

养血祛风方对抽动障碍大鼠纹状体神经元超微结构的作用研究

魏丽娜¹, 吴力群², 陈海鹏¹

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 北京中医药大学东方医院 儿科, 北京 100078

摘要: **目的** 探讨养血祛风方对抽动障碍(TD)大鼠纹状体神经元超微结构的影响。**方法** 采用ig亚氨基二丙腈(IDPN)制备TD大鼠模型,造模成功后将大鼠随机分为模型组,养血祛风方高、中、低剂量(11.75、23.50、35.25 g/kg)组,硫必利(阳性药)组,同时设立对照组,连续给药8周。于给药第1、4、8周进行刻板运动评分;末次给药24 h后,大鼠开颅取纹状体,多聚甲醛固定后切片、染色,通过透射电镜观察纹状体腹侧部超微结构。**结果** 与模型组比较,低、中、高剂量养血祛风方和硫必利均对大鼠刻板运动评分发挥显著改善作用($P < 0.05$);养血祛风方高剂量组和硫必利组大鼠纹状体中的神经元细胞、线粒体、轴突、树突及微血管结构与模型组比较,具有显著差异。**结论** 养血祛风方对TD模型大鼠脑细胞有保护和修复作用。

关键词: 养血祛风方; 抽动障碍; 透射电镜; 纹状体; 超微结构

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2016)06-0958-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.008

Effect of Blood-nourishing and Wind-expelling Formulae on ultrastructure of striatal neurons in tic disorder rats

WEI Li-na, WU Li-qun, CHEN Hai-peng

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, china

2. Department of paediatrics, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, china

Abstract: **Objective** To explore the effect of Blood-nourishing and Wind-expelling Formulae (BWF) on ultrastructure of striatal neurons in tic disorder (TD) rats. **Methods** TD model was induced by ig injection of iminodipropionitrile (IDPN), then TD rats were divided into model group; BWF low, medium, and high dose (11.75, 23.50 and 35.25 g/kg) groups; and tiapride (positive drug) group by random and meanwhile establish control group. Then the rats were treated for 8 weeks and the stereotyped movement scores were recorded in the first, fourth and eighth week. Operate rats craniotomy for their striatum 24 h after treatment, and then fix, slice, and stain striatum, observe the ultrastructure by transmission electron microscope. **Results** Compared with model group, low, medium, and high dose of BWF and tiapride significantly improved stereotyped movement scores of rats ($P < 0.05$). TD rats striatum of high dose BWF and tiapride in neuronal cells, mitochondria, axons, dendrites, and microvasculature were significantly different compared with model group. **Conclusion** BWF plays a role of protection and repairing in TD rats brain cells, which should be paid great attention in the treatment of TD therapy.

Key words: Blood-Nourishing and Wind-Expel Formulae; tic disorders; transmission electron microscope; striatum; ultrastructure

抽动障碍(tic disorders, TD)主要以不自主的、反复的运动肌群抽动,伴或不伴喉间发声为主要表现。TD的成因至今仍不能明确,普遍认为引起TD的原因为遗传因素和环境因素的共同作用。研究发

现,采用弥散张量成像(DTI)技术研究儿童TD患者,其左侧苍白球和双侧丘脑分量各向异性参数(FA)值降低;双侧尾状核、双侧壳核和双侧丘脑的表观弥散系数(ADC)值增高,提示TD患者的

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7122096)

作者简介:魏丽娜(1988—),博士,研究方向为中医药治疗儿科疾病。E-mail: 18088005823@163.com

陈海鹏(1988—),博士,研究方向为中医药治疗儿科疾病。E-mail: chenhaipenggood@foxmail.com

*通信作者 吴力群(1965—),博士,主任医师,教授,研究方向为中医药治疗儿科疾病。E-mail: wulq1211@163.com

基底节和丘脑存在着微小结构的异常^[1]。治疗上,西医主要以氟哌啶醇、利培酮、硫必利等经典药物为主要选择^[2],其中又以硫必利应用最为广泛,但其服药过程中仍有嗜睡、体质量增加、乏力等不良表现^[3-4]。因此如何研发高效低毒的药物防治 TD,成为科研人员及临床工作者的一项重要任务。前期研究表明,养血祛风方药通过降低纹状体内多巴胺水平,抑制多巴胺神经元的过度活动,达到止抽的作用^[5]。但是对于纹状体超微结构的影响尚不明确。本研究旨在初探养血祛风方对 TD 大鼠纹状体超微结构的影响,进一步探讨养血祛风方治疗 TD 作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 82 只,3 周龄,体质量(60±5)g,购自北京维通利华实验动物有限公司,许可证号 SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物及主要试剂

盐酸硫必利片(江苏天士力帝益药业有限公司,批号 20130211);养血祛风方(生地黄 12 g、白芍 12 g、当归 10 g、川芎 6 g、全蝎 5 g、蜈蚣 2 g),高、中、低剂量组分别按 5.875、3.917、1.958 g 药材/mL 制备成中药浸膏,由北京中医药大学第二临床医学院药剂室及制剂室共同提供。

水合氯醛、多聚甲醛、PBS 缓冲液、戊二醛、锇酸、乙醇、环氧树脂 618、环氧丙烷、亚氨基二丙腈(IDPN),均购自北京百诺威生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

LKBV 型超薄切片机(德国 LeitzL 公司);EM 1230 型透射电镜(日本 JEOL 公司)。

2 方法

2.1 造模

动物适应性喂养 5 d 后,根据体质量随机分出 14 只大鼠作为对照组,参照神经毒全身用药法,将余下的 68 只大鼠 ig IDPN 200 mg/kg 造模,浓度 15 mg/mL,每天 1 次,连续 7 d。造模后,采用刻板运动进行行为学评价,0 分,无刻板运动;1 分,躯体旋转行为;2 分,头和颈部的上下运动过多;3 分,头向侧摆合并头和颈部的上下运动过多。将得分分为低、中、高 3 等级,剔除 0 分大鼠,采用数字表随机方法将 3 个等级的大鼠分为 5 组,每组 13 只。

2.2 干预方法

对照组、模型组:每日 ig 给予生理盐水(体积等同于中药中剂量组);养血祛风方低、中、高剂量组:每日分别 ig 11.75、23.50、35.25 g/kg(以生药计)养血祛风方,相当于儿童临床用药的 5、10、15 倍;硫必利组:每日 ig 硫必利(0.06 g/kg,以生理盐水配成混悬液),各组均连续 ig 8 周。分别于给药第 1、4、8 周进行刻板运动评分,具体方法同“2.1”项。

2.3 标本制备

末次给药 24 h 后,对照组、模型组、养血祛风方高剂量组、硫必利组分别取 3 只大鼠,10%水合氯醛(350 mg/kg)ip 麻醉,开胸充分暴露心脏,从左心室插入灌注针头至升主动脉,用止血钳固定,剪开右心耳,室温下将生理盐水 200 mL 快速灌注以冲洗血液,待流出液体清亮后再用 4%多聚甲醛(以 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PBS 配制)300 mL 灌注,先快后慢,持续约 30 min,断头取脑,取出两侧纹状体,修块,将组织块固定于 2%戊二醛 PBS 固定液中。

2%戊二醛 PBS 前固定, PBS 缓冲液漂洗,1%锇酸 PBS 固定液后固定, PBS 缓冲液漂洗,30%-50%-70%-80%-95%-100%-100%乙醇逐级脱水,环氧树脂 618 包埋液与环氧丙烷 1:1 浸透, LKBV 型超薄切片机切片,染色,透射电镜观察超微结构。

2.4 数据采集与统计学分析

使用机器进行图像采集,采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,两组比较,符合正态分布用 *t* 检验,不符合正态分布用非参数检验;多组比较,符合正态分布且方差齐用方差分析,不符合正态分布或方差不齐用 *H* 检验,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 各组大鼠刻板运动比较

与模型组比较,第 1 周各组之间刻板运动无明显差异,第 4 周养血祛风方中、高剂量组与模型组比较差异显著($P<0.05$),第 8 周各给药组均与模型组比较差异显著($P<0.05$)。见表 1。

3.2 透射电镜结果

结果如图 1 所示,对照组透射电镜下可见纹状体神经元胞浆丰富,线粒体结构正常,细胞核核膜完整、核染色质分布均匀,核仁清晰可见,神经髓鞘纤维排列整齐,髓鞘结构正常,微血管结构正常。

表 1 各组大鼠不同时间点刻板运动评分比较
Table 1 Comparison on rigid motion score of rats in each group at different time

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	刻板运动评分/分		
		第 1 周	第 4 周	第 8 周
模型	—	3.14±0.28	2.96±0.67	2.67±0.52
养血祛风方	11.75	3.10±0.23	2.78±0.48	1.75±0.67 [#]
	23.50	3.14±0.28	1.89±0.89 [#]	1.78±0.98 [#]
	35.25	2.60±0.92	1.67±0.83 [#]	1.19±0.50 [#]
硫必利	0.06	3.00±0.46	2.57±1.34	1.03±0.63 [#]

与模型组比较: [#]*P*<0.05

[#]*P* < 0.05 vs control group

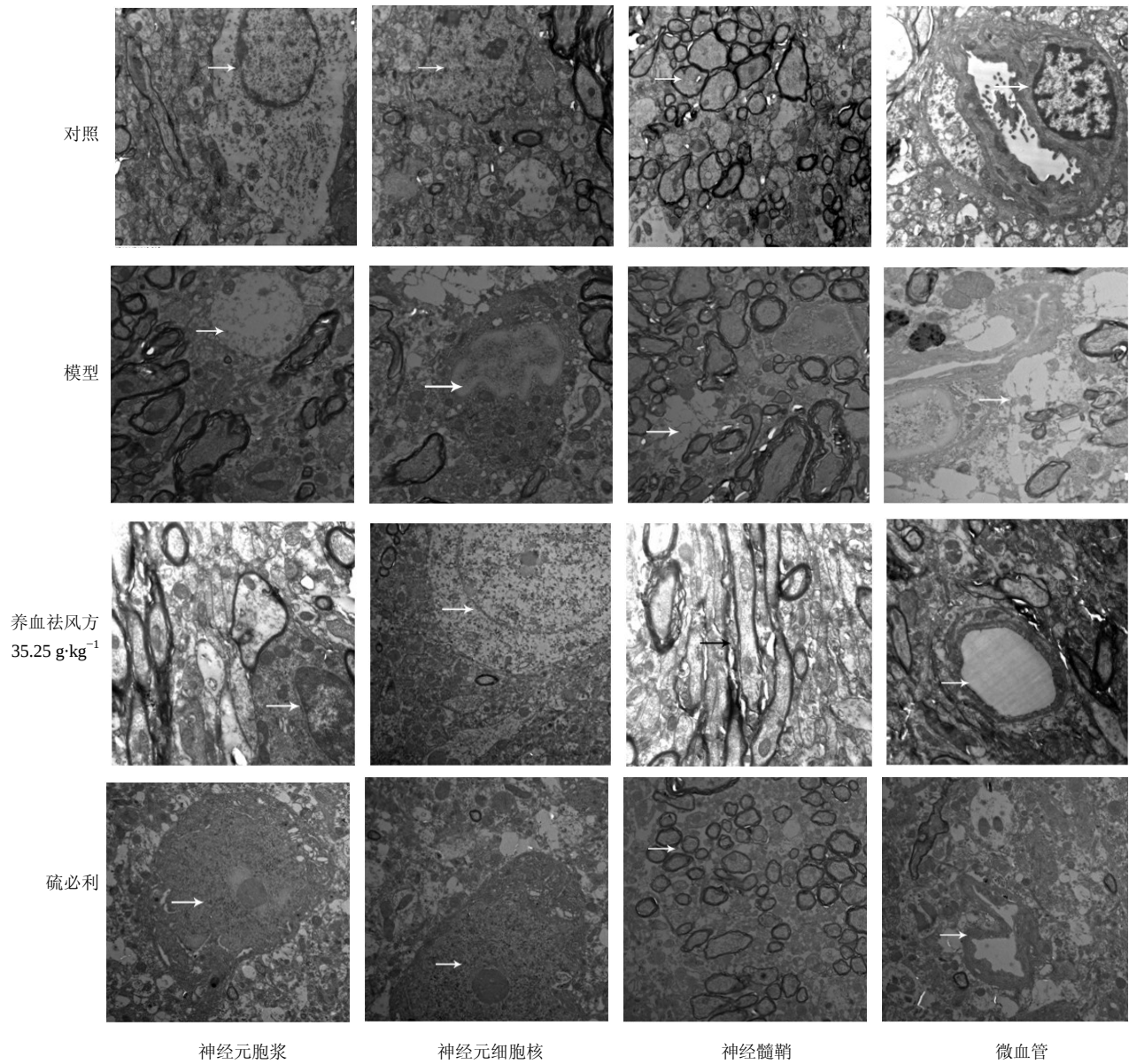


图 1 大鼠大脑纹状体腹侧部超微结构图像
Fig. 1 Ultrastructure of ventral striatum in rats

模型组神经元胞浆内细胞器不清晰,线粒体浓缩、嵴消失;细胞核肿胀,核染色质浅淡;神经无髓鞘纤维肿胀呈水肿状态,排列紊乱,有髓鞘纤维肿胀,髓鞘分层;微血管外胶质细胞肿胀,突轴呈水肿状态。养血祛风方高剂量组,神经元胞浆丰富,线粒体结构正常;细胞核核膜完整;神经髓鞘纤维排列整齐,髓鞘结构正常;微血管结构正常,基底膜完整。硫必利组神经元胞浆丰富,线粒体结构正常;细胞核核膜完整、核染色质分布均匀,核仁清晰可见;神经髓鞘纤维排列整齐,髓鞘结构正常;微血管结构正常,基底膜完整。结果见图1。

4 讨论

TD属于中医“癰疽”“慢惊风”和“肝风”的范畴。中医认为“治风先治血,血行风自灭”,养血祛风方为胡天成教授结合多年临床经验,以四物汤合止痉散“从血论治”来治疗小儿慢性TD和多发性抽动症的经验方^[6]。方中药物组成:当归、川芎、熟地、白芍、全蝎、蜈蚣,共奏养血活血,熄风止痉之功。现代研究亦表明白芍总苷对小鼠的空间识别障碍和学习记忆获得不良有改善作用,当归可以改善因脑缺血引起的空间认知障碍^[7]。

TD的神经病理基础多认为是多巴胺通道平衡失调导致了边缘系统抑制障碍,影像学显示部分患儿脑区存在一定程度的器质损害。神经元作为构成神经系统结构和功能的基本单位,其结构和功能的完整性是神经递质释放和调节的基础。目前对于TD治疗的研究多从神经递质及受体方面进行,而对于神经递质关系密切的神经元组织病理学变化的研究较少。

本研究表明,在行为学方面,ig亚氨基二丙脒的大鼠会呈现不同程度的行为学障碍,经治疗后其行为障碍得到不同程度的改善,其中养血祛风方中、高剂量组对其改善的时间点较其他两组提前。在超微结构层面,经养血祛风方干预的大鼠神经元结构比较完好,与对照组、硫必利组无明显差异,神经元胞浆丰富线粒体结构正常,细胞核核膜完整,神经髓鞘纤维排列整齐,髓鞘结构正常,微血管结构正常,基底膜完整。而模型组神经元细胞结构破

坏明显,线粒体固缩、线粒体嵴消失,轴突、树突排列紊乱,呈水肿状态,直接导致了神经信号传导障碍,致使学习、记忆能力下降。而线粒体作为细胞的“能源工厂”,其在神经元细胞中不仅是产能的场所,更在神经突生长、突触形成等过程中发挥了重要的作用^[8]。因此线粒体的损伤不仅是TD导致的病理结果更是其进一步加重的原因。本研究表明,养血祛风方可以明显修复及保护线粒体的结构完整性,这也可能是其对大鼠行为学改善的一个作用机制。

TD的病因复杂而多样,应当从多方位、多靶点对本病进行研究。此次研究从神经元的超微结构层面对养血祛风方的治疗机制进行研究,表明养血祛风方对纹状体神经元具有保护和修复的作用。期待有更多的研究为本病的临床治疗提供指导性的依据。

参考文献

- [1] 李秀丽,孙锦华,李飞.弥散张量成像技术研究抽动秽语综合征患儿[J].四川大学学报:医学版,2010,4(2):284-287.
- [2] Teng M M, Wei C J, Wei L C, et al. Kyphosis correction and height restoration effects of percutaneous vertebroplasty [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2003, 24(9): 1893-1900.
- [3] 李发明.硫必利治疗抽动秽语综合征临床疗效和安全性[J].吉林医学,2013,34(3):465.
- [4] 杨彦林.喹硫平与氟哌啶醇治疗儿童抽动障碍对照研究[J].临床身心疾病杂志,2011,17(6):494-496.
- [5] 戴志国,崔雅璠,霍婧伟,等.养血祛风法对慢性抽动障碍鼠行为改善和单胺类神经递质的影响[J].四川中医,2012,30(1):22-24.
- [6] 吴力群,徐正莉,王素梅,等.胡天成教授从血论治多发性抽动症经验[J].四川中医,2012,28(1):11-12.
- [7] 朱振铎,霍青,薛一涛,等.疏肝解郁滋肾养心法治老年性痴呆34例临床研究[J].山东中医药大学学报,1998,22(5):348.
- [8] Mattson M P, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorder [J]. *Neuron*, 2008, 60(5): 748-766.