熄风静宁颗粒对多发性抽动症大鼠HPA轴及纹状体单胺类神经递质的影响

于敬龙，王俊宏*，周义山，李　燕，任昕昕，穆　俊，彰　金，张文想
北京中医药大学东直门医院，北京 100700

摘　要：目的 探讨熄风静宁颗粒（XFJNG）对多发性抽动症（TS）模型大鼠HPA轴及纹状体单胺类神经递质的影响。**方法** 采用连续7 d ip亚氨基二丙腈（IDPN，150 mg/kg）建立TS大鼠模型，造模成功后将大鼠随机分为模型组、氟哌啶醇（0.5 mg/kg）组、XFJNG（6 mg/kg，临床等效剂量）组，同时设立对照组，每组10只，连续给药4周。于给药第0、1、2、3、4周进行刻板运动评分；末次给药后24 h杀鼠取材，试剂盒法检测各组大鼠纹状体内多巴胺（DA）、去甲肾上腺素（NE）、5-羟色胺（5-HT）含量，下丘脑及血清促肾上腺皮质素释放激素（CRH）含量，血清促肾上腺皮质激素（ACTH）、皮质醇（CORT）含量；取肾上腺组织，进行HE染色，光学显微镜下观察大鼠肾上腺组织形态。**结果** 与模型组比较，给药4周后，氟哌啶醇和XFJNG组大鼠刻板运动评分均显著降低，纹状体DA、NE、5-HT的水平均显著升高，血清及下丘脑CRH水平均显著降低，血清ACTH及CORT水平均显著降低，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。与对照组比较，模型组大鼠肾上腺细胞体积较小，染色深，细胞质占比较大，空泡明显减少；氟哌啶醇、XFJNG组大鼠肾上腺细胞质染色相对模型组较浅，空泡数量增多。**结论** 熄风静宁颗粒可能通过抑制大鼠纹状体DA系统失衡及HPA轴功能亢进来改善大鼠TS症状。

关键词：熄风静宁颗粒；抽动-秽语综合征；下丘脑-垂体-肾上腺轴；纹状体；单胺类神经递质
中图分类号：R965　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674-6376（2018）11-1970-06
DOI：10.7501/j.issn.1674-6376.2018.11.007

Effect of Xifeng Jingning Granule on HPA axis and striatum monoamine neurotransmitters in Tourette syndrome rats

YU Jinglong, WANG Junhong, ZHOU Yishan, LI Yan, REN Xinxin, MU Jun, ZHANG Jin, ZHANG Wenxiang
Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China

Abstract: Objective To explore the effect of Xifeng Jingning Granule (XFJNG) on the HPA Axis and striatum monoamine neurotransmitters in tics Tourette syndrome (TS) rats.**Methods** TS model was induced by ig injection of iminodipropionitrile (IDPN, 150 mg/kg), then TS rats were randomly divided into model group, Haloperidol group (0.5 mg/kg), XFJNG group (6 mg/kg) and meanwhile establish control group, each group was 10 cases. Then the rats were treated for 4 weeks and the stereotyped movement scores were recorded in the 0, 1th, 2th, 3th, 4th week. The striatum levels of DA, NE, 5-HT, the hypothalamus and serum levels of CRH, the serum levels of ACTH and CORT were measured by kits. The adrenal gland tissues were stained with HE and the morphology of adrenal glands was observed under light microscope. **Results** Compared with the model group, the stereotyped movement scores of the rats in the medicine group and traditional medicine group were significantly decreased, the striatum levels of DA, NE, 5-HT, the hypothalamus and serum levels of CRH, the serum levels of ACTH and CORT in the medicine group and traditional medicine group were significantly decreased, all above had statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the control group, the adrenal cells in the model group were smaller, stained deeply, the proportion of cytoplasm was larger, and the number of vacuoles was significantly reduced. In the haloperidol group and XFJNG group, the adrenal gland cytoplasm staining was relatively shallow and the number of vacuoles increased. **Conclusion** XFJNG could improve TS by inhibiting DA system imbalance and HPA

收稿日期：2018-04-04
基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金项目（20120013120011）
第一作者：于敬龙（1993－），男，北京市，硕士研究生，研究方向为儿科神经精神类疾病。
***通信作者：**王俊宏（1964－），女，北京市，博士研究生，研究方向为儿科神经精神类疾病方面的研究。Tel：15611523067
E-mail：zdy4931@163.com

axis hyperfunction.

Key words: Xifeng Jingning Granule; Tourette syndrome; HPA axis; striatum; monoamine neurotransmitters

多发性抽动症，又称抽动-秽语综合征（Tourette syndrome，TS），是一种慢性精神障碍性疾病，以头面部、肢体或躯干的多发性肌肉抽动和（或）发声性抽动为主要特征，好发于儿童时期[1]。目前该病的发病机制尚未完全明确，普遍认为是由遗传因素和环境因素的共同作用引起的。中药复方熄风静宁汤是我国中医儿科专家刘弼臣教授的经验用方，临床实践已经证实该复方可明显减轻TS的抽动症状，具有疗效显著、副作用少的优势[2]。本研究通过观察不同干预措施对TS障碍大鼠纹状体多巴胺（DA）、5-羟色胺（5-HT）、去甲肾上腺素（NE）与下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴相关激素水平的影响，探索熄风静宁颗粒（Xifeng Jingning Granule，XFJNG）治疗抽动障碍的作用机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级健康SD雄性大鼠40只，4周龄，体质量（80±10）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号SYXK（京）2012-0036，实验动物生产合格证号No：11400700215964。动物均在清洁级动物房饲养，室温20～25 ℃，相对湿度40%～60%。饲料由动物实验中心提供，为灭菌颗粒饲料；放置装有清洁自来水的饮水瓶供大鼠自由饮用，饮水瓶每日更换；明暗环境各12 h交替。实验中对动物的处置符合医学伦理学标准。

1.2 药物和主要试剂

XFJNG，由北京康仁堂药业有限公司提供，生产批号15020671，原方由元参10 g、板蓝根10 g、木瓜10 g、清半夏10 g、伸筋草20 g、钩藤15 g、菊花15 g、白芍15 g、全蝎3 g、珍珠母30 g、酸枣仁30 g、炙甘草10 g组成。制备成颗粒剂后质控标准如下：1 g元参颗粒中含哈巴苷和哈巴俄苷总量约1.8 mg；板蓝根、木瓜颗粒浸出物不得少于22%；1 g菊花颗粒含绿原酸不得少于2.0 mg，含木犀草不得少于0.8 mg；1 g白芍颗粒含白芍苷不得少于30 mg；全蝎颗粒浸出物不得少于9%；钩藤颗粒浸出物不得少于13%；1 g酸枣仁颗粒含斯皮诺素不得少于1.5 mg；1 g炙甘草颗粒含甘草苷不得少于5.0 mg，含甘草酸不得少于20.0 mg，等。

氟哌啶醇（2 mg/片，生产批号131003），购自宁波大红鹰药业股份有限公司；亚氨基二丙腈（IDPN，生产批号317306），购自美国Sigma公司；DA酶联免疫检测试剂盒、NE酶联免疫检测试剂盒，均购自武汉优尔生商贸有限公司；5-HT放免检测试剂盒、促肾上腺皮质素释放激素（CRH）放免检测试剂盒、促肾上腺皮质激素（ACTH）、皮质醇（CORT）放免检测试剂盒，均购自北京华英生物研究所。

1.3 主要仪器

LXJ-IIB型低速大容量多管离心机，上海安亭科学仪器有限公司；MULTISKAN-MK3型全自动多功能酶标仪，美国Thermo公司；XH-6020全自动放免计数仪，西安核仪器厂。

2 方法

2.1 动物分组、造模、给药及取材

将40只SD大鼠随机分为4组：对照组、模型组、氟哌啶醇组、XFJNG组，每组10只。除对照组外，其余组别均采用ip 150 mg/kg IDPN建立大鼠TS模型，1次/d，连续7 d。造模完第2天，造模组大鼠均出现不同程度的刻板行为，评分均≥2分[3]，表明造模成功。对照组ip给予等量生理盐水，每天1次，连续7 d。

造模成功后开始进行药物干预，XFJNG组大鼠ig给予6 mg/kg（临床等效剂量）XFJNG；氟哌啶醇组ig给予0.5 mg/kg氟哌啶醇；模型组与对照组均ig给予等量生理盐水；每天1次，连续4周。

末次给药24 h后，ip 5%的水合氯醛（0.6 mL/100 g）进行麻醉，待大鼠麻醉昏迷后，腹主动脉取血，置于软管中，室温下静置1 h，3 000 r/min离心15 min，取血清，于－80 ℃保存；断头取脑，冰盒上快速剥离大鼠纹状体、下丘脑，置于2 mL冻存管中于液氮中速冻；剖取大鼠肾上腺置于4%的福尔马林中。

2.2 刻板行为检测

造模后每周由两名实验人员定期按照参考文献标准进行刻板行为评分，具体评分标准见表1[3]。分别记录两名实验人员评分结果并计算平均数，即为最终评分。

2.3 指标检测

分别检测各组大鼠纹状体内DA、NE、5-HT含量，下丘脑及血清CRH含量，血清ACTH、CORT含量，均严格按照试剂盒说明书操作。

取肾上腺组织，进行HE染色，光学显微镜下观察大鼠肾上腺组织形态。

表1 刻板行为测试评分标准

Table 1 Scoring standard for stereotypic behavior test

评分	评分标准
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

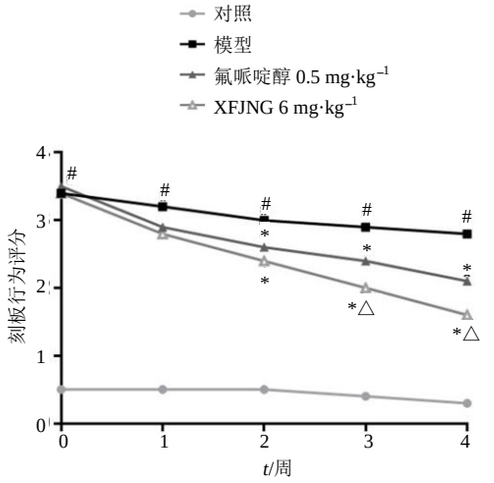
2.4 统计学方法

应用SPSS 22.0统计软件进行统计学处理，实验数据均以$\bar{x} \pm s$表示，组间比较采用单因素方差分析和t检验。

3 结果

3.1 刻板行为学评分

造模后，模型、氟哌啶醇、XFJNG组大鼠刻板行为评分均显著高于对照组，差异均具有统计学意义（$P<0.05$），表明大鼠ip IDPN造模后均出现刻板特征行为。给药2、3、4周后，氟哌啶醇、XFJNG组大鼠刻板评分均显著低于模型组（$P<0.05$），表明经XFJNG或氟哌啶醇干预2周后，大鼠刻板行为开始得到显著改善。给药3周、4周后，XFJNG组大鼠刻板评分均显著低于氟哌啶醇组（$P<0.05$），表明中药复方XFJNG的治疗效果显著优于西药氟哌啶醇，结果见图1。



与对照组比较：#$P<0.05$；与模型组比较：*$P<0.05$；与氟哌啶醇组比较：△$P<0.05$

#$P < 0.05$ *vs* control group；*$P < 0.05$ *vs* model group；△$P < 0.05$ *vs* haloperidol group

图1 大鼠刻板行为评分（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Fig. 1 Scores of stereotypic behavior test（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

3.2 XFJNG对TS大鼠纹状体单胺类神经递质水平的影响

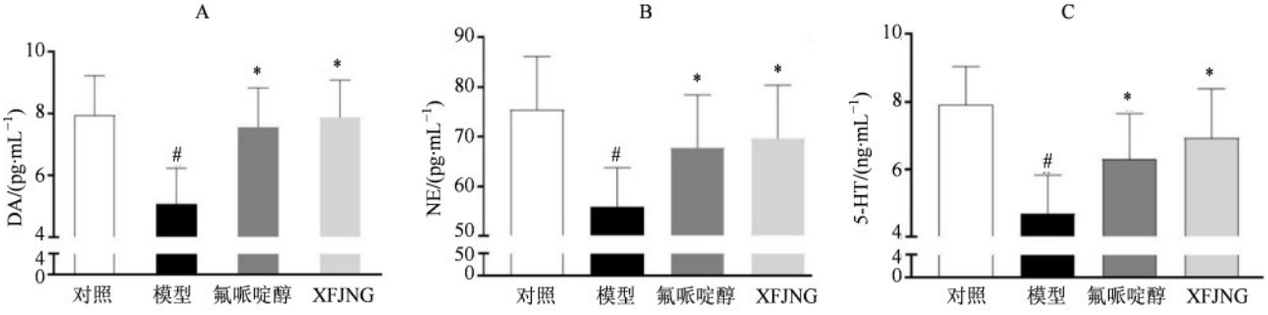
与对照组比较，模型组大鼠纹状体DA、NE、5-HT的水平均显著降低，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，XFJNG和氟哌啶醇组大鼠给药4周后，纹状体DA、NE、5-HT的水平均显著升高，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）；XFJNG组与氟哌啶醇组大鼠纹状体DA、NE、5-HT的水平比较，差异均无统计学意义，见图2。

3.3 XFJNG对TS大鼠下丘脑及血清CRH水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清及下丘脑CRH水平均显著升高，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，XFJNG与氟哌啶醇组大鼠血清及下丘脑CRH水平均显著降低，差异均具有统计学意义（$P<0.05$），见图3。

3.4 XFJNG对TS大鼠血清ACTH、CORT水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清ACTH、CORT水平均显著升高，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；

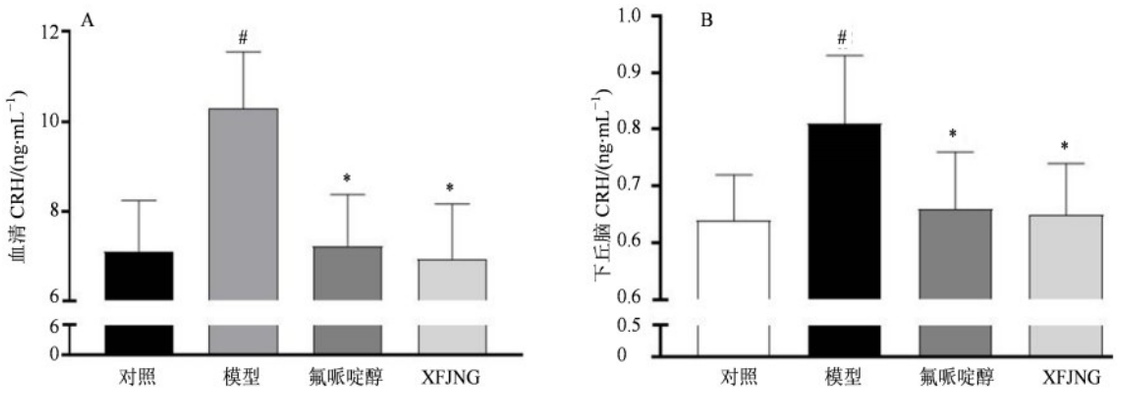


与对照组比较：#$P<0.05$；与模型组比较：*$P<0.05$

#$P < 0.05$ *vs* control group；*$P < 0.05$ *vs* model group

图2 大鼠纹状体单胺类神经递质含量（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Fig. 2 Content of monoamine neurotransmitters in rat striatum（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）



与对照组比较：#P＜0.05；与模型组比较：*P＜0.05

#P < 0.05 *vs* control group；*P < 0.05 *vs* model group

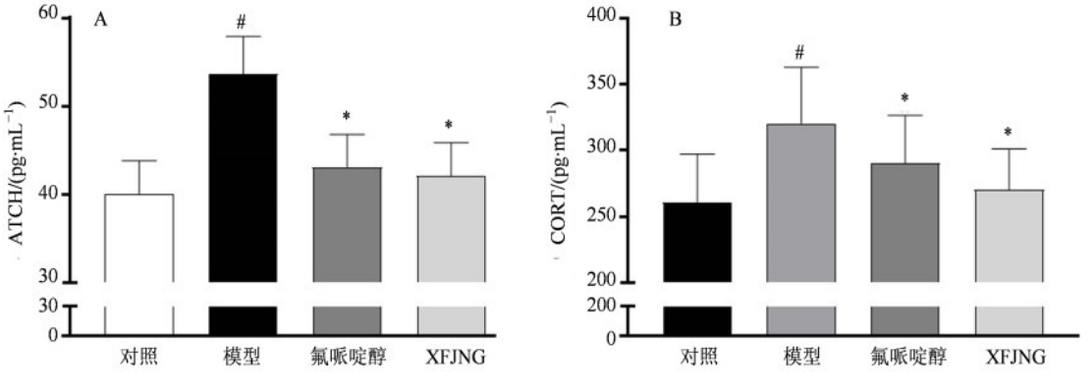
图3 大鼠下丘脑及血清CRH水平（$\bar{x}\pm s$，n = 10）

Fig. 3 Hypothalamus and serum levels of CRH in rats（$\bar{x}\pm s$，n = 10）

与模型组比较，XFJNG与氟哌啶醇组大鼠血清ACTH、CORT水平均显著降低，差异均具有统计学意义（P<0.05），见图4。

3.5 XFJNG对TS大鼠肾上腺组织病理形态的影响

如图5所示，对照组大鼠肾上腺细胞排列成束呈放射状伸向髓质，束宽度为1~2个细胞；细胞大，多边形，常有双核，核圆形，染色淡，有1~2个核仁；胞质内常见丰富的大脂滴，细胞内呈现许多明亮的空泡。模型组大鼠肾上腺细胞体积较小，染色深，细胞质占比较大，空泡较对照组明显减少；氟哌啶醇与XFJNG组大鼠肾上腺细胞质染色相对模型组

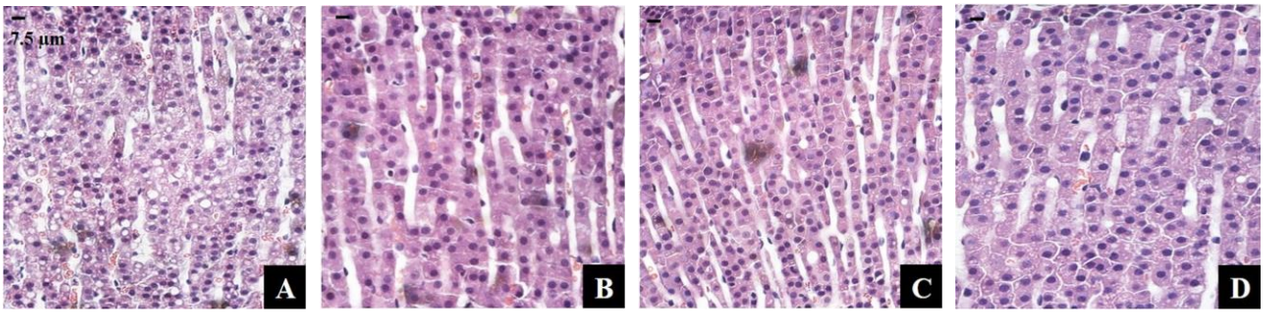


与对照组比较：#P＜0.05；与模型组比较：*P＜0.05

#P < 0.05 *vs* control group；*P < 0.05 *vs* model group

图4 大鼠血清ACTH及CORT水平（$\bar{x}\pm s$，n = 10）

Fig. 4 Serum levels of ACTH and CORT in rats（$\bar{x}\pm s$，n = 10）



对照　　模型　　氟哌啶醇0.5 mg·kg⁻¹　　XFJNG 6 mg·kg⁻¹

图5 大鼠肾上腺光镜图（HE×400）

Fig. 5 Light microscope picture of rat paranephros（HE×400）

较浅，空泡数量相对模型组增多。结果提示，经XFJNG或氟哌啶醇干预4周后可显著改善TS大鼠的病理状态。

4 讨论

TS是临床中较常见的抽动障碍类型之一，是儿童神经发育时期出现的一种特定形式的重复、刻板、不自主的动作，这些症状可能会持续到其成年期，严重者会对社会交往或职业造成不良影响[4]。TS属于中医“瘛疭”“慢惊风”和“肝风”的范畴，中医认为肝风上亢是TS的病理特征，因风善行而数变，故导致症状的反复与多发。刘弼臣认为，本病起源于肝，病发于肺，系风痰鼓动，上扰清窍，横窜经隧，由外风引动内风，风为阳邪，经久不去，形成阳亢有余、阴静不足、动静变化、平衡失制所致[5]。风邪善行数变，因而临床中TS症状经常反复发生，变化不一；头为诸阳之会，风阳上亢，则见头面部位抽动症状，如眨眼、耸鼻、撇嘴、摇头等动作；风邪窜行四肢经络，则见四肢抖动摇摆不定；肝阳上亢则性格急躁易怒，情绪波动明显，因此肝风上亢证是TS障碍的发病中重要表现。XFJNG以平肝熄风，增液舒筋为治疗原则，降低了由于外感风邪或情志因素引发肝风内动的易感性，临床常用于治疗儿童TS。近年研究表明，TS发病可能与遗传因素、神经生理、生化代谢（如神经递质失衡）、心理因素、环境因素等相互作用有关，中枢神经递质失衡在TS的发病中起重要作用[6-7]。

IDPN是一种中枢神经毒素，小剂量应用可破坏锥体外系的DA系统，诱导大鼠出现头部抽动、肩部抽动等刻板行为，而且停止给药后行为症状仍持续维持，常用于诱导TS动物模型[8]。本研究以连续7 d ip IDPN的方式建立大鼠TS模型，造模后，模型组、氟哌啶醇组、XFJNG组大鼠刻板行为评分均显著高于对照组，表明造模后大鼠均出现刻板特征行为，即成功建立TS大鼠模型。氟哌啶醇是一种较强的DA D2受体拮抗剂，可以有效抑制D2受体的超敏反应，进而有效抑制TS的抽动症状，为临床治疗TS的常用药物之一，因此本研究将其作为阳性对照药物，以评价XFJNG治疗TS的效果。本研究结果显示，经中药复方XFJNG、氟哌啶醇干预4周后，XFJNG、氟哌啶醇组大鼠刻板行为评分显著低于模型组大鼠，且XFJNG组显著优于氟哌啶醇组，表明XFJNG可有效改善TS大鼠的抽动症状，且效果明显优于氟哌啶醇。

近期有研究发现，在TS患者纹状体中DA、5-HT、NE等单胺类递质异常，DA突触后受体超敏感，负反馈调节机制启动，代偿以突触前DA释放减少以维持DA系统平衡，当DA失代偿时，5-HT和NE系统参与调节平衡，此时患儿不发病或抽动症状轻微，如果持续失衡，患儿则出现明显的抽动症状[9]。本研究结果显示，模型组大鼠纹状体中DA、NE、5-HT的水平均显著低于对照组大鼠，提示TS大鼠纹状体内存在DA系统失衡。经XFJNG、氟哌啶醇干预4周后，XFJNG、氟哌啶醇组大鼠纹状体内DA、NE、5-HT的水平均显著降低，而氟哌啶醇作为DA受体拮抗剂，可阻断DA与其受体结合，进而降低NE与5-HT的水平，提示XFJNG改善TS抽动症状可能与其维持DA系统平衡有关。

已有大量研究表明，TS患者对心理压力十分敏感，恐惧、愤怒、紧张和焦虑等情绪波动时期，会出现短暂性的症状加重[10-11]。神经内分泌系统中HPA轴是机体最重要的神经内分泌系统，在免疫应答、基础代谢、应激反应等多方面机制中发挥重要的调控作用，其主要是通过调节皮质类固醇激素的分泌来调节机体中枢神经系统[12]。CRH是由下丘脑合成作用于垂体前叶合成ATCH，ACTH诱导肾上腺皮质部分CORT和皮质酮的合成。CRH的释放也可对下丘脑和垂体前叶产生负反馈，导致轴的基线活动恢复。HPA轴调节皮质类固醇激素的分泌，涉及到三个相互关联的过程：维持一个昼日节律，回应挑战或威胁的压力应激反应和通过负反馈机制恢复基础活动[13]。有研究发现，在应对急性应激反应时，TS儿童较正常儿童CORT激素显著升高，初步表明HPA轴可能在TS发病机制中发挥重要作用[14]。国内临床研究结果显示，TS儿童血清中CORT、ACTH较健康儿童均显著升高，提示TS儿童HPA轴功能亢进，可能与糖皮质激素可以增强中枢神经系统的兴奋性有关，进一步表明HPA轴功能异常与TS发病机制有关[15]。本研究结果显示，与对照组大鼠比较，模型组大鼠下丘脑及血清CRH水平与血清ACTH、CORT水平均显著升高（$P<0.05$），表明TS模型大鼠的确存在HPA轴功能亢进情况。经XFJNG干预4周后，XFJNG组大鼠下丘脑及血清CRH水平与血清ACTH、CORT水平均显著降低（$P<0.05$），XFJNG抗抽动作用可能与降低CRH、ACTH，从而抑制CORT的释放有关。

肾上腺是HPA轴系统的关键部分，为进一步证实TS大鼠HPA轴存在亢进状态，本研究观察了大鼠肾上腺的病理变化。肾上腺实质分为皮质与髓

质两部分，大鼠的肾上腺皮质自外向内可分为三个带：球状带、束状带和网状带，束状带位于球状带深面，是皮质中最厚的部分，分泌皮质酮与CORT[16]。本实验中模型组大鼠肾上腺细胞体积较小，染色深，细胞质占比较大，空泡较对照组明显减少，可能与滑面内质网丰富合成并分泌皮质酮亢进，导致胆固醇大量消耗有关。而经XFJNG干预4周后，大鼠肾上腺细胞质染色相对模型组较浅，空泡数量相对模型组增多，进一步提示XFJNG抗TS作用可能与HPA轴有关。

综上所述，中药复方XFJNG可有效改善刻板抽动运动作用，其作用机制可能与抑制TS模型中DA系统失衡及HPA轴功能亢进有关，为中药复方XFJNG治疗TS的临床应用提供了重要的实验依据。但关于XFJNG更进一步的作用靶点与分子机制仍有待深入研究。

参考文献

[1] Martino D, Ganos C, Pringsheim T M. Tourette syndrome and chronic tic disorders: the clinical spectrum beyond tics [J]. Int Rev Neurobiol, 2017, 134(5): 1461-1490.

[2] 张朝霞, 文飞球, 周克英, 等. 熄风静宁汤与小剂量氟哌啶醇治疗多发性抽动症的对照研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2008(14): 2122-2123.

[3] Diamond B I, Reyes M G, Borison R. A new animal model for Tourette syndrome [J]. Adv Neurol, 1982, 35 (2): 221-225.

[4] Albin R L. Tourette syndrome: a disorder of the social decision-making network [J]. Brain, 2018, 141(2): 332-347.

[5] 刘初生, 刘弼臣. 刘弼臣论治小儿抽动-秽语综合征临床经验 [J]. 中国中医药信息杂志, 2002(4): 73.

[6] Albin R L. Many genes involved in Tourette syndrome pathogenesis [J]. Mov Disord, 2017, 32(7): 993.

[7] Leeuw C, Goudriaan A, Smit A B, et al. Involvement of astrocyte metabolic coupling in Tourette syndrome pathogenesis [J]. Eur J Hum Genet, 2015, 23(11): 1519-1522.

[8] 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): 1274-1277, 1286.

[9] 高汉媛, 史正刚, 尚 菁, 等. 菖蒲郁金汤对TS模型大鼠行为及纹状体单胺类神经递质的影响 [J]. 西部中医药, 2017, 30(11): 28-32.

[10] Gadoth N. Tourette syndrome: Update [J]. Brain Dev, 2016, 38(2): 266.

[11] Godar S C, Bortolato M. What makes you tic? Translational approaches to study the role of stress and contextual triggers in Tourette syndrome [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2017, 76(Pt A): 123-133.

[12] Liyanarachchi K, Ross R, Debono M. Human studies on hypothalamo-pituitary- adrenal (HPA) axis [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2017, 31(5): 459-473.

[13] Corbett B A, Mendoza S P, Baym C L, et al. Examining cortisol rhythmicity and responsivity to stress in children with Tourette syndrome [J]. Psychoneuroendocrinology, 2008, 33(6): 810-820.

[14] Conelea C A, Woods D W, Brandt B C. The impact of a stress induction task on tic frequencies in youth with Tourette Syndrome [J]. Behav Res Ther, 2011, 49(8): 492-497.

[15] 崔 霞, 于文静, 张 雯, 等. 健脾止动汤对多发性抽动症儿童HPA轴功能的影响 [J]. 现代中医临床, 2016, 23 (6): 17-20.

[16] 成令忠. 现代组织学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003.