

脾虚证多发性抽动症小鼠模型的建立及评价

陈自佳 于文静 王素梅

【摘要】 目的 建立脾虚证多发性抽动症小鼠动物模型,初步了解该脾虚模型的一般特征。**方法** 腹腔注射亚氨基二丙腈 350 mg/(kg·d)结合浓度为 1 g/mL 的番泻叶颗粒剂溶液 20 mL/(kg·d)灌胃,连续 8 天,建立脾虚证多发性抽动症小鼠模型。通过自主活动计数、刻板运动评分、体质量、食量、大便粒数、胸腺及脾脏指数、胃泌素、D-木糖等指标对脾虚证多发性抽动症小鼠进行评价。**结果** 模型组、脾虚组小鼠造模后在相同的时间内活动路程及平均速度较空白对照组明显增加($P<0.05$),体质量增加缓慢。脾虚组小鼠的食量降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。胸腺指数、脾脏指数及胃泌素、D-木糖浓度均无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 本模型抽动症状稳定,具有脾虚证的某些症状,一定程度上具备了脾虚证多发性抽动症的表面效度。

【关键词】 脾虚证; 多发性抽动症; 模型评价

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.09.006

Establishment and preliminary evaluation of a mouse model of tourette's syndrome (TS) with spleen deficiency syndrome CHEN Zi-jia, YU Wen-jing, WANG Su-mei. Paediatric Department, Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China
Corresponding author: WANG Su-mei, E-mail: wangsumeil20@163.com

【Abstract】 Objective To establish an animal model of TS in mouse with spleen deficiency syndrome, and to explore the general characteristics of the model of spleen deficiency. **Methods** Mice were intraperitoneal injected iminodipropionitrile 350 mg/(kg·d) and intragastric administration Senna granules solution 20 mL/(kg·d) for 8 days. The independent activity counts, stereotyped movement score, body weight, food intake, feces granu, thymus and spleen index, gastrin, D-xylose and other indexes were used to evaluate TS mouse of spleen deficiency. **Results** After modeling, the activity distance and average speed of model group and spleen deficiency group was significantly increased, and body weight increase slowly. Food intake of spleen deficiency group was decreased($P>0.05$). Thymus index, spleen index, gastrin and D-xylose concentration had no significant difference. **Conclusion** The TS model has stable symptoms and some symptoms of spleen deficiency syndrome, and it has the face validity of the syndrome of deficiency of the spleen.

【Key words】 Spleen deficiency; Tourette syndrome; Model evaluation

基金项目: 北京中医药大学青年教师项目(2013)

作者单位: 100078 北京中医药大学东方医院儿科(陈自佳、王素梅);北京中医药大学第三附属医院儿科(于文静)

作者简介: 陈自佳(1984-),女,博士,主治医师。研究方向: 中医药治疗小儿多发性抽动症。E-mail:13810648865@163.com

通讯作者: 王素梅(1950-),女,博士,主任医师,博士生导师。研究方向: 中医药治疗小儿神经精神疾病。E-mail: wangsumeil20@163.com

小儿多发性抽动症(tourette syndrome, TS)是一种儿童时期常见的神经精神疾病,以运动性抽动和(或)发声性抽动为特征。随着其发病率的逐渐增高,以及对患儿的心智发育和人格塑造所产生的不良影响,受到学者们的极大关注。随着研究的进展,以疾病动物模型为研究对象的基础实验逐渐暴露出无法观察中医证候改善、缺乏中医辨证论治思路、难以与临床相一致等问题。故建立并评价病证

结合动物模型,即脾虚证 TS 小鼠模型,对中医药更深入的研究具有重要的意义。

建立病证结合模型目前有疾病动物模型观察、西医病理判断、中医的“病”结合“证”、西医的“病”结合“证”等方法。各方法在不同的病、不同的证方面各有优劣。李继君等^[1]采用脾虚肝亢证 TS 患儿未稀释血清微量灌注于 Wistar 大鼠脑内,制备出脾虚肝亢证 TS 大鼠模型,但制备方法复杂,且费用较为昂贵。针对 TS 的疾病特点及脾虚证的证候特点,结合课题组前期实验及既往文献,依据中医病因发病学原理,本课题采用腹腔注射亚氨基二丙腈(iminodipropionitrile, IDPN)结合苦寒泻下法建立脾虚证 TS 小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

ICR 雄性小鼠 30 只,体质量(18 ± 2)g,清洁级,许可证编号:SCXK(京)2006-0009,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 实验试剂

亚氨基二丙腈(批号:24859071,美国, Sigma-Aldrich),0.9% 氯化钠注射液(批号:0906201w,北京双鹤药业股份有限公司),番泻叶(批号:14014412,北京康仁堂药业有限公司),人胃泌素酶联免疫分析试剂盒(批号:2402503,美国),人 D-木糖酶联免疫分析试剂盒(批号:2400231,美国)。

1.3 实验仪器

JJ2000 型精密电子天平(美国双杰兄弟集团有限公司),ZIL-2 小鼠自主活动程序自动控制仪(中国医学科学院药物研究所),HDR-SR10E 型 SONY 数码摄录一体机(日本索尼),酶标仪,洗板机,水浴箱,微量振荡器。

1.4 建立 TS 小鼠模型

ICR 小鼠随机分为 3 组,每组 10 只,分别为空白组、模型组、脾虚组,12 小时昼夜节律,自由摄食及饮水,适应性喂养 1 周后造模。参照神经毒素全身用法^[2]及课题组前期实验结果^[3],除空白对照组外,其余 2 组小鼠腹腔注射 IDPN,350 mg/(kg·d)[IDPN 原液用生理盐水稀释 50 倍,17 mL/(kg·d)],空白对照组腹腔注射等体积的生理盐水,每天 1 次,连续 8 天。

1.5 建立脾虚模型

采用泻下法对脾虚组 10 只小鼠进行脾虚模型

制备。从腹腔注射 IDPN 造模之日起,予番泻叶颗粒剂溶液灌胃,20 mL/(kg·d)(番泻叶颗粒剂温水溶解,1 g/mL),连续 8 天^[4-5]。

1.6 行为学测定

1.6.1 自主活动次数测定 参照文献报道^[6-7],于实验第 8 天腹腔注射及灌胃后进行测定。采用小鼠自主活动程序自动控制仪随机测定各组小鼠的自主活动。先将小鼠放入自主活动箱中,每个活动箱中 1 只,适应环境 5 分钟后进入计算机程序,自动计数 5 分钟内小鼠的活动总路程及活动速度。为消除对小鼠自主活动的影响,每测定完 1 组小鼠,均需清洁自主活动箱中小鼠的排泄物。

1.6.2 刻板运动观察及评分 参照 Khan 等^[8]及卫利^[9]的方法,采用双盲法观察评分,分别于实验第 7 天、14 天、21 天、28 天各观察及评分 1 次,每次观察 30 分钟。观察 15 分钟后开始评分,评分时间 1 分钟,评分标准^[2]:0 分,无刻板运动;1 分,旋转行为;2 分,头颈部垂直运动;3 分,头颈部垂直运动和旋转行为;4 分,头侧摆,伴头颈部垂直运动。

1.7 脾虚证型测定

1.7.1 一般表现 观察小鼠活动、形态、毛色、饮食、排便及腹形、体表被毛性状等变化。

1.7.2 体质量测定 分别于实验第 1 天、7 天、14 天、21 天、28 天,测定小鼠体质量。

1.7.3 胃泌素及 D-木糖定量测定 实验第 28 天行为学检测后进行血样采集。眼眶球后取血 1~2 mL,加入无菌试管中。室温静置 2 小时,4℃,3000 rpm,离心 10 分钟,取血清 0.5~1 mL,分装冻存。分别采用人胃泌素酶联免疫分析试剂盒、人 D-木糖酶联免疫分析试剂盒进行检测。

1.7.4 胸腺、脾脏指数 眼眶取血后对小鼠进行解剖,取胸腺、脾脏,称重后计算胸腺及脾脏指数(胸腺指数 mg/g=胸腺重量/体质量;脾脏指数 mg/g=脾脏重/体质量)。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述。组间比较采用单因素方差分析,活动总路程、体质量、胸腺指数、脾脏指数、胃泌素、D-木糖符合方差齐性,组间比较采用 LSD 法,刻板运动不符合方差齐性,比较采用 Dunnett's T3 法。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学测定

2.1.1 一般表现 模型组、脾虚组小鼠从实验第 7 天开始可以观察到小鼠在受到刺激(如提出笼外、腹腔注射等)后,比空白组更容易出现直立、攀爬、悬挂、洗脸等各种特殊行为。第 8 天腹腔注射完毕后均出现不同程度的头部抽动、嗅、舔、活动增多等行为,保持某一姿势不变的时间较空白组短,受刺激后活动愈加明显。

2.1.2 自主活动仪检测 模型组、脾虚组小鼠的活动总路程、平均速度较空白组小鼠明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),模型组与脾虚组之间总路程、平均速度无统计学差异($P>0.05$)。见表 1。

表 1 不同组别小鼠活动总路程(mm, $\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	总路程	平均速度
空白组	10	14983.07±4351.34	49.95±14.50
模型组	10	21751.96±11586.51 ^a	72.51±38.62 ^a
脾虚组	10	20683.04±8258.66 ^a	65.61±20.86 ^a

注:与空白组比较,^a $P<0.05$ 。

2.1.3 刻板运动观察评分 模型组、脾虚组小鼠在同一时间节点刻板运动无明显差异($P>0.05$)。模型组小鼠第 28 天与第 7 天相比,刻板运动无显著性差异($P>0.05$)。脾虚小鼠第 28 天与第 7 天相比,刻板运动无显著性差异($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠刻板运动评分($\bar{x}\pm s, n=10$)				
组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
模型组	2.55±0.96	2.55±0.76	2.20±1.14	2.35±1.06
脾虚组	2.44±0.77	2.38±1.05	2.94±1.10	2.83±1.20

2.2 脾虚证型测定

2.2.1 一般表现 各组小鼠在适应性喂养时,均精神良好,行动灵敏,毛色光泽,呼吸正常,饮食、饮水量正常,二便正常。随着造模的进行,脾虚组除与模型组小鼠同出现头部抽动、旋转行为外,体质量增加缓慢($P>0.05$,见表 3),食量下降,肛门轻微污秽,大便粒数增多,但无明显神软萎靡、毛色散乱、

拱背、活动缓慢、反应迟钝等症状。

2.2.2 胸腺及脾脏指数测定 脾虚组小鼠与空白组、模型组小鼠相比,胸腺指数无统计学差异($P>0.05$),脾脏指数无统计学差异($P>0.05$)。见表 4。

表 4 胸腺及脾脏指数(mg/g, $\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	胸腺指数	脾脏指数
空白组	10	1.81±0.56	3.34±0.80
模型组	10	1.73±0.58	3.77±1.08
脾虚组	9	1.36±0.54	3.60±0.83

注:实验过程中脾虚组脱失 1 例。

2.2.3 血胃泌素和 D-木糖浓度测定 脾虚组小鼠与空白组、模型组小鼠相比,胃泌素无统计学差异($P>0.05$),D-木糖浓度无统计学差异($P>0.05$)。见表 5。

表 5 胃泌素及 D-木糖浓度($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	胃泌素(pg/mL)	D-木糖浓度(mg/L)
空白组	10	333.05±173.53	1.71±0.71
模型组	10	355.61±178.58	1.98±0.92
脾虚组	9	287.61±138.20	1.85±0.57

注:实验过程中脾虚组脱失 1 例。

3 讨论

参照文献及 ICR 小鼠本身的特点,确定以小鼠的食欲不振(食量减少)、消瘦(体质量下降)、大便溏泻(拉尾排便次数增多,便形溏稀,肛门污秽)、倦怠乏力(悬空拉尾抵抗力减弱)、毛发不荣、拱背、萎靡嗜睡等症状、体征为脾虚证的主要诊断因素^[7]。根据造模时间、造模方法的可行性等因素选择腹腔注射 IDPN 及番泻叶灌胃进行脾虚证 TS 模型探索。IDPN 的神经毒性使小鼠出现头部抽动、旋转、嗅、舔等刻板运动,模拟了 TS 患儿不随意运动增多(抽动)的表现^[10],而且其表面效度可维持较长时间(至少 1 个月),为中药长时程干预治疗提供了时间保障^[11]。TS 小鼠受到神经毒素本身或所模拟 TS 疾病的影响,体质量偏低,与部分文献中 IDPN 干预后

表 3 各组小鼠体质量(g, $\bar{x}\pm s, n=10$)					
组别	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
空白组	23.11±0.93	27.02±1.50	32.43±2.3	34.18±2.94	36.31±3.10
模型组	23.08±0.89	21.64±1.84	26.96±1.38	28.81±1.80	31.04±2.61
脾虚组	23.18±0.81	22.21±1.05	26.00±1.74	27.38±2.09	28.83±2.12

的实验鼠体质量降低的报道一致^[8,12],但总体仍呈增加趋势。脾胃为水谷之海,后天之本,共司饮食的消化吸收。番泻叶性苦寒,苦寒伤脾,脾胃失和,纳化失职,出现食量下降,进而导致体质量增加缓慢。脾失健运,水湿不化,水谷不分,合污而下,则成便溏。

胸腺是动物细胞免疫的中枢器官,脾脏是动物最大的外围免疫器官,胸腺、脾脏的发育状态及机能强弱,直接决定着免疫水平。两者在形态学上的退行性改变为脾虚证的病理学依据之一^[13]。本实验脾虚组小鼠胸腺及脾脏指数均无明显统计学差异,与既往文献所报道的脾虚组动物脾脏指数呈降低趋势^[14]有一定偏差,考虑与番泻叶作用缓泻等有关。

胃泌素(gastrin, GAs)又称促胃液素,可促进胃排空,激发胃窦平滑肌的收缩反应,密切参与消化道结构与功能的发育和成熟过程^[15-17],其水平下降程度与脾虚证严重程度相关^[18]。血清 D-木糖含量是与小肠吸收功能成正相关的一个较为敏感和特异的检测指标^[19-23],其水平的变化可以较为客观地反映小儿的消化吸收代谢功能^[24]。脾失健运,脾不能运化水谷精微,物质代谢就会发生障碍,表现在糖代谢方面,就会出现 D-木糖吸收功能低下^[25]。本实验尚未能提供有力证据说明本脾虚证 TS 模型具有小肠吸收功能减弱的病理基础。

ICR 小鼠腹腔注射 IDPN 350 mg/(kg·d)所诱导的 TS 模型稳定,表面效度良好,可维持较长时间(至少 1 个月)。结合浓度为 1 g/mL 的番泻叶颗粒剂溶液 20 mL/(kg·d)灌胃,抽动症状稳定,具有脾虚证的某些症状,一定程度上具备了脾虚证 TS 的表面效度。但总体而言,生物学特性与临床尚存在一定的差距。

参 考 文 献

- [1] 李继君,汤海霞,尹文静,等. 宁动颗粒对不同证型抽动-秽语综合征模型大鼠刻板行为的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013,33(8):1112-1115.
- [2] Diamond BI, Reyes MG, Borison R. A new animal model of tourette syndrome[J]. Adv Neurol, 1982,35:221-225.
- [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] 谷建钟,郭勇. 脾虚证荷瘤小鼠模型的建立[J]. 中华中医药学刊, 2011,29(4):767-769.
- [5] 刘汶,张敦义. 番泻叶致脾虚证动物模型的造型方法[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1998,6(4):231-232.
- [6] 张如意,张兰,叶翠飞,等. MPTP 对小鼠行为学及脑纹状体多巴胺含量的影响[J]. 中国行为医学科学, 2001,10(3):164-166.
- [7] 叶春玲. 药理学实验教程[M]. 广州:暨南大学出版社, 2007,79.
- [8] Khan HA, Alhomida AS, Arif IA. Neurovestibular toxicities of acrylonitrile and iminodipropionitrile in rats: a comparative evaluation of putative mechanisms and target sites[J]. Toxicol Sci, 2009,109(1):124-131.
- [9] 卫利. 扶土抑木法对 TS 小鼠纹状体单胺类递质及多巴胺转运蛋白的影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2008.
- [10] 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.
- [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]. 中国行为医学与脑科学杂志, 2010,19(8):683-686.
- [12] Khan HA, Al Deeb S, Al Moutaery K, et al. Influence of age on iminodipropionitrile-induced vestibular and neurobehavioral toxicities in rats[J]. Exp Toxicol Pathol, 2003,55(2-3):181-186.
- [13] 雷妮妮,黄真炎,郑高飞,等. 肾虚、脾虚造型动物免疫超微结构的比较研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 1999,9(2):14.
- [14] 田佳鑫,马增春,王宇光,等. 三种脾虚泄泻证模型大鼠消化系统功能改变的比较[J]. 中国临床康复, 2006,39(10):129-131.
- [15] 陈超,魏克伦,姚裕家,等. 早产儿管理指南[J]. 中华儿科杂志, 2006,44(3):188-191.
- [16] NaKajima T, Konda Y, laumi Y, et al. Gastrin stimulates the growth of gastric pit cell precumom by inducing its own receptors[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002,282(2):359-366.
- [17] 王鉴,陈晓霞,王莉,等. 早产儿血与胃液中促胃液素、胃动素的相关性研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2006,2(5):271-274.
- [18] 金敬善,王广才,张绳祖,等. 血清中胃泌素水平与脾虚证的关系[J]. 中西医结合杂志, 1982,(1):25-26.
- [19] 陈琼科,王再谟. 脾虚宁浸膏对脾虚泄泻动物模型红细胞免疫的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2002,10(5):273-275.
- [20] 蔡华芳,蒋幼芳. 小儿泄泻停冲剂的止泻及改善肠道吸收作用[J]. 儿科药理学杂志, 2005,11(6):3-4.
- [21] 朱曙东,李彬裴,乔樵. 云母粉对脾虚泄泻大鼠淀粉酶、木糖的影响[J]. 浙江中医学院学报, 2002,26(6):46-47.
- [22] 张翥,马继伟,李寅超. 溢尿停对实验性脾虚 SD 大鼠胃肠功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2004,31(8):703-704.
- [23] 王富春,逢紫千. 针灸天枢穴对脾虚泄泻大鼠肠道功能影响的实验研究[J]. 长春中医学院学报, 2005,21(1):52-54.
- [24] 张金玺,马洁. 小儿厌食颗粒对厌食小儿唾液淀粉酶和尿 D-木糖代谢率的影响[J]. 时珍国医国药, 2012,23(12):3008.
- [25] 杜晨光,曹颖,虚丁洁,等. 运脾消食方对厌食症患儿尿 D-木糖排泄率、唾液分泌性免疫球蛋白 A 含量影响的研究[J]. 河北中医, 2013,35(10):1467-1468.

(收稿日期: 2016-01-19)

(本文编辑: 蒲晓田)