

## 菖麻熄风片改善幼龄鼠注意力缺陷多动障碍及作用机制研究

荆宝琴<sup>1,2,4,5</sup>, 张彬彬<sup>2,4,5</sup>, 李冬芝<sup>2,4,5</sup>, 韩冰<sup>3</sup>, 乔鑫<sup>1\*</sup>, 姚洪艳<sup>3\*</sup>

1. 天津医科大学药学院, 天津 300070

2. 天津天诚新药评价有限公司, 天津 300301

3. 黑龙江省济仁药业有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150025

4. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

5. 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300301

**摘要:** 目的 研究菖麻熄风片对幼龄注意力缺陷多动障碍 (ADHD) 模型鼠多动、冲动、注意力缺陷及前额叶、纹状体、脑微透析液中神经递质水平和多巴胺受体的影响。方法 孕期尼古丁暴露 (PNE) 仔鼠随机分为模型组、静灵口服液 (7.4 mL·kg<sup>-1</sup>) 组、盐酸托莫西汀 (17.5 mg·kg<sup>-1</sup>) 组和菖麻熄风片低、中、高剂量 (生药量 2.4、4.8、9.6 g·kg<sup>-1</sup>) 组, 另设同周龄 C57BL/6J 仔鼠为对照组, ig 给药 14 d。自发性高血压大鼠 (SHR) 随机分为静灵口服液 (4 mL·kg<sup>-1</sup>) 组、盐酸托莫西汀 (10 mg·kg<sup>-1</sup>) 组和菖麻熄风片低、中、高剂量 (生药量 1.4、2.8、5.6 g·kg<sup>-1</sup>) 组, 另设同周龄 WKY 大鼠为对照组, ig 给药 14 d。采用旷场实验、Y 迷宫实验和高架十字迷宫实验检测 PNE 仔鼠和 SHR 的多动、冲动行为以及注意力、学习能力; ELISA 法检测 SHR 前额叶、纹状体环磷酸腺苷 (cAMP) 含量; 免疫组化检测 SHR 大脑前额叶、纹状体中多巴胺受体 DRD1 (DRD1)、多巴胺受体 DRD2 (DRD2) 的表达; 高效液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS) 检测 SHR 前额叶、纹状体、脑微透析液中去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 及其代谢终产物 3-甲氧基-4-羟基乙酸 (HVA) 的水平变化。结果 与模型组比较, PNE 仔鼠给药 14 d, 旷场实验中菖麻熄风片中、高剂量组运动总距离及平均速度显著减少 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), Y 迷宫实验中菖麻熄风片低、高剂量组正确反应次数显著增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, SHR 给药 7 d, 旷场实验中菖麻熄风片各剂量组运动总距离及平均速度显著减少 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 高架十字迷宫实验中菖麻熄风片中、高剂量组进入开臂次数显著减少 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 高剂量组开臂停留时间显著缩短 ( $P < 0.05$ ); 给药 14 d, 旷场实验中菖麻熄风片中、高剂量组运动距离及运动速度显著减少 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 各剂量组运动轨迹逐渐向周围分布, 中心区运动轨迹减少; 高剂量组前额叶中 NE 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )、纹状体中 DRD2 阳性面积显著减少 ( $P < 0.05$ )。结论 菖麻熄风片能够通过增加前额叶 NE 水平、降低纹状体中 DRD2 表达, 改善幼龄动物多动、冲动及注意力缺陷情况, 提高幼龄动物的记忆能力, 具有治疗幼龄 ADHD 的药理活性。

**关键词:** 菖麻熄风片; 注意力缺陷多动障碍; 多巴胺受体; 自发性高血压大鼠; 孕期尼古丁暴露; 去甲肾上腺素

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)03-0679-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.03.014

## Effect of Changma Xifeng Tablet on symptoms and mechanism of attention deficit hyperactivity disorder in young animals

JING Baoqin<sup>1,2,4,5</sup>, ZHANG Shanshan<sup>2,4,5</sup>, LI Dongzhi<sup>2,4,5</sup>, HAN Bing<sup>3</sup>, QIAO Xin<sup>1</sup>, YAO Hongyan<sup>3</sup>

1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Tiancheng Drug Assessment Research Co., Ltd., Tianjin 300301, China

3. Heilongjiang Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Harbin 150025, China

4. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

5. State Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin 300301, China

**Abstract: Objective** To study the effects of Changma Xifeng Tablet (CXT) on hyperactivity, impulsivity and attention deficit of young attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) model rats and the levels of neurotransmitters and dopamine receptors in the

收稿日期: 2024-09-24

作者简介: 荆宝琴 (1983—), 女, 副研究员, 研究方向为药理毒理。E-mail: jingbq@tjipr.com

\*通信作者: 乔鑫 (1986—), 男, 副教授, 研究方向为化疗药理学。E-mail: qiaoxin@tmu.edu.cn

姚洪艳 (1980—), 女, 副高级工程师, 研究方向为中药研发。E-mail: 18714765@qq.com

prefrontal lobe, striatum and brain microdialysis solution. **Methods** Prenatal nicotine exposure (PNE) mice were randomly divided into model group, CXT low-dose, medium-dose, and high-dose groups (crude drug dose of 2.4、4.8、9.6 g·kg<sup>-1</sup>), Jingling oral liquid group (7.4 mL·kg<sup>-1</sup>), and tomoxetine hydrochloride group (17.5 mg·kg<sup>-1</sup>), C57BL/6J mice of the same week were also assigned as normal group. All group were administered by gavage for 14 days. Spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomly divided into model group, CXT low-dose, medium-dose, and high-dose groups (crude drug dose of 1.4、2.8、5.6 g·kg<sup>-1</sup>), Jingling oral liquid group (4 mL·kg<sup>-1</sup>), and tomoxetine hydrochloride group (10 mg·kg<sup>-1</sup>), and wistar kyoto rats (WKY) of the same week as normal group. Open field experiment, Y maze experiment and elevated cross maze experiment were used to detect hyperactivity, impulsive behavior, attention and learning ability of PNE mice and SHR rats. The cyclic adenosine monophosphate (cAMP) content in the prefrontal lobe and striatum of SHR rats was detected by ELISA. The expression of DRD1 and DRD2 of dopamine receptors in the prefrontal lobe and striatum of SHR rats was detected by immunohistochemistry. High Performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) was used to determine norepinephrine (NE), dopamine (DA) and the metabolite 3-methoxy-4-hydroxy acetic acid (HVA) in the prefrontal lobe, striatum and brain microdialysis solution of SHR. **Results** Compared with the model group, after 14 days of administration in PNE pups, the total distance traveled and average speed in the open field test were significantly reduced in the medium and high-dose groups of CXT ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the number of correct responses in the Y-maze test was significantly increased in the low and high-dose groups ( $P < 0.05, 0.01$ ). Compared with the model group, after 7 days of administration in SHR, the total distance traveled and average speed in the open field test were significantly reduced in all dose groups of CXT ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the number of entries into the open arms in the elevated plus maze test was significantly reduced in the medium and high-dose groups ( $P < 0.05, 0.01$ ), with the high-dose group showing a significant decrease in the time spent in the open arms ( $P < 0.05$ ); after 14 days of administration, the total distance traveled and average speed in the open field test were significantly reduced in the medium and high-dose groups ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the movement trajectories gradually distributed towards the periphery, with a reduction in the movement trajectories in the central area; the NE level in the prefrontal cortex of the high-dose group was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the positive area of DRD2 in the striatum was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CXT can improve the hyperactivity, impulsivity and attention deficit in young animals, as well as enhance their memory ability, by increasing the level of NE in the prefrontal lobe and reducing the expression of DRD2 in the striatum. It possesses pharmacological activity for the treatment of pediatric ADHD.

**Key words:** Changma Xifeng Tablet; attention deficit hyperactivity disorder; dopamine receptor; spontaneously hypertensive rats; prenatal nicotine exposure; norepinephrine

注意力缺陷多动障碍 (ADHD) 是中枢神经系统结构和功能异常的一种疾病, 是世界范围内儿童最常见的神经发育障碍之一<sup>[1]</sup>。其特征是注意力不集中、多动、冲动的持续症状以及注意力、学习能力的下降<sup>[2]</sup>。我国儿童和青少年 ADHD 的患病率约为 6.3%, 其中约有 65% 的患儿 ADHD 症状可持续到成年期, ADHD 已经成为一种全球性的慢性公共卫生问题<sup>[3]</sup>。

ADHD 发病机制复杂, 由中枢儿茶酚胺类神经递质去甲肾上腺素 (NE) 及多巴胺 (DA) 代谢障碍所致的轻度脑功能缺陷假说被广泛认可<sup>[4]</sup>, DA 和 NE 通过额叶皮质-纹状体-小脑神经调节通路, 对前额叶执行功能起重要作用, 而执行功能被认为是 ADHD 发病的关键因素<sup>[5]</sup>。目前, 针对 ADHD 的治疗药物如哌醋甲酯、托莫西汀等虽已被广泛证实可有效控制 ADHD 症状, 但临床上仍具有较多药物不良反应, 且存在药物滥用的问题, 极具争议<sup>[6]</sup>。许

多中药对不同中枢神经系统疾病具有治疗作用, 且中药治疗无成瘾性, 治疗作用温和平缓, 大大降低了不良反应发生率<sup>[7-8]</sup>。静灵口服液是国内自主研发的中药制剂, 主要组成有熟地黄、山药、茯苓等多种药材, 临床上可单独或联合盐酸托莫西汀等药物治疗儿童 ADHD<sup>[9]</sup>。菖麻熄风片是另一种自主研发的可治疗小儿多发性抽动症中药新药, 由白芍、天麻、石菖蒲、珍珠母、远志组成, 具有豁痰止痉、安神宁志的功效<sup>[10]</sup>。中医认为, ADHD 病因病机为心肝火旺、肺脾肾亏虚, 脏腑失衡, 从而易化痰生瘀<sup>[11]</sup>。而菖麻熄风片中, 天麻平肝熄风止痉; 石菖蒲、远志祛痰开窍, 宁心安神; 白芍平抑肝阳; 珍珠母镇静安神, 与 ADHD 病因病机相合。因此, 本研究考察菖麻熄风片对 ADHD 的改善作用, 并初步探索药物的作用机制。

孕期尼古丁暴露 (PNE) 仔鼠及幼龄自发性高血压大鼠 (SHR) 是广泛应用的 ADHD 模型动物。

母鼠 PNE, 对仔鼠大脑结构中神经递质信号的传导以及行为活动具有持久的影响, 能够增加子代患神经发育障碍的风险<sup>[12]</sup>。SHR 幼龄期多动、冲动、注意力不集中等行为与 ADHD 表现极为相似, 且 DA 递质系统的变化机制符合 ADHD 模式<sup>[13]</sup>。本研究采用旷场、高架十字迷宫以及 Y 迷宫等行为学检测, 观察菖麻熄风片对 PNE 仔鼠及 SHR 幼龄大鼠的多动、冲动行为以及注意力等的影响; 通过 ELISA 法检测菖麻熄风片对 SHR 前额叶、纹状体环磷酸腺苷 (cAMP) 含量的影响, 免疫组化检测菖麻熄风片对 SHR 前额叶、纹状体中神经递质受体 DA 受体 D1 (DRD1)、DRD2 的影响, 同时采用 HPLC-MS 检测菖麻熄风片对 SHR 前额叶、纹状体及脑微透析液中 NE、DA 及其代谢产物高香草酸 (HVA) 的影响, 探讨菖麻熄风片对 ADHD 的作用及机制, 为临床应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 27 只, 妊娠 11 d (G11), 体质量 (18±5) g; SPF 级雄性 SHR 144 只, Wistar 京都大鼠 (WKY) 雄性大鼠 24 只, 3 周龄, 体质量 (40±10) g, 均购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京) 2021-0011, 饲养于天津天诚新药评价有限公司动物实验楼 (屏障环境), 实验动物使用许可证号 SYXK(津滨) 2021-0008, 温度 20~26 °C, 湿度 40%~70%, 光照明暗各 12 h 交替, 自由饮食进水, 适应性饲养 3 d 后用于实验。动物伦理经天津天诚新药评价有限公司动物使用和管理委员会批准, 批准号为: 2022072601、2022041902、2022042405、2022051702、2022120603。

### 1.2 药品与主要试剂

菖麻熄风片 (批号 220103, 规格: 每片 0.53 g) 购自黑龙江省济仁药业有限公司; 静灵口服液 (批号 20211205) 购自辽宁东方人药业有限公司; 盐酸托莫西汀胶囊 (批号 D425019) 购自美国 LILIY DEL CARIBE Inc 公司; 羧甲基纤维素钠 (批号 20200713) 购自国药集团化学试剂有限公司 (沪试); 即用型高效免疫组化二抗试剂盒 (批号 M526D01) 购自爱必信 (上海) 生物科技有限公司; DRD2 Ab (批号 87q5282) 购自 affbiotech 公司; Rb pAb to DRD1 (批号 GR3268581-13) 购自艾博抗 (上海) 贸易有限公司; Mouse/Rat cAMP 试剂盒 (批号 P319363) 购自

R&D Systems 公司; 尼古丁 (批号 24J-KAL-10-0) 购自 PANPHY 公司; 蔗糖 (批号 20140606) 购自天津市化学试剂供销公司。

### 1.3 主要仪器

XR-XZ 301 大小鼠旷场实验箱、XR-XG 201 大小鼠高架十字迷宫宫体、XR-VT 高端动物行为分析系统 (上海欣软信息科技有限公司); RT-6100 酶标分析仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司); Y 迷宫 X SX (安徽正华生物仪器设备有限公司); 高效液相色谱-质谱检测系统、三重四极杆液质联用仪 SCIEX Triple Quad 4500 (美国 AB SCIEX 公司)。

## 2 方法

### 2.1 药物剂量换算及给药设计

菖麻熄风片: 临床拟用治疗剂量为 0.5 g·kg<sup>-1</sup> (以生药量计)。按照体表面积计算, 小鼠等效剂量为 4.8 g·kg<sup>-1</sup> (以生药量计), 大鼠等效剂量为 2.8 g·kg<sup>-1</sup> (以生药量计)。菖麻熄风片低、中、高剂量设计为 0.5、1.0、2.0 倍临床等效剂量, 即: 小鼠 2.4、4.8、9.6 g·kg<sup>-1</sup> (以生药量计), 大鼠 1.4、2.8、5.6 g·kg<sup>-1</sup> (以生药量计)。静灵口服液: 临床治疗剂量为 0.76 mL·kg<sup>-1</sup>, 设计临床等效量小鼠为 7.4 mL·kg<sup>-1</sup>, 大鼠为 4 mL·kg<sup>-1</sup>。托莫西汀: 临床治疗剂量为 1.8 mg·kg<sup>-1</sup>, 设计临床等效量小鼠为 17.5 mg·kg<sup>-1</sup>, 大鼠为 10 mg·kg<sup>-1</sup>。

### 2.2 动物造模及分组

**2.2.1 PNE 仔鼠** 按照随机数字法, 将 27 只孕 14 d 的 C57BL/6J 母鼠分为对照组和 PNE 组, 对照组 3 只, PNE 组 24 只。对照组母鼠饮用 2% 蔗糖水溶液, PNE 组母鼠饮用 0.2 mg·mL<sup>-1</sup> 的尼古丁溶液 (含 2% 蔗糖水溶液, 可以掩盖尼古丁的苦味), 饮用持续至生产当天 (P0)。在 P0~P23 期间所有组均饮用蒸馏水, 仔鼠在 P23 离乳。离乳后, 将 60 只 PNE 仔鼠按照随机数字法, 分为模型组、静灵口服液 (7.4 mL·kg<sup>-1</sup>) 组、托莫西汀 (17.5 mg·kg<sup>-1</sup>) 组和菖麻熄风片低、中、高剂量 (2.4、4.8、9.6 g·kg<sup>-1</sup>) 组, 每组 10 只, 雌雄各半; 另将 10 只未经 PNE 的同周龄 C57BL/6J 仔鼠设为对照组。采用 ig 给药方式, 每天 1 次, 连续给药 14 d, 模型组和对照组 ig 等体积去离子水。用于旷场和 Y 迷宫的研究。

**2.2.2 SHR 及 WYK 大鼠** 按照随机数字法, 将 96 只幼龄 SHR 雄性大鼠分为模型组、静灵口服液 (4 mL·kg<sup>-1</sup>) 组、托莫西汀 (10 mg·kg<sup>-1</sup>) 组和菖

麻熄风片低、中、高剂量 (1.4、2.8、5.6 g·kg<sup>-1</sup>) 组, 每组 16 只; 另将 16 只同周龄雄性 WKY 大鼠设为对照组。用于旷场、高架十字迷宫、前额叶及纹状体 DA、NE、cAMP、DRD1、DRD2 的研究。

另取 48 只幼龄 SHR 雄性大鼠及 8 只同周龄雄性 WKY 大鼠, 分组给药方式同上。用于脑微透析液研究。

### 2.3 行为学检测

**2.3.1 旷场实验** ig 给药 0、7、14 d 对 PNE 仔鼠、SHR 及 WKY 大鼠进行旷场实验。将动物轻轻放置测试箱的中央, 采用视频跟踪系统跟踪动物行为轨迹, 每只动物持续观察 5 min, 第 1 分钟为适应时间, 使用 VisuTrack 动物行为分析软件统计 2~5 min 动物行为轨迹、运动总距离、平均速度。每只动物实验结束后, 清除粪便, 设备喷洒 70% 酒精除去气味, 风干后放入下一只动物。

**2.3.2 Y 迷宫实验** ig 给药 14 d 对 PNE 仔鼠进行 Y 迷宫实验。每只动物在 Y 迷宫中适应 3 min 后, 安全区亮灯不通电, 另两臂通电, 电击延时 3~5 s, 动物逃至安全区即为 1 次正确反应, 动物训练过程中连续 9 次正确反应即为学会。记录动物学会所需训练总次数, 训练次数越少, 说明注意力集中、学习能力越强。第 2 天进行记忆保持能力测试, 共测试 15 次, 记录正确反应次数, 此值越高说明记忆力越好。每次进行下一只动物时, 设备喷洒 70% 酒精除去气味, 风干后放入下一只动物。

**2.3.3 高架十字迷宫实验** ig 给药 0、7、14 d 对 SHR 及 WKY 大鼠进行高架十字迷宫实验。将动物轻轻放置高架十字迷宫的中央区域, 使动物面向开臂。采用视频跟踪系统, 每只动物持续观察 5 min, 使用 VisuTrack 动物行为分析软件统计 5 min 内动物进入开臂、闭臂的次数及各自停留时间。每只动物实验结束后, 清除粪便, 设备喷洒 70% 酒精除去气味, 风干后放入下一只动物。

### 2.4 大脑 cAMP 检测

ig 给药 14 d, 将 SHR 及 WKY 大鼠安乐死后取大脑组织, 按照组织-0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液 (1:5) 制备脑组织匀浆液, 10 000×g 离心 10 min, 取上清液。用 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液中和上清液, 按照 Mouse/Rat cAMP 试剂盒说明书进行 cAMP 含量检测。

### 2.5 大脑神经递质 DA、NE 和受体 DRD1、DRD2 检测

ig 给药 14 d, 将 SHR 及 WKY 大鼠安乐死后取大脑前额叶、纹状体组织, 采用液质联用方法检测前额叶和纹状体中 DA、NE 含量<sup>[4]</sup>。采用免疫组化法检测前额叶和纹状体中 DRD1、DRD2 表达水平, 使用北航医学图像分析管理软件分析并统计前额叶和纹状体中 DRD1、DRD2 的阳性面积比。

阳性面积比=阳性目标面积/统计场总面积

### 2.6 脑微透析液中 DA、NE、HVA 含量检测<sup>[4]</sup>

ig 给药 14 d, 将 SHR 及 WKY 大鼠麻醉后用耳杆固定于脑立体定位仪上, 暴露颅骨, 依照《大鼠脑立体定位图谱》寻找内侧前额叶皮质 (mPFC) 坐标, 根据坐标位置在颅骨上钻孔, 插入套管, 用牙科水泥固定。微透析当天, 把大鼠固定在自由活动鼠笼, 轻轻拔出套管针芯, 插入探针, 以 1.5 μL·min<sup>-1</sup> 体积流量灌流人工脑脊液, 平衡 1 h 后用低温收集器采集微透液, 每隔 20 min 收集 1 管, 共收集 3 管, 放入-80 °C 保存。由于单胺类神经递质不稳定, 在收集管中加入由 100 mmol·L<sup>-1</sup> 高氯酸、0.27 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA、1.25 μmol·L<sup>-1</sup> 抗坏血酸组成的稳定剂, 以样品-稳定剂=9:1 的体积比加入。采用液质联用法检测脑微透析液中 DA、NE、HVA 的含量。

### 2.7 统计学方法

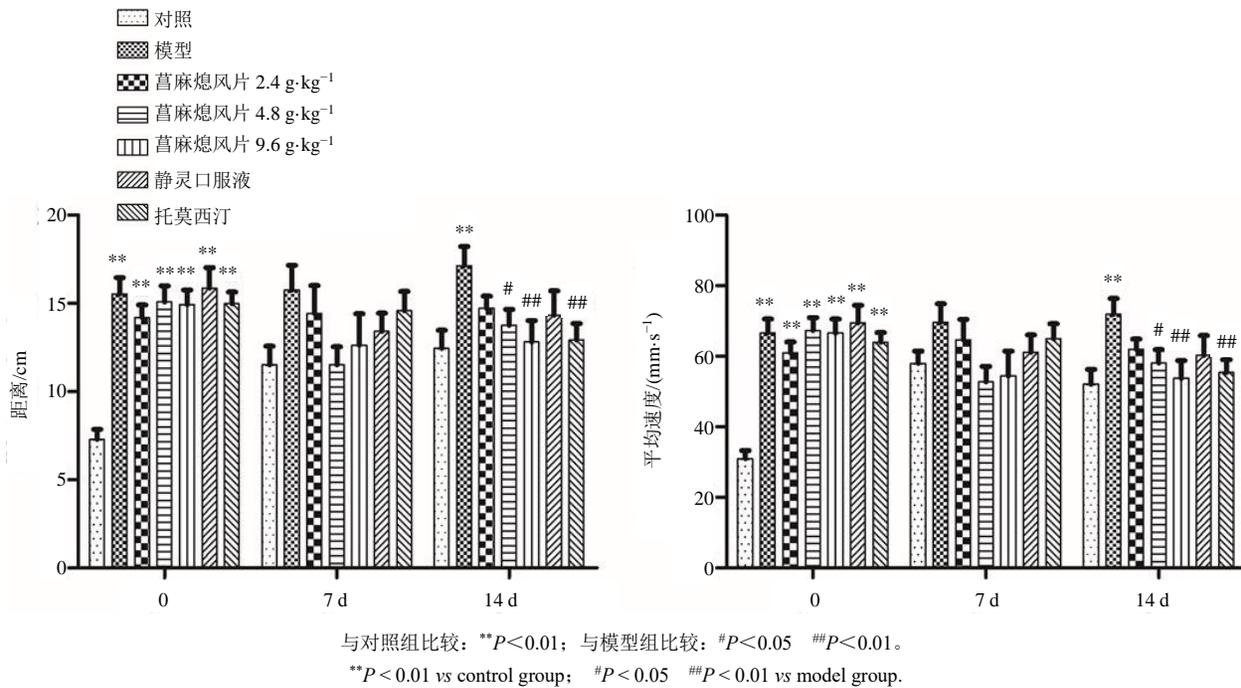
计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 25.0 软件进行统计, 方差齐进行单因素方差分析, 有显著差异时采用 LSD 检验进行两两比较; 方差不齐进行 Kruskal-Wallis 非参数检验, 并进行两两比较。

## 3 结果

### 3.1 菖麻熄风片对 PNE 仔鼠行为学影响

如图 1 所示, 在 PNE 仔鼠旷场实验中, 与对照组相比, 模型组和各给药组大鼠给药 0 天的运动总距离和平均速度均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明尼古丁诱导的 PNE 仔鼠有多动和冲动表现, 且模型组与各给药组比较无显著差异; 给药 7 d, 与模型组比较, 各给药组的运动总距离和平均速度有降低趋势; 给药 14 d, 与模型组相比, 菖麻熄风片中、高剂量组和托莫西汀组运动总距离和平均速度显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 表明菖麻熄风片中、高剂量组能减少尼古丁诱导的仔鼠运动总距离和平均速度, 可以改善仔鼠的多动症状。

如表 1 所示, 在 PNE 仔鼠 Y 迷宫实验中, 与对照组相比, 模型组正确反应次数显著减少 ( $P <$

图 1 菖麻熄风片对 PNE 仔鼠旷场实验运动总距离和平均速度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )Fig. 1 Effect of CXT on total distance and average velocity of PNE offspring in opening test ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )表 1 菖麻熄风片对 PNE 仔鼠 Y 迷宫实验的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )Table 1 Effects of CXT on Y maze test of PNE ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	剂量/ ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	学会所需训 练的总次数	训练 15 次中正 确反应次数
对照	—	18.6 $\pm$ 4.1	11.3 $\pm$ 1.0
模型	—	41.6 $\pm$ 8.9	7.3 $\pm$ 1.2**
菖麻熄风片	2.4	21.7 $\pm$ 4.6	11.2 $\pm$ 0.8##
	4.8	31.8 $\pm$ 9.1	9.3 $\pm$ 1.1
	9.6	22.4 $\pm$ 4.4	12.1 $\pm$ 1.0##
静灵口服液	7.4 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	15.1 $\pm$ 2.6	12.3 $\pm$ 1.0##
托莫西汀	17.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	34.4 $\pm$ 10.4	11.8 $\pm$ 0.9##

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。\*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group.

0.01), 表明尼古丁诱导的 PNE 仔鼠学习能力、注意力及记忆力均弱于对照组; 与模型组相比, 菖麻熄风片低、高剂量组及静灵口服液组、托莫西汀组正确反应次数显著增加 ( $P < 0.01$ ), 表明菖麻熄风片能显著改善 PNE 仔鼠的学习能力、注意力及记忆力。

### 3.2 菖麻熄风片对 SHR 行为学及神经递质水平的影响

**3.2.1 菖麻熄风片对 SHR 行为学影响** 如图 2、3 所示, 在旷场实验中, 与对照组相比, 模型组及各给药组大鼠给药当天的总运动距离、平均速度均显

著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明 SHR 模型大鼠有多动和冲动表现, 且模型组与各给药组比较无显著差异; 给药 7 d, 与模型组相比, 菖麻熄风片低、中、高剂量组、静灵口服液组、托莫西汀组大鼠的总运动距离、平均速度均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01); 给药 14 d, 与模型组相比, 菖麻熄风片中、高剂量组、静灵口服液组、托莫西汀组大鼠的总运动距离、平均速度显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), 各给药组大鼠运动轨迹逐渐向周围分布, 中心区运动轨迹减少, 表明菖麻熄风片可有效改善 SHR 幼龄大鼠的多动症状。

如表 2 所示, 在高架十字迷宫实验中, 与对照组相比, 模型组进入开臂及停留时间均显著增加 ( $P < 0.05$ ), 表明 SHR 模型大鼠有多动表现; 给药 7 d, 与模型组相比, 菖麻熄风片中、高剂量组进入开臂次数明显减少 ( $P < 0.05$ 、0.01), 开臂停留时间显著降低 ( $P < 0.05$ ); 静灵口服液组进入开臂次数明显减少 ( $P < 0.01$ )。表明菖麻熄风片可有效改善 SHR 幼龄大鼠的冲动症状。

**3.2.2 菖麻熄风片对幼龄 SHR 大脑 cAMP 含量的影响** 如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组前额叶和纹状体中的 cAMP 含量均有降低趋势, 但差异无统计学意义。与模型组相比, 菖麻熄风片低、中、高剂量组、静灵口服液组、托莫西汀组大鼠前额叶和纹状体 cAMP 含量有升高趋势, 但差异无统计学意义。

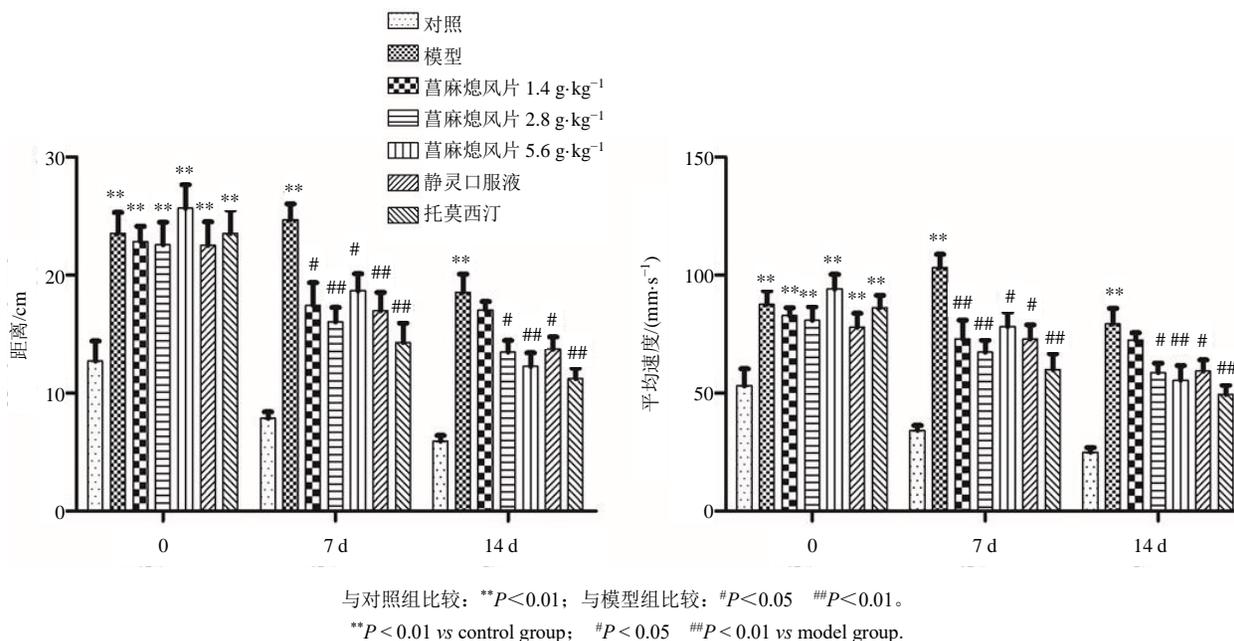


图 2 菖麻熄风片对幼龄大鼠旷场实验运动总距离和平均速度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

Fig. 2 Effect of CXT on total distance and average velocity of opening test in young rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

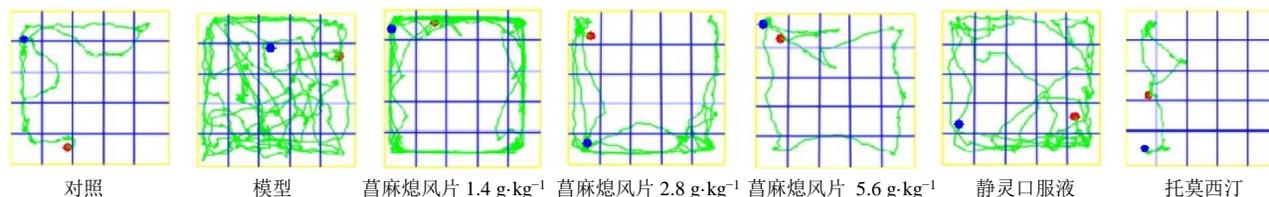


图 3 旷场实验中各组幼龄大鼠给药 14 d 运动轨迹图

Fig. 3 Movement trajectories of each group of young rats on 14 d of administration in open field experiment

表 2 菖麻熄风片对幼龄大鼠进入开臂次数及停留时间的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

Table 2 Effects of CXT on frequency and residence time of young rats entering the open ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=16$ )

组别	剂量/ ( $g \cdot kg^{-1}$ )	进入开臂次数			开臂停留时间/s		
		给药前	给药 7 d	给药 14 d	给药前	给药 7 d	给药 14 d
对照	—	5.9 ± 1.0	2.4 ± 0.7	0.3 ± 0.1	38.8 ± 14.4	8.3 ± 4.0	6.2 ± 3.4
模型	—	8.2 ± 1.0	7.3 ± 0.8**	4.7 ± 0.9**	38.0 ± 6.4	17.7 ± 2.4**	9.7 ± 2.1*
菖麻熄风片	1.4	8.8 ± 0.6	5.5 ± 0.8	3.6 ± 0.8	32.8 ± 5.2	12.0 ± 3.7#	16.1 ± 5.3
	2.8	7.6 ± 1.0	4.1 ± 0.8##	2.1 ± 0.3	34.7 ± 5.4	13.7 ± 3.1	7.1 ± 2.0
	5.6	7.8 ± 0.8	4.5 ± 0.5#	6.6 ± 0.8	30.0 ± 5.4	9.9 ± 3.3#	16.8 ± 3.2
静灵口服液	4 mL·kg <sup>-1</sup>	7.8 ± 0.9	4.4 ± 0.9##	6.2 ± 1.3	41.5 ± 8.0	23.9 ± 10.8#	27.4 ± 6.5
托莫西汀	10 mg·kg <sup>-1</sup>	7.8 ± 0.7	5.4 ± 0.8	6.3 ± 0.9	23.3 ± 4.3	11.5 ± 3.4	12.9 ± 2.2

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group.

**3.2.3 菖麻熄风片对幼龄 SHR 大脑神经递质 DA、NE 及受体 DRD1、DRD2 的影响** 如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组前额叶 DA、NE 及纹状体 DA 含量有降低趋势; 与模型组比较, 菖麻熄风片高剂量组、静灵口服液组、托莫西汀组前额叶 NE 含量

显著增加 ( $P < 0.01$ ), 托莫西汀组纹状体 NE 含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。

如图 5、6 所示, 与对照组相比, 模型组前额叶和纹状体的 DRD1 表达有降低趋势、DRD2 表达有升高趋势; 与模型组相比, 菖麻熄风片高剂量

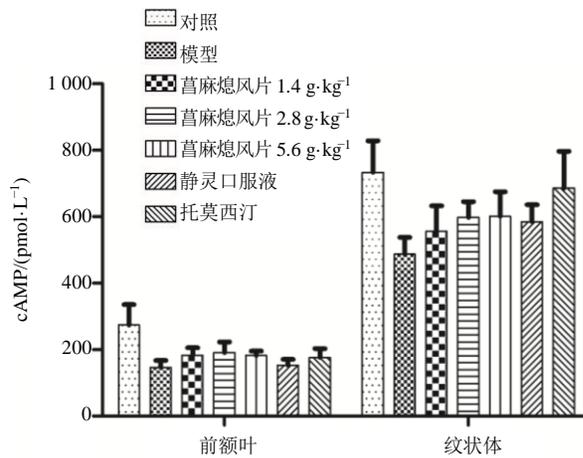


图 4 苜麻熄风片对 cAMP 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Fig. 4 Effect of CXT on cAMP content ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

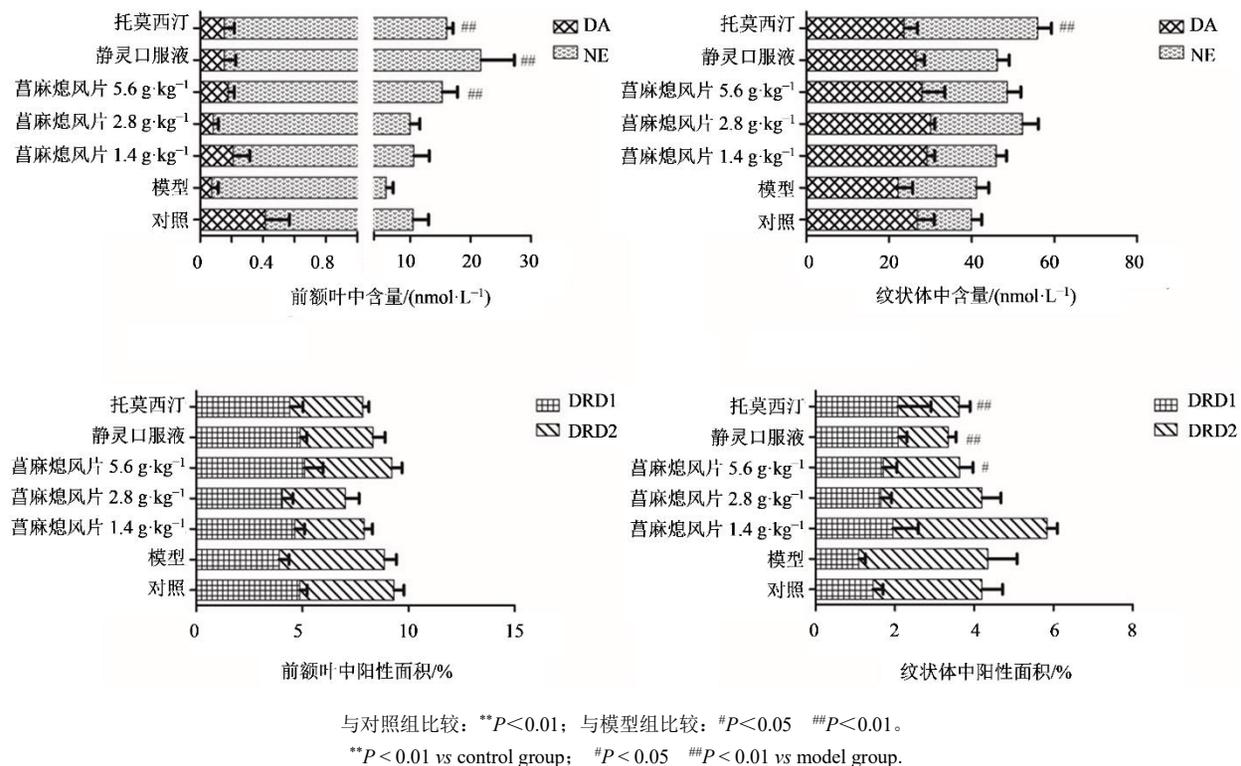


图 5 苜麻熄风片对幼龄大鼠大脑神经递质 DA、NE 及受体 DRD1、DRD2 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 5 Effect of CXT on expression of neurotransmitters DA and NE and receptors DRD1 and DRD2 in young rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

#### 4 讨论

ADHD 作为儿童常见的早发性、持续性神经发育障碍，全球总患病率约为 5.3%，且具有一定的共病率，共病类型主要包括共病精神障碍、睡眠障碍、反社会人格障碍以及焦虑障碍等，给个人和社会带来沉重负担<sup>[14-15]</sup>。ADHD 的产生与环境、遗传具有密切的关系，动物研究表明妊娠期间尼古丁暴露，能够影响脑桥的背侧被盖核在注意力、运动和其他

组、静灵口服液组、托莫西汀组纹状体中的 DRD2 表达显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

**3.2.4 苜麻熄风片对幼龄 SHR 脑微透析液中神经递质 DA、NE 及其代谢产物 HVA 的影响** 如图 7 所示，与对照组相比，模型组大鼠脑微透析液中 NE、DA、HVA 含量有降低趋势；与模型组相比，苜麻熄风片低、中、高剂量组、静灵口服液组、托莫西汀组大鼠脑微透析液中 DA、NE 含量有增加趋势；苜麻熄风片中、高剂量组及静灵口服液组、托莫西汀组大鼠脑微透析液 HVA 含量有增加趋势，但差异无统计学意义。结果表明苜麻熄风片可能通过调节大鼠脑透析液中 NE、DA、HVA 含量参与大脑及神经功能调节。

认知功能的作用。在我国托莫西汀是 ADHD 防治指南中的主要推荐药物，其作用机制是与神经突触前膜的 NE 再摄取转运体结合，提高突触间隙中的 NE 浓度，同时提高 DA 水平，改善患者的认知功能<sup>[16]</sup>。目前，临床前研究一般采用旷场<sup>[17]</sup>、Y 迷宫<sup>[18]</sup>、高架十字迷宫<sup>[19]</sup>、明暗箱<sup>[20]</sup>等行为学实验，评估 ADHD 动物模型的注意力、反应控制、认知灵活性、以及记忆、探索行为等方面的缺陷。苜麻熄

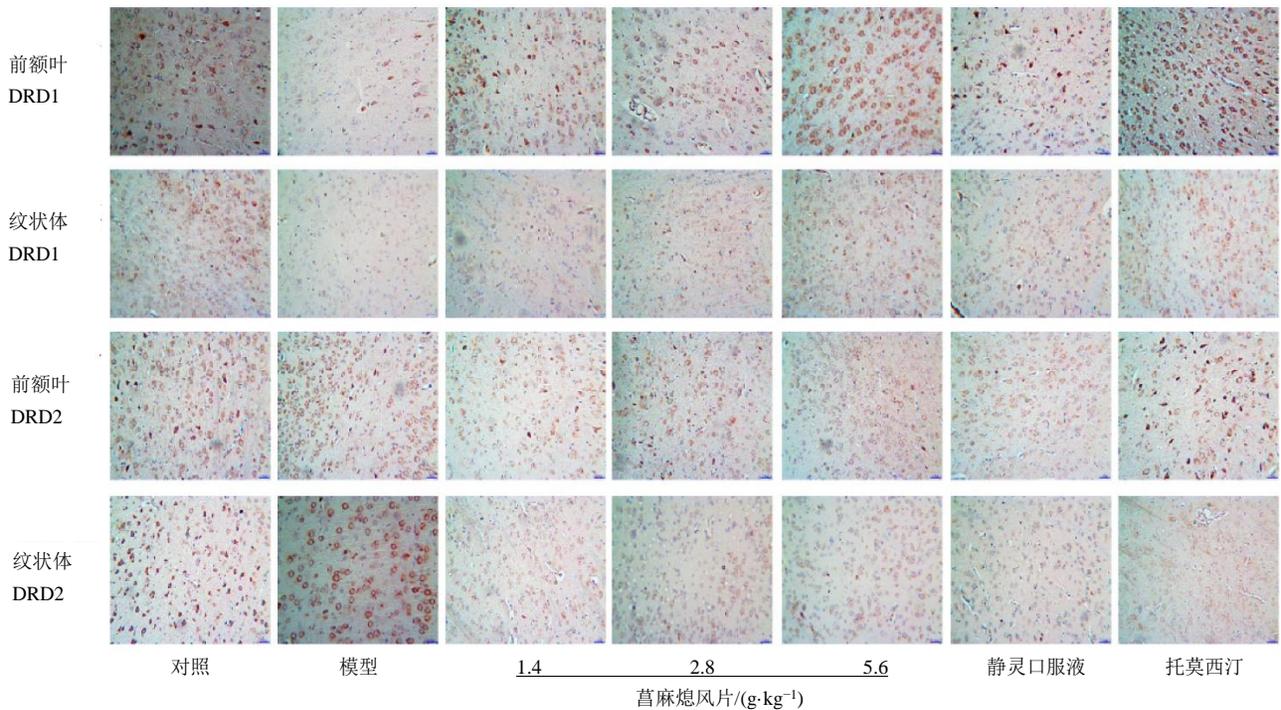


图 6 菖麻熄风片给药 14 d 对幼龄大鼠神经递质受体表达的影响 (目镜 10×, 物镜 10×)

Fig. 6 Expression of neurotransmitter receptor in young rats after 14 d of administration of CXT (eyepiece 10×, objective 10×)

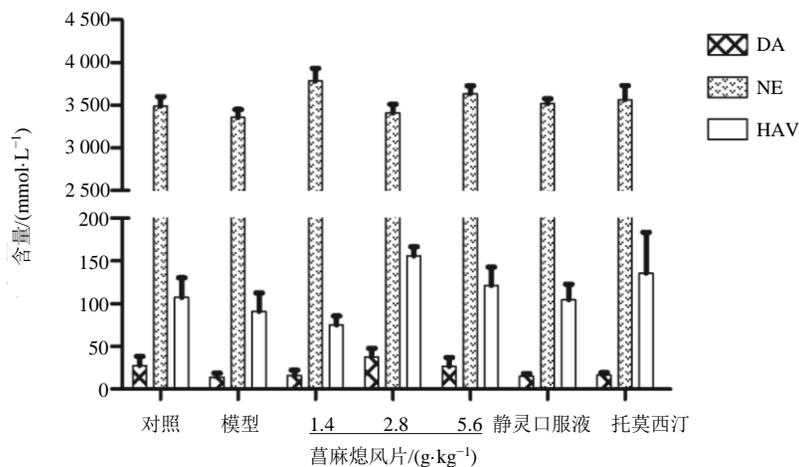


图 7 菖麻熄风片对幼龄大鼠脑微透液中 DA、NE、HVA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 7 Effect of CXT on content of DA, NE and HVA in brain dialysate of young rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

风片临床可单独或联合用药用于治疗儿童多发性抽动症, 临床效果显著, 然而其作用机制尚不明确<sup>[21]</sup>。本实验通过结合现有文献, 探究了菖麻熄风片对 ADHD 动物模型行为学特征的影响及其作用机制。

旷场实验是评价动物自发行为的经典实验, 本研究结果显示, 经菖麻熄风片给药后的 PNE 仔鼠和 SHR 总运动距离、平均速度均显著降低, 且运动轨迹逐渐向周围分布, 中心区运动轨迹减少, 表明菖

麻熄风片可有效改善大鼠多动症状。高架十字迷宫实验是基于动物好奇心与嗜暗天性两者间冲突而设计, 其中进入开臂次数及开臂停留时间是反映动物冲动行为的重要指标; 本研究结果显示菖麻熄风片给药后 SHR 进入开臂次数以及开臂停留时间逐渐减少, 表明菖麻熄风片能够改善 SHR 多动、冲动等 ADHD 行为。Y 迷宫实验是一种广泛用于神经科学和行为学研究的测试, 主要用于评估动物的空间记忆和认知功能, PNE 仔鼠给药 14 d 后正确反

应次数显著提高,表明菖麻熄风片可以改善仔鼠的注意力缺陷,提高仔鼠的记忆能力。

研究发现多种神经递质及转运体以不同方式参与 ADHD,如 DA、NE、5-羟色胺、谷氨酸以及 DA 受体等<sup>[21]</sup>。DA 信号通路在记忆和注意力方面起重要作用,DA 通路紊乱会导致认知缺陷,从而引起注意障碍,表现为易分心等<sup>[22]</sup>。HVA 是 DA 的代谢终产物,能够间接地反映脑内递质水平及大脑功能。DRD1 与额叶的执行功能相关,对记忆力及冲动选择起关键作用。DRD1 通过激活 Gs/Golf 和刺激 cAMP 的产生,调节中枢神经系统奖赏、运动和认知,并在外周组织中发挥有益的作用。DRD2 与 Gi/Go 耦联,抑制 cAMP 积累,并通过 DA 转运体促进 DA 从突触间隙再摄取到突触前膜,导致突触间隙 DA 浓度降低,影响信号传导<sup>[23-25]</sup>。本实验通过对前额叶、纹状体组织中 NE、DA 含量及 DRD1、DRD2 表达水平进行检查,发现菖麻熄风片能引起大鼠前额叶 NE 水平增加、前额叶及纹状体中 DA 有增加趋势,纹状体中 DRD2 阳性面积减少,进而引起大鼠前额叶与纹状体中 cAMP 含量有升高趋势。

微透析是一种以透析原理为基础的微创膜取样技术,对细胞外液内源性和外源性物质进行活体直接取样,具有微创、活体、连续的采样优势<sup>[26]</sup>。通过对脑微透析液中 DA、NE、HVA 进行检测,发现菖麻熄风片治疗后 DA、NE 和 HVA 含量有增加趋势,进而表明了菖麻熄风片可通过升高大鼠前额叶和纹状体中 DA、NE 的含量来改善大鼠多动症的症状。

菖麻熄风片能够调节前额叶、纹状体的 NE 和 DA 水平、降低纹状体 DRD2 表达,增加 cAMP 积累,减少冲动及多动症状,提高记忆能力,对 ADHD 模型动物多动症状具有一定的治疗作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Wüstner A, Otto C, Schlack R, et al. Risk and protective factors for the development of ADHD symptoms in children and adolescents: Results of the longitudinal BELLA study [J]. PLoS One, 2019, 14(3): e0214412.
- [2] Martínez-Badía J, Martínez-Raga J. Who says this is a modern disorder? The early history of attention deficit hyperactivity disorder [J]. World J Psychiatry, 2015, 5(4): 379-386.
- [3] 任艳玲,蔡婧,马岭,等. ADHD 儿童自我意识水平及其影响因素研究 [J]. 中国现代医生, 2023, 61(8): 31-34, 38.  
Ren Y L, Cai J, Ma L, et al. Self-concept and its influencing factors in children with attention deficit hyperactivity disorder [J]. China Mod Dr, 2023, 61(8): 31-34, 38.
- [4] 孙振涛,丁亚媛,刘华强. 心理治疗联合盐酸托莫西汀胶囊治疗儿童多动症的效果观察 [J]. 临床研究, 2019, 27(8): 75-77.  
Sun Z T, Ding Y Y, Liu H Q. Observation of the effect of psychological therapy combined with atomoxetine hydrochloride capsules in the treatment of children with ADHD [J]. Clin Res, 2019, 27 (8): 75-77
- [5] 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): 411-416.  
Lei S, Miao J, Han X M, et al. Effects of Anshen Dingzhi Ling on content level of dopamine and norepinephrine in prefrontal cortex and striatum of spontaneously hypertensive rats [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2017, 44(2): 411-416.
- [6] Faraone S V, Rostain A L, Brendan Montano C, et al. Systematic review: Nonmedical use of prescription stimulants: Risk factors, outcomes, and risk reduction strategies [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2020, 59(1): 100-112.
- [7] Zhu H Z, Liang Y D, Ma Q Y, et al. Xiaoyaosan improves depressive-like behavior in rats with chronic immobilization stress through modulation of the gut microbiota [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108621.
- [8] 张馥玉,李亚平. 中药复方治疗儿童注意缺陷多动障碍疗效与安全性的 Meta 分析 [J]. 江西中医药, 2022, 53(5): 28-35.  
Zhang F Y, Li Y P. Meta analysis of efficacy and safety of traditional Chinese medicine in the treatment of children with attention deficit hyperactivity disorder [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2022, 53(5): 28-35.
- [9] 沈辉. 静灵口服液联合盐酸托莫西汀口服溶液治疗儿童注意缺陷多动障碍效果的探讨 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2024, 8(9): 99-101.  
Shen H. Discussion on the effect of Jingling Oral Liquid combined with Tomoxetine Hydrochloride Oral Solution in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children [J]. Mod Med Health Res Electron J, 2024, 8(9): 99-101.
- [10] 刘姗,唐艳,刘友红. 菖麻熄风片联合氟哌啶醇治疗小

- 儿抽动秽语综合征的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(10): 2311-2315.
- Liu S, Tang Y, Liu Y H. Clinical study on Changma Xifeng Tablets combined with haloperidol in treatment of Tourette's syndrome in children [J]. *Drugs Clin*, 2022, 37(10): 2311-2315.
- [11] 王岳, 曹建雄. 从五脏阴阳失衡及痰瘀互结探讨小儿多动症 [J]. 浙江中医药大学学报, 2023, 47(3): 296-299.
- Wang Y, Cao J X. Discussion on ADHD in children from the imbalance of *Yin* and *Yang* of the five internal organs and mutual formation of phlegm and blood stasis [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2023, 47(3): 296-299.
- [12] Polli F S, Kohlmeier K A. Prenatal nicotine alters development of the laterodorsal tegmentum: Possible role for attention-deficit/hyperactivity disorder and drug dependence [J]. *World J Psychiatry*, 2022, 12(2): 212-235.
- [13] McCarthy D M, Zhang L, Wilkes B J, et al. Nicotine and the developing brain: Insights from preclinical models [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2022, 214: 173355.
- [14] Reale L, Bartoli B, Cartabia M, et al. Comorbidity prevalence and treatment outcome in children and adolescents with ADHD [J]. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2017, 26(12): 1443-1457.
- [15] Cagigal C, Silva T, Jesus M, et al. Does diet affect the symptoms of ADHD ? [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2019, 20(2): 130-136.
- [16] 苗竞. 安神定志灵对 ADHD 模型鼠行为学及相关单胺类神经递质含量影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- Miao J. Effect of Anshen Dingzhiling on behavior and monoamine neurotransmitter content in ADHD model rats [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2014.
- [17] Li X J, Jiang Z Y, Xiao Z, et al. Effect of traditional Chinese Medicine on ADHD animal behavior and brain tissue dopamine and cAMP: A network Meta-analysis [J]. *Pharmacol Res Mod Chin Med*, 2022, 4: 100128.
- [18] Vázquez J C, Martin de la Torre O, López Palomé J, et al. Effects of caffeine consumption on attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) treatment: A systematic review of animal studies [J]. *Nutrients*, 2022, 14(4): 739.
- [19] Bouchatta O, Aby F, Sifeddine W, et al. Pain hypersensitivity in a pharmacological mouse model of attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(30): e2114094119.
- [20] Jogamoto T, Utsunomiya R, Sato A, et al. Lister hooded rats as a novel animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Neurochem Int*, 2020, 141: 104857.
- [21] 刘雨东, 李敬娴, 郭武玲, 等. 苜麻熄风片联合可乐定透皮贴治疗儿童抽动症的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(10): 3030-3034.
- Liu Y D, Li J X, Guo W L, et al. Clinical study on Changma Xifeng Tablets combined with Clonidine Transdermal Patches in treatment of Tourette's disease in children [J]. *Drugs Clin*, 2019, 34(10): 3030-3034.
- [22] González-Martínez Á, Muñoz de Miguel S, Graña N, et al. Serotonin and dopamine blood levels in ADHD-like dogs [J]. *Animals (Basel)*, 2023, 13(6): 1037.
- [23] Polli F S, Kohlmeier K A. Prenatal nicotine alters development of the laterodorsal tegmentum: Possible role for attention-deficit/hyperactivity disorder and drug dependence [J]. *World J Psychiatry*, 2022, 12(2): 212-235.
- [24] Hansen J Y, Shafiei G, Markello R D, et al. Mapping neurotransmitter systems to the structural and functional organization of the human neocortex [J]. *Nat Neurosci*, 2022, 25(11): 1569-1581.
- [25] Kessi M, Duan H L, Xiong J, et al. Attention-deficit/hyperactive disorder updates [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 925049.
- [26] 韦园诗, 朱黎霞, 黄星星, 等. 微透析技术联用 UPLC-Q/TOF-MS 的大脑中动脉栓塞大鼠代谢组学研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3155-3161.
- Wei Y S, Zhu L X, Huang X X, et al. Metabonomics study of MCAO rats based on microdialysis technique combined with UPLC-Q/TOF-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(13): 3155-3161.

[责任编辑 兰新新]