

引用:聂发毅,吴宇蔚,薛思梦,等.耳针干预对精神分裂症模型小鼠阴性症状的影响[J].陕西中医药大学学报,2024,47(5):103-106.

## 耳针干预对精神分裂症模型小鼠阴性症状的影响\*

聂发毅 吴宇蔚 薛思梦 乔海法\*\*

(陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046)

**摘要:**目的 观察耳针干预对精神分裂症模型小鼠阴性症状的影响。方法 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、耳针组,每组 8 只。对照组注射对照病毒,其余各组将表达 EGR3 的腺相关病毒注射至小鼠腹侧海马区建立精神分裂症小鼠模型;耳针组在模型上施用耳针治疗。采用旷场实验与高架十字实验检测各组小鼠自发活动与焦虑样行为,采用三箱社交实验检测各组小鼠社交行为。结果 模型组小鼠在旷场箱内活动总距离与对照组和耳针干预组没有明显差异,模型组小鼠在旷场中心区域停留的时间与对照组相比明显降低( $P<0.05$ );耳针治疗后,小鼠在中心区域的停留时间较模型组显著增加( $P<0.05$ );高架十字实验结果显示,与对照组相比,模型组小鼠在开臂停留时间减少( $P<0.001$ ),在闭臂停留时间增加( $P<0.05$ );耳针干预组小鼠在开臂停留时间较模型组增加( $P<0.05$ ),在闭臂停留时间较模型组减少( $P<0.05$ );三箱社交实验结果显示,模型组小鼠在有陌生小鼠和空白室内停留时间没有差异,在陌生小鼠和熟悉小鼠室内停留时间没有差异。耳针干预组小鼠在陌生小鼠的室内停留时间较空白室长( $P<0.05$ ),与熟悉的小鼠相比,其在陌生小鼠室内停留时间长( $P<0.05$ )。结论 耳针干预可改善精神分裂症模型小鼠焦虑水平和社交能力等阴性症状。本研究为耳针治疗精神分裂症提供了实验依据。

**关键词:**耳针;精神分裂症;阴性症状;耳迷走神经;EGR3

**中图分类号:**R245.32\*3

**文献标识码:**A

**文章编号:**2096-1340(2024)05-0103-04

**DOI:**10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.05.017

精神分裂症是一类复杂慢性的精神疾病,全球患病率接近 1%<sup>[1]</sup>。2019 年中国精神分裂症患者的加权终身患病率为 0.6%<sup>[2]</sup>。尽管近年来精神分裂症的机制研究有一定进展,但其确切的发病机制仍不明确,加之缺乏明确的生物标记物,给该病的防治带来了极大的挑战。目前,该病的临床治疗主要靠药物维持,且多针对患者的阳性症状,而对于精神分裂症的阴性和认知症状则尚无有效的治疗药物,而且这些抗精神病药物会诱发一些严重的不良反应,降低患者依从性,致使复发率升高<sup>[3]</sup>。中医耳针治疗具有安全、经济、无副作用等优势,在治疗情绪与认知功能障碍等方面具有较好的效果<sup>[4-5]</sup>。耳针常与抗精神病药物联用治疗精神分裂症,单独用耳针治疗精神分裂症的研究较少。

精神分裂症的动物模型可以使用药物诱导、脑损伤、环境变化或基因编辑实现。使用基因编辑动物模型有利于将单个基因与疾病的潜在病理生理和特定内表型联系起来,有助于实现精准医疗和制定

更有效的治疗策略。早期生长反应因子 3 (early growth response 3, EGR3) 基因在多个种群(日本、韩国、欧洲、中国北方汉族)中与精神分裂症相关<sup>[6-9]</sup>,是精神分裂症的重要易感基因,因此建立了 EGR3 基因编辑精神分裂症动物模型。EGR3 敲除小鼠模型与 EGR3 过表达转基因大鼠模型已经被多个团队用作研究精神分裂症的病理生理学机制和药物开发的动物模型,并且取得了很多有意义的结果<sup>[10-11]</sup>。本实验通过将 EGR3 转染至 C57BL/6 小鼠的腹侧海马,建立精神分裂症小鼠模型,并在此模型上观察耳针干预对精神分裂症模型小鼠阴性症状的影响,对耳针疗法治疗精神分裂症进行初步探究。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物及饲养** 5~6 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠,体重(20.0±2.0)g,购买自维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK 京 2021-0006。4 只小鼠每笼,常规条件饲养,如室内温度保持在(24±2)℃,12 h/12 h 昼夜交替光照,自由进食和饮

\* 基金项目:陕西省科技厅项目(2019JM-399)

\*\* 通讯作者:乔海法,教授。E-mail:1511006@sntcm.edu.cn

水。所有实验过程依照我国 2006 颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关要求进行的。

**1.2 主要试剂和仪器** 异氟烷(中国,瑞沃德生命科技有限公司);脑立体定位仪(中国,瑞沃德生命科技有限公司);Hamilton 注射针(美国,HAMILTON 公司),Noldus EthoVision 行为记录分析软件(荷兰,Noldus 公司);华佗牌针灸针(中国,苏州医疗用品厂有限公司,规格:0.25 mm×13 mm,0.5 寸);韩氏穴位神经刺激仪(中国,南京济生医疗科技有限公司,型号:HANS 200A)。

**1.3 模型制备及分组** C57BL/6 小鼠购回之后进行适应性喂养 7 天,随机分为对照组、模型组、耳针组,每组 8 只。对照组注射对照病毒,其余各组将表达 Egr3 的腺相关病毒 AAV2/9-Egr3-3FLAG-GFP 立体定位注射到小鼠双侧腹侧海马区(AP: -3.10 mm,ML: ±3.20 mm,DV: -4.00 mm),使用 Hamilton 注射针以 20 nl/min 的速度进行注射病毒,注射完成后缝合,待小鼠清醒后放回饲养笼。继续饲养 4 周之后进行行为学检测,确认病毒表达和小鼠是否表现出精神分裂症样行为。

**1.4 耳针电刺激方法** 建模完成后,使用小动物麻醉机吸入异氟烷(麻醉诱导浓度为 3%,维持浓度为 1.5%)轻度麻醉小鼠。分别将两根针灸针平刺 2 mm 进入左、右耳部耳甲区,利用电针仪导线分别将左右耳部的针灸针与韩氏穴位神经刺激仪的正负极相连。设置刺激参数为:电流强度 1 mA,频率

2 Hz,每次 30 min,每天上午 1 次,连续 14 天。

## 1.5 行为学观察指标

**1.5.1 旷场实验** 耳针干预结束之后第二天进行行为学检测。按照文献中的方法进行旷场实验<sup>[12]</sup>。实验时将小鼠放入中央区域,记录 5 min 内小鼠的行动轨迹,统计这些区域内小鼠的活动路程、在各区域停留时间。

**1.5.2 高架十字实验** 按照文献中的方法进行<sup>[13]</sup>,实验时将待测小鼠放入开放臂和闭合臂的十字交叉区域,跟踪记录 5 min 内小鼠在开臂以及闭臂停留时间。

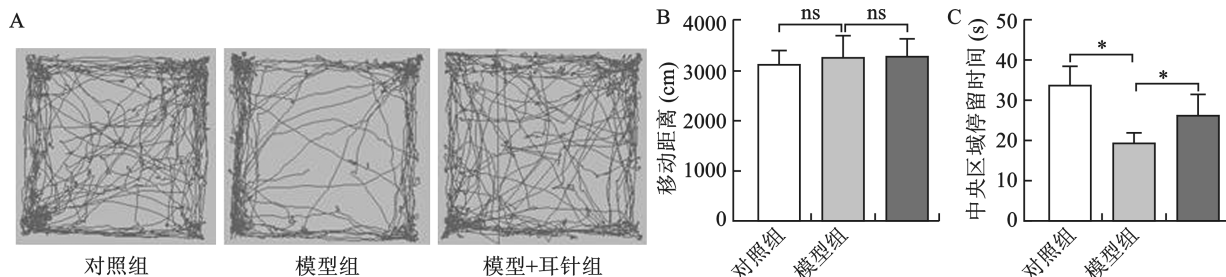
**1.5.3 三箱社交实验** 按照文献中的方法进行<sup>[14]</sup>,统计实验小鼠分别在陌生小鼠、空白笼和熟悉小鼠笼的停留时间。

**1.6 统计学方法** 所有数据统计分析均用均数±标准误差显示。统计分析软件使用 Graphpad prism 8.0,检验方法使用 *t* 检验。 $P<0.05$  表示有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 耳针干预对模型小鼠自发活动和焦虑行为的影响

**2.1.1 旷场实验结果** 如图 1 所示,模型小鼠在旷场箱内活动总距离与对照组和耳针干预组没有明显差异,但模型组小鼠在旷场中心区域活动的时间与对照组相比明显降低( $P<0.05$ );耳针治疗后,小鼠在中心区域的时间较模型组显著增加( $P<0.05$ )。提示耳针干预对小鼠自发活动没有影响,但可以改善模型小鼠的焦虑水平。



注:A.小鼠在旷场中的轨迹图;B.小鼠在旷场中移动总距离;C.小鼠在旷场中心区域停留时间。 $*P<0.05$ , ns 无显著性差异

图1 耳针治疗对模型小鼠旷场活动的影响

**2.1.2 十字高架迷宫实验结果** 与对照组相比模型组小鼠在开臂停留时间减少( $P<0.001$ ),在闭臂停留时间增加( $P<0.01$ );耳针干预可以改善模型小鼠的焦虑状态,具体表现为,耳针干预之后其在开臂停留时间较模型组增加( $P<0.05$ ),在闭臂停留时间较模型组减少( $P<0.05$ )。见图 2。

### 2.2 耳针干预对模型小鼠社交行为的影响 三厢

社交实验结果显示,模型小鼠社交性明显异常,其在有陌生小鼠 1 和空笼子停留时间没有差异;模型小鼠社交新奇性降低,其在陌生小鼠 2 和熟悉小鼠室内停留时间没有差异。耳针干预后模型小鼠社交性和社交新奇性得到改善,表现为其在陌生小鼠 1 的室内停留时间较空白笼增加( $P<0.05$ ),与熟悉的小鼠相比,其更愿意与陌生小鼠 2 交流( $P<0.05$ )。

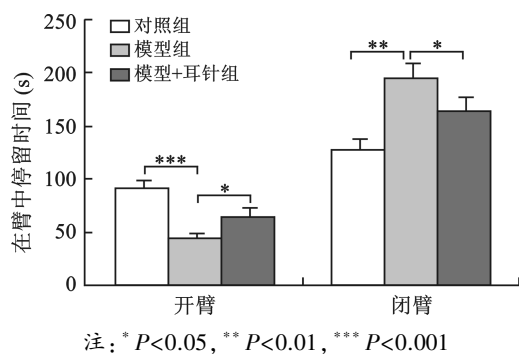


图2 耳针治疗对模型小鼠焦虑行为的影响

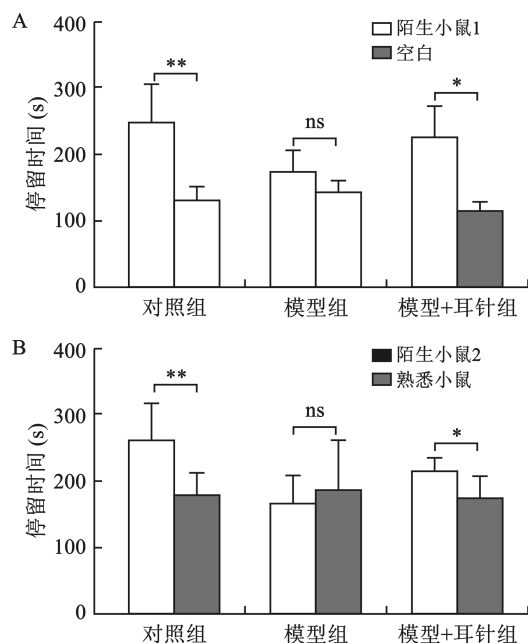


图3 耳针治疗对模型小鼠社交行为的影响

### 3 讨论

精神分裂症是临床上常见的精神疾病之一,其确切病理生理机制尚不清楚。目前临床上主要采用典型的和非典型的抗精神病药物治疗精神分裂症<sup>[15]</sup>。但这些抗精神病药物整体疗效不佳且易引发一些不良反应<sup>[3]</sup>。传统中医针灸治疗精神分裂症显示出较好的效果,几乎没有副作用<sup>[16-17]</sup>。

精神分裂症在中医学中归属于“癫狂”范畴,一般认为情志刺激导致情志不遂,气机不畅,阴阳失调,以气、痰、火、瘀为主要病理因素,与心、肝、脾胃关系密切<sup>[18]</sup>。中医针灸治疗癫症的记载古已有之,晋代葛洪的《肘后备急方》中就记载有用针灸治疗癫症的方法,如“火灸左右肋”“针其足大拇指爪甲下”等。在临床实践中,针灸或与抗精神病药物联用或单独使用都取得了较好的效果<sup>[19]</sup>。取穴方式

有取特定的穴位,如:“十三鬼穴”;辨证施针也多有报道,如主穴水沟、百会、内关、三阴交等结合辨证分型再酌情配穴来治疗精神分裂症<sup>[20]</sup>。此外,也有选用耳部的穴位治疗精神分裂症<sup>[18,21-22]</sup>。

耳针作为中医针灸的一种治疗手段,已用于抑郁症、癫痫、认知障碍以及许多其它类型精神神经疾病的治疗<sup>[4-5]</sup>。《灵枢·口问》曰:“耳者,宗脉之所聚也。”中医学认为人体的十二经脉均循行或者别络于耳,耳郭通过经络与脏腑相连接。对耳部穴位进行有规律的刺激,可以达到调节脏腑,平衡阴阳的目的。耳部的心穴有宁心安神、醒脑开窍之功,神门可镇静安神,肝穴调畅气机、疏肝解郁、调畅情志,脾能益气和胃。因此本研究选择包含这些穴位的耳甲区作为刺激点治疗精神分裂症<sup>[23]</sup>。研究显示,利用耳针治疗精神分裂症幻听症状,显著好转率可达85.29%<sup>[21]</sup>。项七针联合耳穴贴压可快速、有效地改善患者精神症状<sup>[22]</sup>。以耳压法为主治疗青春型精神分裂症取得了较好的临床效果<sup>[24]</sup>。另外,耳穴刺激疗法在其众多适应症以及精神分裂症的临床研究中均未发现明显毒副作用<sup>[4]</sup>。因此,我们选用耳针疗法观察其在改善精神分裂症状中的效应。在本实验中,经耳针干预之后模型小鼠的焦虑和社交缺陷行为得到改善,表现为耳针组小鼠较模型组在旷场实验中心区域时间增加(见图1),在开臂停留时间增加(见图2)以及在陌生小鼠的室内停留时间较空白增加,与熟悉的小鼠相比其更愿意与陌生小鼠交流(见图3)。这些结果提示耳针干预能够改善精神分裂症模型小鼠的焦虑水平和社交缺陷等阴性症状,但其作用机制仍需进一步的研究。

解剖学研究发现,传统耳针的选穴区主要分布在耳甲区,与耳迷走神经分布区重叠。分布在耳甲区的迷走神经耳支是迷走神经在体表的唯一分支<sup>[25]</sup>。大量研究表明,耳迷走神经刺激可以通过其传入纤维调节丘脑、杏仁核、海马以及皮质等大脑区域的网络功能从而改善不同疾病的抑郁、焦虑等情感和认知障碍<sup>[26-27]</sup>。另外,研究证实耳迷走神经刺激够起到与传统迷走神经刺激(vagus nerve stimulation, VNS)治疗相似的效应,VNS已经被美国FDA批准用于治疗难治性癫痫、难治性抑郁症等疾病<sup>[28-29]</sup>。在VNS治疗精神分裂症的研究中发现,两周的VNS可以有效逆转精神分裂症模型大鼠腹侧海



马的过度活跃,恢复异常的中脑边缘多巴胺神经元的功能,并改善与精神分裂症症状相关的症状<sup>[30]</sup>。因此,耳针治疗精神分裂症可能与现代生物学理论的迷走神经刺激的调节功能有关。

综上所述,本研究发现耳针干预能够改善精神分裂症模型小鼠阴性症状,其作用可能与耳迷走神经刺激的调节功能有关。耳针疗法可能是一种有前途的治疗精神分裂症的方法,但其相关的作用机制需要继续深入研究。本研究为临床运用非药物治疗精神分裂症提供了一种新的思路和实验依据。

#### 参考文献

- [1] COLLABORATORS GBDMD. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet Psychiatry*, 2022, 9(2): 137-150.
- [2] HUANG Y, WANG Y, WANG H, et al. Prevalence of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study[J]. *The Lancet Psychiatry*, 2019, 6(3): 211-224.
- [3] VAN DEN NOORT M, YEO S, LIM S, et al. Acupuncture as Add-On Treatment of the Positive, Negative, and Cognitive Symptoms of Patients with Schizophrenia: A Systematic Review[J]. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 2018, 5(2): 29.
- [4] 刘敬莹, 孙彦辉, 张莘, 等. 耳针理论学说的研究现状与思考[J]. *针刺研究*, 2021, 46(10): 893-900.
- [5] 王红, 刘晓茹, 姜劲峰, 等. 耳皮内刺治疗抑郁症的临床观察[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(4): 526-528.
- [6] ZHANG R, LU S, MENG L, et al. Genetic evidence for the association between the early growth response 3 (EGR3) gene and schizophrenia[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30237.
- [7] YAMADA K, GERBER DJ, IWAYAMA Y, et al. Genetic analysis of the calcineurin pathway identifies members of the EGR gene family, specifically EGR3, as potential susceptibility candidates in schizophrenia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(8): 2815-2820.
- [8] KIM SH, SONG JY, JOO EJ, et al. EGR3 as a potential susceptibility gene for schizophrenia in Korea[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2010, 153b(7): 1355-1360.
- [9] HUENTELMAN MJ, MUPPANA L, CORNEVEAUX JJ, et al. Association of SNPs in EGR3 and ARC with Schizophrenia Supports a Biological Pathway for Schizophrenia Risk[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0135076.
- [10] GALLITANO-MENDEL A, WOZNAK DF, PEHEK EA, et al. Mice lacking the immediate early gene Egr3 respond to the anti-aggressive effects of clozapine yet are relatively resistant to its sedating effects[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(6): 1266-1275.
- [11] SONG T, NIE B, MA E, et al. Functional magnetic resonance imaging reveals abnormal brain connectivity in EGR3 gene transfected rat model of schizophrenia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3): 678-683.
- [12] XIAO X, XU X, LI F, et al. Anti-inflammatory treatment with beta-asarone improves impairments in social interaction and cognition in MK-801 treated mice[J]. *Brain Res Bull*, 2019, 150: 150-159.
- [13] WANG X, LUO C, MAO XY, et al. Metformin reverses the schizophrenia-like behaviors induced by MK-801 in rats[J]. *Brain Res*, 2019, 1719: 30-39.
- [14] JEONG Y, BAE HJ, PARK K, et al. 4-Methoxycinnamic acid attenuates schizophrenia-like behaviors induced by MK-801 in mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 285: 114864.
- [15] STEPNIKI P, KONDEJ M, KACZOR AA. Current Concepts and Treatments of Schizophrenia[J]. *Molecules*, 2018, 23(8).
- [16] 钟琴, 田真真, 晏敏. 中医药治疗精神分裂症的研究进展[J]. *江西中医药*, 2022, 53(6): 67-69.
- [17] 林琴韵, 杨朝阳. 中医药治疗精神分裂症研究进展[J]. *河南中医*, 2022, 42(9): 1429-1434.
- [18] 周林艳, 刘文娟. 中医情志护理和耳穴压豆对精神分裂症患者认知功能和社会功能的影响[J]. *新中医*, 2020, 52(14): 144-146.
- [19] 宋欣欣, 安琪, 李玉煊. 针灸治疗精神分裂症的研究进展[J]. *双足与保健*, 2019, 28(3): 25-26.
- [20] 宁式颖, 郑璐, 李响, 等. 针灸治疗精神分裂症取穴规律研究[J]. *中医药信息*, 2015, 32(2): 31-34.
- [21] 黄庆元, 李建国. 耳针治疗精神分裂症幻听 34 例[J]. *甘肃中医学院学报*, 2005, 22(1): 36-38.
- [22] 王美娜, 张永臣, 王家振, 等. 项七针联合耳穴贴压治疗首发精神分裂症 32 例[J]. *中国针灸*, 2022, 42(3): 355-356.
- [23] 杨杰, 张晓明, 马新英, 等. 耳穴压豆联合奥氮平治疗精神分裂症的临床研究[J]. *陕西中医*, 2015, 36(7): 829-830.
- [24] 戴铁城. 以耳压法为主治疗青春型精神分裂症[J]. *甘肃中医*, 1994, 7(4): 25.
- [25] HILZ MJ. Transcutaneous vagus nerve stimulation - A brief introduction and overview[J]. *Auton Neurosci*, 2022, 243: 103038.
- [26] WANG L, WANG Y, WANG Y, et al. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulators: a review of past, present, and future devices[J]. *Expert Review of Medical Devices*, 2022: 1-19.
- [27] BUTT MF, ALBUSODA A, FARMER AD, et al. The anatomical basis for transcutaneous auricular vagus nerve stimulation[J]. *J Anat*, 2020, 236(4): 588-611.
- [28] LIU CH, YANG MH, ZHANG GZ, et al. Neural networks and the anti-inflammatory effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation in depression[J]. *Journal of neuroinflammation*, 2020, 17(1): 54.
- [29] YU Y, HE X, WANG Y, et al. Transcutaneous auricular vagal nerve stimulation inhibits limbic-regional P2X7R expression and reverses depressive-like behaviors in Zucker diabetic fatty rats[J]. *Neurosci Lett*, 2022, 775: 136562.
- [30] PEREZ SM, CARRENO FR, FRAZER A, et al. Vagal nerve stimulation reverses aberrant dopamine system function in the methylazoxymethanol acetate rodent model of schizophrenia[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(28): 9261-9267.

(修回日期:2023-02-14 编辑:蒲瑞生)