

“钩藤-石菖蒲”药对对 TS 模型大鼠神经递质及行为活动的影响

张雪荣¹ 邓丽华² 陈格格³ 李云海¹

(1 湖北中医药大学,武汉,430000; 2 湖北省中医院,武汉,430000; 3 武汉市中西医结合医院,武汉,430000)

摘要 目的:探讨“钩藤-石菖蒲”药对对 TS 模型大鼠神经递质及行为活动的影响。方法:将雄性 SD 大鼠 32 只随机分为正常组、模型组、实验组、泰必利组,每组 8 只。造模的同时开始灌胃给药,正常组与模型组给予蒸馏水,其余各组给予相应药物,1 次/d,连续给药 4 周。观察各组大鼠神经递质含量变化情况及各组大鼠在造模第 7 天及灌胃第 14 天、21 天、28 天刻板行为、运动行为、自主活动次数的情况,并分别进行评分。结果:与正常组比较,模型组多巴胺、多巴胺 D₂ 受体均无明显变化($P>0.05$);与模型组比较,泰必利组、实验组多巴胺、多巴胺 D₂ 受体含量均有下降($P<0.05$);实验组、泰必利组二组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。通过对各组 TS 大鼠刻板行为评分比较,实验组在治疗 21 天以后,大鼠刻板行为减少优于泰必利组及模型组($P<0.05$);通过对各组 TS 大鼠运动行为的评分比较,泰必利组与实验组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);实验组、泰必利组大鼠的活动次数较模型组均减少,二者均有治疗效果。结论:“钩藤-石菖蒲”药对具有抑制多巴胺受体超敏感、促进多巴胺代谢的作用,从而抑制 TS 大鼠的刻板行为,减少 TS 大鼠的活动次数。

关键词 “钩藤-石菖蒲”药对;TS 模型大鼠;神经递质;行为活动

Effects of Drug Pair of “*Ramulus Uncariae Cum Uncis and Rhizoma Acori Tatarinowii*” on Neurotransmitters and Behavioral Activities in TS Rats

Zhang Xuerong¹, Deng Lihua², Chen Gege³, Li Yunhai¹

(1 *Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430000, China*; 2 *Hubei Province Hospital of TCM, Wuhan 430000, China*; 3 *Wuhan Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan 430000, China*)

Abstract Objective: To investigate the effects of drug pair of “*Ramulus Uncariae Cum Uncis and Rhizoma Acori Tatarinowii*” on neurotransmitters and behavioral activities in TS rats. **Methods:** A total of 32 male SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, an experimental group and a tabilium group, with 8 rats in each group. Intra-gastric administration of drugs was given when model establishing. At the same time, the normal group and the model group were given distilled water, and the other groups were given corresponding drugs, once per day, for 4 weeks. The changes of neurotransmitter content in each group of rats were observed, and the stereotyped behaviors, motor behaviors and autonomous activity times of each group of rats were evaluated on the 7th day of modeling and the 14th, 21st and 28th day of instillation. **Results:** Compared with the normal group, there were no significant changes in dopamine and D₂ receptors in the model group ($P>0.05$). Compared with the model group, the levels of dopamine and dopamine D₂ receptor in the tabilium group, the experimental group all decreased ($P<0.05$). There was no significant difference between the experimental group and the tabilium group ($P>0.05$). By comparing the scores of stereotyped behaviors of TS rats in each group, after 21 days of treatment, the reduction of stereotyped behaviors of the experimental group was better than that of the tabilium group and the model group ($P<0.05$). By comparing the scores of exercise behaviors of TS rats in each group, there was no statistical significance between the tabilium group and the experimental group ($P>0.05$). The activity frequency of rats in the experimental group and the tabilium group decreased compared with the model group, and both of them had therapeutic effect. **Conclusion:** Drug pair of “*Ramulus Uncariae Cum Uncis and Rhizoma Acori Tatarinowii*” can inhibit the hypersensitivity of dopamine receptor and promote the metabolism of dopamine, thus inhibiting the stereotypical behavior of TS rats and reducing the activity frequency of TS rats.

Key Words drug pair of “*Ramulus Uncariae Cum Uncis and Rhizoma Acori Tatarinowii*”; TS model rats; Neurotransmitters; Activities

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.08.020

基金项目: 2017 年度湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(B2017109)——“钩藤-石菖蒲”药对对抽动症大鼠神经递质影响的机制研究
作者简介: 张雪荣(1976.03—),女,博士研究生,副主任医师,副教授,研究方向: 中西医结合治疗儿科肝系疾病及内分泌疾病, E-mail: 1251635860@qq.com

通信作者: 李云海(1971.06—),男,博士研究生,教授,研究方向: 中医治疗疑难杂症的研究, E-mail: 155350975@qq.com

多发性抽动症 (Tourette Syndrome, TS) 是一种慢性神经精神疾病, 其患病率在 1%~4% 之间, 且有逐年增高的趋势^[1]。至今为止, 西医对此病尚无根治方法, 目前以氟哌定醇、泰必利为代表的多巴胺受体阻滞剂是公认有效治疗药物, 但不良反应明显, 如锥体外系反应、认知迟钝等。而中医学认为“肝常有余”是小儿重要的生理病理机制, 情志不舒, 肝气郁结, 日久化火, 火极生风, 风阳鼓动, 则肝风挟痰循经而上, 出现面部肌肉、四肢的抽动及怪声连连等症状。小儿又“脾常不足”, 运化维艰, 肝气旺盛常易乘脾犯胃, 则脾胃愈亏, 脾虚木亢, 则肝风内动愈甚。且怪病多责之于痰, 风与痰关系密切, 既可因风而生痰, 亦可因痰而生风, 风痰合邪横串经络, 可使气阻窍闭而发病。故“脾虚肝旺、痰热动风”为本病的基本病机。本研究为了探讨“钩藤-石菖蒲”药对对 TS 模型大鼠神经递质及行为活动的影响, 进行了如下研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠 32 只, 3 周龄, 清洁级, 体质量在 (20 ± 2) g, 雌性。

1.1.2 药物 受试药物: 钩藤、石菖蒲 (饮片), 由江阴天江药业有限公司提供。阳性药物: 泰必利, 由山东健康药业有限公司提供。造模药物: 亚氨基二丙腈 (IDPN, 90%), 为上海至鑫化工有限公司提供。

1.1.3 试剂及仪器 台式冰冻离心机 (美国 BECKMAN 公司 GS-15R 型), Thermo 超低温冰箱 (美国 REVCO 公司), 移液器 (加样器) (德国 Eppendorf), 电子天平 (FA. 1104 型, 上海天平仪器厂), 恒冷冰冻切片机 (德国 Leica-CM1900), Real-time PCR 扩增仪 (7500 型, 美国 Applied Biosystems 公司产品)、紫外分光光度计 (752. C 型, 上海产)、恒温水浴箱 (江苏太仓医用仪器厂, DSHZ-300 型) 等。30% 三氯乙酸、生理盐水、PVDF 膜、焦碳酸二乙酯、Oligo (dT) 15、DNTPs (10 mM)、乙醇、M-MLV 5 × Buffer、10 × Buffer、M-MLV RT、DNA Taq polymerase、cDNA、TRIzol 试剂、RT-PCR 试剂盒等。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 应用 IDPN 造模, 将 IDPN 溶于 0.9% 生理盐水中, 使其终浓度为 22 mg/mL, 每只大鼠腹腔注射 IDPN 330 mg/(kg · d), 连续注射 7 d。对照组腹腔注射等量生理盐水 7 d。

1.2.2 给药方法 将实验大鼠随机分组, 每组大鼠 8 只。正常组: 腹腔注射生理盐水 15 mL/(kg · d),

共注射 7 d, 自注射当日起蒸馏水按 20 mL/(kg · d) 连续灌胃 4 周; 模型组、泰必利组、实验组均予 IDPN 330 mg/(kg · d), 配置成 15 mL/(kg · d) 的剂量, 连续腹腔注射 7 d; 自注射当日起泰必利组予含泰必利 30 mg/(kg · d) 的溶液, 按 20 mL/(kg · d) 连续灌胃 4 周。实验组自造模当日起予含生药 10% 的“钩藤-石菖蒲”药对溶液, 按 20 mL/(kg · d) 连续灌胃 4 周。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 神经递质含量的测定 灌胃结束的第 2 天断头处死各组大鼠 (处死前 24 h 禁食不禁水), 在冰盒上快速剥离大鼠脑黑质-纹状体, 将其一部分放到玻璃匀浆器中, 快速匀浆, 吸取匀浆液, 离心后, 取上清液待测, 另一部分放入冰箱中冷冻。采用酶联免疫吸附测定法检测实验 28 h 后大鼠脑组织多巴胺系统神经递质 DA、DRD₂ 的含量。

1.2.3.2 模型动物行为学观察 由不明确实验分组的实验人员参与 TS 大鼠行为活动评分, 分别观察实验动物大鼠在造模第 7 天及灌胃第 14 天、21 天、28 天刻板行为、运动行为、自主活动次数的情况, 并分别进行评分。1) 刻板行为测试: 将大鼠放入一较大的观察笼内, 大鼠适应 5 min 后, 参照杜淑娟等^[2]动物模型中对刻板行为的评分方法, 在每周灌胃后 1 h, 进行双盲观察 1 h, 5 min 记录 1 次, 并记录总分。评分标准及方法: 0 分: 无刻板行为; 1 分: 旋转行为; 2 分: 头和颈部的上下运动过多; 3 分: 头、颈部的上下运动过多加旋转行为; 4 分: 头向侧摆合并头和颈部的上下运动过多。2) 运动行为评分: 刻板行为评分结束后, 立即将大鼠放入一较大的观察笼内, 大鼠适应后, 以抽动症动物模型中对运动行为的评分方法, 进行双盲观察 1 h, 记录 5 min/次, 并记录总分。评分标准及方法: 0 分: 安静或正常活动; 1 分: 能过度兴奋; 2 分: 探究行为增加; 3 分: 跑; 4 分: 跑和跳。3) 自主活动次数测定: 参照 Wei^[3]等报道的方法, 运动行为评分结束后立即应用大鼠自主活动程序仪进行大鼠自发活动计数, 当计算机进入测定程序后, 将大鼠放入活动箱中 (高 13 cm, 直径 25 cm), 由计算机自动记录大鼠活动情况, 测定每只大鼠 5 min 内的活动次数。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 其中计数资料以 (%) 表示, 采用 χ^2 检验, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表1 各组大鼠脑组织 DA 含量水平比较表($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

组别	DA	P ₁ 值	P ₂ 值
正常组(n=8)	24.23 ± 2.35		
模型组(n=8)	66.88 ± 3.19		
实验组(n=8)	54.27 ± 1.71	0.004	
泰必利组(n=8)	53.94 ± 1.31	0.006	0.818

注: $P < 0.05$, 说明差异有统计学意义。P₁ 表示实验组、泰必利组与模型组大鼠脑组织 DA 含量比较; P₂ 表示实验组、泰必利组大鼠脑组织 DA 含量比较

表2 各组大鼠脑组织 DRD₂ 含量水平比较表($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}$)

组别	DRD ₂	P ₁ 值	P ₂ 值
正常组(n=8)	2.21 ± 1.15		
模型组(n=8)	2.57 ± 0.79		
实验组(n=8)	1.95 ± 0.58	0.025	
泰必利组(n=8)	2.08 ± 0.62	0.044	0.619

注: $P < 0.05$, 说明差异有统计学意义。P₁ 表示实验组、泰必利组与模型组大鼠脑组织 DRD₂ 含量比较; P₂ 表示实验组、泰必利组大鼠脑组织 DRD₂ 含量比较

表3 各组大鼠刻板行为评分比较($\bar{x} \pm s, \text{分}$)

组别	治疗 7 d	治疗 14 d	治疗 21 d	治疗 28 d
模型组(n=8)	2.62 ± 1.06	2.38 ± 0.52	2.88 ± 0.99	2.13 ± 0.83
实验组(n=8)	3.00 ± 0.93	2.25 ± 0.46	1.12 ± 0.83 [△]	1.00 ± 0.76 [*]
泰必利组(n=8)	3.13 ± 0.83	2.13 ± 0.64	2.83 ± 0.92	2.38 ± 0.74

注: * 表示 $P < 0.05$ 。通过对各组 TS 大鼠刻板行为评分比较, 实验组在治疗 21 d 以后, 大鼠刻板行为减少优于泰必利组及模型组 ($P < 0.05$)

表4 各组大鼠运动行为评分比较($\bar{x} \pm s, \text{分}$)

组别	治疗 7 d	治疗 14 d	治疗 21 d	治疗 28 d
模型组(n=8)	2.88 ± 0.99	2.87 ± 0.83	3.13 ± 0.64	2.25 ± 1.03
实验组(n=8)	2.63 ± 0.92	2.26 ± 0.52	1.00 ± 0.93 [*]	0.75 ± 0.70 [*]
泰必利组(n=8)	3.00 ± 0.76	1.00 ± 0.92 [*]	1.25 ± 1.03 [*]	2.25 ± 1.03

注: * 表示 $P < 0.05$ 。通过对各组 TS 大鼠运动行为的评分比较, 泰必利组在治疗 14 d 后运动行为减少, 而在治疗 28 d 后运动行为再次增多; 而实验组在治疗 21 d 后运动行为减少, 二者在起效时效上泰必利组优于实验组, 而在药效维持时间上实验组优于泰必利组

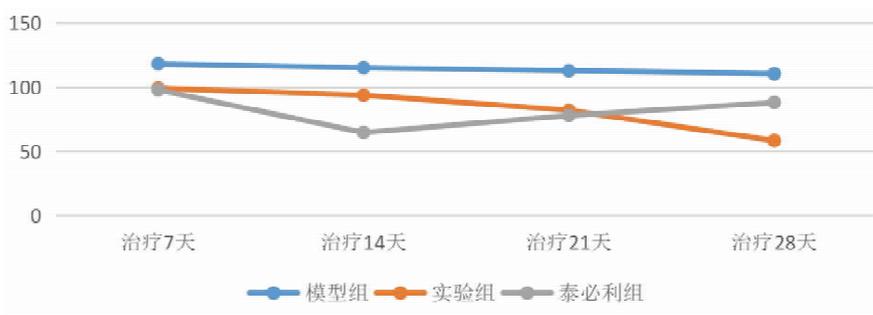


图1 各组大鼠活动次数比较

注: 通过对各组 TS 大鼠活动次数的比较, 模型组在治疗各阶段无明显变化, 实验组大鼠活动次数呈逐渐下降趋势, 而在治疗 21 d 后活动次数明显减少, 泰必利组大鼠活动次数呈现时少时多的波动趋势, 在治疗第 7~14 天, 活动次数明显减少, 而在治疗 14 d 后又呈现活动次数增多的趋势。但总体而言实验组、泰必利组大鼠的活动次数较模型组均减少, 说明治疗有效果

3 讨论

小儿多发性抽动症属于中医学中“瘵疾”“慢惊风”“肝风证”等范畴。临床多表现为眨眼、挤眉、皱鼻、摇头、咧嘴等。中医学认为小儿“肝常有余”“脾常不足”“肾常虚”的生理特点是发为本病的病机所在。其病因可责之先天禀赋不足, 产伤, 外伤等多种因素。小儿稚阴稚阳之体, 肾常虚, 肾虚则肝木无制, 阴虚则筋脉失养^[4]。小儿情志不舒, 肝气郁结, 日久化火, 火极生风, 风阳鼓动, 则肝风挟痰循经而上, 出现面部肌肉、四肢的抽动及怪声连连等症状。小儿“脾常不足”, 运化维艰, 肝气旺盛常易乘脾犯

胃, 则脾胃愈亏, 脾虚木亢, 则肝风内动愈甚。加之“怪病多为痰作祟”, 故本病的病机为“脾虚肝旺、痰热动风”, 病变脏腑在于肝脾, 涉及胃, 病理产物责之于风痰。

TS 发现至今已有 200 多年的历史, 其病因及发病机制目前尚不十分清楚, 但普遍认为其发病与遗传因素、中枢神经递质失衡、神经生化异常和精神因素等诸多方面有关^[5]。但 TS 患者纹状体内多巴胺神经过度支配或突触后受体超敏感是目前公认的 TS 发病的神经生物化学因素^[6]。多巴胺(DA)是中枢神经系统中重要的神经递质, 占有脑内儿茶酚

胺类神经递质总含量的 80%。学者多认为本病存在与基底节纹状体的 DA 神经元活动过度及突触 DA 受体超敏感相关,TS 患儿纹状体内 DA 能系统存有活动过度现象。多巴胺受体 DRD₂ 被认为与 TS 间存在密切关联。有实验显示, IDPN 诱导的模型鼠的 DRD₂ mRNA 表达较正常小鼠明显升高^[7]。本实验研究结果显示在造模后模型组、实验组、泰必利组大鼠脑组织中 DA、多巴胺受体 DRD₂ 的含量均升高,提示 TS 大鼠 DA 能系统存在过度活化的现象,符合理论研究。实验研究的目的在于通过药物干预使 DA 缺乏,从而 DRD₂ 由脑内最重要的兴奋性神经递质谷氨酸激活,通过间接通路,对丘脑-皮质投射产生抑制作用,从而降低运动兴奋性,从而较少改善刻板运动。

本实验研究结果显示在对 TS 模型大鼠进行中药(“钩藤-石菖蒲”)及西药(泰必利)干预后,实验组及泰必利组 DA、多巴胺受体 DRD₂ 的含量较模型组均下降($P < 0.05$),说明“钩藤-石菖蒲”药对与泰必利均可降低 DRD₂ mRNA 表达及抑制 DA 的过度活化;将实验组和泰必利组 DA、多巴胺受体 DRD₂ 的含量进行比较,2 者差异无统计学意义($p > 0.05$),说明“钩藤-石菖蒲”药对及泰必利二者在疗效上无明显优劣之分。

通过对各组 TS 大鼠刻板行为的评分比较,在治疗后实验组、泰必利组 TS 大鼠的刻板行为较模型组均减少,说明二者均有治疗效果,但对实验组及泰必利组 TS 大鼠刻板行为的评分进行比较,实验组在治疗 21 d 以后,大鼠刻板行为较泰必利组减少,说明中药组在优于泰必利组及模型组($P < 0.05$)。通过对各组 TS 大鼠运动行为的评分比较,泰必利组在治疗 14 d 后运动行为减少,而在治疗 28 d 后运动行为再次增多;而实验组在治疗 21 d 后运动行为持续减少,说明二者在起效时效上泰必利组优于实验组,而在药效维持时间上实验组优于泰必利组。通过对各组 TS 大鼠活动次数的比较,模型组在治疗各阶段无明显变化,实验组大鼠活动次数呈逐渐下降趋势,而在治疗 21 d 后活动次数呈现明显下降趋势,泰必利组大鼠活动次数呈现时少时多的波动趋势,在治疗第 7~14 天,活动次数较实验组明显减少,而在治疗 14 d 后又呈现活动次数增多的趋势,且在治疗 21 d 后活动次数高于实验组,这也再次证明了泰必利治疗 TS 大鼠起效快,但药效维持时间弱于实验组。但总体而言实验组、泰必利组大鼠的活动次数较模型

组均减少,说明二者均有治疗效果。

综上所述“钩藤-石菖蒲”药对具有抑制多巴胺受体超敏感、促进多巴胺代谢的作用,从而改善 TS 大鼠的刻板行为及减少其活动次数。

钩藤可清热平肝,熄风止痉,为治疗惊风之良药。钩藤中主要有效成分生物碱,对中枢神经系统的药理作用主要表现为镇静、抗癫痫、抗惊厥和对神经元的保护等^[8]。有研究发现石菖蒲可有效清除自由基、阻止过氧化物形成,发挥神经及脑细胞保护的作用^[9]。钩藤、石菖蒲在临床上治疗多发性抽动症应用广泛,我们分析了万方数据库近 20 年关于中医药治疗小儿多发性抽动症的文献,并对其进行了分析,结果显示钩藤的使用频次为 376 次,占用药总数的 74.3%,位居第 1 位;石菖蒲的使用频次为 219 次,占用药总数的 43.3%,位居第 6 位^[10]。本实验研究也证实了钩藤、石菖蒲具有抑制多巴胺受体超敏感、促进多巴胺代谢的作用,从而降低运动兴奋性,改善 TS 大鼠的刻板运动,减少活动次数,为临床运用提供依据。

参考文献

- [1] 隆红艳. 小儿多发性抽动症多巴胺系统的分子机制及静安口服液作用机理研究[D]. 南京:南京中医药大学,2012.
- [2] 杜淑娟,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):23-25.
- [3] Haifeng Wei, Lin Li, Qiuji Song, et al. Behavioral study of the D₂ galactose induced aging model in C57BL/6J mice. Behav Brain Res, 2005, 157:245-251.
- [4] 朱先康,韩新民,王敏华. 定抽颗粒治疗小儿多发性抽动症的临床及实验研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(2):399-401.
- [5] 刘智胜. 小儿多发性抽动症[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:32-74.
- [6] Xiong S, She H, Zhang AS, et al. Hepatic macrophage iron aggravates experimental alcoholic steatohepatitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 29(5):512-521.
- [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] 黄华,丁伯平. 钩藤生物碱对中枢神经系统的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床,2013,28(5):807-808.
- [9] Cho J, Kim YH, Kong JY, et al. Protection of cultured retractorial neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of *Acorns gramineus* [J]. Life Sci, 2002, 71(5):591-599.
- [10] 邓丽华,陈格格,张雪荣. 中医药治疗小儿多发性抽动症方药文献分析[J]. 中医临床杂志,2017,29(5):663-664.