蓝色箭头表示Sp^+兴奋性突触被计数

B. 100倍镜下体视框计数大鼠mPFC内Sp^+兴奋性突触的示意图

图1 体视学分析图像示意图

1.3.10 免疫荧光染色 每只动物均从6组切片中随机抽取1组，在0.01 mol/L的PBS中漂洗3次，每次10 min，之后在含有0.3%Trinton和0.1%Tween-20的PBS中漂洗6次，每次10 min。之后将切片放于枸橼酸溶液中沸水浴30 min，冷却后再放入含有0.3%Trinton和0.1%Tween-20的PBS中漂洗3次，之后在含有10%山羊血清的封闭液中，37 ℃下封闭2 h，之后用PBS做底液配制兔抗PSD-95一抗（1∶500），4 ℃下孵育48 h。充分洗涤后，将切片放于荧光二抗（DyLight549，1∶200），37 ℃下孵育2 h。漂洗后使用抗荧光猝灭剂封片封片，4 ℃下保存。

1.4 统计学方法

采用SPSS 25.0统计软件进行分析。数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。对体质量测量数据进行重复测量方差分析，在正态性检验之后进行球形度检验，$P<0.05$进行多变量检验，给出F值和P值，若$P<0.05$进行两两比较，给出具体的P值。其余测量数据均进行正态性检验，若数据不服从正态分布进行数据转换，若数据转换后仍不符合正态分布则选用非参数检验；若数据服从正态分布或数据转换后符合正态分布则对数据进行方差齐性检验。若数据符合方差齐性采用单因素方差分析，出现$P<0.05$再进行LSD多重比较。方差不齐则选用非参数检验，检验水准为$\alpha=0.05$。

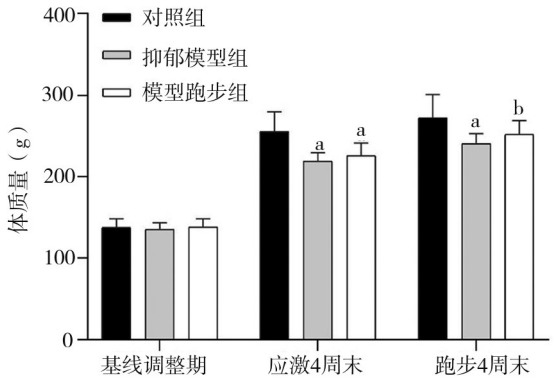
2 结 果

2.1 跑步锻炼可以改善抑郁模型大鼠体质量增长的缓慢

对3次体质量测量的数据进行重复测量方差分析，球形检验的结果$P=0.001$，说明3次测量的体质量间存在高度的相关性；时间效应（$F=1\ 230.69$，$P=0.000$），交互效应（$F=11.832$，$P=0.000$）和组间效应（$F=15.845$，$P=0.000$）的P值均<0.05，说明体质量随时间不断增加；且随时间改变，分组间体质量的增长量不同。跑步锻炼对于改善抑郁模型动物体质量增长的缓慢有一定作用。结果显示，应激实验第4周末，与对照组大鼠的体质量（255.68±23.79）g相比，抑郁模型组[（219.56±10.22）g]和模型跑步组[（225.98±15.46）g]大鼠的体质量增长减缓（$F=31.965$，$P=0.000$，图2）。而在应激实验第8周末时（$F=15.513$，$P=0.000$），模型跑步组大鼠的体质量（252.00±16.75）g和抑郁模型组的（240.79±12.03）g相比，增长缓慢得到了改善（$F=15.513$，$P=0.023$，图2）。

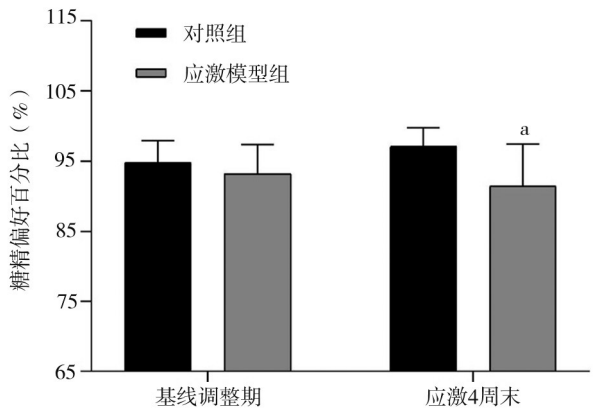
2.2 跑步锻炼可以逆转抑郁模型大鼠的抑郁样行为

2.2.1 跑步锻炼可以提高抑郁模型大鼠的糖精偏好 实验开始时，对照组[（94.80±3.12）%]与应激模型组[（93.21±4.17）%]大鼠糖精偏好百分比之间的差异并无统计学意义（$t=0.476$，$P=0.639$，图3A）。应激第4周时，应激模型组大鼠的糖精偏好百分比低于对照组[应激模型组（89.62±6.05）% vs. 对照组（97.14±2.64）%，$t=3.625$，$P=0.002$，图3A]；抑郁模型组大鼠糖精偏好仍低于对照组[抑郁模型组（89.30±5.06）% vs. 对照组（98.34±1.12）%，$F=15.078$，$P=0.000$，图3B]；模型跑步组大鼠的糖精偏好百分比高于抑郁模型组[模型跑步组（97.30±2.08）% vs.（89.30±5.06）%，$F=15.078$，$P=0.018$，图3B]。



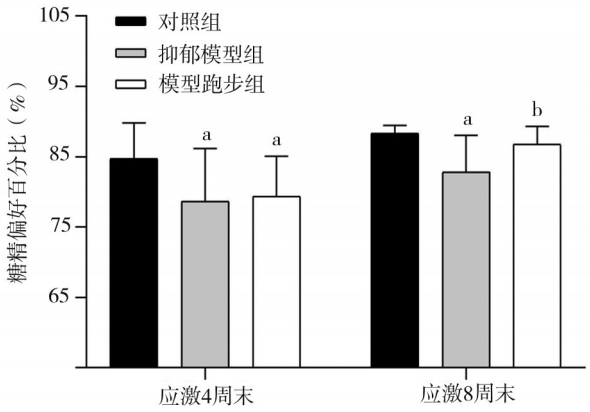
注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与抑郁模型组比较，$P=0.023$；对照组$n=22$，抑郁模型组$n=18$，模型跑步组$n=14$

图2 各组大鼠在不同时期的体质量比较（$\bar{x}\pm s$）



注：a，与对照组比较，$P=0.002$；对照组$n=22$，应激模型组$n=32$

A. 对照组和CRS组在应激第4周末的糖精偏好比较

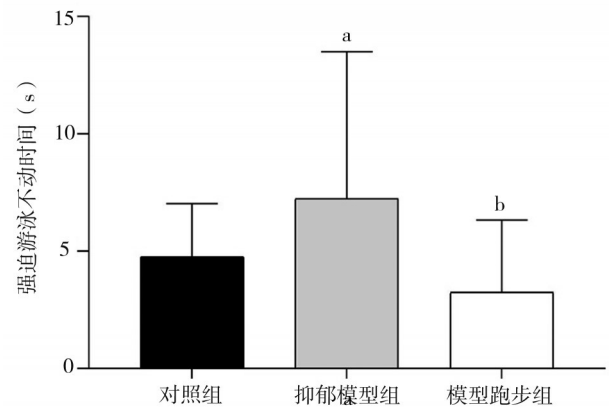


注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与抑郁模型组比较，$P=0.018$；对照组$n=22$，抑郁模型组$n=18$，模型跑步组$n=14$

B. 各组大鼠在应激第8周末（跑步锻炼第4周末）后的糖精偏好比较

图3 各组大鼠在不同时期的糖精偏好实验结果（$\bar{x}\pm s$）

2.2.2 跑步锻炼可以缩短抑郁模型大鼠强迫游泳的不动时间 3组大鼠的FST不动时间分别为(4.97 ± 2.19) s、(7.24 ± 6.26) s 和(4.62 ± 2.61) s，3 组比较差异有统计学意义(F=10.724，P=0.005)，进一步两两比较：与对照组相比，抑郁模型组大鼠的FST不动时间增加(F=10.724，P=0.040)，而与模型跑步组相比大鼠 FST 的不动时间缩短(F=10.724，P=0.001，图4)。



注：a，与对照组比较，P=0.040；b，与抑郁模型组比较，P=0.001；对照组 n=22，抑郁模型组 n=18，模型跑步组 n=14

图4 各组大鼠的强迫游泳实验结果($\bar{x} \pm s$)

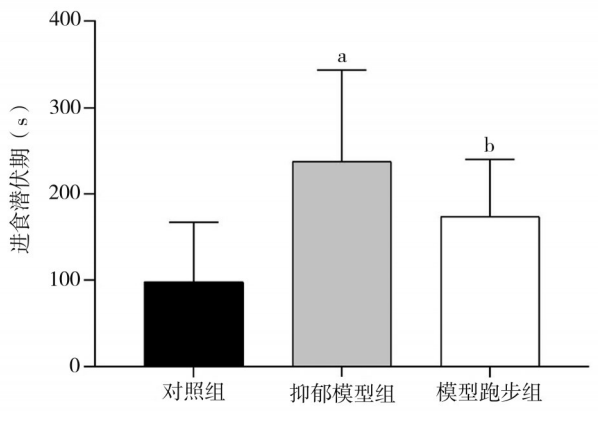
2.2.3 跑步锻炼可以降低抑郁模型大鼠在新环境进食抑制实验中的进食潜伏期 3 组大鼠的进食潜伏期分别为[(85.53 ± 31.78) s、(234.22 ± 113.02) s 和(175.64 ± 63.99) s]，3组比较差异有统计学意义(F=30.443，P=0.000)，进一步两两比较：与对照组相比，抑郁模型组大鼠的FST不动时间增加(F=30.443，P=0.000，图 5A)，而与模型跑步组相比大鼠FST的不动时间缩短(F=30.443，P=0.043，图5A)。而各组大鼠后 5 min 进食量分别为[(1.99 ± 0.51) g、(1.54 ± 0.39) g 和(1.36 ± 0.58) g]，3 组比较并无明显差异(F=1.544，P=0.225，图5B)。

2.3 跑步锻炼可以逆转抑郁模型大鼠的mPFC内兴奋性突触密度的减少

各组大鼠mPFC内PSD-95免疫荧光代表性图片见图6，可见抑郁模型大鼠mPFC内PSD-95的密度低于对照组和模型跑步组。

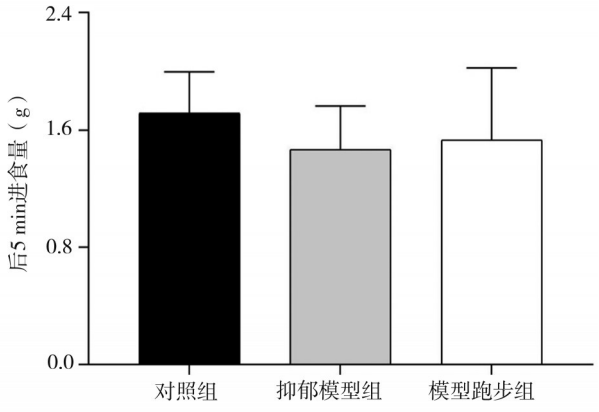
2.4 跑步锻炼可以逆转抑郁模型大鼠的mPFC内Sp^+兴奋性突触密度和总数目的降低

各组大鼠mPFC内Sp^+兴奋性突触免疫组化染色的代表性图片如图7A所示，大鼠Sp^+兴奋性突触体视学参数见表1。体视学结果显示：抑郁模型组[(0.135 ± 0.013)个/μm^3]大鼠Sp^+突触密度低于对照组[(0.139 ± 0.011)个/μm^3]和模型跑步组[(0.145 ± 0.009)个/μm^3]，差异有统计学意义(F=2.856，P=0.097)，见图7B。3组大鼠mPFC内Sp^+突触数量比较差异有统计学意义(F=7.340，P=0.025)，其中抑郁模型组大鼠mPFC内Sp^+突触数量[(9.98 ± 0.35)×10^8个]低于对照组[(11.50 ± 1.27)×10^8个，P=0.013，图7C]，模型跑步组[(11.30 ± 1.21)×10^8个]mPFC内Sp^+突触数量高于抑郁模型组(P=0.003，图7C)。可见观察到的体视学抽样变异的观察误差系数(observed coefficient of error，OCE)<0.15，动物内变异系数(observed coefficient of variation，OCV)<0.15，且个体估计值的观察方差(OCE^2)远小于观察个体间方差(OCV^2)的50%(表1)，本研究中的体视学抽样符合标准。



注：a，与对照组比较，P=0.000；b，与抑郁模型组比较，P=0.043；对照组 n=22，抑郁模型组 n=18，模型跑步组 n=14

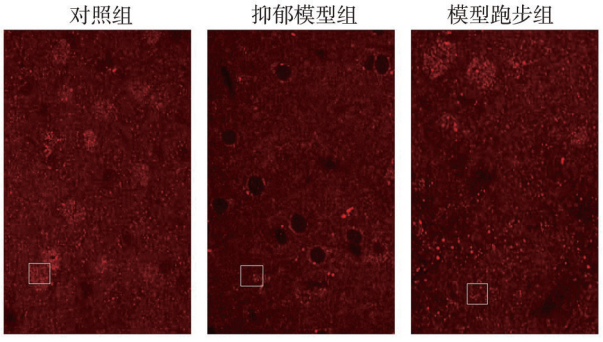
A. 各组大鼠在新环境进食抑制实验中的进食潜伏期比较



注：对照组 n=22，抑郁模型组 n=18，模型跑步组 n=14

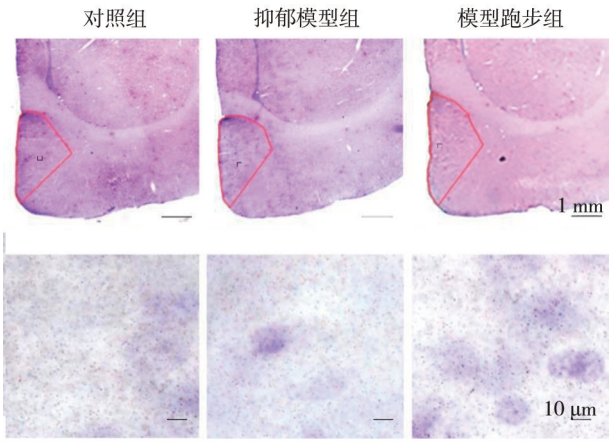
B. 各组大鼠新环境进食抑制实验中后5 min进食量比较

图5 各组大鼠新环境进食抑制实验结果($\bar{x} \pm s$)



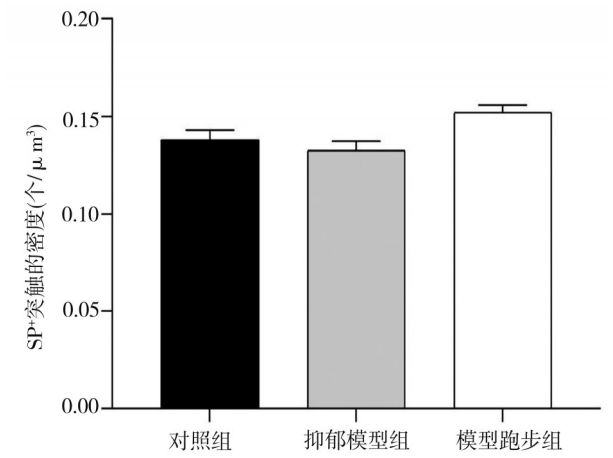
注：方框内红色粒子即为PSD-95阳性

图6 大鼠mPFC内PSD-95免疫荧光染色代表性图片

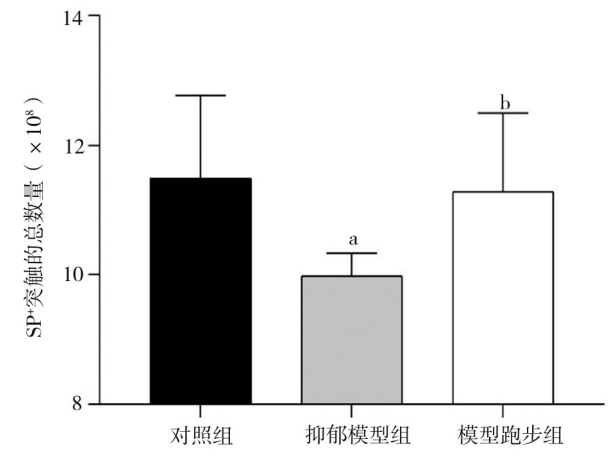


注：上图为4倍镜下mPFC内Sp^+兴奋性突触染色效果，下图为100倍镜下上图黑色框部分对应Sp^+兴奋性突触的图像；红线部分区域为mPFC

A. 免疫组织化学方法观察各组大鼠mPFC内Sp^+兴奋性突触的代表性图片



B. 各组大鼠mPFC内Sp^+兴奋性突触的密度分析



注：a，与对照组比较，P=0.013；b，与抑郁模型组比较，P=0.003

C. 各组大鼠mPFC内Sp^+兴奋性突触的数量分析

图7　大鼠mPFC内Sp^+兴奋性突触的代表性图片和体视学计数的统计结果（n=5，$\bar{x} \pm s$）

表1　大鼠mPFC内Sp^+兴奋性突触的体视学参数（n，$\bar{x} \pm s$）

项目	对照组	抑郁模型组	模型跑步组
切片数量（个）	16~19	14~18	16~18
切片厚度（μm）	21.34 ± 0.61	18.92 ± 1.57	20.54 ± 1.16
抽样计数框数量（个）	257	230	234
Sp^+突触总数量（$\times 10^8$个）	11.50 ± 1.27	9.98 ± 0.30	11.30 ± 1.21
OCV	0.11	0.07	0.11
OCE	0.06	0.04	0.07
OCE^2/OCV^2	0.30	0.33	0.40

注：如果OCE<0.15且OCE^2/OCV^2<0.5说明该体视学抽样符合抽样标准

3　讨　论

本研究选择慢性束缚应激作为抑郁动物模型，CRS模型具有操作简便、重复性强，并且能诱导稳定的抑郁样行为等优点，被广泛用于抑郁症中研究动物大脑各脑区结构的变化、细胞和分子机制等的改变[28-30]。实验结果显示4周的慢性束缚应激后大鼠表现出体质量增长减缓，糖精偏好百分比降低，强迫游泳的不动时间延长，新环境进食抑制实验中进食潜伏期延长，提示CRS模型大鼠已表现出快感缺失、行为绝望等抑郁样行为，模型建立成功。而4周跑步锻炼治疗可以有效延缓慢性应激诱发的大鼠体质量增长的缓慢，有效改善了抑郁模型大鼠的快感缺失、行为绝望等抑郁样行为，这一行为学结果与既往跑步锻炼改善抑郁的研究结果[31-32]，以及本团队前期研究结果相一致[33-34]，也进一步证明了跑步锻炼可能是改善抑郁症状和抑郁行为的有效治疗手段。

作为调控学习记忆和情绪反应的重要脑区，mPFC与包括抑郁症在内的多种精神疾病有关[3]。既往研究显示抑郁症可能与mPFC内突触可塑性的改变有关[35]。而在慢性束缚应激可以引起大鼠内侧前额叶皮质锥体神经元顶端树突棘消退[36-37]。Li CC等[38]采用高尔基染色、透射电镜技术和荧光双标共定位的方式半定量研究内侧前额叶皮质的突触发现，在慢性温和应激模型大鼠mPFC内存在突触数量的相对减少。本实验采用树突棘素对mPFC内兴奋性突触树突棘顶端进行免疫组织化学技术进行染色标记并计数，结果显示4周慢性束缚应激降低了抑郁模型组大鼠大脑mPFC内Sp^+兴奋性突触密度，提示抑郁症mPFC可能存在Sp^+兴奋性突触的丢失。这一结果与既往抑郁症mPFC突触改变的结

论相一致，而这些研究只采用定性和半定量方法对突触进行研究，关于抑郁症内侧前额叶内兴奋性突触数量的精确定量研究仍未见报道。因此本实验进一步运用新的无偏体视学方法对各组大鼠mPFC内兴奋性Sp^+兴奋性突触的数量进行了精确定量。研究发现，抑郁模型组大鼠大脑mPFC内Sp^+兴奋性突触数量为9.98×10^8，相较于对照组大鼠mPFC内Sp^+兴奋性突触数量（11.5×10^8）降低了13.22%。这表明慢性束缚应激介导的抑郁样行为可能与大鼠mPFC内的兴奋性突触的丢失有关，mPFC突触可塑性，特别是mPFC内兴奋性突触的可塑性降低可能是抑郁症发病的重要结构基础。

值得注意的是，突触的可塑性改变可能不仅参与抑郁症的发病机制，也可能与抗抑郁机制密切相关[8,39]。那么有效提升突触可塑性是否可能达到改善抑郁症状的效果，目前并不明确。作为简单有效的行为学干预手段，跑步锻炼可以有效改善患者的抑郁情绪[4]。但跑步锻炼的具体抗抑郁机制目前并不完全清楚。以往研究表明，跑步锻炼可以增加mPFC的体积，增强mPFC内神经元活动[17]。有研究发现，大脑动脉闭塞模型小鼠在跑步锻炼后缺血区域出现树突棘密度增加，突触可塑性增强[40]；正常大鼠在长期跑步锻炼后也出现海马和内嗅皮层内树突棘形态的改变和突触密度的增加[17]；而在慢性不可预知性应激抑郁模型动物的研究中发现，3周的跑步锻炼可以改善大鼠抑郁样行为的同时，也改善了mPFC锥体神经元棘突密度的降低和棘突形态的改变[41]。上述结果提示跑步锻炼可能对抑郁大脑突触具有保护作用。本研究对mPFC内兴奋性突触的研究结果也显示，在4周跑步锻炼后，相较于抑郁模型组，模型跑步组大鼠mPFC内PSD-95的密度低于抑郁模型组，模型跑步组的大鼠大脑mPFC内的Sp^+兴奋性突触密度也出现明显提高，提示跑步锻炼可能对抑郁症Sp^+兴奋性突触具有保护作用。这些结果与既往跑步锻炼保护mPFC内突触的研究结论相一致。之后进一步对跑步锻炼后的CRS抑郁模型大鼠mPFC内的兴奋性突触的数量进行精确定量研究。研究结果发现，在4周的跑步锻炼后，CRS抑郁模型组大鼠mPFC内的树突棘数量为11.3×10^8，高于CRS抑郁模型组大鼠（9.98×10^8），这提示跑步锻炼改善模型大鼠抑郁样行为可能与mPFC内兴奋性Sp^+突触数量的恢复有关。可以猜测，跑步锻炼可能通过增加mPFC内Sp^+兴奋性突触数量，保护mPFC的突触可塑性，实现了抗抑郁效果。

综上所述，本研究结果显示CRS模型大鼠出现抑郁样行为和mPFC内的Sp^+兴奋性突触数量减少，而跑步锻炼可改善这种改变。目前主要聚焦在mPFC内总的兴奋性突触的精确定量研究，关于跑步锻炼对抑郁症mPFC内各亚区兴奋性突触的影响及其可能的分子作用机制仍有待进一步研究。本研究进一步说明了跑步锻炼可能通过有效保护抑郁模型大鼠mPFC内兴奋性突触的数量改善抑郁模型大鼠的抑郁样行为，这可能是跑步锻炼抗抑郁的原因之一。本实验结果为进一步阐明跑步锻炼抗抑郁机制提供了可靠的数据基础和理论依据。

参 考 文 献

[1] Smith K. Mental health：a world of depression[J]. Nature，2014，515（7526）：181.

[2] Ménard C，Hodes GE，Russo SJ. Pathogenesis of depression：insights from human and rodent studies[J]. Neuroscience，2016，321：138-162.

[3] Klune CB，Jin B，DeNardo LA. Linking mPFC circuit maturation to the developmental regulation of emotional memory and cognitive flexibility[J]. Elife，2021，10：e64567.

[4] McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation：central role of the brain[J]. Physiol Rev，2007，87（3）：873-904.

[5] Salvadore G，Nugent AC，Lemaitre H，et al. Prefrontal cortical abnormalities in currently depressed versus currently remitted patients with major depressive disorder[J]. Neuroimage，2011，54（4）：2643-2651.

[6] Luo YM，Xiao Q，Wang J，et al. Running exercise protects oligodendrocytes in the medial prefrontal cortex in chronic unpredictable stress rat model[J]. Transl Psychiatry，2019，9（1）：322.

[7] Verpelli C，Montani C，Vicidomini C，et al. Mutations of the synapse genes and intellectual disability syndromes[J]. Eur J Pharmacol，2013，719（1/2/3）：112-116.

[8] Kang HJ，Voleti B，Hajszan T，et al. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder[J]. Nat Med，2012，18（9）：1413-1417.

[9] Feyissa AM，Chandran A，Stockmeier CA，et al. Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry，2009，33（1）：70-75.

[10] Duman RS. Neurobiology of stress，depression，and rapid acting antidepressants：remodeling synaptic connections[J]. Depress Anxiety，2014，31（4）：291-296.

[11] He HY，Shen WH，Zheng LJ，et al. Excitatory synaptic dysfunction cell-autonomously decreases inhibitory inputs and disrupts structural and functional plasticity[J]. Nat Commun，2018，9（1）：2893.

[12] Froemke RC. Plasticity of cortical excitatory-inhibitory balance[J]. Annu Rev Neurosci，2015，38：195-219.

[13] Dimeo F, Bauer M, Varahram I, et al. Benefits from aerobic exercise in patients with major depression: a pilot study[J]. Br J Sports Med, 2001, 35(2): 114-117.

[14] Dunn AL, Trivedi MH, Kampert JB, et al. Exercise treatment for depression: efficacy and dose response[J]. Am J Prev Med, 2005, 28(1): 1-8.

[15] Mather AS, Rodriguez C, Guthrie MF, et al. Effects of exercise on depressive symptoms in older adults with poorly responsive depressive disorder: randomised controlled trial[J]. Br J Psychiatry, 2002, 180: 411-415.

[16] Chen LM, Zhang AP, Wang FF, et al. Running exercise protects the capillaries in white matter in a rat model of depression[J]. J Comp Neurol, 2016, 524(17): 3577-3586.

[17] Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex[J]. Hippocampus, 2007, 17(11): 1017-1022.

[18] Yang LD, Wu CY, Li Y, et al. Long-term exercise pre-training attenuates Alzheimer's disease-related pathology in a transgenic rat model of Alzheimer's disease[J]. Geroscience, 2022, 44(3): 1457-1477.

[19] Coley AA, Gao WJ. PSD95: a synaptic protein implicated in schizophrenia or autism?[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018, 82: 187-194.

[20] Hao JD, Janssen WGM, Tang Y, et al. Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys[J]. J Comp Neurol, 2003, 465(4): 540-550.

[21] Chiba, Numakawa T, Ninomiya M, et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012, 39(1): 112-119.

[22] Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice[J]. Nat Protoc, 2018, 13(7): 1686-1698.

[23] Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, et al. Biological fate of low-calorie sweeteners[J]. Nutr Rev, 2016, 74(11): 670-689.

[24] Gebara E, Zanoletti O, Ghosal S, et al. Mitofusin-2 in the nucleus accumbens regulates anxiety and depression-like behaviors through mitochondrial and neuronal actions[J]. Biol Psychiatry, 2021, 89(11): 1033-1044.

[25] Hu CL, Luo Y, Wang H, et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185129.

[26] Ramaker MJ, Dulawa SC. Identifying fast-onset antidepressants using rodent models[J]. Mol Psychiatry, 2017, 22(5): 656-665.

[27] Cerqueira JJ, Pêgo JM, Taipa R, et al. Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors[J]. J Neurosci, 2005, 25(34): 7792-7800.

[28] Zhang JY, Liu TH, He Y, et al. Chronic stress remodels synapses in an amygdala circuit-specific manner[J]. Biol Psychiatry, 2019, 85(3): 189-201.

[29] Tse YC, Nath M, Larosa A, et al. Opposing changes in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function in response to acute and chronic restraint stress[J]. Front Mol Neurosci, 2021, 14: 716675.

[30] Yi JH, Jeon J, Kwon H, et al. Rubrofusarin attenuates chronic restraint stress-induced depressive symptoms[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(10): 3454.

[31] Bjørnebekk A, Mathé AA, Brené S. Running has differential effects on NPY, opiates, and cell proliferation in an animal model of depression and controls[J]. Neuropsychopharmacology, 2006, 31(2): 256-264.

[32] Greenwood BN, Foley TE, Day HE, et al. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons[J]. J Neurosci, 2003, 23(7): 2889-2898.

[33] Xiao K, Luo YM, Liang X, et al. Beneficial effects of running exercise on hippocampal microglia and neuroinflammation in chronic unpredictable stress-induced depression model rats[J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 461.

[34] Tang J, Liang X, Dou XY, et al. Exercise rather than fluoxetine promotes oligodendrocyte differentiation and myelination in the hippocampus in a male mouse model of depression[J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 622.

[35] Price RB, Duman R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(3): 530-543.

[36] Radley JJ, Sisti HM, Hao J, et al. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex[J]. Neuroscience, 2004, 125(1): 1-6.

[37] Shansky RM, Morrison JH. Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: effects of circuit, hormones and rest[J]. Brain Res, 2009, 1293: 108-113.

[38] Li CC, Liu B, Xu JY, et al. Phloretin decreases microglia-mediated synaptic engulfment to prevent chronic mild stress-induced depression-like behaviors in the mPFC[J]. Theranostics, 2023, 13(3): 955-972.

[39] Li WF, Ali T, He KW, et al. Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression[J]. Brain Behav Immun, 2021, 92: 10-24.

[40] Shen WM, Jin LQ, Zhu AQ, et al. Treadmill exercise enhances synaptic plasticity in the ischemic penumbra of MCAO mice by inducing the expression of Camk2a via $CYFIP_1$ upregulation[J]. Life Sci, 2021, 270: 119033.

[41] Zhuang PC, Tan ZN, Jia ZY, et al. Treadmill exercise reverses depression model-induced alteration of dendritic spines in the brain areas of mood circuit[J]. Front Behav Neurosci, 2019, 13: 93.

（责任编辑：曾　玲）