

# 龙牡桂枝汤对 ADHD 模型大鼠左右额叶-纹状体 $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达的影响

唐蓓<sup>1</sup>, 祁燕<sup>2</sup>, 唐彦<sup>3\*</sup>

(1. 重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331; 2. 云南省中医医院, 昆明 650021;  
3. 云南中医学院, 昆明 650200)

**[摘要]** **目的:**观察龙牡桂枝汤对注意缺陷多动障碍(ADHD)模型动物—幼年自发性高血压大鼠(SHR)左右额叶-纹状体  $\alpha_{2A}$ 肾上腺素受体( $\alpha_{2A}$ -AR)mRNA 表达的影响,探讨该药治疗 ADHD 的作用机制。**方法:**采用幼年雄性 SHR 大鼠,随机分为龙牡桂枝汤高、低剂量(18,9 g·kg<sup>-1</sup>)组,盐酸哌甲酯组(3.75 mg·kg<sup>-1</sup>)和模型组(生理盐水,10 mL·kg<sup>-1</sup>),连续 ig 给药 14 d,采用 Real-time PCR 法检测各组大鼠左右脑前额叶皮质、纹状体  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达水平。**结果:**在右前额叶皮质,盐酸哌甲酯组及龙牡桂枝汤组大鼠的  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达较模型组显著减少( $P < 0.05$ ),而在左前额叶皮质各组差异不明显。在右纹状体,与模型组相比,盐酸哌甲酯组  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达显著减少,而龙牡桂枝汤低、高剂量组  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达显著增加( $P < 0.05$ );在左纹状体,盐酸哌甲酯组  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达显著高于模型组和龙牡桂枝汤低、高剂量组( $P < 0.05$ ),而龙牡桂枝汤低、高剂量组与模型组比较无显著性差异。**结论:** $\alpha_{2A}$ -AR 与 ADHD 的发生存在一定关联,龙牡桂枝汤治疗 ADHD 的作用机制可能与其下调右脑前额叶皮质  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达,上调右脑纹状体  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达有关。

**[关键词]** 龙牡桂枝汤; 注意缺陷多动障碍; 左右额叶-纹状体;  $\alpha_{2A}$ 肾上腺素受体

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0135-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130135

**Effects of Longmu Guizhi Decoction on  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA Expression in Left and Right Frontal-striatum of ADHD Model Rats** TANG Bei<sup>1</sup>, QI Yan<sup>2</sup>, TANG Yan<sup>3\*</sup> (1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2. Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Kunming 650021, China; 3. Yunnan University of TCM, Kunming 650200, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the influence of Longmu Guizhi decoction (LD) on the  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA expression in the left and right brain of juvenile spontaneously hypertensive rat (SHR), a rat model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), and to investigate the mechanisms of LD for ADHD. **Method:** Male SHRs were randomly divided into high-dose LD group (18 g·kg<sup>-1</sup>), low-dose LD group (9 g·kg<sup>-1</sup>), methylphenidate group (3.75 mg·kg<sup>-1</sup>) and model group (saline, 10 mL·kg<sup>-1</sup>). All the SHRs were lavaged for 14 days. The  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA expression in the left and right prefrontal cortex, corpus striatum were detected by the method of Real-time PCR. **Result:** In the right prefrontal cortex,  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA expression was significantly decreased in the methylphenidate group and two LD groups compared with model group ( $P < 0.05$ ), but there was no obvious change in the left prefrontal cortex in all the groups. In the right corpus striatum, compared with saline control group,  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA expression was significantly decreased in the methylphenidate control group, but it was significantly increased in the two LD groups. In the left corpus striatum,  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA expression was significantly increased in the methylphenidate control group ( $P < 0.05$ ), there was no obvious change in other groups. **Conclusion:** The produce of ADHD may have a certain correlation with  $\alpha_{2A}$ -AR. The potential mechanism of LD in the treatment of ADHD is related to that it can decrease  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA expression in the right prefrontal

**[收稿日期]** 20140730(002)

**[基金项目]** 重庆市教委科学技术研究项目(KJ120603);云南省科技厅自然科学基金面上项目(2010CD074)

**[第一作者]** 唐蓓,博士,教授,从事分子生物学研究,Tel:023-65112426,E-mail:xiaobt26@126.com

**[通讯作者]** \*唐彦,博士,副教授,从事小儿行为障碍中医证治研究,Tel:0871-63537154,E-mail:ytjy0812@126.com

cortex, and increase its expression in the right corpus striatum.

**[Key words]** Longmu Guizhi decoction; attention-deficit/hyperactivity disorder; left and right frontal-striatum;  $\alpha_{2A}$  adrenergic receptor

注意缺陷多动障碍 (attention-deficit/hyperactivity disorder, ADHD) 又称儿童多动症, 是儿童和青少年时期最常见的神经行为障碍, 本病病因与临床表现复杂, 其发病的生物学机制至今尚未阐明。在神经生化方面, 大量的药理学和动物实验显示 ADHD 的病因涉及去甲肾上腺素系统 (NE)<sup>[1]</sup>。NE 系统对于正常认知功能的维持具有重要的调节作用, 其功能失调可能导致注意、工作记忆、反应抑制等功能受损<sup>[2]</sup>。大脑存在大量的与注意力相关的肾上腺素受体, 人群研究多数提示该受体与 ADHD 有一定的相关性<sup>[3]</sup>。而  $\alpha_{2A}$  肾上腺素受体 ( $\alpha_{2A}$ -AR) 激动剂可通过  $\alpha_{2A}$ -AR 产生肾上腺素能的神经兴奋作用, 增强患者的注意力和记忆力。近 10 年来, 中医药治疗 ADHD 的机制研究逐渐成为该领域研究热点之一, 但尚无复方是否可通过肾上腺素受体发挥作用的报道。龙牡桂枝汤是云南省名中医、全国第三、五批老中医学术经验继承指导老师刘以敏主任治疗多动症的经验方, 前期动物实验显示龙牡桂枝汤可减少 ADHD 模型大鼠 SHR 的自发活动水平, 提高非选择性注意力<sup>[4]</sup>, 为进一步探索其作用机制, 本实验采用 Real-time PCR 技术, 研究龙牡桂枝汤对 SHR 大鼠左右脑前额叶皮质-纹状体  $\alpha_{2A}$ -AR 基因表达的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** SHR (鼠龄 5 周), 雄性, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2012-0001。动物饲养于清洁级环境中, 自由饮食进水。

**1.2 试剂** 总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 批号 DP431), TaKaRa PrimeScript RT Master Mix (大连宝生物工程有限公司, 批号 DRR036A), TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, 大连宝生物工程有限公司, 批号 DRR820A)。

**1.3 仪器** Nanodrop ND-2000 型超微量核酸蛋白检测仪 (美国 Thermo 公司), MX3000P 型核酸扩增荧光检测仪 (美国安捷伦科技有限公司), Veriti 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

**1.4 药物** 龙牡桂枝汤由桂枝 6 g, 白芍 15 g, 生龙骨 20 g, 生牡蛎 20 g, 石菖蒲 10 g, 炙远志 10 g, 浮小麦 15 g, 大枣 15 g, 炙甘草 10 g 组成, 生药购于昆明

道地中药饮片厂, 在云南省食品药品检验所进行质量检验, 鉴定为合格饮片。复方的制备由云南中医学院第一附属医院煎药房完成。龙骨、牡蛎打碎先煎 2 h, 其余药物用水浸泡 1 h 后, 加入龙骨、牡蛎药液连续煎煮 3 次, 合并 3 次所得药液用纱布过滤, 按高、低剂量给药, 配成含生药 1.8, 0.9 g·mL<sup>-1</sup> 的溶液并充分搅匀, 贮于 4 °C 冰箱备用。盐酸哌甲酯控释片 (美国 ALZA 公司产品, 批号 ODA3915, 每次 ig 时当场配制, 质量浓度 0.375 g·L<sup>-1</sup>)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 48 只雄性 SHR 大鼠饲养于清洁级环境中, 平衡 1 周后, 按随机区组设计分为模型组、盐酸哌甲酯组 3.75 mg·kg<sup>-1</sup>, 龙牡桂枝汤高、低剂量组 18, 9 g·kg<sup>-1</sup> 4 组, 均按 10 mL·kg<sup>-1</sup> ig。每日给药 1 次, 共 14 d。

**2.2 样品标本采集** 各组大鼠于 ig 14 d 后断头处死, 按随机数字表每组随机抽取 8 只, 在冰台上迅速分离左右大脑的前额叶皮质和纹状体, 速冻后转移至 -80 °C 冰箱保存备用。

**2.3 总 RNA 的提取** 称取组织 100 mg, 加入 1 mL TRIZOL 试剂冰上匀浆, 然后参照总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA, 于超微量核酸蛋白检测仪测定 RNA 的浓度、纯度 ( $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  在 1.8 ~ 2.2), 结果表明总 RNA 质量和纯度较好且无降解。取总 RNA 5  $\mu$ g 按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应, 反应体系为 PrimeScript RT Master Mix 4  $\mu$ L, 1 000 ng 总 RNA, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。反应条件 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。获得的 cDNA 于 -20 °C 保存备用。

**2.4 Real-time PCR 反应** 按 SYBR Premix Ex Taq 荧光定量试剂说明书进行定量 PCR 反应, 以 SYBR Green 为荧光标记物,  $\beta$ -actin 为内参对照。参考 Gen Bank 中小鼠  $\alpha_{2A}$ -AR 基因和内参  $\beta$ -actin 基因的核苷酸序列, 使用 Premier Primer 5.0, 分别设计特异性引物, 各引物序列见表 1。反应体系为 SYBR Premix Ex Taq II 12.5  $\mu$ L, Primer F 0.5  $\mu$ L, Primer R 0.5  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L, 共 25  $\mu$ L。扩增条件为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s; 62 °C 30 s; 共 40 个循环。在 PCR 反应程序结束后, 进入仪器自带软件的数据分析界面, 进行定量分析。 $\alpha_{2A}$ -AR 和内参  $\beta$ -actin 的

RT-PCR 产物融解曲线均为单一峰,未发现非特异性扩增和引物二聚体产生,其目的基因扩增曲线形态良好。基因的表达式应用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算,设置  $\beta$ -actin 为内参基因,模型组样本为对照样本,软件自动计算出各用药组相对于模型组的基因表达差异倍数,其中模型组的相对含量均为 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

引物名称	引物序列产物	大小/bp
$\alpha_{2A}$ -AR	FP;5'-AGCACTCTGAAACCCCTGGAC-3'	150
	RP;5'-GCTGGGAACAACCACAACA-3'	
$\beta$ -actin	FP;5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	124
	RP;5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'	

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学

表 2 左右前额叶皮质纹状体  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Comparison of  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA expression in left and right frontal-striatum ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	$\alpha_{2A}$ -AR mRNA 相对表达量/ $2^{-\Delta\Delta C_t}$			
		右前额叶皮质	左前额叶皮质	右纹状体	左纹状体
模型	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00 <sup>2)</sup>
盐酸哌甲酯	3.75 × 10 <sup>-3</sup>	0.66 ± 0.16 <sup>1)</sup>	1.23 ± 0.32	0.67 ± 0.20 <sup>1)</sup>	2.11 ± 0.31
龙牡桂枝汤	9	0.88 ± 0.13 <sup>1,2)</sup>	1.21 ± 0.45	1.20 ± 0.19 <sup>1,2)</sup>	1.17 ± 0.40 <sup>2)</sup>
	18	0.67 ± 0.12 <sup>1)</sup>	1.07 ± 0.28	1.23 ± 0.20 <sup>1,2)</sup>	1.24 ± 0.22 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与盐酸哌甲酯组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

龙牡桂枝汤由仲景经方桂枝加龙骨牡蛎汤合甘麦大枣汤化裁而来,组方包括桂枝、白芍、龙骨、牡蛎、浮小麦、小枣、石菖蒲、远志、炙甘草 9 味药物,具有交通心肾,开窍宁神,潜阳入阴之功,用于心肝肾失调所致以注意缺陷为主的 ADHD 患儿,疗效甚佳。由于在人体上研究 ADHD 的发病机制及药物疗效受实验取材及伦理学的限制,本实验选用幼年 SHR 大鼠作为 ADHD 动物模型。SHR 大鼠是利用选择性近亲交配法从 Wistar Kyoto 大鼠(WKY)中分离出的遗传动物模型,无需药物诱导,幼年 SHR 相对于 WKY 大鼠能同时表现出注意缺陷、冲动、多动等所有 ADHD 的核心症状,相关神经解剖、神经生化和药理研究同样支持其作为 ADHD 动物模型的合理性<sup>[5]</sup>,是目前国内外研究 ADHD 最理想、应用最广泛的动物模型。

大量分子影像学证据表明,ADHD 主要显

意义。

#### 3 结果

3.1 前额叶皮质  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达 在右前额叶皮质,盐酸哌甲酯组、龙牡桂枝汤低、高剂量组  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达显著低于模型组 ( $P < 0.05$ ),盐酸哌甲酯组  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达也显著低于龙牡桂枝汤中剂量组 ( $P < 0.001$ );而左前额叶皮质  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达各组间无显著性差异。见表 2。

3.2 纹状体  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达 在右纹状体,盐酸哌甲酯组  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达显著低于模型组 ( $P < 0.05$ ),龙牡桂枝汤高剂量组  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达显著高于模型组 ( $P < 0.05$ );龙牡桂枝汤低、高剂量组  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达也显著高于盐酸哌甲酯组 ( $P < 0.05$ );在左纹状体,盐酸哌甲酯组  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的表达显著高于模型组和龙牡桂枝汤低、高剂量组 ( $P < 0.05$ ),而龙牡桂枝汤低、高剂量组与模型组比较无显著性差异。见表 2。

示了额前区和纹状体区血流灌注减少,以右侧为著;形态学研究也发现右侧额前区和右侧纹状体区体积缩小,据此推断 ADHD 病理生理基础可能是额-纹状体通路相关脑区异常,而且以右侧为主导<sup>[6]</sup>。在脑中, $\alpha_{2A}$ -AR 主要分布在除丘脑、基底节及相关区域以外的脑区,在调控 NE 释放方面起着关键作用,尤其是前额叶皮层的  $\alpha_{2A}$ -AR 被激活后,NE 适量释放,通过额叶-纹状体 NE 通路发挥其对注意力调节、工作记忆和行为抑制等认知功能的改善作用<sup>[7]</sup>。在本研究中,龙牡桂枝汤和盐酸哌甲酯可降低 SHR 右前额叶皮质的  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达,提示二药治疗 ADHD 可能与下调此区  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达有关。但在纹状体,盐酸哌甲酯和龙牡桂枝汤对  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 的影响各不相同,前者使 SHR 右侧  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达减少,左侧增加;而后者是增加 SHR 右侧  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达,左侧变化不明显。这也说明西药和中药复方有着不同的作用机制,ADHD 是多基因遗传的复杂疾

病,每个基因只发挥微效作用<sup>[8]</sup>,且目前同类研究可供参考的资料甚少,尚难阐明龙牡桂枝汤和盐酸哌甲酯对 SHR 左右前额叶皮质和纹状体  $\alpha_{2A}$ -AR 表达的不同在其治疗中所起作用的权重。

本研究通过动物实验证实 ADHD 与  $\alpha_{2A}$ -AR 有关,存在左右脑功能的不平衡。复方龙牡桂枝汤治疗 ADHD 的作用机制可能与下调右前额叶皮质  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达,上调右纹状体  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达有关。由于神经递质之间存在错综复杂的联系,针对单一分子的研究尚难达到深入了解 ADHD 病理及药效机制的目的,研究结果的重复性、不同治法的复方和西药对大脑不同部位神经递质的影响及其在病理生理学中的作用都有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 张跃兵,罗学荣,刘霞. 儿童注意缺陷多动障碍遗传学研究进展[J]. 国际精神病学杂志, 2008, 35(2): 99-102.

[2] Sara S J. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(3):211-223.

[3] Roman T, Schmitz M, Polanczyk G V, et al. Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention deficit/hyperactivity disorder [J]. Am J Med Genet, 2003, 120B(1):116-120.

[4] 何平,唐彦,杨若俊. 龙牡桂枝汤改善注意缺陷多动障碍大鼠行为的实验研究[J]. 中国中西医结合儿科学, 2014, 6(3):203-205.

[5] 吴超,李量. 注意缺陷多动障碍大鼠模型的研究进展[J]. 中华精神科杂志, 2009, 42(2):122-123

[6] 张嘉辉,赵正勤,贾少微. 注意力缺陷多动障碍分子影像学进展[J]. 中国医学创新, 2012, 9(31):159-160.

[7] 喻东山. 单胺递质的病理生理学效应[J]. 临床心身疾病杂志, 2006, 12(1):75-77.

[8] Banaschewki T, Becker K, Scherag S, et al. Molecular genetics of deficit hyperactivity disorder:an overview[J]. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2010, 19(3):237-257.

[责任编辑 聂淑琴]