

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.20.015

实验研究

安神定志灵方对自发性高血压大鼠前额叶皮质 D β H、NET 的影响

雷爽¹, 宋宇尘², 韩新民^{2*}, 袁海霞², 周荣易², 孙继超², 刘睿²

1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市汉中路 155 号, 210029; 2. 南京中医药大学

摘要 **目的** 探讨安神定志灵方对注意力缺陷多动障碍 (ADHD) 的作用机制。 **方法** 将自发性高血压大鼠 (SHR) 40 只随机分为模型组、择思达组和安神定志灵低、中、高剂量组, 每组 8 只, 另设 Wistar 京都大鼠 (WKY) 8 只为正常 1 组, SD 大鼠 8 只为正常 2 组。择思达组给予盐酸托莫西汀胶囊 0.045 mg/(kg·d) 灌胃, 安神定志灵低、中、高剂量组分别给予安神定志灵方 6.7、13.4、26.7 g/(kg·d) 灌胃, 正常 1 组、正常 2 组、模型组均灌胃生理盐水 1.5 ml/100 g, 均每日早晚 2 次灌胃, 持续 4 周。运用蛋白免疫印迹法检测大鼠前额叶皮质多巴胺- β -羟化酶 (D β H)、去甲肾上腺素转运体 (NET) 蛋白表达, 运用 PCR 技术检测 D β H、NET mRNA 表达, 运用免疫荧光技术检测 D β H、NET 阳性细胞表达。 **结果** 与正常 1 组、正常 2 组比较, 模型组大鼠前额叶皮质 D β H 蛋白、mRNA 表达及阳性细胞表达量降低, NET 蛋白、mRNA 表达及阳性细胞表达量升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 择思达组及安神定志灵低剂量组 D β H 蛋白、mRNA 表达及阳性细胞表达量升高, 择思达组和安神定志灵低、中剂量组 NET 蛋白、mRNA 表达及阳性细胞表达量降低 ($P < 0.05$); 与择思达组比较, 安神定志灵低剂量组 D β H 蛋白、mRNA 表达及阳性细胞表达量升高, 安神定志灵高剂量组 NET 蛋白、mRNA 表达及阳性细胞表达量降低 ($P < 0.05$)。 **结论** 安神定志灵方可能通过调控 SHR 大鼠前额叶皮质 D β H、NET 的表达, 达到控制注意力缺陷多动障碍临床症状的目的。

关键词 安神定志灵; 注意力缺陷多动障碍; 多巴胺- β -羟化酶; 去甲肾上腺素转运体

注意力缺陷多动障碍 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 是儿童时期常见的神经发育障碍性疾病, 主要表现为注意力不集中、多动和冲动等症状^[1]。ADHD 全球发病率为 5.3% ~ 7.1%^[2], 全球学龄儿童患病率为 5% ~ 6%^[3]。2018 年一项 Meta 分析指出, 中国儿童患病率 5.6%, 其中男孩患病率 7.7%, 女孩患病率 3.4%^[4]。本课题组根据多年临床经验总结出 ADHD 主要病机是心肝火旺、痰热内扰、阴阳失调, 提出了清心平肝、豁痰开窍、安神定志、调和阴阳的治则^[5], 自拟安神定志灵方。前期临床研究^[6]证实, 安神定志灵方治疗儿童多动症临床疗效肯定。ADHD 被广泛认为是一个神经发育障碍性疾病, 目前已有研究^[7-9]证实, 前额叶皮质

(PFC) 功能障碍以及多巴胺 (DA) 和去甲肾上腺素 (NE) 递质失衡是其机制之一。前期实验研究^[9-10]表明, 安神定志灵方可提高 ADHD 模型动物前额叶皮质及纹状体 DA 和 NE 递质水平。DA、NE 属于儿茶酚胺类神经递质, 多巴胺- β -羟化酶 (D β H) 是 DA、NE 神经化学通路的重要酶, 是 NE 合成的必需催化酶; 去甲肾上腺素转运体 (NET) 的再摄取是 NE 清除的主要途径^[11], 所以两者是影响 NE 含量的关键。本研究以 D β H、NET 为切入点, 探讨安神定志灵方的可能药效机制。本研究通过南京中医药大学动物伦理委员会动物伦理审查, 批准编号 ACU170803。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级自发性高血压大鼠 (SHR) 40 只, Wistar 京都大鼠 (WKY) 8 只, SD 大鼠 8 只, 均

基金项目: 国家自然科学基金 (81503614, 81674023)

* 通讯作者: hxmlnj@163.com, 15195996828

为雄性, 3 周龄, 体重 (76.7 ± 7.3) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物合格证号 SCCK (京) 2012-0001。实验大鼠自由饮食进水, 适应性饲养 7 天, 饲养温度 $22 \sim 24^{\circ}\text{C}$, 饲养湿度 $50\% \sim 60\%$ 。

1.2 药物

安神定志灵方组成: 醋南柴胡 6 g, 黄芩 10 g, 远志 6 g, 连翘 10 g, 石菖蒲 10 g, 郁金 10 g, 天竺黄 10 g 等, 购自南京中医药大学国医堂中药房。采用旋转蒸发仪将药液分别浓缩至 0.45、0.89、1.78 g/ml。盐酸托莫西汀胶囊 (择思达, 美国 LILLY DEL CARIBE 公司, 进口药品注册证号 H20110150, 40 mg/片), 加无菌生理盐水配置成浓度 0.67 mg/ml 混合液, 4°C 保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

β -actin 抗体 (批号: ab5694)、NET 抗体 (批号: ab41559), 美国 Abcam 公司; D β H 抗体 (美国 Santa 公司, 批号: sc-47707); BCA 试剂盒 (批号: 23227)、ECL 化学发光底物 (批号: 32109), Thermo 公司; Trizol 裂解液 (批号: 9109)、逆转录试剂盒 (批号: RR036A)、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (批号: RR820A), Takara 公司; Alexa Fluor 488 荧光二抗 (批号: 11-545-003)、594 荧光二抗 (批号: 111-585-003), Jackson Immuno Research 公司; 10% 水合氯醛 (Aladdin 公司, 批号: C104202); 4% 多聚甲醛 (Servicebio 公司, 批号: G1101); 30% 蔗糖溶液 (Bio Froxx 公司, 批号: 1245GR500); DAPI (Beyotime 公司, 批号: C1002)。

MM400 型球磨机 (德国 Retsch 公司); 5427R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); Tissue-Tek-VIP6 型全自动真空组织脱水机 (日本 Sakura 公司); Histostar 型包埋机、Finesse E + 型手动切片机、Shandon 型全自动染色机, 美国 Thermo 公司; BX43 型荧光显微镜 (日本 Olympus 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 分组及给药方法

40 只 SHR 大鼠采用随机数字表分为模型组、择思达组及安神定志灵低、中、高剂量组, 每组 8 只; 另将 8 只 WKY 大鼠设为正常 1 组, 8 只 SD 大

鼠设为正常 2 组。每日 8:00 称重, 根据动物质量调整灌胃量。择思达组给予盐酸托莫西汀胶囊 $0.045 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 安神定志灵低、中、高剂量组分别给予安神定志灵方 6.7、13.4、26.7 g/ $(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 中剂量等同于临床等效剂量^[3]。正常 1 组、正常 2 组、模型组均灌胃生理盐水 1.5 ml/100 g。各组大鼠每日早晚 2 次灌胃, 持续 4 周。

1.5 观察指标及方法

每组采用随机数字表选取大鼠 5 只, 末次给药后禁食 12 h, 10% 水合氯醛 1 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 处死大鼠, 取脑, 冰上迅速分离大鼠前额叶皮质, 置于冻存管中于液氮保存, 取材结束后转移至 -80°C 保存备用。每组另外 3 只大鼠, 末次给药后禁食 12 h, 10% 水合氯醛 1 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 分离心脏, 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, 放入 30% 蔗糖溶液中沉底。

1.5.1 蛋白免疫印迹法检测前额叶皮质 D β H、NET 蛋白表达 前额叶皮质脑组织加入裂解液冰上裂解, 4°C 、12000 r/min 离心 15 min (半径 6.5 cm) 取上清, 按照 BCA 试剂盒操作说明稀释样品、测定浓度、蛋白变性。按照步骤制胶、上样、电泳、转膜, 5% BSA 室温封闭 2 h。分别加入兔源 D β H 一抗 (1:200), 兔源 NET 一抗 (1:1000) 4°C 孵育过夜, 冲洗后加入羊抗兔二抗 (1:3000) 室温孵育 2 h, 冲洗条带 3 次, 每次 10 min, ChemiDoc MP 凝胶成像系统曝光。Image Lab 5.1 软件分析各泳道条带灰度值, 以 β -actin 为参照, 以目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值表述目的蛋白的相对表达量。

1.5.2 实时荧光定量 PCR 法检测前额叶皮质 D β H、NET mRNA 表达 提取前额叶皮质脑组织总 RNA, 参照逆转录试剂盒操作逆转录为 cDNA, 96 孔板加样, 4°C 、4000 r/min 离心 10 min (半径 6.5 cm), 放入荧光 PCR 仪进行 PCR 实验, 反应条件: 37°C 15 min, 85°C 5 s; real-time PCR 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。引物合成由上海生工生物工程有限公司合成, D β H: 上游 5'-TGGAACGTCAGCTATGACCA-3', 下游 5'-ATGACGAGGTCTGCGTTCTC-3', 产物长度 2250 bp; NET: 上游 5'-GGCGACCATACCAAATACTCCA-3', 下游 5'-GACCATCAGGCATAGCAACAGC-3', 产物长度 2257 bp; GAPDH: 上游

5'-GGCAAGTTCAATGGCAGCT-3', 下游 5'-TGGT-GAAGACGCCAGTAGACTC-3', 产物长度 1329 bp。结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法表示。

1.5.3 免疫荧光法检测前额叶皮质 D β H、NET 表达 石蜡切片常规脱蜡, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 抗原修复, 用 PBS 配置新鲜的 3% H₂O₂, 室温封闭 10 min, 双蒸水洗 1 次, PBS 洗 5 min, 甩去多余液体加一抗室温下孵育 1 h, PBS 洗 3 次各 5 min, 滴加 1:200 稀释的 Alexa Fluor 488、594 荧光标记第二抗体, 室温避光作用 1 h, 倾去多余的二抗, PBS 缓冲液漂洗 2 遍, 每遍 5 min, 加入 DAPI 室温作用 5~10 min, 抗淬灭封片剂封片, 在荧光显微镜下观察。运用 Image J 1.52V 软件计算累积吸光度值。

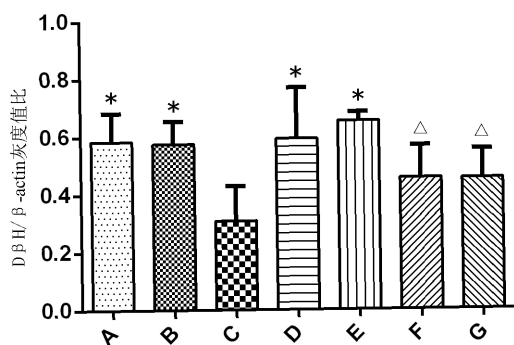
1.6 统计学方法

采用 Graphpad 6 统计软件, 计量资料符合正态分布采用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 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。

2 结果

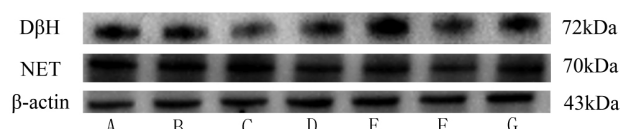
2.1 各组大鼠前额叶皮质 D β H、NET 蛋白表达比较

图 1 示, 与正常 1 组、正常 2 组比较, 模型组大鼠前额叶皮质 D β H 蛋白表达降低, NET 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 择思达组及安神定志灵低剂量组 D β H 蛋白表达升高, 择思达组及安神定志灵低、中剂量组 NET 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与择思达组比较, 安神定志灵中、高剂量组 D β H 蛋白表达降低, 安神定志灵高剂量组 NET 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。各组大鼠前额叶皮质 D β H、NET 蛋白表达电泳图见图 2。



注: A, 正常 1 组; B, 正常 2 组; C, 模型组; D, 择思达组; E, 安神定志灵低剂量组; F, 安神定志灵中剂量组; G, 安神定志灵高剂量组; D β H, 多巴胺- β -羟化酶; NET, 去甲肾上腺素转运体; 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与择思达组比较, $\Delta P < 0.05$

图 1 各组大鼠前额叶皮质 D β H、NET 蛋白相对表达比较



注: A, 正常 1 组; B, 正常 2 组; C, 模型组; D, 择思达组; E, 安神定志灵低剂量组; F, 安神定志灵中剂量组; G, 安神定志灵高剂量组; D β H, 多巴胺- β -羟化酶; NET, 去甲肾上腺素转运体

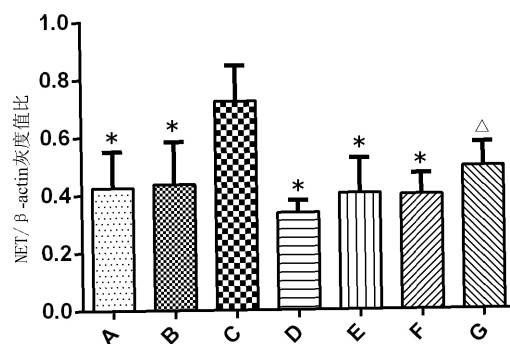
图 2 各组大鼠前额叶皮质 D β H、NET 蛋白电泳图

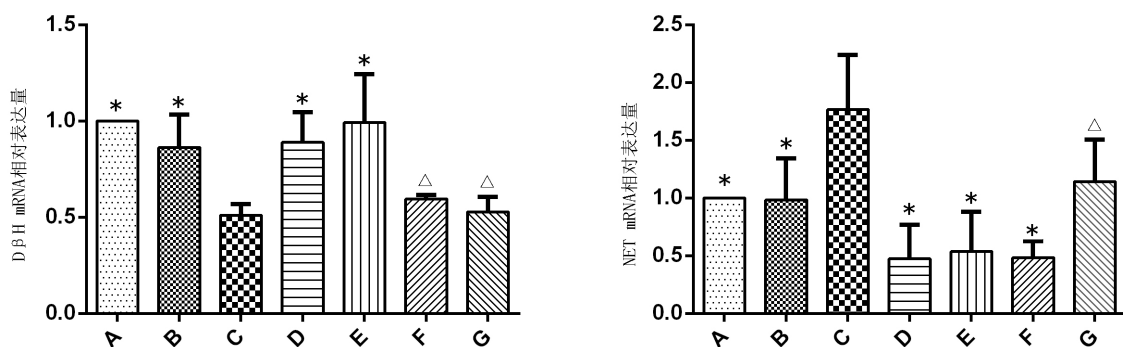
2.2 各组大鼠前额叶皮质 D β H、NET mRNA 表达比较

图 3 示, 与正常 1 组、正常 2 组比较, 模型组大鼠前额叶皮质 D β H mRNA 表达降低, NET mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 择思达组、安神定志灵低剂量组 D β H mRNA 表达升高, 择思达组和安神定志灵低、中剂量组 NET mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。与择思达组比较, 安神定志灵中、高剂量组 D β H mRNA 表达降低, 安神定志灵高剂量组 NET mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠前额叶皮质 D β H、NET 阳性细胞表达比较

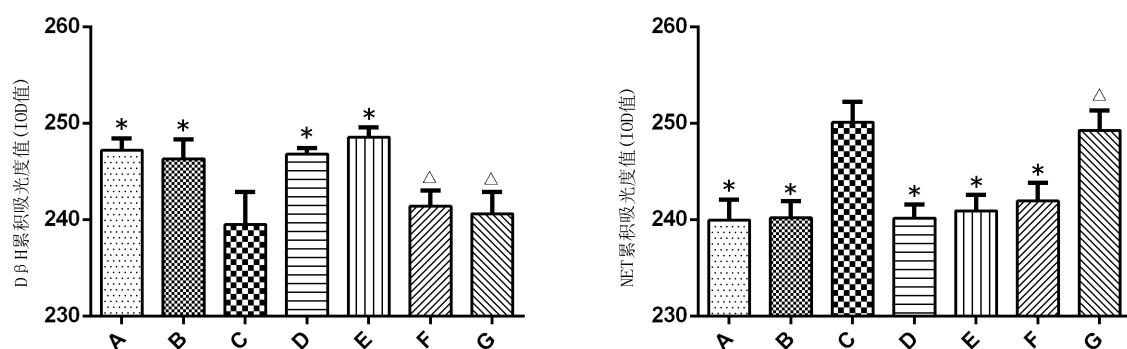
图 4 示, 与正常 1 组、正常 2 组比较, 模型组大鼠前额叶皮质 D β H 阳性细胞表达降低, NET 阳性细胞表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 择思达组及安神定志灵低剂量组 D β H 阳性细胞表达升高, 择思达组及安神定志灵低、中剂量组 NET 阳性细胞表达降低 ($P < 0.05$)。与择思达组比较, 安神定志灵中、高剂量组 D β H 阳性细胞表达降低, 安神定志灵高剂量组 NET 阳性细胞表达升高 ($P < 0.05$)。





注: A, 正常 1 组; B, 正常 2 组; C, 模型组; D, 择思达组; E, 安神定志灵低剂量组; F, 安神定志灵中剂量组; G, 安神定志灵高剂量组; DβH, 多巴胺-β-羟化酶; NET, 去甲肾上腺素转运体; 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与择思达组比较, $\Delta P < 0.05$

图 3 各组大鼠前额叶皮质 DβH、NET mRNA 相对表达比较



注: A, 正常 1 组; B, 正常 2 组; C, 模型组; D, 择思达组; E, 安神定志灵低剂量组; F, 安神定志灵中剂量组; G, 安神定志灵高剂量组; DβH, 多巴胺-β-羟化酶; NET, 去甲肾上腺素转运体; 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与择思达组比较, $\Delta P < 0.05$

图 4 各组大鼠前额叶皮质 DβH、NET 阳性细胞表达比较

3 讨论

近年来中医药对 ADHD 的基础研究逐渐深入。安神定志灵方是我们治疗 ADHD 心肝火旺证的经验方, 临床证明其对 ADHD 心肝火旺证安全有效^[6]。方中黄芩苦寒, 清心肝实火; 柴胡、郁金行气解郁, 清肝平肝, 并能泻热通便使热从大肠而下; 天竺黄清热豁痰, 凉心定惊; 远志化痰宁心, 安神益智; 石菖蒲豁痰开窍, 兼能醒神益智。诸药合用使心火得清, 肝阳得平, 痰湿得除, 神得安, 志得定, 阴阳得平^[13]。

SHR 大鼠是目前公认的 ADHD 动物模型, 可以表现为 ADHD 部分行为和神经化学特点^[14], SHR 大鼠源自 WKY 大鼠, 因此多以 WKY 鼠作为 SHR 的正常对照组^[15]。但近年来有学者发现 WKY 鼠在行为学实验中的表现比其他种系大鼠差, 显示出某些抑郁特性^[16], 可能不适宜作为正常对照组。为了实验更加严谨, 本实验设两种大鼠同为正常对照。临床研究^[17]证实, 盐酸托莫西汀可以治疗

ADHD 持续性注意力障碍, 故本研究选择其为阳性对照药物。

现代研究^[18]表明, 儿茶酚胺信号通路的调节障碍是 ADHD 发病机制的关键。DA 和 NE 系统在 ADHD 的发病中起到了至关重要的作用^[8]。一项 Meta 分析指出 ADHD 患儿血浆和尿中 NE 水平降低可能与 DβH 活性减低有关^[19]。治疗 ADHD 的常用药物可以通过儿茶酚胺系统信号通路发挥作用, 表明 DβH 在 ADHD 发病机制中的作用是可信的^[20]。另有研究^[21]指出, DβH 基因多态性与 ADHD 有关。DβH 基因表达的减少导致 DA 转化为 NE 减少, 从而导致 ADHD 低 NE 状态^[22]。

NET 通过主动转运可以将 92% 交感神经释放的 NE 重摄取到突触前膜内, 对调控突触间隙中 NE 浓度具有重要作用^[11]。因此, NET 的功能障碍被广泛认为与 ADHD 发病相关。有研究^[23]指出, SHR 大鼠的前额叶皮质区域 NET 功能增强导致这个区域的 NE 功能障碍, 进而使 SHR 大鼠出现注意缺陷, 以及逆反学习、工作记忆等功能受损。多项研

究^[24-25]结果显示, NET 是 ADHD 最有希望的候选基因。

本实验中 SHR 动物模型前额叶皮质 D β H 蛋白、mRNA 水平均低于正常 WKY 大鼠以及 SD 大鼠, 而 NET 蛋白、mRNA 水平均高于正常 WKY 大鼠以及 SD 大鼠, 择思达及安神定志灵低剂量均可以显著上调 D β H 蛋白、mRNA 水平, 且可以下调 NET 蛋白、mRNA 表达, 提高突触间隙 NE 递质含量, 从而达到治疗 ADHD 的目的。因此, 安神定志灵可能通过影响神经递质 NE 合成和清除过程中的因子来调控前额叶皮质 NE 的含量, 从而影响前额叶的功能, 对 ADHD 起到治疗作用, 并且低剂量效果最佳。但影响 NE 合成和消除的因子还有很多, 安神定志灵是否还有其他方面的作用靶点, 课题组将做进一步探索。

参考文献

- [1] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders [M]. 5th ed. Arlington VA: American Psychiatric Publishing, 2013: 59-61.
- [2] POLANCZYK G, DE LIMA MS, HORTA BL, et al. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta regression analysis [J]. Am J Psychiatry, 2007, 164(6): 942-948.
- [3] POLANCZYK GV, WILLCUTT EG, SALUM GA, et al. ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis [J]. Int J Epidemiol, 2014, 43(2): 434-442.
- [4] 李世明, 冯为, 方芳. 中国儿童注意缺陷多动障碍患病率 Meta 分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2018, 39(7): 993-998.
- [5] 韩新民. 儿童多动症实证治心肝、虚证调脾肾 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2014, 6(3): 202-203.
- [6] 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.
- [7] BARNES JJ, DEAN AJ, NANDAM LS, et al. The molecular genetics of executive function: role of monoamine system genes [J]. Biol Psychiatry, 2011, 69(12): e127-e143.
- [8] DEL CAMPO N, FRYER TD, HONG YT, et al. A positron emission tomography study of nigro-striatal dopaminergic mechanisms underlying attention: implications for ADHD and its treatment [J]. Brain, 2013, 136(Pt 11): 3252-3270.
- [9] 宋宇尘, 雷爽, 韩新民, 等. 基于微透析技术探讨安神定志灵对 SHR 大鼠前额叶 NE、DA 及其代谢产物含量的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4631-

4636.

- [10] 雷爽, 苗竞, 韩新民, 等. 安神定志灵对自发性高血压大鼠前额叶、纹状体多巴胺和去甲肾上腺素含量的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(2): 411-415.
- [11] 阮怀珍, 蔡文琴. 医学神经生物学基础 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2012: 54-62.
- [12] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revised [J]. FASEB J, 2008, 22(3): 659-661.
- [13] 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): 11-13.
- [14] SAGVOLDEN T. Impulsiveness, overactivity, and poorer sustained attention improve by chronic treatment with low doses of l-amphetamine in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) [J]. Behav Brain Funct, 2011, 7: 6. doi: 10.1186/1744-9081-7-6.
- [15] SAGVOLDEN T, RUSSELL V, AASE H, et al. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. Biol Psychiatry, 2005, 57(11): 1239-1247.
- [16] 苗竞, 韩新民. 注意力缺陷多动障碍动物模型的研究进展 [J]. 精神医学杂志, 2014, 27(2): 145-149.
- [17] BÉDARD AC, STEIN MA, HALPERIN JM, et al. Differential impact of methylphenidate and atomoxetine on sustained attention in youth with attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. J Child Psychol Psychiatry, 2015, 56(1): 40-48.
- [18] ARNSTEN AF. Catecholamine influences on dorsolateral prefrontal cortical networks [J]. Biol Psychiatry, 2011, 69(12): e89-e99.
- [19] SCASSELLATI C, BONVICINI C, FARAONE SV, et al. Biomarkers and attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analyses [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2012, 51(10): 1003-1019.
- [20] BERRIDGE CW, ARNSTEN AF. Psychostimulants and motivated behavior: arousal and cognition [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2013, 37(9 Pt A): 1976-1984.
- [21] CARPENTIER PJ, ARIAS VASQUEZ A, HOOGMAN M, et al. Shared and unique genetic contributions to attention deficit/hyperactivity disorder and substance use disorders: a pilot study of six candidate genes [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2013, 23(6): 448-457.
- [22] TONG J, MCKINLEY LA, CUMMINS TD, et al. Identification and functional characterisation of a novel dopamine beta hydroxylase gene variant associated with attention deficit hyperactivity disorder [J]. World J Biol Psychiatry, 2015, 16(8): 610-618.
- [23] HARVEY RC, JORDAN CJ, TASSIN DH, et al. Per-

formance on a strategy set shifting task during adolescence in a genetic model of attention deficit/hyperactivity disorder: Methylphenidate vs. atomoxetine treatments [J]. Behav Brain Res, 2013, 244: 38–47. doi: 10.1016/j.bbr.2013.01.027.

[24] GAMO NJ, WANG M, ARNSTEN AF. Methylphenidate and atomoxetine enhance prefrontal function through α 2-adrenergic and dopamine D1 receptors [J]. J Am

Acad Child Adolesc Psychiatry, 2010, 49(10): 1011–1023.

[25] LASKY-SU J, NEALE BM, FRANKE B, et al. Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations [J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2008, 147B(8): 1345–1354.

Effects of *Anshen Dingzhi Ling Formula* (安神定志灵方) on D β H and NET in the Prefrontal Cortex of Spontaneously Hypertensive Rats

LEI Shuang¹, SONG Yuchen², HAN Xinmin², YUAN Haixia², ZHOU Rongyi², SUN Jichao², LIU Rui²

1. Nanjing University of Chinese Medicine Affiliated Hospital, Nanjing, 210029; 2. Nanjing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the mechanism of *Anshen Dingzhi Ling Formula* (安神定志灵方) on attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Methods** Totally 40 spontaneously hypertension rats (SHR) were randomly divided into a model group, a strattera group, *Anshen Dingzhi Ling* low, medium and high dose groups, with eight rats in each group. Additionally, eight Wistar-Kyoto rats (WKY) were set as normal group 1, and eight SD rats were set as normal group 2. The rats in strattera group were administered with atomoxetine hydrochloride capsule 0.045 mg/kg per day; *Anshen Dingzhi Ling* low, medium and high dose groups were administered with 6.7, 13.4, and 26.7 g/kg *Anshen Dingzhi Ling* per day separately; and rats in the normal group 1, normal group 2 and model group were given normal saline 1.5 ml/100 g; all groups were administered by gavage, twice daily, every morning and evening, for 4 weeks. The expression of dopamine β -hydroxylase (D β H) and norepinephrine transporter (NET) protein in the prefrontal cortex were detected by Western blotting; the expression of D β H and NET mRNA was detected by PCR technology; and the expression of D β H and NET positive cells were detected by immunofluorescence technology. **Results** Compared with normal group 1 and normal group 2, the expression of D β H protein, mRNA, and positive cells in the prefrontal cortex of model group were decreased, while that of NET protein, mRNA, and positive cells were increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression levels of D β H protein, mRNA, and positive cells were higher in strattera group and in *Anshen Dingzhi Ling* low dose group, and the expression levels of NET protein, mRNA, and positive cells were lower in strattera group and in *Anshen Dingzhi Ling* low and medium dose groups ($P < 0.05$). Compared with strattera group, the expression level of D β H protein, mRNA, and positive cells were higher in *Anshen Dingzhi Ling* low dose group, while the expression level of NET protein, mRNA, and positive cells were lower in *Anshen Dingzhi Ling* high dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Anshen Dingzhi Ling Formula* may improve the clinical symptoms of ADHD by modulating the expression of D β H and NET in the SHR prefrontal cortex.

Keywords *Anshen Dingzhi Ling* (安神定志灵); attention deficit hyperactivity disorder; dopamine β -hydroxylase; norepinephrine transporter

(收稿日期: 2019-12-20; 修回日期: 2020-05-21)

编辑: 邓 媛