

和解泄热安神法对乙醇依赖症大鼠戒断行为的干预研究

张晓霞¹ 杨玲² 薛晓轩² 余轶群¹ 王志斌¹

(1 北京中医药大学东方医院脾胃肝胆科,北京,100078; 2 北京中医药大学东方医院功能检查科,北京,100078)

摘要 目的:研究和解泄热安神法方药对乙醇依赖症大鼠戒断行为的干预作用。方法:21只雄性SD大鼠用随机数字表随机分为正常组、观察组和对照组,每组7只,除正常组大鼠外,其余均采用饮用含乙醇饮水(6%,v/v)21d复制乙醇依赖症模型。之后采用和解泄热安神方药灌胃观察组、纯净水灌胃对照组大鼠共7天,灌胃期间仍饮用含乙醇饮水。第29天起撤除含乙醇饮水,所有大鼠均饮用纯净水,观察记录大鼠乙醇戒断行为。整个实验期间观察大鼠精神状态、活动、记录周体重变化及日饮水量。结果:随着乙醇依赖大鼠的戒断时间延长,戒断行为评分逐渐升高,与正常组比较,对照组的戒断行为评分明显升高($P < 0.05$),于戒断后6h行为表现最明显并持续至24h。观察组行为评分介于二者之间,并明显低于对照组($P < 0.05$)。结论:和解泄热安神法方药可以减轻乙醇依赖症大鼠的戒断行为评分,缓解乙醇戒断症状。

关键词 中医药;和解泄热安神法;乙醇依赖症;乙醇戒断;大鼠

Interventional Study on Harmonizing, Heat-relieving and Mind-tranquilizing Therapy in Treating Alcohol Withdrawal Behaviors in Alcohol Dependence Model Rats

Zhang Xiaoxia¹, Yang Ling², Xue Xiaoxuan², Yu Yiqun¹, Wang Zhibin¹

(1 Gastroenterology Department, Dongfang Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; 2 Functional Inspection Department, Dongfang Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract Objective: To observe the interventional effects of harmonizing, heat-relieving and mind-tranquilizing therapy in treating alcohol withdrawal behaviors in alcohol dependence model rats. **Methods:** Twenty-one male SD rats were randomly divided into normal, treatment and control group by random number table with 7 rats in each group. All rats were fed water with alcohol (6%, v/v) for 21 days to make alcohol dependence models except normal ones. Rats in the treatment group were administered by medicinal granules with the functions of harmonizing, heat-relieving and mind-tranquilizing while rats in the control group were fed with pure water for constantly 7 days, and rats drank water with alcohol during the experiment. From the 29th day, all rats started to drink pure water without alcohol, and their behaviors, mental status, life activity, weekly body weight and daily drinking were observed and evaluated. **Results:** With the extension of alcohol withdrawal time, scores of withdrawal behaviors raised gradually. The scores of control group was higher when compared with normal group ($P < 0.05$). It had a peak score at 6 h and lasted until 24 h after withdrawal. The score of the treatment group was between that of the normal and control group, which was lower than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Harmonizing, heat-relieving and mind-tranquilizing therapy may decrease scores of alcohol withdrawal in alcohol dependence rats and relieve alcohol withdrawal symptoms.

Key Words Traditional Chinese Medicine; Harmonizing, heat-relieving and mind-tranquilizing therapy; Alcohol dependence; Alcohol withdrawal; Rats

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.08.039

物质依赖是指个体强烈或不可自制地反复渴求滥用某种物质,其中对于乙醇的依赖被称为乙醇依赖(Alcohol Dependence, AD)^[1]。物质依赖是个体处于生物、社会和环境多重因素调控的模式中形成的,其中生物因素主要以化学物质作用于中枢神经系统并产生明显的奖赏效应,使患者的中枢神经系

统异常兴奋,从而发生与应激状态下相似的生理功能变化。

全世界约有20亿人口的乙醇消费者,饮酒相关的社会问题也日益突显,因此AD已经不仅属于个人健康问题,而涉及到整个卫生系统^[2]。由于突然减少或停止持续高剂量乙醇消耗,躯体会呈现出如

基金项目:国家中医重点专科建设项目(ZJ0101PW008)

作者简介:张晓霞(1968.01—),女,大专,主管技师,研究方向:消化系统疾病的诊断技术工作,E-mail:zhang_sherry@sina.com

通信作者:王志斌(1978.03—),男,硕士,副主任医师,研究方向:中西医结合治疗脾胃病,E-mail:wangsanger@126.com

自主活动增多、交感神经兴奋增强和精神活动激越等复杂的乙醇戒断综合征(Alcohol Withdrawal Syndrome, AWS)^[3],从而使部分患者无法承受,导致再次复饮乙醇,这就直接加剧了个人和社会体系的各种负担。

中医药在调畅情志、调理精神活动方面有自己独特的优势,但截至目前,尚未见到采用和解泄热安神法干预大鼠乙醇戒断行为的相关报道。我们前期发现了柴胡加龙骨牡蛎汤化痰可以改善AD患者的生命质量^[4],因此,我们通过建立大鼠乙醇依赖模型,观察灌服和解泄热安神法颗粒剂对大鼠乙醇戒断行为的影响,从而验证乙醇戒断可能的多种行为,并为乙醇依赖的形成机制提供参考,亦为和解泄热安神法治疗AWS的作用机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 实验选用8周龄SD(Sprague Dawley)雄性大鼠21只,体重(120±20)g,(北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证批号:SCXK(京)2006-0009)。实验动物饲养于中国中医科学院中药所清洁级动物房,12h光照和黑夜循环,温度(22±2)℃,湿度50%~60%。

1.1.2 药物 和解泄热安神法方药:柴胡10g、黄芩10g、清半夏9g、生龙骨15g、生牡蛎15g、生姜10g、琥珀3g、党参15g、桂枝6g、茯苓15g、酒大黄6g、大枣10g、葛花10g、枳椇子10g、豆蔻6g、通草6g。药物采用中药配方颗粒方式,以80℃以上热水冲调,充分搅拌为混悬液,用药剂量按实验动物与人体体表面积比等效量核算比率,计算动物的等效剂量供灌胃用(以上药物由康仁堂公司提供,通过北京中医药大学东方医院颗粒中药房分装)。

1.1.3 试剂与仪器 试验用喂饲大鼠的低浓度乙醇饮水按体积比将北京红星股份有限公司出产的63%(V/V)的红星二锅头酒和纯净水配置成6%(V/V)的含乙醇饮水。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 适应性饲养1周后,正式开始实验。通过随机数字表法将21只大鼠随机分为3组:观察组(7只)、对照组(7只)和正常组(7只),观察组和对照组在前21d合称为造模组。所有大鼠常规进食大鼠维持饲料,正常组大鼠自由饮用纯净水,造模组大鼠以含6%低浓度乙醇饮水作为唯一水源,共21d。

1.2.2 干预方法 所有大鼠常规进食大鼠维持饲料,正常组大鼠自由饮用纯净水,观察组和对照组大鼠继续以6%低浓度乙醇饮水为唯一饮水来源。实验第22天起观察组大鼠每天早9时和解泄热安神颗粒灌胃1次(1mL/100g),每日给药量折合临床成人用药量7倍(18.2g/kg);对照组每天早9时纯净水灌胃1次(1mL/100g),共干预7d。实验期间每天观察动物进食、饮水、行为、活动、精神状态、毛发及二便等情况,连续28d,计量动物体重1次/周,造模组记录每天饮水量及折合后的乙醇量。

1.2.3 检测指标与方法 实验第29天撤除观察组和对照组大鼠的含乙醇饮水,给予和正常组大鼠相同的纯净水饮用。依照李菁等^[5]的方法观察大鼠撤除乙醇后的戒断症状。观察组、对照组及正常组于大鼠撤除乙醇后不同时间(2、6、24、48h)给予行为体征和听源性癫痫发作评分。乙醇戒断行为体征评分标准见表1。

1.3 统计学方法 采用SPSS 13.0统计软件对数据进行处理,计量资料以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察 3组大鼠均无死亡事件发生,正常组大鼠体毛整齐有光泽,活动度正常,精神良好,进食正常。1~3周中,饮酒组大鼠的体毛略显凌乱,光泽度尚可,活动减弱,精神萎靡,喜团聚蜷卧,环境变化时会有相互撕咬和惊窜表现。增加中药和去离子水灌胃后,观察组大鼠活动度有所增加,对外界刺激反应恢复,相互撕咬及惊窜现象减少。

表1 乙醇戒断行为体征评分标准

刻板行为*	激惹性	尾巴强直	异常姿势	听源性癫痫发作**
出现1种	轻微或中等激惹	轻度尾巴强直	轻微低头拱背	疯狂奔跑
出现2种	极易激惹	中度尾巴强直	中度低头拱背	疯狂奔跑加强直性癫痫发作
出现3种	接触时叫或中等攻击性	尾巴强直但行走时有轻度弹性	显著低头拱背	疯狂奔跑加强直阵挛性癫痫发作
出现4种	接触时叫或极具攻击性	尾巴强直且行走时无弹性	低头拱背加后肢分开	强直阵挛性癫痫发作持续时间超过90s
出现5种	自发性叫或极具攻击性	尾巴极度强直且行走时无弹性	低头拱背加前肢分开	死亡

注:*刻板行为包括理毛、打喷嚏、摇头、咬、咀嚼5种;**以100dB声音刺激大鼠1min

在中断乙醇水供应换为纯净水后,造模组大鼠明显出现躁动,易激惹,攻击性强,行为刻板,姿势异常等表现,而正常组大鼠则在这些行为上明显不同。

2.2 饮酒量和体重比较 实验前 28 d 记录了饮酒大鼠每天的饮酒量。结果显示实验过程中大鼠每天的饮酒量变化呈缓慢上升趋势,但观察组和对照组间饮酒量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 大鼠日均饮酒量变化表 (g/kg, $\bar{x} \pm s, n = 7$)

分组	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
观察组	7.72 ± 0.52 *	8.02 ± 0.52 *	8.14 ± 0.54 *	8.12 ± 0.6 *	8.33 ± 0.54 *
对照组	7.67 ± 0.45	7.90 ± 0.38	8.19 ± 0.49	8.20 ± 0.3	8.37 ± 0.47

注:与对照组比较, * $P > 0.05$

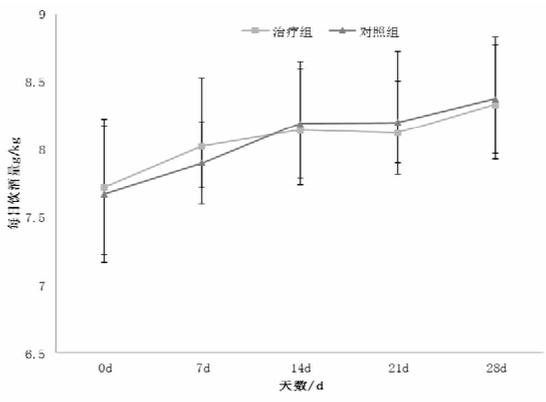


图 1 大鼠饮酒量变化图

每周给大鼠称体重 1 次,以观察乙醇对大鼠生长的影响。28 d 后,比较观察组、对照组与正常组大鼠体重,经计算差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3,图 2。

表 3 大鼠体重变化表 (g, $\bar{x} \pm s, n = 7$)

分组	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
观察组	151 ± 13.6 *	217 ± 14.2 *	256 ± 17.3 *	278 ± 19.1 *	313 ± 20.3 *
对照组	152 ± 15.2	216 ± 16.8	248 ± 15.6	276 ± 20.5	315 ± 19.9
正常组	149 ± 11.3	221 ± 14.6	251 ± 14.3	267 ± 18.2	321 ± 21.5

注:3 组间体重变化比较, * $P > 0.05$

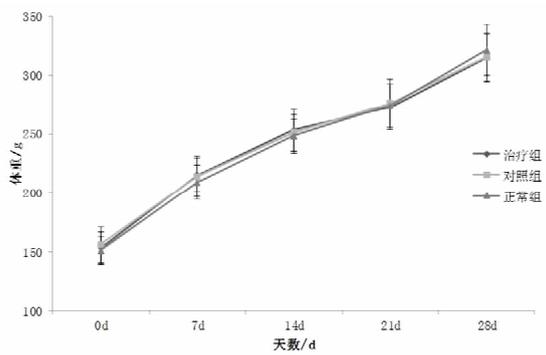


图 2 大鼠体重变化图

3.3 大鼠乙醇戒断行为评分 不饮酒的正常组大鼠较为温顺,不易激惹,攻击性行为较少;而对照组

大鼠在乙醇饮水换为纯净水后,开始出现打喷嚏、极易激惹、听源性癫痫发作次数和强度均增加,其戒断症状评分在戒断后 2、6、24 h 时均显著高于正常组大鼠 ($P < 0.05$)。而观察组大鼠的行为则介于二者之间。48 h 后各组的戒断行为学评分与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4,图 3。

表 4 大鼠乙醇戒断行为学评分表 (分, $\bar{x} \pm s, n = 7$)

分组	2 h	6 h	24 h	48 h
观察组	8.51 ± 4.56 *	10.62 ± 4.2 *	6.34 ± 3.34 *	5.12 ± 1.12 Δ
对照组	13.02 ± 5.14	16.63 ± 6.77	10.43 ± 4.56	4.78 ± 1.45
正常组	5.35 ± 1.32	4.15 ± 1.58	4.47 ± 1.13	4.22 ± 1.20

注:各时间点不同组间数据比较, * $P < 0.05$; 各组间数据比较, $\Delta P > 0.05$

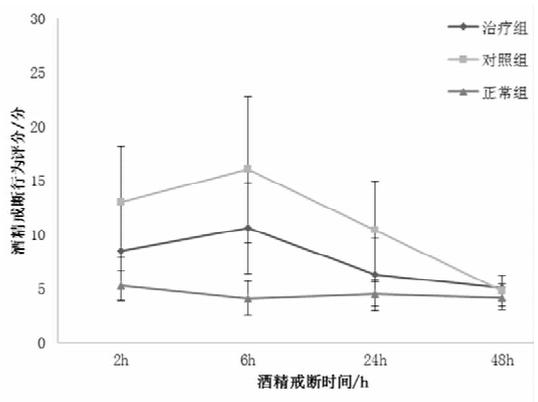


图 3 大鼠乙醇戒断行为学评分变化图

3 讨论

本研究通过持续给予低浓度含乙醇饮水 (v/v, 6%) 的方法建立大鼠 AD 模型,突然停止供应乙醇饮水诱发大鼠乙醇戒断行为的出现,并以和解泄热安神法颗粒灌胃对动物进行干预性治疗来观察和解泄热安神法对乙醇戒断行为的作用。我们发现在造模过程中,进食、饮水和体重等指标上饮酒大鼠和正常组大鼠无明显区别,这说明短期的低剂量饮酒对动物的生长影响不明显。但通过一般状态观察,我们发现造模大鼠在饮酒后,会表现出与正常大鼠显著不同的特征,如活动减弱、精神萎靡、喜团聚蜷卧、环境变化时会有相互撕咬和惊窜等表现。这可能与乙醇及其代谢产物对大脑刺激后产生的一般醉酒反应有关。

AD 的本质就是一种药物依赖性精神疾病,该病的发生背景很复杂,与患者的遗传、生活的社会环境、自身的心理状态等因素有关^[6],而该病行为学的背后则与机体大脑内的神经递质活动有关。长期饮酒者通过中枢神经系统在乙醇环境中长期暴露,引起一系列内源性适应反应,例如乙醇可以刺激体内内源性阿片类物质的释放,加强该受体的结合的

稳定性来获得奖励效应,而乙醇对大脑内多巴胺的影响又使患者能从中获得更多的快感。如此反复的刺激后就可形成牢固的反射通路,为获得这些通路刺激带来的快感,并祛除戒断症状,乙醇依赖患者就必须通过不断饮酒实现这种奖赏反馈。通过诸多研究,研究者们发现影响乙醇依赖症行为学的神经递质包括 NMDA 系统, GABA 系统, DA 系统, 5-HT 系统以及内源性阿片物质激励系统。而在这些参与系统中,并非都占主导,而是相互交叉,互相影响的^[7]。

机体摄入的乙醇促使 GABA 释放,增强了整体的抑制效应:一方面激活的氯离子通道使细胞电位发生超极化,从而引起全脑神经传导缓慢,另一方面乙醇竞争性抑制 NMDAR,使兴奋性的神经递质减少,从而引起机体代偿性地增加兴奋性受体并减少了抑制性受体,使大脑的兴奋-抑制维持在一个非正常水平的平衡状态^[8]。由于长期的乙醇摄入使脑组织产生相应的耐受,但乙醇戒断使血中乙醇浓度下降时,原来建立的非正常平衡被突然破坏,高水平的兴奋性递质和低水平的抑制性递质导致了戒断综合征发生,临床以怕冷、出汗、恶心呕吐和躯体震颤为主,也有少数的震颤性谵妄和癫痫发作会危及生命^[9]。因此乙醇戒断行为是 AD 患者难以忍受并且放弃戒酒和再次复饮的最主要原因,减轻乙醇戒断行为在戒酒过程中显得尤为重要。

我们通过对大鼠乙醇戒断行为评分结果发现,造模后的 AD 大鼠的评分显著高于正常组大鼠,但其中观察组的评分低于对照组。这不仅量化了大鼠因戒酒产生的行为变化,使一般行为观察变为可研究的数据,而且通过观察可以看到低含量乙醇饮水确实能够造成大鼠的行为学改变,而和解泄热安神法能明确降低大鼠乙醇戒断行为评分,从而起到改善乙醇戒断症状的作用。

研究中所采用的和解泄热安神法方药来自于《伤寒论》名方柴胡加龙骨牡蛎汤加减。我们在前期总结了 AD 患者病机多属脾胃虚弱、肝胆湿热和痰热内扰,并且发现代表了和解泄热安神法的柴胡加龙骨牡蛎汤化裁可以明显改善 AD 患者生命质量^[4],而柴胡加龙骨牡蛎汤历来就应用于缓解精神、情志方面的症状^[10]。本方中柴胡作为君药发挥主要作用,中药药理学发现柴胡具有镇静、安神、止痛的作用,在本方起到镇静安神的效果。从桂枝中

提取桂皮醛有同样显著的镇痛、镇静及抗惊厥效果。而作为中药归属镇静安神类药物的龙骨、牡蛎在实验研究中也证实有抑制小鼠的自主活动、促进睡眠及抗惊厥作用^[11]。另有研究^[12]指出该方可以通过影响脑内单胺类神经递质起到抗应激作用,减轻戒断症状;并有促进大鼠 5-HT、DA、GABA 等合成释放^[13-14],从而调整大脑兴奋-抑制状态。

由于本研究为复方制剂,未进行拆方或单药的比较研究,因此为了进一步挖掘和解泄热安神法方药的作用机制,仍需进一步的相关研究,以便明确地发现该法方药在对 AD 患者乙醇戒断行为治疗中的具体作用机制和靶点。

参考文献

- [1] 杨晓佩,姜焰凌,阮冶,等. OPRM1 基因 DNA 甲基化在物质依赖中的研究进展[J]. 昆明医科大学学报,2017,38(1):125-128.
- [2] Schuckit MA. Recognition and management of withdrawal delirium (delirium tremens)[J]. N Engl J Med,2014,371(22):2109-2113.
- [3] Sarff M, GOLD JA. Alcohol withdrawal syndromes in the intensive care unit[J]. Crit Care Med,2010,38(9):S494-501.
- [4] 王志斌,李军祥,韩海啸,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤化裁方对酒精依赖症患者生存质量的影响[J]. 现代中医临床,2014,21(2):33-35.
- [5] 李菁,袁孝如,李跃华,等. 酒精依赖大鼠模型建立[J]. 中国药物依赖性杂志,2006,15(6):433-436,448.
- [6] Timberlake DS, Hopfer CJ, Rhee SH, et al. College attendance and its effect on drinking behaviors in a longitudinal study of adolescents[J]. Alcohol Clin Exp Res,2007,31(6):1020-1030.
- [7] 杨晓华,张华峰,赖江华. 中枢单胺类神经递质在酒精依赖中的分子作用机制[J]. 遗传,2014,36(1):11-20.
- [8] 谭华,吴畏. 酒精依赖戒断的病理生理与麻醉用药的探讨[J]. 西南军医,2016,18(6):539-542.
- [9] Awissi DK, Lebrun G, Fagnan M, et al. Alcohol, nicotine, and iatrogenic withdrawals in the ICU[J]. Crit Care Med,2013,41(9 Suppl 1):S57-68.
- [10] 裴新军. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗癫痫的机制探讨[D]. 济南:山东中医药大学,2004.
- [11] 孙华,张有志,韩鑫,等. 电针对慢性应激抑郁模型大鼠大脑皮层 5-HT1 和 5-HT2 受体数量和结合活性的影响[J]. 中国针灸,2003,23(9):553-555.
- [12] 佐佐下健郎. 柴胡加龙骨牡蛎汤的抗应激作用的机制研究[J]. 国外医学:中医中药分册,1997,19(5):58.
- [13] 徐国龙,杨帆,章复清,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对 PTZ 点燃型癫痫大鼠脑内氨基酸含量的影响[J]. 中国医药学报,2002,17(3):165-167.
- [14] 瞿融,孟海彬,褚蔚,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁模型大鼠脑内单胺递质的影响[J]. 中药药理与临床,2003,19(6):1-3.

(2017-05-16 收稿 责任编辑:王明)