

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

方锦颖 陈琪 国文文 杨德爽 孟州令 陈光耀 吴卓耘 王素梅

【摘要】 目的 探究龟板对多发性抽动症(tourette syndrome, TS)模型大鼠的行为学改变,及其对纹状体多巴胺(dopamine, DA)、多巴胺 D₂受体(dopamine D₂ receptor, D₂R)、血浆中 DA 的含量的影响。**方法** 将 40 只大鼠分为空白组、模型组、硫必利组和龟板组。腹腔注射亚氨基二丙腈(imino-dipropionitrile, IDPN)建立 TS 模型,并给予每组相应的生理盐水或药物灌胃。造模完成后每周进行行为学检测,并于造模第 4 周采用 ELISA 法检测纹状体 DA、D₂R、血浆中 DA 的含量。**结果** (1)与模型组比较,两周后硫必利组大鼠刻板行为减少($P<0.05$),三周后运动行为减少($P<0.05$),四周后运动行为明显减少($P<0.01$)。与模型组比较,龟板组两周后大鼠刻板行为与运动行为均减少($P<0.05$);(2)模型组大鼠较空白组大鼠血浆中 DA 含量升高($P<0.05$),纹状体 DA 含量降低($P<0.05$),纹状体 D₂R 含量升高($P<0.05$)。与模型组比较,龟板组大鼠血浆 DA 含量减少($P<0.05$),硫必利组血浆 DA 明显减少($P<0.01$),纹状体 DA 含量两组均升高($P<0.05$),两组纹状体 D₂R 未发生明显变化($P>0.05$)。**结论** 龟板对 TS 有良好的治疗作用,其原因可能与调节 DA 的代谢有关。

【关键词】 多发性抽动症; 龟板; 多巴胺; 多巴胺 D₂受体

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.07.002

Intervention effect of Plastrum Testudinis on rat model of TS and DA and D₂ receptor FANG Jin-ying, CHEN Qi, GUO Wen-wen, et al. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: WANG Su-mei, E-mail: wangsumeil20@163.com

基金项目:国家自然科学基金(81273799);国家级大学生创新创业训练计划(201510026011);北京市大学生科学研究与创业行动计划专项(BJGJ1616)

作者单位:100029 北京中医药大学基础医学院[方锦颖、陈琪、国文文、杨德爽、孟州令、陈光耀、吴卓耘(硕士研究生)];北京中医药大学东方医院儿科(王素梅)

作者简介:方锦颖(1995-),女,2014 级本硕连读本科阶段在读。研究方向:神经精神疾病病证结合研究。E-mail:fangjinying1@163.com

通讯作者:王素梅(1950-),女,博士,教授,博士生导师。研究方向:小儿肝系疾病。E-mail:wangsumeil20@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the behavior change of *Plastrum Testudinis* on Tourette's syndrome (TS) in a rat model, and the influence of *Plastrum Testudinis* on striatal dopamine (DA), dopamine D₂ receptor (D₂R) and the content of DA in plasma, and provide neural biochemical basis of *Plastrum Testudinis* in treatment of TS. **Methods** 40 rats were divided into blank group, model group, Tiapride group and *Plastrum Testudinis* group. Rats were injected intraperitoneally with iminodipropionitrile (IDPN) to establish the TS model, and the rats were given corresponding normal saline and drugs. Behavioral testing was performed weekly after the model was completed, and the contents of DA, D₂R and DA in the striatum were detected by ELISA method at fourth weeks after the model was made. **Results** (1) Compared with model group, stereotyped behavior of Tiapride group was reduced ($P < 0.05$) after 2 weeks, motor behavior was reduced after 3 weeks ($P < 0.05$), motor behavior was reduced obviously after 4 weeks ($P < 0.01$). Compared with model group, stereotyped behavior and motor behavior of *Plastrum Testudinis* group was reduced ($P < 0.05$). (2) Compared with blank group, DA in plasma of model group was increased ($P < 0.05$); DA in corpus striatum was reduced ($P < 0.05$) and D₂R in corpus striatum was increased ($P < 0.05$). Compared with model group, DA in plasma was reduced in *Plastrum Testudinis* group ($P < 0.05$) and significantly reduced in Tiapride group ($P < 0.01$), DA in corpus striatum were all increased in two group ($P < 0.05$), D₂R in corpus striatum did not change obviously ($P > 0.05$). **Conclusions** The influence of *Plastrum Testudinis* on rat model of TS was significantly, and the reason maybe related to the regulation of DA metabolism.

【Keywords】 Tourette syndrome; *Plastrum Testudinis*; Dopamine; Dopamine D₂ receptor

多发性抽动症(tourette syndrome, TS)是发病于儿童时期的一种以慢性多发运动性抽动和(或)发声性抽动为特征的神经精神性疾病^[1]。其发病原因尚不明确,可能与遗传、免疫、心理、神经递质失衡等多方面因素相关。其中以中枢神经系统单胺类递质失衡造成 TS 发病机制的学说占据了主导地位,因此西医在 TS 治疗中多选取 DA 受体阻滞剂^[2]。但是由于锥体外系反应等一系列的副作用,往往因患者不能够耐受而依从性较差。相对比,中医药在治疗 TS 方面具有副作用小以及多系统、多层面、多靶点的特点,并得到了大量临床与实验研究的证实^[3-4]。因此中医药对抽动症的治疗成为当今研究的热点。

龟板是乌龟的背甲以及腹甲,具有潜降肝阳、补心安神的作用,是治疗 TS 的方剂中被运用频率较高的药物之一^[5]。亦有研究表明龟板能够通过抑制多巴胺能神经元凋亡、影响 DA 及其代谢产物的含量,从而改善帕金森模型大鼠的行为学并发挥保护作用^[6-7]。本研究拟通过动物实验探究龟板对 TS 的确切治疗作用,并通过 DA 及 D₂R 探究治疗机制,为进一步的研究以及指导临床用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 40 只,体质量(180 ± 20)g,提

前一周购入并进行适应性饲养。实验动物购自斯贝福(北京)实验动物科技有限公司,许可证号:SCXK(京)2011-0004。

1.2 实验药品

龟板:由北京中医药大学东直门医院提供并制备成颗粒剂,颗粒剂用蒸馏水配制成悬浊液,生药含量为 0.315 g/mL。硫必利:由江苏天士力帝益有限公司生产(生产批号:201504091),用蒸馏水配置成 3.87 mg/mL 的溶液。IDPN:购自美国 Sigma 公司,使用生理盐水稀释成 10% 的溶液。以上药物放在 4℃ 冰箱中备用。

1.3 实验材料

大鼠 DA 酶联免疫(ELISA)试剂盒、大鼠 D₂R 酶联免疫(ELISA)试剂盒,均购自武汉华美生物工程有限公司产品。

1.4 实验分组

将大鼠适应性喂养后,按体质量随机分为 4 组,分别为空白组、模型组、龟板组、硫必利组,每组 10 只。灌药过程中模型组 1 只大鼠因过度虚弱死亡并剔除数据。

1.5 造模

将配置好的 IDPN 行大鼠腹腔注射,注射剂量为 300 mg/(kg·d),连续给药 7 天。

1.6 给药

造模后每天早上 7 点对大鼠进行灌胃,空白组

表 1 各组大鼠治疗前后运动行为变化比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	造模后	给药后			
			1 周	2 周	3 周	4 周
空白组	10	0.40±0.52	0.50±0.53	0.30±0.48	0.70±0.48	0.40±0.52
模型组	9	2.89±0.33 ^a	2.77±0.44 ^a	2.67±0.50 ^a	2.67±0.50 ^a	2.56±0.53 ^a
硫必利组	10	2.80±0.42 ^a	2.70±0.48 ^a	2.40±0.52 ^a	2.10±0.57 ^{ab}	2.00±0.81 ^{ab}
龟板组	10	2.90±0.32 ^a	2.60±0.52 ^a	2.20±0.42 ^{ab}	2.00±0.47 ^{ab}	1.80±0.63 ^{ab}

注：与正常组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠治疗前后刻板行为变化比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	造模后	给药后			
			1 周	2 周	3 周	4 周
空白组	10	0	0	0	0	0
模型组	9	3.22±0.44	3.33±0.50	3.55±0.53	3.22±0.44	3.11±0.33
硫必利组	10	3.20±0.63	3.10±0.74	3.10±0.31 ^a	2.60±0.70 ^a	2.20±0.42 ^b
龟板组	10	3.40±0.70	3.30±0.48	3.00±0.47 ^a	2.80±0.42 ^a	2.70±0.48 ^a

注：正常组无刻板行为故不参与比较；与模型组比较，^a $P<0.05$ ，^b $P<0.01$ 。

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

组别	n	血浆中 DA 含量	纹状体 DA 含量	纹状体 D ₂ R 含量
空白组	5	2018.84±872.11	107.63±32.08	335.58±110.61
模型组	5	3308.09±389.93 ^a	55.17±10.99 ^a	492.06±62.87 ^a
硫必利组	5	1120.68±761.28 ^b	85.67±18.16 ^c	516.55±45.61
龟板组	5	2547.98±526.08 ^c	85.09±19.17 ^c	469.59±65.52

注：与正常组相比较，^a $P<0.05$ ；与模型组相比较，^b $P<0.01$ ，^c $P<0.05$ 。

和模型组给予生理盐水；龟板组和硫必利组分别给予龟板悬浊液和硫必利水溶液。以上各组灌胃剂量均为 1 mL/100 g。

1.7 监测指标

1.7.1 行为学实验评估标准 (1)运动行为评估标准^[8]：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。(2)刻板行为评估标准：参照 Diamond 评分法^[9]：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。(3)行为学评估时间：造模后以及灌药过程中每隔 7 天进行行为学实验，共进行 5 次行为学测试。

1.7.2 DA、D₂R 含量检测 末次给药后夜间禁食不禁水，每组大鼠随机选取 5 只，断头后取血放入 EDTA 抗凝管中，冷冻离心(3000 rpm, 10 分钟)，取上清液放于-80℃冰箱保存。并在冰盒上快速剥离大鼠纹状体并放入冻存管中，置于液氮中保存。测

定时标本保持在 2 ~ 8℃，加入磷酸缓冲液，用匀浆器匀浆并冷冻离心(3000 rpm, 20 分钟)，取上清液对 DA、D₂R 进行检测。

1.8 统计学处理

所得数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)进行表示，若资料类型为正态分布时，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。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对 TS 模型大鼠运动行为积分影响

不同药物干预前后 TS 模型大鼠运动行为积分变化如表 1 所示，给药 3 周后硫必利组低于模型组($P<0.05$)；给药 2 周后龟板组低于模型组($P<0.05$)。

2.2 对 TS 模型大鼠运动刻板行为积分影响

不同药物干预前后 TS 模型大鼠刻板行为积分变化如表 2 所示，给药 2 周后硫必利组低于模型组($P<0.05$)；给药 2 周后龟板组低于模型组($P<0.05$)。

2.3 对 TS 模型大鼠血浆及纹状体 DA、D₂R 含量影响

不同药物干预前后 TS 模型大鼠 DA、D₂R 含量变化如表 3 所示,模型组大鼠较正常组大鼠血浆中 DA 含量升高 ($P < 0.05$),纹状体 DA 含量降低 ($P < 0.05$),纹状体 D₂R 含量升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,龟板组大鼠血浆 DA 含量减少 ($P < 0.05$),硫必利组血浆 DA 明显减少 ($P < 0.01$),纹状体 DA 含量两组均升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

亚氨基二丙腈 (iminodipropionitrile, IDPN) 是一种神经毒素,对其建立的 TS 模型大鼠中枢和外周神经系统均造成了不易改变的持续性损伤^[10]。研究表明 IDPN 模型通过使 DA 受体出现超敏感,从而诱发抽动症状^[11],表现为过度兴奋、点头、摆头、旋转、舞蹈样运动等一系列类似于抽动症状的行为。实验研究表明,作用于 DA 靶点的药物能够改变该模型的行为学变化^[12],是研究 TS 较为可靠的模型之一。

多巴胺系统功能异常被认为是 TS 发病最主要的原因,并且得到了许多相关研究的证实,西医临床亦采用 DA 受体阻滞剂硫必利、氟哌啶醇等药物作为首选药物对 TS 患者进行治疗^[13]。DA 神经元主要集中在中脑和基底节部位,80% 的 DA 神经元集中在黑质—纹状体系统中,对该部位进行检测能较好地反映出 DA 及其受体的变化^[14]。同时动物实验以及临床研究均发现,TS 患者与 IDPN 建立的动物模型中,血液中的 DA 含量较正常组明显增高,这种差别造成的原因可能与 DA 代谢有关^[15]。因此对血浆中 DA 含量、纹状体中 DA 以及其受体的检测能够反映出 TS 模型大鼠中枢和外周 DA 系统的变化。

行为学实验结果表明,龟板能在一定程度上有效改变 TS 模型大鼠运动行为兴奋性增强以及刻板行为增多的表现,这可能与龟板的滋阴潜阳作用,进一步发挥镇惊安神的功效相关。通过对大鼠 DA 含量研究发现,IDPN 能够降低纹状体中 DA 含量、升高血浆中 DA 的含量,表明 IDPN 可能是影响了 DA 的代谢从而使模型大鼠出现抽动等一系列的表现。而硫必利与龟板均能在一定程度上升高纹状体 DA 含量、降低血液中 DA 含量,提示了这两种药物对 TS 治疗作用可能与 DA 的代谢密切相关。而对多巴胺受体 D₂R 的含量研究发现,IDPN 能够使

纹状体 D₂R 含量升高。但硫必利与龟板均未能改变 D₂R 的含量,提示两种药物对 TS 的治疗作用与影响 D₂R 表达的机制无关。综上,该实验证实了龟板对 TS 模型的调节作用,该调节作用与 DA 代谢密切相关,宜对该机制进行进一步研究,从而更加明确龟板对 TS 的治疗机制。

通过对龟板作用于 TS 的实验研究,证实了龟板对 TS 的治疗作用,为临床用药提供了依据。若进一步研究能够确定其有效成份,将为 TS 相关治疗药物的研发提供新的基础与思路。

参 考 文 献

- [1] 李雄. 儿童多发性抽动症的研究进展[J]. 医学综述,2012,18(9):1352-1354.
- [2] 王道涵. 健脾止动汤对 TS 小鼠纹状体多巴胺系统 DR、DAT 及谷氨酸系统 GLT1 的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2013.
- [3] 王道涵,王素梅,张雯,等. IDPN 诱导 TS 模型小鼠纹状体 EAAT2 表达变化及健脾止动汤的干预研究[J]. 中华中医药杂志,2013,28(5):1471-1474.
- [4] 郝宏文,王素梅. 王素梅扶土抑木法治疗多发性抽动症经验[J]. 中国中医药信息杂志,2010,17(3):86-87.
- [5] 平静,黄伟. 中药治疗儿童多发性抽动症现代文献分析[J]. 中国中西医结合儿科学,2011,3(5):393-395.
- [6] 邓汝东,李伊为,陈东风,等. 龟板抗 Parkinson 病大鼠多巴胺能神经元凋亡的作用[J]. 神经解剖学杂志,2008,24(3):301-306.
- [7] 李伊为,周健洪,陈东风,等. 龟板对帕金森病大鼠行为和脑内多巴胺水平的影响[J]. 解剖学研究,2004,26(1):17-18,21.
- [8] 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.
- [9] Diamond BI, Reyes MG, Borison R. A new animal model for Tourette syndromes[J]. Advances in Neurology, 1982, 35:221-225.
- [10] 卫利,王素梅,崔霞,等. 多发性抽动症动物模型的比较与评价[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2012,21(2):187-189.
- [11] 卫利,王素梅,陈自佳,等. 化学因素诱发的多发性抽动症动物模型的比较研究[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2010,19(8):683-686.
- [12] Bronfeld M, Israelashvili M, Bar-Gad I. Pharmacological animal models of Tourette syndrome[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2012, 36(12):163-167.
- [13] 李红梅. 硫必利治疗小儿多发性抽动症的临床研究[J]. 中国医学工程,2013,21(11):172-173.
- [14] 解莹晶,朱先康. 小儿多发性抽动症的相关实验研究进展[J]. 成都中医药大学学报,2014,37(1):121-124.
- [15] 朱舜丽,唐久来,陈全珠,等. 儿童多发性抽动症的神经生化机制探讨[J]. 临沂医学学报,1997,19(4):253-255.

(收稿日期:2015-10-06)

(本文编辑:韩虹娟)