

益智宁方煎剂对 SHR 大鼠前额叶皮质和纹状体中多巴胺及其代谢产物的影响[※]

● 陈晓刚^{*} 赖东兰 沈 凌 胡小英 李宜瑞

摘 要 目的:观察益智宁方煎剂对注意缺陷多动障碍(ADHD)动物模型——自发性高血压大鼠(SHR)前额叶皮质及纹状体中多巴胺(DA)及其代谢产物——3,4-二羟苯乙酸(DOPAC)、高香草酸(HVA)含量的影响。方法:把24只SHR大鼠随机分为3组,分别用益智宁方煎剂、盐酸哌甲酯和生理盐水灌胃28天,采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测各组大鼠前额叶皮质及纹状体中DA、DOPAC、HVA含量。结果:在SHR大鼠的前额叶皮质,益智宁组和盐酸哌甲酯组的DA、DOPAC、HVA含量均显著高于生理盐水对照组($P < 0.05$),而益智宁组又显著低于盐酸哌甲酯组($P < 0.05$);在纹状体,益智宁组和盐酸哌甲酯组的DA、DOPAC、HVA含量均显著高于生理盐水对照组($P < 0.05$),而益智宁组和盐酸哌甲酯组之间则无显著差异($P > 0.05$)。结论:益智宁方治疗ADHD的机制,可能与其改善调控脑内前额叶皮质-纹状体环路的DA功能相关。

关键词 益智宁方 SHR大鼠 前额叶皮质 纹状体 多巴胺 液相色谱-串联质谱

注意缺陷多动障碍(ADHD),又名儿童多动症,以注意缺陷、多动、冲动等为主要表现,是患病率很高的常见儿童行为障碍,且常伴发学习困难、对立-违抗障碍、品行障碍、情绪障碍等,严重危害儿童的身心健康^[1]。以哌甲酯为代表的中枢兴奋剂虽是目前治疗ADHD的首选,但也存在不良反应较多、有效剂量的个体差异性大、停药后反跳快、复发率高、作为一类管制药物管理困难等诸多问题^[2]。因此,中医药治疗ADHD越来越得到重视。笔者采用复方中药制剂——益智宁治疗ADHD,临床研究发现其疗效较显著^[3]。本项研究通过检测益智宁方煎剂对ADHD动物模型——自发性高血压大鼠(Spontaneous Hypertensive Rat, SHR)前额叶皮质及纹状体中的多巴胺(Dopamine, DA)及其代谢产物的影响,并与中枢兴奋剂——盐酸哌甲酯对照,从脑内DA的角度探讨中医药治疗ADHD的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级雄性8周龄的SHR大鼠24只,体重240~300g,由四川省医学科学院四川省人民医院实验动物研究所生产供应部提供(许可证号:SCXK(111)2008-16)。

1.2 主要仪器和试剂 Agilent 1200 SL Series RRLLC/6410B Triple Quad MS快速高效液相色谱-串联四极杆质谱联用仪(美国安捷伦公司),AS 3120超声波发生器(Auto Science公司),Anke TDL-40B离心机(上海安亭科学仪器厂),XW-80A快速混匀器(海门市麒麟医用仪器厂),盐酸多巴胺(Dopamine, DA)、3,4-二羟苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、高香草酸(Homovanillic acid, HVA)标准品(美国Sigma-Aldrich公司),三蒸水等。

1.3 益智宁方煎剂的制备 益智宁方由龙骨、龟板、远志、石菖蒲、熟地黄、珍珠母、五味子等12味中药组成,生药由广州中医药大学第一附属医院门诊部药房提供,制成水煎剂后,配成含生药约1.154g/mL的溶液并充分搅匀,贮于4℃冰箱备用。盐酸哌甲酯(苏州医药集团有限公司,国药准字H32023102)终浓度

※基金项目 广东省自然科学基金资助项目(No:7004819)

* 作者简介 陈晓刚,男,副教授,医学博士。主要研究方向:中医药治疗儿童行为精神障碍。

• 作者单位 广州中医药大学第一附属医院(510405)

为 0.24g/L。

1.4 实验动物分组及处理 把 SHR 大鼠随机分为 3 组(益智宁组、盐酸哌甲酯组及生理盐水对照组),每组 8 只。称重,编号,按照益智宁组 7.2g/kg(此剂量根据既往动物行为学研究结果确定)、盐酸哌甲酯组 1.5mg/kg 和生理盐水对照组 1.5mg/kg 体重,计算每只老鼠的灌胃体积(mL);用灌胃针分别对 3 组老鼠进行灌胃,28d 后进行不同的实验处理。

1.5 取材 各组大鼠在实验第 29 天上午 8 时取材。取材前 12 小时禁食。断头处死动物,在冰台上迅速分离出前额叶及纹状体。

1.6 样品预处理 准确称取(精确到 0.001g)样本置 1.5mL 尖底带盖聚丙烯离心管的底部,加入 100 μ L 甲醇,用玻棒充分捣碎,直至样本成匀浆状态,再加入 100 μ L 甲醇,涡旋混匀,超声波提取 1min,以 12000r/min 离心 5min,取上层清液,过 0.22 μ m 滤膜,待上机分析。

1.7 混合标准溶液的配制 DA、DOPAC、HVA 均以甲醇为溶剂分别配制质量浓度为 500mg/L 的标准储备溶液,置棕色刻度管,于 -18℃ 冰箱中保存。将上述储备液用甲醇逐级稀释成 2mg/L 的标准溶液,用于优化质谱参数。根据各化合物的灵敏度,分别准确移取不同体积各个化合物储备液于容量瓶,用甲醇定容,并逐级稀释为混合标准工作溶液。

1.8 液相色谱——串联质谱(LC-MS/MS)测定

①色谱条件:色谱柱:Waters Atlantis dC18 柱(2.1mm \times 150mm,3.0 μ m);柱温:30℃;流速:0.25mL/min;进

样量:10 μ L;流动相:A 为 0.4% (V/V) 乙酸水溶液,B 为乙腈;梯度洗脱程序:0 ~ 2.5min,5% B ~ 60% B;2.50 ~ 2.51min,60% B ~ 5% B;2.51 ~ 7.0min,5% B。②质谱条件:电喷雾离子源(ESI);正、负离子扫描模式;多反应监测(MRM)采集方式;干燥气温度(Gas Temp):325℃;干燥气流量(Gas Flow):10.0L/min;雾化气压力(Nebulizer):275.8kPa(40.0psi);毛细管电压(Capillary):1000V(正离子模式)及 6000V(负离子模式);分辨率:MS1 均为 Wide,MS2 均为 Unit。③测定方法:在上述测定条件下,分别将样品溶液和混合标准溶液注入液相色谱——串联四极杆质谱仪进行测定,以混合标准溶液中待测物的保留时间和质谱监测离子对为依据进行定性,以外标法,即以定量离子对的峰面积计算样品中相应待测物的含量。

1.9 统计学方法 采用 SSPS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以()表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

在 SHR 大鼠的前额叶皮质,益智宁组和盐酸哌甲酯组的 DA、DOPAC、HVA 含量均显著高于生理盐水对照组($P < 0.05$),而益智宁组又显著低于盐酸哌甲酯组($P < 0.05$);在纹状体,益智宁组和盐酸哌甲酯组的 DA、DOPAC、HVA 含量均显著高于生理盐水对照组($P < 0.05$),而益智宁组和盐酸哌甲酯组之间则无显著差异($P > 0.05$)。见表 1、表 2。

表 1 各组 SHR 大鼠前额叶 DA、DOPAC、HVA 比较($\bar{x} \pm s$)

	DA(ng/g)	DOPAC(ng/g)	HVA(ng/g)	样本含量
益智宁组	1.48 \pm 0.57 ^{*#}	29.4 \pm 11.2 ^{*#}	30.5 \pm 12.7 ^{*#}	8
盐酸哌甲酯组	3.18 \pm 1.98 [*]	39.5 \pm 10.9 [*]	42.7 \pm 10.1 [*]	8
生理盐水组	0.78 \pm 0.15	20.1 \pm 5.02	19.3 \pm 6.84	8

注:与生理盐水对照组比较,* $P < 0.05$;与盐酸哌甲酯组比较,# $P < 0.05$ 。

表 2 各组 SHR 大鼠纹状体 DA、DOPAC、HVA 比较($\bar{x} \pm s$)

	DA(ng/g)	DOPAC(ng/g)	HVA(ng/g)	样本含量
益智宁组	1.15 \pm 0.25 ^{*Δ}	20.4 \pm 6.56 ^{*Δ}	17.9 \pm 5.91 ^{*Δ}	8
盐酸哌甲酯组	1.26 \pm 0.28 [*]	22.8 \pm 7.05 [*]	18.5 \pm 6.49 [*]	8
生理盐水组	0.65 \pm 0.18	12.0 \pm 5.35	8.97 \pm 3.44	8

注:与生理盐水对照组比较,* $P < 0.05$;与盐酸哌甲酯组比较, $\Delta P > 0.05$ 。

3 讨论

大量研究揭示,中枢神经递质——多巴胺(DA)的功能缺陷,特别是其对前额叶皮质—纹状体环路的调控异常,与ADHD的发病密切相关。分子遗传学和功能脑成像技术(PET、SPECT等)的研究都提示ADHD与脑内DA信号传导的多个靶点相关^[4,5];药理研究也发现,哌甲酯等治疗ADHD最常用的中枢兴奋剂能直接阻滞多巴胺转运体(DAT)对DA的重摄取,提高突触间隙DA的含量^[6]。

益智宁方是广州中医药大学第一附属医院儿科李宜瑞教授在多年临床实践基础上所创制的,用于治疗ADHD的专方,具有滋肾平肝、养心健脾、宁神益智之功,通过调理脏腑、平衡阴阳,从而改善症状。该方以熟地为君药,取其滋肾益阴、填精充髓、安魂益智之功;龟板、龙骨补肾镇肝、潜阳安神,是为臣药;佐以五味子滋肾敛肺、强阴益精,远志开心气、通肾气,石菖蒲散肝舒脾、开窍宁神;又以党参、茯苓、浮小麦、甘草等养心健脾,安神定志。诸药合用,滋补肝肾之阴,肝阳得潜,心神安宁,阴阳平和,而注意涣散、多动、冲动等诸症自除。

既往的动物行为研究发现,益智宁方煎剂显著改善了ADHD动物模型SHR大鼠的持续性主动注意力,并减少其冲动行为^[7];药理实验发现,益智宁方煎剂能上调脑内酪氨酸羟化酶(TH)的蛋白表达和基因表达,由于TH被认为是合成包括DA在内的儿茶酚胺(CA)的限速酶,这提示益智宁方可能促进脑内儿茶酚胺(CA)类神经递质特别是DA的合成;此外,益智宁方煎剂还下调了脑内DAT的表达,这意味着可能减少了突触前神经元通过DAT对DA的重摄取作用,从而增加突触间隙的DA含量^[8]。

本项研究则进一步验证,与哌甲酯相似,益智宁方煎剂提高了SHR大鼠脑内前额叶皮质及纹状体中DA及其代谢产物的含量,提示其改善了DA对前额叶皮

质—纹状体环路的调控功能。然而,有趣的是,在前额叶,益智宁方煎剂对DA及其代谢产物的作用,与哌甲酯也存在较大差异,提示两者的作用机制并非完全一致,具体原因尚待进一步深入研究。

此外需要指出的是,迄今为止绝大多数国内外文献所报道的,检测实验动物脑内DA及其代谢产物的方法,都采用高效液相色谱—电化学法,但其检测脑内DA及其代谢产物的灵敏度及可靠性都欠佳。LC-MS/MS是近年来新发展出的检测有机分子和生物分子的新技术,具有灵敏度高、可靠性强、对色谱分离要求低等诸多优势,比高效液相色谱—电化学法更适用于检测实验动物的脑内神经递质及代谢产物^[9]。

参考文献

- [1] Subcommittee on Attention - Deficit/Hyperactivity Disorder; Steering Committee on Quality Improvement and Management. ADHD: clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention - deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents[J]. Pediatrics, 2011, 128(5):1007 - 22.
- [2] Antshel KM, Hargrave TM, Simonescu M, et al. Advances in understanding and treating ADHD[J]. BMC Med, 2011, 9:72.
- [3] 陈晓刚, 练文华, 廖永州, 等. 益智宁方治疗224例注意缺陷多动障碍患儿的临床观察[J]. 中华临床医药杂志, 2004, (11):20.
- [4] Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta - analytic review[J]. Hum Genet, 2009, 126(1):51 - 90.
- [5] Krause J. SPECT and PET of the dopamine transporter in attention - deficit/hyperactivity disorder[J]. Expert Rev Neurother, 2008, 8(4):611 - 25.
- [6] Dopheide JA, Pliszka SR. Attention - deficit - hyperactivity disorder: an update[J]. Pharmacotherapy, 2009, 29(6):656 - 79.
- [7] Chen XG, Tian H, Lai DL, et al. Yizhining elixation improves sustained attention deficit and impulsiveness of spontaneous hypertensive rats [J]. Neural Regen Res, 2007, 2(1):50 - 53.
- [8] 陈晓刚, 谭丽丽, 沈 凌, 等. 益智宁对SHR前额叶皮质及纹状体TH、DAT蛋白和基因表达的影响[J]. 新中医, 2011, 43(9):110 - 112.
- [9] 苏芬丽, 王 峰, 朱荣华. LC-MS/MS法测定大鼠脑组织中单胺类神经递质及代谢产物[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(8):1238 - 1243.

方 论

泻白散

桑白皮、地骨皮(各一两),甘草(五钱)。肺火为患,喘满气急者,此方主之。

肺苦气上逆,故喘满;上焦有火,故气急,此丹溪所谓气有余便是火也。桑白皮味甘而辛,甘能固元气之不足,辛能泻肺气之有余;佐以地骨之泻肾者,实则泻其子也;佐以甘草之健脾者,虚则补其母也。此云虚实者,正气虚而邪气实也。又曰:地骨皮之轻,可使入肺;生甘草之平,可使泻气,故名以泻白。白,肺之色也。

(明·吴昆《医方考·卷二·火门第八》)