

本文引用:刘微艳,朱沁泉,陈盼,陈创,张涂.健脾柔肝息风汤对抽动障碍模型大鼠脑组织中多巴胺和高香草酸的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(12):1384-1387.

健脾柔肝息风汤对抽动障碍模型大鼠脑组织中多巴胺和高香草酸的影响

刘微艳¹,朱沁泉²,陈盼¹,陈创¹,张涂^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 观察健脾柔肝息风汤对抽动障碍(tic disorder,TD)模型大鼠脑组织中多巴胺和高香草酸(homovanillic acid, HVA)含量的影响,探讨其作用机制。**方法** 建立空白组,模型组,氟哌啶醇组,健脾柔肝息风汤高、中、低剂量组共6组,通过腹腔注射亚氨基二丙腈,建立抽动障碍模型大鼠,分组干预后再采用酶联免疫法(ELISA)测定脑组织中多巴胺(dopamine, DA)和高香草酸(homovanillic acid, HVA)的含量。**结果** 与空白组比较,模型对照组DA及HVA含量均降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,健脾柔肝息风汤高、中、低剂量组及氟哌啶醇组DA与HVA含量均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** DA能系统及代谢产物HVA平衡失调与抽动障碍发病有关,而健脾柔肝息风汤具有调节DA能系统及代谢产物平衡的作用。

[关键词] 健脾柔肝息风汤;抽动障碍;多巴胺;高香草酸

[中图分类号]R285.5;R749.94

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.12.007

Effect of Jianpi Rougan Xifeng Decoction on Dopamine and Homovanillic Acid in the Brain Tissue of Model Rats with Tic Disorder

LIU Weiyang¹, ZHU Qinquan², CHEN Pan¹, CHEN Chuang¹, ZHANG Di^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Jianpi Rougan Xifeng Decoction on the content of dopamine (DA) and homovanillic acid (HVA) in the brain tissue of model rats with tic disorder, and to explore its mechanism. **Methods** The rats were divided into six groups, i.e., blank group, model group, haloperidol group, and Jianpi Rougan Xifeng Decoction groups (high, medium, and low doses). A rat model of tic disorder was established by intraperitoneal injection of iminodipropionitrile. After administration of corresponding treatment for each group, the content of DA and HVA in the brain tissue was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the blank group, the model group had significantly reduced content of DA and HVA ($P<0.01$); the content of DA and HVA was significantly higher in the Jianpi Rougan Xifeng Decoction groups (high, medium, and low doses) and haloperidol group than in the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The imbalance between the dopaminergic system and its metabolite (HVA) is related to the development of tic disorder, while Jianpi Rougan Xifeng Decoction can regulate the balance between the dopaminergic system and its metabolite.

[Keywords] Jianpi Rougan Xifeng Decoction; tic disorder; dopamine; homovanillic acid

[收稿日期]2018-01-30

[基金项目]湖南省教育厅项目(17A159)。

[作者简介]刘微艳,女,在读硕士研究生,研究方向:中医儿科。

[通讯作者]*张涂,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:2655357548@qq.com。

抽动障碍(tic disorder, TD)是一种具有遗传倾向的神经精神性疾病,主要表现在运动性抽动和发声性抽动,临床表现有:努嘴、眨眼、耸肩、鼓腹、踢腿等,严重影响了患儿的生活及发展,且此病的发病率呈上升趋势^[1-2]。抽动障碍分为短暂性抽动障碍、慢性抽动障碍和多发性抽动症三种类型,目前治疗抽动障碍的药物以多巴胺受体拮抗剂为主,其中氟哌啶醇为首选药物,但其锥体外系等副作用明显^[3]。中医认为此病与肝脾密切相关,肝常有余,肝旺生风,脾常不足,脾虚生风,风胜则动。张涤教授在临床中应用“抑木扶土”法,研发了治疗此病的经验用方——健脾柔肝息风汤(茯苓 10 g,白芍 10 g,钩藤 10 g,僵蚕 10 g,全蝎 6 g,甘草 2 g),此方具有疗效显著、副作用小的优势,为进一步明确其作用,本实验通建立 TD 大鼠模型,研究健脾柔肝息风汤对 TD 大鼠脑组织中多巴胺(dopamine, DA)、高香草酸(homovanillic acid, HVA)含量影响,探讨健脾柔肝息风汤的作用靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 60 只,SPF 级,体质量 180~200 g^[4-5],购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。许可证号:SYXK(湘 2013-0004)。

1.2 药品与试剂

健脾柔肝息风汤方由茯苓、白芍、钩藤、僵蚕、全蝎、甘草组成,含生药量 48 g,购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,按照临床等效剂量的 4 倍、2 倍、1 倍高剂量组 12 g/(kg·d)、中剂量组 6 g/(kg·d)、低剂量组 3 g/(kg·d),然后分别按含生药 0.48、0.24、0.12 g/mL 配制健脾柔肝息风汤药液。氟哌啶醇(湖南洞庭药业股份有限公司,规格 1 mL:5 mg)。生理盐水(湖南科伦制药有限公司,规格:100 mL:0.9 g)等。

DA ELISA 试剂盒(武汉华美,批号:CSB-E08660r),HVA ELISA 试剂盒(武汉华美,批号:CSB-EQ07785RA),考马斯亮蓝快速染色液(前尘生物,20309ES03),甘氨酸(Biosharp,批号:BS003A),亚氨基二丙腈(湖南康合益生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

H1650R 台式高速冷冻离心机,湘仪;PW-812 全自动酶标洗板机,汇松;MB-530 多功能酶标分析仪,汇松;DHP-500 恒温培养箱,光明;L530 自动平衡离心机,湘仪;MCT-150-C1.5 mL 离心管,Axygen。

1.4 分组与造模^[6]

60 只 SD 大鼠随机分为 6 组,空白组、模型组、氟哌啶醇组、健脾柔肝息风汤高剂量组、健脾柔肝息风汤中剂量组、健脾柔肝息风汤低剂量组,每组 10 只。除空白组腹腔注射生理盐水 3 mL/(kg·d)外,余 5 组腹腔注射亚氨基二丙腈 150 mg/(kg·d),连续注射 1 周,则出现鼻嗅、仰头、摆头、躯体旋转等兴奋性增高、活动增多的表现,按 Diamond^[6]评分方法评分 ≥ 1 分可判定造模成功。

1.5 干预措施

造模 7 d 后,空白组、模型组:灌胃给予等容量蒸馏水;氟哌啶醇组灌胃氟哌啶醇:0.5 mg/(kg·d)(氟哌啶醇配成混悬液,质量浓度为 1 mL 含 0.025 mg 药物);健脾柔肝息风汤高、中、低剂量组灌胃健脾柔肝息风汤,按 12、6、3 g/(kg·d)给药,每日 1 次,连续灌胃 6 周。

1.6 标本采集与检测

在末次给药 72 h 后,断头取脑,冰上迅速剥离纹状体,称重后液氮速冻放入-80 °C 冰箱保存待测。使用酶联免疫法(ELISA)检测脑组织 DA、HVA 含量,严格参照试剂盒说明操作。将各种试剂移至室温(18~25 °C)平衡至少 30min,按前述方法配制试剂,备用。加样:分别设标准孔和待测样本孔,每孔分别加标准品或待测样本 100 μ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,置 37 °C 温育 2 h。弃去液体,甩干,不用洗涤。每孔加生物素标记抗体工作液 100 μ L,覆上新的板贴,置 37 °C 温育 1 h。弃去孔内液体,甩干,洗板 3 次。每次浸泡 2 min,200 μ L 每孔,甩干。每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 100 μ L,覆上新的板贴,置 37 °C 温育 1 h。弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次。每次浸泡 2 min,200 μ L 每孔,甩干。依序每孔加底物溶液 90 μ L,37 °C 避光显色 15~30 min。依序每孔加终止液 50 μ L,终止反应。在反应终止后 5 min 内用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的 OD 值,以 OD 值除以蛋白浓度所得的值表示 DA、

HVA 的含量。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件包, 计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 多组间比较, 方差齐性, 则采用单因素方差分析, 方差不齐, 则采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

健脾柔肝息风汤对 TD 模型大鼠脑组织中多巴胺及高香草酸的含量影响: 与模型组比较, 健脾柔肝息风汤各组 DA 及 HVA 含量均有升高 ($P < 0.01$); 氟哌啶醇组与健脾柔肝息风汤中、低剂量组比较 DA 及 HVA 含量均升高 ($P < 0.05$); 氟哌啶醇组与健脾柔肝息风汤高剂量组比较 DA 及 HVA 含量相当 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠脑组织 DA、HVA 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng/mL}$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	DA	HVA
空白组	-	2.03±0.05	0.799±0.061
模型组	-	1.596±0.084**	0.555±0.135**
氟哌啶醇组	0.0005	1.995±0.105 ^{##}	0.779±0.081 ^{##}
健脾柔肝息风汤高剂量	12	1.978±0.122 ^{##}	0.783±0.083 ^{##}
健脾柔肝息风汤中剂量	6	1.928±0.078 ^{##△}	0.709±0.071 ^{##△}
健脾柔肝息风汤低剂量	3	1.903±0.083 ^{##△}	0.648±0.092 ^{##△}
F 值		596.8	117.3
P 值		0.000	0.000

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与氟哌啶醇组比较, [△] $P < 0.05$

3 讨论

DA 是脑内重要神经递质, 在控制行为和认知功能中具有重要作用^[7], 异常的 DA 信号具有干扰前额叶皮质和纹状体环路的作用, 长期的 DA 异常调节, 可以导致两者功能紊乱^[8-9]。此外黑质纹状体通路, 它的纤维投射起自中脑黑质致密部的多巴胺能神经元, 支配背侧纹状体(尾壳核), 此通路为椎体外系的一个重要部分, 它涉及运动的控制, 是调节行为活动反应的基本结构, 长期的 DA 异常调节, 可以导致精神活动和运动功能紊乱。而 HVA 是 DA 在降解酶的作用下产生的主要代谢产物, 通常被视为 DA 活性的主要指标^[10]。有研究表明 TD 患儿血清及脑脊液中 HVA 较正常对照组有明显变化, 佐证 DA 系统活

性与 TD 发病具有关联性^[11-12], 因此 HVA 可作为直接反应脑内 DA 代谢的标志。故 DA 及代谢产物 HVA 平衡失调均可能导致抽动障碍的发生。

本文建立抽动障碍大鼠模型 (有相关文章及实验表明, 抽动障碍老鼠选择大鼠及小鼠均可^[4-5]), 研究发现, 与空白组比较, 模型组 DA 及 HVA 含量均降低; 与模型组比较, 氟哌啶醇组 DA 及 HVA 含量升高; 与模型组比较, 健脾柔肝息风汤高、中、低剂量组 DA 及 HVA 含量均升高; 氟哌啶醇是多巴胺受体拮抗剂, 是治疗抽动障碍的主要药物, 通过此实验说明健脾柔肝息风汤在治疗抽动障碍时, 通过调节 DA 能系统及代谢产物平衡而起到相关作用。

传统中医学理论认为, TD 多与肝脾功能失调有关, 常表现为肝亢脾虚的特点。导师张涤教授从五行生克制化理论入手, 根据肝风亢盛、脾虚夹痰的病理演变规律, 提出本病病机为木亢土虚, 肝风内动, 治疗以“抑木扶土”法为纲, 总结出“健脾柔肝息风汤”以平肝息风、健脾化痰。方中白芍柔肝、钩藤平肝为君药。白芍味苦、酸, 性微寒, 归肝、脾经, 具有柔肝敛阴、平抑肝阳的功效, 其主要有效成分白芍总苷具有镇痛、镇静、抗炎、解痉作用^[13-14]。钩藤味甘、苦, 性凉, 具有平肝息风的功效, 现代临床中用于高热惊厥、惊痫抽搐等疾病中^[15], 中药药理研究表明, 钩藤及钩藤碱能明显降低大脑皮层的兴奋性, 具有显著的抗惊厥、抗癫痫、保护神经元等作用^[16-17]。茯苓健脾益气, 僵蚕、全蝎善于驱风, 三者共为臣药。茯苓味甘、淡, 性平, 入脾、心、肾经, 具有健脾化痰, 益气宁心的功效, 临床中有改善学习记忆、镇静的作用^[18]。僵蚕味辛、咸, 性平, 入肝、心、脾、肺经, 具有息风止痉、活络通经等功能。现代研究表明僵蚕表面含有的草酸铵是其药理成分, 具有镇静、抗惊厥作用^[19]。全蝎具有息风、镇痉、通络止痛等作用, 全蝎蝎毒的主要成分是抗癫痫肽, 其作用依赖于单胺类神经递质的存在, 药理实验证实全蝎醇提物有镇静作用^[20]。甘草为使药, 具有补益脾气, 调和诸药的功效, 具有提高免疫力的作用^[21]。通过本次研究, 发现健脾柔肝息风汤对 TD 大鼠模型脑组织中 DA 和 HVA 有调节平衡的作用, 从而抑制抽动的发生, 但其具体作用机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 刘智胜. 儿童抽动障碍的研究现状与进展 [J]. 临床儿科杂志, 2009,27(11):1098-1100.
- [2] 车立纯,刘秀梅,陈 琅,等.抽动障碍大鼠模型的行为学特征及机制研究[J].中国儿童保健杂志,2016,24(12):1274-1276.
- [3] 郑庆梅,李耀东,邓良华,等.阿立哌唑口腔崩解片与氟哌啶醇治疗抽动障碍的对比研究[J].吉林医学,2015,24(14):2995-2997.
- [4] 谢 卉,季 燕,任利民,等.红景天苷对亚氨基二丙腈诱导大鼠抽动行为及多巴胺含量的影响[J].世界临床药物,2013,34(9):531-534.
- [5] 段玲玲.静安口服液对小儿多发性抽动症神经递质影响的机理研究[D].南京:南京中医药大学,2009.
- [6] DAMMOND B I, REYES M G, BORISON R L. A new animal model for Tourette syndrome[J]. Adv Neurol, 1982, 35:221-225.
- [7] GUNTHER W, MULLER N, TRAP P W. et al. Quantitative EEG analysis during motor function and music Perception in Tourette's syndrome[J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci,1996,246(4):197-202.
- [8] TALANTOVA M, SANZ-BLASCO, ZHANG X, et al. induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013,110(27): E2518-2527.
- [9] CHEON K A, RYU Y H, NAMKOONG K, KIM C H, et al. Dopamine transporter density of the basal ganglia assessed with IPT SPECT in drug-naive children with Tourette's disorder[J]. Psychiatry Res, 2004, 130(1): 85-95.
- [10] 刘智胜.小儿多发性抽动症[M].北京:人民卫生出版社,2004:108-109.
- [11] 国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准[M].南京:南京大学出版社,1994:23,29.
- [12] SERRA-MESTRES J, RING H A, COSTA D C. et al. Dopamine transporter binding in Gilles de la Tourette syndrome [J]. Acta Psychiatr Scand, 2004, 109(2):140-146.
- [13] 杨晓帆.白芍有效成分的研究进展[J].广州化工,2015,43(20):76-78.
- [14] 张建军,李 伟,王丽丽,等.赤芍和白芍品种、功效及临床应用述评[J].中国中药杂志,2013,38(20):3595-3601.
- [15] 黄小敏,刘方方,盖亚男,等.钩藤的本草学研究[J].中药材,2016,39(12):2902-2906.
- [16] 江 芳,郭 娜,童文琴,等.钩藤属植物研究进展[J].海峡药学,2017,29(4):5-13.
- [17] 任贵华,王久琴.钩藤碱对糖尿病大鼠神经病理性疼痛的镇痛作用观察[J].现代医药卫生,2010,26(5):643-645.
- [18] 徐煜彬,徐志立,李明玉,等.茯苓及其化学拆分组分学习记忆及镇静催眠的性味药理学研究[J].药学与临床,2014,45(11):1577-1584.
- [19] 喻 静.僵蚕的临床应用及现代药理研究[J].中国中医药咨讯,2010,2(7):185-186.
- [20] 喻 良,孙红斌,梁 益,等.全蝎醇提物对氯化锂-毛果芸香碱诱导癫痫持续状态模型大鼠海马神经细胞 caspase-3 表达的影响[J].中国临床神经科学,2009,17(6):567-572.
- [21] 李海华,青 梅,于 娟,等.甘草的研究进展[J].内蒙古医科大学学报,2015,37(2):199-203.

(本文编辑 杨 瑛)