

# 安神定志灵对大鼠脑内突触体多巴胺合成相关因子表达的影响

周荣易, 尤月, 孙继超, 宋宇尘, 袁海霞, 王娇娇, 韩新民\*  
(南京中医药大学, 南京 210023)

**[摘要]** **目的:**研究安神定志灵对酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH),多巴脱羧酶(DOPA decarboxylase, DDC),蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)的调控作用,揭示安神定志灵治疗注意缺陷多动障碍(ADHD)的药效机制。**方法:**依据随机数字将自发性高血压(SHR)大鼠分为模型组,利他林组,安神定志灵低、中、高剂量(6.75, 13.35, 26.70 g·kg<sup>-1</sup>)组,每组 8 只,另设 WKY 大鼠 8 只为正常组,分别灌胃 4 周。Percoll 密度梯度离心法制各脑突触体,运用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TH, PKA 蛋白表达;运用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)技术检测 TH, DDC, PKA mRNA 表达水平,运用免疫荧光技术检测 TH, DDC 阳性细胞表达量。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠突触体内 TH, DDC, PKA 表达量显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,利他林组及安神定志灵中剂量组突触体内 TH, PKA 蛋白及 TH, PKA, DDC mRNA 表达量及阳性细胞数均有所升高( $P < 0.05$ );免疫组化阳性细胞计数显示,与正常组比较,模型组及安神定志灵高剂量组 TH 阳性细胞表达显著降低( $P < 0.01$ ),安神定志灵低剂量组 TH 阳性细胞表达明显降低( $P < 0.05$ );模型组及安神定志灵低剂量组中 DDC 阳性细胞表达显著降低( $P < 0.01$ );治疗后与模型组比较,利他林组及安神定志灵低、中剂量组 TH 阳性细胞表达显著上升( $P < 0.01$ ),利他林组及安神定志灵中、高剂量组 DDC 阳性细胞数上升显著( $P < 0.01$ )。**结论:**安神定志灵通过调控 TH, DDC, PKA 的表达,影响多巴胺的合成速度,安神定志灵控制 ADHD 核心症状的作用可能与调控多巴胺合成速度有关。

**[关键词]** 安神定志灵; 酪氨酸羟化酶; 多巴脱羧酶; 蛋白激酶 A; 自发性高血压大鼠; 突触体

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0103-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120103

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1439.064.html>

**[网络出版时间]** 2017-03-24 14:39

## Effect of Anshen Dingzhiling on Synaptosome Dopamine Synthesis Related Factor Expression in Rats

ZHOU Rong-yi, YOU Yue, SUN Ji-chao, SONG Yu-chen, YUAN Hai-xia,  
WANG Jiao-jiao, HAN Xin-min\*  
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the regulation effect of Anshen Dingzhiling (ADL) on tyrosine hydroxylase (TH), DOPA decarboxylase (DDC), and protein kinase A (PKA), and reveal the effect mechanism of Anshen Dingzhiling in treatment of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Method:** Spontaneously hypertensive (SHR) rats were divided into model group, western medicine group, ADL high, medium and low dose (26.70, 13.35, 6.75 g·kg<sup>-1</sup>) groups based on random number,  $n = 8$  in each group. Another 8 WKY rats were set as normal group. The rats in each group received lavage administration for 4 weeks. Brain synaptosome was prepared by using Percoll density gradient centrifugation method. Western blot method was used to

**[收稿日期]** 20161227(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81273801);江苏省教育厅研究生创新工程项目(KYZZ16\_0410)

**[第一作者]** 周荣易,在读博士,从事小儿精神神经系统疾病研究, Tel:18351893662, E-mail:zhourongyitem@sina.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

detect the protein expression levels of TH and PKA; Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) technique was used to detect mRNA expression levels of TH, DDC, PKA; and immunofluorescence technique was used to detect TH, and DDC positive cells expression. **Result:** As compared with normal group, the synaptic TH, DDC, and PKA expression levels were significantly reduced in model group ( $P < 0.01$ ); as compared with model group, the synaptic TH, PKA protein expression levels, TH, PKA, DDC mRNA expression levels, and number of positive cells were increased in western medicine group and ADL medium dose group ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry positive cell count results showed that as compared with normal group, TH positive cells expressing level was significantly reduced in model group and ADL high dose group ( $P < 0.01$ ), and TH positive cells expressing level was reduced in ADL low dose group ( $P < 0.05$ ); DDC positive cells expressing level was significantly reduced in model group and ADL low dose group ( $P < 0.01$ ). As compared with model group, TH positive cells expressing level was significantly increased in western medicine group and ADL low dose and medium dose groups ( $P < 0.01$ ); in addition, number of DDC positive cells was increased significantly in the western medicine group and ADL medium and high dose groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** ADL could affect the speed of dopamine synthesis through regulating the expression of TH, DDC, PKA, and the effect of ADL for core symptoms of ADHD may be related to the regulation of dopamine synthesis speed.

[**Key words**] Anshen Dingzhiling; tyrosine hydroxylase (TH); DOPA decarboxylase (DDC); protein kinase A (PKA); spontaneously hypertensive (SHR) rats; synaptosome

注意缺陷多动障碍 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 又称儿童多动症, 是儿童时期常见的精神神经系统疾病, 全球发病率约为 5.9%, 且有不断上升的趋势<sup>[1]</sup>。本病以多动、冲动、注意力不集中为核心症状。众多研究证实 ADHD 与犯罪行为存在密切关联<sup>[2]</sup>, 且本病约有 1/4 患者症状会持续到成年阶段, 导致患者社会适应能力和交往能力下降, 自杀倾向增高<sup>[3]</sup>。本病不断升高的发病趋势及不断增大的社会危害, 使其受到社会的关注度不断上升, 探寻有效的治疗方法是当前的重要任务。目前西医学治疗本病的一线药物为盐酸哌甲酯, 虽能较好的控制本病的核心症状, 但作为精神类药品, 存在诱发抽动、引起焦虑、抑郁及诱导肥胖等不足<sup>[4-5]</sup>, 使得依从性较差, 影响了本病的治疗。安神定志灵是南京中医药大学韩新民教授的经验方, 该方是其在《小儿药证直诀》、《小儿卫生总微方论》、《幼幼集成》等儿科著作中有关儿童神经系统疾病用药规律及本人 30 余年治疗儿童神经系统疾病临证经验总结的基础上创制而成<sup>[6]</sup>, 具有清心平肝、豁痰开窍、安神定志的功效, 临床及实验研究均证实疗效确切<sup>[7]</sup>。多巴胺系统功能异常为 ADHD 发病的国际研究热点, 但从多巴胺合成机制角度的研究尚未见详细报道。课题组前期研究表明安神定志灵能够作用于多巴胺系统, 对多巴胺转运体及多巴胺受体等均有一定的影响<sup>[8-9]</sup>, 为进一步研究安神定志灵治疗 ADHD 的疗效机制, 课题组在前期

研究的基础上, 以突触体为研究切入点, 拟从多巴胺合成角度研究安神定志灵对多巴胺合成途径的影响。

## 1 材料

**1.1 分组** SPF 级自发性高血压 (SHR) 大鼠 40 只, 雄性, 4 周龄, 体重 ( $71.5 \pm 6.6$ ) g; SPF 级 Wistar 大鼠 8 只, 雄性, 4 周龄, 体重 ( $72.4 \pm 5.8$ ) g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2014-0001。按照随机数字表法将 SHR 大鼠随机分为模型组、利他林组、安神定志灵高、中、低剂量组, 每组 8 只, Wistar 大鼠 8 只设为正常组, 所有动物饲养于南京中医药大学 SPF 级动物房并经南京中医药大学实验动物伦理委员会审查通过, 使用许可证号 SYXK(苏)2014-0001。

**1.2 药品制备** 盐酸哌甲酯 (专注达, Janssen Cilag Manufacturing LLC 公司, 进口药品注册证号 H20120111, 36 mg/片), 将药品加生理盐水溶解配制成  $0.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  混合溶液,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存, 灌胃前按需取出, 复温至室温后灌胃给药。

安神定志灵方中所有药品均同一批次购置于江苏省中医院中药房, 中药饮片由南京中医药大学中药资源与开发与利用专业负责人, 中药资源学教研室主任巢建国教授鉴定为正品。主要组成: 柴胡 6 g, 黄芩 6 g, 郁金 10 g, 石菖蒲 10 g, 钩藤 10 g, 远志 (制) 6 g, 益智仁 10 g, 地黄 10 g, 天竺黄 10 g, 当归 (全) 10 g, 连翘 10 g, 决明子 10 g 共 12 味中药。药

品煎煮制备工艺按课题组前期研究方案进行<sup>[10]</sup>, 采用旋转蒸发器将药液浓缩至生药含量为 1.78, 0.89, 0.45 g·mL<sup>-1</sup>, 4 °C 保存, 灌胃前按需取出, 复温至室温后灌胃给药。

**1.3 仪器** Allegra 64R 型离心机(美国 Beckman Coulter 公司); 5427R 型离心机(德国 Eppendorf 公司); 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); Light Cycle 型 DNA 荧光定量分析仪(德国 Roche 公司); Quantsstudio7 型荧光 PCR 仪(美国 Life 公司)。

**1.4 试剂**  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司, 货号 sc-47778); Anti-蛋白激酶 A (PKA) 2 beta, Anti-Tyrosine Hydroxylase, Anti-DOPA Decarboxylase, 羊抗兔二抗(美国 Abcam 公司, 货号分别为 ab75993, ab6211, ab3905, 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(美国 Takara 公司, 批号分别为 9109, RR036A, RR820A); 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI, 美国 Sigmag 公司, 货号 D8417)。引物序列依据 Gen-Bank 公布的序列进行设计, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 多巴脱羧酶(DDC, 20 bp): 上游 5'-CACAACATGCTGCTCCTTTG-3', 下游 5'-TAAG CCCTGAATCCTGATGG-3'; 酪氨酸羟化酶(TH, 20 bp): 上游 5'-CGAGCTGTGAAGGTGTTGA-3', 下游 5'-GTACACCTGGTCCGAGAAGC-3'; PKA (20 bp): 上游 5'-CTGGAGCAGTTGCCGAGATTT-3', 下游 5'-GCTGCATGTGAATTTTGTGG-3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 20 bp): 上游 5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3', 下游 5'-AGCCC AGGATGCCCTTTAGT-3'。

## 2 方法

**2.1 给药** 大鼠灌胃(*ig*)量根据 9 岁儿童(体重 26 kg)体表面积和 4 周龄 SHR 大鼠(体重 60 g)体表面积进行转换<sup>[11]</sup>, 每日上午 8:00 前称量大鼠, 根据动物体重调整 *ig* 量。利他林(1.05 mg·kg<sup>-1</sup>)组及安神定志灵高、中、低剂量组(26.70, 13.35, 6.75 g·kg<sup>-1</sup>)按体重给予对应药物 *ig*, 正常组、模型组 *ig* 等量生理盐水, 体积为 1.5 mL/100 g, 每日约上午 8:00~9:00, 下午 13:30~14:30 进行灌胃, 持续 4 周。

**2.2 材料收集** 末次给药 24 h 后断头处死大鼠, 冰上迅速分离大鼠前额叶、纹状体, 置于冻存管中液氮保存, 取材结束后转移至 -80 °C 保存备用。免疫

荧光样品制备: 末次给药 24 h 后每组随机选取实验动物 4 只, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 行 4% 多聚甲醛灌注固定, 灌注完毕取出脑组织, 置 4 °C, 4% 多聚甲醛中固定过夜, 然后放入 30% 蔗糖溶液中沉底。

**2.3 突触体制备** 取前额叶、纹状体, 用大量预冷均质缓冲液洗去血液等杂质, 滤纸吸干后称质量, 将组织剪碎放入研磨管研磨, 采用 Percoll 密度梯度离心法制备突触体备用<sup>[12]</sup>。

**2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测突触体内 TH, PKA 蛋白表达** 脑组织加入裂解混合液 200 L, 冰上裂解 30 min 后, 离心取上清, 按照 BCA 试剂盒操作说明提取蛋白、测定浓度、蛋白变性。按照实验操作步骤制胶、上样、电泳、转膜, 5% BSA 室温封闭 2 h。分别加入兔源 PKA 一抗(1:50 000), 兔源 TH 一抗(1:200)4 °C 孵育 8 h, 羊抗兔二抗室温孵育 2 h(1:3 000), 冲洗条带 3 次, 每次 5 min, ChemiDoc MP 凝胶成像系统成像系统曝光。Bio-Red Image Lab 5.1 软件分析各泳道条带灰度值, 以  $\beta$ -actin 为参照, 以目的蛋白灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值表述目的蛋白的相对表达量。

**2.5 Real-time PCR 检测 mRNA 表达** 取制备的前额叶、纹状体突触体提取突触体总 RNA, 参照逆转录试剂盒操作逆转录为 cDNA, 96 孔板加样, 离心, 放入 Quantsstudio7 型荧光 PCR 仪进行 PCR 实验, 反应条件为 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, 实验结果取 RQ 值进行分析。

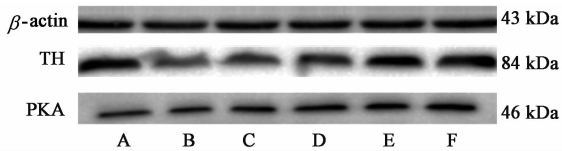
**2.6 纹状体免疫荧光检测 TH, DDC 表达** 取纹状体, 包埋, 冰冻切片机 -20 °C 迅速冷冻, 连续冠状切片, 切片厚约 15~20  $\mu$ m, 隔 2 张取 1 张, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次, 每次 5 min, 封闭, 孵育。加兔源 TH 一抗(1:800), 兔源 DDC 一抗(1:300)4 °C 孵育过夜, 加 DAPI(1:1 000)荧光二抗避光室温孵育 2 h, PBS 洗涤 4 次, 每次 5 min, 甘油封片, 荧光显微镜下观察, 计算阳性细胞数。

**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 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 安神定志灵对大鼠突触体内 TH, PKA 蛋白表达水平的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠突触体内 TH, PKA 表达显著降低( $P < 0.01$ ); 与模型组

比较,利他林组及安神定志灵中剂量组突触体内 TH, PKA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ),安神定志灵高剂量组 TH, PKA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。见图 1,表 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 利他林组;D. 安神定志灵低剂量组;E. 安神定志灵中剂量组;F. 安神定志灵高剂量组(图 2,3 同)

图 1 大鼠突触体 TH, PKA 蛋白表达电泳

Fig.1 Electrophoresis of protein expression of TH, PKA in rat's brain synaptosome

**3.2 安神定志灵对大鼠突触体内 TH, PKA, DDC mRNA 表达水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠突触体内 TH, PKA mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ),DDC mRNA 表达无统计学差异。经治疗后,与模型组比较,利他林组大鼠突触体内 TH,

表 2 安神定志灵对各组大鼠 TH, PKA, DDC mRNA 相对表达水平影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of Anshen Dingzhiling on mRNA expression of TH, PKA and DDC ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PKA	TH	DDC
正常	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	-	0.74 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.69 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.85 ± 0.04
利他林	1.05 × 10 <sup>3</sup>	1.28 ± 0.11 <sup>3)</sup>	1.07 ± 0.09 <sup>3)</sup>	1.13 ± 0.06
安神定志	6.75	0.98 ± 0.09 <sup>2)</sup>	1.05 ± 0.04 <sup>2)</sup>	1.06 ± 0.95
	13.35	1.39 ± 0.12 <sup>3)</sup>	1.11 ± 0.13 <sup>3)</sup>	0.94 ± 0.07
	26.70	0.90 ± 0.10	0.89 ± 0.04	0.95 ± 0.87

**3.3 安神定志灵对大鼠纹状体中 TH, DDC 表达水平的影响** 与正常组比较,模型组及安神定志灵高剂量组 TH 阳性细胞表达量显著降低 ( $P < 0.01$ );经治疗后,与模型组比较,利他林组及安神定志灵低、中剂量组 TH 阳性细胞表达量显著上升 ( $P < 0.01$ ), DDC 阳性细胞数在利他林组及安神定志灵中、高剂量组上升显著 ( $P < 0.01$ )。见图 2,3,表 3。

#### 4 讨论

多巴胺是脑内重要的单胺类神经递质,在调控人体运动功能和情感表达上具有至关重要的作用<sup>[13]</sup>。多巴胺系统是已知的众多脑部疾病发病的关键,因此也是当前国内外研究的重点和热点<sup>[14]</sup>。ADHD 发病机制复杂,病因众多,国际上尚未有明确的研究结论。在众多理论假说中,多巴胺缺陷理论在国际上认可度最高,并不断被相关实验研究所证实<sup>[15]</sup>,ADHD 与多巴胺系统之间的关系可能是探究本病发病机制的一个突破口。有关多巴胺缺陷理论

表 1 安神定志灵对大鼠突触体 TH, PKA 蛋白相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of Anshen Dingzhiling on protein expression of TH and PKA ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PKA/β-actin	TH/β-actin
正常	-	1.034 ± 0.138	1.559 ± 0.218
模型	-	0.651 ± 0.113 <sup>1)</sup>	0.867 ± 0.142 <sup>1)</sup>
利他林	1.05 × 10 <sup>3</sup>	0.998 ± 0.106 <sup>2)</sup>	1.520 ± 0.269 <sup>2)</sup>
安神定志	6.75	0.819 ± 0.121	1.225 ± 0.158
	13.35	1.007 ± 0.141 <sup>2)</sup>	1.472 ± 0.270 <sup>2)</sup>
	26.70	1.068 ± 0.147 <sup>3)</sup>	1.545 ± 0.218 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

PKA, DDC mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ),安神定志灵低剂量组 TH, DDC mRNA 表达水平明显提高 ( $P < 0.05$ ),安神定志灵中剂量组 TH, PKA mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

的研究中,多巴胺转运体功能的异常是学者们关注的重点,也取得了一些重要的研究成果<sup>[16]</sup>。然而,多巴胺系统是一个复杂的神经网络,DAT 虽然在维持脑内多巴胺含量上意义重大,但影响脑内多巴胺含量的因素众多<sup>[17]</sup>。多巴胺在合成、释放及清除的每个环节出现问题,均可能导致脑内多巴胺含量的异常。因此,本实验从多巴胺合成角度展开研究,试图从多巴胺合成机制上探讨 ADHD 的发病机制。

突触是神经元之间在功能上发生联系的部位,是神经化学信息传递的必经之处。由于其特殊位置和作用,突触是探讨脑功能的关键所在,脑部功能探讨和疾病防治都与其息息相关<sup>[18]</sup>。中国科学院院士陈宜张<sup>[19]</sup>曾明确提出:“突触是脑内基本信息加工的节点部位,突触的功能失调应该是许多——即使不是所有——脑部疾病的基础”、“突触的功能和分子机制研究或是解开众多脑部疾病复杂原因的途径”。且多巴胺的合成主要在大脑多巴胺神经元突触

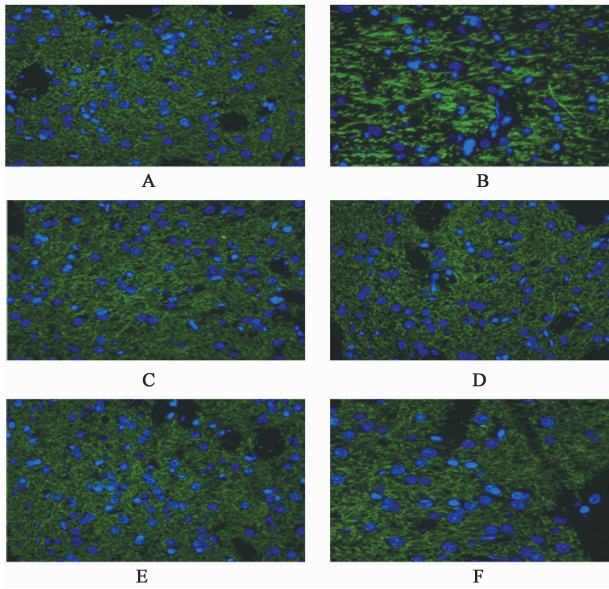


图 2 安神定志灵对 SHR 大鼠纹状体 TH 阳性细胞表达的影响 (DAPI, ×400)  
Fig. 2 Effect of Anshen Dingzhiling on TH positive cells expression levels in striatum of SHR rats (DAPI, ×400)

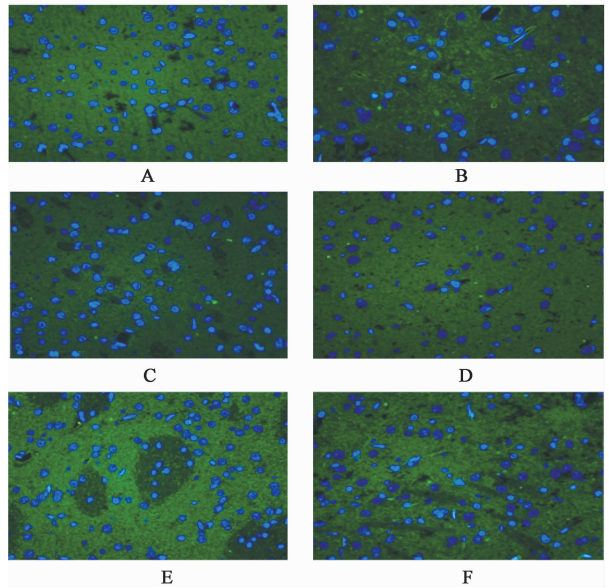


图 3 安神定志灵对 SHR 大鼠纹状体 DDC 阳性细胞表达的影响 (DAPI, ×400)  
Fig. 3 Effect of Anshen Dingzhiling on DDC positive cells expression levels in striatum of SHR rats (DAPI, ×400)

前膜内进行。基于以上原因,本实验引入了突触体作为实验切入点。多巴胺在突触前膜的合成涉及两个关键酶类 TH 和 DDC。神经元摄取血液中的酪氨酸进入细胞浆,酪氨酸在细胞浆内被酪氨酸羟化酶 TH 催化,形成多巴胺。而多巴脱羧酶 DDC 可以促进细胞浆内的多巴脱羧基形成多巴胺,该步反应为速度为多巴合成速度的 100 倍。酪氨酸羟化酶催化

表 3 安神定志灵对各组大鼠纹状体中 TH, DDC 阳性细胞计数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 3 Effect of Anshen Dingzhiling on TH and DDC positive cells expression levels in striatum of rats in all groups ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TH	DDC
正常	-	45.66 ± 6.37	36.50 ± 3.93
模型	-	28.16 ± 5.98 <sup>2)</sup>	20.00 ± 2.36 <sup>2)</sup>
利他林	1.05 × 10 <sup>3</sup>	42.00 ± 3.74 <sup>3)</sup>	33.50 ± 5.16 <sup>3)</sup>
安神定志	6.75	38.00 ± 3.03 <sup>1,3)</sup>	17.50 ± 2.42 <sup>2)</sup>
	13.35	41.50 ± 2.66 <sup>3)</sup>	34.66 ± 3.98 <sup>3)</sup>
	26.70	32.66 ± 5.04 <sup>2)</sup>	33.51 ± 4.08 <sup>3)</sup>

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

反应需要氧分子, Fe<sup>2+</sup> 和四氧喋啶 (BH<sub>4</sub>), 并具有较高的底物特性, 其活力仅为 DDC 的 1% ~ 0.1%。因此酪氨酸羟化酶被认为是多巴胺合成的限速酶<sup>[20]</sup>。TH 及 DDC 含量的多少, 直接决定了多巴胺合成的速度。PKA 为 cAMP 依赖性蛋白激酶, 能够为 TH, DDC 酶活性的发挥提供能量。此外, 有研究表明, TH 及 DDC 基因表达异常与不同民族人群发生 ADHD 存在诸多关联<sup>[21-22]</sup>, 因此, 本实验重点对 TH, DDC 及 PKA 进行了多方法的研究。

安神定志灵为临床治疗 ADHD 的经验方, 该方针对 ADHD 心肝火旺证而设<sup>[6]</sup>, 方中黄芩苦寒清心肝之火; 柴胡、郁金疏散肝郁之热; 决明子清肝火, 平肝阳, 又能泄热通便, 使热从大肠而下; 天竺黄清心, 解无形之痰; 钩藤平肝熄风止痉; 石菖蒲豁痰开窍; 炙远志祛痰开窍, 宁心安神。诸药合用清心平肝, 豁痰开窍, 安神定志, 使阴阳调和, 神魂安位。在本次实验中, 本课题组首先研究了安神定志灵对 TH, PKA 蛋白表达的影响, 发现安神定志灵中、高剂量能够明显上调 TH, PKA 蛋白表达, 提示安神定志灵具有影响多巴胺合成速度的可能, 本课题组发现, 安神定志灵低、中剂量组 TH, DDC mRNA 表达水平提高。为展示安神定志灵调控多巴胺合成的作用, 本研究运用免疫荧光技术观察安神定志灵对 TH, DDC 阳性细胞数的影响, 虽然安神定志灵低、高剂量在对 TH 及 DDC 的影响上波动明显, 但安神定志灵中剂量效果比较稳定。

通过以上多种研究手段, 证实安神定志灵能够上调 TH, DDC 及 PKA 的表达, 影响多巴胺的合成速度。安神定志灵治疗 ADHD 的药效机制可能为通过提高多巴胺的合成速度影响脑内多巴胺的含量来达到控制临床症状的目的。前期研究业已证实安神

定志灵对多巴胺转运体及多巴胺受体均有广泛影响<sup>[8-9]</sup>,本次研究进一步说明安神定志灵能够多途径、多靶点的调控脑内多巴胺系统,其药效的发挥可能是多途径的分子调控,具有重要的意义。本次实验也有较多不足之处,如安神定志灵在对DDC的调控上显示出了一定的迟滞性,需要进一步研究。多巴胺的合成、释放、清除机制在生理上是相互影响的,本课题组将会在接下来的研究中探讨安神定志灵对多巴胺释放及清除机制的影响,以期从多途径探讨安神定志灵的作用机制,更好地服务临床。

[参考文献]

[1] Polanczyk G, de Lima M S, Horta B L, et al. The worldwide prevalence of ADHD; a systematic review and meta-regression analysis [J]. *Am Psychiatry*, 2007, 164 (6):942-948.

[2] Young S, Thome J. ADHD and offenders [J]. *World J Biol Psychiatry*, 2011, 12 (S1):124-128.

[3] Fletcher J M. The effects of childhood ADHD on adult labor market outcomes [J]. *Health Econ*, 2014, 23 (3): 159-181.

[4] Sadasivan S, Pond B B, Pani A K, et al. Methylphenidate exposure induces dopamine neuron loss and activation of microglia in the basal ganglia of mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (3):e33693.

[5] Harvey R C, SEN S, Deaciuc A, et al. Methylphenidate treatment in adolescent rats with an attention deficit/hyperactivity disorder phenotype: cocaine addiction vulnerability and dopamine transporter function [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36 (8):837-847.

[6] 周荣易, 韩新民, 雷爽, 等. 安神定志灵系列方治疗多发性抽动症疗效观察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22 (10):127-133.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 刘成全, 韩新民, 徐建亚, 等. 安神定志灵对 ADHD 模型大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.

[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] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited [J]. *FASEB J*, 2008, 22 (3):659-661.

[12] 周荣易, 韩新民, 王娇娇, 等. SHR 大鼠前额叶、纹状体突触体的提取方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25 (12):59-64.

[13] Heijtz R D, WANG S G, Anuar F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (7): 3047-3052.

[14] Dasbanerjee T, Middleton F A, Berger D F, et al. A comparison of molecular alterations in environmental and genetic rat models of ADHD: a pilot study [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2008, 147B (8): 1554-1563.

[15] Swanson J M, Kinsbourne M, Nigg J, et al. Etiologic subtypes of attention deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis [J]. *Neuropsychol Rev*, 2007, 17 (1):39-59.

[16] Hansen F H, Skjørringe T, Yasmeen S, et al. Missense dopamine transporter mutations associate with adult parkinsonism and ADHD [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 (7):3107-3120.

[17] 赵成江, 朱树勇, 周嘉伟. 多巴胺重摄取的分子机制 [J]. *生命的化学*, 2014, 34 (2):136-146.

[18] 林玲, 吴馥梅. 突触体的制备与应用 [J]. *生理科学*, 1986, 6 (2):89-95.

[19] 陈宜张. 突触 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2014: 17-21.

[20] 金国章. 脑内多巴胺 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2010:69-77.

[21] GUAN L, WANG B, CHEN Y, et al. A high-density single-nucleotide polymorphism screen of 23 candidate genes in attention deficit hyperactivity disorder: suggesting multiple susceptibility genes among Chinese Han population [J]. *Mol Psychiatry*, 2009, 14 (7): 546-554.

[22] Ghosh P, Sarkar K, Bhaduri N, et al. Catecholaminergic gene variants: contribution in ADHD and associated comorbid attributes in the eastern indian probands [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 10 (S2):918410.

[责任编辑 张丰丰]