

· 研究报告 ·

肝郁脾虚证大鼠双侧DG区微量注射BDNF后行为变化及逍遥散有效部位的调节作用

岳利峰¹, 刘玥芸², 解华², 霍素坤², 高珊珊², 奚胜艳³, 黄英恒², 严志祎², 焦海燕², 王婷晔²,
谷浩荣², 赵彪², 王琦⁴, 陈家旭²

(¹北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; ²北京中医药大学, 北京 100029;
³厦门大学医学院, 厦门 361005; ⁴北京工商大学, 北京 102401)

摘要: 目的: 从行为学角度探讨逍遥散有效部位治疗肝郁脾虚证的调节机制。方法: 60只雄性SD大鼠随机等分为5组: 正常组、模型组、假手术组、脑源性神经营养因子(BDNF)组、逍遥散组。以21d慢性束缚应激方法塑造大鼠肝郁脾虚证模型, 在此基础上, 运用脑立体定位仪埋管微量注射BDNF塑造BDNF组。逍遥散组造模方法和BDNF组尽可能相似, 突出逍遥散有效部位和BDNF二者干预的可比性, 第1、7、14、21天分别比较BDNF组和逍遥散组反映行为变化的各项指标变化趋势是否一致。结果: 模型组大鼠逐步呈现肝郁脾虚证表现; 假手术组大鼠开始呈现焦虑状态, 第14-21天, 逐步和模型组行为表现趋同; BDNF组起到干预治疗作用, 大鼠焦虑状态得到抑制; 逍遥散组大鼠表现自然, 逍遥散有效部位起到较好的调节作用。排除了手术创伤等混杂因子, 逍遥散组和BDNF组经过21d治疗后穿格数、站立次数、修饰次数变化趋势逐步相似。结论: 逍遥散有效部位和BDNF可能有一条作用通路相似, 即可能均通过BDNF信号通路来治疗肝郁脾虚证。

关键词: 逍遥散有效部位; 脑源性神经营养因子; 行为学; 肝郁脾虚证; 调节机制; 海马齿状回

基金资助: 国家自然科学基金青年基金项目(No.81302960)

Behavior changes of rats with syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency after injecting microcrystalline BDNF in bilateral DG areas and regulation of active fraction of Xiaoyao Powder

YUE Li-feng¹, LIU Yue-yun², XIE Hua², HUO Su-kun², GAO Shan-shan², XI Sheng-yan³,
HUANG Ying-heng², YAN Zhi-yi², JIAO Hai-yan², WANG Ting-ye²,
GU Hao-rong², ZHAO Biao², WANG Qi⁴, CHEN Jia-xu²

(¹Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; ²Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; ³Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China;
⁴Beijing Technology and Business University, Beijing 102401, China)

Abstract: Objective: To explore the mechanism of active fraction of Xiaoyao Powder in treating rats with syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency. Methods: Sixty SD male rats were randomly divided into 5 groups as control group, model group, sham-operation group, BDNF group and Xiaoyao Powder group. The rat models with syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency were established by using method of chronic immobilization stress (CIS) for 21 days. On the basis, rats in BDNF group received injection with microcrystalline BDNF in bilateral DG areas with the help of stereotaxic apparatus. The model establishing methods of Xiaoyao Powder and BDNF groups were as similar as possible, in order to highlight the comparability in intervention between active fraction of Xiaoyao Powder and BDNF. The variation trend of behavior indicators of rats in Xiaoyao Powder group and BDNF group was compared on the 1st, 7th, 14th, and 21st day. Results: The symptoms of 'syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency' appeared progressively in rats of the model group. Rats in sham-operation group were in anxiety states at the beginning, and the symptoms were basically the same with model group from the 14th to 21th day. Anxiety state of rats in BDNF group was inhibited. The behaviors of rats in Xiaoyao Powder group were nature, which showed that active fraction of Xiaoyao Powder could play a good adjustment effect. Eliminating the influence of surgical

通讯作者: 陈家旭, 北京市朝阳区北三环东路11号北京中医药大学中医诊断系83信箱, 邮编: 100029, 电话: 010-64286583

E-mail: chenjx@bucm.edu.cn

trauma, the crossing times, standing times, and licking frequency of rats in Xiaoyao Powder group and BDNF group after treating for 21 days were basically the same. Conclusion: From the above results of behaviors, it concludes that there is a similar action pathway between active fraction of Xiaoyao Powder and BDNF, and both might treat syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency by BDNF signaling pathway.

Key words: Active fraction of Xiaoyao Powder; BDNF; Behavioristics; Syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency; Regulation mechanism; Dentategyrus

Funding: Young Scientists Fund of National Natural Science Foundation of China (No.81302960)

海马是学习记忆及情绪的调控中枢,对慢性应激最易受损。慢性束缚应激21d导致大鼠海马神经元损伤^[1]。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是神经营养因子家族的代表,在中枢神经系统广泛表达,具有修复受损神经元的功能,但不能透过血脑屏障。海马齿状回(dentategyrus, DG)区是神经元生发中心,采用双侧DG区埋管微量注射BDNF,促进受损神经元再生及分化,缓解海马神经元的损伤。本研究以21d慢性束缚应激方法造肝郁脾虚证模型^[2],同时设立正常组、假手术组、BDNF组和逍遥散组,逍遥散组造模方法和BDNF组尽可能相似,突出逍遥散有效部位和BDNF二者干预的可比性,观察逍遥散组和BDNF组行为学实验结果变化趋势是否相似。

材料

1. 动物 健康雄性SD大鼠,体质量(220±10)g,清洁级,动物许可证号为SCXK(京)2002-0003,由北京维通利华实验动物中心提供。所有动物适应性饲养3d。饲养于北京中医药大学实验动物中心三级实验室。

2. 药品 逍遥散有效部位,经北京康仁堂药业有限公司按《太平惠民和剂局方》选用逍遥散生药材,提纯石油醚提取部位^[3]。方药组成:北柴胡30g,当归30g,白芍30g,白术30g,茯苓30g,炙甘草15g,生姜10g,薄荷10g,由北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司提供,批号为20131123,经北京中医药大学东直门医院药房鉴定为纯正药材。出膏率约为0.52%。实验流程为:逍遥散生药材经无水乙醇提取,加热回流2次后,对提取液进行过滤、浓缩,再次加水、浓缩后,经石油醚超声萃取后,萃取液经浓缩、真空干燥后,得到逍遥散有效部位。

3. 试剂 BDNF由Sigma公司提供(5mg/瓶),批号为20140312,5mg BDNF溶于2 500μL DMSO和2 500μL 0.9%氯化钠溶液中,即1μL BDNF溶液含1μg BDNF^[4]。

4. 仪器与设备 Angel-one 数控式脑立体定位仪,由美国Benchmark公司生产;荷兰Noldus公司开发的动物行为活动标记分析系统及配套The Observer 5.0分析软件;自制木质旷场箱为立方体,长宽高为100cm×100cm×40cm。内侧壁及底面为灰色,用黑线划分为20cm×20cm面积相等的25块。沿侧壁的格称为外周格(16个周边正方形),其余为中心格(9个中心正方形)。

方法

1. 分组 大鼠适应性饲养3d后进行初步筛选,将过于活跃和过于安静的大鼠排除,余下60只大鼠按体质量利用随机区组方法等分为5组。正常(A)组、模型(B)组、假手术(C)组、BDNF(D)组、逍遥散(E)组,群养,每组12只,4只/笼。

2. 手术 适应喂养第4天对C、D、E组大鼠进行脑部埋管手术,A、B组不手术。大鼠用2.0%戊巴比妥钠(40mg/kg腹腔注射)麻醉并固定于脑立体定位仪上。手术刀切开头部皮肤,暴露颅骨前囟和人字缝。钻头钻孔,将2个相同的由8号针头自制的不锈钢导管(直径0.8mm)分别先后垂直插入双侧距海马DG注射位点上方1mm处(AP: -3.8mm, L: ±2.0mm, DV: -3.2mm,以冠状缝和矢状缝交点为原点,AP代表前后,L代表侧向,DV代表距硬脑膜深度)。用3根不锈钢螺丝钉和502胶将导管固定在颅骨上。导管内置1根封闭管封闭^[5]。术后连续3d腹腔注射16万单位青霉素,大鼠休息1周。

3. 造模 大鼠手术1周后,开始造模。束缚与灌胃:将B、C、D、E组大鼠分别束缚于特制的大鼠束缚架上,每日3h,束缚时间点随机,连续束缚21d。A组在同一时间段不做束缚但禁止饮食水。自造模第1天开始,E组每日在束缚前1h灌服逍遥散有效部位,按人体用药换算成大鼠等效剂量作为大鼠用药量,给药量为0.24g/kg体质量^[3],灌胃容积为10mL/kg体质量。A、B、C、D组灌等体积含0.5%Tween-80和1%CMC-Na水溶液^[3]。灌胃后大鼠休息0.5h后束缚。

脑内微量注射^[5]:造模第1、7、14、21天在D组大鼠双侧海马DG区微量注射BDNF溶液2μL,C、E组双侧微量注射0.9%氯化钠溶液2μL。

微量注射方法:将一个尖端磨平的4号针头(直径0.4mm)穿过导管至导管末端1mm以下处。聚乙烯管插在针头上端和微量调节器之间。使用Hamilton(USA)匀速推进器,1min内匀速推动Hamilton(USA)微量注射器,将2μL液体注射在海马DG区内。聚乙烯管内气泡的运动可以证实药物进入。注射完毕后留针1min,使液体扩散^[6]。

4. 行为学实验 选择造模的第1、7、14、21天这4个时间点进行行为学观察。

4.1 一般形态观察 每次给药前,仔细观察大鼠的精神状态、姿势、皮毛色泽、活动度、对束缚的反应性、眼裂黏膜色

表2 各组大鼠穿格数、站立次数及修饰次数比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	穿格数				站立次数				修饰次数			
	第1天	第7天	第14天	第21天	第1天	第7天	第14天	第21天	第1天	第7天	第14天	第21天
A组	36.23±5.18	36.41±5.21	36.53±5.23	35.72±4.98	12.56±2.05	12.24±2.13	11.74±2.01	11.59±1.97	11.21±1.99	10.55±1.86	10.95±1.91	10.42±3.35
B组	54.33±7.02 ^{''}	39.29±5.02	27.71±3.95 ^{''}	20.11±2.94 ^{''}	15.71±2.68 [']	14.31±2.46	8.49±1.86 [']	4.69±1.36 ^{''}	10.46±1.90	8.64±1.64	6.35±1.38 [']	3.30±0.89 ^{''}
C组	54.41±7.13 ^{''}	40.10±5.76	28.16±4.01 ^{''}	20.32±3.17 ^{''}	16.54±2.70 [']	14.42±2.55	8.57±1.89 [']	5.17±1.44 ^{''}	10.24±1.88	8.53±1.59	6.47±1.42 [']	3.18±0.84 ^{''}
D组	48.44±6.84 ^{''}	34.70±4.83	33.70±4.76	33.28±4.32 ^{''}	15.62±2.63 [']	13.18±2.37	10.62±1.93	11.12±1.98 ^{''}	10.95±1.94	8.77±1.68	9.31±1.79	10.11±1.81 ^{''}
E组	49.88±6.51 ^{''}	36.81±4.95	31.53±4.54	33.62±4.69 ^{''}	15.38±2.57 [']	13.82±2.43	9.97±1.91	11.04±1.94 ^{''}	10.73±1.91	8.59±1.61	9.24±1.77	10.20±1.83 ^{''}

泽、耳廓色泽以及粪便等情况。

4.2 大鼠体重质量增长情况测量 实验开始后隔日上午7:00用电子秤称量大鼠体重质量,并根据体重质量调整给药量。计算第7、14、21天各组大鼠体重质量增长情况并比较。体重质量变化(g)=束缚后每周周末体重质量(g)-每周束缚前体重质量(g)。

4.3 旷场实验 实验用自制木质旷场箱正中格正上方安置摄像头。于实验进程的第1、7、14、21天上午7:00开始,在安静、四周由全封闭的遮光帘隔离开人及电脑干扰并杜绝参照物的环境条件下进行。实验前置大鼠于测试实验室内适应10min。操作者握住大鼠尾部1/3处,轻轻将大鼠放入旷场箱的正中格内,开始同步录像、计时。观察5min内大鼠活动情况。取出大鼠后,用毛巾蘸清水及低浓度酒精彻底擦拭箱底,并等待其挥发扩散,避免留有气味而干扰下一只大鼠的观察结果。

观察如下指标:①总穿格数:三爪以上跨入相邻格的次数;②站立次数:两前肢向上抬起离开箱底面或攀伏在侧壁上,以后腿支撑使身体竖立的次数。③修饰次数:两前肢理毛、抓痒、洗脸、舔足的次数。

5. 统计学方法 运用SPSS 17.0软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计处理,组间比较采用SNK检验,以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。

结果

1. 一般形态观察结果 见表1。造模前各组大鼠毛色、进食、排便和自主活动等方面均无明显差异。造模第7天各组大鼠束缚时均反抗、嘶叫、双目圆睁、毛须竖立、窜叫不安或竖立呈防御姿态,体重质量增长较正常组减少($P<0.01$)。第14-21天模

表1 各组大鼠体重质量增长情况 ($\bar{x} \pm s, n=12, g$)

组别	第7天	第14天	第21天
A组	21.87±4.33	23.99±4.47	30.21±4.59
B组	9.88±2.73 ^{''}	18.12±3.40 [']	19.34±3.46 ^{''}
C组	9.68±2.45 ^{''}	17.99±3.16 [']	19.03±3.54 ^{''}
D组	10.53±2.81 ^{''}	22.88±3.91 ^{''}	29.43±4.50 ^{''}
E组	10.49±2.78 ^{''}	22.70±4.18 ^{''}	29.79±4.55 ^{''}

注:与A组同期比较,['] $P<0.05$,^{''} $P<0.01$;与B组同期比较,^{''} $P<0.05$,^{'''} $P<0.01$ 。下表同。

型组和假手术组大鼠相似,均逐步转化为神态倦怠、烦躁、毛发枯黄散乱无光泽、扎堆或蛰伏在角落、大便多稀溏,体重质量增长缓慢;BDNF组和逍遥散组大鼠则动作均逐渐转为灵活,毛发整洁,体重质量增长量较模型组增加($P<0.05, P<0.01$)。

模型组大鼠肝郁日久,木郁乘土,21d出现“肝郁脾虚证”表现;与模型组比较,假手术组无统计学差异,表明手术创伤对造模无太大影响;逍遥散组和BDNF组造模过程相似,经过14d治疗,第14-21天与正常组一般形态表现基本相近,体重质量增长也均与正常组无显著差异。

2. 各组大鼠旷场实验情况 见表2。经过21d治疗后,与模型组比较,逍遥散组和BDNF组大鼠穿格次数、站立次数、修饰次数均有统计学意义($P<0.01$);与正常组比较,逍遥散组及BDNF组上述指标均无统计学差异,且变化趋势逐步相似;与BDNF组比较,逍遥散组各指标无统计学差异。

讨论

旷场实验是目前最常用的一种动物心理实验方法。通过记录大鼠进入一个新环境后,在一定时间内的探究行为和自发活动的情况,以反映大鼠在新环境中的探究行为和适应能力。传统观察法极易造成实验动物的紧张,而且人工评价存在定性武断、耗时费力和指标过于主观等诸多问题,严重影响了实验的可靠性和客观性。利用摄像监控手段,国际上公认的荷兰Noldus公司的行为学设备,对大鼠的活动进行监测,能客观分析模型大鼠的焦虑、抑郁程度。

选旷场实验中有代表性的穿格数、站立次数、修饰次数进行分析。以正常组为基准,从表2可以看出,第1天初次束缚,B、C、D、E各组大鼠并不适应,穿格数、站立次数均明显高于正常组($P<0.01, P<0.05$)。第1-7天,处于急性应激期,大鼠呈现焦虑状态,穿格数、站立次数虽有下降的趋势,但高于正常组。从第7天起模型组和假手术组大鼠逐渐适应,大鼠逐步呈现从焦虑状态向抑郁状态转变的过程,穿格数、站立次数、修饰次数均有下降趋势($P<0.05, P<0.01$),且在第21天达到最小值,符合肝郁日久,木郁乘土,脾虚乏力,活动力下降的疾病演变过程。BDNF治疗效果比逍遥散起效早,但这两组大鼠在第21天各项指标均趋近于正常组,表明逍遥散有效部位和BDNF都起

到很好的调节作用。

前期研究已经论证, 21d慢性束缚应激大鼠为肝郁脾虚证模型^[2], 慢性束缚应激21d导致大鼠海马神经元损伤^[1]。采用双侧DG区埋管微量注射BDNF, 促进受损伤神经元再生及分化, 缓解海马神经元的损伤。结合实验造模过程逍遥散组和BDNF组相似, 不同的只是分别采用逍遥散有效部位和BDNF干预, 取类比象, 推断逍遥散有效部位可能和BDNF调节机制相似, 即逍遥散有效部位可能通过BDNF信号通路起到抗抑郁的疗效。

参 考 文 献

[1] Vyas A.Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *Neurosci*.2002.22(12):6810-6818

[2] 岳利峰,丁杰,陈家旭,等.肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价. *北京中医药大学学报*.2008.31(6):394-399

[2] 岳利峰,陈家旭,王大伟,等.逍遥散对肝郁脾虚证模型大鼠海

马和杏仁核AMPA受体亚基基因表达的调节机制. *北京中医药大学学报*.2009.32(8):513-517

[3] Zhou Y,Lu L,Li Z,et al.Antidepressant-like effects of the fractions of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress. *Journal of Ethnopharmacology*.2011.137(1):236-244

[4] Gao X,Smith G M,Chen J.Impaired dendritic development and synaptic formation of postnatal-born dentate gyrus granular neurons in the absence of brain-derived neurotrophic factor signaling. *Experimental Neurology*.2009.215(1):178-190

[5] Bennett M R.The prefrontal-limbic network in depression:A core pathology of synapse regression.*Progress in Neurobiology*. 2011.93(4):457-467

[6] Michael H,Mesches,Marino Bianchin,et al.The effects of intraamygdala infusion of the AMPA receptor antagonist BDNF on retention performance following aversive training.*Neurobiology of Learning and Memory*.1996.66:324-340

(收稿日期: 2014年12月7日)

• 研究报告 •

股骨粗隆间骨折单臂外固定术后站立状态肌骨有限元模型的建立及其应力分析

王爱国¹, 谷福顺¹, 郑昆仑¹, 张荣位¹, 信金党¹, 冯其金¹, 李瑞峰¹, 胡志刚², 张健³

(¹天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150; ²河南科技大学医学技术与工程学院, 洛阳 471003; ³上海硅步科学仪器有限公司, 上海 200030)

摘要: 目的: 研究股骨粗隆间骨折单臂外固定术后站立状态的生物力学特性, 为临床治疗提供理论依据。方法: 将CT数据文件经Simpleware软件进行三维重建处理得到股骨及外固定架的三维几何模型。在Anybody软件中建立正常人体股骨模型, 并与股骨外固定架模型(stl几何模型)一同导入Geomagic Studio软件中, 将两组模型进行比对配准, 将配准好的股骨外固定架模型导入Anybody软件中, 通过Simpleware得到的网格模型(inp格式)导入到Abaqus软件中, 分析站立状态的应力分布情况。结果: 在不锈钢钉与股骨的连接处以及不锈钢钉与固定架的连接处产生较大应力, 整体未出现明显应力集中现象。结论: 单臂外固定架治疗股骨粗隆间骨折安全、有效, 其治疗骨折符合中医伤科“筋骨并重”理论, 符合生物力学要求。

关键词: 单臂外固定架; 股骨粗隆间骨折; 站立状态; 肌骨三维有限元模型; 应力分析

基金资助: 天津市中医重点专科, 天津市中医管理局中医、中西医结合科研课题(No.13106), 天津市高等学校科技发展基金计划项目(No.20120217)

Establishment of finite element model of muscle-bone in standing state and analysis on its stress after operation of single-arm external fixation of femoral intertrochanteric fracture

WANG Ai-guo¹, GU Fu-shun¹, ZHENG Kun-lun¹, ZHANG Rong-wei¹, XIN Jin-dang¹, FENG Qi-jin¹, LI Rui-feng¹, HU Zhi-gang², ZHANG Jian³

通讯作者: 谷福顺, 天津市河北区真理道816号天津中医药大学第二附属医院骨伤科, 邮编: 300150, 电话: 022-60335307

E-mail: gufushun@126.com