

·针灸推拿·

本文引用:李中正,盛益华,李思迪,谭静,魏星,阳仁达.电针对MPTP亚急性帕金森病模型小鼠步态运动行为的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(7):874-878.

电针对MPTP亚急性帕金森病模型小鼠步态运动行为的影响

李中正^{1,2,3}, 盛益华⁴, 李思迪⁴, 谭静^{1,2}, 魏星^{1,2}, 阳仁达^{1,2*}

(1.湖南中医药大学针灸推拿学院,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学中医学国内一流建设学科,湖南长沙410208;
3.吉首大学医学院,湖南吉首416000;4.吉首大学生物资源与环境科学学院,湖南吉首416000)

[摘要] **目的** 研究电针治疗早期对帕金森病(Parkinson's disease, PD)小鼠模型步态运动行为的影响。**方法** 步态运动行为训练合格的C57BL/6小鼠40只,随机分为对照组、模型组、美多芭组和电针组,每组10只。对照组腹腔注射生理盐水,模型组、美多芭组和电针组腹腔注射MPTP诱导亚急性PD小鼠模型。对照组、模型组不予干预,美多芭组给予美多芭灌胃,电针组给予电针“合谷”“太冲”干预,连续7d后进行步态行为学实验、爬杆实验、悬挂实验、转棒实验。**结果** 模型组与对照组比较,平均体转角、单支撑时相、双支撑时相、足迹平均强度、对侧协调性、速度、平均步行周期、支撑时相、瞬时速度等步态指标均有明显变化($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,电针组、美多芭组的单支撑时相_左后、单支撑时相_右后、速度、平均步行周期、瞬时速度_左后、瞬时速度_右后、左前推进指数、右前推进指数等步态指标有明显改善($P<0.05$, $P<0.01$);模型组与对照组比较,下半部时间、总时间等爬杆指标均明显增加($P<0.01$);模型组与对照组比较,掉落潜伏期、在杆足数得分等悬挂指标均有明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);模型组与对照组比较,转棒指标掉落潜伏期明显下降($P<0.05$);电针组、美多芭组与模型组比较,爬杆、悬挂、转棒指标均无明显变化($P>0.05$)。**结论** 电针在治疗早期即可改善PD小鼠的步态运动行为,全自动小鼠步态分析系统能够在电针治疗早期准确敏感反映PD小鼠步态运动行为的细微改变。

[关键词] 帕金森病;步态;电针;合谷;太冲

[中图分类号] R245;R742.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.07.019

Effects of Electroacupuncture on Gait Movement Behavior in MPTP Sub-acute Parkinson's Disease Model Mice

LI Zhongzheng^{1,2,3}, SHENG Yihua⁴, LI Sidi⁴, TAN Jing^{1,2}, WEI Xing^{1,2}, YANG Renda^{1,2*}

(1. Acupuncture and Massage College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Domestic First-class Discipline Construction Project of Chinese Medicine of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Medical College of Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China; 4. Biological Resources and Environmental Sciences College of Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of electroacupuncture on gait movement behavior of Parkinson's disease (PD) model mice at early stage. **Methods** A total of 40 C57BL/6 mice were randomly divided into a control group, a model group, a Madopar group and an electroacupuncture (EA) group, with 10 mice in each group. The control group was given intraperitoneal injection of normal saline. The sub-acute PD mice models were induced by the intraperitoneal injection of MPTP in the model group, the Madopar group and the EA group. The control group and model group were not intervened. The Madopar group was given intragastric administration of Madopar, and the EA group was given electroacupuncture intervention at "

[收稿日期] 2018-12-17

[基金项目] 湖南省教育厅科研项目(17C1306)。

[作者简介] 李中正,男,在读博士研究生,研究方向:针灸治病机制研究。

[通讯作者] * 阳仁达,男,教授,博士研究生导师, E-mail: yangrd11@163.com。

Hegu (LI 4)" and "Taichong (LR 3)". After 7 consecutive days, gait behavior experiment, rod climbing experiment, suspension experiment and rod rotation experiment were carried out. **Results** Compared with the control group, the gait indexes such as average body rotation angle, single support phase, double support phase, average footprint strength, contralateral coordination, speed, average walking cycle, support phase and instantaneous speed were significantly changed in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the gait indexes of the EA group and the Madopar group were significantly improved ($P<0.05$, $P<0.01$), such as single support phase (left back), single support phase (right back), speed, average walking cycle, instantaneous speed (left back), instantaneous speed (right back), left forward propulsion index, right forward propulsion index, etc. ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the control group, climbing rod indexes like the lower half time and the total time in the model group were increased significantly ($P<0.01$). Compared with the control group, the suspension indexes such as the drop latency and the number of feet on the rods in the model group were decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). While the drop latency of the rod rotation index was decreased significantly ($P<0.05$) in the model group compared with the control group. Compared with the model group, there were no significant changes in the indexes of climbing rod, suspension and rotating rod in the EA group and Madopar group ($P>0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture can improve the gait movement behavior of PD mice in the early stage of treatment, and the automatic mice gait analysis system can accurately and sensitively reflect the subtle changes of the gait movement behavior of PD mice in the early stage of electroacupuncture treatment.

[**Keywords**] Parkinson's disease; gait; electroacupuncture; Hegu (LI 4); Taichong (LR 3)

帕金森病(Parkinson's disease, PD)中老年常见的神经退行性疾病,临床上表现为静止性震颤、肌僵直、运动迟缓和平衡障碍四大主症,主要病理改变为中脑黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)能神经元进行性变性丢失。临床研究表明,针刺“合谷”“太冲”可以治疗PD,并能降低PD运动并发症剂末现象(剂末现象一般定义为规律用药 ≥ 3 次/d,每次服用有效剂量的左旋多巴,可缓解PD症状时间 < 4 h)的发生^[1]。动物实验表明,电针“合谷”“太冲”可促进帕金森小鼠多巴胺神经元突触可塑性,其细胞分子基础可能与脑源性神经营养因子的神经营养作用、神经细胞黏附分子的细胞黏附、对内源性神经干细胞的原位诱导和促进多巴胺的合成与重摄取有关^[2]。PD临床上表现的症状非常复杂,主要表现为运动障碍症状和非运动症状两大类^[3],其中运动障碍特征及其干预改善是目前研究的热点。本研究电针治疗早期(7 d)对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导亚急性PD模型小鼠步态运动行为的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

C57BL/6小鼠,雄性,体质量28~30 g,购于斯莱克实验动物有限公司,合格证号:SCXK(湘)20147-0011。实验期间控制室温在18~22℃,12 h交替照明,小鼠自由饮水、取食。动物于造模前进行步态、爬杆、转棒和悬挂实验训练,选取训练合格的40只小鼠适应性饲养1周,随机分为对照组(注射

生理盐水),模型组(注射MPTP造模)组,美多芭组(注射MPTP造模,模型建立后开始给予美多芭灌胃给药),电针组(注射MPTP造模,模型建立后开始给予电针干预),每组10只。实验过程中对动物的处置符合2006年国家科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

1.2 主要试剂与仪器

MPTP(美国Sigma公司,批号M0896),美多芭(上海罗氏制药有限公司,批号SH3159);华佗牌针灸针(规格0.19 mm \times 10 mm,苏州医药用品厂有限公司);华佗牌针刺手法诊疗仪(型号SXDZ-100,中国苏州医疗用品厂有限公司);全自动小鼠步态分析系统(型号MGT-PR,中国医学科学院药用植物研究所、北京鑫海华仪科技有限公司、中国航天员科研训练中心联合研制);转棒式疲劳仪(型号YLS-4C,安徽正华生物仪器设备有限公司)。小鼠爬杆架(自制):将一直径为3 cm的泡沫小球固定于一根长50 cm、粗1.3 cm的金属杆顶端,金属杆上缠上纱布。小鼠悬挂线(自制):固定一根距地面36.5 cm水平放置的电线。

1.3 模型制作

模型组、美多芭组和电针组在实验第1天开始腹腔注射MPTP(30 mg/kg),给药体积0.01 mL/g体质量,每天1次,连续7 d。对照组在实验第1天开始腹腔注射生理盐水,剂量计算方法和给药体积与其余3组相同。

1.4 干预方法

电针组:根据中国针灸学会实验针灸分会制定

的《动物针灸穴位图谱》,参照人体经穴定位取“合谷”“太冲”。MPTP 亚急性 PD 模型建立后开始电针治疗,毫针刺后不行补泻手法,接电针诊疗仪,“合谷”穴接正极、“太冲”穴接负极,参数为连续波、100 Hz、1 mA、强度 2 档,连续 20 min,每日 1 次,连续 7 d。

美多芭组:MPTP 亚急性 PD 模型建立后开始按临床人体给药剂量折算,6.25 mg/kg,每天灌胃 1 次,连续 7 d。

对照组、模型组和美多芭组 MPTP 亚急性 PD 模型建立后,每天与电针组相同时间相同方法进行抓取、固定,但不给予电针干预。

上述各组 7 d 后进行步态行为学实验、爬杆实验、悬挂实验、转棒实验。

1.5 步态行为学实验

开始实验前每天每只动物进行 3 次跑台适应性训练,连续 7 d,以保证动物可从跑台的一端不间断地跑到另一端,训练结束后进行测试。测试前调试仪器采光系统,在适当的光线条件下,保证动物足印在采集图像窗口中清晰可见,每只动物不间断连续跑过跑台,并通过高频摄像机记录步态录像,再通过计算机分析软件进行图像分析,计算统计步态指标。

1.6 爬杆实验

参照 Ogawa 等^[4]的检测方法,将一直径为 25 mm 的软木球固定于一根长 50 cm 粗 1 cm 的木杆顶端,木杆上缠上纱布以防打滑,然后将被测小鼠放到小球上,并记录以下几个时间:小鼠从小球上下来所需要的时间(调头时间)、小鼠爬完杆子的上半部所需要的时间、小鼠爬完杆子下半部所用的时间。

1.7 悬挂实验

参照 Kuribara 等^[5]的检测方法,将受试小鼠悬挂于一水平电线上,如小鼠用两后爪抓住电线则记 3 分,如用一后爪抓住电线则记 2 分。如果小鼠两后爪均抓不住电线则记 1 分,并记录各组动物从电线上掉落的潜伏期(s)。

1.8 转棒实验

将小鼠置于转棒式疲劳仪上,给予 30 s 的适应时间,然后启动转棒式疲劳仪,使小鼠在 5 r/min 的转棒上爬行 90 s。将转棒式疲劳仪转速调为 16 r/min,开始计时,小鼠从转棒跌落下来时可以被红外装置所监测,自动停止计时并显示小鼠在转杆上运动的

时间,记录小鼠第一次从棒上跌落的时间(潜伏期)。

1.9 统计学方法

运用统计软件 SPSS 19.0 对所得数据进行处理,用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,先对数据进行正态性检验和方差分析。若数据符合正态分布以及方差齐性则采用 LSD 法进行组间比较,若符合正态分布不符合方差齐性则采用 *Dunnnett's T3* 法,若不满足正态分布则采用秩和检验,当 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电针对 MPTP 亚急性帕金森病小鼠步态行为的改善作用

模型组与对照组比较,平均体转角、单支撑时相、双支撑时相、足迹平均强度、对侧协调性、速度、平均步行周期、支撑时相、瞬时速度等步态指标均有明显变化($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示造模成功。

与模型组比较,电针组和美多芭组在单支撑时相_左后、单支撑时相_右后、速度、平均步行周期、瞬时速度_左后、瞬时速度_右后、左前推进指数、右前推进指数等步态指标方面,均有明显恢复($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示电针组和美多芭组在治疗早期(7 d)均可以改善 PD 小鼠的步态行为。

与模型组比较,电针组的平均体转角、双支撑时相_左前_右后、双支撑时相_左后_右前、右后足迹平均强度等 4 个步态指标有明显减少($P < 0.05$),而美多芭组的改善无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,美多芭组瞬时速度_右前有明显增加($P < 0.05$),但电针组的改善无统计学意义($P > 0.05$),说明在某些步态指标方面,电针组和美多芭组的改善作用各有不同。具体见表 1。

2.2 电针对 MPTP 亚急性帕金森病小鼠爬杆行为的影响

爬杆实验结果显示,模型组与对照组比较,下半部时间、总时间均明显增加($P < 0.01$),提示造模成功。电针组、美多芭组与模型组比较,掉头时间、上半部时间、下半部时间、总时间等爬杆指标无明显变化($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 电针对 MPTP 亚急性帕金森病小鼠悬挂及转棒行为的影响

悬挂实验结果显示,模型组与对照组比较,掉落潜伏期、在杆足数得分均有明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),

表 1 电针对 MPTP 亚急性帕金森病小鼠步态行为的改善作用($n=10, \bar{x} \pm s$)

步态指标	对照组	模型组	美多芭组	电针组
平均体转角(度)	1.368±1.250	3.244±2.568*	1.868±1.443	1.141±1.007 [#]
单支撑时相_左前	0.291±0.079	0.280±0.120	0.341±0.157	0.423±0.210
单支撑时相_左后	0.132±0.054	0.051±0.014**	0.102±0.056 [#]	0.140±0.120 [#]
单支撑时相_右前	0.300±0.073	0.245±0.090	0.245±0.120	0.264±0.120
单支撑时相_右后	0.153±0.076	0.066±0.024**	0.156±0.120 [#]	0.133±0.080 [#]
双支撑时相_左前_右后	0.370±0.065	0.418±0.040*	0.382±0.089	0.374±0.029 [#]
双支撑时相_左后_右前	0.375±0.046	0.419±0.047*	0.373±0.093	0.323±0.039 ^{##}
左前足迹平均强度	34.079±6.909	37.006±3.523	37.072±6.333	36.510±5.711
左后足迹平均强度	36.733±5.629	48.704±11.336**	43.842±8.237	41.849±5.120
右前足迹平均强度	30.665±2.428	34.943±7.410	35.902±4.317	35.611±8.772
右后足迹平均强度	43.316±4.214	53.081±4.736**	48.861±7.647	46.701±8.310 [#]
右后相对于左前对侧协调性	0.577±0.177	0.403±0.162*	0.425±0.093	0.411±0.079
右前相对于左后对侧协调性	0.372±0.073	0.280±0.132*	0.354±0.097	0.308±0.117
速度(毫米/秒)	637.48±140.07	526.28±60.60*	586.14±68.92 [#]	596.71±74.52 [#]
平均步行周期(秒)	0.199±0.027	0.232±0.035*	0.200±0.031 [#]	0.203±0.019 [#]
支撑时相_左前	0.395±0.054	0.474±0.069**	0.443±0.036	0.459±0.059
支撑时相_左后	0.402±0.066	0.479±0.095*	0.473±0.081	0.452±0.106
支撑时相_右前	0.378±0.033	0.462±0.075**	0.466±0.061	0.495±0.054
支撑时相_右后	0.431±0.059	0.543±0.025**	0.506±0.097	0.502±0.079
瞬时速度_左前(毫米/秒)	758.79±186.21	530.00±91.11**	663.90±212.55	583.13±118.83
瞬时速度_左后(毫米/秒)	633.07±206.67	434.80±81.63*	636.74±157.64 ^{##}	577.05±94.24 ^{##}
瞬时速度_右前(毫米/秒)	768.62±180.06	547.34±132.38**	694.31±170.37 [#]	579.91±98.01
瞬时速度_右后(毫米/秒)	655.40±189.94	447.16±90.52**	626.78±115.98 ^{##}	581.78±101.54 [#]
左前推进指数	0.496±0.121	0.636±0.067**	0.512±0.169 [#]	0.527±0.113 [#]
左后推进指数	0.577±0.109	0.614±0.139	0.546±0.151	0.577±0.111
右前推进指数	0.494±0.097	0.644±0.112**	0.524±0.082 [#]	0.504±0.123 [#]
右后推进指数	0.583±0.122	0.563±0.071	0.539±0.180	0.539±0.097

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

表 2 电针对 MPTP 亚急性帕金森病小鼠爬杆行为的影响($n=10, \bar{x} \pm s, s$)

组别	掉头时间	上半部时间	下半部时间	总时间
对照组	0.76±0.32	1.66±0.29	1.33±0.29	3.70±0.69
模型组	0.98±0.43	1.83±0.28	1.90±0.45**	4.71±0.88**
美多芭组	0.85±0.09	1.77±0.30	1.69±0.14	4.31±0.42
电针组	0.95±0.22	1.81±0.14	1.88±0.23	4.64±0.41

注:与对照组比较,** $P<0.01$

提示造模成功。电针组、美多芭组与模型组比较,掉落潜伏期、在杆足数得分等悬挂指标无明显变化($P>0.05$)。转棒实验结果显示,模型组与对照组比较,掉落潜伏期明显下降($P<0.05$),电针组、美多芭组与模型组比较,转棒掉落潜伏期无明显变化($P>0.05$)。见表 3。

3 讨论

爬杆实验、悬挂实验、转棒实验是 3 种目前公认、常用、传统经典的评价帕金森动物运动行为的方

表 3 电针对 MPTP 亚急性帕金森病小鼠悬挂及转棒行为的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	悬挂行为实验		转棒行为实验
	掉落潜伏期/s	在杆足数得分/分	掉落潜伏期/s
对照组	138.33±81.51	2.80±0.42	174.17±11.97
模型组	76.71±46.60*	2.11±0.60**	148.12±45.01*
美多芭组	127.13±87.69	2.57±0.79	176.59±9.03
电针组	101.46±35.39	2.33±0.82	148.73±37.76

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

法。越来越多的学者关注并运用 Catwalk 自动步态分析系统来评价各种 PD 动物模型的行为学特征和评估治疗效果^[6-7],而本研究采用国产的 MGT-PR 全自动小鼠步态分析系统,通过封闭式图像采集系统实现了步态分析视频采集系统内部稳定、均一的光线环境,步态实验可在任何光线环境下顺利进行,且全过程均由计算机自动识别记录,具有智能化和自动化的优点,可从距离、时间、速度、压力分布和体态

5大方面对动物运动行为进行精确全面的评价,极大得弥补了传统经典方法的不足。

太冲、合谷合称“四关”穴,两穴合用,阴阳相合,互根互用,气血双调,既可养肝血以养经脉,又可解肝郁以息肝风^[1],是针灸治疗PD的常用腧穴。因此本研究中电针组取穴太冲、合谷,并用公认的阳性药物美多芭对照。本研究采用公认的MPTP诱导亚急性PD模型小鼠造模方法^[2],在步态行为学实验中发现PD小鼠平均体转角(度)、对侧协调性等可反映动物运动协调能力的指标显著下降,四肢足迹平均强度和四肢推进指数可反映动物行走时肢体力量的指标也显著下降等,比传统的3种方法更为直接准确、客观敏感。另外,传统行为学方法不仅费时,费力,易受主观因素影响,准确性差,尤其重要的是对动物的刺激较大,比如从转棒或线绳上掉落对本来就虚弱的小鼠来讲,是一个不小的损伤和刺激,对接下来评价或深入机制的研究均可产生一定的影响,而步态行为学实验中小鼠是自发行走的实验过程,全程对小鼠未添加较大的刺激。

本研究发现PD小鼠移动速度发生非常急剧的下降,步行周期显著升高,提示小鼠行走整体功能发生了非常明显的障碍,而电针对其有明显的改善作用。本研究通过观察PD小鼠步行过程中体轴与水平线之间的平均夹角以及标准偏差,客观准确地反映了小鼠步行时体态的变化规律。PD小鼠平均体转角发生显著变化,平均体转角标准偏差有增加的趋势,提示小鼠对行走方向的控制能力或平衡能力发生了显著的下降,且行走的稳定性也受到了一定的影响,而电针有明显的改善作用。本研究发现PD小鼠对侧协调性指数发生显著的异常,提示在行走过程中其行走的协调性也出现严重的失调,而电针有明显的改善作用。另外,本研究还发现一个有趣的现象,PD小鼠后肢的平均足迹强度显著增加,前肢的推进指数显著增加,提示小鼠步态异常的特点可能是其行走过程中发生了非常明显的前肢支撑或着力功能下降,通过后肢代偿性的增加支撑或着力功能来完成步行过程(此发现可能为今后进一步挖掘PD运动功能障碍的神经生物学机制提供重要线索),而电针对这2个步态指标也有明显的改善作用。

总之,本研究表明PD小鼠的步态出现严重异常,电针“合谷”“太冲”在治疗早期(7d)即可改善小鼠的步态运动行为,与文献研究结果相一致^[3],该研究报告电针预处理组和电针治疗7d、14d、21d、28d组,均可以改善PD大鼠旷场实验垂直运动和水平运动的得分。同时,本研究也发现模型组小鼠在经典的爬杆、悬挂和转棒实验中均出现了阳性结果,提示MPTP诱导的亚急性帕金森病模型小鼠造模是成功的。然而与模型组相比,电针组、美多芭组在爬杆、悬挂和转棒实验中却未能出现显著性差异,仅出现了一定的改善趋势,可能是由于电针组仅实施了7d干预,其改善作用程度是目前经典的行为评价方法无法捕捉到的。相比之下,全自动小鼠步态分析系统能够在电针治疗早期准确敏感反映PD小鼠步态运动行为的细微改变,值得科研中应用。

参考文献

- [1] 林 铎,赖新生,庄子齐,等.针刺四关穴治疗帕金森病剂末现象的临床观察[J].浙江中医药大学学报,2018,42(2):157-159.
- [2] 唐 勇,余曙光,陈 瑾.电针对帕金森小鼠黑质致密部脑源性神经营养因子表达的影响[J].针刺研究,2006,31(1):38-42.
- [3] 李 军,刘存勇.中西医结合治疗对帕金森患者生活质量的影响及临床疗效观察[J].湖南中医药大学学报,2017,37(7):789-791.
- [4] OGAWA N, HIROSE Y, OHARA S, et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice[J]. Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology, 1985,50(3):435-441.
- [5] KURIBARA H, HIGUCHI Y, TADOKORO S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice [J]. The Japanese Journal of Pharmacology, 1977, 27(1):117-126.
- [6] MING Z, ZHANG W, CHANG J, et al. Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease[J]. Neuroscience Letters, 2015, 584:184-189.
- [7] KUCINSKI A, ALBIN R L, LUSTIG C, et al. Modeling falls in Parkinson's disease: slow gait, freezing episodes and falls in rats with extensive striatal dopamine loss[J]. Behavioural Brain Research, 2015, 282(6):155-164.
- [8] 吕 娥,费学超,李 侃,等.血管活性肠肽对MPTP亚急性帕金森病模型小鼠突触的影响[J].解剖学报,2018,49(1):29-34.
- [9] 马 骏,王中明,王述菊,等.电针对帕金森病模型大鼠内质网应激IRE1 α -ASK1-JNK通路的影响[J].中国康复医学杂志,2018,33(6):658-680.

(本文编辑 匡静之)