

肝郁脾虚证多发性抽动症大鼠模型的建立及评价

刘晓芳¹ 薛小娜¹ 王素梅¹ 张 雯² 卫 利¹ 王道涵¹ 尹英敏¹

(1 北京中医药大学第二附属医院东方医院,北京,100078; 2 北京中医药大学第三附属医院,北京,100029)

摘要 目的:建立肝郁脾虚证多发性抽动症大鼠动物模型,初步了解该模型的一般特征。方法:亚氨基二丙腈(IDPN)腹腔注射诱导法后,用饮食失节、慢性束缚以及过度疲劳法建立多发性抽动症肝郁脾虚证大鼠模型。通过自主活动计数、刻板运动评分、体重、食量、胸腺及脾脏指数、胃泌素、D-木糖等指标对肝郁脾虚证多发性抽动症大鼠进行评价。结果:模型组、肝郁脾虚组大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。肝郁脾虚组大鼠的进食量减少,胸腺与脾脏指数,胃泌素及D-木糖浓度差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:本模型有儿童多发性抽动症的动作性抽动和发声性抽动的症状,同时具有小儿多发性抽动症中医证型中的肝郁脾虚证中情志抑郁,神疲气短,少气懒言,食少便溏等相似症状。动物模型的表面效度方面具有较大的相似程度。

关键词 健脾止动汤;多发性抽动症;肝郁脾虚证;胃泌素;D-木糖浓度

Establishment and Preliminary Evaluation of Rats Model of Tourette's Syndrome (TS) with Liver Stagnation and Spleen Deficiency Syndrome

Liu Xiaofang¹, Xue Xiaona¹, Wang Sumei¹, Zhang Wen², Wei Li¹, Wang Daohan¹, Yin Yingmin¹

(1 Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; 2 The Third Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To establish rats model of tourette's syndrome (TS) in mouse with liver stagnation and spleen deficiency syndrome, and to explore the general characteristics of the model. **Methods:** After the induction of iminodipropionitrile (IDPN) by intraperitoneal injection, a rat model of multiple tic disorder with liver stagnation and spleen deficiency was established by eating dislocation, chronic restraint and excessive fatigue. 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:** In the model group and the liver stagnation and spleen deficiency group, the activity distance and the average speed of the rats in the same time were significantly increased compared with the blank control group. The food intake of rats in the liver stagnation and spleen deficiency group decreased, and the thymus index, spleen index, gastrin and D-xylose concentrations were statistically different ($P < 0.05$). **Conclusion:** This model has relatively stable tic symptoms, and has some similar symptoms of liver stagnation and spleen deficiency syndrome, and to some extent has the surface validity of multiple tic disorder liver stagnation and spleen deficiency syndrome.

Key Words Jianpi Zhidong Decoction; Tourette syndrome; Liver stagnation and spleen deficiency syndrome; Gastrin; D-xylose

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.034

多发性抽动症(Tourette Syndrome, TS),是一种儿童精神科常见的神经精神障碍性疾病^[1]。肢体肌肉、面部肌肉及颈部肌肉或者患儿出现迅速、反复、不规则的抽动,为TS常见的临床特征。TS往往有冲动、强迫、多动、注意力不集中等各种伴随症状^[2]。本病在临床缺乏比较有效的治疗,严重影响了患儿的身心健康,目前受到临床医生与社会公众的极大关注^[1]。随着研究的进展,目前迫切需求建立模拟小儿TS的动物模型,进行病因、病理机制、药物筛选及药效学等方面的评价研究,为揭示

和有效诊治TS提供研究工具。随着中医对TS的研究逐渐增多,目前模型不能很好反映中医“辨证论治”思想精髓的缺点愈加突出。因此,本次实验拟建立TS大鼠模型的同时,建立其中医证型中的肝郁脾虚证,并对其以评价,以便对中医治疗儿童TS有进一步的深入研究。结合既往文献及课题组前期实验,依据中医病因发病学原理,本课题组以亚氨基二丙腈(IDPN)腹腔注射诱导法后,用饮食失节、慢性束缚以及过度疲劳法建立TS肝郁脾虚证大鼠模型。

基金项目:北京中医药大学青年教师项目(2018-JYBZZ-JS127);国家自然科学基金项目(81503615)

作者简介:刘晓芳(1982.12—),女,博士,主治医师;研究方向:中西医结合儿科;E-mail:liuxiaofang1226@163.com

通信作者:薛小娜(1980.06—),女,硕士,主治医师;研究方向:中西医结合儿科;Tel:(010)67689706,E-mail:huaer_2008@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 30 只 3 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠(于北京维通利华实验动物技术有限公司购买,许可证编号为:SCXK(京)2012-0001),要求其重量在 40 ~ 60 g。自由摄食饮水,保持相对的温度及湿度,注意环境通风(温度控制在(22 ± 2)℃,湿度控制在 50% -70%)。

1.1.2 药物 0.9% 氯化钠注射液(北京双鹤药业股份有限公司,批号:0906201w),10 mL 每支;亚氨基二丙晴 1 瓶(美国 Sigma-Aldrich,批号:24859071)。

1.1.3 试剂与仪器 D-木糖酶测试分析试剂盒(南京建成生物科技有限公司,生产批号:A035);人胃泌素酶联免疫分析试剂盒(江莱生物科技有限公司,生产批号:2402503);精密电子天平(美国双杰兄弟集团有限公司,JJ2000 型);自发活动视频分析系统(上海吉星软件科技有限公司,DB018 型);DigBehv 动物行为分析系统(SOFTRON, JLBhv-RRTM);数码摄录一体机(HDR SR10E 型,SONY);微量振荡器(北京拓普分析仪器有限公司,DEM-3);酶标仪(Thermo Scientific, Multiskan MK3)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将自由分笼喂养的大鼠分成 3 组,每组 10 只,分别标注为肝郁脾虚组、空白组和模型组。让各组大鼠自由饮水及进食失误,以 12 h 为白昼黑夜节律。将各组大鼠适应性喂养 1 周后,参照全身用药法^[3]及前期课题实验结论^[4-7],模型组及中医证型组大鼠腹腔注射 300 mg/(kg · d) 的 IDPN,空白组则在腹腔内注射同等的氯 0.9% 化钠注射液。各组均注射 7 d,1 次/d。

1.2.2 给药方法 参考李艳彦等人的方法^[8-10],从腹腔注射 IDPN 之日起,肝郁脾虚组大鼠于每天上午 9:00 置于束缚盒中限制其活动 3 h,下午 3:00 放于盛有温水桶内迫其游泳 10 min 左右。连续 3 周隔日给大鼠喂食。于造模第 21 天开始,停止上述造模因素,观察其行为变化。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 自主活动次数测定 每周对各组大鼠进行 1 次自主活动观察,记录大鼠 15 min 内的自主活动情况。

1.2.3.2 刻板运动观察及评分 于造模后第 1 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天进行刻板运动观察及评分。评分时间为 2 min,评分标准参照前期研

究^[2]。

1.2.3.3 中医证型评价 1)外观变化:观察各组大鼠活动活跃度、毛色顺滑、进食量多少及大便次数的变化。2)重量测定:于实验第 1 天开始,每隔 7 天测定 1 次大鼠的重量。3)胃泌素及 D-木糖酶定量测定:在实验第 28 天测定各组大鼠血清的胃泌素及 D-木糖酶。在大鼠眼眶球后取 1 mL 血,加入无菌试管中。室温静置 2 h 后将其离心,冷冻保存。采用 D-木糖酶测试分析试剂盒以及人胃泌素酶联免疫分析试剂盒检测其含量。4)脾脏与胸腺指数:胃泌素及 D-木糖酶定量测定后,对各组大鼠解剖,取其脾脏、胸腺。将各组器官分别称重后,根据公式计算各组大鼠的胸腺及脾脏指数

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件包,定量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,对正态分布数据,采用单因素方差分析,方差齐,采用 LSD 检验,方差不齐,采用 Games-Howell 检验。对偏态分布数据,采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学测定 从实验第 4 天开始,除空白组外,其余组大鼠在受到外界各种刺激后,出现各种特殊行为,如直立、攀爬。实验第 8 天,除空白组外,其余组大鼠均出现不同程度的头部抽动,同时舔、嗅、活动增多等行为,部分大鼠出现旋转行为。

2.2 自主活动仪检测 空白组大鼠与其余组大鼠比较,自主活动数明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组与中医证型组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠的自主活动($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	自由活动度
空白组	577.674 ± 166.31
模型组	676.143 ± 110.86
肝郁脾虚组	660.708 ± 101.47

2.3 刻板运动观察评分 模型组与肝郁脾虚组比较未见明显差异($P > 0.05$)。除空白组外,其余各组大鼠第 28 天与第 7 天比较,其刻板运动有显著性差异($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠刻板运动评分($\bar{x} \pm s, 分$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
模型组	2.59 ± 0.51	2.76 ± 0.46	2.79 ± 0.38	2.80 ± 0.31
肝郁脾虚组	2.65 ± 0.31	2.77 ± 0.50	2.78 ± 0.41	2.86 ± 0.18

2.4 中医证型测定与评价 肝郁脾虚组大鼠造模后开始出现烦躁易怒的状态。3 周后,肝郁脾虚组

表 3 各组大鼠体重比较($\bar{x} \pm s, g, n = 10$)

组别	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
空白组	266.1 ± 1.51	298.1 ± 3.66	311.8 ± 1.08	325.2 ± 1.91	342.7 ± 2.44
模型组	269.3 ± 2.61	301.2 ± 2.05	313.2 ± 2.41	324.2 ± 2.06	335.2 ± 1.26
肝郁脾虚组	265.2 ± 2.31	299.1 ± 2.50	298.5 ± 2.01	290.4 ± 3.16	282.7 ± 3.17

大鼠逐渐出现活动及饮食减少,情绪低落,体重增加缓慢($P < 0.05$),大便次数增多,质地较稀的症状。见表 3。

2.5 胸腺及脾脏指数测定 肝郁脾虚组以及模型组与空白组比较,其胸腺、脾脏指数差异分别有统计学意义($P < 0.05$)。肝郁脾虚组大鼠与模型组大鼠之间比,各组指数差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠胸腺及脾脏指数比较($\bar{x} \pm s, mg/g, n = 10$)

组别	胸腺指数	脾脏指数
空白组	1.69 ± 0.12	3.09 ± 0.26
模型组	1.78 ± 0.83	3.79 ± 0.32
肝郁脾虚组	1.78 ± 0.21	3.90 ± 0.18

2.6 D-木糖浓度测定与胃泌素测定 中医证型组大鼠与其余各组比较,其 D-木糖浓度测定与胃泌素测定差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 胃泌素及 D-木糖浓度($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	胃泌素 (pg/mL)	D-木糖浓度 (mg/L)
空白组	386.88 ± 1.31	1.47 ± 0.81
模型组	356.21 ± 2.01	1.45 ± 0.83
肝郁脾虚组	305.77 ± 3.62	0.97 ± 1.98

3 讨论

多年来,本课题组一直致力于小儿 TS 的临床与基础实验研究。导师王素梅教授认为,小儿 TS 病机多属土虚木亢,风痰内扰,临证时采用扶土抑木法从肝脾论治,取得一定疗效。课题组利用“名老中医临床诊疗信息采集系统”及名老中医经验智能分析平台,对王素梅教授于 2005 年 10 月至 2006 年 5 月之间建立的 102 例 TS 病历,进行信息结构化、数据分析,结果表明:共 757 次诊次中,中医辨证分型以肝郁脾虚最多见,共 334 例次,占 44.12%^[11-13]。课题组通过文献查阅亦发现,抽动症患者以肝郁脾虚型为最多见。因此,本课题组认为,建立 TS 肝郁脾虚证动物模型对本病的中医辨证论治有着重大意义。

参照文献及 SD 大鼠本身的特点,本实验造模方法基于以下考虑:动物在慢性束缚中,其活动被禁,引起情绪受抑,情志不遂,气机不畅,导致肝郁;

迫其每日游泳活动 10 min,使有劳累感;给予饮食的时而增加与时而缺失类似饥饱失调,两者相加,与中医的饮食劳倦类似,导致脾胃受损。本次实验过程中观察到,肝郁脾虚证的大鼠体重有明显的减轻,其外观表证发生明显的变化。除了出现头部抽动、旋转行为外,大鼠由开始的易怒烦躁转为情绪低落,同时饮食减少,大便由正常转为稀溏;活动渐少,体重增加缓慢,与中医临床中肝郁脾虚证型表现出的症状较接近。

脾脏与胸腺的功能,对动物有重要意义。脾脏与胸腺的各种改变,目前认为是中医脾虚证的病理学依据之一^[14-15]。本次实验中,中医证型组动物的脾脏与胸腺指数与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与模型组大鼠比较,差异无统计学意义,表明模型组与肝郁脾虚组大鼠均有免疫力的下降。

胃泌素在人体及动物的消化系统中具有重要作用。目前有相关文献表明,其水平下降程度与肝郁脾虚证的严重程度有一定的相关性^[16]。本实验中统计学有差异性,说明本脾虚证 TS 模型具有胃蠕动减弱的病理基础。血清 D-木糖含量水平的变化可以较客观地反映儿童的消化吸收代谢功能,是一个与机体的小肠吸收功能有正相关性的检测指标。血清 D-木糖水平的变化可以客观地反映人体的消化功能^[17-19]。从中医角度而言,脾失健运,无法运化水谷精微,使机体无法吸收其精华。表现在生物学糖代谢方面,则会出现 D 木糖数值降低。本次实验中中医证型组大鼠与其余各组大鼠比较统计学有差异性,说明其具有肠道吸收功能减弱的表现。

SD 大鼠腹腔注射 IDPN 所诱导的 TS 模型抽动症状稳定,表面效度良好,可维持较长时间^[20-22]。结合饮食失节、慢性束缚以及过度疲劳法建立肝郁脾虚证 TS 大鼠模型,具有儿童 TS 中医证型中的肝郁脾虚证的相似症状。但根据儿童 TS 的临床表现,其生物学特性目前存在一定的差距,且本次实验尚缺乏对肝郁证的生物学检查方法和相关指标,我们将在下一步的深入研究继续探索以弥补本次不足。

参考文献

[1] 刘智胜. 小儿多发性抽动症[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:

- 32-65.
- [2] Teive HA, Chien HF, Munhoz RP, et al. Charcot's contribution to the study of tourette's syndrome[J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2008, 66: 918-921.
- [3] Diamond BI, Reyes MG, Borison R. A new animal model for Tourette syndrome[J]. *Adv Neurol*, 1982, 35(2): 221-225.
- [4] 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.
- [5] 王道涵, 王素梅, 卫利, 等. 健脾止动汤对多发性抽动症模型小鼠纹状体多巴胺及其受体含量的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2012, 35(7): 452-455.
- [6] 刘晓芳, 王素梅, 卫利, 等. 健脾止动汤对 Tourette 综合征模型鼠纹状体多巴胺转运蛋白表达的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2012, 21(3): 225-227.
- [7] 刘晓芳, 王素梅, 卫利, 等. 健脾止动汤对多发性抽动综合征模型鼠纹状体多巴胺 D2 受体 mRNA 的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2013, 22(4): 296-298.
- [8] 梁媛, 郭晓玲, 岳广欣, 等. 逍遥散对肝郁脾虚证模型大鼠行为学变化的调节作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(5): 317-322.
- [9] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭, 等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价[J]. *北京中医药大学学报*, 2008, 31(6): 396-400.
- [10] 刘燕, 邹小娟, 丁秀芳. 基于复合应激的肝郁脾虚证小鼠模型的建立与评价[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 5(21): 80-84.
- [11] 盛昭园, 王佑华, 徐燕, 等. 健脾疏肝降脂汤对高脂血症大鼠血脂及炎症因子水平调节的作用[J]. *世界中西医结合杂志*, 2017, 12(12): 107-110.
- [12] 刘海洋, 董文婷, 雷霞, 等. 肝郁脾虚型慢性肝炎“病、证”复合模型的建立[J]. *中医药信息*, 2014, 31(3): 84-85.
- [13] 刘晓芳, 卫利, 张雯, 等. 王素梅教授从病因病机论小儿多发性抽动症的治疗[J]. *现代中医临床*, 2016, 23(3): 38-41.
- [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, 10(39): 129-131.
- [15] 蒋萃, 李白雪, 袁世清, 等. 脾虚证大鼠模型的制备方法研究进展及评价[J]. *环球中医药*, 2018, 11(8): 1333-1336.
- [16] 王洪海, 谢鸣. 复合病因造模法致脾虚证大鼠模型在免疫系统方面的变化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(12): 41-45.
- [17] 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.
- [18] 陈自佳, 于文静, 王素梅. 脾虚证多发性抽动症小鼠模型的建立及评价[J]. *环球中医药*, 2016, 9(9): 1055-1058.
- [19] 张雯, 于文静, 王道涵, 等. 健脾止动汤对 TS 模型大鼠抗抽动效应及脑内兴奋性氨基酸递质的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(5): 1653-1656.
- [20] ISOLA R, ZHANG H, TEJWANI GA, et al. Acute nicotine changes dynorphin and prodynorphin mRNA in the striatum[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009, 201(4): 507-516.
- [21] NYLANDER I, TERENIUS L. Chronic haloperidol and clozapine differentially affect dynorphin peptides and substance P in basal ganglia of the rat[J]. *Brain Res*, 1986, 380(1): 34-41.
- [22] Herrer-Marschitz M, Hokfelt T, Ungersted U, et al. Functional studies with the opioid peptide dynorphin: Acute effects of injections into the substantia nigra reticulata of naive rats[J]. *Life Sci*, 1983, 33(1): 555-558.
- (2018-10-26 收稿 责任编辑: 王明)

(上接第 3090 页)

参考文献

- [1] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480687 adults[J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-771.
- [2] 宇传华, 罗丽莎, 李梅, 等. 从全球视角看中国脑卒中疾病负担的严峻性[J]. *公共卫生与预防医学*, 2016, 27(1): 1-5.
- [3] 李予春, 李强, 冯砚国, 等. 认知行为疗法联合米氮平治疗脑卒中后抑郁疗效观察[J]. *新乡医学院学报*, 2018, 35(9): 816-819.
- [4] 崔燕, 魏峰, 阎文静, 等. 脑卒中后抑郁发病的影响因素[J]. *山东医药*, 2017, 57(9): 89-91.
- [5] 唐启盛, 侯秀娟, 赵瑞珍. 中药颐脑解郁方对抑郁模型大鼠脑单胺递质的干预作用[J]. *北京中医药*, 2011, 30(9): 710-713.
- [6] 尹军祥, 田金洲, 王永炎, 等. 寒凝血瘀证表征模型的建立[J]. *北京中医药大学学报*, 2006, 29(10): 682-685, 722.
- [7] 范瑞娟, 罗亚非, 孙玉凤. 新式线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的建立[J]. *中国民族民间医药*, 2014, 31(6): 26-27.
- [8] 唐启盛, 罗斌, 司银楚, 等. 脑出血后抑郁状态动物模型的建立[J]. *北京中医药大学学报*, 2006, 1(29): 16-19.
- [9] 李冬梅, 唐启盛, 李小黎, 等. 脑卒中后大鼠模型精神症状组群的改变及中药的干预作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2011, 34(6): 391-395.
- [10] 赵宪林, 方秀斌, 李东培. 大鼠血管性痴呆模型制作[J]. *中国医科大学学报*, 2002, 31(3): 166-167.
- [11] 李冬梅, 唐启盛, 赵瑞珍, 等. 脑卒中后大鼠模型边缘系统血管内皮生长因子的动态改变及中药的干预作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(9): 606-610.
- [12] Xie Y, Zhang B, Zhang Y. Protective effects of Acanthopanax polysaccharides on cerebral ischemia-reperfusion injury and its mechanisms[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72(1): 946-50.
- [13] 白雪, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 刺五加主要活性物质及其药理作用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(6): 396-399.
- [14] 王颖, 郭兰萍, 黄璐琦, 等. 姜黄、莪术、郁金的化学成分与药理作用研究进展[J]. *中国药房*, 2013, 24(35): 3338-3341.
- [15] 梁婧, 侯海燕, 兰晓霞, 等. 五味子乙素的药理作用及其分子机制的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(4): 506-510.
- [16] 王亭. 中药栀子有效成分及药理作用的研究进展[J]. *中国药师*, 2015, 18(10): 1782-1784.
- (2018-07-02 收稿 责任编辑: 杨阳)