

本文引用:邓楚欣,于征森,林培政,吴智兵.半夏生物总碱对健康小鼠运动平衡、自主活动及空间工作记忆能力的影响[J].湖南中医药大学学报,2021,41(11):1676-1682.

半夏生物总碱对健康小鼠运动平衡、自主活动及空间工作记忆能力的影响

邓楚欣¹,于征森¹,林培政²,吴智兵^{1*}

(1.广州中医药大学第一附属医院,广东 广州 510405;2.广州中医药大学,广东 广州 510000)

〔摘要〕目的 使用与运动平衡、自主活动及空间工作记忆功能相关的行为学测试,观察半夏生物总碱(pinellia total alkaloids, PTA)对健康雄性小鼠神经系统的运动和认知功能的抑制作用,从而评价PTA的神经毒性。方法 限量试验取30例4周龄雄性KM小鼠,随机分为PTA组(2 g/kg)和空白组,每组15只,灌胃1次,在灌胃前(0 h)和灌胃后8 h、7 d、14 d进行转棒测试及Y臂迷宫测试。28 d重复剂量试验取60例4周龄雄性KM小鼠,随机分为PTA低、中、高剂量组(0.08、0.28、1 g/kg)及空白组,每组15只,连续灌胃28 d;在首剂灌胃前(0 h)和首剂灌胃后14 d、28 d、35 d进行转棒测试及Y臂迷宫测试。取脑和脊髓组织行HE染色病检,观察额叶、尾状核、海马、黑质、脑桥、小脑及脊髓前角的组织形态学改变。结果 限量测试:与空白组比,PTA组体质量在7 d和14 d较高($P<0.05$),Y臂迷宫的自发路线转换行为比(SAB%)在8 h升高($P<0.05$)。28 d重复剂量试验:与自身0 h比,PTA高剂量组的SAB%在28 d升高($P<0.05$)。病检未见明显异常。结论 在本研究的给药方案及评价指标下,PTA未对雄性小鼠产生显著的神经毒性,个别时间点出现的行为学水平提高的意义尚不明确。

〔关键词〕半夏生物总碱;神经毒性;运动平衡;自主活动;空间工作记忆;病理;小鼠

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.11.006

Effect of Pinellia Total Alkaloids on Motor Coordination, Locomotion, and Spatial Working Memory on Healthy Mice

DENG Chuxin¹, YU Zhengmiao¹, LIN Peizheng², WU Zhibing^{1*}

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

〔Abstract〕 **Objective** Neurotoxicity evaluation concerning motor and cognitive inhibition of pinellia total alkaloids (PTA) on healthy mice was conducted by using behavioral tests related to motor coordination, locomotion, and spatial working memory. **Methods** In the limit test, 30 male KM mice (4 weeks old) were divided into a PTA group (2 g/kg) and a control group, with 15 mice in each group, and were intragastrically dosed once. The rotarod test (RT) and the Y-maze test (YMT) were examined before dosing (0 hour) and at 8 hours, 7 and 14 days after dosing. In the repeated 28-day dosing test, 60 male KM mice (4 weeks old) were assigned to the PTA low, medium, and high dose (0.08, 0.28, 1 g/kg) groups and the control group, with 15 mice in each group. Mice were intragastrically dosed once daily for 28 days. The RT and YMT were examined before the first dose (0 hour) and at 14, 28 and 35 days after the first dose. HE staining was conducted on sections of the frontal motor cortex, caudate putamen, hippocampal formation, substantia nigra, pons, cerebellum cortex, and ventral horns of the spinal cord. **Results** In the limit test, compared with the control group, the PTA group showed higher body weight at 7 and 14 days ($P<0.05$), and higher spontaneous alternation behavior

〔收稿日期〕2021-06-07

〔基金项目〕广东省中医药局项目(211020030624)。

〔作者简介〕邓楚欣,女,主治医师,博士,研究方向:中西医结合诊治脑病。

〔通信作者〕* 吴智兵,男,主任医师,博士研究生导师,E-mail:nbk_gzucm@foxmail.com。

(SAB%) at 8 hours ($P<0.05$). In the repeated 28-day dosing test, compared with 0 hour, the PTA high dose group showed higher SAB% at 28 days ($P<0.05$). No significant histopathological changes were observed. **Conclusion** With the dosing regimens and indicators used in this study, PTA did not induce significant neurotoxicity in healthy male mice, the significance of increased behavioral responses detected in certain time points remained undefined.

[**Keywords**] pinellia total alkaloids; neurotoxicity; motor coordination; locomotion; spatial working memory; histopathology; mice

半夏(Pinelliae Rhizoma)性味辛温,有燥湿化痰、降逆止呕和消痞散结等功效,临床中常用于治疗各种痰证,如痫病、痰喘咳嗽、风痰眩晕和痰湿呕逆等。半夏复杂的成分中含有生物碱、半夏蛋白、辛辣性醇类、有机酸类、多糖、甾醇类、氨基酸、挥发油及无机元素等^[1]。现代研究^[2-5]发现,半夏生物总碱(pinellia total alkaloids, PTA)对多种癫痫模型的脑部痫性放电及运动性痫性发作症状展现出显著的抗痫作用,提示 PTA 可能是半夏的主要抗痫成分。

抗痫药物必须进行神经毒性筛查,一是鉴别药物对痫性发作的抑制作用是直接的抗痫作用还是对神经系统的毒性作用,比如通过损害运动系统而掩盖痫性发作症状;二是如果药物确实存在神经毒性,则需评估毒性的性质、范围、强度及可逆性等^[6-7]。初筛试验首选无创的神经行为学测试指标,以定量反映药物对认知、运动、感觉和自主神经等神经系统功能的影响^[8]。当行为学测试提示存在神经毒性时,再进一步行组织病理学、电生理学、神经化学、神经内分泌学和神经免疫学等指标检测^[9]。

研究^[10]显示,PTA 可能存在镇静催眠和中枢止呕等除抗痫作用以外的中枢抑制作用,提示在深入研究 PTA 对癫痫的治疗作用前有必要对其进行神经毒性筛查。本研究前期试验^[9-10]发现,PTA 对雄性 SD 大鼠的经口半数致死量 >2 g/kg(扩展试验法),测试期间大鼠未见病态,考虑 PTA 的经口毒性可能不大。因此,本研究选择限量试验和 28 d 重复剂量试验这两种常用的经口毒性测试方案。指标方面,用转棒测试筛查 PTA 对运动平衡能力的影响,用 Y 臂迷宫-自发路线转换测试筛查 PTA 对自主活动量及空间工作记忆能力的影响。当行为学测试提示异常时,选取与运动和认知相关的神经系统区域进行组织形态学病检。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 KM 小鼠 90 只,体质量 18~22 g,4

周龄,购自广州中医药大学实验动物中心[许可证:SCXK(粤)2013-0034],饲养于广州中医药大学第一附属医院 SPF 级动物实验室[实验动物环境、设施使用合格证:SYXK(粤)2013-0092],自由取食 SPF 级饲料及水。适应性饲养 5 d,期间进行适应性触摸。实验设计及执行符合广州中医药大学第一附属医院动物伦理委员会规定。

1.2 主要药品、试剂及仪器

PTA 粉剂(南京道斯夫生物科技有限公司,货号:170325R);水合氯醛(山东西亚化学工业有限公司,货号:I19957),溶于 0.9%氯化钠注射液(normal saline, NS)(四川科伦药业股份有限公司,货号:A17011607-1);4%多聚甲醛(Paraformaldehyde, PFA)溶液(北京雷根生物技术有限公司,货号:1129A17);苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染液(武汉谷歌生物科技有限公司,货号:G1005);Y 臂迷宫由黑色有机玻璃制成(佛山市富惠厨房设备有限公司),有 3 条外观一致的、顶面开放的长方体型臂(各臂长 50 cm、宽 10 cm、高 25 cm),分别命名为 A 臂、B 臂和 C 臂;ZB200-6 通道疲劳转棒仪(成都泰盟科技有限公司);FDR-AX40 Sony®高清摄像机(上海索广电子有限公司)固定在 Y 臂迷宫中心的正上方。

2 方法

2.1 分组、给药及取材

适应性饲养 5 d 后进行首次行为学测试。限量试验取 30 只雄性 KM 小鼠,分为 PTA 组(2 g/kg)和空白组(纯水),灌胃 1 次,观察 14 d,随后取材。28 d 重复剂量试验取 60 只雄性 KM 小鼠,分为 PTA 低、中、高剂量组(0.08、0.28、1 g/kg)及空白组(纯水),连续 28 d 每天灌胃 1 次,然后每组取材 6 只小鼠,其余小鼠观察至 35 d 后取材。灌胃量为 8 mL/(kg·次)。取材时予腹腔注射 7%水合氯醛(0.55 g/kg),然后进行原位灌注:先从升主动脉灌入 4 ℃的 NS 120 mL,

再灌入 4 ℃ 的 4% PFA 60 mL, 留取全脑及脊髓。

2.2 监测指标

2.2.1 一般情况 每天两次记录小鼠的健康状态(皮肤毛发、个体及群居活动、运动状态及排便情况等), 每周称重 1 次。

2.2.2 行为学 限量试验在灌胃前(0 h)和灌胃后 8 h 内、7 d、14 d 测行为学。28 d 重复剂量试验在首剂灌胃前(0 h)和首剂灌胃后 14 d、28 d、35 d 测行为学。转棒测试^[9]: 首先进行训练, 将小鼠放到转速为 4 r/min 的转棒上保持平衡 60 s, 训练 3 次, 如第 3 次训练时小鼠能保持平衡 60 s 不掉落即符合进入正式实验的要求。每次正式测试前需进行 1 次仪器适应, 将小鼠放到转速为 4 r/min 的转棒上保持平衡 60 s 不掉落即可, 10 min 后进行正式测试。每次的正式测试需进行 3 轮, 每轮的测试方法一致: 将小鼠放到初速为 4 r/min 的转棒上, 每 10 s 加速 1 r/min, 最高加到 50 r/min, 当小鼠掉落时, 该轮测试结束, 记录掉落潜伏期(latency to fall, LTF), 间隔 15~20 min 后进行下一轮测试, 3 轮测试后取 LTF 的平均值。Y 臂迷宫-自发路线转换测试^[11]: 小鼠从 3 条臂中的某一条进入活动场并自由探索 5 min, 测试期间实验员离场, 过程由摄像机拍摄, 作为采集数据的依据。记录每条臂的进入次数和自发路线转换行为(spontaneous alternation behavior, SAB)次数。当小鼠的运动路线连续包括 3 条不同的臂时记录为 1 次 SAB, 如果活动路线为 B 臂→A 臂→C 臂→A 臂→C 臂→B 臂→B 臂→A 臂→C 臂, 则 SAB 有 3 次(BAC-ACB-BAC)^[11]。

$$\text{SAB}\% = [\text{SAB 次数} / (\text{总进入臂次数} - 2)] \times 100\%^{[11-12]}$$

2.2.3 组织病检 限量试验中每组取 6 只小鼠进行病检。28 d 重复剂量试验中空白组和 PTA 高剂量组在 28 d 后每组取 6 只小鼠进行病检, 如有阳性发现, 再进行其他组别的和 35 d 后取得的组织病检。经 4% PFA 固定的脑及脊髓组织进行脱水、包埋、切片、脱蜡、HE 染色及脱水封片。脑组织取 Bregma1.5、-2.0、-2.5、-5.5 mm(L1、L2、L3、L4) 4 个区域进行冠状切片^[13]。L1 主要观察额顶叶皮层和尾状核, 与学习、行为和肢体活动有关; L2 主要观察海马结构, 与行为学表现(如空间工作记忆)有关; L3 主要观察黑质, 与运动协调性有关; L4 主要观察脑桥和小

脑皮质, 与姿势步态和运动平衡能力有关^[13]。脊髓在颈、胸及腰等 3 个区域进行横轴切片, 主要观察脊髓前角, 与肢体活动有关。玻片在 IX3-RFACS 显微镜(Olympus)下观察并拍摄。颈髓及腰髓在双侧前角各拍摄 1 个视野($\times 200$), 胸髓的双侧前角拍摄在 1 个视野下($\times 200$); 对视野中的胶质细胞增生程度进行评级: 胶质细胞在视野中的面积占比为 0%, 1%~25%, 26%~50%, 51%~75%, 76%~100% 时, 分别为 0、1、2、3、4 分。

2.3 统计学分析

使用 SPSS 21.0 统计软件。数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 符合正态分布者进行 *t* 检验或单因素方差分析, 多组间的两两比较选择 Bonferroni 法(方差齐时)或 Games-Howell 法(方差不齐时); 不符合正态分布者进行 Wilcoxon 秩和检验或 Kruskal-Wallis *H* 检验; 对于两个或多个独立样本的、服从正态分布的重复测量资料(测量次数 ≥ 3 次), 进行重复测量资料的方差分析, 组间数据的多重比较选择 Bonferroni 法。 $P < 0.05$ 时表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 PTA 对小鼠一般健康状态及体质量的影响

给药期间各组小鼠的一般健康状态良好, 毛发光亮、洁白整齐, 个体及群居活动如常, 一般肢体活动及排便情况亦未见明显异常。PTA 高剂量组有 1 只小鼠因人为意外死亡, 不纳入统计分析。限量测试中, 与空白组比较, PTA 组 7 d($P < 0.05$)和 14 d($P < 0.05$)的体质量较高(见表 1)。28 d 重复剂量试验中, 与空白组比较, 给药期间(0 h~28 d)PTA 低剂量组的体质量增长较慢($P < 0.05$), 但实验全程(0 h~35 d)各组之间的体质量增长差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 限量试验中 PTA 对小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=15, g$)

组别	0 h	7 d	14 d
空白组	30.63±1.64	34.53±1.91	38.46±2.07
PTA 组	31.51±1.39	35.95±1.55*	40.39±2.03*

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$

3.2 PTA 对小鼠运动平衡能力的影响

限量测试中, 与空白组比, PTA 组 8 h、7 d、14 d 的 LTF 较低($P > 0.05$); 与 0 h 比, 空白组 8 h ($P < 0.01$)、

表 2 28 d 重复剂量试验中 PTA 对小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, g$)

组别	n	0 h	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白组	15	32.75±1.45	37.89±1.82	40.47±2.48	42.73±2.81	41.67±2.78	45.28±2.57
PTA 低剂量组	15	31.03±1.67	35.35±2.57*	37.51±3.13*	39.63±3.34	39.46±3.37	42.64±3.18
PTA 中剂量组	15	32.03±1.83	37.45±2.73	40.05±3.29	41.95±3.67	41.52±2.80	44.29±3.45
PTA 高剂量组	14	31.41±2.24	34.94±2.14*	37.49±2.37*	40.01±2.90	40.08±3.32	43.08±2.94

注:与空白组比较,* $P<0.05$;其中 35 d 空白组,PTA 低、中、高剂量组中小鼠数量依次为 9、9、8

表 3 限量试验中 PTA 对小鼠转棒测试 LTF 的影响($\bar{x}\pm s, n=15, g$)

组别	0 h	8 h	7 d	14 d
空白组	152.11±38.22	223.67±112.22**	221.69±72.51**	230.98±66.04**
PTA 组	152.58±44.56	176.60±89.18	167.51±77.75	177.47±84.32

注:与 0 h 比较,** $P<0.01$

7 d($P<0.01$)、14 d($P<0.01$)的 LTF 较高,PTA 组 8 h、7 d、14 d 的 LTF 也较高,但差异无统计学意义($P>0.05$)(见表 3)。28 d 重复剂量试验中,与空白组比,PTA 低、中、高剂量组在 14、28、35 d 的 LTF 未见显著降低($P>0.05$)。见表 4。

3.3 PTA 对小鼠自主活动量及空间工作记忆能力的影响

限量试验及 28 d 重复剂量试验期间各组的总

进入臂次数有所波动,但组间比较未显示出某种固定的趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。限量试验中,与空白组比,PTA 组 8 h 的 SAB% 升高 ($P<0.05$);与本组 0 h 比,PTA 组 7 d($P<0.01$)和 14 d($P<0.01$)的 SAB% 下降。28 d 重复剂量试验中,与自身 0 h 比,PTA 高剂量组 28 d 的 SAB% 升高($P<0.05$),但与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5-8。

3.4 PTA 对小鼠组织形态的影响

4 组小鼠的额叶运动皮层见大量锥体细胞分布,周围见散在分布的胶质细胞;尾状核结构完整,神经纤维网紧凑丰富;海马结构中齿状回颗粒细胞层和海马 CA3、CA2 及 CA1 区的锥体细胞层结构完整,呈带状分布,周围有少许胶质细胞分

表 4 28 d 重复剂量试验中 PTA 对小鼠转棒测试 LTF 的影响($\bar{x}\pm s, s$)

组别	n	0 h	14 d	28 d	35 d
空白组	15	144.58±62.87	193.49±90.97	243.89±88.73	238.81±64.83
PTA 低剂量组	15	140.04±59.78	179.89±78.01	207.98±91.93	189.00±58.72
PTA 中剂量组	15	144.18±68.97	192.53±68.62	220.62±65.63	254.85±68.20
PTA 高剂量组	14	145.28±59.90	176.62±59.67	218.71±43.56	235.75±54.15

注:35 d 空白组,PTA 低、中、高剂量组中小鼠数量依次为 9、9、9、8

表 5 限量试验中 PTA 对小鼠 Y 臂迷宫总进入臂次数的影响($\bar{x}\pm s, n=15, 次$)

组别	0 h	8 h	7 d	14 d
空白组	25.53±5.76	20.27±7.21*	20.53±8.68*	28.47±15.72
PTA 组	26.73±4.96	19.67±5.49**	20.40±6.16**	20.47±8.83*

注:与 0 h 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表 6 28 d 重复剂量试验中 PTA 对小鼠 Y 臂迷宫总进入臂次数的影响($\bar{x}\pm s, 次$)

组别	n	0 h	14 d	28 d	35 d
空白组	15	26.87±5.58	29.33±5.59	27.47±7.97	23.22±7.21
PTA 低剂量组	15	23.33±5.43	24.67±7.15	27.60±7.85	30.00±7.78
PTA 中剂量组	15	24.20±6.19	26.40±6.43	30.53±7.11 $\Delta\Delta$	26.11±7.08
PTA 高剂量组	14	29.43±2.44** $\#$	31.21±5.40*	29.43±5.83	23.75±6.65

注:与 PTA 低剂量组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与中剂量组比较, $\#P<0.05$;与 0 h 比较, $\Delta\Delta P<0.01$;其中 35 d 空白组,PTA 低、中、高剂量组中小鼠数量依次为 9、9、9、8

表 7 限量试验中 PTA 对小鼠 Y 臂迷宫 SAB% 的影响($\bar{x}\pm s, n=15, \%$)

组别	0 h	8 h	7 d	14 d
空白组	67.21±13.82	56.64±20.66	65.17±21.15	62.90±9.01
PTA 组	67.75±9.75	71.26±8.33*	56.62±8.43 $\#$	55.66±12.17 $\#$

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 0 h 比较, $\#P<0.01$

表 8 28 d 重复剂量试验中 PTA 对小鼠 Y 臂迷宫 SAB% 的影响($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	0 h	14 d	28 d	35 d
空白组	15	70.37±11.70	70.668±12.16	68.86±12.15	67.89±14.38
PTA 低剂量组	15	70.61±9.78	66.95±10.64	67.97±13.11	67.90±13.25
PTA 中剂量组	15	66.04±14.47	70.12±13.96	73.41±9.16	64.53±16.23
PTA 高剂量组	14	68.31±7.93	67.82±8.93	75.28±11.33*	51.97±16.74

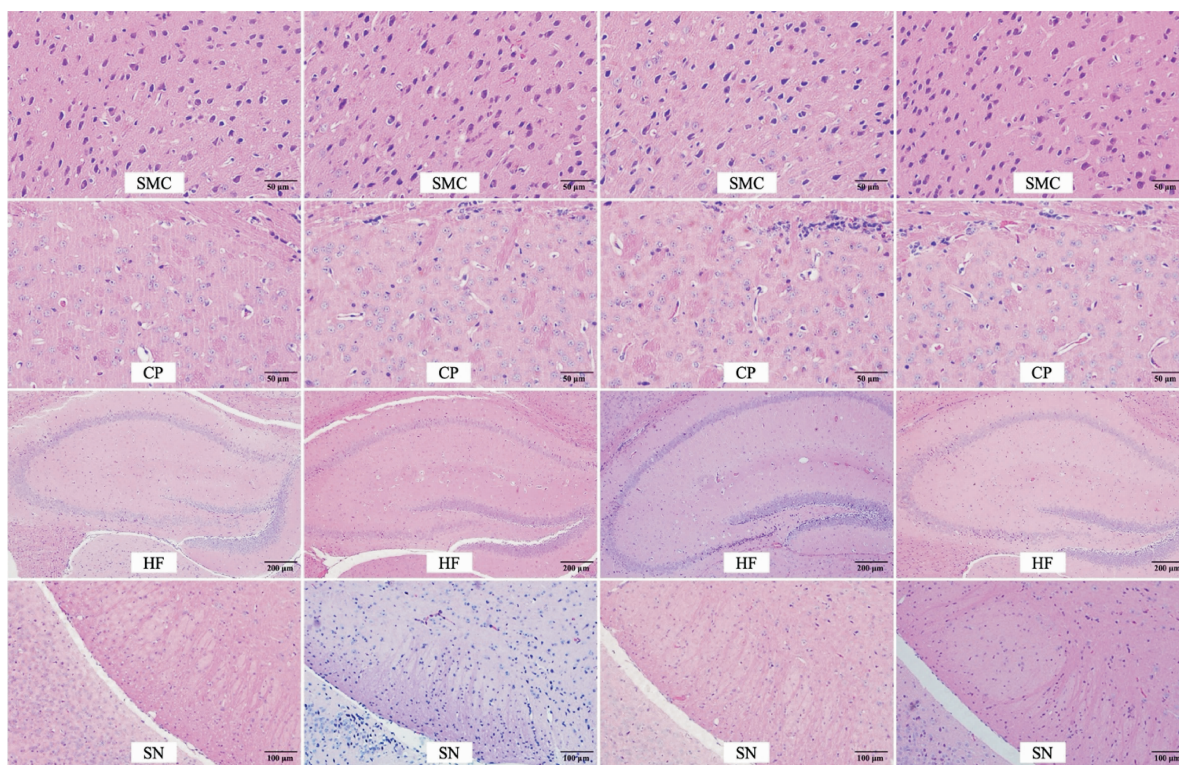
注:与 0 h 比较,* $P<0.05$;其中 35 d 空白组,PTA 低、中、高剂量组中小鼠数量依次为 9、9、8

布;黑质核团及神经纤维网完整;第 4 脑室底部脑桥结构完整,核团清晰可见;小脑皮质可见清晰的分子层、浦肯野细胞层及颗粒层,各层中优势细胞排列整齐;以上结构血管及血管周围腔径适中,未见明显的病变(见图 1-2)。4 组小鼠的颈髓、胸髓及腰髓的前角可见运动角细胞,白质纤维的分布及中央管的室管膜上皮的形态正常,可见不同程度的胶质细胞增生(见图 2),但限量试验及 28 d 重复剂量试验中空白组与 PTA 给药组的胶质细胞增生程度在组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 9-10。

4 讨论

经济合作与发展组织(Organisation for Economic Co-operation and Development)发布的啮齿类动

物神经毒性测试指南将神经毒性定义为任何与治疗有关的、由治疗导致的某个器官的生存能力、再生能力及对环境的适应能力下降到基线水平以下的作用^[14]。由此可知,神经毒性的评价并非简单的“有或无”,而是对药物存在的或潜在的神经毒性作用进行评估。抗癫痫药物(anti-epileptic drugs, AEDs)的急毒作用多为神经毒性,在啮齿类动物上常表现为镇静和运动系统功能下降^[15]。但是,AEDs 在发挥作用时必然会产生中枢抑制作用,因此在判断药物的神经毒性时应该更加慎重;把不同程度的意识水平或活动功能下降都称为“毒性”是不合理的。从常见的 AEDs 不良反应来猜测,其神经毒性可能会表现为不可逆地降低认知、运动和感觉等能力,或产生广泛的抑制作用后使合并其它不良结局的风险增大(如服药后出现嗜睡)^[9]。



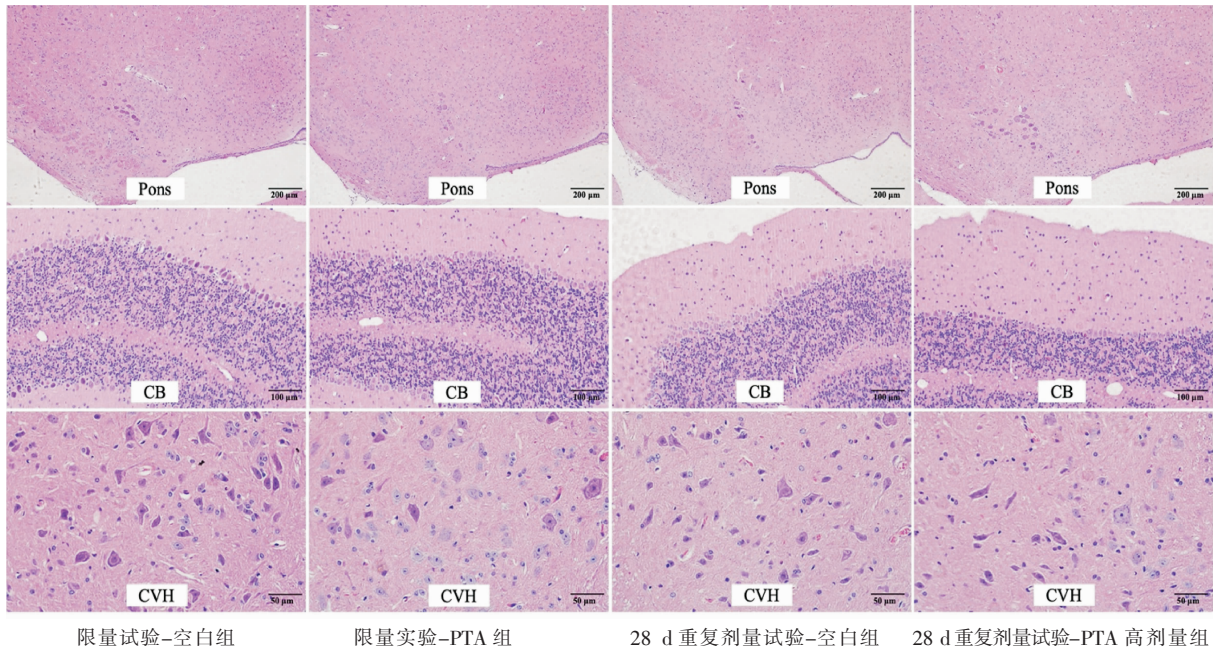
限量试验-空白组

限量试验-PTA 组

28 d 重复剂量试验-空白组 28 d 重复剂量试验-PTA 高剂量组

注:SMC(secondary motor cortex,次级运动皮层, $\times 400$);CP(caudate putamen,尾状核, $\times 400$);HF(hippocampal formation,海马结构, $\times 100$);SN(substantia nigra,黑质, $\times 200$)

图 1 PTA 对小鼠额叶运动皮层、尾状核、海马结构及黑质的组织形态的影响(HE)



注: Pons (脑桥, ×100); CB (cerebellum, 小脑, ×200); CVH (cervical ventral horn, 颈髓前角, ×400)

图 2 PTA 对小鼠脑桥、小脑皮层及颈髓前角的组织形态的影响(HE)

表 9 限量试验中 PTA 对小鼠脊髓前角胶质细胞增生程度的影响($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	n	颈髓	腰髓	n	胸髓
空白组	6	0.83±0.52	1.17±0.52	5	0.20±0.45
PTA 组	6	0.67±0.41	0.67±0.52	6	0.33±0.52

表 10 28 d 重复剂量试验中 PTA 对小鼠脊髓前角胶质细胞增生程度的影响($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	n	颈髓	腰髓	胸髓
空白组	6	0.67±0.41	0.75±0.52	0.50±0.55
PTA 高剂量组	5	0.60±0.65	0.60±0.65	0.20±0.45

转棒测试是神经毒性初筛试验的首选指标之一^[7], 而本研究使用的“加速方案”比既往的“定速方案”能更敏感地发现动物运动平衡能力的细微差异^[11]。Y 臂迷宫测试是药理研究的常用行为学测试方案之一^[16]。其中, SAB% 可反映由海马结构主导的空间工作记忆能力, 该能力还与丘脑、新皮质和基底核等区域的神经网络有关; 总进入臂次数则反映动物的自主活动活跃程度; 另外, 本试验还能用于评估药物的胆碱能抑制作用及多巴胺能和 5-羟色胺能的激活作用^[11, 16]。

在本研究的给药方案下, PTA 未对雄性小鼠的一般健康状态和自主活动量产生显著的负面影响。PTA 单次大剂量给药与重复较低剂量给药似乎对

小鼠的体质量产生了不同趋势的影响(大剂量增加体质量, 较低剂量减少体质量), 提示这两种给药方案可能对小鼠的体质量产生了不同机制的作用(如延长给药时间可能会导致药物作用累积、敏化或耐受)。但以上发现尚不确切, 因 28 d 重复剂量试验的中、高剂量组未发现类似的体质量增减, 即量效关系不显著; 另外, 体质量受较多混杂因素的影响, 单纯的体质量上升或下降并不能直接说明药物的毒性作用。PTA 单剂(2 g/kg)及 28 剂(0.08、0.28、1 g/kg)给药后小鼠转棒测试 LTF 的增速较低, 但未见量效关系, 与空白组比较未得出统计学差异, 而且停药后变化不明显; 提示 PTA 可能对小鼠的运动平衡能力存在一定的降低作用, 但该作用暂未能定义为神经毒性。另外, PTA 单剂(2 g/kg)在给药后 8 h 内, 测得 Y 臂迷宫的 SAB% 出现短暂升高, 在 7 d 和 14 d 复测的 SAB% 虽较前下降, 但与空白组比较无统计学差异; 类似情况可见于 PTA(1 g/kg)给药 28 d 后 SAB% 高于自身给药前, 但与空白组比较亦无统计学差异。尽管 SAB% 反映动物的空间工作记忆能力, 但这两组中出现的单发的 SAB% 升高暂不能解读为“空间工作记忆能力提高”。首先, 这种情况仅见于两个 PTA 给药组的某个测试时间点; 另外, 某些脑区通过控制正常风险探索行为而对学习速度起调控作

用,当这些区域受损时、可能表现为学习速度的异常提高^[17]。

基于以上的可疑阳性发现,本研究参考美国国家毒理部对神经毒性研究的病理切片要求^[13],进一步对与运动系统及空间工作记忆相关的脑区进行病理镜检。病检包含的额叶运动皮层、尾状核、海马结构、黑质、脑桥、小脑皮层和脊髓运动前角均未发现显著的病变,即 PTA 未对以上结构产生显著的毒性作用。因此,我们推测行为学测试的可疑阳性发现可能是:(1)与 PTA 无关的偶然波动;(2)与 PTA 有关的一过性功能改变;(3)病检部位未覆盖到某些罕见的小灶病变区域。

综上所述,在本研究的给药方案及评价指标下,PTA 未对雄性小鼠产生显著的神经毒性,同时亦未对小鼠产生广泛的神经系统抑制性作用,个别时间点出现的行为学水平提高的意义尚不明确。

参考文献

- [1] 王依明,王秋红.半夏的化学成分、药理作用及毒性研究进展[J]. 中国药房,2020,31(21):2676-2682.
- [2] GU Y T, MA Y G, WANG M Z, et al. The effects of Pinellia total alkaloids on the amino acid concentration and the GABAA receptor expression in Hippocampus region of epileptic rats[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2009, 18(3): 252-256.
- [3] CHENG Y X, WANG M Z, CHEN J J, et al. Synergistic effect of pinellia total alkaloids and uncaria total alkaloids on anti-convulsant action in mice and rats[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2007(2): 139-145.
- [4] 邓楚欣,于征森.阴痫大鼠模型的建立与证候评价[J].中华中医药杂志,2017,32(3):1363-1368.
- [5] DENG C X, WU Z B, CHEN Y, et al. Pinellia total alkaloids modulate the GABAergic system in hippocampal formation on pilocarpine-induced epileptic rats[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2020, 26(2): 138-145.
- [6] LÖSCHER W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs[J]. Seizure, 2011, 20(5): 359-368.
- [7] GALANOPOULOU A S, MOWREY W B. Not all that glitters is gold: A guide to critical appraisal of animal drug trials in epilepsy[J]. Epilepsia Open, 2016, 1(3/4): 86-101.
- [8] 赵超英,姜允申.神经系统毒理学[M].北京:北京大学医学出版社,2009:46-187.
- [9] TURNER B. Organisation for economic co-operation and development (OECD)[M]//The Statesman's Yearbook 2005. London: Palgrave Macmillan UK, 2004: 44-46.
- [10] 邓楚欣.PTA 对癫痫大鼠的疗效及对 GABA 能系统和 BDNF/TrkB 表达的影响[D].广州:广州中医药大学,2019.
- [11] GHAFOURI S, FATHOLLAHI Y, JAVAN M, et al. Effect of low frequency stimulation on impaired spontaneous alternation behavior of kindled rats in Y-maze test[J]. Epilepsy Research, 2016, 126: 37-44.
- [12] HIDAKA N, SUEMARU K, ARAKI H. Serotonin-dopamine antagonism ameliorates impairments of spontaneous alternation and locomotor hyperactivity induced by repeated electroconvulsive seizures in rats[J]. Epilepsy Research, 2010, 90(3): 221-227.
- [13] RAO D B, LITTLE P B, MALARKEY D E, et al. Histopathological evaluation of the nervous system in National Toxicology Program rodent studies: A modified approach[J]. Toxicologic Pathology, 2011, 39(3): 463-470.
- [14] Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guidelines 424 Neurotoxicity Study in Rodents[M]. Paris: 1997.
- [15] LÖSCHER W, FASSBENDER C P, NOLTING B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anti-convulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models[J]. Epilepsy Research, 1991, 8(2): 79-94.
- [16] PAUL C M, MAGDA G, ABEL S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents[J]. Behavioural Brain Research, 2009, 203(2): 151-164.
- [17] U.S. Environmental Protection Agency. Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment[J]. Federal Register, 1998, 63(93): 26926-26954.

(本文编辑 苏 维)