

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.08.011

祛风止动方对抽动障碍患儿外周血调节性 T 细胞的影响

张欣^{1,2}, 吴敏^{*}, 虞坚尔², 高戈¹

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院, 上海市杨浦区控江路 1665 号, 200092; 2. 上海中医药大学附属市中医医院)

摘要 目的 探讨祛风止动方对抽动障碍患儿调节性 T 细胞 (Treg) 外周血表达水平的影响。方法 收集抽动障碍患儿 30 例为治疗组, 另选取健康儿童 20 例为对照组。治疗组给予祛风止动方每日 1 剂, 疗程 3 个月。于治疗组治疗前后及对照组入组时检测受试者外周血 Treg 表达。结果 治疗前治疗组儿童外周血 Treg 表达水平显著低于对照组, 在学龄前 (3~6 岁) 和学龄期 (7~16 岁) 治疗组外周血 Treg 表达水平亦较对照组降低 ($P < 0.01$)。治疗组学龄前和学龄期患儿治疗后外周血 Treg 表达水平均较治疗前出现上升趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 Treg 表达水平异常与抽动障碍发病有关, 祛风止动方对抽动障碍患儿外周血 Treg 表达有上调作用。

关键词 抽动障碍; 调节性 T 细胞; 祛风止动方

抽动障碍是儿童和青少年时期起病, 以反复、不自主的运动性抽动和 (或) 发声性抽动为临床特征的神经精神类疾病^[1], 并可伴有强迫症、注意力缺陷或其他神经行为异常^[2]。抽动障碍在很长一段时间内被认为是一种罕见疾病, 直到大量的流行病学研究表明, 适龄儿童中抽动障碍发病率在 0.3%~1% 左右^[3-4]。目前, 自身免疫稳态的改变在抽动障碍发病中的作用日益受到关注^[5]。调节性 T 细胞 (Treg) 在免疫系统的稳态和免疫反应的调节中起到举足轻重的作用, 是外周免疫耐受产生和维持的关键^[6]。刘弼臣教授认为, 抽动障碍是一种本源在肝、病发于肺的病证, 我们据此确立“肝肺并调”的治疗原则, 并根据祛除外风的苍耳子散和平肝熄风的天麻钩藤饮化裁出祛风止动方。前期研究证实, 祛风止动方在抽动障碍治疗中疗效肯定, 可显著改善患者抽动症状及体征, 提高生活、学习质量, 安全性高^[7-8]。本研究探讨抽动障碍患儿外周血 Treg 的表达规律以及祛风止动方对其的干预作用, 报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

病例来自 2013 年 6 月至 2014 年 11 月在上海交通大学医学院附属新华医院中医儿科抽动障碍专科就诊的抽动障碍患儿 30 例 (治疗组), 另自上海交通大学医学院附属新华医院中医儿科门诊选取健康儿童 20 例 (对照组)。治疗组男 15 例, 女 15 例; 年龄 3~16 岁, 平均年龄 (7.27 ± 3.03) 岁, 其中学龄前 (3~6 岁) 15 例, 学龄期 (7~10 岁) 15 例; 病程 2~24 个月, 平均病程 (7.80 ± 4.51) 个月。对照组男 10 例, 女 10 例; 年龄 3~16 岁, 平均年龄 (6.80 ± 3.29) 岁, 其中学龄前 10 例, 学龄期 10 例。两组受试者一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 诊断标准

抽动障碍诊断标准参照《ICD-10 精神与行为障碍分类》^[9]。并依据耶鲁整体抽动严重程度量表 (YGTSS)^[10] 评分分为轻度、中度、重度三种类型, < 25 分属轻度, $25 \sim 50$ 分属中度, > 50 分属重度。

1.3 纳入标准

治疗组: 1) 符合上述诊断标准者, 属于中、重度患儿, 年龄 3~16 岁; 2) 自愿参与本研究, 家长签署知情同意书者。对照组: 自愿参与并由家

基金项目: 国家中医药管理局“十二五”重点专科项目; 卫生部临床重点专科项目 (ZJ0901EK013); 上海市中西医结合临床重大项目 (ZY3-LCPT-2-2005)

* 通讯作者: xinhuaqiyan123@126.com, (021) 25076845

长签署知情同意书者。

1.4 排除标准

有神经系统或精神障碍性疾病家族史，有神经精神类疾病史；有慢性疾病、内分泌及代谢性疾病；有急性感染性疾病、自身免疫性疾病、重大躯体疾病等；有异常物质以及特殊药物依赖及滥用史；受过严重头部外伤或产伤的，接受过头颅介入性手术及放疗化疗；童年或婴幼儿期出现过高热惊厥的；出生时缺血、缺氧及病理性黄疸表现的儿童；合并小舞蹈症、肝豆状核变性、癫痫肌阵挛发作、药源性不自主运动及其他锥体外系病变者。

2 方法

2.1 治疗方法

治疗组给予祛风止动方颗粒剂（江苏江阴制药有限公司）：天麻 10 g（批号 1204062），辛夷 10 g（批号 1204014），全蝎 5 g（批号 1203078），钩藤 10 g（批号 1205055），伸筋草 10 g（批号 1202019）。每日分 2 次服用，疗程 3 个月。

2.2 观察指标及方法

治疗组治疗前后、对照组入组时于上海交通大学医学院附属新华医院检测外周血 Treg 表达。采用一次性采集空腹静脉血 5 ml 注入抗凝管中，轻轻混匀，样本需在 1 h 内采集完成，4℃ 保存，且在采集后 2 h 内进行外周血淋巴细胞的分离（人外周血淋巴细胞分离液，美国 Sigma 公司，批号：140602）。1) 用一次性吸管将静脉血转移到 15 ml BD 离心管内，加入 5 ml PBS 稀释血液，用一次性吸管混匀；2) 取另一个干净的 15 ml 离心管，加入 5 ml 人淋巴细胞分离液；3) 将混匀的血液用一次性吸管小心沿着管壁加到淋巴细胞分离液上，注意保持两者界面清晰。4) 室温下 2000 r/min 离心 30 min，离心机要保证缓升缓降；离心后试管可分为 4 层，用一次性吸管吸出单个核细胞，加入到另一个干净的 15 ml 离心管内，后加入 5 ml PBS 稀释、混匀；5) 室温下 1500 r/min 离心 10 min，洗涤，弃掉上清，重新洗涤 1 次，尽可能将上清吸干净；6) 分离出的单个核细胞可加入 Trizol（美国 Invitrogen 公司，批号 10296-010）提取 RNA。

Treg 流式细胞检测：1) 调整细胞密度为 1×10^6 /ml，取 1.5 ml EP 管为加样管，每管加入细胞悬浮液。2) 加样管内加入 APC anti-human CD4、PE anti-human CD25（设置单染管和 blank 管），室温避光孵育 20 min，离心 5 min，PBS 洗涤 2 次，拍

干。3) 加样管中各加 $1 \times$ Cell Staining Buffer，重悬细胞，用 $1 \times$ Cell Staining Buffer 重悬细胞，可 4℃ 下避光保存。4) 用 $1 \times$ Permeabilization Wash Buffer 洗涤细胞 3 次，用 $1 \times$ Permeabilization Wash Buffer 重悬细胞，加 FITC anti-human FOXP3，室温下避光孵育 20 min，用 $1 \times$ Permeabilization Wash Buffer 洗涤细胞 2 次，重悬细胞。采用微流式细胞分析仪（美国 Millipore 公司，型号 guava easy Cyte 8）检测。APC anti-human CD4、PE anti-human CD25、FITC anti-human FOXP3、Fixation Buffer、Permeabilization Wash Buffer，美国 Biolegend 公司，批号分别为 E10610-4635、E10284-4633、E09963-1633、4104911、4111109。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理，计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 治疗前两组受试儿童外周血 Treg 表达水平比较

表 1 示，治疗前治疗组儿童 Treg 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.01$)。表 2 示，在学龄前 (3~6 岁) 和学龄期 (7~16 岁)，治疗前治疗组外周血 Treg 表达水平均较对照组显著降低 ($P < 0.01$)。

表 1 治疗前两组受试儿童外周血 Treg 表达水平比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Treg
治疗组	30	$1.38 \pm 0.64^*$
对照组	20	3.67 ± 1.20

注：Treg，调节性 T 细胞；与对照组比较，* $P < 0.01$

表 2 治疗前两组受试儿童不同时期外周血 Treg 表达水平比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	学龄前 (3~6 岁)	学龄期 (7~16 岁)
治疗组	$1.43 \pm 0.59^* (15)$	$1.32 \pm 0.69^* (15)$
对照组	$4.10 \pm 1.19 (10)$	$3.23 \pm 1.09 (10)$

注：Treg，调节性 T 细胞；与正常组比较，* $P < 0.01$ ；() 内为例数

3.2 治疗组治疗前后外周血 Treg 表达水平比较

表 3 治疗组不同时期抽动障碍患儿治疗前后外周血 Treg 表达水平比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

时间	学龄前 (3~6 岁)	学龄期 (7~16 岁)
治疗前	$1.43 \pm 0.59 (15)$	$1.32 \pm 0.69 (15)$
治疗后	$1.74 \pm 0.56 (15)$	$1.62 \pm 0.82 (15)$

注：Treg，调节性 T 细胞；() 内为例数

表 3 示, 学龄前和学龄期患儿治疗后外周血 Treg 表达水平平均较治疗前出现上升趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

抽动障碍发病机制尚未明确, 现代医学研究认为, 抽动障碍是一种多病因共同致病的疾病, 其发病机制可能与中枢神经递质失调、遗传因素、感染与免疫因素、心理因素和环境因素等诸多方面有关系^[1]。目前, 抽动障碍发病机制的研究主要集中在机体内多巴胺能系统异常以及感染与自身免疫紊乱两个方面, Treg 细胞在免疫系统的稳态和免疫反应的调节方面起到了举足轻重的作用, Treg 细胞已成为外周免疫耐受产生和维持的关键^[2]。研究显示, Treg 细胞在抽动障碍患者表达下调以及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 12、可溶性血管细胞黏附分子 1 (sVCAM-1) 等免疫因子表达增高现象^[3]。

中医学认为, 抽动障碍属于“慢惊风”“肝风”等范畴, 其病因与先天禀赋不足、产褥期异常、感受外邪、饮食不调等因素有关。祛风止动方依据中医儿科名家刘弼臣学术思想研发而成。以辛夷、天麻为君, 辛夷之辛温, 其性上达, 升达清气, 走气而入肺, 发散风寒且尤善通窍; 天麻甘平柔润, 既善熄风止痉又可祛外风、通经络, 二药并用既散外风又熄内风, 共为君药。以钩藤、全蝎为臣, 钩藤之性和缓, 功善熄肝风, 清肝热, 平肝阳, 助天麻奏熄风通络之功; 全蝎为虫类搜剔之品, 治厥阴风木之病, 既平熄肝风, 有又搜风通络, 兼具熄风止痉及祛风止痉之效。以伸筋草为佐使药, 入肝脾肾三经, 有祛风散寒、舒筋活血之功。诸药合用, 既可疏风通窍祛除外风, 又可止痉定抽平熄肝风, 既治病之因, 又治病之本。

本研究结果显示, 与正常儿童相比, 抽动障碍患儿外周血 Treg 表达明显下降, 提示抽动障碍的发生可能与外周血 Treg 水平异常降低导致的自身免疫耐受机制出现紊乱有关。而接受祛风止动方治疗的抽动障碍患儿治疗后外周血 Treg 表达高于治疗前的水平, 虽然差异无统计学意义, 但是在一定程度上说明祛风止动方对抽动障碍患儿自身免疫状态具有调节作用, 在今后可通过大样本、长期的实验研究进一步明确。

参考文献

- [1] BERARDELLI A, CURRÀ A, FABBRINI G, et al. Pathophysiology of tics and Tourette syndrome [J]. J Neurol, 2003, 250(7): 781-787.
- [2] PLESSEN KJ. Tic disorders and Tourette's syndrome [J]. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2013, 22 (Suppl 1): S55-S60.
- [3] ROBERTSON MM, EAPEN V, CAVANNA AE. The international prevalence, epidemiology and clinical phenomenology of Tourette syndrome: a cross-cultural perspective [J]. J Psychosom Res, 2009, 67(6): 475-483.
- [4] SCHARF JM, MILLER LL, MATHEWS CA, et al. Prevalence of Tourette syndrome and chronic tics in the population-based Avon longitudinal study of parents and children cohort [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2012, 51(2): 192-201.
- [5] MOLLER JC, TACKENBERG B, HEINZEL-GUTENBRUNNER M, et al. Immunophenotyping in Tourette syndrome: a pilot study [J]. Eur J Neurol, 2008, 15(7): 749-753.
- [6] SHEVACH EM, MCHUGH RS, PICCIRILLO CA, et al. Control of T-cell activation by CD4 + CD25 + suppressor T cells [J]. Immunol Rev, 2001, 182: 58-67. PMID: 11722623
- [7] WU M, XIAO GH, YAO M, et al. Multicenter clinical study on the treatment of children's tic disorder with Qufeng Zhidong Recipe [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(4): 254-260.
- [8] 吴敏, 张欣. 祛风止动方及全蝎急性毒性反应的实验研究 [J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(12): 77-79.
- [9] 世界卫生组织. ICD-10 精神与行为障碍分类 [M]. 范肖冬, 汪向东, 于欣, 等译. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 55.
- [10] LECKMAN JF, RIDDLE MA, HARDIN MT, et al. The Yale Global Tic Severity Scale: initial testing of a clinician-rated scale of tic severity [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 1989, 28(4): 566-573.
- [11] BLOCH M, STATE M, PITTENGER C. Recent advances in tourette syndrome [J]. Curr Opin Neurol, 2011, 24(2): 119-125.
- [12] SAKAGUCHI S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance [J]. Cell, 2000, 101(5): 455-458.
- [13] LESLIE DL, KOZMA L, MARTIN A, et al. Neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection: A case-control study among privately insured children [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2008, 47(10): 1162-1172.

The Effect of *Qufeng Zhidong Decoction* (祛风止动方) on Regulatory T cells in Peripheral Blood of Child Patients with Tic Disorder

ZHANG Xin^{1,2}, WU Min¹, YU Jian'er², GAO Ge¹

(1. Xinhua Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092; 2. Chinese Medicine Hospital of Shanghai City, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Qufeng Zhidong Decoction* (祛风止动方) on expression level of regulatory T cells (Treg) in peripheral blood of child patients with tic disorder. **Methods** Thirty children patients with tic disorder were collected as the treatment group. Another 20 healthy children were selected as the control group. The treatment group was given *Qufeng Zhidong Decoction* granules 1 dose per day for 3 months. The expression of Treg in peripheral blood of subjects was tested before and after treatment in the treatment group, and at the time when entered group in the control group. **Results** Before treatment, the expression level of Treg in peripheral blood of children in the treatment group was remarkably lower than that in the control group. At their preschool period (3 ~ 6 years old) and school age (7 ~ 16 years old), the expression level of Treg in peripheral blood in the treatment group also decreased compared with the control group ($P < 0.01$). After treatment The expression level of Treg in peripheral blood of child patients in the treatment group at their preschool period and school age all showed rising trend compared with that before treatment, but there was no statistical significance in differences ($P > 0.05$). **Conclusion** Abnormal expression of Treg is related to the attack of tic disorder. *Qufeng Zhidong Decoction* has up-regulation effect on Treg expression of child patients with tic disorder.

Keywords tic disorder; regulatory T cells; *Qufeng Zhidong Decoction*

(收稿日期: 2016-09-21; 修回日期: 2016-12-21)

编辑: 邓 媛

(上接第 668 页)

Characteristics of Plasma Metabonomics of Patients of Diabetes Mellitus Type 2 with Blood Stasis Syndrome

CHU Shufang, LI Huilin, LIU Deliang, ZHAO Hengxia, ZHANG Zhiling, LI Zengying

(The Fourth School of Clinic Medicine, Guangzhou University of Chinese medicine/Chinese Medical Hospital of Shenzhen, Shenzhen, 518033)

ABSTRACT Objective To explore the features of plasma metabonomics in patients with diabetes mellitus type 2 with blood stasis syndrome. **Methods** Fifty patients with diabetes mellitus type 2 were enrolled, among whom 25 with blood stasis syndrome and 25 without blood stasis syndrome. The basic condition and blood stasis syndrome scores of patients in two groups were observed. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was applied to conduct quantitative determination on plasma contents of metabolites. Main factors contributing to the differences in metabolic components of patients in the two groups were analyzed using principal component analysis method. The possible metabolic pathways in the two groups were concluded. **Results** Blood stasis syndrome scores of type 2 diabetic patients with blood stasis syndrome were remarkably higher than that of without blood stasis syndrome ($P < 0.05$). Forty-seven kinds of metabonomics were detected totally using NMR. Some of those were found in both two groups, but there were significant differences between the groups. Levels of acetone, acetoacetate, alpha hydroxy butyric acid, alpha hydroxy isovaleric acid, beta hydroxy butyric acid, alpha keto alien acid salt, 3-methyl-2-oxopentanoate, 3-hydroxy isobutyric acid and glycine in patients with blood stasis syndrome were higher than that in those without blood stasis syndrome ($P < 0.05$). However, levels of fumaric acid, citric acid, N-acetyl ornithine, pyroglutamic acid, and methionine in group with blood stasis syndrome were lower than those in the group without blood stasis syndrome ($P < 0.05$). There was no statistical significant difference in other 32 kinds of metabonomics between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Patients with diabetes mellitus type 2 with blood stasis syndrome may have more severe fat metabolic, amino acid metabolic and energy metabolic disorders.

Keywords diabetes mellitus type 2; blood stasis syndrome; metabonomics; nuclear magnetic resonance spectroscopy

(收稿日期: 2016-11-08; 修回日期: 2017-01-10)

编辑: 王利芬