

柴胡加龙骨牡蛎汤对创伤后应激障碍模型大鼠行为学的调节作用

陈光耀 吴卓耘 张新宁 陈莹莹 刘燕 丁雷 周清缘 宋月晗

【摘要】 目的 观察柴胡加龙骨牡蛎汤对单次延长应激(single-prolonged stress, SPS)建立的创伤后应激障碍(post traumatic stress disorder, PTSD)模型大鼠行为学的调节作用。方法 采用旷场实验以及强迫游泳实验,对不同组大鼠的行为学改变情况进行检测。结果 (1)与正常组大鼠进行比较,模型组大鼠游泳试验不动时间延长、次数增多,旷场实验直立时间减少、运动总距离缩短($P < 0.05$)。(2)与模型组比较,柴胡桂枝龙骨牡蛎汤以及阿普唑仑均能够降低大鼠游泳试验不动次数、时间以及增加旷场实验直立时间、运动总距离($P < 0.05$),且两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 本实验成功复制了 PTSD 样大鼠模型,柴胡加龙骨牡蛎汤能够改善改变 SPS 建立的 PTSD 大鼠的情绪行为变化,能够从总体方面改善 PTSD 样大鼠的症状。

【关键词】 创伤后应激障碍; 柴胡加龙骨牡蛎汤; 单次延长应激; 行为学实验

【中图分类号】 R285 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.02.003

The regulating effect of *Chaihu jia Longgu Muli* decoction (CLMD) on behavior responds of PTSD rats established by SPS CHEN Guang-yao, WU Zhuo-yun, ZHANG Xin-ning, et al. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: SONG Yue-han, E-mail: songyuehan1981@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the behavior changes and the influence of traditional Chinese prescription *Chaihu jia Longgu Muli* decoction (CLMD) on post traumatic stress disorder (PTSD) rats.

Methods The open field test and forced swimming test was used to detect the change of the behavior of rats in different groups. **Results** (1) Compared with the normal group, the duration and the times of immobility of model group in forced swimming test were significantly higher ($P < 0.05$). The vertical activity and total distance movement in the open fields of model group were significantly lower ($P < 0.05$).

(2) The vertical activity and total distance movement in Xanax group and CLMD group were both significantly higher than those of the model group ($P < 0.05$). And the duration and the times of immobility in forced swimming test were significantly reduced in both Xanax group and CLMD group ($P < 0.05$). All the parameters of CLMD group and Xanax group had no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusions**

The PTSD model in rat is established successfully, and CLMD can significantly improve the abnormal behavior changes of the PTSD rats established by SPS model.

【Keywords】 Post traumatic stress disorder; *Chaihu jia Longgu Muli* decoction; Single prolonged stress; Behavioral experiment

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划(201410026055); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20100013120005)

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院

作者简介: 陈光耀(1994-), 2012 级本硕连读本科阶段在读。

研究方向: 神经精神疾病病证结合研究。E-mail: chenguangyao1994@163.com

通讯作者: 宋月晗(1981-), 女, 副教授, 硕士生导师。研究方向: 神经精神疾病病证结合研究。E-mail: songyuehan1981@126.com

创伤后应激障碍(post traumatic stress disorder, PTSD)是指由严重的突发性、威胁性或灾难性生活事件导致长期持续存在的精神障碍^[1],其症状主要包括对创伤事件的病理性重现、对创伤相关线索的回避、持续性的高唤醒,以及对创伤经历的选择性遗忘和情感麻木^[2]。由于 PTSD 在灾难后普遍发生,发病率高、病程长、疗效差,严重影响了患

者的生活质量^[3]。因此针对 PTSD 治疗手段的增加以及相关药物的研发成为当务之急。

柴胡加龙骨牡蛎汤出自《伤寒论·辨太阳病脉证并治》第一百零七条,主治“胸满烦惊,小便不利,谵语,一身尽重,不可转侧”。研究发现其对各种神经类疾病如失眠、更年期综合征、自闭症、抑郁症、焦虑症、癫痫等有着良好的效果^[4]。一项以汶川地震幸存者中 PTSD 患者为研究对象、以柴胡加龙骨牡蛎汤为主方配制的药物作为变量的随机安慰剂对照试验显示出其对 PTSD 症状有着良好的改善作用^[5]。

在涉及到药物对神经系统的作用研究上,行为学试验发挥着重要的作用,它能够反映出实验动物的整体状态,因而较之其他指标具有更为重要的意义,是评价实验成功与否的最重要的标准,能够为进一步实验提供相对合理的依据^[6]。因而通过柴胡加龙骨牡蛎汤对单次延长应激(single-prolonged stress,SPS)建立的 PTSD 样大鼠行为学的调节作用的研究,能够为进一步的相关生理、生化实验研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠 48 只,体质量(180±20)g,提前一周购入并进行适应性饲养。实验动物购自斯贝福(北京)实验动物科技有限公司;许可证号:SCXK(京)2011-0004。

1.2 实验药品

柴胡加龙骨牡蛎汤(药物组成:《伤寒论》所记载的柴胡加龙骨牡蛎汤去铅丹,由柴胡、半夏、桂枝、茯苓、黄芩、大枣、人参、牡蛎、龙骨、生姜组成,各药用量按照原方比例)由北京中医药大学东直门医院提供并制备成颗粒剂,颗粒剂用蒸馏水配制成悬浊液,每毫升含生药 1 g;阳性对照组实验药物为阿普唑仑,用蒸馏水配置成 0.01 mg/mL 的溶液。药物放在 4℃ 冰箱中备用。

1.3 仪器设备

大鼠固定器、木质旷场箱由北京中医药大学神经免疫实验室提供。行为学自动观察分析系统采用 Nodule 公司行为学研究设备,含计算机、摄像监控以及 observior、ethevision 分析软件。

1.4 实验分组

将大鼠适应性喂养后,按体质量随机分为 4

组,分别为正常对照组、模型组、柴胡加龙骨牡蛎汤组、阿普唑仑组,每组 12 只。在造模束缚过程中共 10 只大鼠死亡,为保证实验组大鼠数量,将正常对照组 4 只大鼠造模后分配进入实验组,其中柴胡加龙骨牡蛎汤组在给药第 7 天死亡一只。

1.5 造模

采用 SPS 法建立 PTSD 大鼠模型,包括先将大鼠进行 2 小时束缚,随后将大鼠置于水箱中进行 20 分钟的强迫游泳,游泳结束 15 分钟后将大鼠置于密闭容器中进行乙醚麻醉,待大鼠昏迷后放在通风处,待意识恢复后再放回鼠笼静养。

1.6 给药

造模后每天早 7:00 对大鼠进行灌胃,正常对照组和模型组按体重给予 1 mL/100 g 生理盐水;柴胡桂枝龙骨牡蛎汤组给予 1 mL/100 g 的柴胡加龙骨牡蛎汤悬浊液;阿普唑仑组给予 1 mL/100 g 的阿普唑仑溶液。连续灌胃 14 天后进行行为学检测。

1.7 实验内容

1.7.1 旷场试验 采用立方灰色木质旷场箱,其底面为灰色,用黑线划分为 25 个正方形格(20 cm × 20 cm),分为沿侧壁的 16 个外周格,其余为中心 9 个中央格,摄像头置于中央格正上方。实验时将动物放入箱内底面中心,实验人员远离旷场箱,同时进行摄像 5 分钟。每次实验结束后用酒精清洗方箱内部,以免影响下次测试,最后采用计算机软件对录像进行分析。

1.7.2 强迫游泳实验 旷场实验结束后将大鼠放入有水的水箱中,测量大鼠 5 分钟内放弃逃跑而保持静止不动(仅前肢轻微运动以保持头部露出水面)的时间作为指标。

1.8 统计学分析

所得数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。各项指标中,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计学描述,若资料类型为正态分布时,采用单因素方差分析进行组间比较;若为偏态分布的资料,采用秩和检验进行组间比较。

2 结果

2.1 对大鼠游泳试验不动时间及次数影响

对大鼠游泳试验不动时间及次数两项指标,模型组与正常对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),阿普唑仑组、柴胡加龙骨牡蛎汤组分别与模型组相比在游泳试验不动时间以及次数,均有

差异 ($P < 0.05$); 柴胡加龙骨牡蛎汤与阿普唑仑组在游泳试验不动时间以及次数, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 大鼠游泳试验不动时间表 ($n, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	不动时间 (s)	不动次数 (次)
正常对照组	8	1.11 ± 1.76	1.12 ± 1.35
模型组	10	5.28 ± 4.21 ^a	3.90 ± 2.60 ^a
柴胡加龙骨牡蛎汤组	9	1.28 ± 1.54 ^b	1.22 ± 1.09 ^b
阿普唑仑组	10	1.98 ± 2.42 ^b	1.80 ± 1.75 ^b

注: 与正常组相比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.2 旷场试验

大鼠旷场试验大鼠直立时间与运动总距离两项指标, 模型组与正常对照组相比均有差异 ($P < 0.05$), 阿普唑仑组、柴胡加龙骨牡蛎汤组分别与模型组相比均有差异 ($P < 0.05$); 柴胡加龙骨牡蛎汤与阿普唑仑组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 大鼠旷场实验直立时间以及运动总距离表 ($n, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	大鼠直立时间 (s)	大鼠运动总距离 (cm)
正常对照组	8	36.8 ± 12.5	572.5 ± 298.3
模型组	10	21.6 ± 8.6 ^a	288.0 ± 217.2 ^a
柴胡桂枝龙骨牡蛎汤组	9	38.6 ± 12.5 ^b	622.2 ± 263.9 ^b
阿普唑仑组	10	33.9 ± 11.1 ^b	524.0 ± 249.7 ^b

注: 与正常组相比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比较, ^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

单次延长应激 (single-prolonged stress, SPS) 是一种短时高强度的应激刺激, 因其重复性良好以及能够较好的模拟出 PTSD 所表现出的临床症状, 被广泛应用于 PTSD 的实验研究中, 已成为一种国际通用的 PTSD 成熟的造模手段, 其相关的生理、生化研究亦成为国内外研究热点之一^[7-9]。

强迫游泳试验能较好的模拟当 PTSD 患者再次处于灾难性事件发生的环境中时所表现出的强烈的恐惧感和无助感。在实验过程中, 以四肢仅作轻微摆动、保持头部漂浮在水面以上, 为放弃挣扎的标准并记录游泳试验不动时间, 反映出 PTSD 大鼠再次处于 SPS 模型应激条件下所表现出的绝望^[10]。旷场实验能够较好的评价啮齿类实验动物自主运动行为、探究行为与紧张度, 从而反映出动物的整体的认知情况和焦虑状态, 是用来评价动物模型行为学变化的经典实验之一^[11]。相对于正常组, 模型组大鼠在经历 SPS 应激之后, 游泳试验不动时间延

长、次数增多以及旷场实验直立次数减少、运动总距离缩短, 说明 SPS 应激能够增加大鼠的恐惧行为以及抑制自发性活动, 较好的模拟了临床 PTSD 患者的无助感、反应性麻木以及探索能力下降的表现。

近代有中医研究认为 PTSD 是在各种先后天因素所致心虚胆怯、肝郁不舒的基础上, 由“惊”而发, 损伤人体气机, 引起脏腑、气血津液失调, 进而引起气郁生火, 心神被扰, 神机失藏^[12]。柴胡加龙骨牡蛎汤作为经方中治疗神志类疾病的代表方剂, 原方由柴胡、黄芩、生姜、铅丹、人参、桂枝、茯苓、半夏、大黄、牡蛎、龙骨、大枣十二味药物所组成, 因铅丹毒副作用较大, 现代一般不使用。该方龙骨、牡蛎镇惊安神, 柴胡、桂枝升发宣散; 黄芩、大黄清热泻火, 茯苓、半夏健脾化痰; 人参、大枣补虚, 可调寒热并调、升降并用、补虚泄实, 共同发挥解郁泻热, 镇静安神的功效, 与 PTSD 病因病机不谋而合。

本实验阳性对照药物阿普唑仑, 是目前治疗 PTSD 最常用的药物, 研究表明应激后早期及时给予阿普唑仑干预可明显减轻创伤后应激障碍大鼠的恐惧反应, 能够起到良好的对照作用^[13-14]。在连续给药 14 天后, 柴胡加龙骨牡蛎汤组以及阿普唑仑组相对于模型组均表现出在游泳试验中不动时间以及次数减少、旷场实验总运动距离增加, 且两组之间无统计学差异 ($P > 0.05$), 表明柴胡加龙骨牡蛎汤对 SPS 建立的 PTSD 样大鼠行为学具有调节作用, 其作用效果与阿普唑仑无显著差异。

综上所述, 柴胡加龙骨牡蛎汤对 SPS 模型建立的 PTSD 样大鼠的行为学异常具有良好的调节作用, 将柴胡加龙骨牡蛎汤运用于 PTSD 的动物实验以进一步研究其调节机制, 将对以 PTSD 的临床治疗提供实验基础。

参 考 文 献

- [1] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders [M]. Fourth Edition (DSM-IV), Washington DC, 1994.
- [2] 段妮, 冯玉芳, 刘彩兴, 等. 创伤后应激障碍研究进展 [J]. 四川精神卫生, 2014, (6): 575-577.
- [3] 张娅玲, 白艳秋, 彭正午, 等. 创伤后应激障碍 (PTSD) 的生物学研究概述 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11 (1): 172-175, 168.
- [4] 林珍臣. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗情志类疾病 128 例之文献研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [5] Xian-Ze Meng, Feng Wu, Pin-Kang Wei, et al. A Chinese Herbal Formula to Improve General Psychological Status in Posttraumatic Stress Disorder: A Randomized Placebo-Controlled

- Trial on Sichuan Earthquake Survivors[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, 2012(1):691258.
- [6] 林晓春, 李云鹏, 卞艳芳, 等. 大鼠旷场实验指标检测及参考值的探讨[J]. 毒理学杂志, 2010, 3:224-225.
- [7] Bing Xiao, Bo Yu, Dong-Juan Liu, et al. Single prolonged stress induces dysfunction of endoplasmic reticulum in a rat model of post-traumatic stress disorder[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2015-2020.
- [8] Keller SM, Schreiber WB, Staib JM, et al. Sex differences in the single prolonged stress model[J]. Behav Brain Res, 2015, 286(1):29-32.
- [9] 刘俊丽, 夏亮, 王莉颖, 等. 单次延长应激导致的创伤后应激障碍行为伴随乳头体神经元活化[J]. 神经解剖学杂志, 2012, 28(4):397-400.
- [10] 韩明飞, 高东, 孙学礼, 等. 两种慢性强迫游泳应激抑郁模型的行为学比较[J]. 四川大学学报(医学版), 2010, 41(1): 137-139, 152.
- [11] 周波, 文敏, 李宏伟, 等. Matlab 在旷场实验行为视频分析中的运用[J]. 贵阳医学院学报, 2013, 38(2):164-165, 168.
- [12] 宋月晗, 李峰, 刘燕, 等. 从“惊”探析创伤后应激障碍的中医病机[J]. 环球中医药, 2011, 4(4):284-286.
- [13] 毛萌, 宋月晗, 李峰, 等. SPS 建立 PTSD 样大鼠旷场行为的改变及十味温胆汤的调节作用[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(17):3214-3216, 3224.
- [14] 党少康, 罗晓星, 张振, 等. 阿普唑仑对创伤后应激障碍的预防作用[J]. 神经解剖学杂志, 2010, 26(3):245-248.

(收稿日期: 2015-09-14)

(本文编辑: 韩虹娟)