

红景天苷对 Tourette 综合征模型大鼠抽动行为的影响

谢 卉¹ 王 珍² 季 燕¹ 尹 静¹ 阳文浩¹ 任利民¹

摘要 **目的** 观察红景天苷对 Tourette 综合征(Tourette syndrome, TS)模型大鼠抽动行为及体内多巴胺(dopamine, DA)、5-羟色胺(serotonin, 5-HT)的影响。**方法** 将 40 只大鼠随机分为空白组、模型组、氟哌啶醇组[(西药组, 0.5 mg/(kg·d))、红景天苷组[(中药组, 50 mg/(kg·d))], 每组 10 只, 采用亚氨基二丙腈(imino-dipropio-nitrile, IDPN)诱导的大鼠作为 TS 动物模型。造模后第 4 日开始腹腔注射干预, 空白组及模型组予生理盐水, 连续干预 7 日。对造模前、造模后及干预后各组大鼠进行刻板行为评分并测定血浆及纹状体中 DA、5-HT 含量。**结果** 与空白组比较, 模型组造模后抽动行为评分升高($P < 0.01$), 血浆及纹状体 DA、5-HT 含量降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与本组造模后比较, 两个给药组干预后抽动行为评分降低($P < 0.01$), 血浆 DA 含量升高($P < 0.01$), 中药组 5-HT 含量升高($P < 0.01$)。与模型组同期比较, 两个给药组干预后抽动行为评分均降低($P < 0.01$), 血浆及纹状体 DA 含量升高($P < 0.01$, $P < 0.05$), 中药组血浆及纹状体 5-HT 含量升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与西药组同期比较, 中药组干预后抽动行为评分升高($P < 0.01$), 血浆及纹状体 DA 含量降低, 5-HT 含量升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 红景天苷能减少 TS 模型大鼠的抽动行为, 并使血浆及纹状体的 DA 水平增高。红景天苷对抽动行为的疗效与调节纹状体 DA 能神经元活动有关。

关键词 Tourette 综合征; 亚氨基二丙腈; 多巴胺; 5-羟色胺; 红景天苷

Effects of Salidroside on Tic Behavior of Tourette Syndrome Model Rats XIE Hui¹, WANG Zhen², JI Yan¹, YIN Jing¹, YANG Wen-hao¹, and REN Li-min¹ 1 Department of Encephalopathy, Clifford Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (511495); 2 Experimental Center, Clifford Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (511495)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of salidroside on tic behavior and *in vivo* dopamine (DA) and serotonin (5-HT) levels in Tourette syndrome (TS) model rats. **Methods** Forty rats were randomly divided into the blank control group, the TS model group, the haloperidol-treated group (0.5 mg/kg·d⁻¹), and the salidroside-treated group (50 mg/kg·d⁻¹), 10 in each group. TS rat model was induced by imino-dipropio-nitrile (IDPN). Peritoneal injection of haloperidol and salidroside was started from the 4th day of modeling in the haloperidol-treated group and the salidroside-treated group respectively. Normal saline was peritoneally injected to rats in the blank control group and the TS model group respectively. Stereotyped behavior was scored, and changes of DA and 5-HT levels in blood and striatum were measured before modeling, after modeling, and after intervention. **Results** Compared with the blank control group, the score of the tic behavior was elevated ($P < 0.01$), levels of DA and 5-HT in plasma and striatum were reduced in the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the same group after modeling, the tic behavior score decreased and plasma DA levels increased in the two treated groups after intervention ($P < 0.01$). 5-HT content increased in the salidroside-treated group ($P < 0.01$). Compared with the model group after intervention, the tic behavior score was significantly reduced ($P < 0.01$), and

基金项目:广东省中医药管理局 2010 年建设中医药强省立项资助课题(No. 2010259);2011 年番禺区科技计划项目(No. 2011-Z-03-

69)

作者单位:1.广州中医药大学祈福医院脑病科(广州 511495);2.广州中医药大学祈福医院实验中心(广州 511495)

通讯作者:谢 卉, Tel:020-84518222 转 81998, E-mail: xiehui@sina.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2016.01.0090

DA levels in plasma and striatum were elevated ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in the salidroside-treated group and the haloperidol-treated group. Compared with the haloperidol-treated group, the tic behavior score increased ($P < 0.01$), DA levels in plasma and striatum were lowered ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the 5-HT level increased in plasma and striatum ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in the salidroside-treated group. Conclusions In the salidroside-treated group, the tic behavior was significantly reduced, and DA levels in plasma and striatum were elevated. Its mechanism might be related to regulating activities of dopamine neurons in striatum.

KEYWORDS Tourette syndrome; imino-dipropio-nitrile; dopamine; serotonin; Salidroside

Tourette 综合征 (Tourette syndrome, TS) 于 1885 年由法国医生 Georges Gilles de la Tourette 首先详细描述, 是一种以慢性多发性运动性抽动和 (或) 发声性抽动为特征的神经精神障碍性疾病, 它阻碍了儿童身心的健康成长, 使患儿及家长的生活质量严重下降, 已被众多临床工作者高度关注。研究表明脑内许多神经环路及多种神经递质的异常参与了 TS 的发生^[1]。亚氨基二丙腈 (iminodipropionitrile, IDPN) 是一种中枢神经毒素, 小剂量应用可成功诱导出大鼠的头部抽动、肩部抽动等刻板行为, 该模型可部分模拟 TS 患者的神经生化和行为改变, 因此可作为 TS 的动物模型用于多种临床药物的评价^[2]。本研究利用 IDPN 诱导的大鼠头部抽动模型, 检测大鼠血浆及纹状体多巴胺 (dopamine, DA) 和 5-羟色胺 (serotonin, 5-HT) 含量的改变, 探讨红景天苷对 IDPN 诱导大鼠的抽动行为及神经生化影响, 为今后红景天苷在 TS 的临床应用提供依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠, 体重 180~220 g, 雄性, 2 月龄, 由广州中医药大学实验动物中心所提供, 许可证号: SCXK(粤)2008-0002。

2 药物 红景天苷 (20 mg/支, 中国药品生物制品检定所, 批号: 110818-201102), 氟哌啶醇 (1 mL: 5 mg/支, 上海九福药业有限公司, 批号: H08031121)。

3 试剂及仪器 IDPN (批号: A014000701)、DA 标准品 (批号: 200527-8) 均为美国 Sigma 公司产品; 水合氯醛、高氯酸、碳酸氢钠溶液等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。TGL-16GB 型台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); 3K-18 型高速低温冷冻离心机 (德国希格玛电气有限公司); FA1004 型精密电子分析天平 (上海恒平科学仪器有限公司); Model 960 脑立体定位仪 (德国 Kopf 公司)。

4 分组及造模 将 40 只 Wistar 雄性大鼠随机

分为空白组、模型组、氟哌啶醇组 (西药组)、红景天苷组 (中药组), 每组 10 只。常规饮食, 自然节律光照, 分笼饲养 1 周后开始造模。除空白组外, 其余 3 组大鼠均腹腔注射 IDPN 150 mg/(kg·d), 连续干预 7 日, 诱导大鼠头部抽动模型。空白组给予生理盐水 0.4 mL/d 腹腔注射, 连续给药 7 日。造模成功后 1~3 日观察各组大鼠刻板行为并评分。大鼠腹腔注射 IDPN 7 日后出现头部抽动、口腔运动、舔食前爪等行为, 其中头部抽动的刻板行为明显、易分辨, 且抽动频率高, 作为该模型成功的标准^[3]。

5 干预方法 造模成功后第 4 日开始给药。空白组及模型组: 腹腔注射生理盐水 0.4 mL/d, 连续 7 日; 西药组: 腹腔注射氟哌啶醇 [0.5 mg/(kg·d)], 相当于临床常用剂量 2.5 倍^[3], 连续 7 日; 中药组: 腹腔注射红景天苷 50 mg/(kg·d)^[4], 连续 7 日, 干预结束后第 1~3 日观察各组大鼠刻板行为并评分。

6 检测指标及方法

6.1 行为学评分 抽动行为评分: 在造模前 3 日、造模成功后第 1~3 日及干预结束后第 1~3 日按 Diamond BI 等^[5]方法对各组大鼠进行刻板行为评分, 每日 3 次, 每次 5 min, 累计 3 日评分为总评分。

评分标准如下: 0 分为无刻板运动; 1 分为有旋转行为; 2 分为垂直的头部和颈部的运动障碍 (上下运动过多); 3 分为垂直的头部和颈部的运动障碍加旋转行为; 4 分为头向侧摆并伴有头颈部上下运动过多。比较各组治疗前后评分的变化, 以评价临床疗效。

6.2 血浆及脑组织中 DA、5-HT 含量检测 受试大鼠均在造模前、造模成功后第 3 天, 干预结束后第 3 天由眼眶采血 1 mL, 置于肝素抗凝的 EP 管中, 迅速 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取血浆 -80℃ 冻存备用。

大鼠模型脑立体定位取组织标本: 干预结束后第 4 天开颅留取大鼠纹状体并检测 DA 含量。操作如下: 10% 水合氯醛 (0.35 mL/100 g) 腹腔注射麻醉后, 头颅

水平位固定在脑立体定位仪上,参照 Paxions and Watson 图谱快速分离双侧纹状体称湿重,以 1:10 的比例加入 0.4 mol/L 的高氯酸,冰浴下充分匀浆,冰浴沉淀 30 min,于 4 ℃ 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液,每毫升上清液加 0.75 mL 4% 的碳酸氢钠溶液、混匀后,于 4 ℃ 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,过 0.45 μm 滤膜,分装,于 -80 ℃ 保存待用。

上述标本参照崔翰明、朱玲英等^[6,7]方法,送广州金域医学检验中心应用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)测定各组大鼠血及脑纹状体中 DA、5-HT 的变化。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件包,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,大鼠抽动行为评分、各时间点大鼠血浆及纹状体 DA、5-HT 含量数据均进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD 多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般状态比较(表 1) 与空白组比较,其他 3 组大鼠进食及饮水量无变化,但活动时间均减少,且警觉性、啃咬活动及睡眠时间都出现相应变化。

表 1 各组大鼠一般状态比较

组别	n	警觉性	活动时间	啃咬活动	体重变化	睡眠时间
空白	10	正常	多	正常	增加	正常
模型	10	增高	减少	减少	无明显变化	正常
西药	10	降低	最少	减少	明显增加	延长
中药	10	增高	减少	减少	无明显变化	正常

2 各组各时间点抽动行为评分比较(表 2) 与空白组比较,模型组造模后抽动行为评分升高($P < 0.01$)。与本组造模后比较,两个给药组干预后抽动行为评分降低($P < 0.01$)。与模型组同期比较,两个给药组干预后抽动行为评分均降低($P < 0.01$)。与西药组同期比较,中药组干预后抽动行为评分升高($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠各时间点抽动行为评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	抽动行为评分		
		造模前	造模后	干预后
空白	10	0 ± 0	0 ± 0 ^Δ	0 ± 0
模型	10	0 ± 0	34.7 ± 2.5	34.8 ± 2.9
西药	10	0 ± 0	34.7 ± 2.8	14.1 ± 3.5 ^{*Δ}
中药	10	0 ± 0	35.1 ± 2.0	18.6 ± 2.4 ^{*Δ▲}

注:与本组造模后比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组同期比较,^Δ $P < 0.01$;与西药组同期比较,[▲] $P < 0.01$ 。

3 各组各时间点大鼠血浆 DA、5-HT 含量比较(表 3) 与空白组同期比较,模型组造模后大鼠血浆 DA、5-HT 含量降低($P < 0.01$)。与本组造模后比较,两个给药组干预后血浆 DA 含量升高($P < 0.01$),中药组 5-HT 含量升高($P < 0.01$)。与模型组同期比较,两个给药组干预后血浆 DA 含量升高($P < 0.01$),中药组 5-HT 含量升高($P < 0.01$)。与西药组同期比较,中药组干预后血浆 DA 含量降低,5-HT 含量升高($P < 0.01$)。

表 3 各组各时间点大鼠血浆 DA、5-HT 含量比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	DA	5-HT
空白	10	造模前	6.5 ± 1.2	13.4 ± 1.1
		造模后	6.5 ± 1.2 ^Δ	13.4 ± 1.1 ^Δ
		干预后	6.5 ± 1.3	13.4 ± 1.1
模型	10	造模前	6.5 ± 1.2	13.3 ± 1.0
		造模后	4.0 ± 1.2	10.9 ± 1.0
		干预后	4.2 ± 1.2	10.8 ± 1.0
西药	10	造模前	6.5 ± 1.2	13.2 ± 1.2
		造模后	3.9 ± 1.3	11.0 ± 1.1
		干预后	5.8 ± 1.3 ^{*Δ}	10.9 ± 1.2
中药	10	造模前	6.5 ± 1.2	13.9 ± 0.8
		造模后	3.6 ± 1.1	10.9 ± 0.7
		干预后	4.9 ± 1.0 ^{*Δ▲}	12.5 ± 0.8 ^{*Δ▲}

注:与本组造模后比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组同期比较,^Δ $P < 0.01$;与西药组同期比较,[▲] $P < 0.01$ 。

4 各组干预后大鼠纹状体 DA、5-HT 含量比较(表 4) 与空白组比较,模型组大鼠纹状体 DA、5-HT 含量降低($P < 0.05$)。与模型组比较,两个给药组纹状体 DA 含量升高,中药组 5-HT 含量升高($P < 0.05$)。与西药组比较,中药组大鼠纹状体 DA 含量降低($P < 0.05$),5-HT 含量升高($P < 0.05$)。

表 4 各组干预后大鼠纹状体 DA、5-HT 含量比较 (μg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	DA	5-HT
空白	10	4.3 ± 1.2 [*]	4.1 ± 1.2 [*]
模型	10	2.9 ± 1.1	2.5 ± 1.0
西药	10	4.2 ± 1.2 [*]	2.4 ± 1.0
中药	10	4.0 ± 1.2 ^{*Δ}	3.6 ± 1.3 ^{*Δ}

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与西药组比较,^Δ $P < 0.05$ 。

讨 论

TS 又称图雷特综合征、抽动秽语综合征,是一种常见的、儿童期或青少年期起病的慢性神经精神障碍性疾病。临床以一组或多组肌肉无意识的反复抽动以及各种发声障碍为主要症状,可同时伴有注意缺陷——多动障碍、强迫障碍等行为问题。近年研究表明,中枢神经递质失衡在 TS 的发病中起重要作用,主

要与 DA、5-HT、去甲肾上腺素等单胺类递质异常有关。TS 患者多巴胺突触后受体超敏感,导致多巴胺系统活动亢进所致^[8]。研究显示 TS 患者血浆、脑脊液中的 DA 明显降低,且降低程度与抽动症状的严重程度明显相关^[9]。

本研究应用 IDPN 作为 TS 动物模型诱导药物。IDPN 是一种中枢神经毒素,小剂量应用可成功的诱导出大鼠的头部抽动、肩部抽动等刻板行为,其机制主要认为是破坏了锥体外系的 DA 系统,产生持久的降低 DA 浓度的效应,使动物在生长发育过程中出现 DA 受体超敏现象,导致动物出现刻板行为,同时研究还发现该动物模型血浆、脑脊液中的 DA 明显降低,低于正常对照组,提示该模型可部分模拟 TS 患者的神经生化和行为改变,因此可作为 TS 的动物模型用于多种临床药物的评价^[5]。

氟哌啶醇是较强的 DA D₂ 受体拮抗剂,可以抑制 D₂ 受体的超敏反应,能明显抑制 TS 的抽动症状,为临床治疗 TS 的常用药物之一。但其有嗜睡、乏力、心动过速、锥体外系反应等副作用,患者难以长期耐受,因而开发一种安全、有效且不良反应少的药物正成为当前 TS 研究的热点。

红景天是景天科红景天属多年生草本或亚灌木植物,由于其能在极其恶劣多变的环境中适应生长,故遗传学方面具备其他植物所没有的特殊环境适应性,是天然配方的药用植物,素有“高原人参”和“雪山仙草”之称,为藏医常用药物。红景天苷(又称红景天甙, Salidroside)是红景天的主要提取物之一,近年帕金森病、阿尔茨海默症及脑梗死等多种疾病的动物模型研究表明,它具有神经保护、清除自由基、调节中枢神经递质促进神经修复及神经细胞分化等多种作用^[10]。

IDPN 诱发 TS 模型大鼠出现明显的头部抽动、异常跑跳、旋转行为等刻板行为均具有特征性,类似于人类 TS 患儿转颈、耸肩等动作,而且停止给药后行为症状仍持续维持,且与空白组比较,模型组血浆、纹状体内 DA 含量均降低,表明在该动物模型在行为学上及神经生化水平均很大程度上模拟了 TS 的特征。应用红景天苷及氟哌啶醇干预后大鼠头部抽动行为明显减少,同时,大鼠血浆、纹状体内 DA 的浓度均升高。提示红景天苷与阳性对照药物氟哌啶醇均能降低多巴胺系统功能,从而减少 TS 模型大鼠的抽动行为。同时,给药后中药组大鼠血浆、纹状体中 5-HT 的水平明显高于模型组,提示红景天苷还可能通过提高脑内 5-HT 浓度而达到治疗作用。本研究还显示,西药组减少大

鼠头部抽动行为的疗效优于中药组,且西药组 DA 含量在给药后升高也更明显,提示红景天苷对多巴胺系统功能的抑制作用弱于氟哌啶醇,也提示了在 TS 抽动行为的治疗中,对神经递质 DA 的调节比对 5-HT 的调节更为重要。本研究还观察到,西药组睡眠时间延长,警觉性降低,活动时间、啃咬活动均减少,考虑与西药组的镇静作用有关,而镇静作用同时也可能使抽动行为减少。此外,本实验虽显示红景天苷能提高脑内 5-HT 浓度,但未设计观察大鼠是否存在多动障碍、强迫障碍等与 5-HT 浓度关系密切的情绪及行为问题,有待于将来进一步的研究及总结。

综上所述,红景天苷作为天然植物红景天的提取物,能减轻 IDPN 诱导的大鼠头部抽动行为,其作用机制可能与调节纹状体 DA、5-HT 能神经元活动有关,为将来红景天苷的临床应用奠定了理论基础,也为研发安全、有效且副作用小的 TS 治疗药物提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Ganos C, Ogrzal T, Schnitzler A, et al. The pathophysiology of echopraxia/echolalia: relevance to Gilles de la Tourette syndrome [J]. *Movement Disord*, 2012, 27(10): 1222 - 1229.
- [2] 阮铭,吴敏,马碧涛.抽动障碍大鼠模型的建立与选择[J]. *中华神经医学杂志*, 2012, 11(9): 873 - 875.
- [3] 郭慧,欧阳颖.托吡酯治疗 Tourette 综合征大鼠的疗效及机制研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(4): 509 - 512.
- [4] 张宇红,陈生弟,李江林,等.红景天甙促进帕金森病模型小鼠表达内源性胶质细胞源性神经营养因子蛋白保护多巴胺能神经元[J]. *中华神经科杂志*, 2006, 39(8): 540 - 554.
- [5] Diamond BI, Reyes MG, Borison R. A new animal model for Tourette syndrome [J]. *Adv Neurol*, 1982, 35(3): 221 - 225.
- [6] 崔翰明,白鸽,黄世敬,等.高效液相—电化学法测定大鼠血浆中单胺类神经递质及其代谢产物[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(1): 53 - 56.
- [7] 朱玲英,孔铭,彭蕴茹,等.高效液相色谱法测定大鼠海马中 5 - 羟色胺含量的方法学研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(11): 2783 - 2784.
- [8] 刘智胜主编.小儿多发性抽动症[M].北京:人民卫生出版社, 2002:153
- [9] McNaught KS, Mink JW. Advances in understanding and treatment of Tourette syndrome [J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(12): 667 - 676.
- [10] 谢卉,朱大会.红景天苷对中枢神经系统疾病药理作用的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(17): 2505 - 2509.

(收稿:2014 - 03 - 16 修回:2015 - 05 - 18)