

张永婷,周荣易,马丙祥,等. 黄芩苷对注意缺陷多动障碍动物模型 SHR 大鼠核心症状影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 25-32, 149.

Zhang YT, Zhou RY, Ma BX, et al. Effect of baicalein on core symptoms in an SHR model of attention deficit hyperactivity disorder [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 25-32, 149.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.004

黄芩苷对注意缺陷多动障碍动物模型 SHR 大鼠 核心症状影响研究

张永婷¹, 周荣易^{1,2,*}, 马丙祥^{2,*}, 吴晨蕾¹, 谢新月¹, 丁雪颖¹

(1.河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450000; 2.河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

【摘要】 目的 通过旷场和 Morris 水迷宫实验,探究黄芩苷调控注意缺陷多动障碍动物模型核心临床症状的疗效及其潜在机制。**方法** 将 30 只 SHR 大鼠随机分为模型组、盐酸哌甲酯(MPH)组、黄芩苷组、黄芩苷+丁苯那嗪组和 MPH+丁苯那嗪组,每组 6 只,另设 6 只 WKY 大鼠为对照组。MPH 组(1.5 mg/kg)、黄芩苷组(150 mg/kg)按体重(1 mL/100 g)灌胃给药,空白组、模型组给等量生理盐水,MPH+丁苯那嗪组、黄芩苷+丁苯那嗪组在灌胃给药同时,按体重(0.5 mL/100 g)腹腔注射丁苯那嗪(3 mg/kg)。连续给药 4 周。在规定时间内进行旷场和水迷宫实验,记录并分析实验结果。**结果** MPH 组和黄芩苷组在旷场实验中运动总距离和平均速度较模型组显著减小($P<0.05$),在水迷宫实验中潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$)、在目标象限运动距离和停留时间占比及穿越平台次数较模型组显著增加($P<0.05$),且这两组间无明显差异;黄芩苷+丁苯那嗪组在旷场实验中运动总距离和平均速度较模型组显著减小($P<0.05$),较黄芩苷组明显增大,在水迷宫实验中潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$),较黄芩苷组显著延长($P<0.05$)、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组明显增加,较黄芩苷组显著减少($P<0.05$)。**结论** 黄芩苷能够改善 SHR 大鼠多动、冲动、注意力不集中等核心症状,其疗效的发挥可能与调控 DA 囊泡转运相关。

【关键词】 注意缺陷多动障碍;自发性高血压大鼠;黄芩苷;行为学实验;核心症状

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0025-08

Effect of baicalein on core symptoms in an SHR model of attention deficit hyperactivity disorder

ZHANG Yongting¹, ZHOU Rongyi^{1,2,*}, MA Bingxiang^{2,*}, WU Chenlei¹, XIE Xinyue¹, DING Xueying¹

(1. Pediatric Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.

2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Objective To explore the efficacy and potential mechanism of baicalin in regulating the core clinical symptoms of ADHD by Morris water maze and open field tests. **Methods** Thirty SHRs were randomly divided into five groups: model, methylphenidate hydrochloride (MPH), baicalin, baicalin+tetrabenazine, and MPH+tetrabenazine groups with six rats in each group. Another six WKY rats were used as the normal control group. Rats in the MPH group (1.5

【基金项目】国家自然科学基金青年基金(82104928);中国博士后科学基金面上项目(2021M701123);河南省特色骨干学科课题(STG-ZYX06-202150);河南中医药大学仲景青年学者科研启动项目(CZ0168-04)。

【作者简介】张永婷(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治儿童神经内科疾病。E-mail:1179866610@qq.com

【通信作者】周荣易(1990—),男,副教授,研究生导师,研究方向:中医药防治儿童神经内科疾病。E-mail:zhourongyitem@sina.com

马丙祥(1963—),男,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治儿童神经内科疾病。E-mail:mbx1963@126.com

* 共同通信作者

mg/kg) and baicalin group (150 mg/kg) were administered the corresponding drugs (1 mL/100 g) by gavage, and those in normal control and model groups were administered an equal volume of normal saline by gavage. In addition to the corresponding drug gavage, rats in MPH+tetrabenazine and baicalin+tetrabenazine groups were subjected to intraperitoneal injection of tetrabenazine (3 mg/kg) in accordance with body weight (0.5 mL/100 g). The course was 4 weeks for all groups. Open field and Morris water maze experiments were conducted at predefined time points to record and analyze the result. **Results** In the open field test, the total distance and average speed of rats in the MPH and baicalin groups were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$). In the Morris water maze test, the latency of rats in the MPH and baicalin groups was significantly shorter than that of the model group ($P<0.05$), and the proportion of movement distance and residence time in the target quadrant and the number of times crossing the platform in the MPH and baicalin groups were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$), and there is no significant difference between the two groups. The total distance and average speed in the baicalin+tetrabenazine group were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$) and larger than those in baicalin group in the open field test. The latency in the baicalin+tetrabenazine group was significantly shorter than that in the model group ($P<0.05$) and was significantly longer than that in baicalin group ($P<0.05$) in the Morris water maze test. The movement distance and residence time in the target quadrant in the baicalin+tetrabenazine group were higher than model group and significantly lower than those in the baicalin group ($P<0.05$). **Conclusions** Baicalin controls the core symptoms of hyperactivity, impulse, and inattention in the ADHD model, and its curative effect may be related to regulation of dopamine vesicle transport.

【Keywords】 attention deficit hyperactivity disorder; SHR; baicalin; behavioral experiment; core symptoms

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

注意缺陷多动障碍 (attention deficit/hyperactivity disorder, ADHD) 是儿童时期常见的神经发育障碍性疾病,全球范围研究显示,ADHD 患病率约为 7.2%,并呈上升趋势^[1]。ADHD 临床以注意力不集中、多动、冲动为核心症状^[2],常共患品行障碍、抽动障碍、行为障碍及对立违抗性障碍^[3-5],约有 50% 在儿童或青少年时期被诊断为 ADHD 的个体成年后仍会持续多动症症状^[6],这导致患者社会适应能力下降,对其生活、学习和社交造成极大困扰,给家庭带来极大压力。目前 ADHD 临床上以药物治疗为主,精神兴奋剂 MPH 为一线治疗药物,临床疗效显著,但存在长期应用成瘾性、影响发育、体重等不良反应,导致患者依从性差^[7]。黄芩苷是课题组早期在临床治疗 ADHD 疗效显著的中药复方研究过程中发现的单体成分^[8]。前期研究显示,黄芩苷控制 ADHD 核心症状疗效显著,且未发现明显副作用^[9]。截止目前,ADHD 的发病机制尚不明确,围绕多巴胺 (dopamine, DA) 系统的研究成为当前全球范围内 ADHD 发病机制的研究热点,受国际社会广泛关注^[10]。课题组前期基础研究表明,黄芩苷对 DA 系统具有特殊亲和力^[11-12],不同剂量的黄芩苷均能控制 ADHD 核心症状,且在 150 mg/kg 剂量下疗效最为稳定^[9]。深入机制研究表明,这一疗效或许与黄芩苷调控前额叶皮质、纹状体内 DA 囊泡转运环节中囊泡单胺转运体 II 型 (VMAT2) 的表

达有关^[8]。囊泡转运是 DA 囊泡循环过程中极为关键的环节,对脑内 DA 正常释放、维持脑内 DA 正常水平意义重大;VMAT2 作为主要表达于中枢神经系统多巴胺能神经末梢的关键蛋白^[13],在 DA 转运和释放中发挥关键作用。研究显示,ADHD 患者及其动物模型 SHR 大鼠均存在脑内 VMAT2 表达下调现象,导致 DA 转运速度降低和释放减少,形成脑内 DA 缺陷^[8,14-15]。研究显示,VMAT2 功能异常导致大鼠脑内 DA 含量显著降低而表现出 ADHD 核心症状^[16]。基于课题组前期研究和以上理论基础,作者推测 VMAT2 可能作为黄芩苷发挥药效的潜在作用靶点。为验证黄芩苷是否通过作用于 DA 囊泡循环中 VMAT2 这一靶点达到控制 ADHD 核心症状的疗效,进而探究其潜在疗效机制。本研究在前期研究基础上,应用 VMAT2 抑制剂丁苯那嗪继续开展研究工作,以期为进一步阐明黄芩苷的疗效机制以及后期新药开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4 周龄 SPF 级 SHR 雄性大鼠 36 只,体重 (103±10) g; 4 周龄 SPF 级 WKY 雄性大鼠 6 只,体重 (93.5±7) g,均采购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2021-0001]。SHR 大鼠起源于东京高血压 Wistar 大鼠,经交叉培育获得,幼龄

SHR 大鼠是国际公认的 ADHD 动物模型,该模型在 10 周龄前不表现高血压特征,而表现出 ADHD 核心临床症状,被广泛应用于 ADHD 的研究,WKY 大鼠为其天然对照组^[17-18]。所有动物均饲养于河南中医药大学 SPF 级动物实验中心[SYXK(豫)2021-0015],自由饮水进食,温度 21~24℃,湿度 50%~60%。动物伦理申请经由河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(DWLL202202007),符合《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892-2018)、《关于善待实验动物的指导性意见》和《河南中医药大学实验动物伦理委员会章程》的相关规定。在实验中,我们严格遵循实验动物使用的 3R 原则,减少对动物的伤害并给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

黄芩苷(货号:A0016)购自成都曼斯特生物科技有限公司,保存于 4℃ 冰箱;丁苯那嗪(货号:GC13672)购自上海宏叶生物科技有限公司,保存于 -20℃ 冰箱;MPH(批号:11E648,分装批号:11E648C)购自河南中医药大学第一附属医院,生产于 Janssen-Cilag Manufacturing, LLC,西安杨森制药有限公司分装,规格为每片 18 mg,保存于 4℃ 冰箱。旷场实验设备:包含旷场实验箱、SMART V3.0 软件,购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司(型号:63041);水迷宫实验设备:包含 Morris 摄像系统、恒温水箱、SMART V3.0 软件,购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司(型号:63034)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物给药及分组

大鼠适应性饲养 5 d 后,进行给药。配药:根据给药量 150 mg/kg^[9],灌胃量 1 mL/100 g,配制黄芩苷溶液,冰箱 4℃ 保存;根据给药量 1.5 mg/kg^[19],灌胃量 1 mL/100 g,配制 MPH 溶液,每颗药(含 18 mg MPH)配 120 mL 纯水,冰箱 4℃ 保存;根据给药量 3 mg/kg^[20],注射量 0.5 mL/100 g,配制丁苯那嗪溶液,即配即用;灌胃前将药物溶液定量取出,水浴复温至 30℃ 后予大鼠灌胃。给药前称重,根据体重调整给药量,每天给药 1 次,时间固定于上午 8:00~12:00。灌胃前将药物溶液定量取出,水浴复温至 30℃ 后予大鼠灌胃,MPH 组(1.5 mg/kg)、黄芩苷组(150 mg/kg)按体重(1 mL/100 g)灌胃给药,空白组、模型组给等量生理盐水,MPH+丁苯那嗪组、黄芩苷+丁苯那嗪组在灌胃给药同时,按体重(0.5 mL/100 g)腹腔注射丁苯那嗪(3 mg/kg)。

1.3.2 旷场实验

在给药第 0、7、14、21、28 天进行旷场实验,使大鼠从中央区域进入旷场中,电脑持续稳定追踪大鼠轨迹,SMART V3.0 软件记录大鼠运动总距离及平均速度,每只大鼠每次旷场实验时间为 5 min,实验结束后将大鼠放回笼中,清理旷场后进行下一只。

1.3.3 Morris 水迷宫实验

在给药第 3 周进行为期 6 d 的 Morris 水迷宫实验,前 5 d 为隐匿站台实验,将水箱内注水,水面高出逃生平台约 1 cm;水面分为 4 个象限,按方位分别命名为西北象限、东北象限、东南象限、西南象限。逃生平台置于西南象限中央区域。将大鼠从四个象限依次放入水中,连续 5 d 入水象限的顺序采取半随机循环方式,避免固定入水顺序影响实验结果^[21];将大鼠依次从不同象限放入水中,当大鼠找到逃生平台并停留 10 s 后,停止信号追踪,若大鼠 120 s 内未找到逃生平台,将其引导至逃生平台并停留 15 s 后,进行下一次实验,结束后烘干放回笼中。实验第 6 天为空间探索实验,撤除逃生平台,将大鼠从东北象限放入水中,记录 120 s 内大鼠穿越平台次数和运动轨迹,实验进行两次求均值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件对实验数据进行统计学分析,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组定量数据的组间比较采用单因素方差分析,若等方差($P > 0.05$)则用 LSD 进行组间比较,若不等方差($P < 0.05$)则用 Dunnett T3 进行组间比较。组间比较结果中, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 旷场实验结果

2.1.1 旷场实验中大鼠运动总距离实验结果

实验第 0 天,空白组运动总距离显著小于各实验组($P < 0.05$)。实验第 7、14、21、28 天,MPH 组、黄芩苷组运动总距离较模型组显著减少($P < 0.05$),且这两组间无明显差异;MPH+丁苯那嗪组运动总距离较 MPH 组显著增加($P < 0.05$)。实验第 14、21 天,黄芩苷+丁苯那嗪组运动总距离较黄芩苷组显著增加($P < 0.05$)。实验第 28 天,黄芩苷+丁苯那嗪组运动总距离较模型组显著减少($P < 0.05$),较黄芩苷组显著增加($P < 0.05$)。见表 1,图 1。

表 1 旷场实验中每组大鼠运动总距离的比较结果($\bar{x}\pm s, m, n=6$)

Table 1 Comparison of total distance traveled by each group of rats in the open field experiment

组别 Groups	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21	第 28 天 Day 28
空白组 Normal control group	7.9±3.9	4.3±1.3	4.0±0.5	3.3±0.4	3.6±1.2
模型组 Model group	45.8±3.7 ^a	31.0±5.4 ^a	29.9±5.0 ^a	30.7±4.5 ^a	28.4±5.6 ^a
MPH 组 Methylphenidate hydrochloride group	44.2±2.5 ^a	19.7±5.5 ^{ab}	17.2±5.9 ^{ab}	16.2±3.0 ^{ab}	14.5±5.8 ^{ab}
黄芩苷组 Baicalin group	42.4±8.7 ^a	21.6±2.2 ^{ab}	17.8±5.8 ^{ab}	14.9±6.1 ^{ab}	12.3±5.4 ^{ab}
MPH+丁苯那嗪组 MPH+tetrabenazine group	46.1±4.5 ^a	33.6±5.9 ^{ac}	29.2±5.2 ^{ac}	30.4±4.1 ^{ac}	28.4±6.1 ^{ac}
黄芩苷+丁苯那嗪组 Baicalin+tetrabenazine group	45.1±5.6 ^a	28.2±6.7 ^a	26.5±6.7 ^{ad}	24.3±6.6 ^{ad}	20.2±6.1 ^{abde}
<i>F</i>	33.514	18.646	14.148	21.040	13.348
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较, ^a*P*<0.05;与模型组比较, ^b*P*<0.05;与 MPH 组比较, ^c*P*<0.05;与黄芩苷组比较, ^d*P*<0.05;与 MPH+丁苯那嗪组比较, ^e*P*<0.05。

Note. Compared with normal control group, ^a*P*<0.05. Compared with model group, ^b*P*<0.05. Compared with methylphenidate hydrochloride group, ^c*P*<0.05. Compared with baicalin group, ^d*P*<0.05. Compared with MPH+tetrabenazine group, ^e*P*<0.05.

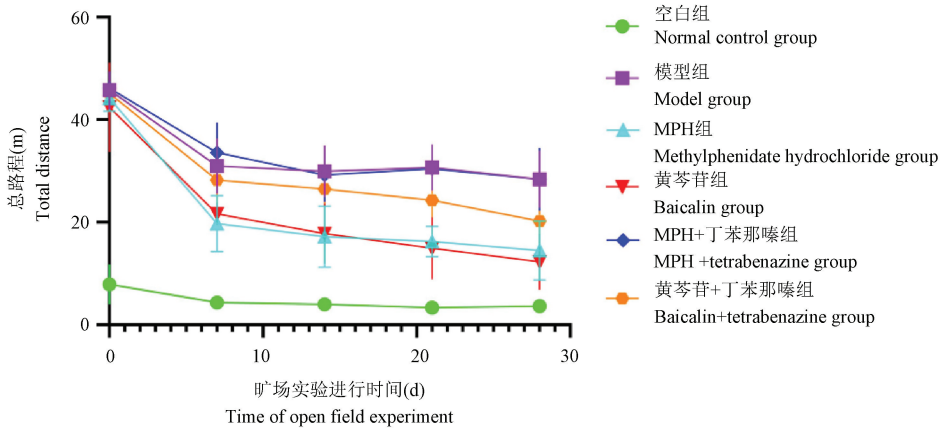


图 1 旷场实验每组大鼠运动总距离比较

Figure 1 Comparison of total distance traveled by each group of rats in the open field experiment

2.1.2 旷场实验中大鼠运动平均速度实验结果

实验第 0 天,空白组运动平均速度较各实验组显著降低(*P*<0.05)。实验第 7、14、21、28 天,黄芩苷组、MPH 组运动平均速度较模型组显著降低(*P*<0.05),且这两组间无明显差异。实验第 14、21、28 天,MPH+丁苯那嗪组运动平均速度较 MPH 组显著升高(*P*<0.05)。实验第 7、14、21、28 天,黄芩苷+丁苯那嗪组运动平均速度较模型组明显降低,较黄芩苷组明显升高。见表 2,图 2。

2.1.3 旷场实验轨迹

旷场实验轨迹中,空白组在中央区域进入旷场后立即进入周围区域运动,未进入中央区域,运动轨迹短。模型组进入旷场后运动轨迹遍布整个旷场,中央区域运动轨迹明显增加,运动轨迹长。

MPH 组在周围区域运动轨迹多,中央区域运动少,运动轨迹较模型组明显减少。黄芩苷组进入旷场后立即进入周围区域运动,未进入中央区域,运动轨迹较模型组明显减少;MPH+丁苯那嗪组在中央区域运动轨迹占比较 MPH 组增大,运动轨迹长;黄芩苷+丁苯那嗪组在中央区域运动轨迹较模型组减少,较黄芩苷组增加,如图 3。

旷场实验结果显示,在给药第 7、14、21、28 天,MPH 组和黄芩苷组运动总距离和平均速度较模型组显著降低(*P*<0.05),且这两组间无明显差异;在给药第 14、21、28 天,黄芩苷+丁苯那嗪组运动总距离较黄芩苷组显著增大(*P*<0.05),平均速度较黄芩苷组明显增大,运动总距离和平均速度较模型组明显减小。

表 2 旷场实验中每组大鼠运动平均运动速度比较($\bar{x}\pm s$,cm/s, $n=6$)

Table 2 Comparison of average movement speed of each group of rats in the open field experiment

组别 Groups	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21	第 28 天 Day 28
空白组 Normal control group	2.5±1.4	1.4±0.4	1.3±0.2	1.1±0.1	1.4±0.2
模型组 Model group	15.4±1.4 ^a	13.1±2.2 ^a	11.3±0.8 ^a	11.3±1.2 ^a	9.1±2.3 ^a
MPH 组 Methylphenidate hydrochloride group	14.9±0.8 ^a	7.8±3.2 ^{ab}	5.7±2.0 ^{ab}	6.7±0.7 ^{ab}	4.9±2.1 ^{ab}
黄芩苷组 Baicalin group	14.3±2.8 ^a	7.6±3.5 ^{ab}	6.7±2.8 ^{ab}	6.8±1.7 ^{ab}	4.4±2.4 ^{ab}
MPH+丁苯那嗪组 MPH+tetrabenazine group	15.5±1.4 ^a	11.2±2.0 ^a	10.1±1.8 ^{ac}	10.4±1.0 ^{ac}	9.5±2.0 ^{ac}
黄芩苷+丁苯那嗪组 Baicalin+tetrabenazine group	17.8±3.3 ^a	9.7±2.1 ^a	8.6±2.5 ^a	7.1±2.3 ^{abe}	6.9±1.9 ^a
<i>F</i>	28.536	10.745	13.795	28.469	9.860
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 MPH 组比较,^c $P<0.05$;与 MPH+丁苯那嗪组比较,^e $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with methylphenidate hydrochloride group, ^c $P<0.05$. Compared with MPH+tetrabenazine group, ^e $P<0.05$.

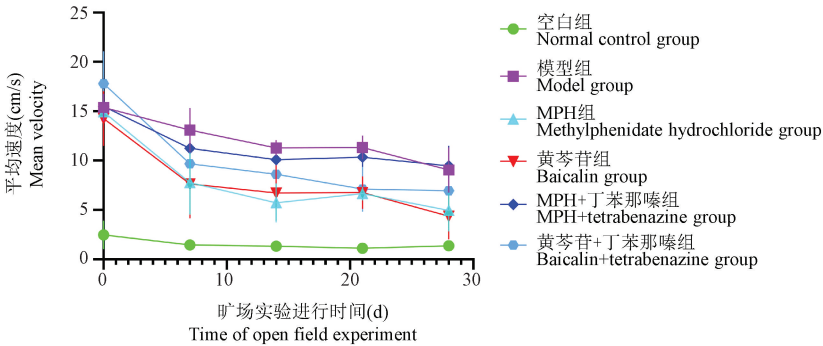


图 2 旷场实验每组大鼠运动平均速度比较

Figure 2 Comparison of average exercise speed of rats in each group in open field experiment

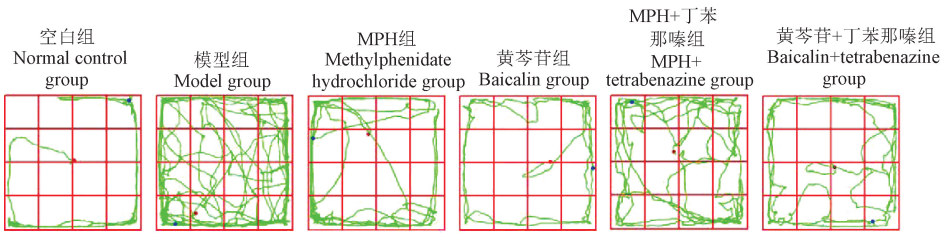


图 3 旷场实验中各组大鼠典型运动轨迹图

Figure 3 Typical movement trajectory plots of different groups of rats in the open field experiment

2.2 Morris 水迷宫实验结果

2.2.1 Morris 水迷宫空间隐匿站台实验中各组大鼠潜伏期实验结果

实验第 2~5 天,各实验组潜伏期较空白组显著缩短($P<0.05$)。实验第 1 天,黄芩苷组潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$);第 2~5 天,黄芩苷组、MPH 组潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$),这两

组在 2~4 d 组间无明显差异,在第 5 天黄芩苷组潜伏期较 MPH 组显著缩短($P<0.05$)。实验第 1~5 天,MPH+丁苯那嗪组潜伏期较 MPH 组显著延长($P<0.05$)。实验第 1、3、4、5 天,黄芩苷+丁苯那嗪组潜伏期较黄芩苷组显著延长($P<0.05$);第 4、5 天,黄芩苷+丁苯那嗪组潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$)。见表 3,图 4。

表 3 Morris 水迷宫隐匿站台实验每天各组大鼠潜伏期时间比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of latency periods of different groups of rats in the hidden platform experiment of the Morris water maze each day

组别 Groups	第 1 天 Day 1	第 2 天 Day 2	第 3 天 Day 3	第 4 天 Day 4	第 5 天 Day 5
空白组 Normal control group	38.3±9.8	41.3±3.9	38.9±4.7	47.9±8.0	28.8±4.1
模型组 Model group	27.6±3.0 ^a	20.6±6.4 ^a	26.5±5.1 ^a	25.4±4.1 ^a	22.6±6.2 ^a
MPH 组 Methylphenidate hydrochloride group	20.6±4.8 ^a	10.2±1.8 ^{ab}	12.6±6.4 ^{ab}	9.8±4.7 ^{ab}	13.7±1.6 ^{ab}
黄芩苷组 Baicalin group	14.8±3.2 ^{ab}	11.6±2.8 ^{ab}	14.9±3.6 ^{ab}	8.9±2.4 ^{ab}	9.3±3.6 ^{abc}
MPH+丁苯那嗪组 MPH+tetrabenazine group	33.2±9.0 ^c	16.5±3.7 ^{ac}	21.8±4.7 ^{ac}	19.0±4.0 ^{ac}	20.7±5.1 ^{ac}
黄芩苷+丁苯那嗪组 Baicalin+tetrabenazine group	27.4±7.8 ^{ad}	15.4±3.4 ^a	22.8±5.8 ^{ad}	16.8±2.7 ^{abd}	16.5±1.3 ^{abd}
<i>F</i>	6.122	33.834	13.277	37.522	11.725
<i>P</i>	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较, ^a*P*<0.05;与模型组比较, ^b*P*<0.05;与 MPH 组比较, ^c*P*<0.05;与黄芩苷组比较, ^d*P*<0.05。
Note. Compared with normal control group, ^a*P*<0.05. Compared with model group, ^b*P*<0.05. Compared with methylphenidate hydrochloride group, ^c*P*<0.05. Compared with baicalin group, ^d*P*<0.05.

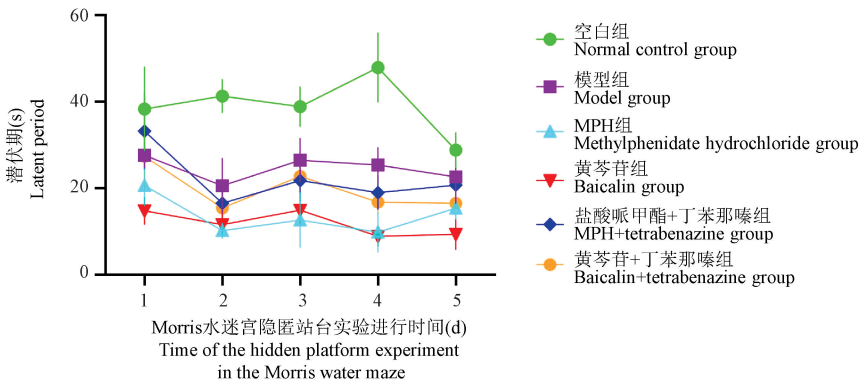


图 4 Morris 水迷宫隐匿站台实验各组大鼠潜伏期随时间的变化情况

Figure 4 Changes in the latency period of rats in different groups during the Morris water maze experiment over time

2.2.2 Morris 水迷宫空间探索实验中各组大鼠穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比实验结果

实验第 6 天,除 MPH+丁苯那嗪组外,各实验组穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较空白组显著增加(*P*<0.05);MPH 组、黄芩苷组穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组显著增加(*P*<0.05),且这两组间无明显差异;MPH+丁苯那嗪组穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较 MPH 组显著减少(*P*<0.05);黄芩苷+丁苯那嗪组在目标象限运动距离和停留时间占比较黄芩苷组显著降低(*P*<0.05),较模型组明显升高。见表 4。

2.2.3 Morris 水迷宫空间探索实验典型轨迹图

Morris 水迷宫空间探索轨迹图中,空白组运动轨迹较短,各象限运动轨迹分布均匀;模型组运动轨迹混乱,各象限平均分布;MPH 组、黄芩苷组在目标象限运动轨迹占比较模型组明显增大;MPH+丁苯那嗪组运动轨迹与模型组相当;黄芩苷+丁苯那嗪组在目标象限运动轨迹占比较模型组增加,较黄芩苷组减少。如图 5。

Morris 水迷宫实验结果显示,MPH 组、黄芩苷组潜伏期较模型组显著缩短(*P*<0.05),穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组显著升高(*P*<0.05),且这两组在实验 1~4 d 组间无明显差异,第 5 天黄芩苷组潜伏期较 MPH 组显著缩

表 4 Morris 水迷宫空间探索实验各组大鼠穿越平台次数、目标象限运动距离和停留时间占比 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Number of platform crossings, distance moved within the target quadrant and proportion of time spent in the target quadrant in the Morris water maze spatial exploration experiment for each group of rats

组别 Groups	穿越平台次数 Number of platform crossings	目标象限运动距离占比 (%) Proportion of movement distance within the target quadrant	目标象限停留时间占比 (%) Proportion of time spent within the target quadrant
空白组 Normal control group	0.8±0.6	16.3±4.7	15.7±4.1
模型组 Model group	2.0±0.4 ^a	25.1±1.8 ^a	25.6±5.6 ^a
MPH 组 Methylphenidate hydrochloride group	3.4±0.8 ^{ab}	38.5±7.2 ^{ab}	38.5±5.3 ^{ab}
黄芩苷组 Baicalin group	3.1±0.9 ^{ab}	34.1±1.4 ^{ab}	34.4±3.1 ^{ab}
MPH+丁苯那嗪组 MPH+tetrabenazine group	1.5±0.9 ^c	21.9±3.1 ^c	24.4±2.7 ^{ac}
黄芩苷+丁苯那嗪组 Baicalin+tetrabenazine group	2.5±0.6 ^a	27.7±3.4 ^{ad}	27.6±3.7 ^{ad}
F	7.825	15.558	14.313
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较, ^a $P<0.05$;与模型组比较, ^b $P<0.05$;与 MPH 组比较, ^c $P<0.05$;与黄芩苷组比较, ^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with methylphenidate hydrochloride group, ^c $P<0.05$. Compared with baicalin group, ^d $P<0.05$.

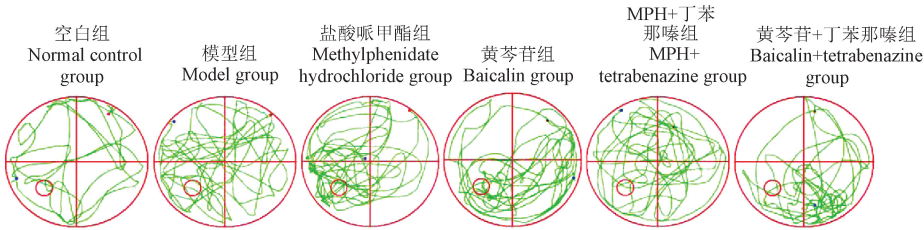


图 5 Morris 水迷宫空间探索实验中各组大鼠典型轨迹图

Figure 5 Typical trajectory plots of different groups of rats in the Morris water maze spatial exploration experiment

短($P<0.05$)。黄芩苷+丁苯那嗪组潜伏期在实验第 1、3、4、5 天,较黄芩苷组显著延长($P<0.05$),在实验第 4、5 天较模型组显著缩短($P<0.05$);黄芩苷+丁苯那嗪组在目标象限运动距离和停留时间占比相较于黄芩苷组显著降低($P<0.05$),相较于模型组明显升高。

3 讨论

脑内 DA 是由胺能神经吸收血液中酪氨酸,在酪氨酸羟化酶催化下形成左旋多巴,再由多巴脱羧化酶最终合成^[22]。合成后的 DA 主要在突触前膜经囊泡单胺转运体 II 型(VMAT2)转运进入突触小泡储存,从而避免 DA 被细胞质中单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)氧化降解失活,当动作电位到达神经末梢时,突触小泡与突触前膜融合,胞吐释放 DA^[23]。VMAT2 的正常表达对脑内 DA 的转运、释放以及维持脑内 DA 正常水平意义重大。课

题组前期研究发现,黄芩苷能够显著提高 VMAT2 蛋白及 RNA 表达水平,尤其对纹状体内 VMAT2 表达的影响最为直接^[12],但其具体的作用靶点尚不明确。这为本次探讨黄芩苷潜在作用靶点的研究奠定了基础。

旷场实验中大鼠的运动距离和平均速度反映大鼠的多动和冲动行为^[24]。Morris 水迷宫实验通过检测大鼠的学习记忆能力来评估大鼠注意力情况^[25-26]。本次实验研究显示,在给药前的旷场实验中,所有实验组运动总距离和平均速度较空白组显著升高,实验组各组间无明显差异,表明实验组大鼠与空白组对比,存在明显多动、冲动症状。在给药过程中的旷场实验中,MPH 组和黄芩苷组运动总距离和平均速度较模型组显著降低,且这两组间无明显差异,表明黄芩苷与 MPH 均能控制 SHR 大鼠多动、冲动症状,并且两种药物的疗效无明显差异。研究表明,MPH 通过与 DA 转运体(DAT)结合,抑

制 DAT 的生理功能,减少 DA 重摄取,增加脑内 DA 含量治疗 ADHD 核心症状^[27]。丁苯那嗪在本实验中作为 VMAT2 特异性阻断剂,能够可逆性抑制 VMAT2 表达^[28]。在旷场实验过程中,MPH+丁苯那嗪组大鼠运动总距离和平均速度较 MPH 组显著升高,与模型组对比无明显差异。这一实验结果我们推测,可能是丁苯那嗪阻断 VMAT2 对 DA 的转运和释放,DA 释放减少,导致 DAT 再摄取抑制过程中突触间隙 DA 含量降低,即使 MPH 发挥抑制作用也不能达到脑内 DA 水平的正常峰度,导致 MPH 疗效不佳,但其确切机制还需进一步研究。Morris 水迷宫隐匿站台实验中,MPH 组、黄芩苷组大鼠潜伏期较模型组显著缩短,穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组显著升高,且这两组间无明显差异。这一结果表明,MPH 与黄芩苷均能提高大鼠空间记忆和学习能力,改善大鼠注意力不集中,且两种药物疗效相当。

黄芩苷+丁苯那嗪组大鼠在旷场实验中运动总距离和平均速度较模型组显著降低,较黄芩苷组显著升高,在隐匿站台实验中的潜伏期较黄芩苷组显著延长,较模型组稍有缩短且两组之间的差异随实验时间的延长逐渐显著,在空间探索实验中穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组升高,较黄芩苷组显著降低。实验结果表明,黄芩苷作用于 VMAT2 控制 ADHD 核心症状,但其作用靶点并不单一,存在黄芩苷治疗 ADHD 的其他靶点,而这些靶点尚不明确,这也是课题组后期的研究方向。

本研究在前期研究基础上,应用 VMAT2 特异性抑制剂丁苯那嗪初步探索黄芩苷治疗 ADHD 的潜在疗效机制及作用靶点,但深入的机制分析尚未进行。实验尚存在不足之处,缺乏 VMAT2 的激动剂组,以便更加明确 VMAT2 的表达对大鼠 ADHD 症状的影响,我们将在后期实验中进行补充和探索。

参考文献:

- [1] Wolraich ML, Hagan JF Jr, Allan C, et al. Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents [J]. *Pediatrics*, 2019, 144(4): e20192528.
- [2] Sayal K, Prasad V, Daley D, et al. ADHD in children and young people: prevalence, care pathways, and service provision [J]. *Lancet Psychiatry*, 2018, 5(2): 175-186.
- [3] Miovský M, Lukavská K, Rubášová E, et al. Attention deficit hyperactivity disorder among clients diagnosed with a substance

use disorder in the therapeutic communities: prevalence and psychiatric comorbidity [J]. *Eur Addict Res*, 2021, 27(2): 87-96.

- [4] Drechsler R, Brem S, Brandeis D, et al. ADHD: current concepts and treatments in children and adolescents [J]. *Neuropediatrics*, 2020, 51(5): 315-335.
- [5] Young S, Cocallis KM. Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in the prison system [J]. *Curr Psychiatry Rep*, 2019, 21(6): 41.
- [6] 周荣易, 马丙祥, 韩新民, 等. 黄芩苷对注意缺陷多动障碍动物模型生长状态的影响及对 CaMK II, ERK1/2 的调控作用 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(6): 1220-1226.
- [7] Corona JC. Role of oxidative stress and neuroinflammation in attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(11): 1039.
- [8] 周荣易, 王娇娇, 韩新民, 等. 黄芩苷对自发性高血压大鼠突触体多巴胺释放相关因子表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5): 2007-2013.
- [9] Zhou R, Wang J, Han X, et al. Baicalin regulates the dopamine system to control the core symptoms of ADHD [J]. *Mol Brain*, 2019, 12(1): 11.
- [10] 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.
- [11] 周荣易, 王娇娇, 尤月, 等. 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 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(5): 576-582.
- [12] 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.
- [13] 张京钟, 余爽, 赵春礼, 等. II 型囊泡单胺转运体基因过表达对多巴胺含量影响的体外研究 [J]. *解剖学报*, 2004, 35(4): 344-349.
- [14] Lorenzo-Sanz G, Sánchez-Herranz A. Involvement of vesicular monoamine transporter in attention deficit hyperactivity disorder [J]. *Rev Neurol*, 2011, 52(1): S103-S108.
- [15] Toren P, Rehav M, Luski A, et al. Decreased platelet vesicular monoamine transporter density in children and adolescents with attention deficit/hyperactivity disorder [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2005, 15(2): 159-162.
- [16] Quansah E, Zetterström TSC. Chronic methylphenidate preferentially alters catecholamine protein targets in the parietal cortex and ventral striatum [J]. *Neurochem Int*, 2019, 124: 193-199.
- [17] Meneses A, Perez-Garcia G, Ponce-Lopez T, et al. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview [J]. *Rev Neurosci*, 2011, 22(3): 365-371.

(下转第 149 页)