

贝健胶囊对小鼠抽动障碍模型的作用及机制研究

吴青业, 关业枝, 鞠学鹏, 梁荣辉, 许常辉, 林丹荣

(广州中医药大学科技产业园, 广东 广州 510445)

摘要: 目的 研究贝健胶囊对小鼠抽动障碍(TD)模型的治疗作用,通过检测模型小鼠脑内神经递质多巴胺(DA)的量,探讨贝健胶囊治疗 TD 的作用机制。**方法** 咖啡因诱导小鼠 TD 模型,采用自主行为实验和攀爬实验研究贝健胶囊对模型小鼠的影响;采用高效液相色谱法测模型小鼠脑组织中 DA 的量。**结果** 贝健胶囊能明显抑制咖啡因引起的小鼠攀爬行为($P<0.05$),并显著减少自主活动次数($P<0.05$);降低模型小鼠脑内 DA 的量($P<0.05$)。**结论** 贝健胶囊对咖啡因诱导的小鼠 TD 模型具有显著的治疗作用,降低脑内多巴胺的量可能是其治疗 TD 的作用机制。

关键词: 贝健胶囊; 抽动障碍; 咖啡因; 多巴胺; 作用机制

中图分类号: R971; R985

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)04-0286-04

Effects of Beijian Capsule on mouse with tic disorders and its mechanism of action

WU Qing-ye, GUAN Ye-zhi, JU Xue-peng, LIANG Rong-hui, XU Chang-hui, LIN Dan-rong

(Science and Technology Park, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510445, China)

Abstract: Objective To observe the therapeutic effects of Beijian Capsule on mouse with tic disorders (TD), and to explore the mechanism of Beijian Capsule for treatment of TD by determining the neurotransmitter dopamine content in mouse brain. **Methods** TD model of mouse was established by gastric perfusion of caffeine. The climbing test and spontaneous behavior test were performed to study the effects of Beijian Capsule on the mouse model. Dopamine in mouse brain was determined by high performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD). **Results** Beijian Capsule significantly inhibited the mice abnormal climbing behavior caused by caffeine ($P<0.05$), and markedly reduced the spontaneous movements ($P<0.05$). Beijian Capsule also decreased the dopamine content in mouse brain ($P<0.05$). **Conclusion** Beijian Capsule has significant therapeutic effects on mouse with tic disorders, and the mechanism may be related to its decreasing dopamine content in mouse brain.

Key words: Beijian Capsule; tic disorders; caffeine; dopamine; mechanism

抽动障碍(tic disorders, TD)是一种起病于儿童,临床上以头、面部、肢体或躯干部的肌肉抽动,伴有语言障碍等症状为主的综合征。TD起病多在5~15岁之间,主要表现为不自主、反复、快速、无目的的一个或多个部位肌肉运动性或发声性抽动,可伴有诸多行为问题,如注意缺陷多动障碍、强迫障碍、睡眠障碍和情绪障碍等。2005年中国卫生部疾病控制司提供的信息表明,从流行病学调查和临床发现的儿童精神疾病常见病种为:多动症约为6%、抽动症为3%~5%。资料显示,约80%的少年犯曾患多动症、抽动症^[1]。

儿童一旦患上此病,将无法正学习,如果错过治疗的黄金阶段,将影响智力,造成行为退缩和社交障碍,贻误前途。因此,TD已引起了家庭和社会的高度重视。

贝健胶囊是在民间验方治疗儿童TD的研究基础上,利用现代提取工艺,从民间草药提取有效部位制成的新制剂,目前尚处于临床前研究阶段。本实验研究贝健胶囊对小鼠TD模型的治疗作用,通过检测脑内神经递质多巴胺(DA)的量,研究其对咖啡因小鼠TD模型的治疗作用及探讨其治疗TD的可能作用机制。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

贝健胶囊, 广州中医药大学科技有限公司提供(批号: 090301), 将胶囊内容物用蒸馏水配成质量浓度分别为 36、18、9 mg/mL 的混悬液备用; 氟哌啶醇片, 宁波大红鹰药业股份有限公司产品(批号: 080902), 用蒸馏水配成 0.09 mg/mL 溶液备用。盐酸多巴胺对照品, 中国药品生物制品检定所提供(批号: 100070-200405); 咖啡因, 合肥博美生物科技有限责任公司产品; 高氯酸, 分析纯, 天津市东方化工厂产品; 甲醇, 色谱纯, 德国 Merck 公司产品; 其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

NIH 小鼠, SPF 级, 广东省医学实验动物中心提供, 合格证号: 2008A021。实验前在实验观察室温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 湿度(70 ± 5)%, 光照 12 h/d, 检疫观察 3 d, 取健康动物用于实验。

1.3 仪器

MR23i 高速冷冻离心机, 法国 Jouan 公司产品; BP121S 电子天平, Sartorius 公司产品; 1-15 型台式离心机, Sigma 公司产品; 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产品; 自制小鼠攀爬网测定笼(直径 13 cm, 高 14 cm, 铁丝粗 2 mm, 铁丝间距 1 cm); Agilent 1100 高效液相色谱仪(带有荧光检测器), 安捷伦科技有限公司产品。

2 方法

2.1 贝健胶囊对小鼠自主活动的影响^[2-3]

选取 SPF 级 NIH 小鼠 48 只, 雌雄各半, 体质量 10~12 g。按活动记数法用 ZIL-2 小鼠自主活动程序自动控制仪, 先将小鼠放入活动箱中适应 3 min, 然后测定小鼠 5 min 内的活动次数, 并按活动次数分层随机分为 6 组: 正常对照组, 模型对照组, 贝健胶囊低、中、高剂量(90、180、360 mg/kg)组及氟哌啶醇(0.9 mg/kg, 临床每日最高用量等效剂量)组, 每组 8 只。除正常对照组外, 其余各组小鼠均 ig 咖啡因 90 mg/kg (10 mL/kg) 复制模型, 复制模型后 15 min, 各组均按 10.0 mL/kg 给药体积 ig 给药 1 次, 正常对照组、模型对照组 ig 等体积的蒸馏水。给药后 30 min, 按上法测定小鼠 5 min 内自主活动次数。

2.2 贝健胶囊对小鼠攀爬行为的影响^[4]

选取 NIH 小鼠 48 只, 雌雄各半, 体质量 10~12 g。按体质量分层随机分为 6 组: 正常对照组, 模型对照组, 贝健胶囊低、中、高剂量(90、180、360 mg/kg)组及氟哌啶醇(0.9 mg/kg)组, 每组 8 只。除正常对照组外, 其余各组小鼠均 ig 咖啡因 90 mg/kg (10 mL/kg) 复制模型, 复制模型后 15 min, 各组均按 10 mL/kg 给药体积 ig 给药 1 次, 正常对照组、模型对照组 ig 等体积的蒸馏水。给药后 30 min 开始测试小鼠攀爬行为。测试前先将小鼠在铁丝网实验笼中适应环境 30 min, 随即连续观察小鼠行为 15 min, 记录每 5 min 内小鼠抓握垂直棒的累积时间, 每 5 min 内对小鼠行为评分(1 只爪抓住垂直棒记为 1 分, 2 只爪抓住垂直棒记为 2 分, 依此类推)。

2.3 贝健胶囊对小鼠脑组织中 DA 量的影响

2.3.1 模型的建立

选取 NIH 小鼠 48 只, 雌雄各半, 体质量 10~12 g, 按体质量分层随机分为 6 组: 正常对照组, 模型对照组, 贝健胶囊低、中、高剂量(90、180、360 mg/kg)组及氟哌啶醇(0.9 mg/kg)组, 每组 8 只。各组均按 10 mL/kg 给药体积 ig 给药, 每天 1 次, 连续 3 d, 正常对照组、模型对照组 ig 等体积的蒸馏水。给药第 3 天, 除正常对照组外, 其余各组小鼠均 ig 咖啡因 90 mg/kg (10 mL/kg) 复制 TD 模型, 复制模型后 15 min 再给药 1 次, 正常对照组、模型对照组 ig 等体积的蒸馏水。给药后 30 min, 将小鼠脱臼处死, 取脑, 按以下步骤制备脑组织匀浆和测定。

2.3.2 小鼠脑组织匀浆液的处理^[5]

1) 用冰冷的生理盐水冲洗除去脑组织块血液, 滤纸拭干称质量; 2) 剪取脑组织块 0.1 g, 倒入玻璃匀浆器中, 上下转动数十次, 充分研磨使组织匀浆化; 3) 向脑组织匀浆液中加入 8 倍体积的 0.4 mol/L 的高氯酸, 充分混匀, 置冷冻离心机内, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 15 min; 4) 取离心后的上清液, 再次离心, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min; 5) 取上清液用 0.4 mol/L 的高氯酸定容至 1 mL, 充分混匀, 得样品溶液。

2.3.3 色谱条件^[6-7]

色谱柱: Diamonsil-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相: 0.1 mol/L 磷酸二氢钠-甲醇 (95:5); 体积流量: 1.0 mL/min; 荧光检测器: Ex=280 nm,

Em=315 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

2.3.4 对照品溶液制备

精密称取盐酸多巴胺对照品适量, 用 0.02 mmol/L 的柠檬酸三钠水溶液 (pH 5.0) 制备成 40 μg/mL 的标准储备液。

2.3.5 DA 量的测定

按照“2.3.3”项下色谱条件测定小鼠脑组织匀浆液中 DA 的量。

2.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间数据进行 *t* 检验, 运用 CS2000 统计软件进行运算。

3 结果

3.1 贝健胶囊对小鼠自主活动的影响

实验结果表明, 咖啡因使小鼠自主活动增强, 与正常对照组比较有显著差异 ($P < 0.05$); 贝健胶囊中、高剂量组与模型对照组比较均能减少小鼠自主活动次数 ($P < 0.01$ 、 0.001); 提示贝健胶囊可抑制咖啡因诱导的小鼠自主活动增强, 并有明显的量效关系。结果见表 1。

表 1 贝健胶囊对模型小鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	5 min 自主活动/次
正常对照	—	74.5 ± 26.5
模型对照	—	116.8 ± 40.6 [△]
贝健胶囊	90	80.8 ± 29.7
	180	49.1 ± 15.3 ^{**}
	360	23.2 ± 13.3 ^{***}
氟哌啶醇	0.9	29.1 ± 11.0 ^{***}

与正常对照组比较: [△] $P < 0.05$

与模型对照组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

3.2 贝健胶囊对小鼠攀爬行为的影响

模型对照组小鼠出现特殊的攀爬行为, 四肢攀附于垂直的铁丝网上, 很少回到笼底, 与正常对照组比较小鼠攀爬时间明显延长 ($P < 0.05$); 贝健胶囊低、中、高剂量组与模型对照组比较均能缩短小鼠攀爬时间 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且高剂量组的小鼠在整个实验过程中没有活动。说明贝健胶囊可显著抑制咖啡因引起的小鼠攀爬行为增强。结果见表 2、3。

表 2 贝健胶囊对模型小鼠累积握杆时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	不同时间的累积握杆时间/s		
		0~5 min	5~10 min	10~15 min
正常对照	—	93.1 ± 38.2	65.5 ± 22.2	68.0 ± 19.2
模型对照	—	190.8 ± 75.7 [△]	161.2 ± 101.0 [△]	113.8 ± 46.7 [△]
贝健胶囊	90	119.1 ± 84.4	80.6 ± 45.9	67.2 ± 31.4 [*]
	180	34.0 ± 18.3 ^{***}	23.9 ± 12.8 ^{**}	0.0 ± 0.0 ^{***}
	360	0.0 ± 0.0 ^{***}	0.0 ± 0.0 ^{**}	0.0 ± 0.0 ^{***}
氟哌啶醇	0.9	29.0 ± 18.3 ^{***}	23.0 ± 20.3 ^{***}	21.3 ± 17.6 ^{***}

与正常对照组比较: [△] $P < 0.05$; 与模型对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

表 3 贝健胶囊对模型小鼠行为评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	不同时间的行为评分		
		0~5 min	5~10 min	10~15 min
正常对照	—	2.0 ± 2.1	1.50 ± 2.1	1.0 ± 1.8
模型对照	—	4.0 ± 1.9 [△]	3.5 ± 1.4 [△]	3.0 ± 1.8 [△]
贝健胶囊	90	3.0 ± 1.8	2.5 ± 2.1	3.0 ± 1.8
	180	1.0 ± 1.8 ^{**}	0.5 ± 1.4 ^{***}	0.5 ± 1.4 ^{**}
	360	0.0 ± 0.0 ^{**}	0.0 ± 0.0 ^{***}	0.0 ± 0.0 ^{***}
氟哌啶醇	0.9	1.0 ± 1.0 ^{**}	1.0 ± 0.8 ^{***}	0.5 ± 1.0 ^{***}

与正常对照组比较: [△] $P < 0.05$; 与模型对照组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

3.3 贝健胶囊对小鼠脑组织中多巴胺量的影响

高效液相色谱法测定结果表明, 咖啡因使模型小鼠脑组织中 DA 的量显著升高, 与正常对照组比较有显著差异 ($P < 0.05$), 说明咖啡因提高小鼠脑内 DA 的量; 贝健胶囊高剂量组与模型对照组比较可明显降低模型小鼠脑组织中 DA 的量 ($P < 0.05$), 表明贝健胶囊具有抑制 TD 小鼠脑内 DA 量升高的作用。结果见表 4。

表 4 贝健胶囊对模型小鼠脑组织中 DA 的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	DA/(μg·g ⁻¹)
正常对照	—	20.2 ± 6.0
模型对照	—	30.3 ± 1.2 [△]
贝健胶囊	90	24.4 ± 2.3
	180	21.0 ± 7.8
	360	9.8 ± 6.4 [*]
氟哌啶醇	0.9	7.8 ± 2.2 ^{**}

与正常对照组比较: [△] $P < 0.05$

与模型对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

4 讨论

近年来研究发现多种中枢神经递质异常在 TD 发病过程中起着重要作用。涂人顺等^[2]认为, TD 是由于 DA 功能异常所致, TD 患者存在中枢神经递质失衡, 病理部位在基底节纹状体 DA 能系统的靶细胞膜受体, 由于神经突触 DA 活动过度或 DA 受体超敏感所致。

已报道的 TD 动物模型主要有以下几种: 与多巴胺能(多巴胺)失调相关的苯丙胺诱导模型、阿朴吗啡(APO)诱导模型, 与 5-羟色胺(5-HT)失调相关的 DOI 诱导模型, 以及自身免疫模型、特定的神经回路发育缺陷动物模型、感觉运动门控缺失动物模型等^[3]。这些模型均通过不同的作用机制, 部分地模拟了临床 TD 患者的行为学和神经生化改变等。但由于 TD 的病因复杂至今还不很清楚, 所以目前尚不能复制出一种动物模型能够完全表现严格意义上的人类抽动障碍。

咖啡因是最常用的神经兴奋药, 同时又是许多食品的主要添加剂。有研究表明咖啡因的摄入与儿童 TD 症状的出现呈正相关^[8]。Chen 等^[9]在强黑质

毒素诱导的小鼠帕金森病模型中观察到, ip 低剂量咖啡因(5~10 mg/kg)的小鼠纹状体中多巴胺水平显著升高。同时, 咖啡因口服吸收快而完全、利用度较高, 且脂溶性高、易透过血脑屏障。所以本实验采用 ig 给予咖啡因的方式诱导小鼠 TD 模型。结果表明, ig 给予咖啡因 90 mg/kg 后, 小鼠自主活动次数增加, 并出现特殊的攀爬行为, TD 模型诱导成功。

本实验采用自主行为实验和攀爬实验, 观察贝健胶囊对咖啡因诱导的小鼠 TD 模型的治疗作用。结果表明, 贝健胶囊可对抗咖啡因的作用, 能明显抑制咖啡因引起的小鼠自主活动增强和小鼠攀爬行为增强; 采用高效液相色谱-荧光检测法测定小鼠脑组织中单胺类神经递质 DA 的量, 结果表明贝健胶囊可降低脑内 DA 的量。

综上, 笔者认为贝健胶囊可有效治疗 TD, 其作用可能与抑制脑内神经递质 DA 的分泌有关, 但其确切的机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 郑灵巧. 我国有数千万儿童心理不健康[N]. 健康报, 2005-10-12 (2).
- [2] 涂人顺, 张国玺, 孙斌辉. 关于小鼠自主活动规律的研究[J]. 中国药理学通报, 2002, 18 (4): 464-465.
- [3] 魏凤环, 罗佳波, 余林中, 等. 麻黄汤及其拆方组对小鼠自主活动的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17 (6): 988-989.
- [4] 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.
- [5] 鲁燕侠, 崔 佳, 蔺兴遥, 等. RP-HPLC-荧光检测法测定小鼠脑组织中 5 种神经递质的含量[J]. 解放军药科学学报, 2003, 19 (4): 262-268.
- [6] 郑春梅, 张惠云. 大鼠血清中单胺递质的高效液相色谱-荧光检测法分析[J]. 药物分析杂志, 2006, 26 (2): 215-217.
- [7] 熊元君, 郝万鹏, 贾晓光, 等. 新疆大叶金丝桃抗抑郁作用研究[J]. 中成药, 2006, 28 (1): 138-140.
- [8] Davis R E, Osorio I. Childhood caffeine tic syndrome [J]. Pediatrics, 1998, 101 (E4): 1-2.
- [9] Chen J F, Xu K, Petzer J P, et al. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease [J]. J Neurosci, 2001, 21 (RC143): 1-6.

(收稿日期 2010-06-02)