

小鼠周边活动累积数据比率法评价药物镇静效应

虞希冲, 杨伟, 吴波拉

(温州医学院药学院药理学教研室, 浙江温州 325035)

中国图书分类号: R-332; R 322.8; R 971.3

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2010)03-0411-03

摘要:目的 建立一种基于累积周边活动时间/周边时间的比值(accumulate peripheral active time percent, APATP)的行为学评价模型。方法 利用视频跟踪系统检测戊巴比妥钠和地西洋诱导小鼠自发活动并提取相应数据,并计算得到 APATP。采用 DAS 软件对数据进行处理,得到小鼠活动趋稳半衰期($T_{\frac{1}{2}\alpha}$)、对数曲线下面积($\lg AUC_{0-60}$)和对数尾点回归值($\lg P_{\min}$)进行统计学分析。结果 各组小鼠的 APATP 随着时间的延长而逐步下降,均符合方程 $P = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ 。与正常组比较, PB 5 mg·kg⁻¹组 $T_{\frac{1}{2}\alpha}$ 、 $\lg AUC_{0-60}$ 和 $\lg P_{\min}$ 略有下降,而 PB 10 mg·kg⁻¹组(均为 $P < 0.01$)和 PB 15 mg·kg⁻¹组($P < 0.01$, $P < 0.01$ 和 $P > 0.05$)均能不同程度的抑制 3 参数;与 PB 10 mg·kg⁻¹组比较, PB 15 mg·kg⁻¹组 3 参数有所回升($P > 0.05$, $P < 0.05$ 和 $P < 0.05$)。本模型参数 $\lg AUC_{0-60}$ 和 $\lg P_{\min}$ 与总路程具有较好的一致性($r^2 = 1.0000$ 和 $r^2 = 0.9995$, 均为 $P < 0.01$)。应用地西洋进一步证实了模型的可行性,具有类似的特点;与正常组比较,地西洋 2、4 mg·kg⁻¹组 3 参数均下降(均为 $P < 0.01$),认为两组的镇静效应与正常等同;与 PB 10 mg·kg⁻¹比较,地西洋 2、4 mg·kg⁻¹组的 3 参数差异均无显著性,认为两组地西洋镇静作用与之等同。结论 ICR 小鼠累积周边活动时间占比模型可用于评价小鼠自发活动及药物干预效果。

关键词:小鼠;自发活动;周边活动时间占比;戊巴比妥钠;地西洋;镇静

自发活动是一个中枢神经系统药理学评价及神经科学研究的常用方法,主要用于一般行为变化、精神兴奋、抑郁以及相关药物的研究。目前对自发活动的测定方法有多种^[1],包括抖笼法、抖笼滴水法、转轮法、斜笼法、运动计量法以及视频跟踪系统分析法等。其中视频跟踪系统分析较为普遍,常采用总路程为指标^[2,3]。此类方法多是取其中某段时间内的自发活动指标,一般在给药后或适应 10~20 min 后检测指标^[4],放弃了小鼠对新环境探索活动的评价,丢失部分活动信息。本文通过对累积的周边活动时间占比数据进行分析,建立一种新的较为全面的分析药物对小鼠自发活动影

响评价方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与器械 自发活动(开场实验)视频分析系统(DigBehv-LA)购自上海吉量软件科技有限公司,戊巴比妥钠购自中国医药(集团)化学试剂公司(批号:F20020915),地西洋购自国家麻醉品实验室(批号:1230-9601)。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 动物分组 ICR 小鼠体重 26~30 g, ♀ ♂ 各半,清洁级,购自本校实验动物中心,实验动物使用许可证号 SYXK(浙江):2005-0061,饲养于安静、明暗节律、室温 28℃ 的室内环境,自由饮食。将 ICR 小鼠随机分组,分成正常组(Norm)、戊巴比妥钠(pentobarbital sodium, PB)5、10 和 15 mg·kg⁻¹组和地西洋(diazepam, Diz)2 和 4 mg·kg⁻¹组。各药物配成相应浓度后均按照 10 ml·kg⁻¹腹腔给药。

1.3 自发活动测定及指标计算 参照文献方法^[5],进行改进。测定自发活动前,将小鼠置于温度 28℃、室内湿度为 50% 并安静的测定环境中适应 24 h,明暗节律,自由饮食。测定时间在早上 9 点至 12 点,测定前禁食 12 h。给药后立即将小鼠轻轻置于自发活动测定盒中央,立即开始记录小鼠活动 60 min。按 5 min 递增,将累积周边活动时间除以累积周边时间得到累积周边活动时间占比(accumulate peripheral active time percent, APATP)进行处理和统计分析。

1.4 统计学处理 自发活动数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。累积数据动力学参数采用 DAS 2.0(drugs analysis system 2.0)软件的成批数据处理模块估算。曲线下面积(AUC_{0-60})和尾点回归值(P_{\min})经对数转换后及各取段时间点数据均采用单因素方差分析,并进行 Dunnet *t* 检验;活动趋于稳定半衰期($T_{\frac{1}{2}\alpha}$)采用非参数检验(kruskal wallis test)。以 $\lg AUC_{0-60}$ 和 $\lg P_{\min}$ 作为比较指标,两种干预因素的作用后同时出现差异有或无显著性,判断为两者作用效果不等同或等同;若仅两者之一出现显著性差异,则认为两干预因素结果有所差异,但不等同。

2 结 果

2.1 戊巴比妥钠诱导累积周边活动时间占比数据特点 正常组和戊巴比妥钠诱导的周边活动时间抑制随着时间的推移, APATP 逐步下降。与正常组比较, PB 5 mg·kg⁻¹ 时其累积占比趋势与正常组相似,除 5 min 时差异有显著性($P < 0.01$)外,其余点差异均无显著性; PB 10 mg·kg⁻¹ 和 PB 15 mg·kg⁻¹ 组几乎平行,在各累积时间点差异均有显著性(均为 $P < 0.01$),但 PB 15 mg·kg⁻¹ 组明显高于 PB 10 mg·kg⁻¹ ($P < 0.01$),见 Tab 1。累积占比在经历快速下降之后趋于缓慢, PB 10 mg·kg⁻¹ 和 PB 15 mg·kg⁻¹ 组周边活动时间累积占比均在 35 min 左右不再下降,提示小鼠的活动进

收稿日期:2009-12-21,修回日期:2010-01-19

作者简介:虞希冲(1975-),男,硕士,讲师,研究方向:神经药理学和毒理学, Tel: 0577-86689710, E-mail: wenzhyu2004@yahoo.com.cn

Tab 1 Accumulate peripheral active time percent induced by pentobarbital sodium(PB) in mice($\bar{x} \pm s$)

Accumulate time/min	APATP/%			
	Norm	PB 5 mg · kg ⁻¹	PB 10 mg · kg ⁻¹	PB 15 mg · kg ⁻¹
1	97.67 ± 3.19	94.90 ± 4.30*	82.80 ± 10.37**	87.60 ± 17.37*
2.5	96.06 ± 2.5	89.25 ± 7.45**	72.70 ± 10.04**	82.09 ± 14.11**△
5	91.88 ± 3.27	85.34 ± 9.81*	62.76 ± 10.65**	73.43 ± 17.04**△
10	86.87 ± 7.29	84.02 ± 9.07	51.254 ± 16.54**	64.82 ± 22.14**△
15	81.70 ± 9.62	82.00 ± 9.39	39.10 ± 15.38**	58.82 ± 24.92**△
20	79.03 ± 11.25	77.86 ± 10.81	32.91 ± 14.10**	52.82 ± 23.43**△△
25	76.15 ± 12.88	73.80 ± 12.32	29.40 ± 11.65**	46.41 ± 21.30**△△
30	73.29 ± 14.09	68.74 ± 14.20	26.10 ± 11.33**	42.71 ± 19.73**△△
35	70.96 ± 15.20	64.96 ± 15.79	24.52 ± 11.26**	40.28 ± 19.04**△△
40	69.14 ± 15.72	62.08 ± 16.84	23.77 ± 10.77**	40.51 ± 19.12**△△
45	65.94 ± 16.72	60.01 ± 17.53	24.00 ± 10.60**	42.05 ± 19.28**△△
50	63.64 ± 17.48	57.92 ± 18.24	24.21 ± 10.49**	43.06 ± 18.73**△△
55	61.28 ± 17.89	56.08 ± 19.12	24.12 ± 8.18**	43.27 ± 17.75**△△
60	59.29 ± 18.30	54.32 ± 19.44	23.76 ± 6.83**	43.05 ± 16.92**△△

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs norm; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs PB 10 mg · kg⁻¹. Number of samples; $n = 18$ for norm group, and $n = 16$ for others

Tab 2 Parameters of fit curve for APATP induced by pentobarbital sodium(PB) in mice($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Unit	Group			
		Norm	PB 5 mg · kg ⁻¹	PB 10 mg · kg ⁻¹	PB 15 mg · kg ⁻¹
A	/	38.580 ± 26.28	71.51 ± 100.76	571.66 ± 2023.81	57.44 ± 22.57
α	/	0.20 ± 0.47	0.54 ± 1.33	0.55 ± 1.48	0.1972 ± 0.2591
B	/	64.18 ± 27.08	53.57 ± 31.77	31.33 ± 20.63	39.68 ± 23.29
β	/	0.0054 ± 0.0051	0.0081 ± 0.006	0.0063 ± 0.010	0.0008 ± 0.0023
r ²	/	0.9631 ± 0.0372	0.9431 ± 0.0389	0.9601 ± 0.0477	0.9253 ± 0.0618
T _{1/2} ^α	min	56.48 ± 82.34	33.46 ± 36.04	6.58 ± 6.61●●	9.69 ± 8.71●●
T _{1/2} ^β	min	122770.5 ± 416920.4	437789 ± 1162146	201683 ± 213284.2	629203.2 ± 697103.2
lgAUC ₀₋₆₀	Min%	3.64 ± 0.11	3.63 ± 0.08	3.30 ± 0.12**	3.45 ± 0.19**△
lgP _{min}	%	1.77 ± 0.16	1.71 ± 0.17	1.36 ± 0.13*	1.60 ± 0.20△
D	m	69.72 ± 35.68	60.48 ± 29.75	6.82 ± 5.81*	31.16 ± 35.96**△

** $P < 0.01$ vs norm; △ $P < 0.05$ vs PB 10 mg · kg⁻¹; ●● $P < 0.01$ vs norm (Kruskal wallis test). Number of samples; $n = 18$ for norm group and $n = 16$ for others. D; total distance(15 ~ 30) min after PB ip

入较稳定的自发活动期。

2.2 曲线拟合及指标确定 以时间为变量, 累积周边活动时间占比为应变量, DAS 2.0 进行曲线拟合, 符合方程, 各组数据拟合度较好。在参数中消除相 β 的较小 (Tab 2), 随着时间的延长, 消除相的周边活动时间占比的下降非常缓慢, 可以认为此项在本测试时间范围内基本不变或变动微小, 即小鼠活动趋于稳定。因此, 可采用对数最小尾点回归值 (lgP_{min})、占比下降趋于稳定的半衰期 T_{1/2}^α 以及对数曲线下面积 (lgAUC₀₋₆₀) 作为评价指标。(Tab 2)。

2.3 参数估算及评价 在本实验时间范围内, 累积周边活动时间占比的 T_{1/2}^α、lgAUC₀₋₆₀ 和 lgP_{min} 均随剂量的先下降后略为上升, 与总路程趋势一致, lgAUC₀₋₆₀ 和 lgP_{min} 总路程 (D) 均呈线性关系 ($r^2 = 1.0000, P < 0.01$ 和 $r^2 = 0.9995, P < 0.01$), T_{1/2}^α 也同样具有类似的趋势。与正常组比较, PB 5 mg · kg⁻¹ 组三参数均略有下降; PB 10 mg · kg⁻¹ 组 3 参数均明显下降 (均 $P < 0.01$), PB 15 mg · kg⁻¹ 组 3 参数均有下降, ($P < 0.01, P < 0.01$ 和 $P > 0.05$)。与 PB 10 mg · kg⁻¹ 组比较, PB 15 mg · kg⁻¹ 组 3 参数均有所回升 ($P > 0.05, P < 0.05$)

和 $P < 0.05$), 见 Tab 2。从上述数据中, 可以认为 PB 5 mg · kg⁻¹ 的镇静作用与正常组等同, PB 10 mg · kg⁻¹ 的镇静作用不等同于正常组, 而 PB 15 mg · kg⁻¹ 则既不等同于正常组, 也不等同于 PB 10 mg · kg⁻¹ 组的效应, 较之有明显地反弹。

2.4 对地西洋镇静作用的评价 地西洋 2 mg · kg⁻¹ 组和 4 mg · kg⁻¹ 组与 PB 10 mg · kg⁻¹ 组累积数据具有相似的趋势, 均符合方程 $P = Ae^{-at} + Be^{-bt}$, 其拟合度分别为 $r^2 = 0.966 \pm 0.029 (n = 16)$ 和 $r^2 = 0.982 \pm 0.015 (n = 16)$ 。与正常组比较, Diz 2 mg · kg⁻¹ 组和 4 mg · kg⁻¹ 组在各时间点上均有明显的抑制的作用 (均 $P < 0.01$), Diz 4 mg · kg⁻¹ 组抑制更加明显; 与 PB 10 mg · kg⁻¹ 组比较, 两组地西洋各指标差异均无显著性, 可以认为地西洋的镇静作用与 PB 10 mg · kg⁻¹ 等同。见 Tab 3。

3 讨论

传统单一分段数据仅能反映进入测试箱后较稳定的自发活动量而不能评价小鼠活动的总过程。有文献采用其累积数据^[6]或连续分段数据^[7,8]进行评价小鼠活动的总过程和药物的效应, 由于分段数据的波动性并不能有效反映药效的起效时间和达到平稳时间。文献^[3]利用累积数据可有效

Tab 3 Evaluation of sedative effect of diazepam with parameters of curve for APATP($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Parameter		
		$T_{1/2\alpha}$ /min	lgAUC ₀₋₆₀ /min%	lgP _{min} /%
Norm	18	56.48 ± 82.34	3.64 ± 0.11	1.77 ± 0.16
PB 10 mg · kg ⁻¹	16	6.58 ± 6.61 ^{△△}	3.30 ± 0.12 ^{**}	1.36 ± 0.13 ^{**}
Diz 2 mg · kg ⁻¹	16	8.11 ± 8.98 ^{△△}	3.38 ± 0.20 ^{**}	1.40 ± 0.28 ^{**}
Diz 4 mg · kg ⁻¹	16	6.9 ± 5.56 ^{△△}	3.25 ± 0.18 ^{**}	1.21 ± 0.26 ^{**}

** $P < 0.01$ vs norm, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs norm (kruskal wallis test), PB: pentobarbital sodium. Diz: Diazepam

区分不同剂量戊巴比妥钠的作用强度,本实验结果显示累积的周边活动时间占比曲线参数也同样能有效区分它们的作用,且趋势与传统模型^[2]得到结果较一致,且戊巴比妥钠诱导的lgP_{min}和lgAUC₀₋₆₀与分段总路程指标具有良好的线性关系,因此,可以用于评价小鼠总过程和药物的效应。此外,小鼠活动趋于稳定半衰期 $T_{1/2\alpha}$,受药物的影响非常明显,戊巴比妥钠和地西洋均使小鼠活动 $T_{1/2\alpha}$ 明显减少,且药物的剂量相关,即药物的作用越强 $T_{1/2\alpha}$ 越小,活动达到稳定的时间越快。

参考文献:

- [1] 史红,吕燕萍,钱伯初.鼠、猪与猴自发活动试验方法学研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2006,11(3):246-50.
[1] Shi H, Lu Y P, Qian B C. Progress in study of methodology of spontaneous locomotor activity in rats, pigs and monkeys [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2006, 11(3): 246-50.

- [2] 王一奇,朱朝阳,魏尔清.不同品系小鼠自发活动特点及中枢抑制药新评价模型[J].科技通报,2003,19(4):292-6.
[2] Wang Y Q, Zhu C Y, Wei E Q. A new model for evaluating locomotor activity and central depressive drugs in different strain mice [J]. Bull Sci Technol, 2003, 19(4): 292-6.
[3] 吴开华,杨冠玲,何振江,等.四箱式小鼠自发活动检测系统的研究[J].中国药理学通报,1997,13(5):464-6.
[3] Wu K H, Yang G L, He Z J, et al. A monitoring system for locomotor activity of mice in open field with four-boxes [J]. Chin Pharmacol Bull, 1997, 13(5): 464-6.
[4] Li Y F, Yuan L, Xu Y K, et al. Antistress effect of oligosaccharides extracted from Morinda officinalis in mice and rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(12): 1084-8.
[5] 张琦,魏尔清,朱朝阳,等.一种测定小鼠长时间自发活动时空特点的新方法[J].浙江大学学报(医学版),2004,33(6):509-14.
[5] Zhang Q, Wei E Q, Zhu C Y, et al. A novel method for continuously assessing the spatio-temporal properties of locomotor activity in mice [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2004, 33(6): 509-14.
[6] Redolat R, Vidal J, Gómez M C, et al. Effects of acute bupropion administration on locomotor activity in adolescent and adult mice [J]. Behav Pharmacol, 2005, 16(1): 59-62.
[7] Kelly M A, Rubinstein M, Phillips T J, et al. Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations [J]. J Neurosci, 1998, 18(9): 3470-9.
[8] Fedorova I M, Jacobson M A, Basile A, et al. Behavioral characterization of mice lacking the A3 adenosine receptor: sensitivity to hypoxic neurodegeneration [J]. Cell Mol Neurobiol, 2003, 23(3): 431-47.

Locomotor model based on accumulate peripheral active time percent in ICR mice

YU Xi-chong, YANG Wei, WU Bo-la

(Dept of Pharmacology, College of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou Zhejiang 325035, China)

Abstract; Aim To establish a novel locomotor model based on accumulate peripheral active time percent (APATP) in ICR mice induced by pentobarbital sodium (PB) and diazepam. **Methods** Total distance, accumulate peripheral active time and accumulate peripheral time were aquired from video tracking system with computer, and APATP in all groups was fit and got correspondent parameters with Drugs Analysis System 2.0. Logarithm of area under the curve (lgAUC₀₋₆₀), minimum APATP (lgP_{min}), and half time of steady-state locomotor activity ($T_{1/2\alpha}$) were ready for evaluation. **Results** APATP decreased with time increasing in all groups gradually, and PB 10 mg · kg⁻¹ and PB 15 mg · kg⁻¹ had similar tendency. PB 10 mg · kg⁻¹ and PB 15 mg · kg⁻¹ all decreased APATP significantly throughout the time course. APATP in all mice was fit to kinetics equation. Compared with norm group, PB 5 mg · kg⁻¹ decreased three parameters slightly (all $P > 0.05$), and PB 10 mg · kg⁻¹ and PB 15 mg · kg⁻¹ had similar tendency. PB 10 mg · kg⁻¹ (all $P < 0.05$) and PB 15 mg ·

kg⁻¹ ($P < 0.01$, $P < 0.01$ and $P > 0.05$) decreased parameters. Compared with PB 10 mg · kg⁻¹, PB 15 mg · kg⁻¹ increased reversely ($P > 0.05$, $P < 0.05$ and $P < 0.05$). lgAUC₀₋₆₀ and lgP_{min} were both linear with total distance ($r^2 = 1.0000$ and $r^2 = 0.9995$, both $P < 0.01$), $T_{1/2\alpha}$ also showed similar tendency as well as total distance. Referring PB 10 mg · kg⁻¹ as positive drugs and norm as negative control, diazepam 2 mg · kg⁻¹ and 4 mg · kg⁻¹ depressed all parameters significantly compared with norm group (all $P < 0.01$) and were similar as PB 10 mg · kg⁻¹, which indicated that sedative effect of diazepam was the same as PB 10 mg · kg⁻¹. **Conclusion** Locomotor activity model based on APATP may be used to evaluate drug effects on locomotor activity induced by sedative hypnotics.

Key words: mice; locomotor activity; accumulate peripheral active time percent; pentobarbital sodium; diazepam; sedative effect