

# 金童颗粒治疗拟抽动秽语综合征模型大鼠的药理机制研究

张如意<sup>1a</sup>, 张丽<sup>1a</sup>, 艾厚喜<sup>1a</sup>, 叶翠飞<sup>1a</sup>, 孙雪静<sup>1b</sup>, 李林<sup>1a</sup>

**[摘要]** 目的 建立拟抽动秽语综合征(TS)大鼠模型,观察临床验方金童颗粒的治疗效果并探讨其可能的作用机理。方法 IDPN 腹腔注射建立大鼠拟 TS 模型。将 SD 大鼠随机分为对照组,模型组,金童颗粒小、中、大剂量组和阳性对照药氟哌啶醇组。观察动物一般行为,旷场分析实验检测动物空间认知能力,高效液相色谱法测定大鼠纹状体单胺类神经递质含量,流式细胞仪检测大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群比例。结果 金童颗粒(4.5 g/kg, 9 g/kg, 18 g/kg)可明显减少模型动物的异常旋转圈数和仰头次数( $P < 0.05$ ),金童颗粒(9 g/kg)能明显降低模型大鼠纹状体多巴胺含量( $P < 0.05$ ),金童颗粒(18 g/kg)能明显提高模型大鼠外周血 T 淋巴细胞 CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 比例( $P < 0.05$ )。结论 金童颗粒可以明显改善 TS 模型大鼠行为学,其可能的作用机制为影响模型动物的多巴胺系统。同时,金童颗粒具有改善模型动物免疫功能的作用。

**[关键词]** 抽动秽语综合征;刻板行为;多巴胺;动物模型;金童颗粒

**Pharmacological Mechanism of Jintong Capsule on Tourette Syndrome Rat Model Induced by Iminodipropionitrile** ZHANG Ru-yi, ZHANG Li, AI Hou-xi, et al. Dept. of Pharmacology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Beijing 100053, China

**Abstract:** **Objective** To observe the effects of Jintong capsule on model rats of Tourette syndrome (TS) and explore its probable pharmacological mechanisms. **Methods** SD rats were randomly divided into six groups; blank control, TS model, haloperidol and three Jintong capsule treated groups. Model rats were copied by intraperitoneal injection of iminodipropionitrile (IDPN). The stereotyped behaviors of model rats were recorded. Open field test was used to detect ability of space recognition of rats, high performance liquid chromatography was used to detect content of monoamines, and flow cytometry was used to detect the ratio of T lymphocyte. **Results** Jintong capsule can ameliorate the stereotyped behaviors of model rats, decrease content of dopamine in striatum and increase the ratio of CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>. **Conclusion** Jintong capsule can improve behaviors of model rats. The potential mechanism of Jintong capsule maybe: it can affect the dopaminergic system of model rats, and Jintong can enhance the immune system of model rats.

**Key words:** Tourette syndrome; stereotyped behaviors; dopamine; animal model; Jintong capsule

**[中图分类号]** R749.94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2010)10-0910-03

**[本文著录格式]** 张如意,张丽,艾厚喜,等.金童颗粒治疗拟抽动秽语综合征模型大鼠的药理机制研究[J].中国康复理论与实践,2010,16(10):910—912.

抽动秽语综合征(Tourette syndrome, TS)是以慢性多发性运动抽动和(或)发声性抽动为特征的精神障碍性疾病。近年来,TS的发病率呈逐年上升的趋势,患儿的生活和学习受到严重影响,造成患者及家属的极大痛苦。

大鼠的亚氨基二丙腈(iminodipropionitrile, IDPN)腹腔注射模型可较好地模拟 TS 患者的神经生化和行为学改变,因此可作为 TS 动物模型用于多种临床药物的评价<sup>[1-3]</sup>。氟哌啶醇为临床常用的治疗 TS 药物,是一种多巴胺受体阻滞剂,可以阻断刻板运动,因此作为本试验的阳性对照药物。

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,是治疗小儿抽动障碍的临床经验方,由北京首儿金童医药科技开发有限公司研制。本研究采用拟 TS 大鼠模型对金童颗粒治疗 TS 的作用机制进行初步探讨。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物** SD 大鼠,雄性,体重(200±20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,SPF 级,合格证号:SCXK11-00-0008。

**1.2 药物** 金童颗粒由北京首儿金童医药科技开发有限公司提供。实验时用蒸馏水稀释,大鼠灌胃量 10 ml/kg。氟哌啶醇(haloperidol),由上海九福药业有限公司生产,沪卫药准字(1997)第 022034 号。实验时用蒸馏水溶解配成 20 μg/ml。

**1.3 主要试剂** 多巴胺(dopamine, DA)、高香草酸(homovanillic, HVA)、辛烷磺酸钠盐(octyl sulfate sodium salt, OSA)、5-羟色胺(serotonin, 5-HT)、5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)均为 SIGMA 公司产品。亚氨基二丙腈( $\beta, \beta'$ -iminodipropi-

作者单位:1.首都医科大学宣武医院,a:药物研究室、神经变性病教育部重点实验室;b:血液科,北京市 100053。作者简介:张如意(1974-),女,北京市人,博士,助理研究员,主要研究方向:神经药理学。作为主要骨干参加的课题“补肾中药治疗老年性痴呆的实验研究与技术平台的建立”获 2005 年北京市科学技术一等奖。通讯作者:李林。

onitrile, IDPN)、甲醇购自北京化工厂。

**1.4 仪器** 旷场分析箱由中国医学科学院研制,高效液相色谱仪为 Waters 公司产品(460 型色谱泵,410 型电化学检测器)。T-21 型高速冷冻离心机由美国杜邦公司生产。Calubur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

### 1.5 实验方法

#### 1.5.1 IDPN 致抽动秽语综合征大鼠模型的建立<sup>[4]</sup>

IDPN 溶于 0.9% 生理盐水中,使其终浓度为 30 mg/ml,每只大鼠腹腔注射 IDPN 150 mg/kg/d,连续注射 7 d。

**1.5.2 动物分组及给药** SD 大鼠随机分组。除正常对照组腹腔注射生理盐水外,其余各组大鼠均以 IDPN 150 mg/kg/d,连续腹腔注射 7 d。模型组大鼠自造模当日起灌胃蒸馏水 3 周。金童颗粒用药组自造模当日起,分别给予金童颗粒小(4.5 g/kg)、中(9 g/kg)、大剂量(18 g/kg),连续灌胃 3 周。氟哌啶醇组(阳性对照药组)自造模当天开始灌胃氟哌啶醇 200  $\mu$ g/kg,共给药 3 周。

**1.5.3 旷场分析<sup>[5]</sup>** 将动物放入正中方格中,观察动物的中央格停留时间。

**1.5.4 高效液相色谱法对脑组织单胺类神经递质及其代谢产物的测定:**

**1.5.4.1 标准品配制** 各标准品都溶于流动相中,使用时稀释到 10 ng/ml,进样量 10  $\mu$ l。色谱条件:Waters 公司碳十八反相色谱柱,流动相:80 mM 磷酸氢二钠,0.5 mM 乙二胺四乙酸二钠,1 mM OSA,20% 甲醇。调 pH 为 4.3,流量 1.0 ml/min。检测电压 0.7 V,测定温度 37  $^{\circ}$ C。

**1.5.4.2 样品处理<sup>[6]</sup>** 组织按照 1:10(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,高速冷冻离心机 12000 r/min,4  $^{\circ}$ C 离心 15 min。取上清 10  $\mu$ l 进行测定。

**1.5.5 外周血 T 细胞亚群比例的测定** 取鼠尾血 200  $\mu$ l,加入肝素 30  $\mu$ l,充分混匀。测定管 I 中加入荧光标记的 CD<sub>3</sub> 抗体 5  $\mu$ l 和 CD<sub>4</sub> 抗体 5  $\mu$ l,测定管 II 中加入 CD<sub>3</sub> 抗体 5  $\mu$ l 和 CD<sub>8</sub> 抗体 5  $\mu$ l,向测定管 I、测定管 II 中各加入抗凝血 50  $\mu$ l,空白管中不加血样,将上述试剂充分混匀后室温避光孵育 15 min。加入裂解液 1  $\mu$ l,裂解 10 min。1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 PBS 液 1 ml,再次重悬,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1% 多聚甲醛 0.5 ml,混匀后上机测定。

**1.6 统计学处理** 使用 SPSS 10.0 进行分析,数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示,模型组与其他各组进行 *t* 检验。

## 2 实验结果

### 2.1 金童颗粒对 IDPN 模型大鼠刻板行为和中枢兴奋

性的影响 模型组大鼠出现明显的眨眼、张口等无意识行为,头向后仰,步态蹒跚,身体向一侧倾倒,伴有明显的不自主旋转行为。金童用药组大鼠不自主旋转圈数和仰头次数较模型组大鼠减少( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。旷场分析实验中,模型组大鼠中央格停留时间较对照组延长,金童用药组大鼠停留时间与模型组相比有缩短趋势,但无统计学差异。氟哌啶醇组大鼠的中央格停留时间明显延长。见表 1。

表 1 金童颗粒对 IDPN 模型大鼠刻板行为和中枢兴奋性的影响

组别	给药剂量	n	旋转圈数/5 min	仰头次数/5 min	中央格时间(s)
对照	/	12	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	3.83 $\pm$ 1.89
模型	/	12	15.4 $\pm$ 8.2 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	9.00 $\pm$ 5.67 <sup>a</sup>
氟哌啶醇	200 $\mu$ g/kg	12	5.7 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>	1.4 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	96.67 $\pm$ 91.30 <sup>b</sup>
金童颗粒	4.5 g/kg	12	8.7 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>	6.2 $\pm$ 4.0	6.83 $\pm$ 4.11
金童颗粒	9 g/kg	12	9.4 $\pm$ 8.8 <sup>c</sup>	2.2 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	6.33 $\pm$ 4.07
金童颗粒	18 g/kg	12	10.7 $\pm$ 8.1 <sup>c</sup>	3.3 $\pm$ 2.8 <sup>c</sup>	7.25 $\pm$ 3.54

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

**2.2 金童颗粒对 IDPN 模型大鼠纹状体内单胺类神经递质含量的影响** 模型组大鼠纹状体内多巴胺(DA)含量与对照组相比无显著性差异,但金童中剂量用药组大鼠纹状体内 DA 的含量较模型组显著降低( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 金童颗粒对 IDPN 大鼠纹状体内神经递质含量的影响(ng/mg 纹状体湿重)

组别	剂量	n	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
正常	/	9	9.9 $\pm$ 2.0	1.3 $\pm$ 0.30	0.78 $\pm$ 0.31	0.41 $\pm$ 0.14	0.24 $\pm$ 0.10
模型	/	8	10.5 $\pm$ 3.0	1.2 $\pm$ 0.40	0.59 $\pm$ 0.21	0.49 $\pm$ 0.11	0.26 $\pm$ 0.11
氟哌啶醇	200 $\mu$ g/kg	8	9.7 $\pm$ 2.1	1.7 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.11	0.24 $\pm$ 0.10
金童颗粒	4.5 g/kg	9	9.5 $\pm$ 1.6	1.3 $\pm$ 0.23	0.74 $\pm$ 0.24	0.44 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.07
金童颗粒	9 g/kg	9	7.9 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.27	0.62 $\pm$ 0.25	0.44 $\pm$ 0.17	0.25 $\pm$ 0.13
金童颗粒	18 g/kg	7	10.0 $\pm$ 1.9	1.0 $\pm$ 0.15	0.57 $\pm$ 0.13	0.35 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.09

注:与模型组比,a: $P < 0.05$ 。

**2.3 金童颗粒对 IDPN 模型大鼠外周血淋巴细胞亚群比例的影响** 模型组大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 CD<sub>8</sub> 比例较正常对照组有所升高,金童颗粒大剂量可以明显降低 CD<sub>8</sub> 在 T 细胞中所占的比例( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 金童颗粒对 IDPN 大鼠外周血淋巴细胞亚群比例的影响

组别	给药剂量	n	CD <sub>4</sub> (%)	CD <sub>8</sub> (%)	CD <sub>4</sub> /CD <sub>8</sub>
对照	/	6	64.2 $\pm$ 5.4	42.0 $\pm$ 5.7	1.6 $\pm$ 0.3
模型	/	6	65.0 $\pm$ 2.8	44.9 $\pm$ 2.3	1.4 $\pm$ 0.1
氟哌啶醇	200 $\mu$ g/kg	6	66.0 $\pm$ 7.3	40.4 $\pm$ 6.2	1.7 $\pm$ 0.4
金童颗粒	4.5 g/kg	6	60.5 $\pm$ 8.6	48.3 $\pm$ 9.3	1.3 $\pm$ 0.4
金童颗粒	9 g/kg	6	64.6 $\pm$ 2.5	42.8 $\pm$ 4.0	1.5 $\pm$ 0.2
金童颗粒	18 g/kg	6	67.8 $\pm$ 3.0	40.2 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>

注:与模型组比,a: $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

TS 是一种多发于儿童时期的慢性神经精神障碍疾病,其病因未明,人们认为遗传因素、神经递质代谢缺陷、药源性因素等都可引起本病的发生。近年来,多项研究显示本症患者存在多巴胺能系统功能亢进、5-羟色胺代谢紊乱等改变<sup>[7]</sup>。

IDPN 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。国内外研究均认为该模型可部分模拟 TS 患者的神经生化和行为学改变,因此可作为 TS 动物模型用于多种临床药物的评价。氟哌

哌啶醇为多巴胺受体阻滞剂,可以抑制多巴胺受体的超敏,从而阻断由 IDPN 诱导的刻板运动,因此作为本试验的阳性对照药物。

行为学观察发现,模型大鼠出现明显的头、颈部不自主摇摆、眨眼、无意识张口行为及躯体异常旋转。旷场分析实验中,模型大鼠在中央格停留的时间较对照组延长,表明其空间认知能力受到一定的损害。金童用药组大鼠异常旋转行为和仰头次数较模型大鼠显著减少,中央格停留时间有缩短趋势,但无统计学意义,表明金童颗粒对模型大鼠的行为学和空间认知能力都有一定的改善作用。

已有的研究表明,TS 患者存在基底节纹状体的神经突触多巴胺活动过度及多巴胺受体超敏感。多巴胺活动过度表现为多巴胺合成和释放增加或摄取障碍,Singer 等<sup>[8]</sup>对多发性抽动症患者尸解研究发现,其多巴胺受体区的多巴胺含量明显增高,纹状体区多巴胺含量更高。动物实验表明多巴胺投射到纹状体的纤维过多将导致基底节环路过度、过快反应甚至自发反应。为了探讨金童颗粒改善动物行为学的机理,我们测定了各组动物纹状体内单胺类神经递质含量。结果表明,金童用药组大鼠纹状体内 DA 的含量较模型组显著降低。因此,我们认为金童颗粒的此种作用很可能是其改善大鼠行为的神经生化基础。金童颗粒对模型大鼠多巴胺的再摄取是否具有阻碍作用以及对多巴胺受体是否具有直接抑制作用,尚需进一步的实验加以确定。

近年来,越来越多的研究表明儿童抽动障碍的发生与免疫功能紊乱有一定的关系<sup>[9]</sup>。正常情况下,T 淋巴细胞亚群在细胞免疫中起着重要的作用; $CD_4^+$ 通过分泌细胞因子调节机体免疫, $CD_8^+$ 通过负调节效应抑制免疫应答,两者相互诱导和制约调节细胞免疫和免疫平衡。陈燕惠<sup>[10]</sup>等用抗人 T 淋巴细胞单克隆抗体检测抽动障碍患儿外周血 T 细胞亚群和 NK 细胞活性,发现患儿  $CD_4^+$  细胞百分率下降, $CD_8^+$  细胞百分率上升,结果导致  $CD_4^+ / CD_8^+$  比例明显降低,提示抽动障碍患儿存在着较严重的细胞免疫功能紊乱。李海波<sup>[11]</sup>等的研究也显示,TS 患儿  $CD_3$ 、 $CD_4$  及  $CD_8$  明显低于对照组。因此,本实验中,我们测定各组动物  $CD_4^+$ 、 $CD_8^+$  细胞的百分率,同时计算  $CD_4^+ / CD_8^+$  的比例。结果发现,模型组大鼠  $CD_8$  比例较正常对照组有所升高,金童颗粒大剂量用药组可以明显降低  $CD_8$  的比例,提示金童颗粒可能具有免疫调节的作用。

国内治疗 TS 的常用药物是氟哌啶醇,但其用药剂量不易调节,副作用较大,长期用药会对患者的智力产生不良的影响<sup>[12]</sup>。中医药以其个体化治疗和毒副

作用小显示出独特的优势。金童颗粒是治疗小儿抽动症的临床经验方,近期的一项多中心临床研究中<sup>[13]</sup>,金童颗粒用于治疗小儿抽动障碍患者 469 例,其疗效不劣于阳性对照药泰比利片。对于运动性抽动,疗效较泰比利好且临床使用安全。实验中,我们还发现氟哌啶醇明显抑制模型大鼠的空间认知力,为其不良作用;而金童颗粒各剂量组都不影响动物的空间认知力,此点较氟哌啶醇优越。综上所述,金童颗粒对于拟 TS 模型大鼠行为学有明显的改善作用,其可能的作用机制是对多巴胺系统的抑制。此外,金童颗粒对模型大鼠的免疫功能也有一定的增强作用,无疑具有良好的临床应用前景。

## 【参考文献】

- [1]杜娟娟,彭贝如,程树军,等. 抽动秽语综合征动物模型的建立和评价[J]. 中国比较医学杂志,2010, 20(3): 23—26.
- [2]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.
- [3]韩新民,朱先康,王敏华. 定抽颗粒治疗抽动秽语综合征的临床及机制研究[J]. 中国中西医结合儿科学,2009, 1(1): 37—41.
- [4]Diamond BI, Reyes MG, Borison R. A new animal model for Tourette syndrome [J]. Adv Neurol, 1982, 35:221—225.
- [5]叶翠飞,张兰,李斌,等. 二苯乙烯苷对胆碱能损伤拟老年性痴呆大鼠学习记忆功能和兴奋性的影响[J]. 中国康复理论与实践,2003, 9(10): 593—595.
- [6]张潇,张德芹. 高效液相色谱-电化学法测定大鼠不同脑区单胺类神经递质及其代谢产物的方法学研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2009, 11(6): 255—257.
- [7]Wong DF, Brasic JR, Singer HS, et al. Mechanisms of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in Tourette syndrome: clues from an in vivo neurochemistry study with PET [J]. Neuropsychopharmacology, 2008, 33(6): 1239—1251.
- [8]Singer HS, Hahn IH, Krowiak E, et al. Tourette's syndrome: a neurochemical analysis of postmortem cortical brain tissue[J]. Ann Neurol, 1990, 27:443—446.
- [9]Lekman JF, Katsorich L, Kawikoval, et al. Increased serum levels of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha in Tourette's syndrome [J]. Biol Psychiatry, 2005, 57 (6): 667—673.
- [10]陈燕惠,陈珊,王勇,等. 干扰素对儿童抽动障碍免疫调节作用的探讨[J]. 中国实用儿科杂志,2002, 17(4): 219—221.
- [11]李海波,张赛,张波,等. 抽动秽语综合征患儿免疫功能的研究[J]. 中国实用儿科杂志,2008, 23(11): 857—858.
- [12]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.
- [13]马融,胡思源,魏小维,等. 金童颗粒治疗小儿抽动障碍的临床研究[J]. 环球中医药,2010,3(1): 31—34.

(收稿日期:2010-08-18)