

梁志健,张建军,陈润红,等. 调元散对孤独症大鼠行为和脑内生化指标的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8): 22-27.
Liang ZJ, Zhang JJ, Chen RH, et al. Effect of tiaoyuansan on behavior and cerebral biochemical index of autistic rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 22-27.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.004

调元散对孤独症大鼠行为和脑内生化指标的影响

梁志健,张建军,陈润红,严家荣,邝少松*

(广东省医学实验动物中心,广东 佛山 528248)

【摘要】 目的 研究调元散对孤独症大鼠行为及脑内 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、炎症因子的影响,评价调元散对孤独症是否有改善治疗作用。**方法** 取40只丙戊酸(valproic acid, VPA)诱导的孤独症大鼠随机分为模型对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,另取10只正常大鼠作为空白对照组。低、中、高剂量组动物分别灌胃给予调元散(2.5 g/kg, 5 g/kg, 10 g/kg),空白对照组和模型对照组灌胃给予等体积的纯净水,1次/d,连续30 d。动物给药后分别进行旷场实验和三箱社交实验,随后麻醉、放血处死,取大脑皮层检测 GABA、取海马检测 IL-1 β 、IL-6。**结果** 与空白对照组比较,模型对照组在旷场实验中的中央路程百分比、中央时间百分比降低($P=0.026, P=0.044$),边上路程百分比和边上时间百分比升高($P=0.026, P=0.044$),在三箱社交实验中对陌生鼠的探索次数减少(第二阶段 $P=0.011$, 第三阶段 $P=0.041$),大脑皮层中 GABA 升高($P=0.002$),海马中 IL-1 β 、IL-6 升高($P=0.011, P=0.003$)。与模型对照组比较,高剂量组旷场实验的中央路程百分比、中央时间百分比升高($P=0.007, P=0.021$),边上路程百分比、边上时间百分比降低($P=0.007, P=0.021$),在三箱社交实验中对陌生鼠的探索次数增加(第二阶段 $P=0.032$, 第三阶段 $P=0.002$),大脑皮层中 GABA 降低($P=0.006$),海马中 IL-1 β 、IL-6 降低($P=0.001, P=0.000$)。**结论** 调元散可减轻 VPA 诱导孤独症大鼠的刻板行为,增加模型大鼠的社交次数,对孤独症大鼠有一定的改善治疗作用。

【关键词】 调元散;孤独症;三箱社交实验; γ -氨基丁酸;炎症因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 08-0022-06

Effect of tiaoyuansan on behavior and cerebral biochemical index of autistic rats

LIANG Zhijian, ZHANG Jianjun, CHEN Runhong, YAN Jiarong, KUANG Shaosong*
(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of tiaoyuansan on autistic rat behavior as well as proinflammatory factors and GABA in brain tissue and its therapeutic effect. **Methods** Forty VPA-induced autistic rats were divided into a model control group and three dosage groups of tiaoyuansan (2.5, 5 and 10 g/kg). Ten normal rats were used as the normal control group. Tiaoyuansan at various concentrations or water were administered orally to the corresponding groups once a day for 30 days. The open field test and the three chamber social test were performed. The cerebral cortex and hippocampus were collected to determine the contents of GABA, IL-1 β and IL-6. **Results** Compared with the findings in the normal control group, in the model control group, the percentage of distance and time in the central area were decreased ($P=0.026, P=0.044$) and the percentage of distance and time in the perimeter area were increased ($P=0.026, P=0.044$) in the open field test, the times of searching for unfamiliar rats were decreased (phase II: $P=0.011$, phase III: $P=0.041$) in the three chamber social test, GABA in the cerebral cortex was increased ($P=0.002$), and IL-1 β and IL-6

【基金项目】广东省中医药局科研项目(20211057);广东省省级科技计划项目(2019A030317015)。

【作者简介】梁志健(1989—),男,主管中药师,研究方向:药理与毒理学。E-mail:kenjiliang@foxmail.com

【通信作者】邝少松(1973—),女,高级兽医师,研究方向:药效评价。E-mail:kuangss@126.com

in the hippocampus were increased ($P=0.011$, $P=0.003$). Compared with the findings in the model control group, in the high dosage group, the percentage of distance and time in the central area were increased ($P=0.007$, $P=0.021$) and the percentage of distance and time in the perimeter area were decreased ($P=0.007$, $P=0.021$) in the open field test, the times of searching for unfamiliar rats were increased (phase II: $P=0.032$, phase III: $P=0.000$) in three chamber social test, GABA in the cerebral cortex was decreased ($P=0.006$), and IL-1 β and IL-6 in the hippocampus were decreased ($P=0.001$, $P=0.002$). **Conclusions** Tiaoyuansan reduces stereotypical behavior and increases the social times of VPA-induced autistic rats. Therefore, it has certain therapeutic effect on autism.

【Keywords】 tiaoyuansan; autism; three chamber social test; GABA; proinflammatory factors

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD), 简称孤独症, 是一种常见的神经发育障碍性疾病。临床的患儿可见语言发育落后、社交障碍、活动范围狭窄及刻板动作行为^[1]。在美国, 每 68 名儿童就有 1 名 ASD 患者^[2]。而在我国, 严重的孤独症患者约有 65 万, 症状较轻的患者约有 500 多万^[3]。中医典籍中无孤独症相关表述, 但孤独症相关症状在中医论著有相关的记载, 如“童昏”“五迟”“无慧”等症^[4]。中医治疗相关症状的思路有滋阴敛阳、安神祛燥, 填精益髓、滋养肝肾, 健脾扶阳、化痰开窍, 补益心脾、养血安神等方法^[5]。调元散出自《活幼心书》, 由山药、人参、茯苓、白术、白芍、熟地黄、当归、黄芪、川芎、甘草、石菖蒲组方而成, 主治小儿元气不足, 肌肉消瘦, 语迟、行迟、齿迟, 其主治与孤独症的症状十分相似。本课题通过旷场实验和三箱社交实验研究调元散能否改变孤独症大鼠的行为, 并观察其对脑内 GABA、IL-1 β 、IL-6 的影响, 综合评价调元散对孤独症大鼠是否有治疗改善作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD 大鼠, SPF 级, 雄性: 10 只, 体重 300~340 g, 雌性: 20 只, 体重 200~240 g; 均购自广东省医学实验动物中心 [SCXK (粤) 2018-0002], 并在该中心的 SPF 级动物房完成后续动物实验 [SYXK (粤) 2018-0002]。饲养条件: 自由进食饮水, 采用 12 h/12 h 昼夜间断照明, 饲养温湿度为 20~26 $^{\circ}$ C、40%~70%。本研究经广东省医学实验动物中心实验动物伦理委员会审核及批准 (B202202-1), 实验严格遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

药液的准备: 干山药 15 g, 人参、白茯苓、茯神、白术、白芍药、熟地黄、当归、黄芪各 7.5 g, 川芎、

甘草各 9 g, 石菖蒲 6 g。上述药材切片后加水煎煮、浓缩至 100 mL, 得 1 g/mL 调元散药液。GABA Elisa 试剂盒 (武汉云克隆科技股份有限公司, 批号: L220616189); IL-1 β ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程公司, 批号: T24019348); IL-6 ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程公司, 批号: T09019286)。Multiskan Mk3 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific); Flyde-A 旷场实验分析系统 (广州飞迪生物科技有限公司); JLBbehv-SSR-4 型大鼠社交活动视频分析系统 (上海吉量软件科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 孤独症大鼠的制备与给药

雌雄大鼠按 2:1 比例合笼过夜, 翌日清晨观察雌鼠的阴道栓和阴道涂片。如观察到阴道栓或阴道内精子, 则判断为孕期 0.5 d。受孕大鼠单笼饲养, 未受孕继续合笼配种。取 18 只孕期 12.5 d 孕鼠, 腹腔注射给予 600 mg/kg 的 VPA 造模; 2 只孕期 12.5 d 孕鼠注射等体积的生理盐水。待孕鼠产仔后, 取造模的 40 只雄性仔鼠随机分为模型对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组, 取 10 只正常的雄性仔鼠纳入为空白对照组。待仔鼠断乳后, 低、中、高剂量组动物分别灌胃给予调元散 (2.5 g/kg、5 g/kg、10 g/kg), 空白对照组和模型对照组灌胃给予等体积的纯净水, 每天 1 次, 连续 30 d。

1.3.2 旷场实验

灌胃第 29 日, 进行旷场实验。将动物放入旷场中, 视频记录 5 min 内动物的活动, 并用软件分析该段时间内动物的活动总路程、各区域时间、各区域路程。每完成 1 只动物, 均需用酒精擦拭箱底, 清除气味对下只动物的影响。

1.3.3 三箱社交实验

灌胃第 30 天, 进行三箱社交实验。第一阶段, 打开挡板使三箱互通, 将待测鼠放进中箱, 让其自

由探索以适应环境 10 min。第二阶段,将两个小笼分别放置在左箱和右箱,在右笼放入 1 只陌生鼠 I (陌生鼠指与待测鼠月龄相仿、性别相同、未同笼饲养过的同品系鼠),左笼放入 1 个与待测鼠相似的物体,将待测鼠放置在中箱自由在三箱中探索 10 min。第三阶段,将左笼中的物体取出放入陌生鼠 II,右笼中的陌生鼠 I 变为熟悉鼠,将待测鼠放入中箱自由在三箱中探索 10 min。测试结束。记录待测鼠在三箱分别停留的时间、路程,与左笼和右笼的探索次数^[6]。

1.3.4 生化指标

末次灌胃给药次日,动物腹腔注射乌拉坦(1.2 g/kg)麻醉后放血处死。取下完整大脑,冰上分离大脑皮层及海马组织进行匀浆,大脑皮层匀浆液采用 ELISA 法检测 GABA 含量,海马组织匀浆液检测 IL-1 β 、IL-6 含量。

1.4 统计学方法

实验所得数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并

采用 SPSS 25.0 进行统计分析。实验数据满足正态性及方差齐,采用单因素方差分析,检验水平 $\alpha = 0.05$ ^[7]。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

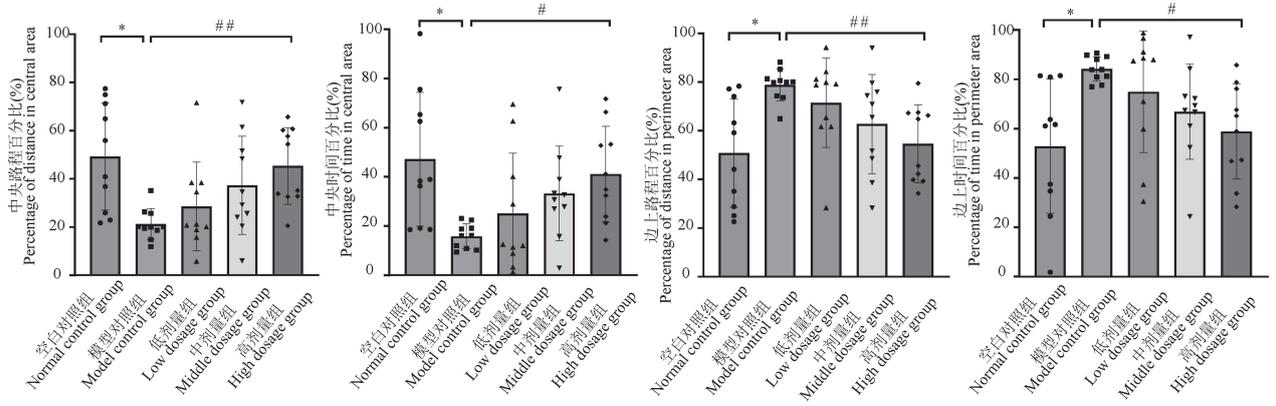
2 结果

2.1 动物状态观察

注射 VPA 孕鼠的部分仔鼠可见行走时后脚拖行(21.1%)、尾根部附近皮肤可见小范围脱毛(14.8%)、尾巴出现弯折(32.2%)。为避免上述异常影响实验结果,出现异常的仔鼠均淘汰、不纳入实验组。

2.2 旷场实验

与空白对照组比较,模型对照组的中央路程百分比降低($P = 0.026$)、中央时间百分比降低($P = 0.044$),边上路程百分比升高($P = 0.026$)、边上时间百分比升高($P = 0.044$)。与模型对照组比较,高剂量组中央路程百分比升高($P = 0.007$)、中央时间百分比升高($P = 0.021$),边上路程百分比降低($P = 0.007$)、边上时间百分比降低($P = 0.021$)(图 1、图 2)。



注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。与模型对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 1 各组动物旷场实验结果

Note. Compared with the normal control group, * $P < 0.05$. Compared with the model control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 1 Result of open field test

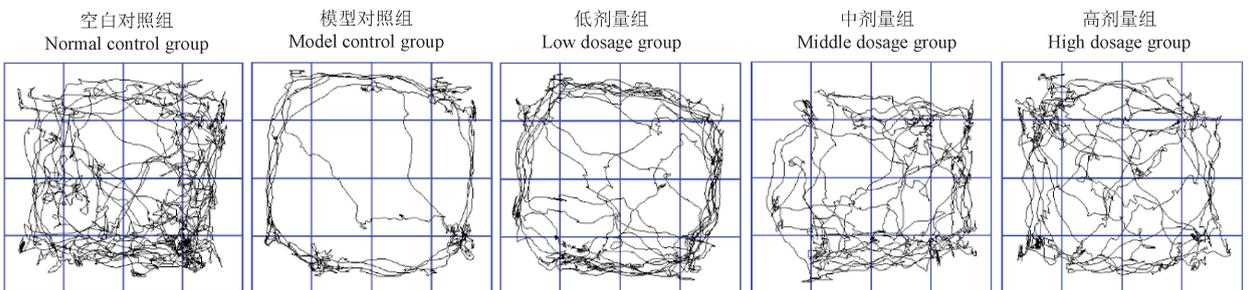


图 2 各组旷场实验轨迹图

Figure 2 Track of each group in open field test

2.3 三箱社交实验

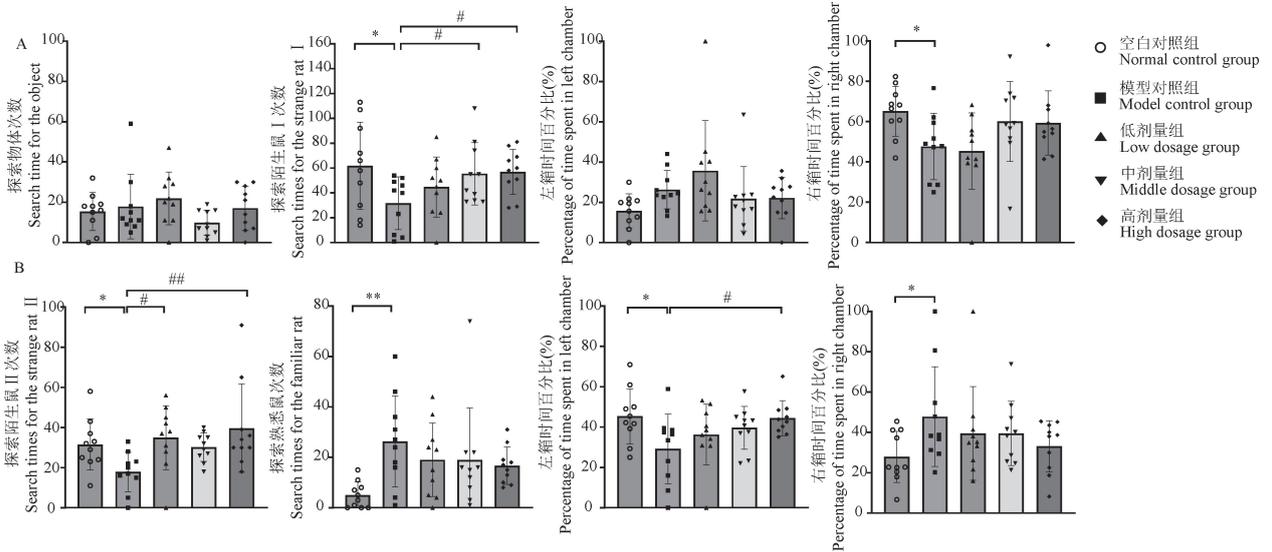
三箱社交实验第二阶段结果见图 3A 和图 4A, 模型对照组对陌生鼠的探索次数较空白对照组减少 ($P=0.011$), 且在右箱探索时间百分比减少 ($P=0.025$)。与模型对照组比较, 中剂量组和高剂量组对陌生鼠的探索次数增加 ($P=0.043, P=0.032$)。

第三阶段结果见图 3B 和图 4B, 模型对照组对陌生鼠 II 的探索次数较空白对照组减少 ($P=0.041$)、对熟悉鼠探索次数增加 ($P=0.002$), 在左箱探索时间百分比降低 ($P=0.010$)、右箱探索时间百分比增加 ($P=0.021$)。与模型对照组比较, 低剂

量和高剂量组对陌生鼠 II 的探索次数升高 ($P=0.012, P=0.002$), 高剂量组在左箱的探索时间百分比升高 ($P=0.015$)。

2.4 脑内生化指标

与空白对照组比较(图 5), 模型对照组动物大脑皮层 GABA 和海马 IL-1 β 、IL-6 升高 ($P=0.002, P=0.011, P=0.003$)。与模型对照组比较, 调元散低剂量海马 IL-6 降低 ($P=0.002$), 中剂量的大脑皮层 GABA 和海马 IL-1 β 、IL-6 降低 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$), 高剂量的大脑皮层 GABA 和海马 IL-1 β 、IL-6 降低 ($P=0.006, P=0.001, P=0.000$)。

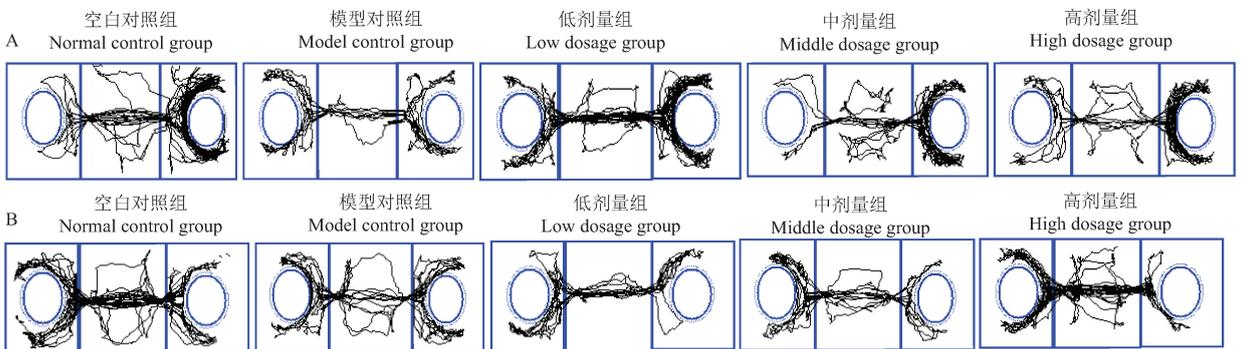


注: A: 三箱社交实验第二阶段; B: 三箱社交实验第三阶段。与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型对照组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 3 三箱社交实验结果

Note. A, Three chamber test phase II. B, Three chamber test phase III. Compared with the normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the model control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Result of the three chamber test

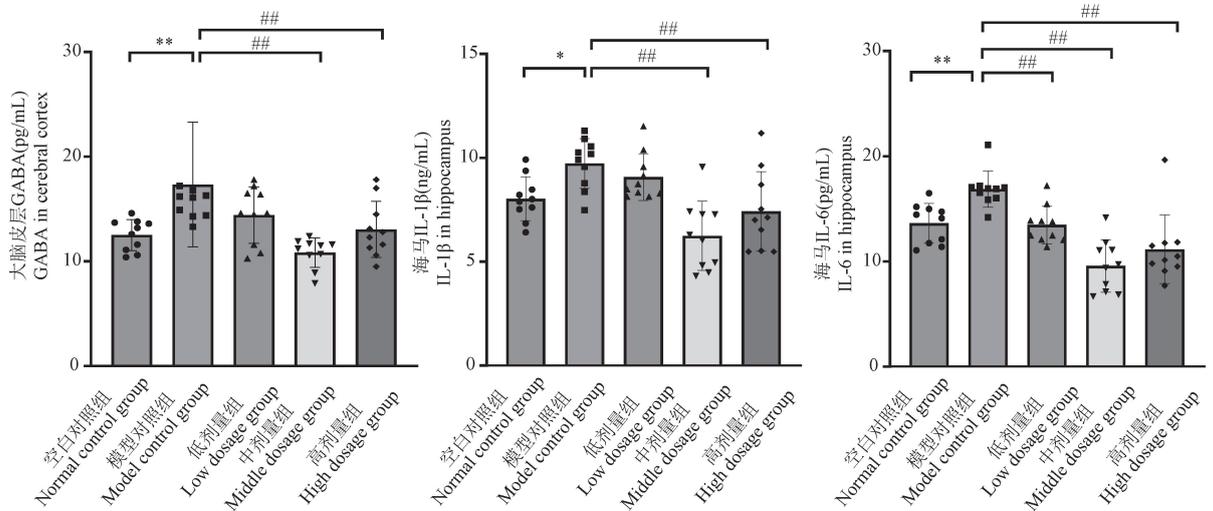


注: A: 三箱社交实验第二阶段; B: 三箱社交实验第三阶段。

图 4 各组三箱社交实验轨迹图

Note. A, Three chamber test phase II. B, Three chamber test phase III.

Figure 4 Track of each group in three chamber test



注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与模型对照组比较, ### $P < 0.01$ 。

图 5 大脑皮层 GABA 及海马 IL-1 β 、IL-6 结果

Note. Compared with the normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model control group, ### $P < 0.01$.

Figure 5 Result of GABA in cerebral cortex and IL-1 β , IL-6 in hippocampus

3 讨论

中医认为孤独症总属脏腑功能失调,阴阳失衡,病位在脑,与心、肝、脾、肾有密切联系。目前,中医在孤独症的临床研究中,针灸法已经逐渐成熟并占主要地位^[8-9],中药方剂的治疗研究报道较少。调元散出自《活幼心书》,由山药、人参、茯苓、白术、白芍、熟地黄、当归、黄芪、川芎、甘草、石菖蒲组成,可补气健脾、活血行气、醒神益智,主要用于少儿元气不足、颅脑开解、肌肉消瘦所致的语迟行迟,手足如痫,齿生迟者^[10]。调元散的主治证与孤独症患者的症状高度重合,本研究主要利用孤独症大鼠模型对调元散进行研究,评价这一经典名方对孤独症大鼠是否具有治疗作用。

Schneider 在 2005 年对孕期第 12.5 天的大鼠一次性腹腔注射 VPA 600 mg/kg,成功制备了稳定孤独症大鼠模型,从此该模型便被广泛用于孤独症的研究中。该模型能很好模拟孤独症患者重复刻板行为的增加、对陌生环境探索行为和社会交流减少^[11]。本研究正是利用该模型进行了后续研究。旷场实验是一种评价动物在新环境中的自主探索行为的一种常用实验方法。动物在新异开阔的场地中,因恐惧主要在周边区域进行活动,而在中央区域活动较少,但动物又有探究、探索的天性,又会促使动物在中央区域进行探索活动,可以考察动物在新环境中焦虑、紧张和刻板行为的情况^[12]。在本

研究中,模型对照组动物在旷场中的活动更多集中在周边区域,反映了该组动物的刻板、焦虑行为的产生。经调元散干预后,动物在旷场中央的活动时间和路程占比升高,提示动物的刻板、焦虑行为有减轻。三箱社交实验可用于评价啮齿类动物的社交行为。大鼠作为群居动物,对陌生的同类具有与生俱来的接触、探索倾向^[13]。在本研究中,模型对照组动物在两个阶段的实验中对陌生鼠的探索次数和时间均减少,反映出社交能力低于空白对照的大鼠。经调元散干预后的模型大鼠对陌生大鼠的探索次数增加,表明调元散能改善孤独症大鼠的社交能力。

VPA 诱导的孤独症模型与机体内的 GABA 失衡及脑中炎性因子的过表达有关。(1) GABA 广泛参与了神经功能活动,它介导的抑制性突触传递能够防止神经元的过度兴奋,维持中枢神经系统的稳态^[14];GABA 水平的异常造成脑内兴奋抑制失衡,可造成多种神经精神疾病。有研究表明,VPA 诱导的孤独症小鼠脑内 GABA 明显升高^[15-16]。(2) 正常脑组织中,IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎性因子表达很低。有研究证实,VPA 诱导的孤独症大鼠神经小胶质细胞为首的脑内固有免疫细胞首先活化,进而激活星形胶质细胞,反过来放大小胶质细胞的介导的炎症反应,一同释放炎性细胞因子,当炎性细胞因子超过一定阈值,可导致神经发育的异常^[17-18]。其中 IL-1 β 和 IL-6 的过表达,可分别导致大脑的过度

发育和兴奋性-抑制性突触失衡^[19-20]。本研究发
现,调元散可减少 VPA 诱导孤独症大鼠脑内的
GABA 含量,也可以减少炎性因子 IL-6、IL-1 β 的
表达。

综上所述,调元散可减轻 VPA 诱导孤独症大鼠
的刻板行为,增加模型大鼠的社交次数,对孤独症
大鼠有一定的治疗改善作用,其途径可能与模型大
鼠脑内 GABA 异常升高、减少炎性因子 IL-6、IL-1 β
过表达有关。

参考文献:

[1] Emerald M. Essential oils and autism spectrum disorder (ASD)
[J]. *Int J Pro Holist Aromather*, 2016, 5(2): 19-30.

[2] 王刚,单玲,杜琳,等. γ -氨基丁酸与孤独症谱系障碍 [J].
中华临床医师杂志(电子版), 2015(21): 3958-3961.

[3] 王舒婷,张楠,姚雷. 香柠檬精油对子代自闭症大鼠焦虑行
为与认知能力的影响研究 [J]. *天然产物研究与开发*,
2020, 32(7): 1124-1133.

[4] 王静. 孤独症谱系障碍儿童中医症状特点研究 [J]. *中医临
床研究*, 2022, 14(14): 24-26.

[5] 宾有富,李佳恒,刘苑彝,等. 中药汤剂治疗儿童自闭症的
研究概况 [J]. *中国民间疗法*, 2020, 28(5): 110-112.

[6] 张考苑. 孤独症蛋白生物标志物的筛选及相关机制研究
[D]. 深圳:深圳大学, 2018.

[7] 梁志健,严家荣,陈桂煌,等. 蒺藜淫羊藿复合物对大鼠性
功能及精子活力的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32
(1): 62-67.

[8] 程艳然,熊振芳,卢金清,等. 中西医结合干预自闭症的研究
现状 [J]. *湖北中医杂志*, 2017, 39(5): 63-64,
F0003, F0004.

[9] 李祎豪,吕建琴,李宁. 针灸治疗精神障碍的临床研究概况
[J]. *中国民间疗法*, 2022, 30(8): 117-119, 125.

[10] 曾世荣. 活幼心书 [M]. 北京:中国中医药出版社, 2016.

[11] Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats
prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism [J].
Neuropsychopharmacology, 2005, 30(1): 80-89.

[12] 肖露. 孤独症谱系障碍儿童粪便菌群对无菌鼠行为的影响及
可能机制的研究 [D]. 重庆:重庆医科大学, 2021.

[13] 陈锡,陈楚茂,许宏烽,等. Fmr1 基因敲除小鼠的三箱社交
新奇偏好行为观察 [J]. *现代医院*, 2018, 18(8): 1185
-1187.

[14] 侯倩伶. VPA 孤独症大鼠发育特点和 GABA 能神经元在不
同脑区的表达 [D]. 重庆:重庆医科大学, 2017.

[15] 赵佳佳,赵蓓,高未,等. 自闭症模型小鼠神经递质水平病
理性改变的机制研究 [J]. *浙江医学*, 2022, 44(4): 350
-354.

[16] Zhang F, Wan X, Cao YZ, et al. Klotho gene-modified BMSCs
showed elevated antifibrotic effects by inhibiting the Wnt/ β -
catenin pathway in kidneys after acute injury [J]. *Cell Biol Int*,
2018, 42(12): 1670-1679.

[17] 陈运华. 孤独症大鼠发病机制中突触与神经免疫功能异常的
初步研究 [D]. 贵阳:贵州医科大学, 2016.

[18] Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative
disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(4): 193-201.

[19] 赵晓倩. 丰富环境对 VPA 诱导的孤独症大鼠行为及 IL-1 β 、
IL-6 的影响 [D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2020.

[20] 魏淇淇,刘忠民,冯广智. 不同干预方式对 ASD 大鼠认知能
力的影响及机制探讨 [J]. *实验动物科学*, 2021, 38(3): 47
-53.

[收稿日期] 2023-01-03