

· 实验研究 ·

托吡酯治疗 Tourette 综合征大鼠的疗效及机制研究

郭慧^{1,2}, 欧阳颖¹

(1. 四川省人民医院儿科; 2. 四川大学华西临床医学院儿科, 四川 成都 610072)

[摘要] **目的** 目前研究认为 Tourette 综合征(TS)的发病与多巴胺(DA)、兴奋性氨基酸(EAA)等神经递质障碍有关。近年报道托吡酯等抗癫痫药对此综合征有一定的疗效,但其具体的作用机制尚不十分清楚。该研究通过测定亚氨基二丙腈(IDPN)诱发的头部抽动大鼠模型脑内游离 DA 和血浆 EAA 含量的改变,探讨 TS 发病与神经递质异常之间的关系并探讨托吡酯对该模型的作用。**方法** 将 48 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为空白对照组、模型组、氟哌啶醇组(0.5 mg/kg)、托吡酯 I 组(5 mg/kg)、托吡酯 II 组(10 mg/kg)、托吡酯 III 组(20 mg/kg)。采用腹腔注射 IDPN (每日 150 mg/kg,1 次/d,连续 7 d)诱导大鼠头部抽动作为 Tourette 综合征动物模型。托吡酯或氟哌啶醇给药 35 d 后分别采用 ELISA 法和 HPLC 法测定脑组织游离 DA 和血浆 EAA 的含量。**结果** 与空白对照组相比,IDPN 诱导的头部抽动大鼠脑组织游离 DA 含量明显降低、血浆 EAA 含量明显升高($P<0.05$);与模型组相比,中、大剂量托吡酯给药 35 d 后能明显减少 IDPN 所致的大鼠头部抽动行为($P<0.05$),升高脑内游离 DA 的含量;同时大剂量托吡酯组还伴随着血浆 EAA 水平的降低($P<0.05$),作用效果与阳性对照药氟哌啶醇一致。**结论** TS 的发生可能与中枢 DA 受体超敏感和血浆 EAA 的过度作用有关。托吡酯可减轻 IDPN 诱导的大鼠抽动行为,其作用机制可能与其抑制脑内 DA 与 DA 受体的结合以及抑制血浆 EAA 的释放和分泌有关。

[中国当代儿科杂志,2008,10(4):509-512]

[关键词] 托吡酯;Tourette 综合征;多巴胺;兴奋性氨基酸;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)04-0509-04

Curative effect and possible mechanisms of topiramate in treatment of Tourette syndrome in rats

GUO Hui, OU-YANG Ying. Department of Pediatrics, People's Hospital of Sichuan Province, West China School of Clinical Medicine, Chengdu 610072, China (Ou-Yang Y, Email:118@5551an.com)

Abstract: Objective The pathogenesis of Tourette syndrome (TS) is associated with the disorders of neurotransmitters, such as dopamine (DA) and excitatory amino acids (EAA). Antiepileptic drugs such as topiramate have shown some effects on TS, but the mechanism has not been clearly identified. The objective of the research was to evaluate the relationship between the pathogenesis of TS and abnormality of neurotransmitters by determining the levels of brain free DA and plasma EAA in iminodipropionitrile (IDPN) induced head twitch response (HTR) rats, and to investigate the effects of topiramate on HTR induced by IDPN. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups: blank control, TS model, and haloperidol-(0.5 mg/kg) and topiramate-treated (5, 10 and 20 mg/kg). HTR was induced by 7-day peritoneal injections of IDPN (150 mg/kg daily) and was used as TS model. Brain free DA levels and plasma levels of EAA were measured using ELISA and high performance liquid chromatography respectively 35 days after haloperidol or topiramate administration. **Results** Brain free DA levels were significantly lower and plasma EAA levels were significantly higher in the TS model group compared with those in the blank control group ($P<0.05$). Topiramate of 10 and 20 mg/kg significantly decreased the frequency of IDPN-induced HTR and significantly increased the level of brain free DA when compared with the TS model group ($P<0.05$). Topiramate of 20 mg/kg treatment as haloperidol treatment significantly decreased plasma EAA levels compared with the TS model group ($P<0.05$). **Conclusions** The pathogenesis of TS is related to the super-sensitivity of DA receptor in the center nervous system and the over-effect of plasma EAA. Topiramate can reduce IDPN-induced HTR, probably through the inhibition of DA and DA-receptor combination in the brain and the secretion and release of plasma EAA. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (4):509-512]

Key words: Topiramate; Tourette syndrome; Dopamine; Excitatory amino acids; Rats

[收稿日期]2007-12-15;[修回日期]2008-01-24
[作者简介]郭慧,女,博士研究生,医师。主攻方向:小儿神经系统疾病。
[通讯作者]欧阳颖:女,硕士生导师,主任医师,四川省人民医院儿科,邮编:610072。

小儿 Tourette 综合征(TS),是一种儿童期起病,以慢性多发性运动性抽动和(或)发声性抽动为特征的神经精神障碍性疾病,发病率为0.1%~1%,男女发病比例为2~5:1,常伴有强迫症^[1,2]。脑内许多神经环路及多种神经递质的异常参与了TS的发生。

亚氨基二丙腈(iminodipropionitrile, IDPN)是一种中枢神经毒素,小剂量应用可成功的诱导出大鼠的头部抽动、肩部抽动等刻板行为,其机制主要认为是破坏了锥体外系的多巴胺(DA)系统,产生持久的降低DA浓度的效应,使动物在生长发育过程中出现DA受体超敏现象,导致动物出现刻板行为^[3]。该模型可部分模拟TS病人的神经生化和行为改变,因此可作为TS的动物模型用于多种临床药物的评价。氟哌啶醇有较强的DA能受体阻滞作用,可以抑制DA受体的超敏,从而阻断由IDPN诱导的刻板运动,因此作为本试验的阳性对照药物。本研究利用IDPN诱导的大鼠头部抽动模型,检测IDPN诱发的大鼠头部抽动模型脑内DA和血浆兴奋性氨基酸(EAA)含量的改变,探讨TS发病与神经递质异常之间的关系。

托吡酯(topiramate, TPM)是一种结构独特的具有多重药理作用的新型抗癫痫药物,有学者试用于TS患儿的治疗结果令人鼓舞^[4],但有关TPM治疗TS的机制国内外尚未见报道。本研究利用IDPN诱导的大鼠头部抽动模型探讨TPM对TS的治疗机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体重180~220 g,雄性,由成都中药研究所提供。许可证号:SCXK(川)2005-19。

1.1.2 药品 托吡酯(西安杨森制药有限公司生产,批号:060407069)。氟哌啶醇(上海九福药业有限公司生产,批号:H31021234)。亚氨基二丙腈、谷氨酸、天冬氨酸均为Sigma公司产品。大鼠多巴胺ELISA试剂盒(美国ADL公司生产)。

1.1.3 主要实验仪器 高效液相色谱仪(SPD-10AVP紫外可见检测器),碳18反相色谱柱均为日本SHIMADZU公司产品,高速冷冻离心机为德国HERMLE公司产品,法国METLER AE100型电子分析天平。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将48只SD大鼠随机分为空

白对照组、模型组、氟哌啶醇组(0.5 mg/kg)、TPM I组(5 mg/kg)、TPM II组(10 mg/kg)、TPM III组(20mg/kg),每组各8只大鼠。

1.2.2 动物模型制作 大鼠TS模型采用Diamond等^[3]创立的神经毒素全身用药法建立,即将IDPN溶于生理盐水,按照给药剂量每日150 mg/kg,给药体积0.1 mL/100 g的方法腹腔注射,1次/d,连用7 d。同时,空白对照组予等体积的生理盐水腹腔注射。

1.2.3 动物模型成功的标准 大鼠腹腔注射IDPN 7 d后出现头部抽动、口腔运动、舔食前抓等行为,其中头部抽动的刻板行为明显、易分辨,且抽动频率高,作为该模型成功的标准。

1.2.4 刻板行为评分 从实验第8天开始分别给各用药组大鼠逐日灌服氟哌啶醇及低中高剂量的TPM至刻板行为明显减轻为止;其中,空白对照组和模型组予等体积的生理盐水灌胃。同时,于试验第8天开始,排除大鼠疾病等其他因素的影响,按照Diamond的方法开始对大鼠进行刻板行为评分,3次/天,每次计时5 min,各次累加的评分和为总评分。评分标准如下:0分为无刻板运动,与生理盐水的作用无差别;1分为有旋转行为;2分为垂直的头部和颈部的运动障碍(上下运动过多);3分为垂直的头部和颈部的运动障碍加旋转行为;4分为头向侧摆并伴有头颈部上下运动过多。

1.2.5 检测指标

(1)大鼠脑组织游离DA含量测定:大鼠给药35 d后,于最后一次给药后2 h,断头取脑,用ELISA法检测大鼠脑组织DA的含量。

(2)大鼠血浆EAA测定:各组大鼠造模成功后连续给药35 d,于最后一次给药后2 h,大鼠断头采血2~3 mL,用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定大鼠血浆EAA的含量。

1.3 统计学处理

数据资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析用单因素方差分析和 q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 行为学评分结果

在给药7 d和35 d(1次/d)后,分别对各组大鼠进行刻板行为评分,结果显示:中、大剂量的TPM可显著抑制IDPN诱导的大鼠头部刻板行为($P <$

0.05),与阳性药氟哌啶醇一致,均比模型组评分低;小剂量 TPM 组与模型组相比差异无统计学意义(表 1)。

表 1 TPM 对 IDPN 所致的大鼠刻板行为的评分

(n=8, $\bar{x} \pm s$)			
组别	剂量(mg/kg)	给药 7 d 后	给药 35 d 后
模型组(IDPN)	150	3.43 ± 0.478	3.25 ± 0.463
氟哌啶醇组	0.5	2.25 ± 0.582 ^a	1.69 ± 0.594
TPM I 组	5.0	2.91 ± 0.533 ^b	2.50 ± 0.535 ^b
TPM II 组	10.0	2.28 ± 0.542 ^{a,b}	1.81 ± 0.458 ^{a,b}
TPM III 组	20.0	2.25 ± 0.823 ^{a,b}	1.69 ± 0.704 ^{a,b}
F 值		6.244	11.984
P 值		<0.01	<0.01

a:与模型组相比 $P < 0.05$;b:组间比较 $P < 0.05$

2.2 TPM 对大鼠脑组织游离 DA 含量的影响

TPM 连续给药 35 d(1 次/d)后用 ELISA 法检测大鼠脑组织游离 DA 的含量,结果显示:模型组脑组织游离 DA 含量明显低于空白对照组 ($P < 0.05$);中、大剂量 TPM 与阳性药氟哌啶醇均可增加脑组织游离 DA 的含量 ($P < 0.05$);小剂量组 TPM 与模型组相比差异没有统计学意义(表 2)。

表 2 TPM 对大鼠脑组织游离 DA 含量的影响

(n=8, $\bar{x} \pm s$)		
组别	剂量(mg/kg)	DA (ng/g)
空白对照组		4822.53 ± 2385.76
模型组(IDPN)	150	1641.65 ± 546.90 ^b
氟哌啶醇组	0.5	4517.31 ± 2431.82 ^a
TPM I 组	5.0	3685.31 ± 1719.54
TPM II 组	10.0	4064.26 ± 1956.36 ^a
TPM III 组	20.0	5787.35 ± 2577.87 ^a
F 值		3.698
P 值		<0.01

a:与模型组相比 $P < 0.05$;b:与对照组相比 $P < 0.05$

2.3 TPM 对大鼠血浆 EAA 的影响

TPM 连续给药 35 d(1 次/d)后用 HPLC 法检测大鼠血浆 EAA[谷氨酸(GLU),天冬氨酸(ASP)]的含量,结果显示:模型组大鼠血浆 GLU,ASP 的水平明显高于空白对照组 ($P < 0.05$);大剂量 TPM 与阳性药氟哌啶醇均可降低血浆 GLU,ASP 水平 ($P < 0.05$);中、小剂量 TPM 组与模型组比较差异没有统计学意义(表 3)。

表 3 TPM 对大鼠血浆 EAA 的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	GLU (mmol/l)	ASP (mmol/l)
空白对照组		0.0386 ± 0.0054	0.0079 ± 0.0010
模型组(IDPN)	150	0.0503 ± 0.1330 ^b	0.0100 ± 0.0011 ^b
氟哌啶醇组	0.5	0.0321 ± 0.0032 ^a	0.0073 ± 0.009 ^a
TPM I 组	5.0	0.0488 ± 0.0065	0.0094 ± 0.0021
TPM II 组	10.0	0.0446 ± 0.0052	0.0095 ± 0.0025
TPM III 组	20.0	0.0319 ± 0.0032 ^a	0.0073 ± 0.0009 ^a
F 值		10.692	5.067
P 值		<0.01	<0.01

a:与模型组相比 $P < 0.05$;b:与对照组相比 $P < 0.05$

3 讨论

本试验应用 IDPN 成功地诱导出大鼠头部抽动、肩部抽动、舔舐前爪等类似 TS 临床表现的行为。应用 ELISA 法检测 IDPN 诱导的大鼠头部抽动模型脑内游离 DA 的含量,结果显示模型组大鼠脑组织游离 DA 较空白对照组明显降低。突触后 DA 受体超敏感是 TS 发病中比较公认的学说^[5,6],突触后 DA 受体敏感性增强,引起突触后间隙 DA 含量下降。应用神经毒素 IDPN 后大鼠脑组织内游离 DA 含量降低提示 IDPN 诱导的大鼠头部抽动行为可能是由于多巴胺受体敏感性增强,导致多巴胺系统活动亢进造成的。

本试验应用 HPLC 法检测 IDPN 诱导的大鼠头部抽动模型血浆 EAA 的含量,结果显示模型组大鼠血浆 EAA 含量较空白对照组明显升高。EAA 主要包括 GLU 和 ASP,广泛存在于哺乳动物的中枢神经系统中,它们不但可以通过与相应受体结合参与中枢神经系统的信息传递,而且还可作为内源性兴奋毒素破坏中枢神经细胞,导致神经功能障碍^[7]。EAA 系统与 DA 系统具有广泛的突触联系,从黑质发出的 DA 能神经纤维支配纹状体内的中型多嗜神经元,纹状体的中型多嗜神经元通过释放抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)来控制神经末梢 EAA 的释放。由此可推测 EAA 系统很有可能通过 DA 系统的支配作用导致了 TS 发病,或与 DA 系统相互作用共同调节了 TS 的发病。

TPM 是一种结构独特的新型抗癫痫药物,Abuzzahab 等^[8]于 2001 年最早报道,将 TPM 用于 2 例经大剂量氟哌啶醇、利培酮治疗无效的 TS 患儿并获得满意疗效。在抗癫痫的研究中发现,TPM 可以直接抑制 EAA 的释放^[9],亦可以通过作用于中枢 GABA 系统抑制 EAA 的释放^[10]。Levin 等^[11]研究发现 GABA 对 DA 神经元具有持续的传入抑制作

用,其作用机制主要与 GABA-A 受体产生的突触后抑制作用有关。本实验中,中、大剂量 TPM 能明显减少 IDPN 所致的大鼠头部抽动行为,大剂量 TPM 还可明显降低模型大鼠血浆 EAA 的水平 ($P < 0.05$),分析其一部分原因与 TPM 直接抑制 EAA 的作用有关;另外,中、大剂量 TPM 给药 35 d 后,检测到脑组织游离 DA 的含量升高 ($P < 0.05$),分析与 TPM 一方面作用于中枢 GABA 系统,增强了 GABA-A 受体处 GABA 的活性;另一方面作用于 GABA 转氨酶,抑制了脑内 GABA 的降解^[12],从而使 GABA-DA 通路抑制纹状体 DA 神经元的作用增强有关。该作用使脑内 DA 神经元的活动减弱,与 DA 受体结合的 DA 减少,脑组织游离 DA 水平升高。

综上所述,本研究中,中、大剂量 TPM 能显著减轻 IDPN 诱导的大鼠头部抽动行为,探讨其作用机制可能与其抑制脑内 DA 与 DA 受体的结合以及抑制血浆 EAA 的释放和分泌有关,为临床应用 TPM 治疗 TS 患儿提供了进一步的理论依据;但 TS 本身是一个与遗传、心理及环境等多因素相关的疾病,多发性抽动也只是 TS 多种临床表现中的一种,且托吡酯等抗癫痫药对此综合症的慢性病程也远非长期有效。因此,本模型是远不能表达 Tourette 综合征真相与全貌的,对 TS 的病因及治疗的探讨尚任重而道远^[13,14]。

[参 考 文 献]

[1] Rampello L, Alvano A, Battaglia G, Bruno V, Raffaele R, Nico-

letti F. Tic disorders: from pathophysiology to treatment [J]. J Neurol, 2006, 253 (1): 1-15.
[2] 马学梅,赵亚茹. 抽动障碍的神经心理研究进展[J]. 中国行为医学科学,2006,15(6):573-574.
[3] Diamond BI, Reyes MG, Borison R. A new animal model for Tourette syndrome[J]. Adv Neurol, 1982, 35:221-225.
[4] 朱海峤,王欣欣,周馥英. 托吡酯治疗小儿 Tourette 综合征疗效的初步观察[J]. 中华儿科杂志, 2005,43 (11):870-871.
[5] 姚阳,麻宏伟,卢瑶,戴晓梅. 氟西汀和氟哌啶醇对 DOI 诱导头部抽动的小鼠模型的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2007,9 (5):469-472.
[6] Albin RL, Koeppe RA, Bohnen NI, Nichols TE, Meyer P, Wernette K, et al. Increased ventral striatal monoaminergic innervation in Tourette syndrome[J]. Neurology, 2003, 61 (3): 310-315.
[7] Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury[J]. Science, 1989, 244 (4906): 798-800.
[8] Abuzzahab FS, Brown VL. Control of Tourette's syndrome with topiramate[J]. Am J Psychiatry, 2001, 158(6): 968.
[9] Qian J, Noebels JL. Topiramate alters excitatory synaptic transmission in mouse hippocampus [J]. Epilepsy Res, 2003, 55 (3): 225-233.
[10] White HS, Smith MD, Wilcox KS. Mechanisms of action of anti-epileptic drugs[J]. Int Rev Neurobiol, 2007, 81:85-110.
[11] Levin BE. Glucose-regulated dopamine release from substantia nigra neurons[J]. Brain Res, 2000, 874(2):158-64.
[12] Petroff OA, Hyder F, Mattson RH, Rothman DL. Topiramate increases brain GABA, homocarnosine, and pyrrolidinone in patients with epilepsy [J]. Neurology, 1999, 52(3):473-478.
[13] 王文光,张亚君,肖洁芳. 小剂量氟哌啶醇结合支持性心理治疗抽动-秽语综合征疗效观察[J]. 中国当代儿科杂志,2001,3 (1):41-42.
[14] 卢瑶,麻宏伟,郝春艳,张莹,王雁,姚璐,等. 多巴胺 D₄ 受体基因启动子区多态性与慢性抽动障碍的关联研究[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(5):357-360.

(本文编辑:吉耕中)