

· 药理 ·

安神定志灵对 ADHD 模型大鼠前额叶、纹状体 CDK5/DARPP32/PP1 信号通路的影响

孙继超¹, 尤月¹, 周荣易¹, 宋宇尘¹, 雷爽², 韩新民^{1*}

(1. 南京中医药大学 中医儿科研究所, 南京 210023; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨中药复方安神定志灵对注意缺陷多动障碍(ADHD)模型自发性高血压大鼠(SHR)前额叶、纹状体中细胞周期素依赖性蛋白激酶 5(CDK5)/32kDa 多巴胺与环磷酸腺苷(cAMP)调节的磷蛋白(DARPP32)/蛋白磷酸酶 1(PP1)信号通路的影响。方法:将 50 只 SHR 大鼠运用随机区组设计分为模型组、利他林组(2 mg·kg⁻¹)、安神定志灵低、中、高剂量(6.7, 13.4, 26.7 g·kg⁻¹)组,每组 10 只,另设 10 只 Wistar 京都大鼠为正常组。各组 ig 相应药物,每日 2 次,治疗 4 周后取大鼠脑组织。采用蛋白质免疫印迹法(Western blot),免疫组织化学法及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组大鼠前额叶和纹状体中 CDK5,调节蛋白 35(p35),DARPP32,PP1 和 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)蛋白和 mRNA 表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠前额叶、纹状体中 CDK5,p35 及 CREB 的蛋白和 mRNA 表达水平均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),PP1 和 DARPP32 的表达水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。经治疗后,与模型组比较,利他林组、安神定志灵各剂量组前额叶、纹状体中 CDK5,p35,CREB 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),PP1 和 DARPP32 的表达水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:SHR 大鼠行为表现与 CDK5/DARPP32/PP1 信号通路密切相关,安神定志灵可以通过调控该信号通路中相关因子的表达发挥治疗作用。

[关键词] 安神定志灵; 注意缺陷多动障碍; SHR 大鼠; 细胞周期素依赖性蛋白激酶 5/32kDa 多巴胺与环磷酸腺苷调节的磷蛋白/蛋白磷酸酶 1 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0081-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016170081

Effects of Anshen Dingzhiling Compound on Signaling Pathway of CDK5/DARPP32/PP1 in ADHD Rats' Striatum and Prefrontal Cortex

SUN Ji-chao¹, YOU Yue¹, ZHOU Rong-yi¹, SONG Yu-chen¹, LEI Shuang², HAN Xin-min^{1*}

(1. Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Anshen Dingzhiling (ADL) compound on signaling pathways of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) /dopamine and adenosine 3', 5'-monophosphate-regulated phospho-protein, 32 kDa (DARPP-32) /protein phosphatase 1 (PP1) in striatum and prefrontal cortex of spontaneously hypertensive rats (SHR) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Method:** The 10 Wistar Kyoto rats were used as normal group. 50 SHR rats were randomly divided into model group, methylphenidate (MPH) group (2 mg·kg⁻¹ by gavage), and ADL low, middle, and high dose groups (6.7, 13.4, 26.7 g·kg⁻¹ respectively), $n = 10$ in each group. The rats in various groups received corresponding drugs by ig administration, *bid*. The brain tissues of the rats were taken after 4 weeks of treatment. Real-time PCR,

[收稿日期] 20160317(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273801);高等学校博士学科点专项科研基金项目(20123237110002)

[第一作者] 孙继超,在读博士,从事小儿精神神经系统疾病研究,Tel:18252066792,E-mail:sunjichao881177@163.com

[通讯作者] *韩新民,教授,主任医师,博士生导师,从事小儿精神神经系统疾病研究,Tel:15195996828,E-mail:hxm1nj@163.com

Western blot and immunohistochemistry were used to detect the protein and mRNA expression levels of CDK5, p35, DARPP32, PP1 and cAMP response element binding protein (CREB) in striatum and prefrontal cortex of SHR rats. **Result:** As compared with normal group, the protein and mRNA expression levels of CDK5, p35 and CREB in striatum and prefrontal cortex were significantly reduced in rats of model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the expression levels of DARPP32 and PP1 were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After treatment, the protein and mRNA expression levels of CDK5, p35 and CREB in striatum and prefrontal cortex were significantly increased in rats of MPG group and ADL groups as compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the expression levels of DARPP32 and PP1 were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The acts of SHR rats may be associated with the signaling pathway of CDK5/DARPP32/PP1. ADL can exert the therapeutic action by regulating the signaling pathway of CDK5/DARPP32/PP1.

[Key words] Anshen Dingzhiling compound; attention deficit hyperactivity disorder; spontaneously hypertensive rats; signaling pathway of cyclin-dependent kinase 5 /dopamine and adenosine 3', 5'-monophosphate-regulated phospho-protein Mr 32 kDa/protein phosphatase 1

注意缺陷多动障碍 (ADHD) 是儿童常见的神经发育障碍性疾病, 发病率为 6% ~ 8%^[1], 因其多动、冲动、注意力不集中的临床表现及合并障碍, 对个人、家庭、社会产生了严重的负面影响。中医药治疗 ADHD 疗效确切、药物副反应相对较少, 因而受到患儿家长的青睐。韩新民教授在长期临床工作中发现 ADHD 病机多属“心肝火旺、痰火内扰”, 提出“清心平肝, 豁痰开窍, 安神定志”的治则, 拟方安神定志灵用于该病的治疗^[2]。目前 ADHD 的病因和发病机制尚不明确, 基于多巴胺激动剂对 ADHD 的确切疗效及大量的动物实验, 有学者提出脑中多巴胺失衡与 ADHD 的发病密切相关^[3-4]。多巴胺与环磷酸腺苷 (cAMP) 调节的磷蛋白 dopamine and adenosine 3', 5'-monophosphate-regulated phospho-protein Mr 32 kDa (DARPP32) 作为多巴胺信息传递及整合过程中的一个关键分子, 可以抑制蛋白磷酸酶 1 (PP1) 对 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 的抑制作用, 提高 CREB 的表达水平, 进而调控即早基因 c-Fos 及神经营养因子等的表达^[5]。研究发现, DARPP32 介导的信号通路与细胞周期素依赖蛋白激酶 5 (CDK5)/p35 表达密切相关, 故 CDK5/DARPP32/PP1 信号通路作为多巴胺受体下游的信号通路之一, 值得深入研究。为阐明中药复方安神定志灵的药理作用机制, 本研究进行了相关动物实验, 发现安神定志灵的药理作用与多巴胺系统密切相关^[6-8]。本实验拟在前期研究的基础上, 继续选用 ADHD 模型自发性高血压大鼠 (SHR)^[9], 从多巴胺系统着手, 对其前额叶、纹状体 CDK5/DARPP32/PP1 信号通路中的相关因子进行检测, 明确安神定志灵对该信号通路的影响, 以期进一步阐明安神定志灵治疗

ADHD 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SHR 大鼠 50 只, 雄性 Wistar 京都大鼠 10 只, 4 周龄, 体重 (73.4 ± 6.5) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2012-0001。动物饲养于南京中医药大学动物实验中心, 自由饮食进水, 适应性饲养 5 d。

1.2 药物 安神定志灵由醋南柴胡 6 g, 黄芩 10 g, 远志 6 g, 连翘 10 g, 石菖蒲 10 g, 郁金 10 g, 天竺黄 10 g, 钩藤 10 g, 决明子 10 g, 当归 10 g, 地黄 10 g, 益智仁 10 g 组成。全部药材同批次购自江苏省中医院中药房。中药煎剂按照课题组前期研究的水提取工艺进行制备^[10]。将药液分别浓缩至 1.78, 0.89, 0.45 g·mL⁻¹ (高、中、低剂量), 4 °C 保存备用。利他林片 (苏州第一制药有限公司, 国药准字 H32023102, 10 mg/片)。使用前研磨, 加蒸馏水配置成 0.067 g·L⁻¹ 的混合液。4 °C 保存备用。

1.3 主要仪器 Trans-Blot SD 型蛋白半干转印仪、ChemiDoc MP 型凝胶成像系统 (美国 Bio Rad 公司), M200 pro 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), Light Cycle 型 DNA 荧光定量分析仪 (德国 Roche 公司), 5810R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), Quantsstudio7 型荧光 PCR 仪 (美国 Life 公司)。

1.4 主要试剂 β-肌动蛋白 (β-actin) 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz, 货号 sc-47778), Anti-CDK5 抗体, Anti-p35 抗体, Anti-Protein Phosphatase 1 抗体, Anti-CREB 抗体, Anti-DARPP32 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab40773, ab64960, ab53315, ab31387, ab40801), 羊抗兔二抗 (美国 Abcam 公司, 批号 ab6271); BCA 试剂盒, ECL 化学发光底物 (美国

Thermo 公司,批号分别为 23227,32109),Trizol,逆转录试剂盒,实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 试剂盒(日本 Takara 公司,批号分别为 9109,RR036A,RR820A),三氯甲烷等其他试剂均为分析纯。引物序列根据 Gen-Bank 发布序列进行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司设计完成,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(20 bp):上游 5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3',下游 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3';CDK5(20 bp):上游 5'-TAGGGACACCGACTGAGGAA-3',下游 5'-CACGACATTACCAAGGATG-3';p35(20 bp):上游 5'-AAAGGTGTGGATGAGGCAAC-3',下游 5'-GGCTTCCCAGTCTCCTGTAA-3';CREB(20 bp):上游 5'-GGAGTTGTTATGGCGTCTCTC-3',下游 5'-TCTTGCTGCTTCCCTGTTCT-3';DARPP32(20 bp):上游 5'-CTGTGTTTGCTTTGGCTGAA-3',下游 5'-GTTTCCAGTGTGGTGCTTG-3'。

2 方法

2.1 动物分组及给药 运用随机区组设计^[11]将 50 只 SHR 大鼠分为模型组、利他林组、安神定志灵高、中、低剂量(26.7,13.4,6.7 g·kg⁻¹)组,每组 10 只;另将 10 只 Wistar 大鼠设为正常组。安神定志灵中剂量等同于人类临床等效剂量,大鼠服药量根据 9 岁(体重 26 kg)儿童体表面积和 4 周龄(体重 60 g)SHR 幼鼠体表面积进行平行转换^[12]。正常组、模型组均 ig 蒸馏水(15 mL·kg⁻¹),利他林组、安神定志灵组分别 ig 相应药物(15 mL·kg⁻¹),每日 2 次,连续 4 周。

2.2 样本制备 末次给药 24 h 后每组随机选取 3 只大鼠麻醉,充分暴露心脏后,将灌注针插入左心室心尖,剪开右心耳,用生理盐水快速灌注,待肝脏颜色变为淡红,换 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液(PBS)缓慢灌注后;迅速剥离大鼠脑组织,4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后行石蜡包埋及冠状切片。剩余大鼠麻醉后直接取脑,分离大脑前额叶及纹状体,-80 °C 保存备用。

2.3 免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达

脑组织加入裂解混合液 200 μL 冰上裂解 30 min 后,离心取上清。测定蛋白浓度,进行蛋白变性,上样,凝胶电泳,转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭,分别加入兔源 CDK5 一抗(1:2 000),兔源 p35 一抗(1:500),兔源 CREB 一抗(1:500),兔源 DARPP32 一抗(1:5 000)4 °C 孵育过夜,羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,显影,ChemiDoc MP 凝胶成像系统成

像。结果采用 Adobe Photoshop CS5 软件分析蛋白条带灰度值,以 β-actin 作为内参,以目的蛋白条带灰度值/β-actin 表示目的蛋白的相对表达水平。

2.4 Real-time PCR 检测 mRNA 表达 脑组织提取总 RNA,参照逆转录试剂盒操作逆转录为 cDNA,反应条件 37 °C 15 min,85 °C 5 s;Real-time PCR 参照说明书进行,扩增条件 95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 20 s,循环 40 次,同时做溶解曲线,重复 3 次。结果采用相对定量法计算 2^{-ΔΔCt}。

2.5 免疫组织化学检测相关蛋白表达 切片常规脱蜡水化,灭活内源性过氧化物酶,加入复合消化液消化、抗原修复液修复、正常山羊血清封闭液封闭,滴加抗 PPI 一抗(1:100),37 °C 孵育 2 h,滴加生物素化二抗,37 °C 孵育 1 h,滴加 SABC 于 37 °C 反应 30 min,采用 DAB 显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片。以棕黄色或淡黄色颗粒染色为阳性表达,每组取 5 个视野,计算吸光度 A。

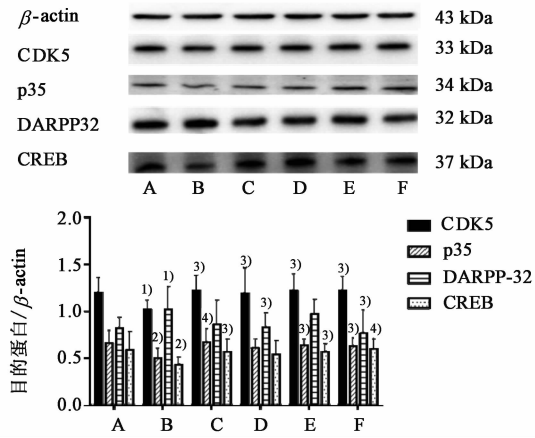
2.6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 和 Dunnett 法,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠前额叶 CDK5, p35, DARPP32, CREB 蛋白相对表达 与正常组比较,模型组中前额叶 CDK5, p35, CREB 蛋白表达水平明显降低(P < 0.05, P < 0.01);经治疗后,与模型组比较,利他林组及安神定志灵中、高剂量组均可明显上调上述蛋白表达水平(P < 0.05, P < 0.01)。与正常组比较,模型组前额叶 DARPP32 蛋白的表达水平明显增加(P < 0.05);经治疗后,与模型组比较,安神定志灵低、高剂量组均可明显下调 DARPP32 蛋白表达水平(P < 0.05)。见图 1。

3.2 各组大鼠纹状体中 CDK5, p35, DARPP32, CREB 蛋白相对表达 与正常组比较,模型组纹状体中 p35 蛋白表达明显降低(P < 0.05);经药物治疗后,与模型组比较,利他林组可明显上调 p35, CREB 蛋白表达水平(P < 0.05, P < 0.01),安神定志灵中、高剂量组均可明显上调 CDK5, p35, CREB 蛋白表达水平(P < 0.05, P < 0.01)。与正常组比较,模型组纹状体 DARPP32 蛋白表达显著增加(P < 0.01);经治疗后,与模型组比较,利他林组及安神定志灵各剂量组均可显著下调 DARPP32 蛋白表达(P < 0.01)。见图 2。

3.3 各组大鼠前额叶 CDK5, p35, DARPP32, CREB



A. 正常组; B. 模型组; C. 利他林组; D ~ F. 安神定志灵 (6.7, 13.4, 26.7 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (图 2 ~ 6 同)

图 1 安神定志灵对各组大鼠前额叶 CDK5, p35, DARPP32, CREB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of ADL on protein expression levels of CDK5, p35, DARPP32 and CREB in rats' prefrontal cortex ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

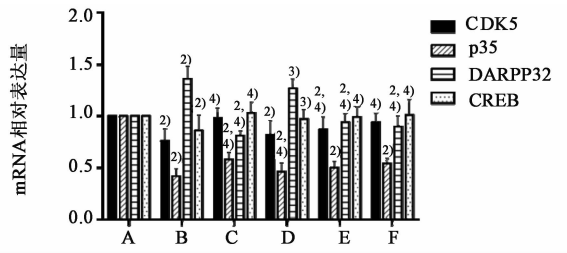


图 3 安神定志灵对各组大鼠前额叶 CDK5, p35, DARPP32, CREB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of ADL on mRNA expression levels of CDK5, p35, DARPP32 and CREB in rats' prefrontal cortex ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

定志灵中、高剂量组 CDK5, p35 mRNA 表达明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组纹状体 DARPP32 mRNA 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 经治疗后, 与模型组比较, 利他林组及安神定志灵各剂量组均能显著下调其表达 ($P < 0.01$)。见图 4。

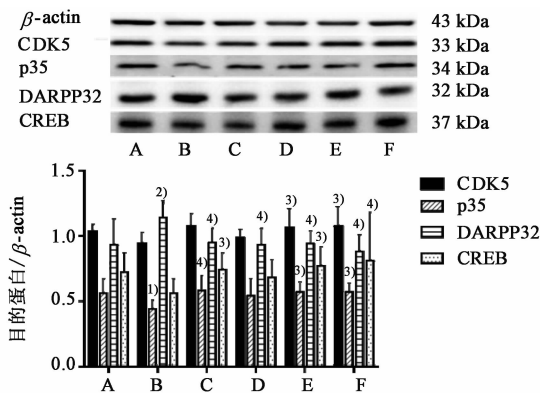


图 2 安神定志灵对各组大鼠纹状体 CDK5, p35, DARPP32, CREB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of ADL on protein expression levels of CDK5, p35, DARPP32 and CREB in rats' striatum ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

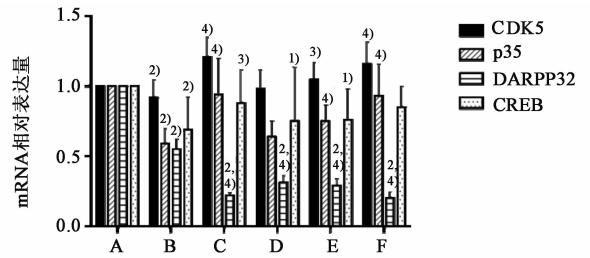


图 4 安神定志灵对各组大鼠纹状体 CDK5, p35, DARPP32, CREB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effects of ADL on mRNA expression levels of CDK5, p35, DARPP32 and CREB in rats' striatum ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

mRNA 表达 与正常组比较, 模型组前额叶中 CDK5, p35, CREB mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 经治疗后, 与模型组比较, 利他林组及安神定志灵各剂量组均能明显上调上述 mRNA 表达水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组前额叶 DARPP32 mRNA 的表达显著增加 ($P < 0.01$); 经治疗后, 与模型组比较, 利他林组及安神定志灵各剂量组均能明显下调其表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3。

3.4 各组大鼠纹状体 CDK5, p35, DARPP32, CREB mRNA 表达 与正常组比较, 模型组纹状体中 CDK5, p35, CREB mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 经治疗后, 与模型组比较, 利他林组及安神

3.5 各组大鼠前额叶、纹状体 PP1 蛋白表达 与正常组比较, 模型组大鼠前额叶及纹状体中 PP1 阳性黄染颗粒明显增加, 其平均光密度值明显高于正常组 ($P < 0.05, P < 0.01$); 经治疗后, 与模型组比较, 利他林组及安神定志灵各剂量组 PP1 蛋白阳性表达均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1, 图 5, 6。

4 讨论

CDK5 是一种主要表达在神经元内的脯氨酸限制的丝/苏氨酸蛋白激酶, 通过对底物的磷酸化调节神经元的生物活性^[13]。其本身没有酶活性, 只有结合其调节蛋白 p35, p29 等后有生物活性, 而调节蛋白 p35 只在脑组织表达, 是神经元特异性蛋白。相关研究发现 CDK5 与突触形成、突触可塑性及脑的高级功能密切相关, 其机制涉及突触前神经递质释放及对突触后神经递质受体的调控^[14]。CDK5 在神经系统的质量作用也预示着其与诸多神经系统疾病密切相关, 尤其是神经退行性疾病如阿尔茨海

表 1 安神定志灵对各组大鼠前额叶、纹状体 PP1 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of ADL on protein expression levels of PP1 in rats' prefrontal cortex and striatum ($\bar{x} \pm s, n = 6$) A

组别	剂量/g·kg ⁻¹	前额叶	纹状体
正常	-	0.086 ± 0.002	0.094 ± 0.001
模型	-	0.102 ± 0.002 ²⁾	0.097 ± 0.001 ¹⁾
利他林	0.002	0.082 ± 0.000 ³⁾	0.090 ± 0.000 ^{2,3)}
安神定志灵	6.7	0.092 ± 0.001 ^{1,3)}	0.085 ± 0.002 ^{2,3)}
	13.4	0.094 ± 0.005 ^{2,3)}	0.088 ± 0.001 ^{2,3)}
	26.7	0.075 ± 0.003 ^{2,3)}	0.084 ± 0.002 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

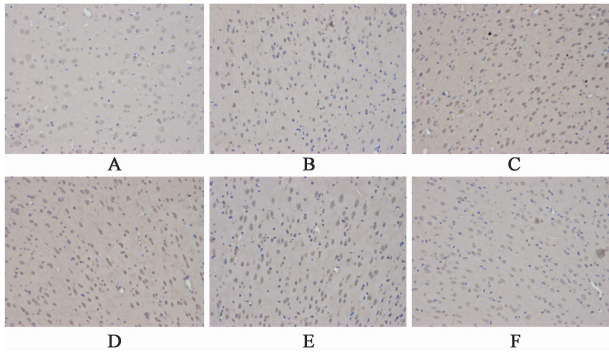


图 5 安神定志灵对各组大鼠前额叶 PP1 蛋白表达的影响 (IHC, × 200)

Fig. 5 Effects of ADL on protein expression levels of PP1 in rats' prefrontal cortex (IHC, × 200)

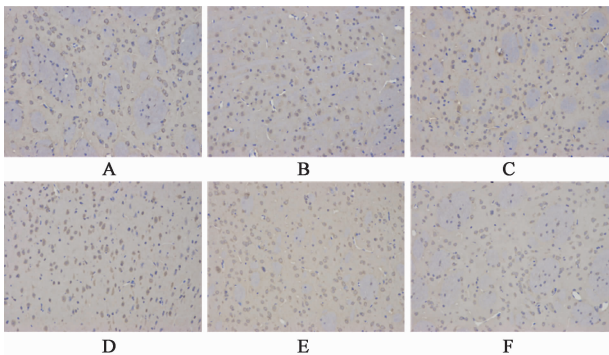


图 6 安神定志灵对各组大鼠纹状体 PP1 蛋白表达的影响 (IHC, × 200)

Fig. 6 Effects of ADL on protein expression levels of PP1 in rats' striatum (IHC, × 200)

默症、帕金森病等。随着对其结构、功能认识的加深,以及基因敲除动物的广泛应用,国外学者发现 p35 基因敲除动物表现出明显的多动症状,提示 p35 变化引起 CDK5 活性的改变是多动行为的潜在诱因^[15],这为研究 ADHD 的发病机制提供了新的可

能。鉴于 DARPP32 介导的信号通路与 CDK5/p35 表达密切相关,故 CDK5/DARPP32/PP1 信号通路值得进一步深入研究。

安神定志灵是南京中医药大学韩新民教授治疗 ADHD 的经验方,临床疗效确切^[16]。方中黄芩、连翘清心泻火;醋南柴胡、郁金疏肝郁之热;决明子清肝火,平肝阳,泄热通便;天竺黄清解无形之痰;钩藤平肝息风止痉;石菖蒲豁痰开窍;当归养血活血;地黄滋补肝肾之阴;益智仁补肾益智;远志祛痰开窍,宁心安神。诸药合用清心平肝,豁痰开窍,可使心火得清,肝阳得平,肝肾得补,阴阳得调,安神定志,使多动、注意力不集中等症得以消除。课题组前期研究发现安神定志灵能减少 SHR 大鼠自发活动,缓解其焦虑行为,并能改善大鼠空间学习和记忆能力^[6];药理实验发现安神定志灵可以上调 SHR 大鼠前额叶和纹状体中 D1, D2 受体 mRNA 及蛋白的表达水平,降低 SHR 大鼠纹状体中多巴胺转运体 mRNA 及蛋白的表达水平^[7,17],说明安神定志灵治疗 ADHD 的作用机制与多巴胺系统密切相关。

本实验结果显示与正常组比较,模型组前额叶及纹状体中 CDK5, p35 及 CREB 蛋白和 mRNA 表达水平均明显下降,而 PP1 与 DARPP32 的表达呈相反趋势。表明 SHR 大鼠前额叶及纹状体中上述指标的表达水平与 WKY 大鼠存在明显的差异,提示该信号通路可能与 ADHD 的症状表现相关,而利他林及安神定志灵能够上调 SHR 大鼠前额叶及纹状体中 CDK5, p35 及 CREB 蛋白和 mRNA 的表达水平,下调 DARPP32 的表达水平,提示 CDK5/DARPP32/PP1 信号通路可能是药物的作用靶点之一。结合前期研究结果及文献报道,本课题组认为 CDK5/DARPP32/PP1 信号通路对 ADHD 的影响可能与以下途径相关,①CDK5 能够调控突触前膜递质囊泡大小,通过激活突触前膜终端抑制突触囊泡对于神经递质的释放^[18],从而影响突触间隙神经递质的浓度,这可能与多动行为的发生相关。②CDK5 可以磷酸化突触后膜谷氨酸 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)受体中的 NR2A 受体、突触后致密蛋白 95 (PSD-95)以及 DARPP32 和多巴胺 D2 受体,进而影响神经递质与受体的结合,并通过抑制 PP1 提高 CREB 的表达水平,最终影响 SHR 大鼠的行为表现^[19-20]。安神定志灵如何调控多巴胺经典信号通路及对多巴胺受体活性的影响是下一步研究的重点。

[参考文献]

- [1] Polanczyk G V, Willcutt E G, Salum G A, et al. ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis[J]. *Int J Epidemiol*, 2014, 43(2):434-442.
- [2] 韩新民. 儿童多动症心肝火旺证探析[J]. *中医儿科杂志*, 2006, 2(1):11-13.
- [3] Volkow N D, Wang G J, Newcom J, et al. Depressed dopamine activity in caudate and preliminary evidence of limbic involvement in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder[J]. *Aich Gen Psychiatry*, 2007, 64(8):932-940.
- [4] Volkow N D, Wang G J, Fowler J S, et al. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Biol Psychiatry*, 2005, 57(11):1410-1415.
- [5] Brami-Cherrier K, Valjent E, Garcia M, et al. Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(20):8911-8921.
- [6] 苗竞, 刘成全, 韩新民. 安神定志灵对注意力缺陷多动障碍模型大鼠自发活动、焦虑及空间学习能力的影响[J]. *实验动物与比较医学*, 2014, 34(3):210-213.
- [7] 刘成全, 韩新民, 徐建亚, 等. 安神定志灵对 ADHD 模型大鼠纹状体多巴胺转运体表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23):101-104.
- [8] 雷爽, 韩新民, 袁海霞, 等. 安神定志灵对 SHR 大鼠前额叶皮质去甲肾上腺素 alpha2A 受体蛋白表达的影响[J]. *中成药*, 2015, 37(8):1832-1835.
- [9] Sagvolden T, Johansen E B, Woien G, et al. The spontaneously hypertensive rat model of adhd-the importance of selecting the appropriate reference strain [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 57(7/8):619-626.
- [10] 王店云, 单进军, 韩新民. 正交试验法优选安神定志灵的水提取工艺[J]. *辽宁中医杂志*, 2014, 41(6):1249-1251.
- [11] 周一平. 用 Excel 软件进行药物毒理实验的随机分组[J]. *药学进展*, 2005, 29(9):425-427.
- [12] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited [J]. *Faseb J*, 2008, 22(3):659-661.
- [13] Tawauchi T. Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease [J]. *Develop Growth Differ*, 2014, 56(5):335-348.
- [14] Kessels H W, Malinow R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior [J]. *Neuron*, 2009, 61(3):340-350.
- [15] Drerup J M, Hayashi K, Cui H, et al. Attention-deficit/hyperactivity phenotype in mice lacking the cyclin-dependent kinase 5 cofactor p35 [J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 68(12):1163-1171.
- [16] 韩新民, 朱先康. 安神定志灵治疗儿童多动症 58 例临床观察[J]. *河北中医*, 2004, 26(12):898-899.
- [17] 刘成全, 韩新民, 徐建亚, 等. 安神定志灵对 ADHD 模型鼠前额叶皮质和纹状体多巴胺 D1, D2 受体表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(7):136-139.
- [18] Kim S H, Ryan T. CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release [J]. *Neuron*, 2010, 67(5):797-809.
- [19] Plattner F, Hernandez A, Kistler T M, et al. Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B [J]. *Neuron*, 2014, 81(5):1070-1083.
- [20] Jeong J, Park Y U, Kim D K, et al. Cdk5 phosphorylates dopamine d2 receptor and attenuates downstream signaling [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e84482.

[责任编辑 张丰丰]