

龙牡清心合剂对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞 cAMP/PKA-CREB 信号通路的影响

李雪军^{1,2}, 王淑敏³, 陈秀峰^{3*}, 刘安琪³, 姜之炎^{3*}, 张宏宇³

(1. 河南中医药大学第一附属医院儿科医院, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医药大学儿科医学院, 河南 郑州 450000; 3. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

摘要: 目的 探讨龙牡清心合剂对 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 损伤的 SH-SY5Y 细胞的神经保护作用。方法 以 6-OHDA 诱导 SH-SY5Y 细胞多巴胺 (DA) 能神经元损伤, 将细胞分为空白血清组、模型组、PKA 抑制剂 (H-89) 组、龙牡清心合剂中、高剂量组和龙牡清心合剂中、高剂量+H-89 组, 含药血清干预 24 h 后, 收集上清液及细胞, ELISA 法检测上清液 DA、cAMP 水平, Western blot 和 RT-qPCR 法检测细胞中多巴胺 D1 受体 (DRD1)、G 蛋白 α 亚基 ($G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha olf}$)、PKA、CREB、脑源性神经营养因子 (BDNF) 蛋白和 mRNA 相对表达。结果 与模型组比较, 龙牡清心合剂各剂量组和龙牡清心合剂各剂量+H-89 组细胞 DA、cAMP 水平升高 ($P<0.01$); 龙牡清心合剂各剂量组和高剂量+H-89 组细胞 DRD1、PKA、 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha olf}$ 、p-CREB、BDNF 及中剂量+H-89 组 PKA、 $G_{\alpha s}$ 、p-CREB 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 龙牡清心合剂各剂量组细胞 DRD1、PKA、 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha olf}$ 、CREB、BDNF mRNA 和各剂量+H-89 组细胞 DRD1、PKA、 $G_{\alpha s}$ mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 龙牡清心合剂可能通过激活 cAMP/PKA-CREB 信号通路上调 DA 水平, 发挥对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞的神经保护作用。

关键词: 龙牡清心合剂; SH-SY5Y 细胞; 神经递质; cAMP/PKA-CREB 信号通路; 6-OHDA

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-0790-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.011

Effects of Longmu Qingxin Mixture on cAMP/PKA-CREB signaling pathway in SH-SY5Y cells damaged by 6-hydroxydopamine

LI Xue-jun^{1,2}, WANG Shu-min³, CHEN Xiu-feng^{3*}, LIU An-qi³, JIANG Zhi-yan^{3*}, ZHANG Hong-yu³

(1. Pediatric Hospital of the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2. Pediatric School of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 3. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the neuroprotective effect of Longmu Qingxin Mixture on SH-SY5Y cells injured by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). **METHODS** SH-SY5Y cells dopaminergic (DA) neurons were injured by 6-OHDA, and divided into blank serum group, model group, PKA inhibitor (H-89) group, middle and high dose groups of Longmu Qingxin Mixture, and middle and high doses of Longmu Qingxin Mixture+H-89 group. After 24 hours of intervention with medicated serum, the supernatant and cells were collected, and the levels of DA and cAMP in the supernatant of each group were detected by ELISA. The relative expressions of dopamine D1 receptor (DRD1), G protein α subunit ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha olf}$), PKA, CREB, brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

收稿日期: 2025-02-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (82405474); 上海市 2023 年度“科技创新行动计划”医学创新研究专项项目 (23Y21920100); 上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划 (2021—2023 年) 项目 [ZY (2021-2023) -0206-01]; 上海市临床重点专科建设项目 (中医专业) (shslczdzk04102); 龙华医院科技创新项目 (KY22059)

作者简介: 李雪军 (1993—), 女, 博士, 主治医师, 从事中医儿科学、中药药理学研究。E-mail: 13837194674@163.com

* **通信作者:** 陈秀峰 (1991—), 女, 硕士, 主治医师, 从事中医儿科肺系、脾系、肝系疾病的研究。E-mail: chenxiufeng91@163.com
姜之炎 (1960—), 女, 主任医师, 博士生导师, 从事中医儿科肺系、脾系疾病的研究。E-mail: lhjzycm@163.com

protein and mRNA were detected by Western blot and RT-qPCR. **RESULTS** Compared with the model group, the levels of DA and cAMP of cells in each dose group of Longmu Qingxin Mixture and each dose of Longmu Qingxin Mixture +H-89 group increased ($P<0.01$). The protein expressions of DRD1, PKA, G α s, G α olf, p-CREB, BDNF in cells of Longmu Qingxin Mixture in each dose group and PKA, G α s, p-CREB in cells of high dose +H-89 group increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The mRNA expressions of DRD1, PKA, G α s, G α olf, CREB, BDNF in cells of Longmu Qingxin Mixture in each dose group and DRD1, PKA, G α s mRNA in cells of each dose +H-89 group increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** Longmu Qingxin Mixture may exert neuroprotective effects against 6-OHDA-induced damage in SH-SY5Y cells by upregulating DA level through activation of the cAMP/PKA-CREB signaling pathway.

KEY WORDS: Longmu Qingxin Mixture; SH-SY5Y cells; neurotransmitters; cAMP/PKA-CREB signaling pathway; 6-OHDA

注意缺陷多动障碍 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 是儿童期最常见的慢性神经发育障碍, 以多巴胺 (dopamine, DA)、去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 等儿茶酚胺类神经递质缺陷为核心病理机制, 是造成学龄儿童学习困难、执行功能障碍的主要原因^[1-2]。盐酸哌甲酯 (methylphenidate hydrochloride, MPH) 是 ADHD 的一线用药, 但患儿使用后可能会出现生长发育受限、食欲不振、睡眠障碍等不良反应^[3-4], 故寻找新的治疗药物是研究热点。环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) /蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) -cAMP 反应原件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 信号通路是介导 DA 合成、释放的经典途径^[5]。DA 与多巴胺 D1 受体 (dopamine D1 receptor, DRD1) 偶联, 通过 G 蛋白 G α s、G α olf 亚型可激活腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 催化 ATP 水解为 cAMP, 进而刺激 PKA 诱导 CREB 磷酸化和脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 转录, 从而参与神经元再生、神经递质传递及执行功能的调节, 是反馈性调节 DA 合成, 改善 ADHD 的潜在靶点^[6-7]。龙牡清心合剂传承于上海市非遗徐氏儿科流派, 具有运脾柔肝之功, 可升高前额叶和纹状体 DA 水平而降低 ADHD 模型大鼠的多动、冲动水平, 并提高学习记忆能力^[8], 但具体机制尚未完全阐明。本研究旨在探讨龙牡清心合剂是否通过调控 cAMP/PKA-CREB 途径调节 DA 合成从而实现神经保护、改善 ADHD 的目的, 以期为 ADHD 的治疗提供实验药理学依据。

1 材料

1.1 动物 50 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 6 周

龄, 体质量 (180 \pm 20) g, 购自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) 2021-0006], 并饲养于上海中医药大学动物实验中心屏障环境内 [实验动物使用许可证号 SYXK (沪) 2020-0009], 温度 (23 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 50%~60%, 12 h/12 h 光/暗循环, 自由获取水和食物。所有实验程序均按照中国国家实验动物卫生研究所指南和国际公认的实验动物使用和护理原则进行, 并经上海中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理号 PZSHUTCM2303210001)。

1.2 细胞 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞系 (货号 FH0156) 购自上海富衡生物科技有限公司, 已传至第 4 代。

1.3 药物 龙牡清心合剂 (批号 2206001, 沪药制字 Z05170218) 购自上海中医药大学附属龙华医院, 所有药材先用蒸馏水浸泡 1 h, 然后将煅龙骨、煅牡蛎、珍珠母、磁石以蒸馏水煎煮 2 次, 每次 2 h, 再加入黄芪、当归、钩藤、炙甘草、大枣、浮小麦、白芍、五味子、夜交藤、黄芩、黄柏, 煎煮 2 次后合并滤液, 最后采用旋转蒸发器将药液浓缩为 4.17 g/mL, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 备用。盐酸哌甲酯缓释片 (批号 1KE744) 购自西安杨森制药有限公司。

1.4 试剂 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA, 北京普西唐生物科技有限公司, 货号 H7003); PKA 抑制剂 (H-89)、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号 S1643、P0013C、P0012); DMEM 高糖培养基、特级胎牛血清、细胞冻存液 (上海富衡生物科技有限公司, 货号 FH-D01、FH100-900、FH7001); CCK-8 试剂 (上海瑟欧生物科技有限公司, 货号 MA0218); 人 DA、cAMP ELISA

试剂盒(上海博研生物科技有限公司,货号BY-JZF0030、BY-JZF0167);DRD1、BDNF、PKA抗体(英国Abcam公司,货号ab81296、ab108319、ab75991);p-CREB抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG(美国Cell Signaling Technology公司,货号9198S、7074P2);G α olf、GAPDH抗体(美国Affinity公司,货号DF4108、AF7021);G α s抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号10150-2-AP);12.5% SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号PG113);EZB法RNA提取试剂盒(美国EZBioscience公司,货号B0004DP);PrimeScript™ RT Reagent反转录试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ PCR试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,货号RR037A、RR420A]。

1.5 仪器 CO₂细胞培养箱、NanoDrop超微分光光度计、ABI-7500型实时荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司,编号149738-20760、AZY2124236、275050432);ECLIPSE TS100-F型倒置显微镜(日本Nikon公司,编号606306);酶标仪(美国伯腾仪器有限公司,编号LH127-15-07-MBY1);96孔板离心机、低速离心机(德国Eppendorf公司,编号5811FM378889、5811DH472122);Chemiscope 6300型凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,编号85004)。

2 方法

2.1 含药血清制备 大鼠适应喂养1周后,随机分为空白血清组、MPH含药血清组(4.22 mg/kg)和龙牡清心合剂低、中、高剂量含药血清组(5.28、10.56、21.12 mL/kg),每组10只,灌胃体积1 mL/100 g。空白血清组给予生理盐水,根据大鼠(4周龄)与儿童(9岁)的体表面积进行换算,以龙牡清心合剂等效剂量作为中剂量,0.5、2倍等效剂量为低、高剂量,每日2次,连续给药7 d。大鼠处死前12 h禁食不禁水,第7天灌胃1 h后采用舒泰® 50(50 mg/kg)麻醉,腹主动脉取血,室温静置1 h后,4 ℃、3 500 r/min离心10 min,取上清液置于无菌50 mL离心管中,56 ℃水浴灭活30 min,经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,封口,分装后于-80 ℃冰箱保存,备用。

2.2 细胞培养 将人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y置于完全培养基(DMEM高糖培养基+10%特级胎牛血清+1%青霉素链霉素混合液)中,在37 ℃、5% CO₂及饱和湿度培养箱中静置培养。细胞贴壁

生长,当细胞处于对数生长期时,用0.25%胰酶进行消化,制成单细胞悬液。

2.3 DA能神经元损伤模型建立 使用6-OHDA诱导DA神经元损伤^[9]。取对数生长期的SH-SY5Y细胞,以2×10⁴个/孔的密度接种于96孔板中,培养48 h后饥饿处理8~12 h。用0.2%维生素C稀释液将40 mmol/L 6-OHDA母液稀释成6个浓度梯度(40、30、20、10、5、2.5 mmol/L)。将细胞分为对照组(加维生素C稀释液,终浓度为0.002%) and不同浓度6-OHDA组(终浓度分别为400、300、200、100、50、25 μmol/L),每组6个复孔,分别诱导24、48 h后,于倒置显微镜下观察细胞形态。CCK-8法检测细胞活性,以评价造模是否成功,并筛选最佳6-OHDA浓度,即半数抑制浓度(IC₅₀)。实验重复3次。

2.4 细胞分组及给药

2.4.1 不同剂量龙牡清心合剂对6-OHDA损伤的SH-SY5Y细胞活力的影响 取处于对数生长期的SH-SY5Y细胞,以2×10⁴个/孔的密度接种于96孔板中,分为对照组(DMEM+1%双抗+10%胎牛血清+0.2%维生素C)、空白血清组(DMEM+1%双抗+10%空白血清+0.2%维生素C)、模型组(DMEM+1%双抗+10%空白血清+6-OHDA)、MPH组(DMEM+1%双抗+10% MPH含药血清+6-OHDA)和龙牡清心合剂低、中、高剂量组(DMEM+1%双抗+10%低、中、高剂量组含药血清+6-OHDA),干预24 h后检测细胞活力。

2.4.2 龙牡清心合剂调控cAMP/PKA-CREB信号通路对6-OHDA损伤的SH-SY5Y细胞的神经保护作用 将细胞分为空白血清组(DMEM+1%双抗+10%空白血清+0.2%维生素C)、模型组(DMEM+1%双抗+10%空白血清+6-OHDA)、H-89组(DMEM+1%双抗+10%空白血清+6-OHDA+H-89)、龙牡清心合剂中、高剂量组(DMEM+1%双抗+10%中、高剂量组含药血清+6-OHDA)、龙牡清心合剂中、高剂量+H-89组(DMEM+1%双抗+10%中、高剂量组含药血清+6-OHDA+H-89)。取处于对数生长期的SH-SY5Y细胞,以2×10⁵个/mL的密度接种于6孔板中,待细胞贴壁生长至60%左右时,采用无血清DMEM饥饿8~12 h,各组加入相应含药血清预处理2 h,随后加入相应药物及含药血清干预24 h,收集上清液及细胞,备用。

2.5 CCK-8法检测细胞相对活力 细胞按照“2.4”项下方法分组、造模及给药,每组6个复

孔。孵育 24 h 后每孔加入 CCK-8 检测液，37 °C 避光孵育 2 h，使用酶标仪在激发波长 450 nm 处检测各孔的吸光度 (A) 值，计算细胞相对活力。公式为细胞相对活力 = [(实验孔 A 值 - 背景孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 背景孔 A 值)] × 100%。

2.6 ELISA 法检测细胞培养上清液 DA、cAMP 水平 细胞按照“2.4”项下方法分组、造模及给药，每组 5 个复孔。孵育 24 h 后收集细胞上清液，根据 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清液中 DA、cAMP 水平，通过酶标仪检测 450 nm 波长处各孔 A 值，采用四参数 Logistic 曲线拟合 (4-p1)，创建标准曲线方程，通过 A 值计算各孔浓度。

2.7 Western blot 法检测细胞 cAMP/PKA-CERB 信号通路相关蛋白表达 细胞按照“2.4”项下方法分组、造模及给药，孵育 24 h 后收集各组细胞，充分裂解后收集裂解液和细胞碎片，离心，取上清，BCA 法测定总蛋白浓度。蛋白变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜后用无蛋白快速封闭液封

闭 30 min，加入相应一抗 4 °C 孵育过夜，TBST 洗膜后加入二抗，室温孵育 1 h，洗膜后滴加发光液，以 GAPDH 为内参，利用凝胶成像系统扫描并分析 DRD1、BDNF、PKA、p-CREB、Gαolf、Gαs 相对表达。实验重复 3 次。

2.8 RT-qPCR 法检测细胞 cAMP/PKA-CERB 信号通路相关 mRNA 表达 细胞按照“2.4”项下方法分组、造模及给药，孵育 24 h 后，根据 EZB 法说明书提取总 RNA，Nanodrop 超微分光光度计测定 RNA 浓度，并利用 PrimeScript™ RT Reagent 反转录试剂盒将得到的 RNA 反转录为 cDNA。根据 Primer Bank 公布的基因序列设计 qPCR 所需引物，引物序列见表 1。采用 TB Green® Premix Ex Taq™ PCR 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 分析，输出实验结果 C_T 值，以 GAPDH 为内参，采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 DRD1、Gαs、Gαolf、PKA、CREB、BDNF mRNA 相对表达。实验重复 5 次。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	正向序列(5'→3')	反向(5'→3')	产物长度/bp
DRD1	GGTGACCAACTTCTTTGTCATC	GGGGTCATCTTTCTCTCATAACC	103
Gαs	GATCCAGTGCCTCAACGATGTG	CAAGGACTTTCTCAGCGAGC	206
Gαolf	ACCAGGACCTCCTCAGATGC	AATGGTCCGTAACCACCTGTT	275
PKA	TCCTTCAAAGGACAACCTCAAAC	ATACTCAAAGGTCAGGACGATC	144
CREB	CTGATGGACAGCAGATCTTAGT	CTTCATTAGACGGACCTCTCTC	194
BDNF	GACACTTTCGAACACGTGATAG	TACAAGTCTCGCTCTTATTGT	89
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	110

2.9 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理，符合正态分布的数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，事后多重比较采用 LSD-t 检验。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DA 能神经元损伤模型建立 如图 1~2 所示，正常情况下，SH-SY5Y 细胞呈上皮样贴壁生长，

并有短触角延伸；6-OHDA 诱导后，细胞短触角消失，缩短变圆，且浓度越高，细胞损伤越严重。如表 2 所示，6-OHDA 诱导 24、48 h 后，随着 6-OHDA 浓度的增加，细胞活力呈下降趋势，其 IC₅₀ 值分别为 127.5、190.3 μmol/L。结合文献 [10] 报道，以 127.5 μmol/L 6-OHDA 诱导 24 h 作为此次造模条件。

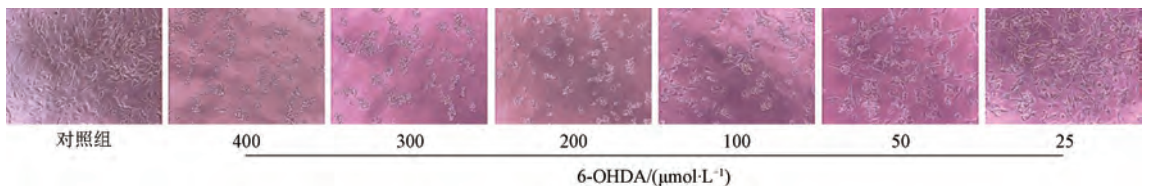


图 1 不同浓度 6-OHDA 诱导 24 h 对 SH-SY5Y 细胞形态的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of 6-OHDA induced for 24 h on the morphology of SH-SY5Y cells

3.2 不同含药血清对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 MPH、龙牡清心合剂含药血清对正常 SH-SY5Y 细

胞均无明显损伤作用 (P>0.05)，见图 3、表 3。

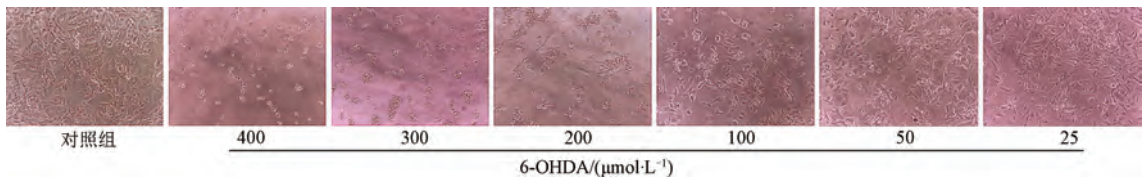


图2 不同浓度6-OHDA诱导48 h对SH-SY5Y细胞形态的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of 6-OHDA induced for 48 h on the morphology of SH-SY5Y cells

表2 不同浓度6-OHDA对SH-SY5Y细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 2 Effects of different concentrations of 6-OHDA on the viability of SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	诱导24 h 细胞相对活力/%	诱导48 h 细胞相对活力/%
对照组	—	100.00±0.00	100.00±0.00
6-OHDA组	400	15.85±3.35	6.11±2.14
6-OHDA组	300	19.09±4.60	14.68±3.61
6-OHDA组	200	20.23±3.28	42.69±7.20
6-OHDA组	100	55.81±11.37	95.68±12.42
6-OHDA组	50	107.45±19.70	117.72±15.16
6-OHDA组	25	126.55±19.93	145.76±14.97

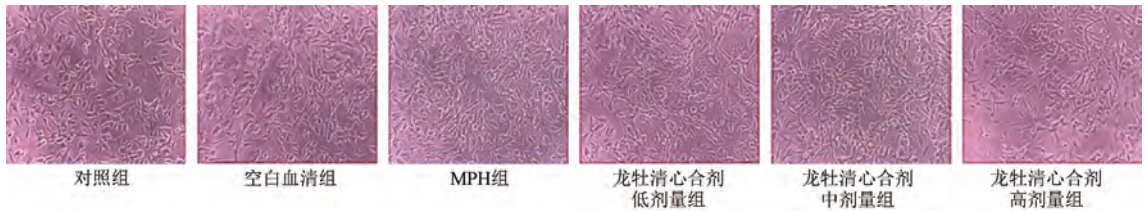


图3 不同含药血清对正常SH-SY5Y细胞形态的影响

Fig. 3 Effects of different drug-containing sera on the morphology of normal SH-SY5Y cells

表3 不同含药血清对正常SH-SY5Y细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 3 Effects of different drug-containing sera on the viability of normal SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	细胞相对活力/%
对照组	100.00±0.00
空白血清组	123.36±16.06
MPH组	131.65±10.08
龙牡清心合剂低剂量组	132.23±11.38
龙牡清心合剂中剂量组	132.88±7.30
龙牡清心合剂高剂量组	130.00±11.46

3.3 不同含药血清对6-OHDA损伤的SH-SY5Y细胞活力的影响 与空白血清组比较,模型组细胞活力降低 ($P < 0.01$),提示6-OHDA诱导了DA能神经元损伤;与模型组比较,龙牡清心合剂各剂量含药血清均能升高细胞活力 ($P < 0.01$),且高剂量组优于低剂量组 ($P < 0.01$);MPH组细胞活力高于模型组,但无显著变化 ($P > 0.05$),见图4、表4。结果提示,龙牡清心合剂能够逆转6-OHDA对SH-SY5Y细胞所造成的损伤,以高剂量组效果最为显著。根据以上结果,后续选择龙牡清心合剂中、高剂量含药血清进行通路验证实验。

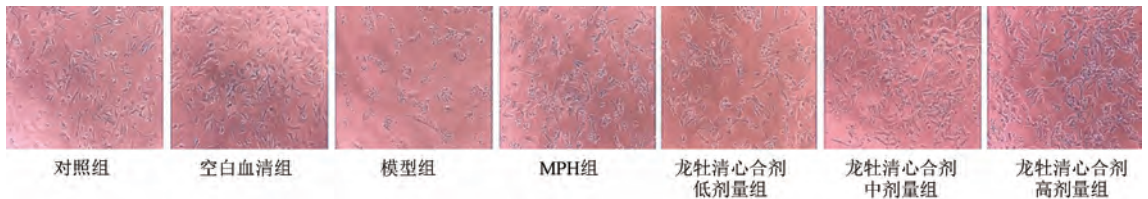


图4 不同浓度含药血清对6-OHDA损伤的SH-SY5Y细胞形态的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of drug-containing sera on the morphology of SH-SY5Y cells injured by 6-OHDA

3.4 龙牡清心合剂对6-OHDA损伤的SH-SY5Y细胞培养上清液DA、cAMP水平的影响 与空白血

清组比较,模型组DA、cAMP水平降低 ($P < 0.05$);与模型组、H-89组比较,龙牡清心合剂各

剂量组和各剂量+H-89组 DA、cAMP 水平均升高 ($P<0.01$), 见表 5。H-89 组效应与模型组相当, 提示 cAMP-PKA 通路被 H-89 所抑制。以上结果提示, 龙牡清心合剂能够激活 cAMP 而增加 DA 水平, 并解除 H-89 对 cAMP 通路的抑制作用。

3.5 龙牡清心合剂对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞 cAMP/PKA-CERB 信号通路相关蛋白表达的影响 与空白血清组比较, 模型组 DRD1、PKA、G α olf、p-CREB、BDNF 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), H-89 组 DRD1、PKA、G α olf、BDNF 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比较, 龙牡清心合剂各剂量组和高剂量+H-89 组 DRD1、PKA、G α s、G α olf、p-CREB、BDNF 蛋

表 5 龙牡清心合剂对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞上清液 DA、cAMP 水平的影响 (nmol/L, $\bar{x}\pm s$, $n_{DA}=6$, $n_{cAMP}=3$)
Tab.5 Effects of Longmu Qingxin Mixture on DA and cAMP levels in the supernatant of SH-SY5Y cells injured by 6-OHDA (nmol/L, $\bar{x}\pm s$, $n_{DA}=6$, $n_{cAMP}=3$)

组别	DA	cAMP
空白血清组	12.25±0.52	7.71±0.14
模型组	11.28±0.26**	7.18±0.90*
H-89 组	11.59±0.20	7.20±0.92*
龙牡清心合剂中剂量组	13.20±0.33###§§	8.00±0.26###§§
龙牡清心合剂高剂量组	13.33±0.80###§§	8.14±0.45###§§
龙牡清心合剂中剂量+H-89 组	13.07±0.65###§§	8.21±0.22###§§
龙牡清心合剂高剂量+H-89 组	12.82±0.57###§§	8.26±0.32###§§

注: 与空白血清组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ### $P<0.01$; 与 H-89 组比较, § $P<0.01$ 。

白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 中剂量+H-89 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 6、图 5。
组 PKA、G α s、p-CREB、BDNF 蛋白表达均升高

表 6 龙牡清心合剂对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞 DRD1、PKA、G α s、G α olf、p-CREB、BDNF 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab.6 Effects of Longmu Qingxin Mixture on the protein expressions of DRD1, PKA, G α s, G α olf, p-CREB and BDNF in SH-SY5Y cells injured by 6-OHDA ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	DRD1/GAPDH	PKA/GAPDH	G α s/GAPDH
空白血清组	1.00±0.32	0.97±0.05	0.72±0.16
模型组	0.39±0.11**	0.74±0.11**	0.62±0.09
H-89 组	0.25±0.21**	0.88±0.11*	0.62±0.11
龙牡清心合剂中剂量组	0.94±0.23###§§	1.26±0.09###§§	1.12±0.22###§§
龙牡清心合剂高剂量组	0.73±0.12#§§	1.28±0.17###§§	1.13±0.14###§§
龙牡清心合剂中剂量组+H-89 组	0.55±0.12\$▲▲	1.19±0.24###§§	1.13±0.16###§§
龙牡清心合剂高剂量组+H-89 组	0.64±0.29#§§▲	1.19±0.30###§§	1.12±0.21###§§
组别	G α olf/GAPDH	p-CREB/GAPDH	BDNF/GAPDH
空白血清组	1.03±0.10	0.92±0.13	0.87±0.14
模型组	0.56±0.06*	0.51±0.18*	0.14±0.39**
H-89 组	0.64±0.04*	0.66±0.04	0.31±0.23*
龙牡清心合剂中剂量组	1.07±0.31###§§	1.11±0.33###§§	1.11±0.37###§§
龙牡清心合剂高剂量组	0.98±0.27#	1.10±0.24###§§	1.21±0.40###§§
龙牡清心合剂中剂量组+H-89 组	0.89±0.20	0.91±0.17#	0.87±0.11###§§
龙牡清心合剂高剂量组+H-89 组	1.12±0.20###§§	0.86±0.07#	0.79±0.12###§§▲

注: 与空白血清组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ### $P<0.01$; 与 H-89 组比较, \$ $P<0.05$, § $P<0.01$; 与龙牡清心合剂高剂量组比较, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$ 。

表 4 不同浓度含药血清对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab.4 Effects of different concentrations of drug-containing sera on the viability of SH-SY5Y cells injured by 6-OHDA ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	细胞相对活力/%
对照组	100.00±0.00
空白血清组	106.41±8.43
模型组	65.91±6.35**
MPH 组	80.12±13.43
龙牡清心合剂低剂量组	107.50±14.11##
龙牡清心合剂中剂量组	120.68±13.90##
龙牡清心合剂高剂量组	130.44±16.85### $\Delta\Delta$

注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$; 与龙牡清心合剂低剂量组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

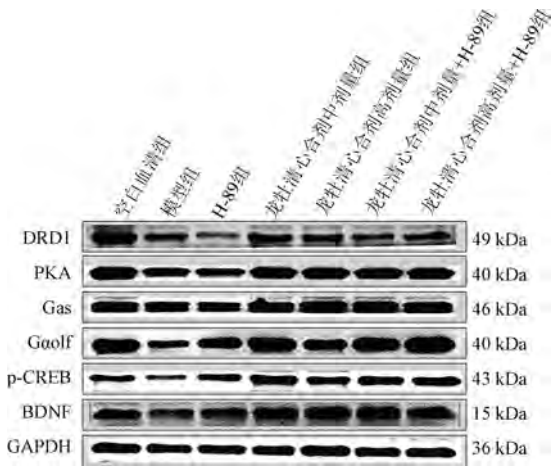


图5 各组细胞 DRD1、PKA、Gas、Gαolf、p-CREB、BDNF 蛋白条带图

Fig. 5 Protein bands of DRD1, PKA, Gas, Gαolf, p-CREB and BDNF in cells of each group

表7 龙牡清心合剂对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞 DRD1、PKA、Gas、Gαolf、CREB、BDNF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 7 Effects of Longmu Qingxin Mixture on the mRNA expressions of DRD1, PKA, Gas, Gαolf, CREB and BDNF in SH-SY5Y cells injured by 6-OHDA ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	DRD1 mRNA	PKA mRNA	Gas mRNA
空白血清组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	0.44±0.12*	0.45±0.04**	0.55±0.03**
H-89 组	0.47±0.10*	0.46±0.05**	0.55±0.05**
龙牡清心合剂中剂量组	1.09±0.48 ^{##} §§	0.70±0.10 ^{##} §§	1.18±0.05 ^{##} §§▲
龙牡清心合剂高剂量组	0.93±0.30 [#] §	0.61±0.09 ^{##} §§	1.26±0.09 ^{##} §§
龙牡清心合剂中剂量组+H-89 组	1.07±0.53 ^{##} §	0.76±0.05 ^{##} §§	0.97±0.05 ^{##} §§@▲▲
龙牡清心合剂高剂量组+H-89 组	0.96±0.47 [#] §	0.71±0.08 ^{##} §§	0.99±0.05 ^{##} §§@▲▲
组别	Gαolf mRNA	CREB mRNA	BDNF mRNA
空白血清组	1.00±0.01	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	1.21±0.26	0.62±0.19**	0.44±0.08**
H-89 组	1.32±0.40	0.70±0.04**	0.46±0.07**
龙牡清心合剂中剂量组	3.00±0.64 ^{##} §§	0.91±0.13 ^{##} §	0.82±0.23 ^{##} §§
龙牡清心合剂高剂量组	2.63±0.25 ^{##} §§	0.92±0.23 ^{##} §	0.83±0.18 ^{##} §§
龙牡清心合剂中剂量组+H-89 组	2.26±0.51 ^{##} §§@	0.72±0.06 [@] ▲	0.73±0.36 [#] §
龙牡清心合剂高剂量组+H-89 组	1.72±0.44 [@] ▲▲	0.73±0.10 [@] ▲	0.71±0.19 [#]

注：与空白血清组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与 H-89 组比较，[§] $P<0.05$ ，^{§§} $P<0.01$ ；与龙牡清心合剂中剂量组比较，[@] $P<0.05$ ；与龙牡清心合剂高剂量组比较，[▲] $P<0.05$ ，^{▲▲} $P<0.01$ 。

心总结为脾失健运，肝阳偏亢，“脾意不藏”“肝魂妄动”而见多动诸症，强调调脾柔肝论治大法，龙牡清心合剂疗效显著^[14]。前期发现，该方可显著改善 ADHD 患儿临床核心症状以及脾虚肝旺主症^[15-16]。药理实验发现该方可升高模型大鼠前额叶和纹状体 DA 含量而减缓多动、冲动水平并提高长期学习和记忆水平^[8]。

本研究发现，6-OHDA 可诱导 SH-SY5Y 细胞 DA 能神经元损伤，龙牡清心合剂能够改善 6-OHDA 所导致的 SH-SY5Y 细胞损伤和 DA 低水平状态。SH-SY5Y 细胞具有合成 DA 和 NE 的能力，是研究 DA 能神经元特性的代表性细胞^[17]。Xu 等^[18]研究发现，经 6-OHDA 处理的 SH-SY5Y 细

胞 cAMP/PKA-CREB 信号通路相关 mRNA 表达的影响 与空白血清组比较，模型组、H-89 组 DRD1、PKA、Gas、CREB、BDNF mRNA 表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组、H-89 组比较，龙牡清心合剂各剂量组和各剂量+H-89 组 DRD1、PKA、Gas、BDNF mRNA 表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，龙牡清心合剂各剂量组 CREB mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，龙牡清心合剂各剂量组和中剂量+H-89 组 Gαolf mRNA 升高 ($P<0.01$)，见表 7。

4 讨论

ADHD 可共患智力残疾、情绪障碍、睡眠障碍、抽动障碍等，甚至增加自杀和犯罪风险^[11-13]，属中医学“躁动”“脏躁”等范畴，多由脏腑失调，阴阳失衡所致。徐氏儿科将 ADHD 的病机核

胞，其活力下降，线粒体功能障碍，是神经代谢疾病发生发展的重要因素。

cAMP/PKA-CREB 通路参与了 SH-SY5Y 细胞损伤及 DA 能神经元凋亡^[19-20]，恢复该通路对神经元的保护作用已成为治疗 ADHD 的重要途径。cAMP/PKA-CREB 失调所致的神经递质缺陷、氧化应激、能量代谢障碍、神经炎症等病理变化与 ADHD 脾失健运，无以充养先天，脑髓失养，肝阳相对偏亢等病机存在密切联系^[21]。本研究表明，6-OHDA 与 H-89 下调了 cAMP/PKA-CREB 通路相关蛋白和 mRNA 表达，H-89 作为 cAMP/PKA-CREB 通路的抑制剂，可抑制下游级联反应而无法产生相应的药理活性，龙牡清心合剂则能够逆转

6-OHDA 诱导的 cAMP/PKA-CREB 信号通路的失活状态,并解除了 H-89 对该通路的抑制作用,进一步证明了龙牡清心合剂改善 ADHD 与促进 DA 的合成有关,而 cAMP/PKA-CREB 通路的激活是促进 DA 合成的关键途径。龙牡清心合剂与龙牡清心合剂+抑制剂组效应比较,整体差异不显著,尤其 DA、cAMP 水平无明显变化,可能是因为龙牡清心合联合 H-89 后,其药理效应被部分抵消;而中、高剂量组间疗效差异不显著,提示中剂量接近最大效应阈值或存在其他补偿性调节机制。以上结果表明,龙牡清心合剂的核心作用机制依赖 cAMP/PKA-CREB 通路的激活,且其疗效存在剂量饱和效应,对该方的量-时-效的研究尚需进一步探讨。

综上所述,龙牡清心合剂可促进 DA 合成而改善 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞 DA 能神经元损伤,cAMP/PKA-CREB 通路的激活可能是介导该效应的关键分子机制,可能为 ADHD 的治疗提供新思路、新方向。

参考文献:

[1] Willcutt E G, Doyle A E, Nigg J T, et al. Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review[J]. *Biol Psychiatry*, 2005, 57(11): 1336-1346.

[2] Del Campo N, Chamberlain S R, Sahakian B J, et al. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder[J]. *Biol Psychiatry*, 2011, 69(12): e145-e157.

[3] Pozzi M, Carnovale C, Peeters G G A M, et al. Adverse drug events related to mood and emotion in paediatric patients treated for ADHD: a meta-analysis[J]. *J Affect Disord*, 2018, 238: 161-178.

[4] Clavenna A, Bonati M. Pediatric pharmacoepidemiology—safety and effectiveness of medicines for ADHD[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16(12): 1335-1345.

[5] Nishi A, Kuroiwa M, Miller D B, et al. Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(42): 10460-10471.

[6] Sun J C, Han X M, Ren X G, et al. Saikosaponin A alleviates symptoms of attention deficit hyperactivity disorder through downregulation of DAT and enhancing BDNF expression in spontaneous hypertensive rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 2695903.

[7] Wang H, Xu J, Lazarovici P, et al. cAMP response element-binding protein (CREB): a possible signaling molecule link in the pathophysiology of schizophrenia[J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 255.

[8] Li X, Xiao Z, Pu W, et al. Network pharmacology, molecular

docking, and experimental validation to explore the potential mechanism of Long Mu Qing Xin Mixture for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1144907.

[9] Titz-de-Almeida R, Titz-de-Almeida S S, Ferreira N R, et al. Suppressing nNOS enzyme by small-interfering RNAs protects SH-SY5Y cells and nigral dopaminergic neurons from 6-OHDA injury[J]. *Neurotox Res*, 2019, 36(1): 117-131.

[10] Rehfeldt S C H, Silva J, Alves C, et al. Neuroprotective effect of luteolin-7-O-glucoside against 6-OHDA-induced damage in undifferentiated and RA-differentiated SH-SY5Y cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 2914.

[11] Kim J H, Kim J Y, Lee J, et al. Environmental risk factors, protective factors, and peripheral biomarkers for ADHD: an umbrella review[J]. *Lancet Psychiatry*, 2020, 7(11): 955-970.

[12] Naguy A. Psychopharmacotherapy of attention deficit-hyperactivity disorder in children with comorbid conditions[J]. *Pediatr Neurol*, 2018, 82: 7-12.

[13] Liu T L, Hsiao R C, Chou W J, et al. Self-reported depressive symptoms and suicidality in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: roles of bullying involvement, frustration intolerance, and hostility[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(15): 7829.

[14] 李雪军,姜之炎,王淑敏,等.徐氏儿科“运脾柔肝”法治儿童注意缺陷多动障碍[J].*中华中医药杂志*, 2023, 38(5): 2154-2158.

[15] 陈秀峰,肖臻.龙牡清心合剂治疗儿童注意力缺陷多动障碍的临床疗效研究[J].*中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(10): 1366-1368; 1381.

[16] 张超群,姜之炎.龙牡清心合剂治疗儿童注意力缺陷多动障碍(心脾两虚肝旺型)临床观察[J].*辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(11): 104-107.

[17] Xie H R, Hu L S, Li G Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(8): 1086-1092.

[18] Xu Z, Yang D, Huang X, et al. Astragaloside IV protects 6-hydroxydopamine-induced SH-SY5Y cell model of Parkinson's disease via activating the JAK2/STAT3 pathway[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 631501.

[19] Zhong J, Yu H, Huang C, et al. Inhibition of phosphodiesterase 4 by FCPR16 protects SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced decline of mitochondrial membrane potential and oxidative stress[J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 47-58.

[20] Zhu G, Fang Y, Cui X, et al. Magnolol upregulates CHRM1 to attenuate amyloid- β -triggered neuronal injury through regulating the cAMP/PKA/CREB pathway[J]. *J Nat Med*, 2022, 76(1): 188-199.

[21] 倪新强,胥丹桂,杨萌,等.基于“阴静阳躁”理论探讨补肾填髓中药调控注意缺陷多动障碍“皮质成熟延迟”新模式[J].*中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(1): 184-190.