

针刺对脑卒中后抑郁模型大鼠行为学的影响^{*}

昌恩惠¹, 肖 伟^{2△}, 储浩然², 郭晓利², 章显宝², 汪 燕¹, 晏启禄¹

(1. 安徽中医药大学, 安徽合肥 230038; 2. 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽合肥 230061)

摘要: 目的 观察分析针刺百会、风府、神门、太冲穴对脑卒中后抑郁(Post-stroke depression, PSD)模型大鼠行为学、神经功能缺损以及体重的影响,为针灸治疗脑卒中后抑郁(PSD)提供科学的依据。方法 建立大脑中动脉线栓阻塞法(MCAO)模型复合慢性不可预知性应激抑郁症(CUMS)模型,观察各组大鼠体质量、敞箱实验以及糖水消耗实验的变化。结果 治疗后针刺组及药物组大鼠与模型组大鼠的体质量以及行为学评估结果相比,均有明显增加($P<0.05$);针刺组与药物组大鼠的体质量以及行为学评估结果相比,无差异($P>0.05$)。结论 针刺百会、风府、神门、太冲穴与盐酸氟西汀在治疗脑卒中后抑郁大鼠中均有效,且疗效相当。

关键词: 脑卒中后抑郁; 针刺; 行为学

中图分类号: R246.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)06-0001-03

脑卒中是严重危害人类健康的常见病、多发病,除引起多种躯体功能障碍外,还出现不同程度的认知和语言功能障碍,常导致一系列情感行为的变化和各种心理问题,其中抑郁是脑卒中后常见的心理障碍,称之为脑卒中后抑郁(PSD)。其发病率占脑卒中患者的 20%~50%,症状一般在脑卒中后 6 个月~2 年内最严重^[1],且以轻、中度抑郁多见^[2]。既往研究发现脑卒中后抑郁研究都集中在临床方面,但脑卒中后抑郁的基础研究相当薄弱,而本课题旨在观察分析针刺百会、风府、神门、太冲穴对脑卒中后抑郁(PSD)模型大鼠行为学、神经功能缺损以及体质量的影响,为针灸治疗脑卒中后抑郁(PSD)提供科学的依据。

1 材料

1.1 动物

安徽医科大学实验动物中心提供的 SPF 级健康成年 SD 大鼠 131 只,月龄 3~5 个月,雌雄各半,体质量(260 ± 40)g,采用敞箱实验(open-field)法对大鼠作行为学评分,选用得分(总分低于 30 分或高于 120 分的动物予以剔除)相近的 116 只大鼠。饲养期间给予大鼠标准颗粒饲料及纯净饮水。实验过程中

共死亡大鼠 71 只,死亡率约为 67%,剔除造模不成功大鼠 5 只,实际入组大鼠 40 只,每组各 10 只。

1.2 主要仪器设备

敞箱为 100cm×100cm×50cm 的木制无盖箱。壁为白色,底部黑色。用白线在底部划分为 25 个等格(10cm×10cm)。为北京友诚嘉业生物科技有限公司生产。

针刺大鼠固定架(自制),架台离地约 1.2m 高,架台上粘有多个相距约 30cm,约 15cm×8cm×8cm 的塑料块。

CHR-Ⅲ 双极电凝器:上海 Fisher 实验器材有限公司生产。

针灸针:华佗牌 0.20mm×13mm 不锈钢毫针。

1.3 药物

盐酸氟西汀胶囊由美国 Lilly 公司生产,20mg/粒。

10%水合氯醛溶液:上海泰正化工有限公司。

2 方法

2.1 模型制备

参照孙奕等^[3] 大脑中动脉线栓阻塞法模型制备,大鼠用 10%水合氯醛腹腔注射(3.5mL/kg)麻醉,

^{*} 基金项目:国家自然科学基金(NO:81273857)

收稿日期:2013-11-15 修回日期:2013-11-21

作者简介:昌恩惠(1988~),女,安徽铜陵人,在读硕士研究生,研究方向:针灸临床及作用机理。

△通信作者:肖伟, E-mail: xiaowei1216@gmail.com

制备大脑中动脉线栓阻塞法模型 (MCAO)^[4-6]。MCAO 模型大鼠在清醒后第 7 天,相继给予慢性温和不可预测应激处理,制备卒中伴抑郁的复合模型。慢性不可预知性应激抑郁症(CUMS)模型:参照 Willner^[7]等方法,将动物予以夹尾 1min、禁水 24h、禁食 24h、束缚 5min、昼夜颠倒 24h、电击、4℃冰水游泳 5min 等 7 种刺激方法。由于机体对同种强度的单一应激容易产生耐受性,因此本实验运用这 7 种不可预知的刺激方式以每天采取一种的频率交替应激大鼠 24h,共安排 3 周。

2.2 实验动物分组

实验共分为 4 组,分别为空白组、模型组、药物组及针刺组,每组 10 只大鼠。

(1)空白组:正常饲养,不作任何处理。于实验结束后脱臼处死。

(2)模型组:在造模成功后,正常饲养,不作其它任何处理。于实验结束后脱臼处死。

(3)针刺组:造模成功后第 3 天开始给予针刺治疗,每日 1 次,7d 为 1 个疗程,共 3 个疗程,每疗程之间休息 1d。于实验结束后脱臼处死。

(4)药物组:在造模成功后第 3 天后给予西药盐酸氟西汀。盐酸氟西汀是目前临床上广泛使用的抗抑郁药,主要作用机制为选择性抑制 5-HT 再摄取,按 2mg/kg 溶入生理盐水进行灌胃,1 次/d,7d 为 1 个疗程,共 3 个疗程,每疗程之间休息 1d。于实验结束后脱臼处死。

2.3 指标观测与方法

2.3.1 一般状况观察

每天观察各组大鼠的精神状况;进食、饮水情况;大便质地;颈部切口是否有化脓表现、是否有死亡大鼠,记录死亡时间并作尸解以查明死因;每周复测一次体质量并记录。

2.3.2 大鼠神经功能缺损评分

造模成功后及治疗疗程结束后,均由一不了解分组情况的观察者评估记录神经行为学评分,参考 Longa 评分^[8]方法,进行 5 分制评分。评分标准:0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸直对侧前爪;2 分:右前肢阻力减小,行走偏右侧;3 分:向右侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。

评定时间:在 MACO 模型建立后以及开始治疗后第 7,15,22 天。

2.3.3 大鼠行为学观察

(1)糖水消耗实验

所有大鼠首先训练饮用 10g/L 蔗糖水,即在开始的 48h 内用 10g/L 蔗糖水代替自来水,接着禁水禁食 20h,然后给予 10g/L 蔗糖水饮用并计算 24h 的饮用量。

评定时间:在 PSD 模型建立前以及开始治疗后第 7,15,22 天。

(2)敞箱实验

敞箱为 100cm×100cm×50cm 的木制无盖箱。壁为黑色。用白线在底部划分为 25 个等格(10cm×10cm)。沿墙格称外周格,其余为中央格。实验室内为暗光,在中央格上方 150cm 处放一 50W 白炽灯照明,实验过程中伴有噪声。每次放入 2 只大鼠在正中格中,然后进行观察大鼠在中央格内停留的时间、方格间穿行次数、竖起修饰次数。有两位评定者,分别评定一只大鼠在 5min 内的活动情况,每次实验后需将排泄物彻底清除。

评定指标:大鼠在 5min 内在中央格内停留的时间。方格间穿行次数:3 只爪以上跨入邻格的次数。竖起修饰次数:两前肢离地 1cm 以上的次数。总分低于 30 分或高于 120 分的动物予以剔除。

评定时间:在 PSD 模型建立前以及开始治疗后第 7,15,22 天。

2.4 针刺方法

参照《实验针灸学》大鼠穴位定位方法进行取穴,选取百会、风府、神门、太冲。将大鼠轻轻地放置在自制的固定架上(架台离地约 1.2m 高,架台上粘有多个相距约 30cm,约 15×8×8cm 的塑料块,大鼠因恐高会蹲在木质架台的木块上,不需要捆绑或注射麻醉药,可以避免大鼠挣扎、跑动),动物保持清醒安静状态。选用华佗牌 0.20×13mm 不锈钢毫针,百会穴斜刺进针,其余穴位均垂直进针,进针深度约 5mm,轻度捻转,留针 20min,期间行针 1 次。每日 1 次,7d 为 1 个疗程,共 3 个疗程,每疗程间隔 1d。

2.5 统计学方法

(1)数据管理:专人采集,录入数据。实验完成后将已录入的数据文件妥善保存,以便进行监控、核查。

(2)数据分析:对采集到的数据进行统计处理,

方法是:采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA)。

3 结果

在 MACO 模型建立 2h,大鼠清醒后进行神经功能缺损评分,各构造模大鼠的 Longa 评分均在 1~3 分,24h 后大鼠神经功能缺损基本恢复正常,Longa 评分均为 0 分,说明大鼠在手术麻醉清醒

后出现了病灶对侧肢体轻度功能障碍。治疗后各实验组与模型组大鼠的体质量以及行为学评估结果相比,各组大鼠体质量,敞箱水平活动,垂直活动得分和糖水消耗量都有明显增加($P<0.05$),但针刺组与药物组未见明显差异,说明针刺组与药物组治疗脑卒中后抑郁大鼠均有效,但差异不明显(见表 1)。

表 1 治疗后各实验组与模型组大鼠体质量以及行为学评估结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量/g	敞箱水平活动得分/分	敞箱垂直活动得分/分	糖水消耗实验/g
空白组	10	337.79 $\pm$ 94.40	64.00 $\pm$ 22.40	13.50 $\pm$ 5.02	78.50 $\pm$ 27.91
模型组	10	263.40 $\pm$ 40.90 [△]	40.10 $\pm$ 13.74 [△]	6.70 $\pm$ 4.99 [△]	40.90 $\pm$ 15.79 [△]
针刺组	10	335.04 $\pm$ 57.78 [▲]	65.20 $\pm$ 31.07 [▲]	12.90 $\pm$ 5.53 [▲]	63.50 $\pm$ 17.05 [▲]
药物组	10	329.79 $\pm$ 54.30 ^{▲#}	6.10 $\pm$ 32.15 ^{▲#}	15.10 $\pm$ 7.23 ^{▲#}	69.20 $\pm$ 18.27 ^{▲#}

注:与空白组相比,[△] $P<0.05$;与模型组相比,[▲] $P<0.05$;针刺组与药物组相比,[#] $P>0.05$

4 讨论

PSD 的生物学机制尚不明确,目前有两种主要观点:一种认为 PSD 主要由社会心理应激所致,另一种认为 PSD 的发生与大脑缺血损害后的神经生物学改变有关。而本实验则是通过大脑中动脉线栓阻塞法造成局灶性脑缺血后制备慢性不可预知性应激抑郁症模型的 PSD 复合模型来观察大鼠行为学、神经功能缺损以及体重的变化。

目前,局灶性脑缺血大鼠神经功能的评定主要是依靠 Longa5 分法将大鼠神经功能缺陷用量化的分级方法予以评定,而大脑中动脉线栓阻塞法制备的局灶性脑缺血模型,Longa5 分法显示脑卒中大鼠在 24h 内出现显著的神经功能缺陷,24h 后神经功能缺陷不显著,趋于正常水平。已有研究认为抑郁症的快感缺失、兴趣缺乏、精神运动性迟缓等症状,与中枢神经系统的奖赏系统(reward system)功能受损有关,提示各治疗方法可能通过改善奖赏系统功能而达到作用。慢性不可预知性应激抑郁症(CUMS)模型主要模拟了人类抑郁症的核心症状,对奖赏的反应性下降,即快感缺乏。而快感缺失的测量,即糖水消耗实验则作为模型是否成功的关键。敞箱实验行为评定是检测大鼠在新异环境中的启动、探究行为、紧张恐惧状态和对新环境的警觉性。水平运动减少反应了动物的活动度的情况,垂直运动反应了动物对新鲜环境的好奇程度。

本实验中,治疗后针刺组及药物组大鼠敞箱水平活动,垂直活动得分和糖水消耗量均较模型组大鼠有所增加,接近空白组大鼠。盐酸氟西汀治疗脑卒中后抑郁的疗效是肯定的,针刺治疗法亦有效,但本实验旨在研究针刺治疗卒中后抑郁,但行为学评估结果并没有突出针刺疗效,待课题中形态学以及神经递质受体 PCR 芯片等实验结束后,再进一步观察针刺对脑卒中后抑郁的疗效。

参考文献

- [1] Fruhwald S, Löffler H, Baumhackl U, et al. Depression after cerebro-vascular injury: review and differentiation from other psychiatric complications[J]. Fortschr Neurol Psychiatr, 1999, 67(4): 155-162.
- [2] 龙洁,刘永珍,蔡焯基,等. 卒中后抑郁状态的发生率及相关因素研究[J]. 中华神经科杂志, 2001, 34(3): 145-148.
- [3] 孙奕,张志珺,王少华,等. 卒中后抑郁大鼠模型的建立及评估[J]. 中国卒中杂志, 2007, 2(11): 891-894.
- [4] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T. Experimental studies of ischemic brain edema: 1—a new experimental model of cerebral embolism in rats in which re-circulation can be introduced in the ischemic area. Jpn. J. Stroke, 1986(8): 1-8.
- [5] 陈春富,李劲松. 栓线法大鼠局灶性脑缺血模型的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1996, 13(1): 18-19.
- [6] Wang CX, Yang Y, Yang T, et al. A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation. Brain Res. [J]. Brain Res Protoc, 2001, 7(2): 115-120.

(下转第 6 页)

Scifinder 检索后得知,该化合物 3 为新化合物。化合物 1,2,4 均为已知成分,其的 NMR 波谱数据与文献^[6]一致。

参考文献

- [1] 徐冬英. 三七名称及其有文字记载时间的考证[J]. 广西中医学院学报, 2000, 17(3): 91.
- [2] Ye ZG, Xue BY, Dai BQ, et al. Comparative study on pharmacological action of ginseng saponins and notoginseng saponins[J]. China J Chinese Medicinal Information, 1996, 3(5): 11-14.
- [3] 张春红, 李向高, 张连学, 等. 人参二醇衍生物抗肿瘤活性

- 比较的初步结果[J]. 中国天然药物, 2004, 2(6): 369-371.
- [4] 邹澄, 赵庆, 郝小江, 等. 丰产易得天然产物结构改造值得重视[J]. 中国民族民间医药杂志, 2004(3): 135-137.
- [5] 浦湘渝, 张荣平, 邹澄. 不同产地三七总皂甙的含量研究[J]. 云南中医中药杂志, 2001, 22(4): 36.
- [6] 黄兹英, 赵声定, 邹澄, 等. 三七原人参三醇型总皂苷和人参三醇的 4 个衍生物的合成研究 [J]. 昆明医学院学报, 2011(11): 10-12.
- [7] 邵曰凤, 赵庆, 邹澄, 等. 三七原人参三醇型总皂苷的琼斯氧化[J]. 中国民族民间医药杂志, 2009, 17: 33-34.

(编辑: 迟越)

Research of Oxidation Reaction of Panaxadiol and Panaxatriol

CAO Qing-qing¹, ZOU Cheng², HU Jian-lin², LIANG Ning-jia², DONG Cheng-mei²,
PU Hong², ZHAO Qing², CHEN Hai-feng²

(1. Faculty of pharmacy, Yunnan university of Traditional Chinese Medical, Kunming Yunnan 650200, China;
2. School of Pharmaceutical Sciences, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

ABSTRACT: Objective To research the oxidation reaction of panaxadiol and panaxatriol from panax notoginseng. **Methods** Panaxadiol and panaxatriol were oxidized by PCC and DDQ, respectively. **Results** Four derivatives (compound 1~4) were obtained. **Conclusion** The four compounds are easy to obtain with relatively higher yeild, which provided a good pathway to obtain compound 3 and 4. Compound 3 was a new compound.

KEY WORDS: panax notoginseng; panaxadiol; panaxatriol

(上接第 3 页)

- [7] Willner P. Animal models of depression. an overview[J]. Pharmacol Ther, 1990, 45(3): 425-455.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible mid-

dle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91

(编辑: 迟越)

The Effects of Manipulating Needles Points on the Behaviors of the Rat Models with Post-stroke Depression

CHANG En-hui¹, XIAO Wei², CHU Hao-ran², GUO Xiao-li²,
ZHANG Xian-bao², WANG Yan¹, YANG Qi-lu¹

(1. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei Anhui 230038, China;
2. The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei Anhui 230061, China)

ABSTRACT: Objective By observation and analysis of the effects of manipulating needles in Baihui, Fengfu, Shenmen and Taichong points on the behaviors, neurological deficits and weights of the rat models with post-stroke depression, to provide scientific evidence for acupuncture of post-stroke depression. **Methods** Establishing of MCAO models and CUMS models in minds of rats, observing the weights of rats and the changed results of the open field tests and sucrose consumption tests. **Results** After the treatments, comparing to the results of rats in model group, the weights and the behavioural assessments of rats in acupuncture group and medical group increase markedly ($P < 0.05$); while the behavioural assessments of rats between acupuncture group and medical group are still same ($P > 0.05$). **Conclusion** Acupuncture of Baihui, Fengfu, Shenmen and Taichong points and Fluoxetine Hydrochloride are both have clinical efficacies, and the efficacies are equivalent.

KEY WORDS: PSD; acupuncture; behavioural science