

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.36.024

改良掺食法建立苯巴比妥成瘾大鼠模型*

韩彬¹, 王国俊^{1△}, 傅萍², 叶云¹

(1. 泸州医学院附属医院药剂科, 四川泸州 646000; 2. 四川省食品药品检验所, 成都 611731)

摘要:目的 研究用掺食法建立苯巴比妥成瘾大鼠模型的方法。方法 选用大鼠为实验动物, 采用掺食法造模, 苯巴比妥起始剂量 75 mg/kg, 逐日递增剂量, 经 45 d, 模型分别采用文献报道的催促戒断法及自然戒断法加以检验, 判断造模是否成功。结果 掺食法催促戒断组的惊厥率明显高于对照组 ($P < 0.01$); 掺食法自然戒断组的戒断症状评分明显高于对照组 ($P < 0.05$); 两个戒断组的体质量减轻程度均大于对照组 ($P < 0.05$); 造模组脑切片显示明显的细胞凋亡改变。结论 掺食法建立苯巴比妥成瘾大鼠模型简单可行。

关键词:掺食法; 苯巴比妥成瘾; 大鼠模型

中图分类号:

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)36-4924-04

Establishment of phenobarbital addiction rat model by modified drug admixed food method*

Han Bin¹, Wang Guojun^{1△}, Fu Ping², Ye Yun¹

(1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Sichuan Provincial Institute for Food and Drug Control, Chengdu, Sichuan 611731, China)

Abstract: Objective To establish the phenobarbital addiction rat model by the modified drug-admixed-food (DAF) method. **Methods** Rats were selected as the experimental animal. The modified DAF method was adopted to construct the model. The initial dose of phenobarbital 75 mg/kg was given mixed and the dose was gradually increased day by day, which continued for 45 d. The established model was verified by the precipitated withdrawal method and the natural withdrawal method for judging whether the model construction succeeding. **Results** The convulsion rate in the DAF precipitated withdrawal group was higher than that in the control group ($P < 0.01$); the withdrawal symptoms scores in the DAF natural withdrawal group were higher than those in the control group ($P < 0.05$); the relieving degree of body mass in the two withdrawal groups was greater than that in the control group ($P < 0.05$). The brain section in the mode group revealed obvious cellular apoptotic change. **Conclusion** DAF is simple and feasible for establishing the phenobarbital addiction rat model.

Key words: drug-admixed food method; phenobarbital addiction; rat model

药物成瘾 (addiction) 是滥用药物的后果, 指习惯于摄入某种药物而产生的一种依赖状态, 撤去药物后可引起一些特殊的症状即戒断症状, 又称药物依赖性。成瘾性药物可诱发欣快感或缓解疼痛, 持续使用促使中枢神经系统发生适应性改变, 导致出现耐受性、依赖性、嗜欲性和复发性^[1]。苯巴比妥是一种临床应用非常广泛的催眠镇静药物, 随着其新的药理作用不断被发现, 大量使用此类药物所带来的药物成瘾已经成为临床日益重视的问题。

既往文献中对于巴比妥类药物成瘾的研究, 一般采用苯巴比妥或者巴比妥, 用大鼠、小鼠、狗、猴为试验对象, 一般是采用剂量递增的灌胃、腹腔注射、掺食的方式^[2]。灌胃或腹腔注射造模方法报道较多; 建立大鼠苯巴比妥成瘾模型多历时 90 d 左右, 操作要求较高, 对大鼠损伤较大^[3]; 国内掺食法造模较少报道; 一般第 1 周内让大鼠日摄入量达 100 mg/kg, 逐渐增加剂量到 600 mg/kg, 历时 10 周以上^[2], 造模耗时较长; 国外有报道掺食法历时 40 d 左右建立苯巴比妥成瘾模型, 但剂量递增方法不尽相同^[4]。模型检验一般采用停止摄入药物方式自然戒断、中枢兴奋药催促戒断以验证造模是否成功^[5]。

本实验参考国内外文献报道^[3-6], 对既往造模方法加以改进, 选用大鼠为实验动物, 采用掺食法造模, 苯巴比妥起始剂量 75 mg/kg, 逐日递增剂量, 经 45 d, 模型分别采用文献报道的催促戒断法及自然戒断法加以检验, 结果表明大鼠形成了稳定的苯巴比妥依赖。本法操作简单, 造模时间较既往明显缩短, 有效地避免了长期灌胃及注射对大鼠造成的痛苦, 无大鼠死亡, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SD 大鼠雌雄各半, 重庆腾鑫比实验动物销售有限公司提供, 动物批准号 SCXK(渝)2012-0008, 体质量 150~200 g。所有大鼠自由摄食、饮水 1 周适应环境。

1.2 药品与试剂 苯巴比妥片, 每片 30 mg, 上海信谊药厂有限公司提供, 批号 120401; 异烟肼注射液, 规格 2 mL:100 mg, 天津药业集团新郑股份有限公司提供, 批号 1112281。

1.3 实验方法

1.3.1 造模方法 80 只大鼠分为对照组 (催促戒断对照组、自然戒断对照组), 造模组 (苯巴比妥催促戒断模型组、苯巴比妥自然戒断模型组) 共 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半。苯巴比妥

* 基金项目: 四川省中药管理局基金资助 (12086)。 作者简介: 韩彬 (1984—), 硕士, 药师, 主要从事临床药学研究。 △ 通讯作者, E-mail: wanggj7532@163.com。

造模组用剂量递增的苯巴比妥片粉末掺入粉末状的大鼠食物喂养,药物剂量为结合临床,以 Meeh Rubner 公式即人与大鼠间药物剂体表面积换算关系为依据^[7],并参考相关动物试验^[5-6]及前期试验^[8-9]的用药剂量而定。1~10 d 苯巴比妥起始浓度为 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 11~20 d 剂量为 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 21~30 d 剂量为 $165 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 31~45 d 剂量为 $210 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。对照组则用普通的粉末状饲料喂养。造模第 33 天苯巴比妥催促戒断模型组用催促戒断试验验证成瘾模型制造进展,自然戒断组继续喂养至第 45 天后停药。

1.3.2 模型检验 大鼠催促戒断试验模型检验:造模第 33 天,催促戒断试验验证成瘾模型制造进展,苯巴比妥催促戒断模型组大鼠,用普通的不含苯巴比妥的食物代替含苯巴比妥的混合食物喂养大鼠并称取重量,戒断 16 h 后用诱导惊厥阈下剂量 150 mg/kg 的异烟肼对大鼠给予腹腔注射^[10-11],观察半小时内的反应并统计惊厥率;直至第 72 小时,每日称取重量^[12]。与对照组相比较, χ^2 检验惊厥率差异的显著性, t 检验重量减轻程度差异的显著性。大鼠自然戒断试验模型检验:造模第 46 天,苯巴比妥自然戒断模型组大鼠停药,称取重量,每隔 8 h 进行戒断症状观察并评分直至 72 h^[12],统计戒断症状评分,每日称取重量,与对照组相比较, t 检验差异的显著性。

1.3.3 对照组及造模组脑切片情况(光镜下情况) 上述各组大鼠处死,脑组织切片,HE 染色,光镜下观察对比切片情况。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS18.0 软件进行统计分析,计算各组戒断后的体质量变化百分率、催促戒断各组惊厥百分率、自然戒断各组戒断症状评分,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

采用上述掺食法建立大鼠苯巴比妥成瘾模型,分别采用催促戒断、自然戒断两种方法进行模型检验,表明该方法能成功用于建立大鼠苯巴比妥成瘾模型,方法简便可行,造模过程中未发生大鼠死亡。

2.1 大鼠苯巴比妥成瘾模型催促戒断法模型检验结果 催促戒断组的惊厥发生率为 60%,明显高于对照组($P<0.05$),见表 1。催促戒断组的体质量明显下降,至 72 h 仍没恢复,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 大鼠注射 INH 后惊厥情况

组别	合计	未惊厥	惊厥	惊厥率(%)
对照组	20	20	0	0.00
催促戒断组	20	12	8	60.00

表 2 大鼠催促戒断后体质量变化情况($\bar{x} \pm s, \%$)

戒断后	对照组	催促戒断组
24 h	0.58 ± 1.48	$-2.06 \pm 1.85^*$
48 h	-0.71 ± 1.29	$-5.11 \pm 2.44^*$
72 h	0.16 ± 1.94	$-4.32 \pm 2.69^*$

*: $P<0.05$,与对照组比较。

2.2 掺食法大鼠苯巴比妥成瘾模型自然戒断法进行模型检验结果 戒断后第 16 小时开始模型组有大鼠出现戒断症状,如

兴奋不安、嘶叫、流涎、稀便、竖毛、颤抖、四肢乱抓。24~48 h 症状出现到达顶峰,开始出现阵发性惊厥,呼吸急促,四肢痉挛,全身皮肤发白,牙关打颤,个别大鼠出现强直性阵挛甚至死亡(图 1~3)。48~72 h 症状稍有减轻,体质量下降尤为明显,至 72 h 仍未恢复。自然戒断组 24~72 h 的戒断症状评分(标准见表 3)与对照组差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4,体质量减轻与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

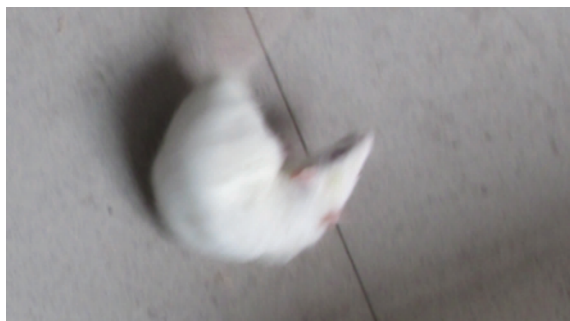


图 1 大鼠兴奋、挣扎



图 2 大鼠阵发惊厥、跌倒

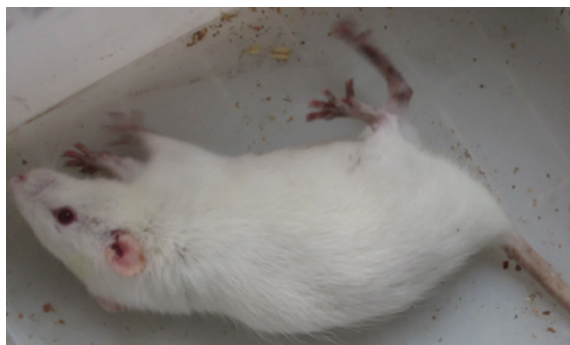


图 3 大鼠强直惊厥

表 3 大鼠戒断症状评分标准*

等级	分数	症状
没有	0	无明显症状
轻微	1	亢奋;厌食
中等	2	多汗;激烈震颤;体质量减轻($<10\%$)
严重	3	阵挛性惊厥;体质量减轻($>10\%$)
极其严重	4	强直性惊厥;死亡

*: 本文评分标准参考文献[12]。

2.3 成瘾大鼠脑切片情况 大鼠苯巴比妥成瘾,与脑细胞的凋亡相关联^[6],一般认为大鼠对苯巴比妥的依赖性越强,其额

叶脑细胞凋亡数目占额叶脑细胞总数比例越高,将上述大鼠进行断头取脑额叶部位,切片 HE 染色,可观察到对照组与模型组对比脑细胞形态的变化^[9,13]。对照组:脑细胞形态完好,细胞核清晰可见,胞质颜色正常(图 4)造模组:细胞体积小,胞质浓缩,核染色质以不同形式凝聚:有的凝聚于核膜之下;有的呈典型的新月形;有的凝聚成一大块或几小块占据整个核区(图 5、6)。

表 4 大鼠自然戒断评分($\bar{x} \pm s, n=20$)

时间	对照组	自然戒断组
8 h	0.05±0.22	0.15±0.37
16 h	0.10±0.31	0.35±0.48
24 h	0.05±0.22	1.15±0.67*
32 h	0.10±0.31	1.80±0.69*
40 h	0.05±0.22	2.89±0.69*
48 h	0.00±0.00	3.31±0.66*
56 h	0.15±0.36	3.03±0.84*
64 h	0.10±0.31	1.94±0.87*
72 h	0.05±0.22	1.72±0.75*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 5 大鼠自然戒断后体质量变化情况($\bar{x} \pm s, \%$)

戒断后	对照组	自然戒断组
24 h	0.08±1.41	-4.59±1.07*
48 h	0.71±1.62	-9.16±2.98*
72 h	0.33±1.97	-7.99±3.06*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

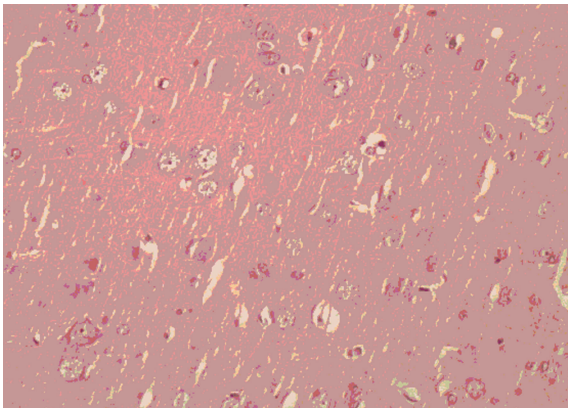


图 4 对照组脑细胞 HE 染色切片($\times 200$)

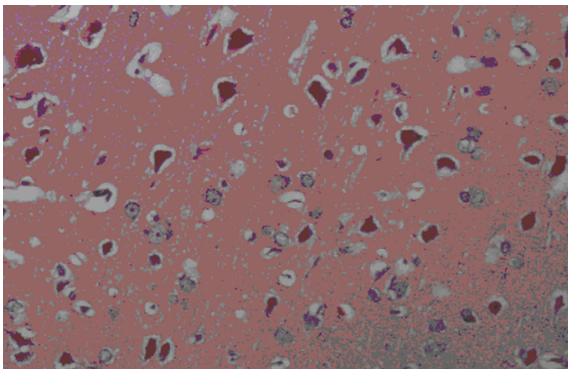


图 5 催促模型组脑细胞 HE 染色切片($\times 200$)

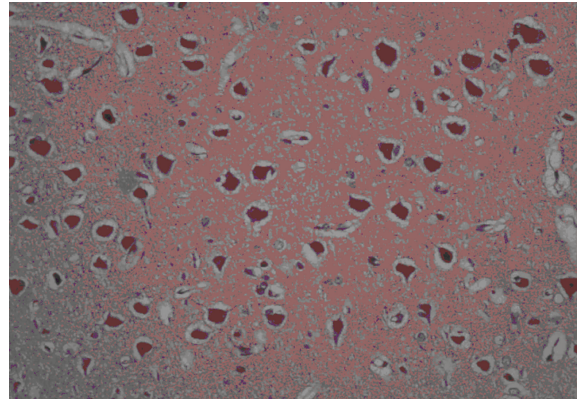


图 6 自然戒断组脑细胞 HE 染色切片($\times 200$)

3 讨 论

戒断反应是药物成瘾的明显特征之一,指停止使用药物或减少使用剂量或使用拮抗剂占据受体后所出现的特殊的心理症候群,其机制是由于长期用药后,突然停药引起的适应性反跳,症状是出现反跳性的兴奋性升高。苯巴比妥是一种在临床使用广泛,成瘾性较大的催眠镇静抗癫痫药,本身有中枢神经系统抑制作用,能够提高惊厥的发作阈值^[12]。然而长期使用该药后忽然停药,却会导致包括自发性的惊厥在类的戒断症状出现。在苯巴比妥模型建立过程中,停药戒断后的亢奋、厌食、多汗、体质量减轻、自发性惊厥等症状可以作为动物身体依赖的观察指标,也可以根据程度的不同用来划分戒断症状的严重程度。

本试验动物用药起始剂量(75 mg/kg)为结合临床,以 Meeh Rubner 公式即人与大鼠间药物剂量体表面积换算关系为依据^[7],并参考相关动物试验^[4-6]及前期试验^[8-9]的用药剂量而定,此剂量会在一定程度上对大鼠造成轻微的中枢抑制,但一般不会造成严重的中枢而抑制影响活动进食。每日早上用少量食物粉末混合药物粉末,密切观察大鼠,保证全部食物及药物均完全摄入大鼠体内,从而有效避免大鼠因为进食饮水习惯导致的药物未完全摄入体内。待大鼠吃光后再给予剩余的正常粉末食物。在掺食法造模过程中需注意的:初期给药期间如果出现大鼠中枢抑制极其严重已经不能正常进食可以略微减少给药的剂量再逐渐递增,在计算催促戒断的惊厥率的时候,只奔跑未倒地 and 奔跑倒地的动物,均应一并计算惊厥发生率。

与现有的灌胃法和腹腔注射法相比,掺食法建立苯巴比妥依赖模型的优势在于可以让大鼠以最自然的方式摄入药物,灌胃法导致的食道损伤和腹腔注射法导致的局部感染溃疡等问题都可以避免,可以更好地模拟患者平时长期服用药物形成的药物依赖,大大减少实验动物在实验过程中的死亡数量(采用文献报道方法灌胃法造苯巴比妥成瘾大鼠模型时发现该方法操作要求较高,动物死亡数较多,且造模历时较长,由于病死率高的原因模型成型率较低);而与现有文献的掺食法需要造模时间 10~12 周相比,本法将大鼠的初始摄药剂量略微增加,加大了药物的递增梯度剂量,以起始剂量 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 开始用药(以出现中枢抑制状态为标志^[5])直至剂量高达 $210 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,造模时间仅仅为 45 d,除戒断检验模型时有大鼠出现惊厥死亡外,造模过程中无大鼠死亡,在第 33 天用催促戒断的方式验证成瘾模型制造进展,45 d 就可以观察到自

然戒断症状,与以往文献相比较,最终成型的模型在相同的时间段均能观察到相似的戒断症状和体质量减轻情况。多年的研究表明药物滥用对大脑有损伤,药物滥用导致的成瘾是一种脑疾病,Cadet 等^[14]将药物成瘾造成的脑细胞丧失与细胞凋亡机制联系在一起,认为药物成瘾的神经损伤是由激活调控细胞凋亡的分子机制引起的。本实验中造模组大鼠脑切片图显示:造模组大鼠脑细胞呈现明显的凋亡改变,符合成瘾大鼠脑细胞改变情况,进一步表明造模成功。

近期研究发现,成瘾不仅有关于脑细胞的凋亡调控^[15],而且与学习和记忆也密切相关^[16],本造模法建立的苯巴比妥成瘾模型所造成的身体依赖结果可靠,重复性好,可以成为成瘾脑细胞凋亡调控与成瘾学习记忆能力研究的基础。

参考文献:

- [1] 郝伟. 精神病学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2008:74-83.
- [2] 郑继旺,蔡志基. 镇静催眠药的身体依赖性动物评价方法[J]. 中国药理学通报,1993,9(3):224-227.
- [3] 陈素青,崔艳英,邱毅,等. 巴比妥类药物依赖性试验动物模型的建立[J]. 中国药物依赖性杂志,2012,21(4):264-269,277.
- [4] Tagashira E, Izumi T, Yanaura S. Experimental barbiturate dependence. I. Barbiturate dependence development in rats by drug-admixed food(DAF)method[J]. Psychopharmacology(Berl),1978,57(2):137-144.
- [5] 张开镐. 镇静催眠、抗焦虑药物的身体依赖性试验[J]. 中国药物依赖性杂志,2000,9(1):12.
- [6] 李净兵. 苯巴比妥对大鼠额叶、顶叶、小脑神经元及神经胶质细胞凋亡的影响[D]. 石家庄:河北医科大学,2011:11-13.
- [7] 魏泓. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:142-146.
- [8] 朱海霞,蔡方成,张晓萍,等. 长程服用苯巴比妥、氯硝安定、丙戊酸和托吡酯对未成熟脑发育影响的实验研究[J]. 中华儿科杂志,2007,45(2):121-125.
- [9] 陈锦. 长程施用抗癫痫药致大鼠脑损伤的机理研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2009:27-33.
- [10] Ishiwata Y, Nagata M, Yasuhara M. Effect of isoniazid on the pharmacodynamics of cefazolin-induced seizures in rats[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2005, 20(2): 117-120.
- [11] 袁晓冉,余方,何小华,等. 惊厥相关动物模型的研究进展[J]. 卒中与神经疾病,2010,17(5):312-315.
- [12] 张力,蔡志基. 苯巴比妥致大鼠身体依赖性实验[J]. 中国药物依赖性杂志,1996,5(4):206-211.
- [13] 沈强,俞彰,法京,等. 电镜下几种凋亡细胞的形态特征[J]. 复旦学报:医学版,2010,37(3):322-325.
- [14] Cadet JL, Jayanthi S, Deng X. Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis[J]. FASEB J, 2003,17(13):1775-1788.
- [15] 韦献良,梁莹,叶峻,等. 海洛因成瘾复吸大鼠脑组织神经元超微结构和神经递质变化的研究[J]. 电子显微学报,2004,2(5):530-535.
- [16] 宋岭,郝伟,崔涛涛,等. 大鼠配对前啡啡成瘾及戒断对子代焦虑样行为和学习记忆的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2009,18(6):519-522.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-07-12)

(上接第 4923 页)

的斑块形态与人类斑块的早期病变相接近,更适合做 AS 发生早期机制的研究;加强对临床 AS 发病机制的研究,结合临床发病机制及病变特点,建立更加符合人类 AS 特点的动物模型对 AS 的诊断、治疗及预防具有重大的意义^[7]。

参考文献:

- [1] Moulton KS. Plaque angiogenesis and atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep,2011,3(3):225-233.
- [2] Tang YY, Xie YC, Huang YL, et al. Contrast-enhanced ultrasound in assessing atherosclerosis of abdomind aorta in rabbits model: a preliminary study [J]. J Kunming Medical College,2010,31(12):12-15.
- [3] Tsimikas S, Shaw PX. Non-invasive imaging of vulnerable plaques by molecular targeting of oxidized LDL with tagged oxidation-specific antibodies [J]. J Cell Biochem Suppl,2002(39):138-146.
- [4] Moulton KS, Olsen BR, Sonn S, et al. Loss of collagen X
- [5] VIII I enhances neovascularization and vascular permeability in atherosclerosis [J]. Circulation, 2004, 110(10): 1330-1336.
- [5] Hamilton AJ, Huang SL, Warnick D, et al. Intravascular ultrasound molecular imaging of atheroma components in vivo[J]. J Am Coll Cardiol,2004,43(3):453-460.
- [6] Abdolreza Rezaie-Majd, Maca T, Robert A, et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6 interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2002,22(7):1194-1199.
- [7] Yao CX, Yang B. Research and application of targeting microbubble contrast agent in ultrasonic diagnosis and treatment[J]. Chinese Journal of Ultrasonography, 2009, 18(1):83-85.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-08-25)