

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.24.015

益智宁神颗粒对自发性高血压幼鼠下丘脑、海马中多巴胺及去甲肾上腺素的影响

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

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津市西青区王兰庄昌凌路 88 号, 300381; 2. 天津中医药大学)

摘要 目的 探讨益智宁神颗粒治疗注意缺陷多动障碍 (ADHD) 的可能作用机制。方法 24 只自发性高血压 (SHR) 幼鼠随机分为模型组、中药组、托莫西汀组、哌甲酯组, 每组 6 只。6 只京都大鼠 (WKY) 设为正常组。中药组给予益智宁神颗粒 1.1 g/(kg·d) 灌胃, 托莫西汀组给予托莫西汀胶囊 3 mg/(kg·d) 灌胃, 哌甲酯组给予哌甲酯片 5 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组和正常组给予与中药组等体积生理盐水灌胃。灌胃 4 周后检测各组大鼠海马及下丘脑中多巴胺 (DA) 及去甲肾上腺素 (NE) 含量。结果 与正常组比较, 模型组下丘脑 DA 含量升高, 海马 DA 含量降低 ($P < 0.05$), 下丘脑、海马 NE 均无明显变化 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 各给药组下丘脑 DA 含量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 托莫西汀组、哌甲酯组海马 DA 含量升高 ($P < 0.05$), 中药组海马 DA 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与中药组比较, 托莫西汀组下丘脑 DA 含量升高 ($P < 0.05$); 托莫西汀组、哌甲酯组海马 DA 含量升高, 且哌甲酯组海马 DA 含量高于托莫西汀组 ($P < 0.05$)。结论 益智宁神颗粒治疗 ADHD 可能通过调节 DA 含量起作用, 且不同脑区调节作用不同。

关键词 注意缺陷多动障碍; 益智宁神颗粒; 益肾填精法; 多巴胺; 去甲肾上腺素

注意缺陷多动障碍 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 是以注意集中困难、注意持续时间短暂、活动过度或冲动为主要特征的, 儿童及青少年期最常见的神经行为障碍。有研究调查发现, 约有 4.31% ~ 5.83% 的学龄儿童罹患该病, 其中有一半以上可持续到青少年, 甚至影响到成年期^[1]。该病的病因及发病机制复杂, 遗传、环境、解剖及神经递质等均被列入研究的热点, 其中最关注的神经递质为多巴胺 (DA) 及去甲肾上腺素 (NE)。目前现代医学将中枢兴奋剂哌甲酯及非中枢兴奋剂托莫西汀作为治疗 ADHD 的一线用药, 但由于其副作用较多且需长期服用, 不能被家长广泛接受。我们前期以益智宁神颗粒为药物载体运用益肾填精法干预 ADHD 取得稳定的临床疗效^[2-3]。自发性高血压大鼠 (SHR) 是 1969 年由东京 Okamoto 选育 Wistar 京都 (WKY) 大鼠培育而成, 鼠龄在 8 周之内时其行为表现和 DA 递质系统的变化机制符合 ADHD 的模式, 而其血压尚未达到成年

鼠的水平, 故幼年 SHR 大鼠是目前世界上应用最为广泛的 ADHD 动物模型之一^[4-7]。本实验通过 SHR 幼鼠下丘脑及海马内 DA 及 NE 变化情况, 探讨益肾填精法治疗 ADHD 的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性清洁级 SHR 幼鼠 24 只, 雄性清洁级 WKY 大鼠 6 只, 3 周龄, 体重 90 ~ 110 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。大鼠饲养于清洁环境中, 室温为 (22 ± 2) °C, 湿度为 50%。大鼠自由摄食饮水, 每天保持 12 h 光照。

1.2 实验药物

益智宁神颗粒组成: 紫河车 3 g, 石菖蒲 9 g, 远志 9 g, 麻黄 6 g, 龙骨 15 g, 黄连 6 g, 由四川新绿色药业科技发展股份有限公司提供, 批号: 1507029, 用生理盐水将益智宁神颗粒配制成浓度为 5.5 mg/ml 的药液。托莫西汀胶囊 (择思达): 美国 Lilly del Caribe 公司, 批号: C315229, 规格: 10 mg/粒。哌甲酯片 (专注达): 西安杨森制药有限公司, 批号: 4IE416, 规格: 18 mg/片。

基金项目: 国家自然科学基金 (81403430); 天津中医药大学第一附属医院新医疗新技术开发专项 (2016014)

* 通讯作者: zf_ts@163.com, 15222062977

1.3 主要试剂及仪器

NE (Sigma 公司, 货号: A7257-500MG); DA (Sigma 公司, 货号: H8502-5G); 异丙醇-乙酸乙酯 (江苏省东洲化学制品有限公司, 批号 20151229)。

LC-6000 型高效液相色谱仪 (包括: SCL-6A 色谱系统控制器, LC-6A 恒流泵, L-ECD-6A 电化学检测器, Anastar 色谱工作站), 美国科美特公司; AR2140 型电子分析天平, 美国奥豪斯公司; 色谱分析柱 Kromasil (4.6 × 250 mm C₁₈), 天津色谱科学技术公司; MSB010. CX2.5 型离心机, 德国 Eppendorf 公司; HQQ005 型超声波清洗机, 无锡超声电子设备厂; YKH-1 型液体快速混合器, 江西医疗器械厂; VS-25S 匀浆器, 海门弘澄实验器材制造有限公司。

1.4 动物分组及给药

24 只 SHR 幼鼠适应性喂养 1 天后, 称重并统一标记大鼠编号为 1 ~ 24 号, 采用随机区组设计, 按照 SHR 大鼠体重由小到大, 每 4 只大鼠配成 1 个区组, 共配 6 个区组, 查随机数字表, 指定从第 2 行第 1 列向右查 24 个数, 继而在每个区组内根据 4 只大鼠获得的随机数字大小排序, 将其分配到各实验组。分为模型组、中药组、托莫西汀组及哌甲酯组, 每组 6 只; 6 只 WKY 大鼠设为正常组。中药组给予益智宁神颗粒 1.1 g/(kg · d) 灌胃, 托莫西汀组给予托莫西汀胶囊 3 mg/(kg · d) 灌胃, 哌甲酯组给予哌甲酯片 5 mg/(kg · d) 灌胃, 模型组和正常组给予与中药组等体积量生理盐水灌胃。每天上午 8:00—9:00 灌胃 1 次, 连续 4 周。

1.5 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (5:95), 每 1000 ml 中含乙酸钠 0.105 mol, 柠檬酸钠 0.015 mol, 离子对试剂庚烷磺酸钠 0.25 mol/L 取用 3.0 ml, 电压: 70 mV, 流速: 0.7 ml/min; 进样量: 20 μl。

1.6 标准曲线的绘制

精密称取 DA 对照品 1 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 用流动相溶解并定容, 摇匀, 作为对照品储备液 (含 DA 100 μg/ml)。精密量取 NE、DA 对照品储备液适量, 至 10 ml 容量瓶中, 用流动相定容, 摇匀, 即得 10、20、50、80、100、150、300、800 ng/ml 系列浓度对照品供试液。吸取 20 μl 注入色谱柱, 以去 NE、DA 各自的峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 计算得 DA、NE 各自的回归方程,

分别绘制标准曲线。

1.7 大鼠下丘脑、海马 DA、NE 含量测定

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的海马和下丘脑, 速冻后转移至 -80℃ 冰箱保存备用。配制 DA、NE 神经递质标准品储备液: 精确称量 DA、标准品各 1 mg, 分别置于 10 ml 容量瓶中, 用超纯水定容配制成 0.1 g/L 的储备液, 置冰箱备用, 临用时稀释至所需浓度。标准品溶液分装后于 -70℃ 冻存, 备用。流动相水相: 甲醇-水 (5:95), 每 1000 ml 中含乙酸钠 0.105 mol, 柠檬酸钠 0.015 mol, 离子对试剂庚烷磺酸钠 0.25 mol/L, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 超声脱气。将每组大鼠下丘脑和海马标本精密称定后置匀浆器中做组织匀浆, 用 500 μl 纯水清洗转移至离心管中, 精密加异丙醇-乙酸乙酯 (2:8) 1 ml, 置旋涡混合器上混匀提取后, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液; 同法重复提取一次, 合并上清液, 室温下吹干, 用 200 μl 流动相复溶, 取 20 μl 进样。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较方差齐则采用单因素方差分析; 方差不齐先进行对数转换, 若仍不齐, 则采用非参数检验 Kruskal-Wallis 检验, 并以中位数和四分位间距 M (Q25 ~ Q75) 表示; 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 标准曲线结果

将对照品稀释成不同浓度梯度, 以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行回归, 得到回归方程和相关系数, 绘制标准曲线。结果显示, NE、DA 均在 10 ~ 800 ng/ml 范围内, 两种神经递质的浓度与其峰面积呈良好的线性关系。回归方程如下: 去甲肾上腺素 (NE) $Y = 1255.8X - 2854.3r = 0.9999$; 多巴胺 (DA) $Y = 873.69X - 9001.7r = 0.9999$ 。

2.2 各组大鼠下丘脑 NE、DA 含量比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组、托莫西汀组、哌甲酯组大鼠下丘脑 DA 含量显著升高 ($P < 0.05$), 中药组下丘脑 DA 含量无明显变化 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 各给药组下丘脑 DA 含量均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与中药组比较, 托莫西汀组大鼠下丘脑 DA 含量升高 ($P < 0.05$);

托莫西汀组、哌甲酯组间下丘脑 DA 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组和模型组比较,各给药组 NE 含量均明显升高 ($P < 0.05$); 各给药组间 NE 含量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠下丘脑 NE、DA 含量比较 (ng/g)

组别	鼠数	DA ($\bar{x} \pm s$)	NE [M ($Q_{25} \sim Q_{75}$)]
正常组	6	68.44 $\pm$ 48.23	12.45 (7.40 ~ 32.13)
模型组	6	129.30 $\pm$ 48.16*	13.41 (7.79 ~ 15.75)
中药组	6	74.07 $\pm$ 24.12	80.04 (43.06 ~ 92.76) * Δ
托莫西汀组	6	152.82 $\pm$ 77.31* Δ	44.23 (33.66 ~ 96.81) * Δ
哌甲酯组	6	118.41 $\pm$ 59.50*	37.04 (25.28 ~ 73.61) * Δ

注: DA, 多巴胺; NE, 去甲肾上腺素; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组大鼠海马 NE、DA 含量比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组海马 DA 含量降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 托莫西汀组、哌甲酯组海马 DA 含量升高, 且哌甲酯组海马 DA 含量高于正常组 ($P < 0.05$), 中药组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与中药组比较, 托莫西汀组、哌甲酯组海马 DA 含量升高, 且哌甲酯组海马 DA 含量高于托莫西汀组 ($P < 0.05$)。各组海马 NE 含量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠海马 NE、DA 含量比较 (ng/g)

组别	鼠数	DA ($\bar{x} \pm s$)	NE [M ($Q_{25} \sim Q_{75}$)]
正常组	6	61.87 $\pm$ 25.28	71.23 (44.47 ~ 98.60)
模型组	6	26.86 $\pm$ 11.86*	28.69 (27.45 ~ 62.94)
中药组	6	34.19 $\pm$ 11.58*	45.52 (42.50 ~ 99.82)
托莫西汀组	6	85.55 $\pm$ 16.08 Δ	50.71 (36.10 ~ 60.85)
哌甲酯组	6	143.09 $\pm$ 38.17* Δ Δ	14.93 (6.59 ~ 86.92)

注: DA, 多巴胺; NE, 去甲肾上腺素; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药组比较, $\Delta P < 0.05$; 与托莫西汀组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

ADHD 属中医学“躁动”“失聪”“健忘”等范畴。我们通过近二十年的临床实践, 结合中医基础理论及现代医学理论知识, 提出了肾精亏虚为小儿脑病的主要病理基础, ADHD 乃髓海发育迟缓所致的中医病机学说^[9]。认为本病病位在脑, 其本在肾, 为肾精亏虚, 脑髓失养, 阴阳失调所致。治疗当从肾论治, 以填精之品益髓健脑, 确立了益肾填精的基本治疗法则。本实验中所用药物益智宁神颗粒即以益肾填精法为原则组方, 方中紫河车味甘、咸、温, 主入肾经, 养血益肾填精为君; 石菖蒲味辛、温, 入心肝经, 开窍、豁痰、理气、活血, 远志辛温, 入心肾二经, 安神益智、解郁, 麻

黄辛、微苦、温, 入肺、膀胱经, 取其辛运通络之用, 三药相合共奏开窍益智醒神之功为臣; 龙骨甘、涩、平, 入心肝肾经, 益肾安神为佐; 黄连苦寒, 入心肝经, 泻心肝之火, 交通心肾, 且制君药滋腻补益太过为使。纵观全方, 诸药相配补而不滞, 开而不燥。

DA 为脑内兴奋性的递质, 主要调控中枢神经系统的多种生理功能, 如认知、活动、情感、摄食、内分泌等, 当脑内 DA 不足时, 导致大脑的抑制功能不足, 不能有效地过滤进入大脑的无关刺激, 导致注意力不集中及冲动多动行为^[9]。以哌甲酯为代表的中枢神经兴奋类药物通过促进中枢多巴胺的释放阻滞突触前多巴胺转运体对多巴胺的重摄取, 从而提高突触间隙多巴胺的浓度以达到治疗作用^[307,316]。去甲肾上腺素假说认为, ADHD 是觉醒过度, 而苯丙胺可竞争性地抑制 NE 与受体相结合达到改善症状的目的^[9]。非中枢神经兴奋剂托莫西汀通过选择性抑制突触前膜 NE 的转运, 增加突触间隙中 NE 的浓度而达到治疗作用^[9]。益智宁神颗粒经临床验证能够改善 ADHD 症状, 其中医作用机制为益肾填精、充养脑髓, 促进脑发育^[3-5], 本研究正是基于观察下丘脑、海马两个不同脑区 DA 和 NE 两种不同递质的变化而探讨中药促进脑发育的作用机制和特点。

本研究结果显示, ADHD 模型鼠的下丘脑 DA 有异常升高, NE 无异常改变。益智宁神颗粒能够降低下丘脑 DA 至正常组水平, 西药托莫西汀、哌甲酯均无此作用, 中、西药均能升高下丘脑 NE。有研究中模型组海马 DA 较正常组显著下降, NE 无异常改变; 西药托莫西汀、哌甲酯均能提高海马 DA 水平, 而中药组对海马部位的 DA 无改善作用。本课题组以往研究结果^[10-12]说明, SHR 幼鼠不同脑区 DA 变化的方向并非一致, 在下丘脑是升高的, 而在前额叶和海马是降低的, 纹状体并没有观察到这两种递质的异常改变。本研究中西药物治疗均有效, 但哌甲酯、托莫西汀及中药益智宁神颗粒三者作用的脑区部位和对 DA 递质调节的方向均不一样。综上所述, 可以初步得出如下结论: ADHD 模型大鼠多巴胺神经递质有不同的变化方向, 前额叶皮层和而海马内的多巴胺显示降低, 而下丘脑内的多巴胺是显示升高的; 益智宁神颗粒的干预对两个不同脑区 DA 的影响显示出具有多靶点的双向调节作用, 可以降低下丘脑内 DA 含量的同时提高前额叶皮层 DA 的含量至正常水平, 而托莫西汀和哌甲酯的作用显示是单向的, 影响的脑区部位也相对

固定。

本研究还存在如下不足: 1) 没有设立中药的不同剂量进行比较和观察, 对中药量效关系及剂量对作用靶点的影响方面探索不足; 2) 本研究为动物实验, 并且模型组与正常组病变的脑区, 以及相关神经递质的变化与临床 ADHD 患儿的实际情况不完全一致, 有待于今后进一步研究。

参考文献

- [1] 郑毅. 注意缺陷多动障碍 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 2070.
- [2] 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.
- [3] 马融, 魏小维, 李亚平, 等. 益肾填精法治疗儿童多动症及其神经生化机制研究 [J]. 天津中医药, 2007, 24(4): 309.
- [4] 马融, 魏小维, 李亚平, 等. 益肾填精法治疗儿童多动症及其神经生化机制研究 [J]. 天津中医药, 2007, 24(4): 309.
- [5] 李亚平, 马融, 魏小维. 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.
- [6] 苏林雁. 儿童多动症 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2004.
- [7] 徐岩, 周晓林, 王玉凤. 儿童注意缺陷多动障碍病因学研究进展 [J]. 中国行为医学科学杂志, 2003, 12(1): 107-108.
- [8] 杜亚松. 注意障碍、多动综合征发病的单胺机制 [J]. 国外医学儿科学分册, 1995, 22(3): 116-120.
- [9] 邓红珠, 邹小兵. 2011 版美国儿科学会《儿童青少年注意缺陷多动障碍诊断、评估和治疗临床实用指南》解读 [J]. 中国实用儿科杂志, 2012, 27(2): 99-101.
- [10] 李巍, 李亚平, 李瑞, 等. 益智宁神颗粒对幼年自发性高血压大鼠多动水平和认知功能的影响 [J]. 中医杂志, 2017, 58(11): 946-950.
- [11] 李瑞, 李亚平, 马融, 等. 益智宁神颗粒对 SHR 大鼠前额叶纹状体多巴胺含量、GDNF mRNA 及其蛋白表达的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(6): 449-454.
- [12] 马融, 古今楠, 李新民, 张喜莲. 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.

Effects of Yizhi Ningshen Granules (益智宁神颗粒) on Dopamine and Norepinephrine in the Hypothalamus and Hippocampus of Immature Spontaneously Hypertensive Rats

LI Yaping¹, LI Wei¹, LI Rui², YANG Changquan¹, WEI Xiaowei¹, WANG Wei¹, ZHONG Chengliang¹, JIN Li¹, WU Haijiao¹, TANG Wen¹

(1. First Affiliated Hospital of Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 300381; 2. Tianjin University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible action mechanism of Yizhi Ningshen Granules (益智宁神颗粒) in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Methods** A total of 24 immature spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomly divided into a model group, a Chinese medicine group, a tomoxetine group, and a methylphenidate group, with 6 rats in each group, and 6 WKY were selected as the normal group. The Chinese medicine group was given Yizhi Ningshen Granules 1.1 g/(kg · d) by intragastric perfusion, the tomoxetine group was given tomoxetine capsules 3 mg/(kg · d), and the methylphenidate group was given methylphenidate tablets 5 mg/(kg · d) for gavage, the model group and the normal group were given normal saline with the same volume of the Chinese medicine group. After 4 weeks of gavage, the contents of dopamine (DA) and norepinephrine (NE) in hippocampus and hypothalamus were detected. **Results** Compared with the normal group, the DA content in the hypothalamus of the model group increased, and the DA content in the hippocampus decreased ($P < 0.05$), while NE in the hypothalamic and hippocampal did not change significantly ($P > 0.05$). Compared with the model group, there was no significant difference in the content of DA in the hypothalamus in all other groups ($P > 0.05$). The contents of DA in the hippocampus of the tomoxetine group and the methylphenidate group were increased ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the contents of DA in hippocampus of Chinese medicine group ($P > 0.05$). Compared with the Chinese medicine group, the DA content in the hypothalamus of the tomoxetine group was increased ($P < 0.05$). The content of DA in the hippocampus of the tomoxetine group and the methylphenidate group was increased, and the content of DA in the hippocampus of the methylphenidate group was higher than that of tomoxetine group ($P < 0.05$). **Conclusion** Yizhi Ningshen Granules in the treatment of ADHD may have functions through regulating DA content, and the regulatory effects are different in different brain regions.

Keywords attention deficit hyperactivity disorder; Yizhi Ningshen Granules; invigorating kidney for consolidating semen method; dopamine; norepinephrine

(收稿日期: 2018-02-23; 修回日期: 2018-08-03)

编辑: 王利芬