

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.18.015

益智宁神颗粒对幼龄自发性高血压大鼠大脑海马多巴胺神经元形态、GDNF 蛋白及其 mRNA 表达的影响

李瑞¹, 李亚平^{2*}, 马融², 李巍¹, 钟成梁², 魏小维², 王伟², 晋黎², 吴海娇², 唐温²

(1. 天津中医药大学, 天津市南开区鞍山西道 312 号, 300193; 2. 天津中医药大学第一附属医院)

摘要 目的 探讨益智宁神颗粒治疗注意缺陷多动障碍的可能作用机制。方法 40 只幼年自发性高血压大鼠 (SHR) 随机分为模型组、益智宁神组、哌甲酯组、托莫西汀组, 每组 10 只; 另以 10 只 WKY 大鼠为正常组。益智宁神组给予益智宁神颗粒溶液 (浓度为 3.75 g/ml) 按 3.75 g/100 g 灌胃, 哌甲酯组给予盐酸哌甲酯缓释片 5 mg/(kg·d) 灌胃, 托莫西汀组给予盐酸托莫西汀胶囊 0.3 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予 0.5% 生理盐水 2 mg/100g 体重灌胃, 各组均每日 1 次, 持续 28 天。检测各组大鼠大脑海马多巴胺神经元形态及胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 蛋白表达、阳性细胞计数及 mRNA 表达。结果 电镜下益智宁神组海马多巴胺神经元线粒体等结构的损伤程度低于模型组。益智宁神组、托莫西汀组、哌甲酯组大鼠海马 GDNF 蛋白及 mRNA 表达高于模型组 ($P < 0.05$); 托莫西汀组 GDNF mRNA 高于益智宁神组、哌甲酯组 ($P < 0.05$); 各组大鼠海马 GDNF 阳性细胞计数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 益智宁神颗粒可以减轻 SHR 幼鼠海马多巴胺神经元损伤程度, 提高 GDNF 蛋白及其 mRNA 表达, 可能是其作用机制之一。

关键词 注意缺陷多动障碍; 益智宁神颗粒; 多巴胺; 胶质细胞源性神经营养因子; 自发性高血压大鼠

注意缺陷多动障碍 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 俗称多动症, 是儿童期常见的神经发育障碍性疾病之一, 患病率为 3% ~ 5%, 高发于学龄期儿童, 但有 70% 的患儿症状持续到青春期^[1]。ADHD 易患学习障碍、情绪障碍以及社会适应障碍等, 对学习及生活产生广泛影响^[2]。近年来中医药干预 ADHD 取得一定进展, 其多靶点作用较显著, 以现代分子生物学技术来阐述中医药的作用机制及寻找中药活性成分亦逐渐得到发展^[3-5]。我们课题组在前期研究中发现, 益智宁神颗粒可明显改善 ADHD 儿童核心症状, 并能有效改善 ADHD 模型大鼠认知功能, 调节其脑组织中多巴胺、去甲肾上腺素含量^[6-9]。本实验以目前国际公认、使用较广泛的 ADHD 动物模型——幼龄自发性高血压大鼠 (SHR)^[10] 为动物模型, 与其同源的京都 (WKY) 大鼠作为正常对照组, 观察益智宁神颗粒对 SHR 大鼠海马组织中多巴胺神经元形态、胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 及

其 mRNA 表达的影响, 探讨益智宁神颗粒治疗 ADHD 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40 只 SHR 大鼠、10 只 WKY 大鼠均为雄性, 3 周龄, 体重 90 ~ 110 g, 清洁级, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 实验药物

益智宁神颗粒由紫河车 3 g、熟地黄 15 g、远志 9 g、泽泻 9 g、石菖蒲 9 g、黄连 3 g 组成, 四川新绿色药业科技发展股份有限公司提供, 批号: 1507029。盐酸哌甲酯缓释片 (美国 Janssen Cilag Manufacturing LLC 公司, 批号: 41E416)。盐酸托莫西汀胶囊 (美国 LILLY 公司, 批号: C315229)。0.5% 生理盐水 (中国大冢制药有限公司, 批号: BZW21234)。

1.3 主要试剂及仪器

戊二醛 (批号: 20151225, 常州市海拓实验仪器有限公司), 四氧化钨 (批号: Ab18956, 中杉

基金项目: 国家自然科学基金 (81403430)

* 通讯作者: zfts@163.com, 15222062977

金桥公司), 正常山羊血清封闭液 (批号: CW0130, 北京康为世纪生物科技有限公司), 第一抗体 (批号: 1608, 日本 TaKaRa 公司), 生物素化第二抗体 (批号: SP-9001, 上海研谨生物科技有限公司), 超纯 RNA 提取试剂 (批号: CW0581S, 日本 TaKaRa 公司), 反转录试剂盒 (批号: DRR047S, 日本 TaKaRa 公司), Real-time PCR 试剂盒 (批号: E090, 上海欣百诺生物公司), $5 \times$ RNA Loading Buffer (批号: SigmaR-3877, 日本 TaKaRa 公司), GDNF (稀释比例 1:200, 批号: Ab18956, 英国 Abcam 公司), β -actin (批号: DRR420A, 日本 TaKaRa 公司), DAB 显色试剂 (批号: 116975, 北京索莱宝公司)。

透射电镜仪 (日立公司, H-7500 型), 超薄切片机 (徕卡公司, UC-7 型), 涡旋振荡仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司, QL-902 型), 离心机 (德国 Eppendorf 公司, Centrifuge 5415D 型), 荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司, ABI7500 型), 分光光度计 (美国 Thermo scientific 公司, Nanodrop 2000 型), 电子天平 (德国 Sartorius 公司, BSA124S-CW 型), 去离子水仪 (美国 Purelab Plus 公司, JC16-H5HI98308 型), 电泳仪 (北京六一仪器厂, DYCZ-20C 型), 显微镜 (日本奥林巴斯公司, BX51T-PHD-J11 型)。

1.4 动物分组及干预方法

40 只 SHR 大鼠称重后采用随机区组法分为模型组、益智宁神组、哌甲酯组、托莫西汀组, 每组 10 只; 10 只 WKY 大鼠作为正常组。益智宁神组给予益智宁神颗粒溶液 (浓度为 3.75 g/ml) 按 3.75 g/100 g 灌胃, 哌甲酯组给予盐酸哌甲酯缓释片 5 mg/(kg·d) 灌胃, 托莫西汀组给予盐酸托莫西汀胶囊 0.3 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予 0.5% 生理盐水 2 mg/100 g 体重灌胃, 各组均每日 1 次, 持续 28 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 透射电镜法观察大脑海马多巴胺神经元形态 各组大鼠于治疗 28 天后断头处死, 在冰台上迅速分离其大脑中海马, 保存新鲜备用。用 2.5% 戊二醛固定标本 (4℃) 2~4h 以上后进行第一次清洗, 使用 1/15M 磷酸缓冲液 10~15 min, 共 3 次; 继而用 1% 四氧化锇固定 (4℃) 1h 后进行第二次清洗。然后依次进行脱水、浸透、包埋、聚合、超薄切片、电子染色, 最后使用透射电镜仪观察。

1.5.2 Western blot 法检测大脑海马 GDNF 蛋白表达 提取细胞总蛋白并测定蛋白浓度后, 将样品蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜, 封闭液稀释一抗 (内参抗体稀释度为 1:1000)、HRP 标记的二抗杂交 (1:3000) 等步骤, 化学发光显色, 凝胶图像分析系统测定光密度值, 用 Image J 1.43 软件分析灰度值 (美国 Media Cybernetics 公司)。

1.5.3 免疫组化法检测大脑海马 GDNF 阳性细胞计数 使用 PBS 冲洗标本, 取 0.5 cm × 0.5 cm × 0.1 cm 组织块进行固定、包埋, 切片烘烤 (60℃) 过夜, 脱蜡、入水, 依次滴加正常山羊血清封闭液、第一抗体、生物素化第二抗体、辣根酶标记链酶卵白素工作液相应时间后, 进行 DAB 显色, 用显微镜对标本进行 100 倍和 400 倍的显微照相, 选择有意义的组织相, 由多功能真彩色细胞图象分析管理系统进行分析计数。

1.5.4 RT-PCR 法检测大脑海马 GDNF mRNA 表达

1) 提取样本总 RNA: 向每 0.1 g 样品中加入 2ml RNAAiso Plus, 室温静置 5 min 后, 参照说明书提取 RNA, 使用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计测定 RNA 的浓度、纯度 (A260nm/A280nm 为 1.9~2.1)。2) RNA 电泳、消化: 取 5 μ l RNA 进行电泳, 以检测 RNA 的完整性; 将反转录试剂盒中的各组分充分混匀, 短暂离心, 使管壁上的溶液收集到管底, 42℃ 2 min, 4℃ 保存。3) 反转录: 将 RNA 模板、引物等溶解并置于冰上备用。依次经过反转录反应与反转录酶失活后, 4℃ 保存。4) Real-Time PCR 反应按说明书进行扩增, 扩增 40 个循环后, 将各样品 cDNA 10 倍稀释后取 2 μ l 作模板, 分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增, 引物由天津易生源生物技术有限公司合成, GDNF, 上游: CAAGGTAGGCCAGGCATGTT, 下游: ATCCACACCGTTTAGCGGAA, 产物大小: 113bp; β -actin, 上游: ACTCTGTGTGGATTGCTGCGC, 下游: AGAAAGGCTGTAAAACCGCAGC, 产物大小: 155bp。在 PCR 反应程序结束后, 使用仪器自带软件进行定量分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计学分析软件, 计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较方差齐则采用单因素方差分析, 方差不齐采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, 用 LSD 法进行两两比较。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

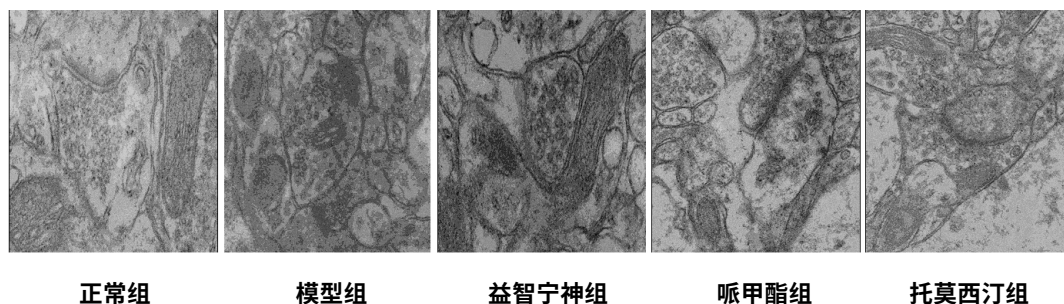


图 1 各组大鼠大脑海马中多巴胺神经元形态的超微结构 (×30 000)

2 结果

2.1 各组大鼠大脑海马多巴胺神经元形态变化

图 1 示, 正常组突触较密集, 在突触前膜内有线粒体和突触小泡聚集, 与突触间隙相靠近, 胞质内粗面内质网、核糖体等结构清晰, 偶见溶酶体。模型组神经元高度水肿, 细胞器较少, 胞质内线粒体可出现结构变暗、嵴和膜融合模糊不清, 出现空泡, 粗面内质网颗粒融合脱颗粒。益智宁神组神经元轻度水肿, 可见突触前膜内有线粒体和突触小泡相对聚集, 与突触间隙较靠近, 线粒体嵴和膜部分融合模糊不清, 但数量较模型组少, 粗面内质网轻度扩张。哌甲酯组神经元水肿程度轻于模型组, 线粒体损伤的结构变化明显重于益智宁神组, 粗面内质网扩张、颗粒融合、脱颗粒。托莫西汀组神经元水肿程度同哌甲酯组, 线粒体嵴和膜融合模糊不清, 粗面内质网明显扩张、脱颗粒。

2.2 各组大鼠大脑海马 GDNF 蛋白、阳性细胞计数及 mRNA 表达比较

表 1 各组大鼠大脑海马 GDNF 蛋白、阳性细胞计数及 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	蛋白阳性表达 (灰度值)	阳性细胞计数 (%)	mRNA
正常组	10	0.74 ± 0.05	34.33 ± 3.28	1.01 ± 0.01
模型组	10	0.87 ± 0.04	24.00 ± 5.86	1.16 ± 0.02*
益智宁神组	10	1.06 ± 0.03*△	27.67 ± 4.91	1.89 ± 0.03*△▲
托莫西汀组	10	1.17 ± 0.02*△	22.67 ± 1.45	2.07 ± 0.05*△
哌甲酯组	10	1.08 ± 0.04*△	26.00 ± 7.64	1.84 ± 0.04*△▲

注: GDNF, 胶质细胞源性神经营养因子; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与托莫西汀组比较, ▲ $P < 0.05$

表 1 示, 益智宁神组、托莫西汀组和哌甲酯组大鼠大脑海马 GDNF 蛋白表达均较正常组和模型组显著升高 ($P < 0.05$), 而 3 组间比较差异无统计学意义, 正常组和模型组之间差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠海马 GDNF 阳性细胞计数组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组比较, 其余各组大鼠海马 GDNF mRNA 表达均升

高, 并且益智宁神组、托莫西汀组和哌甲酯组高于模型组, 益智宁神组和哌甲酯组低于托莫西汀组 ($P < 0.05$), 而益智宁神组和哌甲酯组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

学习困难是 ADHD 的主要伴随症状, 研究发现 ADHD 儿童与正常儿童智力水平及均衡性差异存在统计学意义^[10-12]。目前公认的 ADHD 脑发育落后研究中所涉及的脑区结构之一为前额叶皮质^[13-14], 其与海马之间存在着密切的纤维联系, 而海马与学习、记忆、认知功能有关^[15-16]。因此, 除前额叶皮质外, ADHD 儿童亦可能存在海马功能与结构的异常。有研究显示, 中枢神经系统中多巴胺神经元的功能缺陷与 ADHD 发病密切相关^[17-18]。GDNF 是一种有效的多巴胺特异神经营养因子, 对多巴胺神经元不仅具有支持、保护和修复作用, 而且在神经前体细胞分化为多巴胺神经元过程中起到重要的促进作用^[19-20], 与神经发育和生长密切相关。GDNF 在大脑皮质、海马发育关键期的神经元内高度表达^[21-22], 并在靶组织或神经元损伤后表达迅速增加, 提示 GDNF 的靶神经分布和在突触可塑性上的特殊功能, 其表达增加可能是神经元自我保护的一种形式^[23]。

SHR 大鼠由 WKY 大鼠培育而成, 在 10 周龄后发生自发性高血压, 其幼龄期活动过度、行为冲动、注意力不集中等与 ADHD 行为极为相似, 同时表现出类似 ADHD 的较明显的执行功能障碍, 如厌恶延迟、对直接行为强化更敏感等^[24-25], 其多巴胺递质系统的变化机制也符合 ADHD 的一般模式^[26]。故幼年 SHR 大鼠是目前世界上应用较为广泛的 ADHD 动物模型之一^[27]。WKY 与其具有相同品系的特征, 因此多被选为 SHR 的正常对照动物。

中医学认为, 脑为髓海, 为“精明之府”; 肾精有生髓、充脑的功能。肾精充足, 髓海得养, 则

脑发育健全。而小儿的生理特点之一为“肾常虚”，临床中 ADHD 发病与遗传、孕产期不利因素等密切相关，更易致髓海失养，脑发育迟缓，从而出现注意力不集中、认知功能障碍等病理表现^[2]。因此，肾精亏虚、髓海发育迟缓是 ADHD 发病的关键，治宜益肾填精、髓脑得补，则精神凝聚。本实验所用益智宁神颗粒为中药复方，方中紫河车、熟地黄共为君药，益肾填精，生髓补脑；石菖蒲、远志开窍定志、宁心柔肝为臣药；泽泻甘寒入肾经，引药归经又防温燥太过；黄连苦寒，泻心肝火热，交通心肾。诸药合用，共奏益肾填精、宁心益智之功效。

本研究结果显示，益智宁神组大鼠海马多巴胺神经元线粒体等结构的损伤程度均低于模型组，GDNF 蛋白及 mRNA 表达均高于模型组，推测益智宁神颗粒可能通过修复 SHR 大鼠海马多巴胺结构损伤、提高 GDNF 表达来改善海马功能，从而达到治疗 ADHD 的作用。益智宁神组海马多巴胺神经元线粒体等结构的损伤程度低于哌甲酯组、托莫西汀组，提示在修复海马多巴胺结构损伤方面，益智宁神颗粒疗效优于 ADHD 常用西药盐酸哌甲酯缓释片和盐酸托莫西汀胶囊。在上调 GDNF mRNA 表达方面，盐酸托莫西汀胶囊优于益智宁神颗粒与盐酸哌甲酯缓释片，在促进 GDNF 蛋白表达方面，三者作用相当。综上所述，益智宁神颗粒可以减轻 ADHD 模型大鼠海马多巴胺神经元损伤程度，提高多巴胺特异性营养因子 GDNF 蛋白及其 mRNA 表达，从而促进 ADHD 儿童脑发育、改善大脑功能，达到治疗目的。

参考文献

- [1] 杜亚松. 注意缺陷多动障碍 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 10-11.
- [2] 郑毅, 刘靖. 中国注意缺陷多动障碍防治指南 [M]. 2 版. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2015: 8-14.
- [3] 倪新强, 韩新民. 中医药对注意力缺陷多动障碍的研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(3): 428-431.
- [4] 胡楠楠, 王雪峰. 中医药干预儿童多动综合征相关神经递质基因表达研究进展 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2014, 6(3): 212-214.
- [5] 雷爽, 韩新民. 注意力缺陷多动障碍中医药动物实验研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6): 1937-1939.
- [6] 李亚平, 马融, 魏小维, 等. 益智宁神颗粒治疗儿童多动症“肾阴不足肝阳偏旺”证的临床分析 [J]. 天津中医药, 2004, 21(5): 374-376.
- [7] 马融, 张喜莲. 髓海发育迟缓致儿童注意缺陷多动障碍病机假说探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(8): 737-739.
- [8] 李亚平, 马融, 魏小维. 儿童多动症临床辨证及证候分布规律的研究进展 [J]. 天津中医药, 2011, 28(5): 433-434.
- [9] 马融, 古今楠, 李新民, 等. 益智宁神颗粒对自发性高血压模型大鼠脑组织去甲肾上腺素、多巴胺的影响 [J]. 天津中医药, 2008, 25(1): 6-9.
- [10] TURAL HESAPÇIOĞLU S, ÇELİK C, ÖZMEN S, et al. Analyzing the Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised (WISC-R) in children with attention deficit and hyperactivity disorder: predictive value of subtests, kaufman, and bannatyne categories [J]. Turk Psikiyatri Derg, 2016, 27(1): 31-40.
- [11] 何淑华, 静进. 儿童注意缺陷多动障碍智力的 META 分析 [J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版, 2002, 10(5): 292-294.
- [12] 杨英, 沈理笑, 刘学政, 等. 注意缺陷多动障碍儿童智力水平分析 [J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(4): 334-336.
- [13] PETERSON BS, POTENZA MN, WANG Z, et al. An FMRI study of the effects of psychostimulants on default-mode processing during stroop task performance in youths with ADHD [J]. Am J Psychiatry, 2009, 166(11): 1286-1294.
- [14] QIU MG, YE Z, LI QY, et al. Changes of brain structure and function in ADHD children [J]. Brain Topogr, 2011, 24(3-4): 243-52.
- [15] 鲁利群, 范建义, 赵聪敏. 环境刺激对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠学习记忆及海马病理学的影响 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2007, 22(2): 103-105.
- [16] MCCAFFERY P, ZHANG J, CRANDALL JE. Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus [J]. J Neurobiol, 2006, 66(7): 780-791.
- [17] GIZER IR, FICKS C, WALDMAN ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review [J]. Hum Genet, 2009, 126(1): 51-90.
- [18] ALEX KD, PEHEK EA. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission [J]. Pharmacol Ther, 2007, 113(2): 296-320.
- [19] WILENS TE. Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. J Clin Psychopharmacol, 2008, 28(2): 46-53.
- [20] 郭雨霁, 李盛芳. 神经营养因子家族及其受体的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2001, 17(3): 288-294.
- [21] MARCO S, CANUDAS AM, CANALS JM, et al. Excita-

- tory amino acids differentially regulate the expression of GDNF, neurturin, and their receptors in the adult rat striatum. [J]. Exp Neurol, 2002, 174(2): 243–252.
- [2] KATO H, SEMBA R, TSUZUKI M, MIYAZAKI N, et al. Distribution and immunohistochemical localization of GDNF protein in selected neural and non-neural tissues of rats during development and changes in unilateral 6-hydroxydopamine lesions [J]. Neurosci Res, 2007, 59(3): 277–287.
- [3] MIYAZAKI H, OKUMA Y, NOMURA J, et al. Age-related alterations in the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the senescence-accelerated mouse brain [J]. J Pharmacol Sci, 2003, 92(1): 28–34.
- [4] SAGVOLDEN T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD) [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2000, 24(1): 31–39.
- [5] SAGVOLDEN T, RUSSELL VA, AASE H, et al. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. [J]. Biol Psychiatry, 2005, 57(11): 1239–1247.
- [6] SAGVOLDEN T, JOHANSEN EB, WØIEN 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.
- [7] 池震. 注意缺陷多动障碍动物模型: SHR 大鼠前额叶皮层基因表达谱特征的研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2005.
- [8] 马融, 梁繁荣. 中医儿科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009: 13–14.

Effects of Yizhi Ningshen Granules (益智宁神颗粒) on Morphology and Expression of GDNF Protein and mRNA of Dopamine Neurons in Hippocampus of Juvenile Spontaneously Hypertensive Rats

LI Rui¹, LI Yaping², MA Rong², LI Wei¹, ZHONG Chengliang², WEI Xiaowei², WANG Wei², JIN Li², WU Haijiao², TANG Wen²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193; 2. First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of Yizhi Ningshen Granules (益智宁神颗粒, YNG) in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Methods** Forty juvenile spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomized into the model group, YNG group, methylphenidate group and Tomoxetine group, with 10 rats in each group. Another 10 WKY rats were selected as the normal group. The YNG group was given 3.75 g/100 g of YNG solution (3.75 g/ml) by gavage, the Methylphenidate group was administered 5 mg/(kg·d) of Methylphenidate Hydrochloride Extended-release Tablets by gavage, the Tomoxetine group was given 0.3 mg/(kg·d) of Atomoxetine Hydrochloride Capsules by gavage, and the normal group and the model group were given 2 mg/100 g of 0.5% normal saline by gavage. Each group was treated once a day for 28 days. The cerebral hippocampal dopaminergic neuronal morphology, the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), positive cell count and mRNA expression were detected in each group. **Results** It was observed under electron microscope that the damage of mitochondria and other structures in the hippocampal dopamine neurons in YNG group was less serious than those in the model group. The expressions of GDNF protein and mRNA in hippocampus in the YNG group, the Tomoxetine group and the Methylphenidate group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). The level of GDNF mRNA in the Tomoxetine group was higher than that in the YNG group and the Methylphenidate group ($P < 0.05$). There was no significant difference in GDNF positive cell count among all groups ($P > 0.05$). **Conclusion** YNG could alleviate the damage of dopamine neurons in hippocampus of SHR rats and improve the expressions of GDNF protein and its mRNA, which may be one of its mechanism.

Keywords attention deficit hyperactivity disorder (ADHD); Yizhi Ningshen Granules (益智宁神颗粒); dopamine; glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF); spontaneously hypertensive rat (SHR)

(收稿日期: 2017-04-05; 修回日期: 2017-06-19)

编辑: 邓媛