

· 药理 ·

龙牡桂枝汤及其拆方对注意缺陷多动障碍模型大鼠 下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响

唐彦*, 程艳, 景晓玉, 徐寅

(云南中医药大学 临床医学院, 昆明 650500)

[摘要] **目的:** 探讨龙牡桂枝汤及其拆方对注意缺陷多动障碍(ADHD)动物模型—自发性高血压大鼠(SHR)下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)的调节作用,阐释复方配伍的科学内涵。**方法:** 幼年雄性 SHR 大鼠随机分为生理盐水组,盐酸哌甲酯组($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),龙牡桂枝汤组($30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),桂枝加龙骨牡蛎汤组($21\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),甘麦大枣汤组($9.24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),石菖蒲-远志组($4.62\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),分别予相应药物灌胃 14 d,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),促肾上腺皮质激素(ACTH),皮质酮(CORT)的含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测下丘脑盐皮质激素受体(MR),糖皮质激素受体(GR),CRH 及海马 GR,MR mRNA 的表达水平。**结果:** 与生理盐水组比较,盐酸哌甲酯组、龙牡桂枝汤组大鼠血清 CORT,ACTH,CRH 水平,下丘脑 GR,CRH 及海马 MR,GR mRNA 的表达水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),其海马 GR mRNA 表达明显高于盐酸哌甲酯组($P < 0.01$)。拆方研究显示:与生理盐水组比较,桂枝加龙骨牡蛎汤组和甘麦大枣汤组大鼠血清 ACTH,CRH 水平,下丘脑 MR,GR,CRH 及海马 GR,MR mRNA 的表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠血清 CORT 水平明显升高($P < 0.01$),石菖蒲-远志组大鼠血清 ACTH 水平明显升高($P < 0.05$)。**结论:** 龙牡桂枝汤治疗 ADHD 的作用机制与提高血清 CORT,ACTH,CRH 水平,增加下丘脑 MR,GR,CRH 及海马 GR,MR mRNA 的表达,从而调控 HPA 轴功能有关。各拆方药组对 HPA 轴功能的影响程度依次为桂枝加龙骨牡蛎汤 > 甘麦大枣汤 > 石菖蒲-远志。

[关键词] 注意缺陷多动障碍; 龙牡桂枝汤; 拆方; 下丘脑-垂体-肾上腺轴

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)09-0023-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20200603

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191206.1137.006.html>

[网络出版时间] 2019-12-06 15:44

Effect of Longmu Guizhi Decoction and Its Disassembled Prescription on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Rats with Attention Deficit Hyperactivity Disorder

TANG Yan*, CHENG Yan, JING Xiao-yu, XU Yin

(Clinical Medical College of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the regulatory effect of Longmu Guizhi decoction and its decomposed formula on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of spontaneously hypertensive rats (SHR) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), so as to explain the scientific connotation of compound compatibility. **Method:** Young male SHR rats were randomly divided into saline control group, methylphenidate hydrochloride group ($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Longmu Guizhi decoction group ($30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Guizhi + Longmu Muli decoction group ($21\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Ganmai Dazaotang group ($9.24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Polygalae Radix-Acori Tatarinowii Rhizome group ($4.62\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The corresponding drugs were intragastrically administered for 14 days. Serum adrenocorticotrophic hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) were detected by enzyme-

[收稿日期] 20190805(027)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760880);云南省科技计划项目(2017FF116-025)

[通信作者] *唐彦,博士,教授,从事小儿神经精神疾病的中医证治研究,E-mail:tyj0812@126.com

linked immunosorbent assay (ELISA), and mRNA expressions of glucocorticoid receptor (GR), mineralocorticoid receptor (MR), CRH in hypothalamus and GR, MR in hippocampus were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) method. **Result:** Serum CORT, ACTH and CRH, GR and CRH mRNA expressions of hypothalamus, GR and MR mRNA expressions of hippocampus in methylphenidate hydrochloride group and Longmu Guizhi decoction group were significantly higher than those of saline control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). MR mRNA expression of hypothalamus in Longmu Guizhi decoction group was significantly higher than that in the saline control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and GR expression in hippocampus was significantly higher than that in the methylphenidate hydrochloride group ($P < 0.01$). The dissection study showed that the levels of serum ACTH and CRH, MR mRNA, GR and CRH mRNA of hypothalamus, GR and MR mRNA of hippocampus in Guizhi + Longmu Muli decoction group and Ganmai Dazao group were significantly higher than those in saline control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The serum CORT level of Guizhi + Longmu Muli decoction group was higher than that of normal saline group ($P < 0.01$). The serum ACTH level of Polygalae Radix-Acori Tatarinowii Rhizome pair was significantly higher than that in saline control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The mechanism of Longmu Guizhi decoction in treating ADHD is related to increase of the levels of CORT, ACTH and CRH in serum and the expressions of MR, GR, CRH in hypothalamus and GR and MR in hippocampus, so as to regulate the function of HPA axis. The order of the effect degree of each decomposition group on HPA axis function from high to low was Guizhi + Longmu Muli decoction > Ganmai Dazao decoction > Polygalae Radix-Acori Tatarinowii Rhizome pair drug.

[**Key words**] attention deficit hyperactivity disorder (ADHD); Longmu Guizhi decoction; disassembled prescription; hypothalamic pituitary gonadal axis

注意缺陷多动障碍 (ADHD) 又称儿童多动症, 是儿童时期最常见的行为障碍性疾病。ADHD 发病机制复杂, 是遗传及环境因素相互影响、相互作用的结果。虽然本病有高度的遗传性, 但环境的影响不容忽视, 不良的家庭社会环境及心理因素可诱发甚至加重 ADHD 症状。有学者提出下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 功能紊乱在环境因素对中枢神经系统影响中可能起关键作用^[1]。近年来研究发现, 生命早期应激是促成 ADHD 样症状的重要环境因素, 影响 HPA 轴的高位调节中枢—海马区神经细胞的增殖分化^[2]。HPA 轴同时也是介导压力反应的关键系统, 与 ADHD 密切相关^[3]。国内外诸多研究报道 ADHD 患儿 HPA 轴呈低反应性^[4-8], 存在 HPA 轴调节功能障碍, 通过调控 HPA 轴功能或许是治疗本病的一个可行途径。

中医药治疗 ADHD 立足于整体调节, 具有理法方药的灵活性和药效的安全性等特点。龙牡桂枝汤是云南省名中医刘以敏教授治疗 ADHD 的经验方^[9], 全方由张仲景名方桂枝加龙骨牡蛎汤、甘麦大枣汤及石菖蒲、远志组成, 具有平肝潜阳, 养心安神, 化痰开窍的作用, 并能改善 ADHD 模型动物幼年自发性高血压大鼠 (SHR) 的主动注意力及多动症状^[10], 调节其脑内单胺类神经递质及神经营养因

子^[11-13]。为从 HPA 轴角度探讨本方治疗 ADHD 的作用机制, 阐释复方的配伍机制, 对龙牡桂枝汤进行了以潜阳、养心、化痰为单元药组的拆方研究, 观察龙牡桂枝汤及其拆方对 HPA 轴分泌指标促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH), 促肾上腺皮质激素 (ACTH), 皮质酮 (CORT), 下丘脑糖皮质激素受体 (GR), 盐皮质激素受体 (MR), CRH 及海马 GR, MR mRNA 表达水平的影响。

1 材料

1.1 动物 幼年雄性 SHR 大鼠, 鼠龄 3 周, 体质量 (61 ± 5) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2016-0006。云南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会编号 2019-001。大鼠饲养于清洁级环境中, 适应性饲养 1 周, 自由获取食物和饮用水。

1.2 药物 龙牡桂枝汤组成: 桂枝 10 g, 白芍 15 g, 浮小麦 20 g, 生姜 5 g, 大枣 15 g, 生龙骨 20 g, 生牡蛎 20 g, 石菖蒲 10 g, 炙远志 10 g, 炙甘草 5 g; 桂枝加龙骨牡蛎汤拆方组: 桂枝 10 g, 白芍 15 g, 生姜 5 g, 大枣 15 g, 生龙骨 20 g, 生牡蛎 20 g, 甘麦大枣汤拆方组: 浮小麦 20 g, 炙甘草 5 g, 大枣 15 g, 石菖蒲-远志组: 石菖蒲 10 g, 炙远志 10 g。全部药材同批次购自云南省中医医院中药房, 由云南中医药大

学中药学院李静平副教授鉴定为正品,根据 9 岁体质量 26 kg 儿童与 4 周龄大鼠的体表面积关系换算大鼠的中药生药日用量,分别制成含生药 3, 2.1, 0.924, 0.462 g·mL⁻¹ 的溶液,贮于 4 °C 冰箱备用。盐酸哌甲酯控释片(美国 ALZA 公司,批号 ODA3915),每次灌胃时当场配制,使药物质量浓度为 0.2 g·L⁻¹,用量为 2 mg·kg⁻¹。

1.3 试剂 大鼠 CRH, ACTH, CORT 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(Elabscience 公司,批号分别为 E-EL-R0270c, E-EL-R0048c, E-EL-R0269c); DNA 逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司,批号 K1622); PCR 扩增试剂盒(美国 KAPA 公司,批号 KK4601); trizol 试剂(美国 Lifetech 公司,批号 15596026),引物设计由广州 Invitrogen 公司引物合成;在 Pubmed 上查询对应物种的目的基因 mRNA 序列,以 CDS 序列设计引物。引物序列如下,CRH 引物上游 5'-AGGGAAGTCTTGGAATG-3',下游 5'-CCGATAATC TCCATCAGTT-3',扩增长度为 80 bp;GR 引物上游 5'-ATCATACAGACAATCAAG-3',下游 5'-TACTCT TCATAGGATACC-3',扩增长度为 156 bp;MR 引物上游 5'-GGATTAAGCAAGAACCAGAT-3',下游 5'-ATT CACACCAACGATAGC-3',扩增长度为 77 bp; β -肌动蛋白(β -actin)引物上游 5'-TATGGAATCC TGTGGCATC-3',下游 5'-GTGTTGGCATAGAGGT CTT-3',扩增长度为 87 bp。

1.4 仪器 SPECTCA MAX190 型酶标仪(美国 Molecular 公司);ABI StepOne 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司);NanoDrop ND-1000 型紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 分组及干预 SHR 大鼠,每组 6 只按随机数字表法分为生理盐水组(ADHD 模型),盐酸哌甲酯组(2 mg·kg⁻¹),龙牡桂枝汤组(30 g·kg⁻¹),桂枝加龙骨牡蛎汤组(21 g·kg⁻¹),甘麦大枣汤组(9.24 g·kg⁻¹),石菖蒲-远志组(4.62 g·kg⁻¹),根据大鼠体质量,按 10 mL·kg⁻¹ 用量,分别予生理盐水、盐酸哌甲酯、龙牡桂枝汤煎剂、桂枝加龙骨牡蛎汤煎剂、甘麦大枣汤煎剂和石菖蒲-远志煎剂灌胃,每天灌胃 1 次,连续给药 14 d。

2.2 ELISA 检测血清 CORT, ACTH, CRH 水平 末次给药 24 h 后,眼眶取血注入离心管,常温静置 15 min 后放入 37 °C 恒温箱中,2 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上层血清于塑料离心管中,采用 ELISA 检

测大鼠血清中 CORT, ACTH, CRH 的含量,实验操作严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

2.3 Real-time PCR 检测下丘脑 CRH, MR, GR mRNA 和海马 MR, GR mRNA 表达水平 取血结束后,于冰盘快速剥离下丘脑和海马, -70 °C 保存。trizol 一步法提取总 RNA,参照逆转录试剂盒操作逆转录为 cDNA, Real-time PCR 扩增目的基因,放入定量 PCR 仪中,设置 PCR 循环反应条件为 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 循环 45 次,同时做溶解曲线分析,反应结束,收集信息,做 C_t 值分析,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 计算各 mRNA 的相对表达水平。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据先进行正态性检验和方差齐性检验,数据符合正态分布,方差齐,多个样本均数组间比较采用单因素方差分析,采用 LSD-*t* 检测两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 ADHD 模型大鼠血清 CORT, ACTH, CRH 含量的影响 与生理盐水组比较,盐酸哌甲酯组、龙牡桂枝汤组大鼠血清 CORT, ACTH 及 CRH 水平显著增高($P < 0.01$),各拆方药组对大鼠血清 CORT, ACTH 及 CRH 水平也有不同程度的影响,与生理盐水组比较,桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠血清 CORT, ACTH 及 CRH 水平显著增高($P < 0.01$),甘麦大枣汤组大鼠血清 ACTH, CRH 水平显著增高($P < 0.01$),石菖蒲-远志组大鼠仅血清 ACTH 水平明显增高($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对 ADHD 模型大鼠下丘脑 MR, GR, CRH mRNA 的影响 与生理盐水组比较,龙牡桂枝汤组大鼠下丘脑 MR, GR, CRH mRNA 表达水平显著增高($P < 0.01$),盐酸哌甲酯组大鼠下丘脑 GR, CRH mRNA 表达水平显著增高($P < 0.01$)。各拆方药组除石菖蒲-远志组对大鼠下丘脑 MR, GR, CRH mRNA 表达无明显影响外,桂枝加龙骨牡蛎汤组和甘麦大枣汤组大鼠下丘脑 MR, GR, CRH mRNA 表达均明显增高($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对 ADHD 模型大鼠海马 MR, GR mRNA 的影响 与生理盐水组比较,盐酸哌甲酯组、龙牡桂枝汤组大鼠海马 MR, GR mRNA 表达显著增高($P < 0.01$);与盐酸哌甲酯组比较,龙牡桂枝汤组大鼠海马 GR mRNA 表达显著增高($P < 0.01$)。各拆方药组对大鼠海马 MR, GR mRNA 表达也有不同程度的

表 1 龙牡桂枝汤及其拆方对 ADHD 模型大鼠血清 CORT, ACTH, CRH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Longmu Guizhi decoction and its disassembled prescription on contents of serum CORT, ACTH and CRH in ADHD model rats ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | CORT | ACTH | CRH |
|----------|-----------------------|---|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 生理盐水 | - | 5 | 13.75 ± 2.78 | 34.44 ± 4.79 | 1.33 ± 0.39 |
| 盐酸哌甲酯 | 0.002 | 6 | 23.98 ± 2.90 ^{2,4,6,7)} | 77.71 ± 9.53 ^{2,4,6)} | 3.96 ± 0.76 ^{2,4,6,8)} |
| 龙牡桂枝汤 | 30 | 6 | 24.16 ± 3.06 ^{2,4,6,7)} | 76.83 ± 9.04 ^{2,4,6)} | 4.26 ± 0.62 ^{2,4,6,8)} |
| 桂枝加龙骨牡蛎汤 | 21 | 6 | 19.56 ± 3.61 ^{2,4,5)} | 69.28 ± 1.20 ^{2,4,5)} | 3.02 ± 0.52 ^{2,4)} |
| 甘麦大枣汤 | 9.24 | 6 | 15.84 ± 2.58 | 56.02 ± 1.17 ²⁾ | 2.39 ± 0.63 ^{2,3)} |
| 石菖蒲-远志 | 4.62 | 6 | 14.44 ± 3.27 | 6.59 ± 8.64 ¹⁾ | 1.45 ± 0.43 |

注:与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与石菖蒲-远志组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与甘麦大枣汤比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$;与桂枝加龙骨牡蛎汤组比较⁷⁾ $P < 0.05$, ⁸⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 龙牡桂枝汤及其拆方对 ADHD 模型大鼠下丘脑 MR, GR, CRH mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Longmu Guizhi decoction and its disassembled prescription on MR, GR, CRH mRNA in hypothalamus of ADHD rats ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | MR | GR | CRH |
|----------|-----------------------|---|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 生理盐水 | - | 5 | 1.11 ± 0.77 | 1.06 ± 0.05 | 1.18 ± 0.24 |
| 盐酸哌甲酯 | 0.002 | 6 | 1.31 ± 0.18 | 5.55 ± 0.56 ^{2,4,6,8)} | 4.44 ± 0.15 ^{2,4,6,8)} |
| 龙牡桂枝汤 | 30 | 6 | 1.48 ± 0.25 ^{2,3)} | 5.83 ± 0.18 ^{2,4,6,8)} | 4.54 ± 0.36 ^{2,4,6,8)} |
| 桂枝加龙骨牡蛎汤 | 21 | 6 | 1.40 ± 0.10 ¹⁾ | 4.47 ± 0.86 ^{2,4,6)} | 2.85 ± 0.41 ^{2,4,6)} |
| 甘麦大枣汤 | 9.24 | 6 | 1.36 ± 0.26 ¹⁾ | 3.09 ± 0.54 ^{2,4)} | 1.97 ± 0.35 ^{2,4)} |
| 石菖蒲-远志 | 4.62 | 6 | 1.20 ± 0.74 | 1.30 ± 0.15 | 1.25 ± 0.19 |

影响,桂枝加龙骨牡蛎汤组和甘麦大枣汤组大鼠海马 MR, GR mRNA 表达显著增高 ($P < 0.01$),石菖蒲-远志组大鼠海马 GR mRNA 表达显著增高 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 龙牡桂枝汤及其拆方对 ADHD 模型大鼠海马 MR, GR mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Longmu Guizhi decoction and its disassembled prescriptions on MR and GR mRNA in hippocampus of ADHD rats ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | MR | GR |
|----------|-----------------------|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| 生理盐水 | - | 5 | 1.11 ± 0.77 | 1.06 ± 0.05 |
| 盐酸哌甲酯 | 0.002 | 6 | 12.58 ± 0.32 ^{2,4,6,8)} | 7.91 ± 0.07 ^{2,4,6,8)} |
| 龙牡桂枝汤 | 30 | 6 | 13.34 ± 1.07 ^{2,4,6,8)} | 9.78 ± 0.64 ^{2,4,6,8,9)} |
| 桂枝加龙骨牡蛎汤 | 21 | 6 | 7.47 ± 1.45 ^{2,4,6)} | 5.37 ± 0.72 ^{2,4,6)} |
| 甘麦大枣汤 | 9.24 | 6 | 5.32 ± 1.15 ^{2,4)} | 3.95 ± 0.18 ^{2,4)} |
| 石菖蒲-远志 | 4.62 | 6 | 1.98 ± 0.24 | 2.05 ± 0.28 ²⁾ |

注:与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与石菖蒲-远志组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与甘麦大枣汤比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$;与桂枝加龙骨牡蛎汤组比较⁷⁾ $P < 0.05$, ⁸⁾ $P < 0.01$;与盐酸哌甲酯组比较⁹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

龙牡桂枝汤组方精炼严密、配伍方法明确,各拆方药组体现的治法也极具代表性,其中桂枝加龙骨牡蛎汤重在潜阳平肝,调和阴阳,甘麦大枣汤养心宁神,药对石菖蒲、远志化痰开窍益智;桂枝加龙骨牡蛎汤和甘麦大枣汤都有用于多动症治疗的报

道^[14-16]。文献研究发现,中药复方治疗 ADHD 使用频次最高的前 5 位依次为远志、石菖蒲、熟地黄、牡蛎、龙骨^[17],关联规则分析得出石菖蒲-远志、牡蛎-龙骨是治疗本病最常用的药对^[18],尤其远志、石菖蒲药对可能通过抗氧化、改善胆碱能系统、改善细胞凋亡率、调节突触可塑性药理机制发挥改善记忆作

用^[19]。因此本实验遵循“法依病机、拆方依法”的拆方研究思路,将龙牡桂枝汤拆分为以上 3 组药物进行研究,以把握方内某种治法或某组药物所处的地位和作用,探明不同治法的作用靶点,为寻找复方中起主要作用的药物或有效成分提供线索。

基于在人体上研究神经行为具有诸多局限性,动物模型成为该领域研究的有效工具。目前 ADHD 动物模型主要有遗传动物模型和诱发性动物模型,遗传动物模型 SHR 大鼠从行为学、神经生物学、代谢状态方面与临床 ADHD 患者很大相似性而成为目前国内外应用最广泛的 ADHD 动物模型^[20]。本实验中 SHR 大鼠开始用药时间为 4 周龄,是因为 SHR 大鼠在 4~10 周龄呈现出典型 ADHD 的症状,且 4 周龄大鼠在发育上相当于人类儿童期的开始^[21]。课题组前期研究证实与正常对照 WKY 大鼠相比,SHR 大鼠血清 CORT, ACTH 水平明显低于 WKY 大鼠,SHR 大鼠存在 HPA 轴低反应性^[22],与其他研究者^[23-24]的结论一致。

HPA 轴主要由下丘脑、垂体和肾上腺组成,下丘脑分泌 CRH, CRH 刺激垂体产生 ACTH, ACTH 作用于肾上腺皮质细胞合成并释放糖皮质激素(GC),人类为皮质醇(啮齿类动物为皮质酮)。GC 主要通过 GR 和 MR 结合发挥生理功能,MR 与 GC 的亲合力较强,主要参与基础 GC 水平的维持和昼夜节律的调节,而 GR 主要在应激时发挥作用。MR 和 GR 在海马均有丰富的分布,海马既是 HPA 轴作用的主要靶器官,又可通过 MR 和 GR 参与对 HPA 轴的调控。在 HPA 轴进行生理活动的过程中,CRH 是 HPA 轴的始动激素,CRH 及其受体的表达活性是衡量 HPA 轴功能的重要指标。CORT 是 HPA 轴分泌的终末激素,直接反映 HPA 轴的基础功能。因此 HPA 轴发挥正常生理作用与轴本身功能、糖皮质激素受体系统对轴的调控作用密不可分,并相互影响。文献研究也显示,海马区域的 GR 与 MR 的表达变化及调节 HPA 轴是中药复方拮抗创伤后应激障碍的作用靶点或关键环节^[25]。

在本实验中,龙牡桂枝汤和盐酸哌甲酯组大鼠血清 CRH 的含量及下丘脑 CRH mRNA 的表达均显著增加,提示治疗药物对 HPA 轴活动的起点已具有兴奋的作用,同时海马中 GR, MR mRNA 的表达也明显增加,增强了对 HPA 轴的调节作用,尤其 ADHD 主要表现出 CORT 水平下降,此时 MR 的作用就更为重要,药物干预后,MR mRNA 在海马的表达增加更为明显,从而进一步激活 HPA 轴功能,促

进 ACTH, CORT 的释放,提高了 HPA 轴的活性。就复方与盐酸哌甲酯比较来看,二者提高 SHR 大鼠血清 CORT, ACTH, CRH 水平,增加海马 GR, MR 及下丘脑 CRH, GR mRNA 的表达的作用相当,但龙牡桂枝汤还能明显增加大鼠下丘脑 MR mRNA 表达,对海马 GR mRNA 表达的影响也较盐酸哌甲酯明显。

拆方研究显示,石菖蒲-远志仅对 SHR 大鼠血清 ACTH 及海马 GR mRNA 表达有较明显的提高作用;甘麦大枣汤可提高大鼠血清 ACTH, CRH 水平,增加下丘脑 GR, MR, CRH 及海马 GR, MR mRNA 的表达;桂枝加龙骨牡蛎汤能显著提高大鼠血清 CORT, ACTH, CRH 水平,增加下丘脑 GR, MR, CRH 及海马 GR, MR mRNA 表达,在提高血清 ACTH 水平方面,与龙牡桂枝汤和盐酸哌甲酯作用相当。从各拆方药组对 SHR 大鼠 HPA 轴的影响程度来看,桂枝加龙骨牡蛎汤 > 甘麦大枣汤 > 石菖蒲-远志药组。研究结果提示龙牡桂枝汤改善 HPA 轴功能主要与潜阳收摄之桂枝加龙骨牡蛎汤有关,联合养心安神之甘麦大枣汤具有协同作用,化痰开窍之石菖蒲-远志是其增效配伍,说明复方的药效并非单味药或拆方效应的简单加减,而是有机的整合,其配伍具有复杂性和适用性,这可能也是复方多途径、多靶点作用特点的物质基础。桂枝加龙骨牡蛎汤对代表 HPA 轴分泌指标的 3 种激素及下丘脑 GR, MR, CRH 及海马 GR, MR mRNA 表达都有作用,推测其可能影响 HPA 轴活动的诸多环节,而甘麦大枣汤和石菖蒲-远志可能只对 HPA 轴活动的部分或某个环节具有明显影响。

报道报道以清心平肝、豁痰开窍为治的平动汤对 SHR 大鼠的血清 CORT 水平有提高作用,并降低血清 ACTH 水平,推测平动汤可能是通过降低 ACTH 水平,提高皮质醇水平来调节 HPA 轴功能,达到治疗 ADHD 的目的^[26]。虽与本研究的结果并不完全一致,但都提示复方能改善 HPA 轴功能。HPA 轴的生理活动是一个复杂的过程,其中任何一个环节的障碍均可导致皮质醇分泌出现异常,不同治则的复方对 HPA 轴的影响可能也不尽相同。龙牡桂枝汤及其拆方如何调控与 HPA 轴负反馈密切相关的激素及其受体,与相关神经递质有何交互作用,还需进一步从更深层次进行研究。

[参考文献]

[1] PARK H J, PARK H J, CHAE Y, et al. Effect of acupuncture on hypothalamic-pituitary-adrenal system in

- maternal separation rats [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(8):1123-1127.
- [2] BATH K G, ANZANO-NIEVES G, GOODWILL H. Early life stress accelerates behavioral and neural maturation of the hippocampus in male mice [J]. *Horm Behav*, 2016, 82:64-71.
- [3] RAZ S, LEYKIN D. Psychological and cortisol reactivity to experimentally induced stress in adults with ADHD [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2015, 60:7-17.
- [4] SHIN D W, LEE S H. Blunted hypothalamo-pituitary-adrenal axis reactivity is associated with the poor intelligence performance in children with attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Neuropediatrics*, 2007, 8(6):298-303.
- [5] FREITANG C M, HÄNIG S, PALMASON H, et al. Cortisol awakening response in healthy children and children with ADHD; impact of comorbid disorders and psychosocial risk factors [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, 34(7):1019-1028.
- [6] ISAKSSON J, NILSSON K W, NYBERG F, et al. Cortisol levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *J Psychiatr Res*, 2012, 46(11):1398-1405.
- [7] 陈金兰, 陈辉, 王婷婷, 等. 注意缺陷多动障碍儿童唾液与血浆皮质醇水平变化及临床意义 [J]. *福建医科大学学报*, 2016, 50(6):403-406.
- [8] 柳昌炳. 注意缺陷多动障碍倾向幼儿下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴功能状态研究 [J]. *浙江医学*, 2016, 38(13):1098-1110.
- [9] 刘以敏. 融合寒温, 活用古方治儿疾—刘以敏学术思想与临床经验集 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015:45.
- [10] 何平, 唐彦, 杨若俊. 龙牡桂枝汤改善注意缺陷多动障碍模型大鼠行为的实验研究 [J]. *中国中西医结合儿科学*, 2014, 6(6):203-205.
- [11] 唐蓓, 唐彦, 尹蔚萍. 龙牡桂枝汤对 ADHD 模型大鼠左右额叶-纹状体 NET mRNA 表达的影响 [J]. *中医药信息*, 2016, 33(1):15-18.
- [12] 唐蓓, 祁燕, 唐彦. 龙牡桂枝汤对 ADHD 模型大鼠左右额叶-纹状体 β_2 -AR mRNA 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(13):135-138.
- [13] 唐彦, 祁燕, 何平. 龙牡桂枝汤对多动症模型大鼠左右前额叶皮质和纹状体 BDNF 及 GDNF mRNA 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(4):1773-1776.
- [14] 刘传珍, 周丽华. 桂枝加龙骨牡蛎汤合甘麦大枣汤治疗儿童多动综合症的临床研究 [J]. *中医杂志*, 1999, 40(7):427-428.
- [15] 张晓华. 桂枝加龙骨牡蛎汤治疗儿童多动症 28 例 [J]. *四川中医*, 2003, 21(10):75.
- [16] 吴耀持. 甘麦大枣汤加味与针灸治疗 ADHD 的临床观察 [J]. *中国民族医药杂志*, 1999, 12(5):43.
- [17] 钱章玉, 雷爽, 韩新民. 近 16 年中药复方治疗儿童多动症用药规律分析 [J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(9):737-740.
- [18] 倪新强, 韩新民, 尹东奇, 等. 基于数据挖掘的注意缺陷多动障碍中医用药规律研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(5):62-69.
- [19] 李晓青, 赵佳奇, 田雅娟, 等. 远志、石菖蒲及其对药改善记忆的物质基础和作用机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3):190-198.
- [20] 郑小兰, 陈燕惠. 注意缺陷多动障碍的实验动物模型 [J]. *中华行为与脑科学杂志*, 2015, 24(3):276-279.
- [21] SUSAN L. Andersen. Changes in the second messenger cyclic AMP during development may underlie motoric symptoms in attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) [J]. *Behav Brain Res*, 2002, 130(1/2):197-201.
- [22] 唐彦, 景晓玉, 王渝评, 等. 注意缺陷多动障碍模型大鼠 HPA 轴功能的变化 [J]. *海南医学院学报*, 2019, 25(6):815-817.
- [23] 谢琳琪. SHR 幼鼠不同脑区皮质酮及糖皮质激素受体水平对注意维持的影响 [D]. 福州: 福建医科大学, 2015.
- [24] WU L H, CHENG W, YU M, et al. Nr3C1-Bhlhb2 Axis dysregulation is involved in the development of attention deficit hyperactivity [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(2):1196-1212.
- [25] 郭宏伟. 中医药拮抗创伤后应激障碍的研究现状 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2):213-219.
- [26] 苗竞, 刘成全, 倪新强, 等. 平动汤对注意力缺陷多动障碍模型大鼠 HPA 轴功能的影响 [J]. *中医学报*, 2016, 31(12):1939-1942.

[责任编辑 周冰冰]