

· 基础研究 ·

柴胡加龙骨牡蛎汤对多发性抽动症模型大鼠行为学和多巴胺系统的影响

杨德爽¹ 孟州令¹ 国文文¹ 王素梅² 陈 琪¹ 陈光耀¹ 王雅璇³ 卫 利⁴

摘要 目的 观察柴胡加龙骨牡蛎汤对多发性抽动症(Tourette syndrome, TS)模型大鼠运动行为和刻板行为,以及纹状体多巴胺(dopamine, DA)、血浆 DA 和纹状体多巴胺受体(dopamine D2 receptors, D2R)含量的影响。**方法** 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组,正常组、模型组、硫必利组、中药组,每组 10 只。腹腔注射 3,3'-亚氨基二丙腈(3,3'-iminodipropionitrile, IDPN)建立 TS 大鼠模型。正常组和模型组给予生理盐水,其余 2 组分别给予盐酸硫必利[37.8 mg/(kg·d)]和柴胡加龙骨牡蛎汤颗粒剂[15.5 g/(kg·d)],连续灌胃 4 周,每周记录大鼠行为学积分变化。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测纹状体 DA、血浆 DA 及纹状体 D2R 的含量。**结果** (1)造模后模型组运动行为学积分高于正常组($P < 0.01$)。用药 4 周后,硫必利组、中药组运动行为和刻板行为学积分低于模型组($P < 0.05$)。(2)用药 4 周后,与正常组比较,模型组血浆 DA、纹状体 D2R 含量升高($P < 0.01$),纹状体 DA 降低($P < 0.05$);与模型组比较,硫必利组血浆 DA 含量下降($P < 0.05$),纹状体 DA 含量升高($P < 0.05$);中药组血浆 DA 含量下降($P < 0.05$),纹状体 DA 含量升高($P < 0.05$)。**结论** 柴胡加龙骨牡蛎汤对 TS 模型大鼠的运动行为、刻板行为有显著抑制作用,其抗抽动作用可能与调节外周及脑纹状体 DA 含量有关。

关键词 多发性抽动症;柴胡加龙骨牡蛎汤;行为学;多巴胺;多巴胺 D2 受体

Effects of Chaihujialonggumuli Decoction on Ethology and Dopamine System of Tourette Syndrome Model Rats YANG De-shuang¹, MENG Zhou-ling¹, GUO Wen-wen¹, WANG Su-mei², CHEN Qi¹, CHEN Guang-yao¹, WANG Ya-xuan³, and WEI Li⁴ 1 Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 2 Chinese Medicine Treatment Center, TCM Pediatric Clinics, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); 3 Department of Pediatrics, Beijing First Hospital of Integrated Chinese Medicine and Western Medicine, Beijing (100034); 4 Department of Pediatrics, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Chaihujialonggumuli Decoction (CD) on kinematic behavior and stereotyped behaviors in Tourette syndrome (TS) model rats, as well as on levels of plasma striatum dopamine (DA), plasma DA, and striatum dopamine D2 receptors (D2R). **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into 4 groups, namely, the normal group, the model group, the Tiapride group, and the TCM group, 10 rats in each group. TS rat models were set up by intraperitoneal injection of 3,3'-iminodipropionitrile (IDPN). Normal saline (NS) was given to rats in the normal group and the model group. Tiapride Hydrochloride [37.8 mg/(kg·d)] and CD Granule [15.5 g/(kg·d)] were given to other 2 groups respectively by gastrogavage for 4 successive weeks. Behavioral integral changes of rats were recorded every week. Levels of striatum DA, plasma DA, and striatum D2R were measured by ELISA. **Results** (1) After modeling, the kinematic behavior scores in the model group were

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 81202725); 2015 年大学生创新创业项目(No. 201510026011)

作者单位:1. 北京中医药大学研究生院(北京 100029); 2. 北京中医药大学东方医院中医儿科诊疗中心(北京 100078); 3. 北京市第一中西医结合医院儿科(北京 100034); 4. 北京中医药大学东方医院儿科(北京 100078)

通讯作者:卫利, Tel: 010-67689706, E-mail: weilili0881@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20171125. 288

higher than those of the normal group ($P < 0.01$). The kinematic behavior scores and stereotyped behavior scores in the Tiapride group and the TCM group were lower than those of the model group after 4 weeks of medication ($P < 0.05$). (2) The levels of plasma DA and striatum D2R were increased ($P < 0.05$), and striatum DA was decreased in the model group after 4 weeks of medication, as compared with the normal group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of plasma DA were decreased ($P < 0.05$) and striatum DA content increased ($P < 0.05$) in the Tiapride group. The levels of plasma DA were decreased ($P < 0.05$) and striatum DA content increased ($P < 0.05$) in the TCM group. Conclusions CD could significantly inhibit the kinematic behaviors and stereotyped behaviors in TS model rats. Its anti-twitch actions might be associated with regulating peripheral and brain striatum DA contents.

KEYWORDS Tourette syndrome; Chaihujialonggumuli Decoction; ethology; dopamine; dopamine D2 receptor

小儿多发性抽动症 (Tourette syndrome, TS) 是一种慢性神经精神障碍性疾病, 主要发生在小儿和青少年时期, 以反复、迅速、突发、刻板的运动和发声抽动为主要临床表现。TS 发病的生化机制研究中, 最早发现多巴胺 (dopamine, DA) 与多发性抽动症发病有一定关系, 多倾向于基底节纹状体的神经突触 DA 活动过度及 DA 受体超敏感^[1]。小儿抽动症严重影响儿童身心发育, 现代医学主要采用神经阻滞剂 (硫必利等) 治疗 TS, 但不良反应大, 停药后症状易反复。柴胡加龙骨牡蛎汤出自《伤寒论》, 研究发现其对各种神志类疾病如失眠、更年期综合征、自闭症、抑郁症、焦虑症、癫痫等有良好的治疗效果^[2], 另外, 应用柴胡加龙骨牡蛎汤或其加减治疗 TS 取得较好临床疗效^[3,4]。因此本实验探究柴胡加龙骨牡蛎汤对 TS 模型大鼠的干预作用, 并从 DA 系统的角度探究柴胡加龙骨牡蛎汤治疗 TS 的作用机制。

材料与方法

1 动物 雄性 SD 大鼠 40 只, 2 月龄, 体重 (180 ± 10) g, 购自斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司, SPF 级, 合格证号: 11401500007810, 许可证号: SCXK (京) 2011-0004。12 h 光照、室温 (22 ± 2) °C、50%~55% 相对湿度条件下, 于北京中医药大学基础医学院实验中心适应性饲养 1 周, 实验全程均予以普通饲料进食, 自由进水。遵守国家有关实验动物保护与使用准则。

2 药物、试剂 柴胡加龙骨牡蛎汤根据《伤寒论》原文制定, 由柴胡 24 g、法半夏 12 g、桂枝 9 g、茯苓 9 g、黄芩 9 g、大枣 12 g、人参 9 g、牡蛎 9 g、龙骨 9 g、生姜 9 g、大黄 12 g 组成, 大鼠与人用药之比为 6:3, 由北京中医药大学东直门医院提供并浓缩制备

成颗粒剂, 用蒸馏水配悬浊液, 相当于含生药 1.55 g/mL。盐酸硫必利, 由江苏天士力帝益药业有限公司生产, 批号: 201504091, 100 mg/片, 用蒸馏水配置成溶液, 含生药 3.78 mg/mL。3,3'-亚氨基二丙腈 (3,3'-iminodipropionitrile, IDPN), 购自美国 Sigma 公司, 用生理盐水稀释成 10% 的溶液。DA 和 D2R 试剂盒由北京百诺威生物科技有限公司提供。

3 分组、造模及干预方法 40 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、硫必利组和柴胡加龙骨牡蛎汤组 (简称中药组), 每组 10 只。正常组采用生理盐水腹腔注射, 其余组参照参考文献[5]造模方法建立 IDPN 诱导的 TS 模型, IDPN 300 mg/(kg·d) 腹腔注射, 每天 1 次, 连续 7 天。造模后每天对大鼠进行灌胃, 正常组和模型组给予 1 mL/100 g 生理盐水, 硫必利组和中药组分别给予 1 mL/100 g 的硫必利悬浊液和柴胡加龙骨牡蛎汤悬浊液, 连续灌胃 4 周。灌胃过程中, 大鼠死亡 3 只, 其中模型组死亡 1 只、中药组死亡 2 只。

4 检测指标及方法

4.1 行为学检测 每周末次给药后, 由两名实验人员分别对每只大鼠进行运动行为、刻板行为评分。将大鼠置于鼠笼内 (安静、避光), 同时进行摄影记录。适应 5 min 后开始进行评估, 每只观察 1~2 min, 采用双盲法, 两人评分取平均值作为结果并记录。

4.1.1 运动行为学评分 依照参考文献[6]进行评估。0 分: 安静或正常活动; 1 分: 过度兴奋; 2 分: 探究行为增加, 不连续吸鼻; 3 分: 不停跑动; 4 分: 不停跑动伴有惊跳。

4.1.2 刻板行为学评分 参照 Diamond BI^[7] 方法进行评估。0 分: 无刻板运动; 1 分: 躯体旋转行为 (顺时针或逆时针的旋转行为); 2 分: 头和颈部的上

下运动过多(头颈部和地面垂直方向的一种异常运动);3分:头颈部的上下运动过多加旋转运动;4分:头向侧摆,合并头和颈部的上下运动过多。

4.2 标本采集 末次给药 24 h 后,采用 10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉大鼠,取腹主动脉血于防凝管中,快速离心 (3 000 r/min) 10 min,取上清液,分装后冷冻保存待检测。麻醉后断头取脑,根据 George Paxinos 大鼠脑图谱在冰盒上快速剥离大鼠纹状体,放于冻存管中,置于液氮中保存。测定时温度保持在 2~8℃,取出标本,电子天平称重,用移液枪加入磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4),于研磨玻璃管中充分研磨后匀浆离心 (3 000 r/min) 20 min,取上清液,分装后冷冻保存待测。

4.3 DA 及 D2R 的检测 ELISA 法检测血浆 DA、纹状体 DA 和 D2R 的含量。(1)96 孔酶标板分为标准孔、空白孔与待测样品孔。(2)标准品的稀释与加样:在酶标包被板上设标准品孔 10 孔,在第一、第二孔中分别加标准品 100 μ L,然后在第一、第二孔中加标准品稀释液 50 μ L,混匀;然后从第一孔、第二孔中各取 100 μ L 分别加到第三孔和第四孔,依次类推加满 10 孔。(3)在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L,然后再加待测样品 10 μ L (样品最终稀释度为 5 倍)。将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀,用封板膜封板后置 37℃温育 30 min。(4)配液、洗涤:将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用。小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。(5)加酶:每孔加入酶标试剂 50 μ L,空白孔除外,温育、洗涤。(6)显色:每孔先加入显色剂 A 50 μ L,再加入显色剂 B 50 μ L,轻轻震荡混匀,37℃避光显色 15 min。(7)终止:每孔加终止液 50 μ L,终止反应(此时蓝色立转黄色)。(8)测定:空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。测定应在加终止液后 15 min 以内进行。(9)以标准品浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,在坐标纸上绘制标准曲线,计算出标准曲线直线回归方程式,将样品 OD 值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,计算出 DA、D2R 浓度。

5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,若资料为正态分布时,运动行为学积分和刻板行为积分采用重复测量的方差分析,DA 及 D2R 采用单因素方差分析进行组间比较;若为偏态分布的资料,采用秩和检验进行组间比较。 $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

结 果

1 各组治疗前后运动行为学积分变化比较(表 1) 与正常组比较,模型组各时间点动行为学积分升高($P < 0.01$);与模型组比较,用药 2、3、4 周后硫必利组运动行为学积分下降($P < 0.05$),用药 3、4 周后中药组运动行为学积分下降($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠治疗前后运动学行为积分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	造模后	用药 2 周	用药 3 周	用药 4 周
正常	10	0.30 $\pm$ 0.15	0.50 $\pm$ 0.17	0.50 $\pm$ 0.17	0.70 $\pm$ 0.48
模型	9	2.50 $\pm$ 0.52 [*]	2.88 $\pm$ 0.33 [*]	2.78 $\pm$ 0.44 [*]	2.89 $\pm$ 0.33 [*]
硫必利	10	2.60 $\pm$ 0.52	2.30 $\pm$ 0.48 ^{Δ}	1.70 $\pm$ 0.48 ^{Δ}	2.50 $\pm$ 0.52 ^{Δ}
中药	8	2.63 $\pm$ 0.52	2.75 $\pm$ 0.46	1.50 $\pm$ 0.54 ^{Δ}	1.63 $\pm$ 0.92 ^{Δ}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{Δ} $P < 0.05$

2 各组治疗前后刻板行为学积分变化比较(表 2) 与模型组比较,用药 2、3、4 周后硫必利组及中药组刻板行为学积分下降($P < 0.05$);与硫必利组比较,用药 3 周后中药组刻板行为学积分下降($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠治疗前后刻板行为学积分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	造模后	用药 2 周	用药 3 周	用药 4 周
模型	9	2.67 $\pm$ 0.71	2.89 $\pm$ 0.33	2.44 $\pm$ 0.53	2.67 $\pm$ 0.50
硫必利	10	2.70 $\pm$ 0.82	2.30 $\pm$ 0.48 [*]	2.20 $\pm$ 0.42 [*]	1.90 $\pm$ 0.32 [*]
中药	8	3.13 $\pm$ 0.83	2.50 $\pm$ 0.53 [*]	1.25 $\pm$ 0.26 ^{*Δ}	1.63 $\pm$ 0.74 [*]

注:正常组无刻板行为故不参与比较;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与硫必利组比较, ^{Δ} $P < 0.05$

3 各组大鼠 DA 及 D2R 含量比较(表 3) 给药 4 周后,与正常组比较,模型组血浆 DA、纹状体 D2R 含量升高($P < 0.01$),纹状体 DA 降低($P < 0.05$);与模型组比较,硫必利组及中药组血浆 DA 含量下降($P < 0.05$),纹状体 DA 含量升高($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠 DA 及 D2R 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	血浆 DA	纹状体 DA	纹状体 D2R
正常	5	2 018.84 $\pm$ 872.11	107.63 $\pm$ 32.08	335.58 $\pm$ 110.61
模型	5	3 308.09 $\pm$ 389.93 [*]	55.17 $\pm$ 10.99 [*]	492.06 $\pm$ 62.87 [*]
硫必利	5	1 120.68 $\pm$ 761.28 ^{Δ}	85.67 $\pm$ 18.16 ^{Δ}	516.55 $\pm$ 45.61
中药	5	2 319.15 $\pm$ 508.21 ^{Δ}	77.70 $\pm$ 17.32 ^{Δ}	460.08 $\pm$ 96.44

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{Δ} $P < 0.05$

讨 论

柴胡加龙骨牡蛎汤出自《伤寒论·辨太阳病脉证并治》,为和解少阳、重镇安神之方,主要治疗邪热内陷、表里俱病、虚实互见所导致的少阳枢机不利^[8]。

王素梅教授在长期论治小儿多发性抽动症的临床实践中,发现因情志导致的抽动患儿并不少见,小儿脾常不足,肝阳易亢,由于学习压力大,或家长对待患儿过于宠溺或严苛,导致患儿情志不疏,所欲不遂,则气机不畅,郁久化火,炼液为痰,上蒙清窍,引动肝风,出现烦躁易怒、挤眉眨眼、摇头耸肩、秽语等抽动症状。临证使用柴胡加龙骨牡蛎汤,治疗肝亢风动型抽动患儿,疗效确切。方中柴胡、黄芩和解少阳、疏通三焦气机,大黄泻火,三者合用可解所郁之火;龙骨、牡蛎重镇安神,平肝潜阳;半夏、茯苓、生姜祛痰渗湿降逆;人参、大枣、桂枝温中益气。泻火不伤正,为防止小儿铅中毒,除去铅丹。诸药合用符合虚实夹杂的抽动症病机。

TS 发病机制尚未阐明,大多数学者认为与皮质—纹状体—丘脑—皮质回路有关,其中黑质—纹状体—多巴胺通路是目前研究的热点,认为该通路中多巴胺和/或多巴胺受体的异常参与 TS 发病。本实验中, ID-PN 诱发的 TS 模型大鼠,血浆 DA 升高,纹状体 DA 降低,提示 IDPN 可能是通过影响 DA 代谢诱发大鼠出现抽动症状。实验数据表明,用药 4 周后硫必利与中药对 TS 模型大鼠的运动行为和刻板行为均有改善作用,且二者对 TS 模型大鼠行为学的改善并无明显差异。且硫必利组和中药组血浆 DA 含量均降低,纹状体 DA 含量均升高,提示西药盐酸硫必利和中药柴胡加龙骨牡蛎汤具有调节中枢 DA 和外周 DA 含量的作用。与部分文献报道^[9-11]的 TS 患者纹状体 DA 增加的结果不同,本实验结果显示纹状体 DA 在模型组中呈现低表达,与王道涵等^[12]报道的结果类似。另外,西药硫必利与中药柴胡加龙骨牡蛎汤对纹状体 D2R 并无确定调节作用,提示二者对 TS 的治疗作用可能与纹状体 D2R 无关,或者有其他系统参与调节,具体机制尚需要今后进一步研究。

本实验证实了柴胡加龙骨牡蛎汤可改善 TS 大鼠的运动行为和刻板行为,其抗抽动的作用机制可能与调节外周和中枢神经 DA 系统有关。

参 考 文 献

- [1] Cohen AJ, Leckman JF. Sensory phenomena associated with Gilles de la Tourette syndrome[J]. J Clin Psychiatry, 1992, 53(9): 319-323.
- [2] 陈琪, 杨德爽, 李诗梦, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(17): 3441-3444.
- [3] 唐彦. 仲景方治疗小儿多发性抽动症体悟[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4743-4745.
- [4] 周红权. 应用李士懋教授“火郁发之”理论治愈抽动症一例[J]. 中国民间疗法, 2015, 11: 38.
- [5] 方锦颖, 陈琪, 国文文, 等. 龟板对多发性抽动症模型大鼠的干预作用与对 DA 及 D₂ 受体的影响[J]. 环球中医药, 2016, 9(7): 781-784.
- [6] Al Kadasah S, Al Mutaury A, Siddiquei M, et al. Pentoxifylline attenuates iminodipropionitrile-induced behavioral abnormalities in rats[J]. Behav Pharmacol, 2009, 20(4): 356-360.
- [7] Diamond BI, Reyes MG, Borison R. A new animal model for Tourette syndrome[J]. Adv Neurol, 1982, 35(4): 221-225.
- [8] 林珍臣. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗情志类疾病 128 例之文献研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [9] Singer HS. Neurobiology of Tourette syndrome[J]. Neurologic Clin, 1997, 15(2): 357-379.
- [10] Singer HS, Butler IJ, Tune LE, et al. Dopaminergic dysfunction in Tourette syndrome[J]. Ann Neurol, 1982, 12(4): 361-366.
- [11] Singer HS, Hahn IH, Moran TH. Abnormal dopamine uptake sites in postmortem striatum from patients with Tourette's syndrome[J]. Ann Neurol, 1991, 30(4): 558-562.
- [12] 王道涵, 王素梅, 卫利, 等. 健脾止动汤对多发性抽动症模型小鼠纹状体多巴胺及其受体含量的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(7): 452-455.

(收稿: 2015-09-23 修回: 2017-09-18)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶