

论著·实验研究

黄芩苷对注意缺陷多动障碍大鼠突触体 ATP 酶和 LDH 的影响及对 AC/cAMP/PKA 信号通路的调控作用

周荣易 王娇娇 尤月 孙继超 宋宇尘 袁海霞 韩新民

(南京中医药大学中医儿科研究所 / 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 江苏南京 210023)

[摘要] **目的** 研究黄芩苷对注意缺陷多动障碍(ADHD)模型大鼠脑突触体腺苷三磷酸(ATP)酶、乳酸脱氢酶(LDH)的影响及对腺苷酸环化酶(AC)/环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)信号通路的调控作用。**方法** 将40只SHR大鼠随机分为模型组、盐酸哌甲酯组(0.07 mg/mL)、黄芩苷低(3.33 mg/mL)、中(6.67 mg/mL)、高剂量组(10 mg/mL), 每组8只, 另设WKY大鼠8只为正常对照组。Percoll密度梯度离心法制备脑突触体, 电镜观察突触体结构; 运用比色法检测突触体ATP酶、LDH活性; 运用ELISA法检测突触体内AC、cAMP、PKA的含量。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠脑突触体存在ATP酶活性降低、LDH活性升高及AC、cAMP、PKA含量降低的改变($P<0.05$)。与模型组比较, 盐酸哌甲酯及黄芩苷中、高剂量均能显著升高ADHD模型大鼠脑突触体内ATP酶活性($P<0.05$), 降低LDH活性($P<0.05$), 并显著提高AC、cAMP、PKA含量($P<0.05$)。与盐酸哌甲酯组比较, 高剂量黄芩苷治疗ADHD模型大鼠对改善上述各指标水平的效果更为显著($P<0.05$)。与黄芩苷低剂量组比较, 黄芩苷高剂量组ATP酶活性显著升高($P<0.05$); 黄芩苷中、高剂量组LDH活性显著降低, AC、cAMP、PKA含量均显著升高($P<0.05$)。与黄芩苷中剂量组比较, 黄芩苷高剂量组ATP酶活性显著升高($P<0.05$)。**结论** 盐酸哌甲酯及黄芩苷均能改善ADHD模型大鼠脑突触体ATP酶、LDH活性; 黄芩苷的作用与剂量存在相关性, 且高剂量黄芩苷较盐酸哌甲酯效果更为显著; 黄芩苷可能是通过上调AC/cAMP/PKA信号通路发挥治疗作用。 **[中国当代儿科杂志, 2017, 19(5): 576-582]**

[关键词] 注意缺陷多动障碍; 黄芩苷; 腺苷三磷酸酶; 乳酸脱氢酶; AC/cAMP/PKA信号通路; 大鼠

Effect of baicalin on ATPase and LDH and its regulatory effect on the AC/cAMP/PKA signaling pathway in rats with attention deficit hyperactivity disorder

ZHOU Rong-Yi, WANG Jiao-Jiao, YOU Yue, SUN Ji-Chao, SONG Yu-Chen, YUAN Hai-Xia, HAN Xin-Min. Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Nanjing 210023, China (Han X-M, Email: hxm1nj@126.com)

Abstract: Objective To study the effect of baicalin on synaptosomal adenosine triphosphatase (ATPase) and lactate dehydrogenase (LDH) and its regulatory effect on the adenylate cyclase (AC)/cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) signaling pathway in rats with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Methods** A total of 40 SHR rats were randomly divided into five groups: ADHD model, methylphenidate hydrochloride treatment (0.07 mg/mL), and low-dose (3.33 mg/mL), medium-dose (6.67 mg/mL), and high-dose (10 mg/mL) baicalin treatment ($n=8$ each). Eight WKY rats were selected as normal control group. Percoll density gradient centrifugation was used to prepare brain synaptosomes and an electron microscope was used to observe their structure. Colorimetry was used to measure the activities of ATPase and LDH in synaptosomes. ELISA was used to measure the content of AC, cAMP, and PKA. **Results** Compared with the normal control group, the ADHD model group had a significant reduction in the ATPase activity, a significant increase in the LDH activity, and significant reductions in the content of AC, cAMP, and PKA ($P<0.05$). Compared with the ADHD model group, the methylphenidate hydrochloride group and the medium- and high-dose baicalin groups had a significant increase in the ATPase activity ($P<0.05$), a significant

[收稿日期] 2016-11-24; **[接受日期]** 2017-02-24

[基金项目] 江苏省教育厅研究生创新工程项目(KYZZ16_0410); 国家自然科学基金(81273801)。

[作者简介] 周荣易, 男, 博士研究生。

[通信作者] 韩新民, 男, 主任医师, 教授。

reduction in the LDH activity ($P<0.05$), and significant increases in the content of AC, cAMP, and PKA ($P<0.05$). Compared with the methylphenidate hydrochloride group, the high-dose baicalin group had significantly greater changes in these indices ($P<0.05$). Compared with the low-dose baicalin group, the high-dose baicalin group had a significant increase in the ATPase activity ($P<0.05$); the medium- and high-dose baicalin groups had a significant reduction in the LDH activity ($P<0.05$) and significant increases in the content of AC, cAMP, and PKA ($P<0.05$). Compared with the medium-dose baicalin group, the high-dose baicalin group had a significant increase in the ATPase activity ($P<0.05$).

Conclusions Both methylphenidate hydrochloride and baicalin can improve synaptosomal ATPase and LDH activities in rats with ADHD. The effect of baicalin is dose-dependent, and high-dose baicalin has a significantly greater effect than methylphenidate hydrochloride. Baicalin exerts its therapeutic effect possibly by upregulating the AC/cAMP/PKA signaling pathway. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(5): 576-582]

Key words: Attention deficit hyperactivity disorder; Baicalin; Adenosine triphosphatase; Lactate dehydrogenase; AC/cAMP/PKA signaling pathway; Rats

黄芩为唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根, 在中国拥有数千年的药用植物历史。在传统中药理论中, 黄芩是清热燥湿药的代表药, 药性苦寒, 主归肺、胆、脾、胃、大肠经, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎之功效, 因此在临床中广泛应用于炎症性疾病、发热、肝炎、黄疸及高血压等的治疗^[1-3], 在数千年的临床应用中显示了可靠的安全性和稳定的临床疗效。黄芩苷 (baicalin) 为黄酮类化合物, 是中药黄芩的主要有效成分, 为淡黄色粉末, 无臭, 味苦。在现代药物研究中, 黄芩苷具有抗癌、抗炎、抗氧化的作用, 而黄芩苷对神经系统疾病的影响尚未见报道。

注意缺陷多动障碍 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 又称儿童多动症, 是儿童时期常见的精神神经异常性疾病, 全球发病率约为 5.9%, 且有不断上升的趋势^[4]。本病的发病机制尚未明确, 多巴胺 (dopamine, DA) 缺陷理论当前在国际学术界认可度最高^[5]。关于 DA 缺陷的形成原因, 脑内 DA 转运体 (dopamine transporter, DAT) 功能的异常在学界已基本形成共识^[6], 而近来的研究中发现, 腺苷酸环化酶 (AC) / 环磷酸腺苷 (cAMP) / 蛋白激酶 A (PKA) 通路在脑内 DA 缺陷的形成及 ADHD 的发病过程中地位特殊^[7]。研究表明, D2RS 被突触间隙 DA 激活后, 能够通过抑制 AC/cAMP/PKA 通路反馈性地抑制 DA 合成^[8-9], 使 DA 的合成速度降低, 最终导致脑内 DA 缺陷状态的形成。AC/cAMP/PKA 信号通路的活化情况成为研究 DA 缺陷及 ADHD 发病机制的另一重要方向^[10-11]。在 DA 神经元中, AC/cAMP/PKA 通路广泛分布于 DA 神经元突触体内, 同时, 作为单胺类递质的 DA, 其合成、释放及清除的整个过程也需在突触

体内完成^[12], 因此, 若要精确研究 AC/cAMP/PKA 信号通路及 ADHD 发病机制, 突触体是不可忽视的一个关键环节^[13]。近期研究发现, 黄芩苷能够迅速通过血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 且在纹状体、海马内聚集^[14-15], 发挥对 DA 神经元的保护作用, 并能够治疗与 DA 功能异常相关的神经退行性疾病^[16]。有学者提出 DA 系统可能是黄芩苷的“脑内靶系统”^[17]。基于以上的研究结论, 我们大胆推测黄芩苷可能存在调控脑内 DA 系统而治疗 ADHD 的功能, 相关假说已在 SCI 核心期刊发表^[18]。为验证黄芩苷对脑内 DA 系统的影响及对 ADHD 治疗作用的假说, 作者从 AC/cAMP/PKA 信号通路着手, 在国际公认的 ADHD 模型自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 突触体内进行相关实验研究^[19]。通过提取 SHR 大鼠前额叶、纹状体的突触体, 检测突触体的酶活性及突触体内 AC、cAMP、PKA 的含量, 试图从突触水平初步探讨黄芩苷对脑内 DA 系统的影响及对 ADHD 的治疗作用, 主要实验内容如下。

1 材料与方法

1.1 动物分组

SHR 大鼠用于 ADHD 动物模型的建议目前已被国际上公认, 是国际上应用最为广泛、研究最多的 ADHD 动物模型^[20-21]。SHR 大鼠起源于东京远交系 Wistar 大鼠, 是 Okamoto 等^[22]于 1963 年用 Wistar Kyoto (WKY) 大鼠经过数代交叉培育出的一个新品种。SHR 大鼠起初主要用于高血压病的研究, 但在之后的研究中发现 SHR 大鼠在 10 周龄之前基本不表现高血压症状, 4~10 周龄 SHR 大鼠几乎符合儿童多动症所有临床特征, 且该模型

易于获得, 无需任何人工诱发, 且具有天然对照组 WKY 大鼠, 因此 4~10 周龄 SHR 大鼠成为目前国际认可度最高的 ADHD 模型^[23]。

SPF 级 4 周龄雄性 SHR 大鼠 40 只, 体重 73 ± 6 g; SPF 级 4 周龄雄性 WKY 大鼠 8 只, 体重 74 ± 6 g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号 SCXK (京) 2012-0001。所有动物均饲养于南京中医药大学 SPF 级动物房, 使用许可证号: SYXK (苏) 2014-0001。按照随机数字表法将 SHR 大鼠随机分为模型组、盐酸哌甲酯组、黄芩苷低、中、高剂量组, 每组 8 只, WKY 大鼠 8 只设为正常对照组。

1.2 药品准备

盐酸哌甲酯 (专注达, 36 mg/片), Janssen Cilag Manufacturing LLC 生产, 西安杨森制药有限公司分装, 进口药品注册证号 H20120111, 进口准许证号 TP120120504。将药品加生理盐水配制成 0.07 mg/mL 混合液, 4℃ 保存, 灌胃前按需取出, 复温至室温后灌胃给药。

黄芩苷购自成都菲普斯生物技术有限公司, 药物纯度 >95% (高效液相色谱法, 检测波长 280 nm)。将药品加生理盐水分别配制成 3.33 mg/mL (低剂量)、6.67 mg/mL (中剂量) 及 10 mg/mL (高剂量) 的混合液, 4℃ 保存, 灌胃前按需取出, 复温至室温后灌胃给药, 每次灌胃前摇匀。

1.3 动物给药

大鼠灌胃量根据 9 岁 (体重 26 kg) 儿童体表面积和 4 周龄 (体重 60 g) SHR 大鼠体表面积进行转换得出^[24]。各组大鼠适应性喂养 3~5 d, 然后持续 4 周灌胃, 每日两次 (上午 8:00~9:00、下午 13:30~14:30)。每日上午 8:00 灌胃前称量大鼠体重, 灌胃量为 1.5 mL/100 g。盐酸哌甲酯组及黄芩苷低、中、高剂量组分别按体重给予对应药物灌胃, 正常对照组、模型组给予等量生理盐水灌胃。为避免药物颜色不同对动物的影响, 所有透明灌胃容器均用白色医用胶带包裹。

1.4 动物取材

末次给药 24 h 后断头处死大鼠, 冰上迅速分离大鼠前额叶、纹状体, 置于冻存管中液氮保存,

取材结束后转移至 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.5 主要实验设备

Sartorius PB-10 pH 调定器 (德国 Sartorius 公司); Beckman coulter Allegra 64R 离心机 (美国 Beckman coulter 公司), F0650 50 mL 固定角度转头及 RUBBER ADAPTEK TUBES 15 mL 橡胶适配套 (美国 Beckman coulter 公司); Retsch MM400 球磨仪 (德国 Retsch 公司); Eppendorf 5427R 离心机 (德国 Eppendorf 公司); Infinite M200 PRO 多功能酶标仪 (瑞士 TECAN Infinite 公司); 日立 S-3000N 型透射电镜 (日本 Hitachi 公司)。

1.6 突触体提取

取待检测组大鼠前额叶、纹状体, 用大量冰点的均质缓冲液洗去血液等杂质, 滤纸吸干后称重, 将组织剪碎放入研磨管中研磨, 采用 Percoll 密度梯度离心法制备突触体备用, 详细操作步骤参考课题组前期相关实验技术^[25]。

1.7 突触体结构电镜观察

将提取的突触体, 用 2.5% 戊二醛 4℃ 条件下固定 2 h, 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 每次 10 min, 然后换用 1% 锇酸后固定 1 h。按透射电镜常规超薄切片制作方法, 进行乙醇梯度脱水、渗透、包埋、聚合、醋酸铀染色、硝酸铅染色, 详细步骤按照日立 S-3000N 型透射电镜切片要求进行操作, 观察突触体的结构。

1.8 检测方法

突触体腺苷三磷酸 (ATP) 酶、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测采用比色法进行, 相关试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 比色测定波长分别为 636 nm、440 nm, 具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。突触体中 AC、cAMP、PKA 含量检测均采用 ABC-ELISA 法, 试剂盒由南京金益柏生物科技有限公司提供, 实验步骤按试剂盒操作说明书进行。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 突触体结构电镜观察

完整的突触体结构为圆型或椭圆形，外膜完整呈连续封闭状，内含线粒体及大量突触小泡^[26-27]。本实验所获取的突触体形态上呈连续膜封闭的椭圆结构，周围有完整的膜包围；突触前膜可见一个或多个线粒体和大量颗粒状突触小囊泡；突触间隙清晰可见，且突触后膜可见电密度增高影，结构完整，形态清晰，颜色较深。突触体突触前膜、突触间隙、突触后膜保存完好，突触体分布密度较高，具有典型的突触体形态结构特征，如图 1。

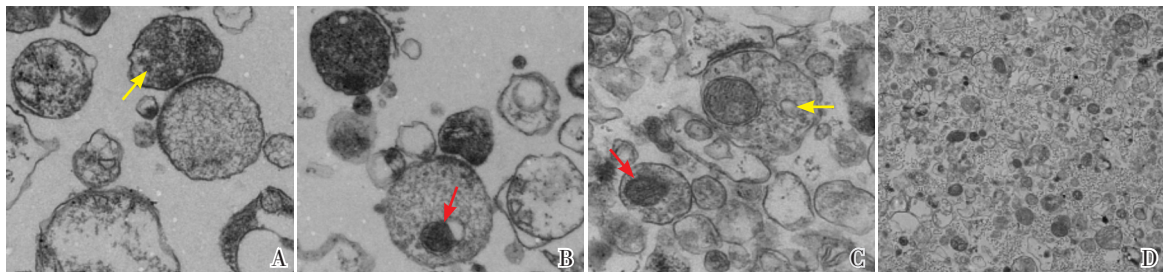


图 1 电镜下观察突触体形态结构 (图 A~C $\times 40000$, 图 D $\times 20000$) 突触体呈椭圆形，分布密度较高，结构完整，可见线粒体 (红色箭头所示) 及突触小泡 (黄色箭头所示)，符合相关实验标准要求。

表 1 突触体内 ATP 酶、LDH 活性测定

($\bar{x} \pm s$, U/mg, $n=8$)

组别	ATP 酶 (U/mg)	LDH (U/mg)
正常对照组	6.2 ± 0.9	91.4 ± 1.4
模型组	4.1 ± 0.7^a	100.7 ± 9.0^a
盐酸哌甲酯组	6.4 ± 1.9^b	92.1 ± 2.7^b
黄芩苷低剂量组	6.9 ± 0.5^b	99.0 ± 10.8^a
黄芩苷中剂量组	$7.7 \pm 0.8^{b,c}$	$90.0 \pm 6.1^{b,d}$
黄芩苷高剂量组	$8.8 \pm 0.7^{b,c,d,e}$	$88.9 \pm 7.2^{b,d}$
F 值	18.257	3.928
P 值	<0.001	0.005

注：a 示与正常对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与模型组比较， $P<0.05$ ；c 示与盐酸哌甲酯组比较， $P<0.05$ ；d 示与黄芩苷低剂量组比较， $P<0.05$ ；e 示与黄芩苷中剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.2 突触体内 AC、cAMP、PKA 含量检测

与正常对照组相比，模型组大鼠脑突触体内 AC、cAMP、PKA 含量均显著降低 ($P<0.05$)；经治疗 4 周后，与模型组相比，盐酸哌甲酯组及黄芩苷低、中、高剂量组大鼠脑突触体内 AC、

2.2 突触体内 ATP 酶、LDH 活性测定

与正常对照组相比，模型组大鼠脑突触体 ATP 酶活性显著降低 ($P<0.05$)，LDH 活性显著升高 ($P<0.05$)；与模型组相比，经给药治疗后，盐酸哌甲酯组及黄芩苷低、中、高剂量组 ATP 酶活性均显著升高 ($P<0.05$)，除黄芩苷低剂量组外，LDH 活性均显著降低 ($P<0.05$)；与盐酸哌甲酯组比较，黄芩苷中、高剂量组 ATP 酶活性显著升高 ($P<0.05$)；与黄芩苷低剂量组比较，黄芩苷高剂量组 ATP 酶活性显著升高 ($P<0.05$)。见表 1。

cAMP、PKA 含量均显著升高 ($P<0.05$)；与盐酸哌甲酯组比较，黄芩苷高剂量组 AC 含量及黄芩苷中、高剂量组 cAMP、PKA 含量均显著升高 ($P<0.05$)；与黄芩苷低剂量组比较，黄芩苷中、高剂量组 AC、cAMP、PKA 含量均显著升高 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 突触体内 AC、cAMP、PKA 含量检测

($\bar{x} \pm s$, ng/L, $n=8$)

组别	AC	cAMP	PKA
正常对照组	42.2 ± 4.1	13.0 ± 1.4	386.1 ± 20.4
模型组	35.9 ± 0.9^a	11.4 ± 0.5^a	352.9 ± 12.1^a
盐酸哌甲酯组	43.1 ± 4.6^b	12.7 ± 1.1^b	381.6 ± 11.6^b
黄芩苷低剂量组	40.4 ± 4.6^b	12.8 ± 0.5^b	381.9 ± 10.5^b
黄芩苷中剂量组	$44.7 \pm 4.2^{b,d}$	$13.7 \pm 0.5^{b,c,d}$	$402.6 \pm 13.8^{b,c,d}$
黄芩苷高剂量组	$47.4 \pm 3.5^{b,c,d}$	$14.4 \pm 0.5^{b,c,d}$	$410.0 \pm 20.3^{b,c,d}$
F 值	8.194	12.375	13.489
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 示与正常对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与模型组比较， $P<0.05$ ；c 示与盐酸哌甲酯组比较， $P<0.05$ ；d 示与黄芩苷低剂量组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

突触是脑内基本信息加工的节点部位,突触的功能失调应该是许多脑部疾病的基础;突触的功能和分子机制研究或是解开众多脑部疾病复杂原因的途径^[28]。突触体是进行脑部疾病研究的良好标本,保证突触体结构完整性且具有较高的酶活性是进行研究的基础。在实验初始阶段,课题组成员在已经熟练掌握相关实验技术的基础上^[25],再次进行实验前突触体结构的观察,保证本次实验所用突触体符合严格的实验要求。之后,课题组进行了ATP酶、LDH活性的检测。ATP酶存在于组织细胞及细胞器的膜上,是生物膜的一种蛋白酶,它在物质运送、能量转换以及信息传递方面具有重要的作用。ATP酶存在 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶两种主要功能形式,前者主要通过 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 泵的作用来维持细胞内外 Na^+ 、 K^+ 的平衡;后者则主要通过将细胞内 Ca^{2+} 泵向细胞外及内质网,来维持细胞内 Ca^{2+} 的浓度^[29]。此外,除了细胞内的ATP,在中枢神经系统中存在大量的细胞外ATP,细胞外ATP在中枢神经系统的主要功能不是直接的信息传递,而是间接的调控作用^[30-31]。对于突触体而言,突触体调控DA合成、释放及清除的功能既需要 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶的作用^[12],也需要细胞外ATP酶的间接调控作用,因此,突触体ATP酶的活性是突触体离子通道活性及间接调控功能强弱的表现,一定程度上代表了突触体的活性。通过实验我们发现,相比正常对照组,模型组大鼠脑突触体ATP酶活性显著降低,表明该模型制备成功;经治疗4周后,与模型组相比,盐酸哌甲酯组及黄芩苷低、中、高剂量组ATP酶活性均显著增高。本实验结果表明,所提取的突触体不仅能够应用于实验研究,且黄芩苷低、中、高剂量均能显著升高ATP酶的活性并具有量效相关性,这提示黄芩苷在提高ATP酶活性上效果明显。

LDH存在于人体各组织器官中,是机体能量代谢中的一种重要酶,LDH质与量的改变,直接影响到机体的能量代谢。在神经药理学研究中,LDH常作为评价脑功能的一项重要指标^[32]。LDH是细胞内酶,少量漏出即提示细胞膜通透性增高,漏出的多少反映细胞膜的受损程度^[33]。LDH广泛

存在于脑细胞中,当脑组织缺血、缺氧时,受损脑细胞释放出LDH,导致脑内LDH含量及活性增高^[34]。因此,LDH活性可侧面评价突触体结构完整性及活性^[35]。在本次实验中,模型组及黄芩苷低剂量组大鼠脑突触体LDH活性有所升高,与模型组相比,LDH活性在盐酸哌甲酯组及黄芩苷中、高剂量组中有所降低。这一实验结果表明,ADHD模型大鼠可能存在突触体及脑功能的损伤,而黄芩苷具有改善这一损伤的作用,而这一损伤是否与脑内DA含量的异常及ADHD症状的产生存在关联尚需更深入的实验研究。

黄芩苷虽广泛应用于炎症性疾病、消化系统疾病的临床治疗,但有关黄芩苷对ADHD的临床及实验研究国内外均未见报道。DA神经元主要分布在中脑的红核后区、黑质区及腹侧被盖区,前额叶及纹状体是DA神经元的主要分布区域和功能区域,研究黄芩苷对DA系统的调控作用,前额叶、纹状体的突触体是最好的实验标本。相关研究表明黄芩苷能够迅速通过BBB,进入中枢神经系统,调控前额叶、纹状体的DA含量,改善因DA含量异常而导致的一系列神经系统疾病,如帕金森、老年痴呆等^[36-38]。良好的BBB通透性及迅速的DA调控作用使黄芩苷治疗ADHD成为可能。基于此,作者提取前额叶、纹状体的突触体,测定突触体ATP、LDH的活性,保证了运用突触体进行实验的可行性,并初步检测了具有代表性意义的、由DA自身受体D2RS调控的G蛋白偶联受体信号通路AC/cAMP/PKA。

概括而论,细胞内的信号转导通路主要分为两类,一类是受G蛋白受体偶联第二信使调节的信号通路,另一类则是受到受体偶联调节的信号通路^[39]。多巴胺受体属于G蛋白偶联受体,其受体分为D1样及D2样受体两类,D1R与D2R均为G蛋白偶联受体,具有该受体的基本特征,为7次跨膜的多肽链,氨基端在细胞外,羧基端在细胞内,其主要信号转导机制是通过G蛋白受体偶联第二信使调节细胞内信号转导^[40]。其中,D1R通过G蛋白 α 亚基的两个亚型 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha olf}$ 来激活AC,进而引起细胞内cAMP含量上升,cAMP含量的升高,导致依赖性蛋白激酶PKA的进一步活化,从而发挥相应功能;而D2R则与D1R相反,研究表明,D2R短链部分D2RS能够特异性的与G蛋

白 α 亚基抑制性亚基G α i/o相结合,产生抑制性效应,抑制AC/cAMP/PKA信号通路的表达,降低DA合成限速酶—酪氨酸羟化酶的合成速度,从而降低脑内DA的含量^[41]。故AC的活性及cAMP的表达水平由D1R与D2R共同维持,其中,能否降低D2RS的抑制作用,是调节DA的合成速度,提高脑内DA含量的重要途径。本次研究表明,黄芩苷能够显著增加突触体内AC、cAMP及PKA的含量,且较盐酸哌甲酯组升高更为明显,同时存在量效相关性,进而反馈性的促进DA的合成,降低D2RS的抑制作用。

本次研究是对前期有关黄芩苷治疗ADHD疗效的求证性研究,通过实验研究我们发现,黄芩苷确实存在提高突触体活性,改善突触体功能的作用,并且显著增加突触体内AC、cAMP及PKA的含量,通过降低D2RS对AC/cAMP/PKA信号通路的抑制作用而发挥疗效。且黄芩苷的药效较盐酸哌甲酯组升高更为明显,同时存在量效相关性,这充分说明黄芩苷在和治疗ADHD一线进口药品的比较中具有优势,值得我们深入研究。同时,本次研究也存在一定的不足之处,如黄芩苷治疗是否显著增加了SHR大鼠脑内DA的含量,增加效果是否也存在量效相关性,黄芩苷对DA系统释放、清除信号通路的影响如何,以及黄芩苷对SHR大鼠ADHD核心症状多动、冲动、注意力不集中等问题的改善情况等尚未进行研究,这些诸多问题仍需进一步的解决,本课题组将会针对此次研究发现的问题,在接下来的实验中联合运用行为学方法、质谱、液相及分子生物学方法等进行更深入的研究,以期ADHD的研究提供参考,造福广大儿童。

[参 考 文 献]

- [1] Tsai CC, Lin MT, Wang JJ, et al. The antipyretic effects of baicalin in lipopolysaccharide-evoked fever in rabbits[J]. *Neuropharmacology*, 2006, 51(4): 709-717.
- [2] Kang MJ, Ko GS, Oh DG, et al. Role of metabolism by intestinal microbiota in pharmacokinetics of oral baicalin[J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(3): 371-378.
- [3] Zeng L, Wang M, Yuan Y, et al. Simultaneous multi-component quantitation of Chinese herbal injection Yin-zhi-huang in rat plasma by using a single-tube extraction procedure for mass spectrometry-based pharmacokinetic measurement[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 967: 245-254.
- [4] Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, et al. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis[J]. *Am J Psychiatry*, 2007, 164(6): 942-948.
- [5] Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, et al. Etiologic subtypes of attention deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis[J]. *Neuropsychol Rev*, 2007, 17(1): 39-59.
- [6] Harvey RC, Sen S, Deaciuc A, et al. Methylphenidate treatment in adolescent rats with an attention deficit/hyperactivity disorder phenotype: cocaine addiction vulnerability and dopamine transporter function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(4): 837-847.
- [7] Napolitano F, Bonito-Oliva A, Federici M, et al. Role of aberrant striatal dopamine D1 receptor/cAMP/protein kinase A/DARPP32 signaling in the paradoxical calming effect of amphetamine[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(33): 11043-11056.
- [8] Kitagishi Y, Minami A, Nakanishi A, et al. Neuron membrane trafficking and protein kinases involved in autism and ADHD[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 3095-3115.
- [9] Baca M, Allan AM, Partridge LD, et al. Gene-environment interactions affect long-term depression (LTD) through changes in dopamine receptor affinity in Snap25 deficient mice[J]. *Brain Res*, 2013, 1532: 85-98.
- [10] Zheng R, Yang L, Sikorski MA, et al. Deficiency of the RII β subunit of PKA affects locomotor activity and energy homeostasis in distinct neuronal populations[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(17): E1631-E1640.
- [11] Few WP, Scheuer T, Catterall WA. Dopamine modulation of neuronal Na(+) channels requires binding of A kinase-anchoring protein 15 and PKA by a modified leucine zipper motif[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(12): 5187-5192.
- [12] 金国章. 多巴胺的神经化学[M]//金国章. 脑内多巴胺. 第2版. 上海: 上海科技出版社, 2010: 69-77.
- [13] Somkuwar SS, Darna M, Kantak KM, et al. Adolescence methylphenidate treatment in a rodent model of attention deficit/hyperactivity disorder: dopamine transporter function and cellular distribution in adulthood[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(2): 309-316.
- [14] Wang X, Zhang L, Hua L, et al. Effect of flavonoids in scutellariae radix on depression-like behavior and brain rewards: possible in dopamine system[J]. *Tsinghua Sci Technol*, 2010, 15(4): 460-466.
- [15] Im HI, Joo WS, Nam E, et al. Baicalein prevents 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic dysfunction and lipid peroxidation in mice[J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 98(2): 185-189.
- [16] Mu X, He G, Cheng Y, et al. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009, 92(4): 642-648.
- [17] Chen L, Zhang L, Wang X. Determination of dopamine and its relativity of baicalin in rat nuclei after intravenous administration of flavonoids from Scutellariae radix[J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(1): 84-88.
- [18] Zhou R, Han X, Wang J, et al. Baicalin may have a therapeutic

- effect in attention deficit hyperactivity disorder[J]. *Med Hypotheses*, 2015, 85(6): 761-764.
- [19] 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.
- [20] Cao AH, Yu L, Wang YW, et al. Effects of methylphenidate on attentional set-shifting in a genetic model of attention-deficit/hyperactivity disorder[J]. *Behav Brain Funct*, 2012, 8(1): 10.
- [21] Davids E, Zhang K, Tarazi FI, et al. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder[J]. *Brain Res Rev*, 2003, 42(1): 1-21.
- [22] Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats[J]. *Jpn Circ J*, 1963, 27: 282-293.
- [23] 周荣易, 王娇娇, 韩新民. ADHD 实验动物模型比较研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(9): 88-92.
- [24] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited[J]. *FASEB J*, 2008, 22(3): 659-661.
- [25] 周荣易, 韩新民, 王娇娇, 等. SHR 大鼠前额叶、纹状体突触体的提取方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(12): 59-64.
- [26] 肖忠新, 魏守刚, 云少君, 等. 小鼠脑突触体制备方法的改进 [J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 16(10): 937-938.
- [27] Dunkley PR, Jarvie PE, Robinson PJ. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(11): 1718-1728.
- [28] 陈宜张. 突触的化学传递 [M]// 陈宜张. 突触. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 17-27.
- [29] 王昱. 盐酸克伦特罗对小鼠大脑皮层 ATP、SDH、ADA 和 LDH 活性的影响 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2013, 48(2): 21-25.
- [30] Hugel S, Schlichter R. Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(6): 2121-2130.
- [31] Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O, et al. Iontropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex[J]. *J Physiol*, 2002, 542(Pt 2): 529-536.
- [32] 陈志武, 赵维中, 宋必卫, 等. 芸香甙对脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 1998, 14(1): 81-83.
- [33] 苗明三, 陈元朋, 吴巍. 姜黄素对大鼠血瘀性脑缺血模型血液流变学及脑匀浆 LD、LDH 和 TchE 水平的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2010, 26(1): 29-31.
- [34] 刘亮, 吕国蔚. 缺氧预适应小鼠脑匀浆去蛋白液对缺氧突触体膜的保护作用 [J]. *中国神经科学杂志*, 2001, 17(4): 373-375.
- [35] 董志, 曾凡新, 周岐新, 等. 脑细胞缺血离体模型—缺血突触体模型的建立与评价 [J]. *中国临床神经科学*, 2002, 10(2): 192-194.
- [36] Zhang DM, Liu HY, Xie L, et al. Effect of baicalin and berberine on transport of nimodipine on primary-cultured, rat brain microvascular endothelial cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(4): 573-578.
- [37] Kwak S, Ku SK, Han MS, et al. Vascular barrier protective effects of baicalin, baicalein and wogonin in vitro and in vivo[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 281(1): 30-38.
- [38] Liu XM, Feng Y, Li AM. Nerve protective effect of Baicalin on newborn HIBD rats[J]. *Asia Pac J Trop Med*, 2014, 7(10): 806-810.
- [39] 孙健, 刘健华, 王谦, 等. 电针对抑郁症大鼠海马组织 AC-cAMP-PKA 信号通路的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(24): 3672-3674.
- [40] 孙继超, 周荣易, 雷爽, 等. 安神定志灵对 ADHD 模型大鼠前额叶、纹状体 AC、cAMP 的影响 [J]. *中成药*, 2016, 38(7): 1605-1607.
- [41] Loos M, Pattij T, Janssen MC, et al. Dopamine receptor D1/D5 gene expression in the medial prefrontal cortex predicts impulsive choice in rats[J]. *Cereb Cortex*, 2010, 20(5): 1064-1070.

(本文编辑: 万静)