宁动颗粒对不同中医证型抽动－秽语综合征模型大鼠刻板行为的影响

李继君[1]　汤海霞[2]　尹文静[3]　李安源[2]

摘要　目的　观察宁动颗粒对不同中医证型抽动－秽语综合征(Tourette's syndrome,TS)大鼠模型刻板行为的影响。**方法**　32 只 Wistar 大鼠分别以心肝亏虚证、肝肾阴虚证、痰瘀阻窍证、脾虚肝亢证 TS 患儿血清诱导建立相应证型 TS 大鼠模型,每组 8 只,血清微量灌注同时给予宁动颗粒 120 mg/kg 灌胃,每天 3 次,连续 3 周;另设正常对照组(8 只),注射健康儿童血清,同时给予生理盐水灌胃。分别在给药第 1、7、14、21 天记录各组大鼠刻板行为次数。**结果**　TS 患儿血清抗神经抗体浓度高于健康儿童血清[U/L,(1.28 ±0.36) *vs* (0.52 ±0.24)],差异有统计学意义(P <0.01);心肝亏虚证、肝肾阴虚证、痰瘀阻窍证、脾虚肝亢证 TS 患儿血清抗神经抗体浓度分别为(1.34 ±0.41)、(1.19 ±0.51)、(1.29 ±0.61)、(1.17 ±0.45)U/L,不同证型比较,差异无统计学意义(P >0.05)。给药前 4 个证型组大鼠刻板行为比较,差异无统计学意义(P >0.05);除脾虚肝亢证组给药第 14 天外,心肝亏虚证组在给药第 7、14、21 天大鼠刻板行为次数均显著低于同期肝肾阴虚证组、痰瘀阻窍证组及脾虚肝亢证组,差异均有统计学意义(P <0.05, P <0.01)。给药 21 天后,心肝亏虚证组刻板行为总计数改善情况(42.8 ±12.6)明显优于肝肾阴虚证组(29.3 ±13.7)、痰瘀阻窍证组(21.9 ±10.4)、脾虚肝亢证组(30.6 ±9.6),差异均有统计学意义(P <0.01, P <0.05)。**结论**　TS 患儿血清中抗神经抗体浓度明显高于健康儿童,富含抗神经抗体 TS 血清可以诱导出刻板行为大鼠模型;宁动颗粒对心肝亏虚证 TS 模型大鼠刻板行为的改善优于其他证型。

关键词　宁动颗粒;抽动－秽语综合征;中医证型;刻板行为

Effect of Ningdong Granule on Stereotyped Behaviors in Tourette Syndrome Model Rats of Different Chinese Medical Syndromes

LI Ji-jun[1], TANG Hai-xia[2], YIN Wen-jing[3], and LI An-yuan[2]

1 Department of Integrative Medicine, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai (200127), China; 2 Department of Integrative Medicine, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan (250021), China; 3 Department of Pharmacy, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai (200127), China

ABSTRACT　Objective　To observe the effect of Ningdong Granule (NDG) on stereotyped behaviors in Tourette's syndrome (TS) model rats of different Chinese medical syndromes. Methods　Thirty-two Wistar rats were used to establish TS models of different Chinese medical syndromes (n =8) induced by TS children patients' sera of 4 syndromes, i.e., Xin-Gan deficiency syndrome (XGDS), Gan-Shen yin deficiency syndrome (GSYDS), sputum-turbid blocking aperture syndrome (STBAS), and Gan hyperactivity Pi deficiency syndrome (GHPDS). Corresponding sera was micro-infused to them while administering NDG (120 mg/kg each time, thrice daily, for 3 successive weeks). Besides, another normal control group (n =8) was set up by injecting sera from healthy children plus intragastric perfusion of normal saline. Stereotyped behaviors were recorded on the 1st, 7th, 14th, and 21st day after administration of NDG. Results　The anti-neural antibody serum concentration in TS children was significantly higher than that in healthy control [(1.28 ±0.36) U/L *vs* (0.52 ±0.24) U/L, P <0.01]. It was (1.34 ±0.41) U/L in the XGDS group, (1.19 ±0.51) U/L in the GSYDS group, (1.29 ±0.61) U/L in the STBAS group, and

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81202724)

作者单位:1.上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心中西医结合科(上海　200127);2.山东大学附属省立医院中西医结合科(济南 250021);3.上海交通大学医学院附属仁济医院药剂科(上海　200127)

通讯作者:李继君,Tel:021－38626161,E-mail:lijijun523@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.08.1112

中国中西医结合杂志

(1.17 ±0.45) U/L in the GHPDS group, showing no statistical difference (P >0.05). There was no statistical difference in stereotypic behaviors of rats after treatment among the four different Chinese medical syndromes (P >0.05). At day 7, 14, and 21 after treatment by NDG, the times of stereotyped behaviors were significantly less in the XGDS group than in the other three groups at the same time points except in the GHPDS group at day 14 (P <0.05, P <0.01). Meanwhile, the total numbers of stereotyped behaviors in the XGDS group [(42.8 ±12.6)] was obviously superior to that in the GSYDS group [(29.3 ±13.7)], the STBAS group [(21.9 ±10.4)], and the GHPDS group [(30.6 ±9.6)], showing statistical difference (P <0.01, P <0.05) after treatment by NDG at day 21. Conclusions The anti-neural antibody serum concentration in TS children was significantly higher than that in healthy children. Stereotyped behaviors could be induced in rats after intrastriatal micro-infusion of TS sera rich in anti-neural antibody. TS model rats of XGDS were better improved than rats in the other 3 groups after treatment by NDG.

KEYWORDS Ningdong Granule; Tourette's syndrome; Chinese medical syndrome; stereotyped behavior

抽动-秽语综合征(Tourette's syndrome,TS)常简称为多发性抽动症,是一种慢性的、复杂的精神行为障碍性疑难病。临床上多表现为多发的运动性和发声性抽动,症状常以头面部、肢体和躯干等部位肌肉多发性、突然的、快速的、不自主的、非节律性的反复刻板运动为主要特征,可有爆破状不自主发声和(或)猥亵言语,常伴强迫、注意力不集中、多动等行为和情绪障碍[1-3]。神经影像学及神经生化学研究表明 TS 患者发病可能与基底神经节及皮质—纹状体—丘脑—皮质回路及多巴胺神经元功能、免疫异常等多种因素相关[2-4]。西医治疗目前以精神类药物为主,副反应较多[5-7],中医辨证治疗 TS 具有一定的优势,前期研究表明宁动颗粒对心肝亏虚型 TS 疗效较好[8-14],但 TS 其他中医证型在动物模型中尚缺少相关研究。本研究以不同证型 TS 患儿血清立体定向注射到大鼠纹状体内的技术,建立 TS 相关证型大鼠模型,观察宁动颗粒对不同证型 TS 模型大鼠刻板行为的影响。

材料与方法

1 TS 患儿的筛选 TS 诊断符合美国《精神疾病诊断与统计手册》第 4 版(DSM-IV)标准[15],TS 中医辨证标准参照文献[16]。纳入标准:符合 TS 诊断;年龄 6~14 岁;依从性好;签署知情同意书。排除标准:前期已经用药干预治疗者;某些药物(如兴奋剂)或儿内科疾病(如亨廷顿舞蹈病或病毒感染后脑炎等)引起的继发性抽动障碍、习惯性痉挛或合并其他疾病且病情不稳定,需要服用其他药物治疗者。收集 2009 年 9 月—2010 年 7 月山东大学附属省立医院中西医结合儿科门诊 TS 患儿 48 例,年龄 6~14 岁,平均年龄(8.5 ±1.3)岁,按中医证型分为心肝亏虚证组、肝肾阴虚证组、痰瘀阻窍证组及脾虚肝亢证组,每组 12 例。

2 抗神经抗体检测及血清标本收集 48 例 TS 患儿分别空腹抽取肘静脉血 3 mL,分离血清,以酶联免疫吸附法(ELISA)测定抗神经抗体(Santa Cruz,美国)[6,7]。每个证型组取 OD 值最高的前 8 例患儿血清作为诱导同证型模型大鼠的血清,另取 8 名健康儿童血清作对照。

3 动物 7 周龄 Wistar 大鼠 40 只,雌雄各半,体重 250~280 g,由山东大学动物实验中心提供。环境温度(22 ±2) ℃,12 h/12 h 的光/暗循环,自由采食及饮水。

4 主要仪器 全自动大鼠脑立体定向仪(Stoelting-51600 型,Hamilton,美国),植入式微量渗透泵(Alzet-2003D 型,Alzet,美国),酶标仪(Thermo-MK3 型,Thermo,美国)。

5 不同中医证型 TS 大鼠模型诱导 采用血清微量灌注技术制备 TS 大鼠模型[4-7]。32 只大鼠随机注射 4 个证型 TS 患儿血清,并分为心肝亏虚证、肝肾阴虚证、痰瘀阻窍证、脾虚肝亢证组,每组 8 只;另设正常对照组(8 只),注射健康儿童血清。具体操作方法:用 10% 水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后将其固定于立体定向仪上,采用无菌手术操作技术,将 L 形的套管植入大鼠脑内,套管植入位点的三维坐标:即前囟前 2.0 mm,正中线左右 4.0 mm,颅下 7.0 mm。用牙科粘固粉固定套管,并严格按照外科手术无菌操作缝合伤口。套管植入后让大鼠恢复 1 周以重建血脑屏障的完整性。1 周后在无菌条件下,将渗透泵连接到套管上,泵内充满 PBS,内含 50 μL 未稀释血清的无菌聚乙烯管与渗透泵相连。以 0.5 μL/h 的速度缓慢注射血清,注射时间持续 72 h。每例患儿血清只用于 1 只大鼠微注射。注射完成后,腹腔注射

10%水合氯醛再次麻醉大鼠,固定于立体定向仪上。沿颅正中线切开皮肤暴露大鼠颅骨,取出渗透泵及套管,缝合伤口,将大鼠放于保温垫上直至苏醒。

6　给药　从上述微注射后第 1 天开始,每天分别于 8:00、13:00、17:00 给予宁动颗粒(由钩藤 10 g、天麻 10 g、党参 10 g、麦冬 10 g、五味子 10 g、龙骨 15 g、牡蛎 30 g、白芍 10 g、甘草 6 g 等共 15 味中药组成,批号:20100311,由深圳三九现代中药加工制备)[8,12]灌胃,每次 120 mg/kg[8],连续给药 3 周;正常对照组同时给予生理盐水 5 mL/kg 灌胃[8]。

7　大鼠刻板行为评估　在微量灌注及给药第 1、7、14、21 天记录大鼠的刻板行为。在每 12 h 光循环的最后 30 min 观察大鼠的刻板行为[4-7],包括:啮咬(用牙齿咬笼子,嚼)、将前爪举到嘴边或面部、自咬、舔(不包括理毛)、理毛、摇头、抓爪、后腿站立、阶段性发声(指大鼠在短时间内重复的中等音调的刻板行为发声)[6,7]。理毛行为按照此类行为发生的时程进行记录。

8　统计学方法　应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,组内两两比较采用 *LSD* 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1　TS 患儿与健康儿童血清抗神经抗体浓度比较　48 例 TS 患儿血清抗神经抗体浓度高于健康儿童血清[U/L,(1.28 ±0.36) *vs* (0.52 ±0.24)],差异有统计学意义($P<0.01$)。心肝亏虚证、肝肾阴虚证、痰瘀阻窍证、脾虚肝亢证 TS 患儿抗神经抗体浓度分别为(1.34 ±0.41)、(1.19 ±0.51)、(1.29 ±0.61)、(1.17 ±0.45) U/L,4 个证型比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

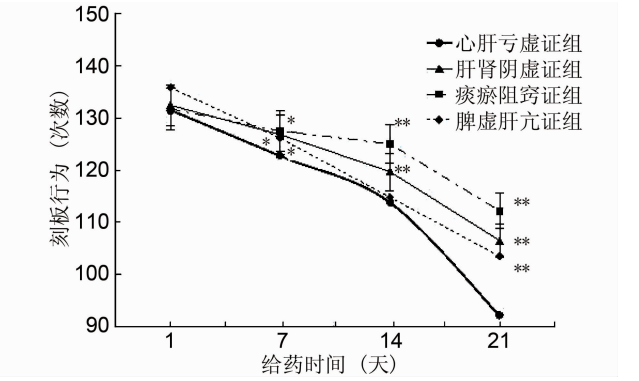
2　TS 血清与正常血清灌注前后大鼠刻板行为比较(表 1)　正常血清灌注后大鼠刻板行为总数与血清灌注前刻板行为总数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。TS 血清灌注后大鼠刻板行为次数较血清灌注前及正常血清灌注后明显增加($P<0.01$, $P<0.05$)。

3　不同证型组 TS 大鼠各时间点刻板行为比较(图 1)　给药前 4 个证型组 TS 大鼠刻板行为次数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。除脾虚肝亢证组给药第 14 天外,心肝亏虚证组在给药第 7、14、21 天大鼠刻板行为次数均显著低于同期肝肾阴虚证组、痰瘀阻窍证组及脾虚肝亢证组,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 1　TS 血清与正常血清灌注前后大鼠刻板行为比较　(次数, $\bar{x} \pm s$)

刻板行为	灌注前 (n =40)	正常血清灌注后 (n =8)	TS 血清微灌注后 (n =32)
啮咬	22.3 ±5.3 **	28.9 ±7.7 **	51.2 ±6.2
举前爪至嘴边面部	3.2 ±1.3 **	3.1 ±1.8 **	14.1 ±3.3
自咬	6.5 ±2.6 *	7.1 ±3.1 *	9.4 ±3.4
舔	3.3 ±1.4 **	3.9 ±1.7 **	9.7 ±2.5
理毛	9.5 ±3.1 **	10.4 ±3.0 **	14.2 ±4.2
摇头	6.2 ±2.8 *	6.8 ±3.2 *	9.8 ±3.1
抓爪	1.2 ±0.5 **	1.5 ±0.6 **	5.4 ±1.1
后腿站立	3.8 ±1.3 **	3.9 ±1.8 **	9.9 ±2.6
阶段性发声	1.7 ±0.8 **	2.0 ±0.7 **	8.8 ±2.9
刻板行为总次数	58.8 ±11.2 **	62.7 ±15.5 **	119.4 ±17.3

注:与 TS 血清微灌注后比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$



注:与心肝亏虚证组同期比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$

图 1　不同证型组 TS 大鼠各时间点刻板行为比较

4　不同证型组 TS 大鼠刻板行为改善情况比较(表 2)　给药 21 天后 4 个证型组 TS 大鼠刻板行为总计数改善情况,即治疗前后刻板行为次数差值($D1_{灌注后}-D21_{给药后}$)比较,心肝亏虚证组刻板行为总计数改善情况明显优于肝肾阴虚证组、痰瘀阻窍证组及脾虚肝亢证组,差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)。

表 2　不同证型组 TS 大鼠刻板行为改善情况比较　(次数, $\bar{x} \pm s$)

刻板行为	治疗前后刻板行为次数差值($D1_{灌注后}-D21_{给药后}$)			
	心肝亏虚证组(n =8)	肝肾阴虚证组(n =8)	痰瘀阻窍证组(n =8)	脾虚肝亢证组(n =8)
啮咬	15.4 ±3.3	10.6 ±3.0 **	7.6 ±2.4 **	9.6 ±3.1 **
举前爪至嘴边面部	6.9 ±2.5	5.3 ±1.9 *	3.1 ±1.4 **	4.3 ±1.8 *
自咬	2.0 ±1.4	1.5 ±0.6 *	1.3 ±0.8 *	1.7 ±1.2
舔	4.1 ±1.6	3.3 ±1.2 *	3.0 ±1.5 *	3.1 ±1.5 *
理毛	4.3 ±1.7	3.0 ±1.3 *	3.2 ±1.5	2.8 ±1.4 **
摇头	2.3 ±1.0	2.0 ±0.5	1.9 ±1.2 *	2.3 ±1.5
抓爪	3.2 ±1.3	2.1 ±0.8 *	2.0 ±0.9 *	2.8 ±1.4
后腿站立	4.5 ±1.7	3.3 ±1.6 *	2.7 ±1.5 **	3.3 ±1.7 *
阶段性发声	5.0 ±2.2	4.2 ±1.6 *	2.9 ±1.5 **	4.1 ±1.3 *
刻板行为总次数	42.8 ±12.6	29.3 ±13.7 **	21.9 ±10.4 **	30.6 ±9.6 *

注:与心肝亏虚证组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$

中国中西医结合杂志

讨　论

TS 是常发病于学龄儿童的常见精神行为性疑难病,症状严重程度不一,轻者常不被患儿家长重视,重者干扰患者日常生活学习,损害患者的认知功能,降低其社会适应能力,严重影响患儿的学习及身心发育。TS 儿童发病率在 1% 左右,近年来有增加趋势[1-5]。TS 的病因及发病机制尚不十分明确。近年来大量研究表明免疫学的异常可能与 TS 易感人群发生机制存在某种关联,同时对 TS 患者的血清学检测发现有抗神经抗体的存在,可致纹状体功能受损[5-7],富含抗神经抗体的血清可以诱导出类似 TS 症状的刻板抽动行为,故基于前期研究[4],本实验采用富含抗神经抗体的血清成功诱导出刻板抽动行为大鼠模型。

中医无 TS 病名,该病临床症状与中医"肝风"、"瘛疭"、"抽搐"、"筋惕肉瞤"、"梅核气"等相关症状描述存在着一定联系[9]。前期研究表明,TS 以心肝亏虚、肝肾阴虚、痰瘀阻窍、脾虚肝亢 4 种证型较常见,其中以心肝亏虚证型尤为多见,约占 TS 患儿的 41.3%[16]。中医辨证治疗 TS 显示良好的疗效,具有一定的优势和特色,毒副反应较少,家长和患儿易于接受。宁动颗粒是中医儿科专家李安源教授多年临床治疗心肝亏虚证 TS 的经验方,研究表明其对心肝亏虚证 TS 有效率达 83%[10-14]。宁动颗粒以钩藤、天麻、党参、麦冬为君,平肝熄风,养心安神,补气益阴;以龙骨、牡蛎镇惊定志为臣,加强熄风解痉之功效;甘草为使,助养心之功效,又可与白芍同行以缓解筋脉、肌肉之挛急。诸药合用,共奏养心柔肝、熄风止痉、扶正达邪、邪去正安之妙。

课题组前期做了大量有关宁动颗粒临床及药理机制的研究,但尚缺乏将中医证型和动物模型有机结合的相关研究。故本实验探索性地以不同证型 TS 患儿血清诱导出不同证型 TS 大鼠模型,并用宁动颗粒进行干预。结果发现宁动颗粒对心肝亏虚证 TS 患儿血清诱导的大鼠模型作用明显优于其他证型,这与课题组前期临床研究相契合,间接表明心肝亏虚证 TS 患儿血清诱导的动物模型在中医证型及中药干预上存在着某种内在关联,但具体机制有待进一步研究。

辨证论治是中医临床的精髓,也是中医最鲜明的特色,其针对特定的患者,很难将此体系置于动物实验研究体系中。本实验基于前期研究探索性地将 TS 中医证型引入动物模型中。目前有关动物模型的证型鉴别尚缺乏客观标准,其机制也不明确,希望为中医证型引入动物模型提供不同思路和方法。

参 考 文 献

[1] Bloch M, State M, Pittenger C. Recent advances in Tourette syndrome[J]. Curr Opin Neurol, 2011, 24(2): 119-125.

[2] Leckman JF. Tourette's syndrome[J]. Lancet, 2002, 360(9345): 1577-1586.

[3] Singer HS. Tourette's syndrome: from behavior to biology[J]. Lancet Neurol, 2005, 4(3): 149-159.

[4] Li JJ, Li ZW, Li AY, et al. Abnormal expression of dopamine and serotonin transporters associated with the pathophysiologic mechanism of Tourette's syndrome[J]. Neurol Ind, 2010, 58(4): 523-529.

[5] Taylor JR, Morshed SA, Parveen S, et al. An animal model of Tourette's syndrome[J]. Am J Psychiatry, 2002, 159(4): 657-660.

[6] Liu X, Wang Y, Li D, et al. Transplantation of rat neural stem cells reduces stereotypic behaviors in rats after intrastriatal microinfusion of Tourette's syndrome sera[J]. Behav Brain Res, 2008, 186(1): 84-90.

[7] 刘秀梅,王玉玮,初清.纹状体内微量灌注 Tourette 综合征患者血清对大鼠刻板行为的影响[J].中国心理卫生杂志, 2010, 24(1): 69-71.

[8] Lu H, Li A, Ma H, et al. Effects of Ningdong Granule on the dopamine system of Tourette's syndrome rat models[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 124(3): 488-492.

[9] 李继君,李安源. 李安源治疗小儿多发性抽动症经验[J].中医杂志, 2009, 50(1): 15-16.

[10] 李安源,马瑞萍,吕红,等. 宁动颗粒治疗抽动-秽语综合征临床研究[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(1): 33-35.

[11] 李安源,吕红,孙蓉,等. 宁动颗粒治疗抽动秽语综合征的药效学研究[J]. 中国中西医结合儿科学杂志, 2009, 1(1): 48-50.

[12] Li JJ, Li ZW, Wang SZ, et al. Ningdong Granule: a complementary and alternative therapy in the treatment of attention deficit/hyperactivity disorder[J]. Psychopharmacology (Berlin), 2011, 216(4): 501-509.

[13] Li AY, Cong S, Lu H, et al. Clinical observation on treatment of Tourette's syndrome by integrative medicine[J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(4): 261-265.

[14] Zhao L, Li AY, Lu H, et al. Traditional Chinese medicine Ningdong Granule: the beneficial effects in Tourette's disorder[J]. J Int Med Res, 2010, 38(1), 169-175.

[15] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders[M]. Text revision, 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association, 2000.

[16] 李继君,赵林,齐芳华,等.126 例抽动-秽语综合征患儿中医证候学特点[J].中国中医杂志, 2010, 51(7): 639-641.

(收稿:2012-11-09　修回:2013-04-09)