

金童颗粒治疗抽动秽语综合征模型小鼠的药效学研究

张如意, 李林, 张丽, 艾厚喜, 楚晋

[摘要] 目的 观察金童颗粒治疗实验性抽动秽语小鼠模型的药效学作用。方法 采用苯丙胺腹腔注射及阿朴吗啡皮下注射方法建立拟抽动小鼠模型, 将动物随机分为正常对照组、模型组、金童颗粒大、小剂量组和氟哌啶醇对照组, 观察动物的自主活动和攀爬行为, 检测动物脑纹状体内多巴胺及其代谢产物的含量。结果 在苯丙胺模型中, 金童颗粒组小鼠的自主活动和纹状体内多巴胺含量低于模型组 ($P < 0.05$); 在阿朴吗啡模型中, 金童颗粒组小鼠异常攀爬时间较模型组缩短 ($P < 0.05$)。结论 金童颗粒能够改善拟抽动模型小鼠异常增高的自主活动, 降低其纹状体内多巴胺含量。

[关键词] 抽动秽语综合征; 苯丙胺; 阿朴吗啡; 金童颗粒

Effect of Jintong Capsule on the Mice Models of Tourette Syndrome ZHANG Ru-yi, LI Lin, ZHANG Li, et al. The Pharmacology Department of Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Abstract: **Objective** To observe effect of Jintong capsule on model mice of tourette syndrome (TS). **Methods** TS models of mouse were established by intraperitoneal injection of amphetamine (AMP) or subcutaneous injection of apomorphine (APO). The animals were randomly divided into the normal control group, model group, Jintong capsule large dose group, Jintong capsule small dose group and haloperidol control group. The spontaneous movements and grasping action of model animals were observed and the contents of dopamine and its products of metabolism in striatum of animals were detected. **Results** The abnormal hyperactivity and the content of dopamine of Jintong capsule groups in striatum of AMP model mice were lower than that of the model group ($P < 0.05$), and the grasping time of Jintong capsule groups in APO model mice shorten compare with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Jintong capsule can ameliorate hyperactivity behaviors of these two animal models, and decrease the content of dopamine in striatum.

Key words: tourette syndrome; amphetamine; apomorphine; Jintong capsule

[中图分类号] R749.94 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)12-1065-02

[本文著录格式] 张如意, 李林, 张丽, 等. 金童颗粒治疗抽动秽语综合征模型小鼠的药效学研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(12): 1065—1066.

目前, 临床上用于治疗抽动秽语综合征 (tourette syndrome, TS) 的首选药物氟哌啶醇 (haloperidol) 为多巴胺受体阻滞剂, 属于丁酰苯类, 其剂量不易调节, 并且由于小儿锥体系统功能不健全, 多巴胺含量少, 故易致锥体外系症状, 而且也有氟哌啶醇引起心肌损害的报道^[1]。因此, 临床上迫切需要一种更易调节剂量、应用更安全、疗效更好的药物。金童颗粒为纯中药制剂, 由钩藤、龟甲、熟地等中药组成, 具有滋阴补肾、平肝息风、化痰宁神的作用。本研究采用拟 TS 小鼠模型^[2]对金童颗粒治疗 TS 的药效学进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 动物与主要试剂与仪器 昆明种小鼠, 雄性, 体重 (18 ± 2) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 清洁级, 合格证号: SCXK11-00-0008。

金童颗粒由北京首儿金童医药科技开发有限公司提供, 批号: 021220。氟哌啶醇由上海九福药业有限公司生产, 沪卫药准字(1997)第 022034 号, 批号: 010711。

试剂与仪器: 硫酸苯丙胺 (amphetamine sulfate, AMP) 购自国家药品监督管理局药品检定所国家麻醉药品实验室。阿朴吗啡 (apomorphine, APO)、多巴胺 (dopamine, DA)、高香草酸 (homovanillic acid, HVA)、二羟基苯乙酸 (dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) 均购自美国 Sigma 公司。仪器: ZH-2 型程控自主活动仪由中国医学科学院药物所研制。自制小鼠攀爬网测定笼 (直径 13 cm, 高 14 cm, 铁丝粗 2 mm, 铁丝间距 1 cm)。高效液相色谱仪、460 电化学检测器、碳 18 反相色谱柱均为 Waters 公司产品, T21 型高速冷冻离心机为美国杜邦公司产品。

1.2 方法

1.2.1 苯丙胺小鼠模型建立及分组 参照金春花等的方法^[3]

作者单位: 1. 首都医科大学宣武医院药物研究室, 北京市 100053; 2. 教育部神经变性病重点实验室, 北京市 100053。作者简介: 张如意 (1974-), 女, 河北乐亭县人, 助理研究员, 博士研究生, 主要研究方向: 神经药理学。通讯作者: 李林 (1953-), 女, 四川江油市人, 教授, 研究员, 博士研究生导师, 主要研究方向: 神经药理学。

将 60 只小鼠随机分为 5 组, 每组 12 只: ①正常对照组: 蒸馏水灌胃 3 周后腹腔注射生理盐水; ②模型组: 蒸馏水灌胃 3 周后腹腔注射苯丙胺 3 mg/kg; ③金童颗粒小剂量组: 给予金童颗粒 5 g/kg (相当于 9~14 岁儿童临床用药量的 3.3 倍), 灌胃 3 周后腹腔注射苯丙胺 3 mg/kg; ④金童颗粒大剂量组: 给予金童颗粒 15 g/kg (相当于 9~14 岁儿童临床用药量的 10 倍), 给药方法同小剂量组; ⑤氟哌啶醇组 (阳性对照药组): 给予氟哌啶醇 1 mg/kg 灌胃 1 d 后, 腹腔注射苯丙胺 3 mg/kg。

1.2.2 阿朴吗啡小鼠模型建立及分组 60 只小鼠随机分为 5 组, 每组 12 只: ①正常对照组: 蒸馏水灌胃 3 周后颈部皮下注射生理盐水; ②模型组: 蒸馏水灌胃 3 周后颈部皮下注射阿朴吗啡 2 mg/kg; ③金童颗粒小剂量组: 给予金童颗粒 7.5 g/kg (相当于 9~14 岁儿童临床用药量的 5 倍), 灌胃 3 周后颈部皮下注射阿朴吗啡 2 mg/kg; ④金童颗粒大剂量组: 给予金童颗粒 15 g/kg (相当于 9~14 岁儿童临床用药量的 10 倍), 给药方法同小剂量组; ⑤氟哌啶醇组 (阳性对照药组): 氟哌啶醇 1 mg/kg 灌胃 1 d 后, 注射阿朴吗啡 2 mg/kg。

1.2.3 小鼠自主活动计数 参照 Wei 等报道的方法^[4], 应用小鼠自主活动程序仪进行小鼠自发活动计数, 当计算机进入测定程序后, 将小鼠放入活动箱中 (高 13 cm, 直径 25 cm), 由计算机自动记录小鼠活动情况, 测定每只小鼠 5 min 内的活动次数。

1.2.4 小鼠攀爬行为测定 参照《药理学实验指南》^[5]略加修改。小鼠先在实验笼 (直径 12 cm, 高 14 cm) 中适应环境 30 min, 随即给予阿朴吗啡 2 mg/kg 颈部皮下注射, 观察小鼠行为, 自阿朴吗啡注射 10 min 后开始记录其握杆时间, 每 5 min 记录 1 次, 直至阿朴吗啡注射后 25 min。

1.2.5 脑组织单胺类神经递质及其代谢产物测定 采用高效液相色谱法。标准品配制: 各标准品都溶于流动相中, 浓度 0.1 mg/ml, 使用时分别稀释至 10 ng/ml, 进样量 10 μ l。色谱条件: Waters 公司碳 18 反相色谱柱; 洗脱液: 80 mM 磷酸氢二钠、0.5 mM 乙二胺四乙酸二钠、1 mM 辛基磺酸钠、20% 甲醇, 调整 pH 为 4.3, 经过滤脱气后使用, 流量 1.0 ml/min。电化学检测器工作电压 0.7 V, 测定温度 37 $^{\circ}$ C。标准品在浓度和峰面积间

有良好的线性关系, $r > 0.99$ 。样品预处理:参照张林魁等的方法^[6]进行样品预处理,纹状体组织按照 1:20(w/v)的比例加入 0.1 M 高氯酸(每 100 ml 含 L-半胱氨酸 5 mg,内标 DHBA 浓度为 200 ng/ml),制备匀浆,置高速冷冻离心机 12000 r/min,4℃离心 15 min。取上清 10 μl 测定其中的多巴胺及其相关代谢产物 DOPAC 和 HVA 的含量。

1.3 统计学处理 所得数据用($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析及秩和检验。

2 结果

2.1 金童颗粒对苯丙胺模型小鼠自主活动的影响 苯丙胺腹腔注射后,模型组小鼠出现自主活动增多、好斗、易激惹;金童颗粒用药组小鼠则较模型组安静,活动次数减少,兴奋性较低(见表 1)。

表 1 金童颗粒对苯丙胺模型小鼠自主活动的影响

| 组别 | n | 剂量(g/kg) | 自主活动次数/5 min |
|----------|----|----------|-----------------------------|
| 正常对照组 | 12 | | 157.09 ± 9.64 |
| 模型组 | 12 | | 237.27 ± 23.28 ^a |
| 氟哌啶醇组 | 12 | 0.001 | 77.36 ± 9.92 ^c |
| 金童颗粒小剂量组 | 12 | 5 | 221.58 ± 24.42 |
| 金童颗粒大剂量组 | 12 | 15 | 177.09 ± 26.14 ^b |

注:a.与正常对照组比较, $P < 0.01$;b.与模型组比较, $P < 0.05$;c.与模型组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 金童颗粒对苯丙胺模型小鼠纹状体内多巴胺及其代谢产物含量的影响 模型组小鼠纹状体内多巴胺含量较正常对照组明显升高,其代谢产物 DOPAC 和 HVA 的含量均降低;金童颗粒用药组小鼠多巴胺含量较模型组明显降低(见表 2)。

表 2 金童颗粒对苯丙胺模型小鼠纹状体内多巴胺及其代谢产物含量的影响 (ng/mg 蛋白)

| 组别 | n | 剂量(g/kg) | 多巴胺 | DOPAC | HVA |
|----------|---|----------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常对照组 | 8 | | 9.47 ± 0.64 | 1.99 ± 0.16 | 1.12 ± 0.12 |
| 模型组 | 8 | | 12.11 ± 0.55 ^a | 1.03 ± 0.12 ^a | 0.96 ± 0.06 |
| 氟哌啶醇组 | 8 | 0.001 | 9.86 ± 0.70 ^b | 0.96 ± 0.08 | 0.63 ± 0.10 ^b |
| 金童颗粒小剂量组 | 8 | 5 | 8.56 ± 0.60 ^c | 1.25 ± 0.20 | 0.69 ± 0.10 |
| 金童颗粒大剂量组 | 8 | 15 | 9.77 ± 1.34 ^b | 1.11 ± 0.14 | 0.72 ± 0.08 |

注:a.与正常对照组比较, $P < 0.01$;b.与模型组比较, $P < 0.05$;c.与模型组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 金童颗粒对阿朴吗啡模型小鼠攀爬行为的影响 正常对照组小鼠给予生理盐水注射后,活动自如,在测定笼中上下活动。模型组小鼠阿朴吗啡皮下注射后出现特殊的攀爬行为,四肢均攀附于垂直的铁丝网笼栏杆上,很少回到笼底。金童颗粒大剂量组小鼠行为表现在测定 20 min 后明显优于模型组(见表 3)。

表 3 金童颗粒对阿朴吗啡模型小鼠攀爬行为(握杆时间)的影响

| 组别 | n | 剂量(g/kg) | 握杆时间(平均秩次) | | |
|----------|----|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | 10~15 min | 15~20 min | 20~25 min |
| 正常对照组 | 12 | | 13.00 | 12.60 | 13.40 |
| 模型组 | 12 | | 35.70 ^a | 38.75 ^a | 38.35 ^a |
| 氟哌啶醇组 | 12 | 0.001 | 8.00 ^c | 8.40 ^c | 8.00 ^c |
| 金童颗粒小剂量组 | 12 | 7.5 | 40.20 | 37.85 | 37.55 |
| 金童颗粒大剂量组 | 12 | 15 | 30.60 | 29.90 ^b | 30.20 ^b |

注:a.与正常对照组比较, $P < 0.01$;b.与模型组比较, $P < 0.05$;c.与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

TS 是一种复杂的神经精神性疾病,以青少年时期起病的多发性运动性抽动伴有不自主发声为主要特征,其病因学不清,但遗传因素及神经递质系统异常与发病相关。此外,神经递质间的不均衡,包括儿茶酚胺类和乙酰胆碱间的不均衡可能也与发病相关^[7]。也有假说认为,皮质-纹状体-丘脑-皮质通路发育异常与 TS 发病相关。近年来,TS 的发病率明显上升。由

于该病病程长、波动性大、共存病(包括注意力涣散及多动、注意缺陷多动障碍、学习障碍、情绪障碍等)较多且具有遗传倾向,给患者及家属带来沉重的精神和经济负担。目前,国内对此病主要采用药物治疗,首选药物为多巴胺 D₂ 受体阻滞剂氟哌啶醇。该药对抽动症状的治疗有效率达 70%~80%,但用药剂量不易调节,副作用较大,主要是锥体外系症状和镇静作用,长期用药会对患者的智力产生不良的影响。刘智胜等的研究显示,氟哌啶醇可对 TS 患儿总的记忆能力产生影响^[8]。因此,临床迫切需要新型安全有效的药物。

本研究首先选用苯丙胺作为工具药,促进模型动物脑内儿茶酚胺类从其神经元贮存部位释放,引起模型小鼠自主活动增多,模拟 TS 患儿不随意活动增多的临床表现。自主活动是反映动物随意运动的指标,动物在肌力改变或中枢神经系统兴奋性改变时,其自主活动频率会发生明显改变。实验中,模型组动物的自主活动较正常对照组明显增多,而金童颗粒用药组动物自主活动较模型组明显减少。人和动物的运动行为都受体内多种神经递质,如多巴胺、乙酰胆碱等的共同调节,任何一种递质的异常增多或减少都会破坏整个系统的平衡。近年来,越来越多的研究表明,多巴胺系统功能异常在 TS 的发病中起着重要作用。Minzer 等应用半定量免疫印迹法对 II 型多巴胺受体及多巴胺转运体的研究显示,TS 患者纹状体内多巴胺受体密度和多巴胺转运体密度较同年龄、同性别对照明显升高^[9]。鉴于多巴胺系统在 TS 发病中的作用,本研究同时测定了各组小鼠脑内多巴胺及其代谢产物的含量,结果显示,模型组小鼠纹状体内多巴胺含量较对照组明显升高,而金童颗粒用药组小鼠多巴胺含量较模型组显著降低。因此,推测金童颗粒改善动物多动的机理可能是抑制多巴胺的异常释放。

在阿朴吗啡致小鼠攀爬实验中,我们发现模型小鼠四肢均攀附于垂直的铁丝网笼栏杆上,很少回到笼底。阿朴吗啡为多巴胺受体激动剂,较大剂量应用可以引起模型动物自主活动增加并影响大脑边缘系统,出现特殊的攀爬行为。实验中,金童颗粒用药组小鼠在测定 20 min 后,在测定笼中上下自由活动,其行为学表现较模型组有明显改善,推测金童颗粒对基底节或边缘系统可能有调节作用。

在本研究的两种动物模型中,氟哌啶醇对小鼠的自主活动行为有明显抑制作用,用药后动物的自主活动较模型组和正常对照组均明显降低,可能与氟哌啶醇治疗中的不良反应—镇静作用相关。与之相反,金童颗粒虽对小鼠异常增高的自主活动有明显抑制作用,但并不影响其正常活动水平,在这一点上,金童颗粒的药效优于氟哌啶醇。

[参考文献]

[1] 陈和斌,邹宏,杨敏杰. 氟哌啶醇口服致抽搐发作及心肌损害一例[J]. 儿科药理学杂志,1995,5(2):36.

[2] 张如意,李林,艾厚喜,等. 多巴胺能系统亢进法建立拟抽动秽语综合征小鼠模型[J]. 中国行为医学科学,2005,14(3):210—212.

[3] 金春花,王英军,姜秀莲. 梦醒安神片的药理研究[J]. 中草药,2001,31(12):925—927.

[4] Haifeng Wei, Lin Li, Qiujie Song, et al. Behavioral study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice[J]. Behav Brain Res,2005,157:245—251.

[5] 杜冠华,李学军,张永祥,等. 药理学实验指南—新药发现和药理学评价[M]. 北京:科学出版社,2001:380—381.

[6] 张林魁,钮心懿,徐瑞明,等. 用高效液相色谱—电化学检测法同时测定大鼠脑内单胺递质及其主要代谢产物[J]. 药学报,1987,22(8):591—596.

[7] Baker GB, Chokka PR, Bornstein RA. Neurochemical and some related psychopharmacological aspects of Tourette's syndrome: an update[J]. J Psychopharmacol,1995,9:273—280.

[8] 刘智胜,杨立志,王芳琳,等. 多发性抽动的记忆功能和记忆模式缺陷研究[J]. 中国心理卫生杂志,1999,13(6):361.

[9] Minzer K, Lee O, Hong JJ, et al. Increased prefrontal D₂ protein in Tourette syndrome: a post mortem analysis of frontal cortex and striatum[J]. J Neurol Sci,2004,219:55—61.

(收稿日期:2006-08-02)