

穴位注射一氧化氮供体对慢性应激抑郁模型小鼠的影响

侯 鹏, 谢丹庶(上海交通大学医学院 200025)

【摘要】 目的 探究针刺治疗抑郁症是否与局部产生一氧化氮有关。方法 慢性应激抑郁模型 C57BL/6 小鼠取百会、双侧肾俞、心俞、后三里、内关、三阴交穴位, 设立一氧化氮供体治疗组、麻醉对照组、生理盐水对照组。每周一次在麻醉状态下, 一氧化氮供体治疗组向以上穴位注射一氧化氮供体, 生理盐水对照组向以上穴位注射生理盐水, 麻醉对照组仅进行麻醉。连续治疗 5 周后作为行为学测试。结果 在开场测试、强迫游泳实验、悬尾实验中三组间各项指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 5 周的穴位注射一氧化氮供体治疗对小鼠抑郁症状没有明显的缓解作用。

【关键词】 一氧化氮供体; 穴位注射; 抑郁症; 疾病模型, 动物; 应激

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.18.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)18-2194-02

Influence of nitric oxide donor by acupoint injection on model mice with chronic distress depression HOU Peng, XIE Dan-shu (Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Objective To investigate whether the acupuncture for treating depression is related to the local production of nitric oxide. **Methods** Chronic distress depression model C57BL/6 mice were randomly divided into nitric oxide donor group, anesthetic control group and normal saline control group. Under anaesthesia, the nitric oxide donor group was weekly injected with nitric oxide donor at specific points (GV20, and SP6, BL23, BL15, ST36 and PC6 on both sides), while the normal saline group was injected with the normal saline at the same points. Meanwhile, the anesthetic group was just anesthetized. The behavior tests were performed after 5-week treatment. **Results** No significant differences were found in open field test, forced swim test and tail suspension test among the three groups. **Conclusion** 5 week nitric oxide donor treatment by acupoint injection has no apparent relieving effect on depression.

【Key words】 nitric oxide donors; injection in points; depressive disorder; disease models, animal; stress

抑郁症是一种常见的精神疾病, 目前该病的常规治疗主要以各类西药治疗为主, 但不少研究均发现, 虽然药物治疗有效, 但同时会出现药物依赖和心慌、嗜睡、头晕、口干、视力模糊等诸多不良反应^[1]。而针灸有疗效好、不良反应小的特点^[2], 故抑郁症的针灸治疗已引起国内外的普遍关注。不少研究表明, 针刺可以在穴位处产生一氧化氮(NO)。NO 具有舒张血管、抑制血小板聚集等作用。针灸刺激诱生的 NO、活性氧和应激蛋白可以通过细胞的应激应答与基因表达的调节而产生显著的治疗效果^[3]。本实验旨在观察穴位注射 NO 供体 S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(SNAP)对慢性应激抑郁模型小鼠抑郁样行为的影响, 判断针刺治疗抑郁症是否与穴位处产生的 NO 有关。

1 材料与方

1.1 实验动物 雄性 C57BL/6 小鼠, 于 5 周龄按标准实验动物饲养, 行为学测试均在每日的 12:00~24:00 进行。

1.2 实验仪器

1.2.1 开场实验(open field test, OFT)测试系统 采用动物行为学分析软件对该视频进行分析而获得数据。

1.2.2 强迫游泳测试(forced swim test, FST)系统 采用人工计时的方式获得实验数据。

1.2.3 悬尾测试(tail suspension test, TST)系统 使用强迫游泳装置, 采用人工计时的方式获得实验数据。

1.2.4 场景恐惧测试系统 购自 Coubourn 公司(美国)场景恐惧测试系统, 用于对实验小鼠给予电刺激。

1.3 实验试剂

1.3.1 注射用器材 注射针头: Disposable Dental Needles(30 G, 购自日本森田株式会社), 医用硅橡胶管(1.0 mm ×

1.2 mm), 微量注射器(5 μ L)。

1.3.2 注射用药品 麻醉剂: 戊巴比妥钠; NO 供体: SNAP (购自 Sigma 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 慢性不可预知刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)造模 使用 CUMS 对小鼠进行造模, 即给予小鼠长期的、温和的刺激来模拟人抑郁症发生的过程。对所有小鼠进行连续 4 周的随机刺激, 每天 1 次, 每种刺激至少实验 2 次。具体刺激方法: (1) 倾斜笼子, 将鼠笼一边抬起, 与地面呈约 40°角放置于实验地面, 24 h 后还原。(2) 湿垫料, 向干净、干燥的垫料注入清水, 直至其达饱和, 将小鼠放入其中, 放回动物房, 24 h 后将其从中取出并放回干燥的鼠笼正常饲养。(3) 冷水强迫游泳, 将小鼠放入水温(12 \pm 1)°C、水深为(21 \pm 1)cm 的容器中, 4 min 后取出, 用暖风将其吹干后放回鼠笼。(4) 夹尾, 用夹子夹住小鼠距尾根 3~4 cm 处并将夹子固定, 1 min 后取下夹子将小鼠放回鼠笼。(5) 噪声, 将实验小鼠放在 60 cm × 55 cm × 65 cm 的箱子中, 给予背景噪声 100 dB, 每间隔 15 s 给一次 0.5 s 的白噪声(108 dB)或者 0.5 s 的高音(106 dB)。白噪声共给予 40 次, 高音 36 次, 二者随机排序。(6) 电刺激, 用场景恐惧测试系统对小鼠进行电刺激, 每 30 秒给予一次 50 ms 的电刺激, 电流强度为 2 mA, 共刺激 7 次, 实验总时间 240 s。(7) 断水, 不供水 24 h。(8) 断粮, 不提供食物 48 h。(9) 悬尾, 用胶布一头固定于小鼠尾 1/2 处, 另一头固定于 2 m 的高架上 5 min 后取下。

为了验证造模 4 周可以造成实验小鼠行为上的差异, 预先单独对两组小鼠进行了抑郁症造模有效性的探究实验。造模

组连续接受 4 周不可预知性刺激,对照组正常饲养。

1.4.2 行为学测试 每天只进行一种行为学测试。实验前将小鼠放在实验室 30 min 以上后开始实验。

1.4.2.1 OFT 该测试通常用于对啮齿类动物的自发行^[4]的测试。实验时将小鼠放入 OFT 测试系统,记录其站立次数(其两只前脚离地并回到地面算站立一次),5 min 后停止记录并将其从测试箱取出,将测试箱彻底清洗后开始下一实验。

1.4.2.2 FST 本实验用于测试小鼠行为绝望时抑郁特征行为^[5]。实验分 2 d 进行。第 1 天使小鼠适应环境。将 FST 测试系统中水温设定为 25 ℃,每只小鼠放入水中 5 min 后取出。第 2 天进行 FST 测试。将 FST 系统内水温设定为 25 ℃,每只小鼠放入水中 5 min 后取出,用行为学软件记录小鼠的活动情况。重复进行下一实验。人工记录小鼠在 FST 中的不动时间(以小鼠两后肢不动作为不动的标志)。

1.4.2.3 TST 实验时将小鼠尾悬于悬尾杆上,同时利用 TST 系统开始记录小鼠活动情况,7 min 后换下一只鼠进行测试。所有实验结束后分析其不动时间以及向上次数。

1.4.3 穴位注射 SNAP 治疗 在麻醉状态下对小鼠进行治疗。每只小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉。SNAP 治疗组麻醉后对每只小鼠进行 SNAP(0.25%)注射,根据《实验针灸学》鼠穴位图谱选取百会,双侧肾俞、心俞、后三里、内关、三阴交共 11 个穴位。用微量注射器向每只小鼠三阴交、内关注射 SNAP 3 μL,其余穴位注射 5 μL。生理盐水对照组小鼠麻醉后在相应穴位注射等体积生理盐水。麻醉对照组小鼠麻醉后不作任何处理。将实验分为两部分,CUMS 造模部分(4 周)和 SNAP 治疗部分(5 周),其中治疗在造模完成后进行,治疗期间同时保持刺激。分别于抑郁症造模 4 周后和治疗 5 周后对小鼠进行行为学测试。

1.5 统计学处理 实验中均采用 Sigma Plot10.0 作图并用 Sigma Stat3.5 对数据进行处理。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用方差分析(Anova),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 抑郁症造模的有效性及其持续性 测试结果表明,开场测试中小鼠的总路程[造模组: $n=4$, (748.605±133.865)cm;对照组: $n=4$, (1 535.737±296.247)cm]、站立次数[造模组: $n=4$, (7.250±1.850)次;对照组: $n=4$, (24.250±5.184)次]、强迫游泳实验中小鼠的不动时间[造模组: $n=4$, (253.840±7.293)s;对照组: $n=4$, (110.470±39.436)s],悬尾实验中不动时间[造模组: $n=4$, (343.750±9.403)s;对照组: $n=4$, (233.000±10.595)s]、向上次数[造模组: $n=4$, (9.000±0.972)次;对照组: $n=4$, (49.250±3.303)次]两组相比差异均存在统计学意义($P < 0.05$),即在 4 周的连续不可预知性刺激后,造模组和对照组行为存在明显差异,说明抑郁症造模成功。

造模完成后不对两组小鼠作任何处理,4 周后再次对造模小鼠和对照组进行开场测试。该测试中总路程[造模组: $n=4$, (576.862±88.458)cm;对照组: $n=4$, (992.465±107.761)cm]两组差异有统计学意义($P < 0.05$),但站立次数[造模组: $n=4$, (5.25±0.893)次;对照组: $n=4$, (10.5±2.136)次]两组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明造模完成后,对造模组小鼠的正常饲养会使其抑郁症状减轻。

2.2 穴位注射 SNAP 对抑郁症治疗的有效性

2.2.1 开场测试 在 4 周 CUMS 造模后,三组小鼠在总路程[SNAP 治疗组: $n=7$, (1 877.101±93.990)cm;麻醉对照组:

$n=6$, (1 765.602±52.701)cm;生理盐水对照组: $n=6$, (1 722.820±152.149)cm; $F(2, 16) = 0.489$]、站立次数[SNAP 治疗组: $n=7$, (18.714±2.048)次;麻醉对照组: $n=6$, (20.667±3.935)次;生理盐水对照组: $n=6$, (19.000±4.466)次; $F(2, 16) = 0.075$]差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

治疗 5 周后,三组小鼠在总路程[SNAP 治疗组: $n=6$, (1 238.430±142.871)cm;麻醉对照组: $n=6$, (1 406.805±77.185)cm;生理盐水对照组: $n=5$, (1 375.684±93.575)cm; $F(2, 14) = 0.569$]、站立次数[SNAP 治疗组: $n=6$, (16.833±3.862)次;麻醉对照组: $n=6$, (15.833±2.033)次;生理盐水对照组: $n=5$, (15.600±4.143)次; $F(2, 14) = 0.031$]差异均无统计学意义($P > 0.05$)。说明 5 周治疗并未明显改变 CUMS 抑郁模型小鼠在开场测试中的行为。

2.2.2 强迫游泳实验 在 4 周 CUMS 造模后,三组小鼠在不动时间[SNAP 治疗组: $n=7$, (152.000±28.737)s;麻醉对照组: $n=6$, (172.667±24.539)s;生理盐水对照组: $n=6$, (140.833±26.397)s; $F(2, 16) = 0.409$, $P > 0.05$]上差异无统计学意义。

治疗 5 周后,三组小鼠在不动时间[SNAP 治疗组: $n=6$, (162.833±16.531)s;麻醉对照组: $n=6$, (154.333±24.246)s;生理盐水对照组: $n=5$, (132.200±32.032)s; $F(2, 14) = 0.330$, $P > 0.05$]上差异无统计学意义。说明 5 周治疗并未明显改变 CUMS 抑郁模型小鼠在强迫游泳实验中的行为。

2.2.3 悬尾实验 在 5 周治疗后,三组小鼠在不动时间[SNAP 治疗组: $n=6$, (241.833±19.165)s;麻醉对照组: $n=6$, (209.000±31.192)s;生理盐水对照组: $n=5$, (204.400±33.345)s; $F(2, 16) = 0.441$]、向上次数[SNAP 治疗组: $n=6$, (13.333±2.642)次;麻醉对照组: $n=6$, (9.333±3.388)次;生理盐水对照组: $n=5$, (56.400±1.734)次; $F(2, 14) = 1.267$]上差异均无统计学意义($P > 0.05$)。说明 5 周治疗并未显著改变 CUMS 抑郁模型小鼠在悬尾实验中的行为。

3 讨 论

本研究通过测试观察在穴位注射 SNAP 是否会对 CUMS 抑郁模型小鼠的抑郁程度有所改善,从而探究针刺治疗抑郁症是否与局部产生 NO 有关。

3.1 CUMS 造模 CUMS 模型作为一个最有前途和价值的抑郁症模型,已被广泛用于探究抑郁症的病理生理以及相关的干预治疗效果观察^[6]。不少研究人员采用 3 周及以上的时间进行 CUMS 造模。本实验选择对小鼠进行连续 4 周的随机刺激,通过小鼠进行测试发现:(1)CUMS 对抑郁症造模有效;(2)停止刺激 4 周后抑郁样行为减轻。

3.2 穴位选择 百会穴为百脉之会,百病所主,是治疗多种疾病的首选穴位,为临床常用穴之一。中医认为抑郁症与内脏功能失调有密切关系,故本实验取心俞和肾俞穴达到静心安神、补肾健脾的作用。现代医学研究证实,针灸刺激足三里穴在神经系统方面可促进脑细胞功能恢复,提高大脑皮层细胞的工作能力^[7]。内关为人体手厥阴心包经上的重要穴道之一。三阴交为肝、脾、肾三者经脉交汇处,经常按揉此穴对肝、脾、肾有保健作用。

3.3 穴位注射 SNAP 注射 SNAP 可使局部 NO 浓度升高,故该试剂常被用作 NO 供体。采用穴位注射 SNAP 代替针刺在穴位产生 NO,借以研究针刺治疗抑郁症的机制是否与针刺时穴位产生 NO 有关。 (下转第 2198 页)

热稳定性没有显著影响。

3.1.2 NBT 和表面活性剂对线性和热稳定性有显著影响, NaN_3 对结果影响不显著, 但是比另外几项因素影响略显著。本次 PB 试验模型显著, 但是失拟现象也比较严重, 因此需要进一步拟合, 在这种精确度不高的情况下, 应该在 PB 及以后的试验中考虑 NaN_3 的影响。

3.2 响应面试验结果表明 (1) 在当前考查水平内, 3 个因素之间没有显著的交互作用, 模型为二次非线性模型。(2) NaN_3 主要的作用是抗菌剂, 可防止试剂中有微生物繁殖, 优化后的加量为 0.55 g/L, 本实验通过无菌培养, 没有发现试剂中有微生物, 因此这个加量是可行的。(3) 不同配方检测结果的线性 r 很接近, 为了使响应变化更明显, 本实验在 PB 设计和响应面设计时对响应值进行了不同的处理。PB 设计时, 响应值取线性 r 的 10 次幂, 在响应面设计时, 响应值 $Y = (r^2 - 0.99) \times 1000$ 。(4) 在实验过程中发现是否添加胆酸盐和尿酸酶效果不显著, 因此本实验在响应面设计过程中没有添加这两个因子, 但这两个因子或许对试剂的其他方面有影响, 这将在以后的试验中进行分析 and 验证。(5) 从反应原理看, 关键反应物是 NBT, 其添加量达到完全反应的加量后, 不应该对试剂的线性产生影响, 但是本试验却证明, 当其添加量超过某一数值时, 平方项的影响将越来越明显, 使试剂的线性下降, 导致这一现象的原因可能是多方面的, 如底物抑制等。

3.3 比对分析 通过与国外某试剂进行比对分析, 结果表明, 经过配方调整的试剂检测结果与进口试剂有很高的相关性 ($r=0.998$), 证明用优化的配方配制的试剂在某些检测性能上达到了同类产品的要求。

综上所述, 本产品属于体外诊断试剂, 要保证其分析方法和分析过程的高特异性、高准确性、可重复性及长期稳定性, 仍

需要进行长期和大量的实验研究。本次实验使果糖胺试剂盒的检测线性明显提高, 说明利用 PB、爬坡和 RSM 等试验设计可以提高工作效率和保证试验结果的可靠性。

参考文献

[1] 韩志钧, 黄志峰, 卢业成, 等. 临床化学常用项目自动分析法[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2005.
 [2] Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein: an index of diabetic control[J]. Clin Chim Acta, 1983, 127 (1): 87-95.
 [3] 钟飞燕, 余斌杰, 曲颖蕃, 等. 果糖胺测定方法影响因素探讨[J]. 中山医科大学学报, 1994, 15(4): 311-315.
 [4] 钟飞燕, 余斌杰, 陈志勇. 自动化测定果糖胺实验条件与方法学评价[J]. 中山医科大学学报, 1994, 15(2): 146-149.
 [5] 李洪臣, 沈轶, 朱双珠, 等. 血清果糖胺的试验研究及临床应用[J]. 综合临床医学, 1993, 9(4): 201-203.
 [6] 任露泉. 回归设计及其优化[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 15.
 [7] Montgomery DC. Design and analysis of experiments[M]. USA: Wiley, 2004: 405.
 [8] 张秀云, 徐辉, 李才. 果糖胺测定标准参照物的合成及果糖胺测定的临床意义[J]. 吉林医学, 2003, 24(3): 217-218.

(收稿日期: 2011-04-18)

(上接第 2195 页)

3.4 行为学测试 CUMS 模型小鼠主要表现为快感缺失, 但研究表明, CUMS 模型小鼠在其他方面也有抑郁行为, 如探索性行为减少、睡眠障碍^[8] 以及行动迟缓等^[9]。因此, 造模后的小鼠, 在开场测试、强迫游泳实验和悬尾实验中的行为与正常未造模小鼠有明显差异。

根据对穴位注射 SNAP 有效性的探究实验, 在造模后、治疗前, 三组造模小鼠之间差异无统计学意义。在此前提下分别对三组造模小鼠进行 5 周 SNAP 治疗、麻醉、生理盐水注射, 结果三者开场测试、强迫游泳实验、悬尾实验中差异均无统计学意义。因此, 可以得出结论, 在百会、双侧肾俞、心俞、后三里、内关、三阴交 11 个穴位进行 5 周注射相应剂量(三阴交、内关注射 SNAP 实验, 3 μL , 其余穴位注射 5 μL) 的 SNAP 对 CUMS 抑郁模型小鼠无治疗效果, 即该实验证明穴位处产生 NO 不是针刺治疗抑郁症的机制。

(此实验全部在上海交通大学生命科学技术学院李胜天副教授的实验室完成, 指导老师是李胜天和王婷。其中关于穴位治疗的部分因为需要较深的专业知识和技能, 所以是由王婷老师完成。在此表示感谢!)

参考文献

[1] 郭章华. 刘公望教授针灸治疗抑郁症经验[J]. 上海针灸杂志, 2008, 27(5): 1-2.
 [2] 程坤, 颜红, 段可杰. 针灸治疗抑郁症的临床与机理研究进展[J]. 中国针灸, 2005, 25(3): 48-50.
 [3] 张志军. 一氧化氮、活性氧与针灸治疗——针灸刺激引起

的细胞应激应答与基因转录调节[J]. 国外医学: 中医中药分册, 2001, 23(5): 272-277.

[4] Blokland A, Lieben C, Deutz NE. Anxiogenic and depressive-like effects, but no cognitive deficits, after repeated moderate tryptophan depletion in the rat[J]. J Psychol, 2002, 16(1): 39-49.
 [5] 王艳, 刘继文, 连玉龙. 抑郁模型大鼠海马 S100 β 蛋白的表达研究[J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(1): 16-18.
 [6] Mao QQ, Xian YF, Sui PL, et al. Long-term treatment with peony glycosides reverses chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior via increasing expression of neurotrophins in rat brain[J]. Behav Brain Res, 2010, 210: 171-177.
 [7] 朱小波, 沈莉. 卡介菌多糖核酸穴位注射对反复呼吸道感染患儿 120 例临床疗效观察[J]. 河北医学, 2006, 12(12): 1298-1299.
 [8] Cheeta S, Ruigt G, van Proosdij J, et al. Changes in sleep architecture following chronic mild stress[J]. Biol Psychiatry, 1997, 41: 419-427.
 [9] D'Aquila PS, Brain P, Willner P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression[J]. Physiol Behav, 1994, 56: 861-867.

(收稿日期: 2011-03-10)