

过高而引起毒性反应。从图 1 可以看出七叶皂苷钠体外对 L1210 细胞的抑制作用虽然非常明显,但量-效曲线陡峭,有效浓度范围窄,这些均意味着该药物的安全指数较低。在体外诱导 HL-60 细胞凋亡的实验中,七叶皂苷钠在小于 10 $\mu\text{g/mL}$ 时无明显的增殖抑制作用,而在 70 $\mu\text{g/mL}$ 时显示明显的细胞毒活性^[9]。因此在本实验中设计与阿霉素联合用药研究时,采用了低剂量的七叶皂苷钠,以观察七叶皂苷钠对阿霉素的增敏作用,目的是从另一个角度来考察该药物的作用,以发挥中药的本来特色。结果表明低剂量的七叶皂苷钠虽然没有直接的治疗作用,但可以明显提高常规化疗药阿霉素的疗效,起到增效减毒的作用,具有更深远的意义。

另外,结果表明七叶皂苷钠中剂量组体内抑瘤作用明显,其作用与化疗药阿霉素 (2 mg/kg) 基本接近。近年来,有关七叶皂苷钠抗肿瘤活性已有所报道,研究发现七叶皂苷钠具有抑制人鼻咽癌 KB 细胞、小鼠肝癌 H₂₂ 细胞、小鼠肉瘤 S₁₈₀ 细胞及大肠癌 HCT-8 细胞生长的作用^[3,4]。Patlolla 等^[5]报道七叶皂苷钠能够抑制小鼠 ACF (结肠癌前病变) 的形成,以及诱导 HT-29 人克隆结肠癌细胞凋亡,但有关作用机制报道甚少。研究表明七叶皂苷钠的代谢产物可以有效抑制小鼠肉瘤、肺癌和肝癌细胞的生长,说明七叶皂苷钠进入小鼠体内在发挥直接抑制肿瘤细胞生长的同时,其代谢后的活化产物也具有抑制肿瘤生长的作用^[10]。另外七叶皂苷钠抗炎机制研究表明:七叶皂苷钠具有通过促进 K⁺ 离子进入通道,提高静脉张力,促进前列腺素 F_{2a} 的释放,拮抗组胺和 5-羟色胺的释放,以及降低组织中透明质酸酶活性等作用。其中的一些特性与七叶皂苷钠潜在的体内抗肿瘤作用有关,如前列腺素 F_{2a} 可以强烈抑制由二甲胂诱导大鼠结肠腺癌细胞的增殖^[11];具有抗透明酸活性的化合物往往同时具有抗肿瘤活性,抗透明酸活性越强其抗肿瘤活性也越强^[12]。从这些现象也许可以解释七叶皂苷钠的体内显著抗肿瘤作用,具体机制有待进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Sirtori C R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile [J]. *Pharmacol Res*, 2001, 44(3): 183-193.
- [2] 侯广平, 池广明. 七叶皂苷的药理作用及其主要临床应用 [J]. *中国药师*, 2004, 7(3): 206-208.
- [3] 郭维, 徐波, 杨秀伟. β -七叶皂苷钠的抗肿瘤作用研究 [J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(3): 351-352.
- [4] 邹明, 韩英, 纪欣. 七叶皂苷抑制大肠癌 HCT-8 细胞生长及提高癌细胞对 5-FU 敏感性的研究 [J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(4): 248-249.
- [5] Patlolla J M, Raju J, Swamy M V, et al. Beta-Escin inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats and regulates the cell cycle growth by inducing p21 (waf1/cip1) in colon cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(6): 1459-1466.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [7] Lacaille-Dubois M A, Wagner H. *In Studies in Natural Products Chemistry* [M]. Elsevier; Amsterdam, 2000.
- [8] 牛浹平, 高瑞兰, Helen T. 人参皂苷诱导 HL-60 细胞凋亡的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22(6): 449-453.
- [9] 牛浹平, 宋必卫, 王文喜. β -七叶皂苷钠对髓性白血病细胞 HL-60 的抑制增殖及诱导凋亡作用研究 [J]. *中华实用中西医结合杂志*, 2005, 19(2): 1097-1099.
- [10] 杨秀伟, 赵静, 崔景荣, 等. 七叶树皂苷-1a 的人肠内细菌生物转化产物及其抗肿瘤活性研究 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2004, 36(1): 31-35.
- [11] Tutton P J, Barkla D H. Influence of prostaglandin analogues on epithelial cell proliferation and xenograft growth [J]. *Br J Cancer*, 1980, 41(1): 47-51.
- [12] Stone O J. Cancer resistance, carcinogenesis and ground substance viscosity [J]. *Med Hypotheses*, 1986, 20(1): 117-124.

自主活动实时测试分析处理系统的建立与开心散安神镇静作用验证

王琼^{1,5}, 买文丽⁵, 李翊华², 陈善广^{3*}, 王立为¹, 冯志强⁵, 朱轶范⁴, 刘新民^{1*}

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100093; 2. 中国科学院大恒集团, 北京 100083;

3. 中国航天员科研训练中心, 北京 100094; 4. 北京三维拓盟数字影像技术有限公司, 北京 100007;

5. 泸州医学院, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 建立自主活动实时测试分析处理系统,并用此系统检测安神中药复方开心散对小鼠自主活动的影

收稿日期: 2009-01-20

基金项目: 国家人事部中医药回国人员重点基金资助项目 (2003LHR01); 国家科技部国际科技合作重点资助项目 (2006DFA21740)

* 通讯作者 刘新民 E-mail: liuxinmin@hotmail.com 陈善广 E-mail: tjgercsg@163.com

响。方法 将计算机、信息和图像分析技术集成用于动物自主活动测试实验中,在线分析获取大鼠、小鼠自主活动的信息资源,采用模式识别、数据挖掘等技术对信息资源进行科学组合和深层次开发,提取包括运动距离、运动时间、运动速度、静息时间以及各种比值以及运动轨迹等快速灵敏、规范客观的评价指标;利用正常小鼠、安定和咖啡因造模的小鼠、开心散中药复方,对系统的稳定可靠性进行实验研究。**结果** 该系统用于评价动物自主活动的指标客观灵敏,所获数据与原人工检测方法所获结果具有高度相关性, $r>0.9$;该系统有很好的重现性和稳定性。**结论** 自主活动实时测试分析处理系统集各种信号监测、采集、自动判别、贮存、结果分析、统计处理和输出一体化,为安神药物的实验研究提供了一套自动化程度高、提取信息量大、可供推广应用的自主活动实时测试分析处理系统。

关键词: 自主活动; 安神; 开心散

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)11-1773-07

Establishment of computer-based image-processing system for animal's locomotor activity and sedative verification by Kaixin Powder

WANG Qiong^{1,5}, MAI Wen-li⁵, LI Yi-hua², CHEN Shan-guang³, WANG Li-wei¹,
FENG Zhi-qiang⁵, ZHU Yi-fan⁴, LIU Xin-min¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100093, China; 2. DaHeng Group, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100083, China; 3. The Scientific Research and Training Center for Chinese Astronauts, Beijing 100094, China; 4. Beijing 3D CT and DR Technology Corp., Beijing 100007, China; 5. Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

Abstract: Objective To set up a system for computer-based image-processing for animal's locomotor activity test in sedative Chinese materia medica (CMM), Kaixin Powder, one of traditional complex prescription. **Methods** Combining the advantage of computer sciences, information knowledge, and imaging analyzed technique into the open field test, the data of mice locomotor activities were collected and analyzed with technique of pattern-recognition, data mining, etc. The total distance, time and speed of movement, resting time and their ratios in the open field were developed; and those various indexes in central area and peripheral area in the open field were established. The system was also verified by using Kaixin Powder. **Results** Those indexes were sensitive and objective for judging animal's locomotor activity. The correlation coefficient of those indexes collected by computer and manpower was over 0.9, which indicated that the system had better reproducibility and stability. **Conclusion** The results show that the system could provide an automatic and intelligent method for studying sedative CMM with integration for monitor, collection, analysis, storage, statistics, and output of experimental data and results.

Key words: locomotor activity; sedative; Kaixin Powder

随着现代生活节奏的加快,人们面临的各种竞争压力越来越大,焦虑症、失眠症等已成为严重影响人类身心健康的社会性问题,从中药中寻找有效的防治药物已成为国内外中药研究中的热点^[1]。目前国内外关于安神中药作用机制研究和药物筛选的行为学方法主要包括自主活动、洞板实验、光电记数法、抖笼法、悬吊法、滚桶法以及遥感大鼠脑电图分析等,而自主活动是应用最多,最广泛的一种^[2]。近年来,国际上利用摄像技术,实现了动物自主活动图像的实时跟踪和在线分析^[3,4],国内应用较多的是采用红外感应、压力传感等技术,将动物在自主活动测试箱内的活动表现经相应换能器转换为数字信号后送入计算机处理^[5]。

本课题组在进行安神益智、抗抑郁中药药理实验过程中,在研制完成动物学习记忆计算机图像在线检测分析处理系统的基础上^[6,7],参考国内外已

有的自主活动研究方法,集成计算机、信息、数据挖掘和图像分析处理等多种技术,研制了用于大鼠、小鼠的自主活动实时测试分析处理系统。本实验建立自主活动实时测试分析处理系统,并用相关药物进行系统稳定性的验证,同时探讨其用于安神中药研究中的可行性。

1 材料

1.1 硬件研制所需器材:计算机(Pentium 2.4 GHz,内存:512 M,硬盘:80 G,显卡:Geforce 4 MX 440)、摄像机(CRE, PAL 制式, CCD 黑白相机;镜头可变焦距为 3.5~8 mm)、视频图像卡(大恒 CG-4000 图像采集卡 768×576 像素; AD8 位:0~255; 频率 25 帧/s; 数据传输方式 DMA); HP-1010 打印机;自主活动测试箱,黑色金属材料制作。
1.2 药品:安定,北京益民药业有限公司,批号 0607090;咖啡因,北京化学试剂公司,批号

20060104。所有药品临用前用蒸馏水配制。开心散按人参、茯苓、远志、石菖蒲 3:3:2:2 的比例,各取适量切碎,8 倍量水浸泡 30 min,加热煮沸,文火煎煮 30 min,趁热滤过;再按同法煎煮两次;合并 3 次滤液,水提物浓缩、低温减压干燥,最后制成粉剂(相当于生药 7.61 g/g)。人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 9 月采,产地吉林;远志 *Polygala tenuifolia* Wild. 秋季采,产地山西;石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 产地四川,秋季采;茯苓(*Poria*)产地湖北,7 月采。以上药材由中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所张本刚教授鉴定,生药样本保存于中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所标本馆(人参样本批号 20060107,远志样本批号 20061018,石菖蒲样本批号 20060916,茯苓样本批号 20060703)。

1.3 实验动物:ICR 小鼠,SPF 级,雌雄各半,体质量 18~22 g,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(J)2002-0003。给药期间饲养于 SPF 动物房,光照时间 12 h,自由供给标准饲料和清洁自来水。

2 自主活动实时测试分析处理系统的建立

2.1 自主活动测试箱:根据国内外文献报道,多数研究者采用了方形测试箱,但方形实验范围容易出现死角,结合实验实际情况,本实验选用圆形测试箱。小鼠测试箱为 4 个相同大小的具有斜度的桶组成:底面直径 30 cm,上口直径 34 cm,高 40 cm,桶壁斜度离垂直面的角度为 7.6°,保证摄像头完整采集动物的活动情况,自主活动测试箱采用封闭式设计,并将所有测试箱置于 80 cm×80 cm×150 cm 的封闭外箱内,外箱内部顶端离箱底 150 cm 高度安置两组照明灯,通过毛玻璃过滤,投射到桶底,桶的材料采用防反光的黑色糙面金属,从各个可能的方面阻止反光的形成,并与动物白色身体相区分。外箱前面设置自由开启门,侧面有电源开关和光线调节旋钮,方便实验操作。实验装置图见图 1。

2.2 摄像系统:摄像头安置于自主活动箱内面顶端,对动物在测试箱内的活动情况实施实时监控,通过摄像机将活动的视频信号传送给视频卡,实时采集动物的运动信息。实验数据以文件方式保存,统计和分析结果用 Excel、Html、Txt 文件格式显示,可以用打印机打印输出。效果图见图 2。

2.3 软件设计:该软件用 Visual Studio. NET2003 开发环境编写而成,运行于中文 Windows2000/XP 操作系统,实现对大鼠、小鼠自主活动行为的实时信

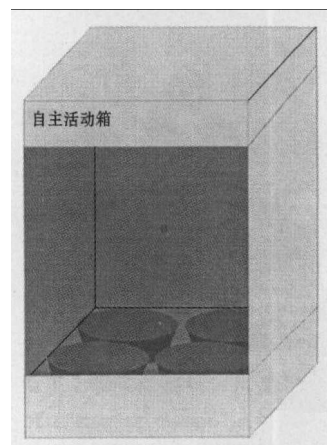


图 1 自主活动实时测试分析处理系统的外观图
Fig. 1 Device of computer-based image-processing system for locomotor activity

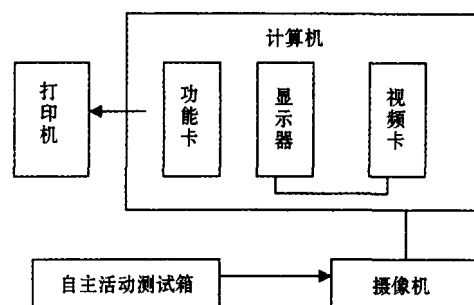


图 2 自主活动实时测试分析处理系统的硬件连接图
Fig. 2 Hardware diagram of computer-based image-processing system for locomotor activity

息采集和统计分析。该软件采用统一界面、统一风格和统一数据格式,具有界面友好、操作方便的特点;由于采用结构化、模块化设计方法,该软件使用及维护简单,且易于扩展。主程序包括“实验参数”、“参数设置”、“开始实验”和“数据回放及分析”4 个功能模块。系统软件按动物在测试箱内的活动情况界定其活动和静息两种状态,并将测试箱划分为中央/周边(二区/一区)等不同区域,通过准确捕获动物在自主活动测试箱中带时间坐标轴的活动轨迹,提取出各区域动物的运动时间、运动路程、运动速度、静息时间,以及相应比值等评价指标。软件界面见图 3。

3 动物实验

3.1 自主活动实时测试分析处理系统对动物活动状态监测可靠性的验证

3.1.1 小鼠运动阈值的确定:ICR 小鼠 23 只,SPF 级,雄性,放入测试箱适应 2~3 min 后,完成实验参数的设置,将实验时间设置于 10 min。键入开始命令,用秒表人工计算动物的运动时间(以动物的双后腿移动为肉眼评价动物运动的标准,其他所有的

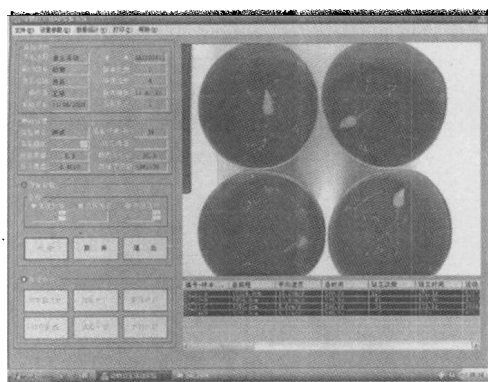


图 3 自主活动实时测试分析处理系统的软件界面图

Fig. 3 Software interface of computer-based image-processing system for locomotor activity

活动状态归为静息,包括理毛、修饰、嗅闻等),此时摄像机自动追踪小鼠在测试箱内的活动情况,并以实时活动轨迹图像显示。实验结束,将人工计时的数据与摄像机自动追踪获得的小鼠运动时间进行比较,以确定合适的运动阈值。以人工观察的运动时间检验计算机判断的各个运动阈值,选用计算机与人工判断较近的几个阈值(2.0、3.1、6.5、9.7、10.8 s),再进行第2次优选,当相关性达0.9或以上作为阈值确认值,低于此值判断动物为静息。实验结果见表1。结果表明,运动阈值在6.5 s时,计算机与人工观察值有高度相关性,对此进行了超过30批次的实验,结果类似。在确定运动阈值后,对计算机检测的运动时间、总路程、区内时间进行人机相关性验证。

表 1 小鼠运动阈值的确认 ($\bar{x} \pm s$, $n=23$)Table 1 Establishment of threshold for judging of mice movement by computer ($\bar{x} \pm s$, $n=23$)

方法	时间/s				
	2.0 s	3.1 s	6.5 s	9.7 s	10.8 s
人工	58.51±29.26	58.51±29.26	58.51±29.26	58.51±29.26	58.51±29.26
计算机	138.48±41.39	92.83±34.42	44.53±20.00	25.73±12.72	21.55±11.17
相关系数	0.87	0.89	0.91	0.88	0.87

3.1.2 运动时间和总路程相关性检验

运动时间:ICR小鼠28只,雌雄各半,放入测试箱适应2~3 min后,实验时间设置为10 min,同3.1.1项方法操作秒表人工计算动物的运动时间,与摄像机自动监测得到的小鼠运动时间比较,计算人机相关性。

总路程:ICR小鼠51只,雄性,将每个测试箱底面分为24格,同上完成实验参数的设置,将实验时间设置为5 min,键入开始命令,人工计算动物的走格数(以动物4只腿进入同一格作为“一格”的运

动距离),同时摄像机自动监测动物的运动总路程。利用确定的运动阈值(6.5)检测计算机与人工观察的相关性,以相关性达0.9或以上作为准确判断标准,结果见表2。结果表明,在运动时间和总路程两个指标上,运动阈值在6.5时,计算机与人工计数有很好的相关性,均大于0.9。更主要的是由于计算机和摄像技术的应用,捕捉到了实验动物在每一点的活动信息,利用自行研制的系统软件进行优化分析处理,建立了包括各区域运动时间、运动路程、速度、静息及各种比率等评价指标,以及动物在测试箱中带时间坐标轴的活动轨迹,使得实验中的评价指标更客观规范(下述)。

表 2 计算机与人工计数小鼠运动时间和总路程的相关性 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Correlation of movement time and movement distance of mice collected by computer and manpower ($\bar{x} \pm s$)

方法	运动时间/s	总路程
人工	36.55±21.17	94.64±60.28(走路数)
计算机	38.86±17.91	2 932.61±2 215.21 (cm)
相关系数	0.93	0.91

3.2 自主活动实时测试分析处理系统各指标可靠性的验证

3.2.1 镇静模式:ICR小鼠32只,雌雄各半,随机分成4组:对照1组、安定组;对照2组、咖啡因组。安定组实验前ig给以安定2 mg/kg、咖啡因组实验前ig给以咖啡因30 mg/kg,给药体积为0.2 mL/10 g,对照组给以等体积的蒸馏水,给药后45 min将小鼠置于测试箱内适应3 min,选择镇静模式,照前述方法进行实验。实验时间10 min。实验结果转换为可供SPSS统计分析的数据格式,采用方差分析(one-way ANOVA)和Duncan's检验方法检验。所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果见表3和图4。

实验结果表明,与对照组比,安定能明显减少动物的运动总路程、运动总时间、平均速度,增加静息总时间,从而使运动时间比率减少、静息时间比率增加;减少中央区运动路程、运动时间、中央区运动时间比率;减少周边区运动时间、周边区运动时间比率;增加周边区静息时间、周边区静息时间比率。

中枢兴奋药咖啡因与对照组比,能明显增加动物的运动总路程、运动总时间、平均速度,减少静息总时间,从而使运动时间比率增加、静息时间比率减少;增加中央区运动路程、运动时间、中央区运动时间比率;增加周边区运动路程、周边区运动时间、周边区运动时间比率;减少周边区静息时间、周边区静

表 3 安定和咖啡因对小鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Diazepam and caffeine on locomotor activity in mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

指标	对照 1		安定		对照 2		咖啡因	
总路程/cm	1 623.30±1 019.89		636.71±496.04*		520.98±331.70		1 239.73±500.08**	
平均速度/(cm·s ⁻¹)	2.71± 1.70		1.06± 0.83*		0.87± 0.55		2.07± 0.83**	
运动总时间/s	130.62± 65.62		54.84± 40.29**		46.41± 27.24		104.39± 38.34	
静息总时间/s	469.27± 65.62		545.07± 40.29**		553.48± 27.24		495.50± 38.35**	
运动时间比率	0.22± 0.11		0.09± 0.07**		0.08± 0.05		0.17± 0.07**	
静息时间比率	0.78± 0.11		0.91± 0.07**		0.92± 0.05		0.83± 0.07**	
中央区时间/s	167.32± 70.88		220.24±128.81		119.62±100.80		175.19± 93.35	
中央区运动路程/cm	672.50± 154.76		264.43±212.89**		257.64±181.51		625.35±268.90**	
中央区运动时间/s	49.23± 13.41		20.20± 14.33**		19.19± 13.12		46.00± 20.61**	
中央区运动速度/(cm·s ⁻¹)	14.01± 2.33		12.04± 1.85		13.23± 1.44		13.61± 1.33	
中央区静息时间/s	118.09± 59.32		200.03±130.55		100.43± 89.51		129.19± 76.98	
中央区时间比率	0.28± 0.12		0.37± 0.21		0.20± 0.17		0.29± 0.15	
中央区路程比率	0.48± 0.15		0.44± 0.14		0.48± 0.12		0.49± 0.14	
中央区运动时间比率	0.08± 0.02		0.04± 0.02**		0.03± 0.02		0.08± 0.04**	
中央区静息时间比率	0.20± 0.10		0.33± 0.22		0.17± 0.15		0.22± 0.13	
周边区时间/s	432.57± 70.88		379.66±128.80		480.27±100.80		424.70± 93.36	
周边区运动路程/cm	950.80± 934.01		372.28±331.07		263.34±156.10		614.38±325.54*	
周边区运动时间/s	130.62± 65.62		54.84± 40.29**		553.48± 27.24		495.50± 38.35**	
周边区运动速度/(cm·s ⁻¹)	13.40± 1.53		12.31± 1.34		12.59± 0.99		12.95± 1.16	
周边区静息时间/s	469.27± 65.62		545.07± 40.29**		553.48± 27.24		495.50± 38.35**	
周边区时间比率	0.72± 0.12		0.63± 0.21		0.80± 0.17		0.71± 0.15	
周边区路程比率	0.52± 0.15		0.56± 0.14		0.52± 0.12		0.51± 0.14	
周边区运动时间比率	0.22± 0.11		0.09± 0.07**		0.08± 0.05		0.17± 0.07**	
周边区静息时间比率	0.78± 0.11		0.91± 0.07**		0.92± 0.05		0.83± 0.07**	

与对照 1 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与对照 2 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group 1; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group 2

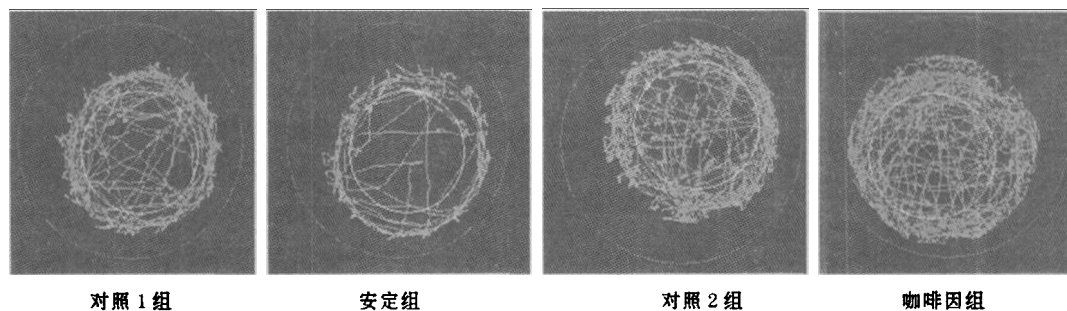


图 4 咖啡因和安定对小鼠自主活动影响的轨迹图

Fig. 4 Movement trails of mice in open field after being treated with Diazepam and caffeine

息时间比率。实验结果也可从各组动物的运动轨迹图上得到证实(图 4)。

3.2.2 抗抑郁模式:ICR 小鼠 78 只,雌雄各半,打开系统软件,选择“抗抑郁”模式,完成实验参数的设置,实验时间 10 min。小鼠置于测试箱适应 2~3 min 后,键入开始命令,实验开始,此时摄像机自动追踪小鼠在测试箱内的运动情况,并显示实时活动轨迹图像。在计算机自动采集数据的同时,实验人员用秒表计算动物的运动总时间,实验结束,将小鼠互换测试箱,再进行同样的实验。实验完成后,利用存贮的文件,采用 t 检验,将动物改变环境前后的运动总时间进行统计分析比较,实验结果见表 4。

表 4 计算机和人工监测小鼠改变环境前后运动总时间的变化 ($\bar{x} \pm s, n=78$)

Table 4 Difference of movement time before and after environment changes for mice collected by computer and manpower ($\bar{x} \pm s, n=78$)

实验条件	计算机/s	人工/s	相关性
改变环境前	24.40±24.50	27.85±19.12	0.93
改变环境后	35.48±31.09**	17.54±25.25**	0.93

与改变环境前比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group before environment change

环境改变增加了小鼠的运动总时间,这种改变可通过计算机自动检测,同时人机相关性达 0.93。

3.3 自主活动实时测试分析处理系统检测开心散

对小鼠自主活性的影响:ICR 小鼠 40 只,雄性,随机分为 5 组,对照组,模型组(咖啡因),阳性药组(安定组),开心散大、小剂量组(4、8 g/kg)。开心散各组 ig 给药,给药体积 0.2 mL/10 g,连续 7 d,每天 1 次,对照组和阳性药组于同一时间给以同样体积的双蒸水。末次给药 45 min 后,除对照组外,其余各组均 ip 咖啡因 30 mg/kg,安定组于咖啡因给药后 15 min ip 安定 2 mg/kg,15 min 后进行实

验。将动物放入测试箱,适应 3 min,开始实验 10 min。实验结果见表 5。

实验结果表明,开心散小剂量能明显对抗咖啡因所致的动物活动量增加,表现出总路程、运动总时间、平均速度、运动时间比率、中央区时间比率、中央区运动路程、中央区运动时间、周边区静息时间等指标减少;静息总时间、静息时间比率、周边区运动时间比率增加。

表 5 开心散对小鼠自主活动的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 5 Effect of Kaixin Powder on locomotor activity in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

指 标	对 照	咖 啡 因	安 定	开 心 散 (4 g · kg ⁻¹)	开 心 散 (8 g · kg ⁻¹)
总路程/cm	5 451.86±584.90 **	10 285.91±1 328.89	4 344.60±462.13 *	6 177.00±722.71 *	8 114.83±742.48
平均速度/(cm · s ⁻¹)	2.04± 0.20 **	3.79± 0.47	1.58± 0.17 **	2.31± 0.25 *	3.00± 0.28
运动总时间/s	92.76± 8.07 **	161.96± 15.49	66.15± 7.57 **	105.49± 10.03 **	131.73± 11.08
静息总时间/s	507.10± 8.06 **	437.89± 15.49	533.75± 7.57 **	494.40± 10.03 **	468.16± 11.09
运动时间比率	0.15± 0.01 **	0.27± 0.03	0.11± 0.01 **	0.18± 0.02 **	0.22± 0.02
静息时间比率	0.85± 0.01 **	0.73± 0.03	0.89± 0.01 **	0.82± 0.02 **	0.78± 0.02
中央区时间/s	170.13± 30.45	226.02± 17.75	167.45± 39.65	175.35± 25.59	161.86± 23.09
中央区时间比率	0.06± 0.01 **	0.13± 0.02	0.04± 0.01 **	0.07± 0.01 **	0.09± 0.01 *
中央区运动路程/cm	2 653.33±452.26 **	5 757.23± 878.27	1 914.38±398.19 **	3 016.81±436.63 **	4 067.38±515.35
中央区运动时间/s	38.64± 6.08 **	78.22± 9.44	24.59± 5.99 **	44.69± 6.38 **	55.18± 6.85
中央区运动速度/(cm · s ⁻¹)	67.88± 2.27	72.30± 3.47	85.24± 6.79 *	67.48± 2.57	74.25± 2.98
中央区静息时间/s	131.51± 26.46	147.81± 14.55	142.84± 35.76	130.66± 21.76	106.73± 17.26
中央区路程比率	0.47± 0.04	0.56± 0.03	0.41± 0.05 **	0.49± 0.04	0.50± 0.03
中央区运动时间比率	0.24± 0.03 *	0.35± 0.04	0.19± 0.04 **	0.27± 0.03	0.35± 0.02
中央区静息时间比率	0.76± 0.03 *	0.65± 0.04	0.81± 0.04 **	0.73± 0.03	0.65± 0.02
周边区时间/s	429.76± 30.45	432.45± 39.65	373.87± 17.75	424.55± 25.59	438.01± 2.09
周边区运动路程/cm	2 798.54±241.28	2 430.24± 212.91	4 528.67±701.23 **	3 160.19±489.61	4 047.44±442.15
周边区运动时间/s	54.15± 3.49 *	41 655.00± 2.82	83.74± 9.77 **	60.81± 7.30	76.55± 7.90
周边区运动速度/(cm · s ⁻¹)	51.18± 1.46	58.71± 3.02	52.81± 2.20	50.74± 1.63	52.76± 1.16
周边区静息时间/s	375.61± 31.22 *	390.88± 40.99	290.13± 14.45 **	363.75± 22.53 *	361.45± 22.43 *
周边区时间比率	0.09± 0.01 *	0.07± 0.00	0.14± 0.02 **	0.10± 0.01	0.13± 0.01
周边区路程比率	0.53± 0.04	0.59± 0.05	0.44± 0.03 *	0.51± 0.04	0.50± 0.03
周边区运动时间比率	0.13± 0.01 **	0.10± 0.01	0.22± 0.02 **	0.14± 0.01 *	0.18± 0.02
周边区静息时间比率	0.87± 0.01 **	0.90± 0.01	0.78± 0.02 **	0.86± 0.01 *	0.82± 0.02

与咖啡因组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs caffeine group

4 讨论

本系统要保证对动物的清晰摄像,不能采用加盖方式,而只能增加测试箱高度,但高度的增加,有可能使一个摄像机同时捕获多个动物活动情况时产生死角,为此采用了圆形测试箱,并使测试箱成一定的角度,这样很好地解决了这些难题。同时,采用封闭式箱体设计,模拟自然环境,尽可能避免外界因素的干扰。经过 50 多批次、超过 500 个样本的研究结果表明,自主活动实时测试分析处理系统评价小鼠活动的可靠性强。当运动阈值为 6.5 时,计算机所获取的运动路程、运动时间等信息与人工所能获得的指标相比,有着高度的吻合性,相关系数大于 0.9。

安定是经典的镇静安神药物,使用安定后,选择

“镇静模式”用本系统监测结果显示,与对照组比,小鼠的总运动路程、运动总时间、平均速度显著减少,而静息总时间显著增加、运动时间比率减少、静息时间比率增加,从而验证了安定的镇静安神作用;也能反映其抗焦虑作用,表现为显著减少周边区运动时间、周边区运动时间比率,增加周边区静息时间、周边区静息时间比率,明显减少中央区运动路程、中央区运动时间、中央区运动时间比率。

用经典的兴奋药咖啡因对小鼠处理后,通过本系统的测试,结果表明,与对照组比,运动总路程、运动总时间、平均速度明显增加,静息总时间减少、运动时间比率增加、静息时间比率减少,中央区运动路程、中央区运动时间、中央区运动时间比率增加,周

边区运动路程、周边区运动时间、周边区运动时间比率增加,而周边区静息时间、周边区静息时间比率明显减少。因此本系统的这些指标和阳性药的特点有很高的重合性。

Mauricette 等^[8]研究表明,抑郁小鼠在新奇环境的活动增加,抗抑郁药西酞普兰能剂量依赖性增加小鼠在新活动箱内的活动量。本实验使用抗抑郁模式对 ICR 小鼠变换实验环境前后的研究表明,正常动物在测试箱变换后,也表现出对新测试环境的新奇性,运动时间与之前相比,显著增加 ($P < 0.01$)。

开心散由人参、茯苓、远志、石菖蒲 4 味药组成,始载于唐·孙思邈之《备急千金要方》,为益气养心、安神定志之代表方剂。应用开心散对本套系统进行验证,结果表明,开心散 4 g/kg 可明显减少小鼠的运动总时间、总距离、运动时间比率,增加静息总时间、静息时间比率;减少小鼠中央区运动时间、中央区运动距离、中央区时间比率;增加周边区运动时间比率、减少周边区静息时间比率。与对照组和阳性药安定组相比,开心散 4 g/kg 在不增加周边区运动时间的基础上,减少周边区静息时间,说明开心散比安定有更为全面的镇静基础。其机制可能与中药的整体综合调节优于化学药的单一靶点有关。从而体现出本套系统在中药药理学研究中的应用优越性,能更为全面的反应这种成分复杂、多组分综合作用、且作用多途径、多靶点的中药及中药复方对动物行

为学影响的细微变化。

由于计算机、信息和图像分析处理等多种技术集成用于动物自主活动研究,不仅实现了系统运行状态、动物的活动图像及活动轨迹的实时监测,使得整个实验过程更为客观准确,更主要的是使得提取的信息量大大增加,获得了运动总路程、运动总时间、平均速度、各区的相关指标及比率等。这些指标客观、敏感、细微,对温和的中药药效研究有重要的价值。

参考文献:

- [1] Murphy J M, Horton N J, Laird N M, *et al.* Anxiety and depression: a 40-year perspective on relationships regarding prevalence, distribution, and comorbidity [J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2004, 109: 355-375.
- [2] 彭 博, 刘新民, 王立为. 安神中药药理研究方法综述 [J]. *中草药*, 2005, 36(8): 1257-1260.
- [3] Salmi P, Ahlinius S. Sedative effects of the dopamine D1 receptor agonist A68930 on rat open-field behavior [J]. *Neuro-report*, 2001, 11(6): 1269-1272.
- [4] Lalonde R, Lewis T L, Trazielle C S. Transgenic mice expression the β APP695 SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination [J]. *Brain Res*, 2003, 977(1): 38-45.
- [5] 李仪奎. 小动物自发活动计算机实时分析系统 [J]. *中国药理学通报*, 1990, 6(2): 127-128.
- [6] 刘新民, 陈善广, 王圣平, 等. 计算机控制的避暗自动测试系统 [J]. *中国医学科学院学报*, 1995, 17(6): 466-469.
- [7] 刘新民, 王圣平, 于澎仁, 等. 小鼠跳台的计算机自动管理系统 [J]. *中国实验动物学报*, 1994, 2(1): 20-25.
- [8] Mauricette B, Dekeyne A, Veiga S, *et al.* Induction of hyperlocomotion in mice exposed to a novel environment by inhibition of serotonin reuptake A pharmacological characterization of diverse classes of antidepressant agents [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 71: 667-680.

龙葵碱调控还原型谷胱甘肽和活性氧氧化还原体系损伤线粒体超微结构诱导 HepG2 细胞凋亡

高世勇^{1,2}, 徐丽丽^{1,2}, 季宇彬^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 探讨龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡与线粒体损伤的关系。方法 倒置显微镜观察细胞形态, Annexin V/PI 双染激光共聚焦扫描显微术检测细胞凋亡, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。透射电镜观察细胞线粒体超微结构, CDFH-DA 染色激光共聚焦扫描显微术检测活性氧 (ROS) 相对量, 比色法检测还原型谷胱甘肽 (GSH) 量。结果 龙葵碱组 HepG2 细胞贴壁细胞数量减少, 部分出现死亡。Annexin V/PI 双染激光共聚焦扫描显微镜下观察发现龙葵碱组细胞 Annexin V-FITC 高染, 细胞膜呈绿色荧光; PI 低染, 细胞核呈红色荧光, 呈现明显的早期凋亡特征。流式细胞术分析 0.4、2、10 $\mu\text{mol/L}$ 龙葵碱作用 HepG2 细胞 24 h 后, 早期凋亡率分别为 4.0%、

收稿日期: 2009-06-05

基金项目: 教育部博士点基金项目 (200802400001); 黑龙江省博士后基金资助项目; 国家自然科学基金资助项目 (30400591); 哈尔滨市青年基金资助项目 (2004AFQXJ035)

作者简介: 高世勇 (1975—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为肿瘤药理学。E-mail: sygao2002@163.com