

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

刘成全, 韩新民*, 徐建亚, 桑锋, 尹东奇, 倪新强, 李亚群
(南京中医药大学, 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究安神定志灵对注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)动物模型-自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)前额叶皮质、纹状体多巴胺受体 D1, D2(DRD1, DRD2)表达的影响, 探讨该药治疗 ADHD 的作用机制。方法: 30 只 SHR 鼠随机分为 5 组(模型组、利他林组、安神定志灵高、中、低剂量组), 每组 6 只, Wistar 大鼠 6 只作为正常对照组。安神定志灵高、中、低剂量组分别按生药剂量 34.1, 17.1, 8.5 g·kg⁻¹ig; 利他林组以 2.1 mg·kg⁻¹利他林 ig; 模型组和正常对照组以 10 mL·g⁻¹生理盐水 ig。实验 2 周后处死大鼠, 取脑分别用 RT-PCR 和 Western blot 检测各组大鼠前额叶皮质、纹状体内 DRD1, DRD2 mRNA 和蛋白表达水平。结果: 模型组与正常对照组比较, DRD1, DRD2 mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$); 利他林组与模型组比较, DRD1, DRD2 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$); 安神定志灵中剂量组与模型组比较, DRD1, DRD2 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$); 安神定志灵低剂量组和高剂量组 DRD1, DRD2 mRNA 和蛋白表达水平高于空白模型组, 但没有统计学差异。结论: 安神定志灵可以上调 SHR 大鼠额叶皮质和纹状体中 DRD1, DRD2 mRNA 及蛋白的表达水平, 说明安神定志灵在调控前额叶-纹状体通路的功能中发挥着重要的作用, 而 DRD1, DRD2 参与了这一调节的过程, 最终起到对 ADHD 的治疗作用。

[关键词] 安神定志灵; 注意缺陷多动障碍; 自发性高血压大鼠; 多巴胺受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0136-04

Effects of Anshen Dingzhi Ling on Expression of Dopamine Receptor-1 and 2 in Prefrontal Cortex and Striatum in Rats with Attention Deficit Hyperactivity Disorder

LIU Cheng-quan, HAN Xin-min*, XU Jian-ya, SANG Feng, YIN Dong-qi, NI Xin-qing, LI Ya-qun
(Department of Pediatrics, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Anshen Dingzhi Ling (ADL) on the expression of dopamine receptor-1 (DRD1) and dopamine receptor-2 (DRD2) in prefrontal cortex and striatum of spontaneously hypertensive rat (SHR) model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), and to investigate the mechanism of ADL treatment for ADHD. **Method:** Thirty SHR rats were randomly divided into 5 groups: untreated model group, ritalin group (2.1 mg·kg⁻¹ by gavage), high dose of ADL group, middle dose of ADL group and low dose of ADL group (ig ADL with the crude drug dosage 34.1, 17.1 and 8.5 g·kg⁻¹ respectively). The normal control group includes 5 Wistar rats (given normal saline 10 mL·kg⁻¹ by gavage). The rats were killed after 14 days of treatment, then the expression of DRD1, DRD2 mRNA and protein in the prefrontal cortex and striatum of rat brain were detected by RT-PCR and Western blot. **Result:** Compared with normal group, the levels of DRD1,

[收稿日期] 20100920(001)

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(200803150003)

[第一作者] 刘成全, 主治医师, 博士研究生, 主要从事小儿精神神经系统疾病研究, Tel: 15105161322, E-mail: lcqgy1207@163.com

[通讯作者] * 韩新民, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事小儿精神神经系统疾病研究, Tel: 13062507138, E-mail: hxm1nj@163.com

DRD2 mRNA and protein in model rats reduced significantly ($P < 0.01$); the levels of DRD1, DRD2 mRNA and protein of ritalin group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.01$); the levels of DRD1, DRD2 mRNA and protein of the middle dose group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.01$); the levels of DRD1, DRD2 mRNA and protein of ADL low dose group and high dose group were higher than that in the model group, but there is no significant difference. **Conclusion:** ADL can up-regulate the expression of DRD1, DRD2 mRNA and protein in the prefrontal cortex and striatum in SHR, may be related with the influence to the activity of adenyl cyclase. It shows that ADL plays an important role on regulation to the prefrontal-striatal pathway, and DRD1, DRD2 involved in the adjustment process, the ADL eventually has therapeutic effect for the treatment of ADHD.

[**Key words**] Anshen Dingzhi Ling; attention deficit hyperactivity disorder; spontaneously hypertensive rat; dopamine receptor

注意缺陷多动障碍(ADHD)是一种最常见于学龄期儿童的精神障碍性疾病,临床主要特点是注意力缺乏、活动过多和行为冲动。其病因和发病机制目前尚不清楚,治疗上主要采用中枢兴奋剂,但由于远期疗效欠佳及药物的不良反应,限制了中枢兴奋剂药物的广泛应用^[1-2]。因此探寻治疗 ADHD 的有效中医方药,成为当前研究的热点。安神定志灵是韩新民教授治疗 ADHD 的经验方剂,临床疗效显著^[3]。SHR 大鼠是目前国际上使用最为广泛的 ADHD 动物模型,系由 Wistar 大鼠培养而来,具有与 ADHD 极为相似的行为特征,而且该特征是遗传性的^[4]。实验通过观察安神定志灵对 SHR 大鼠前额叶皮质、纹状体多巴胺受体 D1, D2 (DRD1, DRD2) 表达的影响,以期深入阐明 ADHD 的发病机制及安神定志灵的药效机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SHR 大鼠 30 只,雄性 Wistar 大鼠 6 只,均为 8 周龄,体重(180 ± 10)g,清洁级,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 0056397。饲养于南京中医药大学动物实验中心恒温恒湿动物房,明暗交替时间为 12 h,动物自由饮食进水。

1.2 药品 安神定志灵组成:醋柴胡、黄芩、连翘、郁金、石菖蒲、天竺黄、决明子、钩藤、全当归、生地、益智仁、炙远志。上述药物由南京中医药大学附属医院中药房提供;按高、中、低给药剂量,制备成生药含量分别为 $3.41, 1.71, 0.85 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水煎剂, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用;利他林,苏州市第一制药有限公司生产,产品批号 080915。每次 ig 时当场配制,使含生药 $0.38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;生理盐水,山东鲁抗辰欣药业有限

公司生产,产品批号 20090203。

1.3 试剂和仪器 引物由上海生物工程有限公司合成;单克隆 β -actin 抗体(32106),DRD1(编号 SC-14001, 1:1000),DRD2(编号 SC-9113, 1:1000)多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。HRP 标记的羊抗兔和羊抗鼠 IgG 购自 Gene Script 公司;Trizol 和逆转录试剂盒购于中晶公司(MBI 产品);定量 PCR 试剂盒购于美津公司(东洋坊产品);PCR 枪头和离心管均为一次性无 RNA 酶产品;其他试剂均为分析纯,购自南京化学试剂公司;大容量高速冷冻离心机(5810R Eppendorf);DNA 荧光定量分析仪(LightCycle Roche 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药剂量 将 30 只 SHR 大鼠随机分为 5 组:安神定志灵高、中、低剂量组,模型组,利他林对照组、将 6 只同龄 Wistar 大鼠设为正常对照组。给药方法:安神定志灵高、中、低剂量组分别予生药剂量 $34.1, 17.1, 8.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$;利他林组以 $2.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$;模型组和正常对照组以 $10 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 体重生理盐水 ig。各用药组每次均以相应剂量的 $1/2$ 量 ig,每日 2 次,连续 2 周。

2.2 标本制备 上述各组均在最后 1 次喂药后 12 h 脱颈椎处死,在冰台上迅速分离出大脑两侧的前额叶皮质和纹状体,液氮速冻后转移至 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.3 引物设计 根据 GenBank 发布序列进行引物设计,使上下游引物跨越 2 个内含子,以排除 DNA 干扰,经 NCBI BLAST 检索无显著同源性序列,内对照为 β -actin(表 1)。

2.4 RT-PCR 方法检测 各组大鼠额叶皮质和纹状体

中 DRD1 和 DRD2 的 mRNA 表达变化 样品剪碎后,加入氯仿 0.1 mL,混匀后静置 10 min,4 ℃ 12 000 r·min⁻¹离心 15 min。取上层水相,加入异丙醇 0.5 mL,混匀后静置 10 min,4 ℃ 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,弃上清,加入 75% 乙醇 1 mL,8 500 r·min⁻¹离心 5 min。弃上清并用滤纸吸干管底液体,无 RNA 酶水溶解沉淀。逆转录采用 10 μL 体系,反应条件为:42 ℃ 1 h;70 ℃ 10 min。定量 PCR 用 25 μL 体系,引物浓度为 250 nmol·L⁻¹。扩增条件为:95 ℃ 变性 1 min;然后 95 ℃ 15 s;60 ℃ 1 min,40 个循环。然后进行定量分析。

表 1 DRD1,DRD2 引物设计具体序列

引物名称	上游引物	下游引物	产物长度 /BP
DRD1	5'-ctgtccaaacaggtgctaaactg-3'	5'-cactctgctgtaaggctcaattat-3'	110
DRD2	5'-tactctccaatccactccaccac-3'	5'-caagtaccacatccagcttcaac-3'	120

2.5 Western-blot 方法检测各组大鼠额叶皮质和纹状体中 DRD1 和 DRD2 的蛋白表达变化

额叶皮质和纹状体用 1 mL 的 RIPA 缓冲液匀浆,12 000 × g 离心后,取上清液。在 95% 水浴中变性 5 min。样品液经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,进行转膜。用封闭液 37 ℃ 封闭 1 h。封闭后,孵育一抗 2 h 或 4 ℃ 静置过夜。PBST 漂洗 3 次后(每次 5 min),二抗室温孵育 1 h。采用暗室曝光显影胶片。最后,将胶上目的条带扫描进电脑,用 BandsScan 软件进行灰度分析。

2.6 统计处理 Western-blot 结果采用灰度值比较分析各组大鼠额叶皮质和纹状体中 DRD1 和 DRD2 的蛋白表达变化,采用 SPSS16.0 软件进行统计学处理.RealTime-PCR 实验采用比较 2^{-ΔΔCt}法分析大鼠额叶和纹状体中 DRD1 和 DRD2 mRNA 的相对含量。参照基因表达谱芯片分析,当目的基因表达 ≥ 2 倍,认为该基因表达增高,若 ≤ 0.5 倍认为基因表达降低。

3 结果

3.1 各组大鼠额叶皮质和纹状体 DRD1,DRD2 的蛋白表达水平 模型组大鼠额叶皮质和纹状体中 DRD1 的蛋白表达水平与正常对照组组比较显著降低(P < 0.01);利他林组和安神定志灵中剂量组 DRD1 的蛋白表达水平显著高于模型组(P < 0.01)。模型组大鼠额叶皮质和纹状体中 DRD2 的蛋白表达水平与正常对照组比较显著降低(P < 0.01);利他林组、安神定志灵中剂量组和高剂量组 DRD2 的蛋

白表达水平显著高于模型组(P < 0.01),3 者比较,表达量从高到低依次为利他林组、安神定志灵中剂量组、高剂量组。结果见表 2。

表 2 各组大鼠额叶皮质和纹状体 DRD1, DRD2 的蛋白表达的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	DRD1	DRD2
正常对照	-	1.52 ± 0.38	1.10 ± 0.56
模型	-	0.87 ± 0.27 ¹⁾	0.39 ± 0.10 ¹⁾
利他林	0.002 1	1.36 ± 0.25 ²⁾	0.74 ± 0.30 ²⁾
安神定志灵	34.1	1.17 ± 0.16	0.66 ± 0.29 ²⁾
	17.1	1.38 ± 0.19 ²⁾	0.69 ± 0.22 ²⁾
	8.5	1.04 ± 0.25	0.46 ± 0.07

注:与正常对照组比较¹⁾P < 0.01;与模型组比较²⁾P < 0.01。

3.2 多巴胺受体 1(DRD1)mRNA 表达水平 比较各组 2^{-ΔΔCt}值显示:对于大鼠额叶皮质和纹状体中 DRD1mRNA 表达水平,组间存在差异。空白模型组与正常对照组比较,DRD1mRNA 在大鼠额叶皮质和纹状体中表达 ≤ 1/2 倍,认为该基因表达降低;与模型组比较,利他林组和安神定志灵中剂量组 DRD1mRNA 表达 ≥ 2 倍,认为该基因表达增高。见表 3。

3.3 多巴胺受体 2(DRD2)mRNA 表达水平 比较各组 2^{-ΔΔCt}值显示:对于大鼠额叶皮质和纹状体中 DRD2mRNA 表达水平,组间存在差异。模型组与正常对照组比较,DRD2mRNA 在大鼠额叶皮质和纹状体中表达 ≤ 1/2 倍,认为该基因表达降低;与模型组比较,利他林组和安神定志灵中剂量组和高剂量组 DRD2mRNA 表达 ≥ 2 倍,认为该基因表达增高。见表 3。

4 讨论

中医学认为 ADHD 属于儿童脑病范畴,主要是由于脏腑功能失常,阴阳失调所致,其病机特点是阳动有余而阴静不足。我们既往研究表明,心肝火旺证是 ADHD 的主要证型,以清心平肝、豁痰开窍为主进行组方是治疗 ADHD 的首选方案,拟定安神定志灵方剂^[5]。方中黄芩、连翘苦寒清心泻火;醋柴胡、广郁金 疏散肝郁之热;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;全当归养血活血,滋肝之阴,润肠通便;益智仁补肾益智;炙远志祛痰开窍,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,使多动不安,注意力不集中等症得以消除。

表3 各组大鼠额叶和纹状体中 DRD1,DRD2 荧光定量 Ct 值及 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	β -actin Ct	DRD1 Ct	DRD1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	DRD2Ct	DRD2 $2^{-\Delta\Delta Ct}$
正常对照	-	14.772 ± 0.254	20.684 ± 0.42	1	20.73 ± 0.398	1
模型	-	14.224 ± 0.289	23.026 ± 0.469	0.135 ± 0.014 ¹⁾	23.386 ± 0.385	0.110 ± 0.017 ¹⁾
利他林	0.002 1	14.262 ± 0.212	22.028 ± 0.278	0.277 ± 0.017 ²⁾	21.858 ± 0.371	0.322 ± 0.027 ²⁾
安神定志灵	34.1	13.790 ± 0.356	21.904 ± 0.129	0.218 ± 0.016	22.23 ± 0.521	0.180 ± 0.020 ²⁾
	17.1	14.524 ± 0.444	22.106 ± 0.712	0.316 ± 0.032 ²⁾	22.168 ± 0.424	0.311 ± 0.013 ²⁾
	8.5	16.880 ± 0.466	24.780 ± 0.692	0.255 ± 0.039	24.726 ± 0.260	0.271 ± 0.028

注: ¹⁾与正常对照组比;DRD1,DRD2 在额叶和纹状体中表达 $\leq 1/2$ 倍; ²⁾与模型组比;DRD1,DRD2 在额叶和纹状体中表达 ≥ 2 倍。

目前 ADHD 的病因和发病机制还不十分明确,但是大量的实验研究表明,ADHD 的发病与前额叶纹状体通路中的儿茶酚胺类神经递质有着密切的关系^[6-9]。基于间接的多巴胺能激动剂对 ADHD 治疗的有效性^[10],研究者提出了 ADHD 发病的多巴胺失调假说^[11],认为 ADHD 发病与脑内多巴胺水平的失调有关。多巴胺是中枢神经系统重要的神经递质,具有调节运动、情感和认知的功能。多项研究显示脑内多巴胺主要通过多巴胺受体调控其功能,其中 DRD1 和 DRD2 在前额叶皮层和纹状体都高度表达,通过和三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白耦联,激活或抑制腺苷酸环化酶,调节前额叶-纹状体回路,影响活动和认知功能^[12-14]。

本实验结果表明,模型组和对照组相比,DRD1 和 DRD2 无论是在 mRNA 表达还是蛋白表达方面都有明显下降,亦证明这两种受体和 ADHD 相关。本研究还发现,连续给药两周后,与模型组相比,安神定志灵低、中、高剂量组 DRD1 和 DRD2 在 mRNA 和蛋白水平都发生了变化,结果显示安神定志灵对 DRD1 和 DRD2 表达的影响是同向的,它既上调 DRD1 的表达,也上调 DRD2 的表达,前额叶皮质和纹状体 DRD1 和 DRD2 可能为安神定志灵治疗 ADHD 的作用靶点,推测其通过上调 DRD1 和 DRD2 的表达,影响腺苷酸环化酶的活性,调控前额叶-纹状体通路,最终达到改善 ADHD 活动和认知功能的治疗目的,其中具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Tan M, Appleton R. Attention deficit and hyperactivity disorder, methylphenidate, and epilepsy[J]. Arch Dis Child,2005,90(1):57.
- [2] 张红宇,杜敏敏,庄思齐,等. 哌甲酯对学龄期注意缺陷多动障碍患儿生长发育影响的评价[J]. 中华儿科杂志,2005,43(8):723.
- [3] 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.

- [4] Li Q, Lu G, Antonio G E, Mak Y T, et al. The usefulness of the spontaneously hypertensive rat to model attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) may be explained by the differential expression of dopamine-related genes in the brain[J]. Neurochem Int, 2007,50(6):848.
- [5] 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.
- [6] Bobb A J, Addington A M, Sidransky E, et al. Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005,134(19):67.
- [7] 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]. Arch Gen Psychiatry, 2007, 64(8):932.
- [8] Biederman J, Faraone S V. Attention deficit hyperactivity disorder[J]. Lancet, 2005,366(17):237.
- [9] Castellanos F X, Tanock R. Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes [J]. Nat Rev Neurosci, 2002, 3(12):617.
- [10] 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(14):10.
- [11] 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(14):10.
- [12] Arnsten A F, Li B M. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical function[J]. Biol Psychiatry,2005,57(13):77.
- [13] Chudasama Y, Robbins T W. Functions of frontostriatal systems in cognition: Comparative neuro-psychopharmacological studies in rats, monkeys and humans [J]. Biol Psychol,2006,42(4):112.
- [14] Kinkead B, Selz K A, Owens M J, et al. Algorithmically designed peptides ameliorate behavioral defects in animal model of ADHD by an allosteric mechanism [J]. J Neuroscience Methods, 2006,151(1):68.

[责任编辑 聂淑琴]