·临床研究·

龙牡宁心方治疗注意缺陷多动障碍的疗效与机制探讨

丁乐乐[1,2],姜永红[1*],任晓丹[1,2],汪淑琴[1]

(1 上海中医药大学附属龙华医院儿科,上海 200032;2 上海中医药大学龙华临床医学院,上海 200032)

[摘要] **目的:**探讨龙牡宁心方治疗儿童注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder,ADHD)的临床疗效,并结合动物实验与蛋白质组学探究其潜在作用机制。**方法:**将80例ADHD患儿随机分为西药组和中药组各40例,西药组给予盐酸哌甲酯缓释片,中药组给予龙牡宁心方,治疗持续12周,比较两组患儿治疗前后SNAP-IV评定量表(父母版)、Weiss功能缺陷量表(父母版)、Conners儿童行为量表(父母版)评分与中医证候积分,并进行安全性评价。采用ADHD的经典模型自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat,SHR)进行动物实验,将18只4周龄雄性SHR随机分为模型组、中药组、西药组,6只Wistar-Kyoto大鼠作为对照组;中药组给予38.00 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$龙牡宁心方,西药组给予4.22 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$盐酸哌甲酯,对照组与模型组灌胃等量生理盐水,连续4周,行为学测试评估大鼠行为表现,实验结束后取前额叶组织进行定量蛋白质组学分析,并进行Western Blot分析验证差异表达蛋白。**结果:**治疗后,中药组的SNAP-IV评定量表、Weiss功能缺陷量表、Conners儿童行为量表评分、中医主症与次症积分均较治疗前显著下降(P均<0.001);中药组的Weiss功能缺陷量表、Conners儿童行为量表评分、中医证候积分改善程度均大于西药组(P均<0.05);所有患儿在治疗期间均未出现与研究药物相关的严重不良反应。龙牡宁心方显著改善了SHR的多动冲动与空间学习记忆缺陷(P均<0.05)。模型组与中药组之间的前额叶蛋白质组学共鉴定到273种差异表达蛋白质,主要涉及NOD样受体信号通路、FoxO信号通路、肠道免疫网络与IgA合成等7条途径。Western Blot结果显示龙牡宁心方逆转了SHR前额叶中上调的Ripk2、Tab1与IL-6。**结论:**龙牡宁心方治疗儿童ADHD疗效较好,且安全性较高,其作用机制可能为调控前额叶Ripk2、Tab1、IL-6表达抑制NOD样受体信号通路介导的神经炎症。

[关键词] 龙牡宁心方;注意缺陷多动障碍;临床研究;定量蛋白质组学

[中图分类号] R971 [文献标志码] A [文章编号] 1003-3734(2026)17-1854-12

Exploration of the efficacy and mechanism of Longmu Ningxin Formula for attention deficit hyperactivity disorder

DING Le-le[1,2], JIANG Yong-hong[1*], REN Xiao-dan[1,2], WANG Shu-qin[1]

(1 *Pediatrics, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai* 200032, *China*; 2 *Longhua Clinical Medical College, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai* 200032, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the clinical efficacy of Longmu Ningxin Formula (LMNXF) in treating children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and to explore its potential mechanism of action

[基金项目] 上海市卫生健康委员会科研项目计划(202240158);上海中医药大学附属龙华医院科技创新基础研究项目(CX202514);上海市科学技术委员会"科技创新行动计划"医学创新研究专项项目(23Y21920100);2025年度上海市自然科学基金项目(25ZR1402487);上海中医药大学科技发展项目(24KFL054)

[作者简介] 丁乐乐,男,博士研究生,主要从事中医药防治儿童肺病与脑病研究。E-mail:dingle1314@126.com。

[通讯作者] *姜永红,女,博士生导师,主任医师,主要从事中医药防治儿童肺病与脑病研究。E-mail:jyh203225@126.com。

[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.17.010

through animal experiments and proteomics. **Methods**: A total of 80 children with ADHD were randomly divided into a western medicine group ($n=40$) and a Chinese medicine group ($n=40$). The western medicine group was treated with methylphenidate hydrochloride extended-release tablets (MPH), while the Chinese medicine group received LMNXF. The treatment lasted for 12 weeks. The scores of the Swanson, Nolan, and Pelham-Ⅳ Rating Scale (SNAP-Ⅳ, parent version), the Weiss Functional Impairment Rating Scale (WFIRS, parent version), the Conners' Parent Rating Scale (CPRS), and the Chinese medicine syndrome scores were compared between the two groups before and after treatment. Safety was also evaluated. For the animal experiment, the spontaneously hypertensive rat (SHR), a classic ADHD model, was used. A total of 18 4-week-old male SHRs were randomly divided into a model group, a Chinese medicine group, and a western medicine group. A total of 6 Wistar-Kyoto rats served as the control group. The Chinese medicine group received LMNXF at 38.00 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$, the western medicine group received MPH at 4.22 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$, and the control and model groups were administered an equal volume of saline by gavage. Treatment lasted for 4 weeks. Behavioral tests were conducted to assess the rats' performance. After the experiment, prefrontal cortex tissues were collected for quantitative proteomic analysis, and Western Blot analysis was performed to validate differentially expressed proteins. **Results**: After treatment, the scores of the SNAP-Ⅳ, WFIRS, CPRS, and the primary and secondary Chinese medicine syndrome scores in the Chinese medicine group were significantly decreased compared to those before treatment (all $P<0.001$). The improvements in the WFIRS and CPRS scores and the Chinese medicine syndrome scores in the Chinese medicine group were greater than those in the western medicine group (all $P<0.05$). No serious adverse reactions related to the study drugs were observed in any child during the treatment period. LMNXF significantly ameliorated hyperactivity/impulsivity and spatial learning/memory deficits in SHRs (all $P<0.05$). Proteomic analysis of the prefrontal cortex identified 273 differentially expressed proteins between the model group and the Chinese medicine group. These proteins were primarily involved in seven pathways, including the NOD-like receptor signaling pathway, FoxO signaling pathway, and intestinal immune network for IgA production. Western Blot results showed that LMNXF reversed the upregulation of Ripk2, Tab1, and IL-6 in the prefrontal cortex of SHRs. **Conclusion**: LMNXF demonstrates favorable efficacy and a high safety profile in treating children with ADHD. Its mechanism of action may involve modulating Ripk2, Tab1, and IL-6 expression in the prefrontal cortex, thereby inhibiting NOD-like receptor signaling pathway-mediated neuroinflammation.

[**Key words**] Longmu Ningxin Formula; attention deficit hyperactivity disorder; clinical research; quantitative proteomics

注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)是儿童期最常见、最持久的神经发育障碍,以注意力不集中、多动和冲动为特征。ADHD 的估计患病率约 5.0% ~7.1%[1],且男孩发病率高于女孩[2]。80% 的患儿同时伴有一种或多种其他共患病,如智力障碍、情绪障碍、睡眠障碍等[3]。这些共病会持续终生,对个人发展与社会稳定造成严重影响,也给家庭和国家经济带来沉重负担。目前,非药物治疗缺乏循证医学的充分支持[4-5],ADHD 患儿大多采取盐酸哌甲酯或去甲肾上腺素来改善执行功能缺陷[6]。然而,ADHD 伴随着焦虑、抑郁、食欲减退、睡眠障碍等不良反应,对身高发育也可能有一定限制[7]。因此,开发新型、安全且有效的疗法以满足紧迫的临床需求至关重要。

课题组负责人根据徐氏儿科学术思想,认为本病病机主要为"肾阴不足,心阳偏旺",以中医经典名方天王补心丹为基础方进行加减,拟龙牡宁心方,临床应用疗效确切,并已获得国家发明专利授权(专利号:ZL202410812364.3)。文献研究发现[8],与执行功能紧密关联的前额叶皮层发育落后、功能异常是 ADHD 的关键病因。为了进一步探究龙牡宁心方对 ADHD 疗效的潜在机制,本研究拟在评价龙牡宁心方疗效的基础上,采用大鼠前额叶组织的数据非依赖性采集(data-independent acquisition, DIA)定量蛋白质组学分析龙牡宁心方改善 ADHD 行为表现的潜在作用机制。

资料与方法

1 临床研究

1.1 一般资料

共纳入 80 例 ADHD 患儿(2024 年 6 月—2025 年 6 月至上海中医药大学附属龙华医院儿科门诊就诊),随机分为中药组和西药组各 40 例。中药组患儿平均年龄(8.99 ± 1.79)岁,男孩 34 例、女孩 6 例;西药组患儿平均年龄(9.35 ± 2.05)岁,男孩 35 例、女孩 5 例;两组一般资料对比 $P > 0.05$,具有可比性。本研究方案通过医院伦理委员会审核并完成了临床试验注册(伦理批件号:2022LCSY018,注册号:ChiCTR2200061786)。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 参照美国精神医学学会《精神障碍诊断和统计手册》第 5 版中儿童 ADHD 诊断标准[9]。轻度:存在非常少的超出诊断所需的症状,且症状导致社交或职业功能方面的轻微损伤;中度:症状或功能损害介于“轻度”和“重度”之间;重度:存在较多超出诊断所需的症状,或存在若干特别严重的症状,或症状导致明显的社交或职业功能方面的损害。

1.2.2 中医证候标准 中医辨证标准参照《中医儿科临床指南》2019 年版制定[10],肾阴不足,心阳偏旺:注意力不集中,神思涣散,多语多动,冲动任性,记忆力差,作业拖拉,学习成绩落后,胆小易惧,或自汗盗汗,入睡困难,或夜寐遗尿,大便干结,舌质红,苔薄白或薄黄,脉细数。

1.3 纳入标准

年龄 6 ~ 14 岁,男女不限;确诊为中度 ADHD 患儿,中医辨证为肾阴不足,心阳偏旺型;进入临床研究前 2 周未服用其他 ADHD 相关的中西药物治疗;近 3 个月未参与其他临床研究者;患儿及家长知情同意,能够接受所规定的治疗方案(服药时间、就诊频率等)。

1.4 排除标准

合并有其他系统的器质性疾病患儿;对试验药物过敏者;无人监护或不能按照医嘱服药者;患有严重胃肠道狭窄的患者(病理性或医源性)、吞咽困难或吞咽药片有明显困难的患者。

1.5 剔除标准

不遵守试验方案,未按规定服药者;失访者;因个人原因需撤销知情同意者。

1.6 脱落标准

依从性差,不能按照试验方案完成者;治疗期间发生严重不良反应者。

1.7 治疗方法

中药组:中药龙牡宁心方(熟地黄 9 g、龟板 9 g、生龙骨 15 g、生牡蛎 15 g、天冬 9 g、麦冬 9 g、石菖蒲 9 g、制远志 9 g、磁石 15 g、茯神 9 g、五味子 6 g、淮小麦 15 g、山药 15 g、当归 9 g、益智仁 9 g),由上海中医药大学附属龙华医院制剂室提供中药配方颗粒,每日 1 付,分 2 次餐后温水冲服。西药组:阳性对照药盐酸哌甲酯缓释片(西安杨森制药有限公司,批号:HJ20170262,18 mg·片$^{-1}$),18 mg,*qd*,晨服。连续服用 12 周。

1.8 有效性评价指标

1.8.1 SNAP-IV 评定量表(父母版) 对患儿的注意缺陷、多动冲动、对立性进行评分,0 分为从不或者很少,1 分为有时(每周 1 次),2 分为经常(每周 3 ~ 4 次),3 分为非常常见(每天)。

1.8.2 Weiss 功能缺陷量表(父母版) 对患儿的家庭、学习或学校、生活技能、自我管理、社会活动、冒险活动进行评分,0 分为从不,1 分为有时候,2 分为经常,3 分为总是或频繁。

1.8.3 Conners 儿童行为量表(父母版) 对患儿的品行行为、学习问题、心身障碍、冲动多动、焦虑、多动指数 6 个维度的 48 个症状进行打分,0 分为无,1 分为稍有,2 分为较多,3 分为很多。

1.8.4 中医证候积分 主症积分:对患儿的神思涣散、多动不宁、多言多语、冲动任性、胆小易惧、记忆力欠佳、学习困难进行打分。次症积分:对患儿的自汗盗汗、食欲、睡眠、大便、小便进行打分。见表 1 与表 2。

表 1 主症评分标准

项目	0 分	3 分	6 分	9 分
神思涣散	无	上课或写作业坚持不到 30 min	上课或写作业坚持不到 20 min	上课或写作业坚持不到 15 min
多动不宁	无	偶有,可自控	不能自控	打扰其他儿童
多言多语	无	话语较多	学习时或在家中话多	言语很多,经常打断别人讲话

续表 1

项目	0 分	3 分	6 分	9 分
冲动任性	无	偶有	小事就易冲动	做什么都易冲动任性
胆小易惧	无	偶有	经常有	总是
记忆力欠佳	记忆力好	记东西慢	经常忘事	总是忘事,丢三落四
学习困难	无	成绩中下等	成绩下等	成绩倒数

表 2 次症评分标准

项目	0 分	2 分	4 分	6 分
自汗盗汗	无	偶有出汗	出汗较多	大汗淋漓
食欲	正常	食量减少 1/3	食量减少 1/2	食量减少 2/3
睡眠	正常	入睡慢,>30 min	入睡难,>50 min,多梦	入睡很难,>1 h,噩梦纷纭
小便	正常	偶有遗尿,<2 次·个月$^{-1}$	经常遗尿,<2 次·周$^{-1}$	总是遗尿,>3 次·周$^{-1}$
大便	正常	大便偏干	干结难下	数日一行

1.9 安全性评价

安全性指标包括生命体征、睡眠情况、情绪问题、心电图、肝肾功能与体格检查。

2 动物研究

2.1 动物

SPF 级雄性自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat,SHR)18 只,Wistar-Kyoto 大鼠(WKY)6 只,4 周龄,体重(78.4 ± 2.1) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2021-0006],所有大鼠均在标准条件下饲养,温度(22 ± 2) ℃,湿度 50% ~60%,12 h 光暗循环,自由进食与饮水。本研究方案通过实验动物伦理委员会审批(批号:LL-2025-299)。

2.2 药物与试剂

龙牡宁心方由上海中医药大学附属龙华医院制剂室制备提供中药配方颗粒;盐酸哌甲酯缓释片(西安杨森制药有限公司,批号:HJ20170262,18 mg·片$^{-1}$);Ripk2、Tab1 抗体(Proteintech 公司,批号:15366-1-AP、67020-1-lg);白介素-6(IL-6)抗体(Abmart 公司,批号:TD6087);GAPDH 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:GB15004-100);Zoletil® 50(法国 Virbac 公司,批号:9KWKA)。

2.3 分组与给药

6 只 WKY 大鼠作为对照组,将 18 只 SHR 大鼠随机分为模型组、中药组和西药组各 6 只。给药剂量根据 9 岁儿童体表面积与 4 周龄 SHR 幼鼠体表面积平行换算[11];中药组予龙牡宁心方 38.00 g·kg^{-1}·d^{-1},西药组予阳性对照药盐酸哌甲酯缓释片 4.22 mg·kg^{-1}·d^{-1};龙牡宁心方中药配方颗粒使用蒸馏水溶解,盐酸哌甲酯缓释片使用生理盐水溶解;对照组、模型组均以等量生理盐水灌胃,灌胃体积均为 1 mL·100 g^{-1},*qd*,连续 28 d。

2.4 行为学测试

旷场实验在给药前、给药结束各进行 1 次。主要记录总运动距离、平均速度,以评价大鼠的活动水平。Morris 水迷宫测试包含定位巡航实验与空间探索实验,从给药第 4 周开始,持续 6 d。定位巡航实验主要记录大鼠的逃避潜伏期,空间探索实验主要记录大鼠的穿台次数、目标象限停留时间和游泳距离以评估大鼠的空间学习和记忆能力。

2.5 取材

行为学测试结束后,大鼠禁食 12 h,Zoletil® 50(50 mg·kg^{-1})腹腔注射麻醉后断头,低温台上分离前额叶组织,预冷磷酸盐缓冲液小心冲洗干净后液氮速冻,储存在 -80 ℃冰箱。

2.6 DIA 定量蛋白质组学与生物信息学分析

对照组、模型组与中药组每组随机选取 4 只大鼠,取前额叶组织进行蛋白质组学分析,对所有鉴定与定量的蛋白质进行 log2 转换处理,基于正态分布回补缺失值做 PCA 分析。以 FoldChange >1.2 或 <0.83,且 $P < 0.05$ 为差异蛋白的筛选条件,差异蛋白的 GO 与 KEGG 富集分析主要通过将所有差异表达蛋白向 Gene Ontology 数据库(http://www.geneontology.org/)的各个 term 映射,计算每个 term 的蛋白质数目,应用超几何检验,筛选出与所有蛋白质背景对比,在差异蛋白中显著富集的 GO 条目与 KEGG Pathway(以 $P < 0.05$ 为阈值),使用 R 语言,ggplot 包绘图。

2.7 Western blot 检测差异蛋白的表达

取 40 mg 前额叶组织，加入 400 μL 含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，超声匀浆后，冰上裂解 30 min，4 ℃、12 000 g 离心 15 min，取上清并使用二喹啉甲酸法（BCA）进行蛋白定量。取 20 μg 蛋白质进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并采用湿转法转移至 PVDF 膜上，无蛋白快速封闭液封闭 20 min，一抗 4 ℃孵育过夜，TBST 缓冲液洗涤后加入二抗室温孵育 1 h，TBST 再次洗涤后使用增强化学发光法（ECL）发光液显影。

3 统计学方法

使用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析处理；临床研究中（$n=40$），计量资料不符合正态性，采用中位数（上四分位数，下四分位数）[$M(P25, P75)$]表示，组内治疗前后比较采用 Wilcoxon 符号秩检验，组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。动物研究中（$n=6$），计量资料符合正态性，采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，组内前后比较采用配对 t 检验；逃避潜伏期比较采用双因素重复测量方差分析；针对蛋白质组学关键差异蛋白的 Western blot 分析中（$n=4$），组间比较采用单因素方差分析；$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1 临床研究

1.1 中药组与西药组治疗前后 SNAP-IV 量表评分变化

经 Wilcoxon 符号秩检验，中药组与西药组治疗后的 SNAP-IV 量表评分均较治疗前显著下降，差异有统计学意义（P 均 <0.001）；两组变化差值 Δ 经 Mann-Whitney U 检验，差异无统计学意义（$P=0.61$），表明中药组的 SNAP-IV 量表评分下降幅度与西药组相当，见表 3。

表 3 中药组与西药组治疗前后 SNAP-IV 量表评分变化　　$M(P25, P75)$

组别	n	治疗前/分	治疗后/分	Δ（治疗后 - 治疗前）/分	Z^a	P
西药组	40	49.50(46.00,53.75)	25.00(22.25,28.75)	-24.00(-32.00,-18.00)	-5.513	<0.001
中药组	40	49.00(45.00,57.00)	25.00(21.00,29.50)	-25.00(-31.75,-20.25)	-5.513	<0.001
Z^b				0.511		
P				0.610		

变化差值 Δ 为个体配对差值的中位数（IQR）；a：Wilcoxon 符号秩检验的标准化检验统计量；b：Mann-Whitney U 检验的标准化检验统计量

1.2 中药组与西药组治疗前后 Weiss 功能缺陷量表评分变化

经 Wilcoxon 符号秩检验，中药组与西药组治疗后的 Weiss 功能缺陷量表评分均较治疗前显著下降，差异有统计学意义（P 均 <0.001）；两组变化差值 Δ 经 Mann-Whitney U 检验，中药组评分下降幅度大于西药组，差异有统计学意义（$P=0.026$），见表 4。

表 4 中药组与西药组治疗前后 Weiss 功能缺陷量表评分变化　　$M(P25, P75)$

组别	n	治疗前/分	治疗后/分	Δ（治疗后 - 治疗前）/分	Z^a	P
西药组	40	28.50(20.00,39.25)	16.00(11.25,21.00)	-10.00(-18.75,-7.00)	-5.501	<0.001
中药组	40	27.50(20.25,41.75)	14.50(7.00,16.75)	-16.00(-25.75,-10.00)	-5.465	<0.001
Z^b				2.225		
P				0.026		

变化差值 Δ 为个体配对差值的中位数（IQR）；a：Wilcoxon 符号秩检验的标准化检验统计量；b：Mann-Whitney U 检验的标准化检验统计量

1.3 中药组与西药组治疗前后 Conners 儿童行为量表评分变化

经 Wilcoxon 符号秩检验，中药组与西药组治疗后的 Conners 儿童行为量表评分均较治疗前显著下降，差异有统计学意义（P 均 <0.001）；两组变化差值 Δ 经 Mann-Whitney U 检验，中药组评分下降幅度大于西药组，差异有统计学意义（$P<0.001$），见表 5。

表 5 中药组与西药组治疗前后 Conners 量表评分变化 $M(P25,P75)$

组别	n	治疗前/分	治疗后/分	Δ(治疗后 - 治疗前)/分	Z^a	P
西药组	40	36.00(28.00,48.50)	25.00(19.00,33.75)	-11.50(-18.00,-9.00)	-5.515	<0.001
中药组	40	46.50(34.25,65.00)	26.00(20.00,32.75)	-20.00(-32.00,-15.00)	-5.324	<0.001
Z^b				4.088		
P				<0.001		

变化差值 Δ 为个体配对差值的中位数(IQR);a:Wilcoxon 符号秩检验的标准化检验统计量;b:Mann-Whitney U 检验的标准化检验统计量

1.4 中药组与西药组治疗前后中医证候积分变化

经 Wilcoxon 符号秩检验,中药组治疗后的主症与次症积分均较治疗前显著下降(P 均 <0.001),西药组治疗后的主症积分较治疗前显著下降(P <0.001),次症积分较治疗前无统计学差异(P =0.425);两组变化差值 Δ 经 Mann-Whitney U 检验,中药组积分下降幅度大于西药组,差异有统计学意义(P =0.019,P <0.001),见表 6。

表 6 中药组与西药组治疗前后中医证候积分变化 $M(P25,P75)$

项目	分组	n	治疗前/分	治疗后/分	Δ(治疗后 - 治疗前)/分	Z^a	P
主症	西药组	40	54.00(45.00,57.00)	28.50(21.00,33.00)	-27.00(-30.00,-21.00)	-5.386	<0.001
	中药组	40	49.50(45.00,57.00)	21.00(15.75,24.00)	-30.00(-36.00,-24.00)	-5.523	<0.001
	Z^b				2.340		
	P				0.019		
次症	西药组	40	8.00(4.50,11.50)	8.00(4.50,11.50)	0.00(-2.00,2.00)	-0.798	0.425
	中药组	40	8.00(4.00,12.00)	4.00(0.00,5.50)	-5.00(-8.00,-2.00)	-4.947	<0.001
	Z^b				4.309		
	P				<0.001		

变化差值 Δ 为个体配对差值的中位数(IQR);a:Wilcoxon 符号秩检验的标准化检验统计量;b:Mann-Whitney U 检验的标准化检验统计量

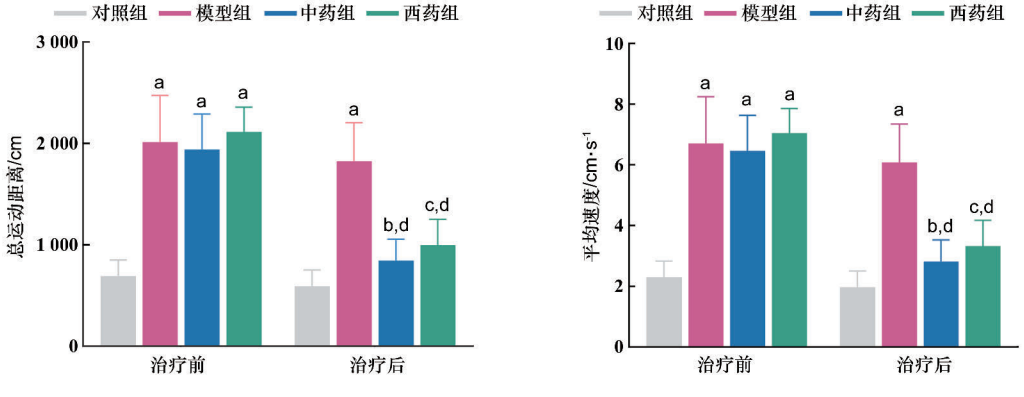
1.5 安全性评价

本研究治疗过程中,中药组与西药组均未出现肝肾功能异常、心电图异常、头痛、睡眠障碍(失眠、梦魇等)及情绪问题(烦躁等)等研究药物相关的严重不良反应。

2 动物研究

2.1 龙牡宁心方对大鼠活动水平的影响

治疗前总运动距离与平均速度,模型组、中药组、西药组均高于对照组(P 均 <0.001)。经配对 t 检验,与治疗前相比,中药组与西药组治疗后总运动距离、平均速度均显著下降(P 均 <0.01)。治疗后总运动距离与平均速度,模型组均高于对照组(P 均 <0.001),中药组与西药组均低于模型组(P 均 <0.001)。见图 1。各组大鼠的代表性运动轨迹见图 2。



与同期对照组相比,a:P <0.001;与同组治疗前相比,b:P =0.001,c:P =0.002;与治疗后模型组相比,d:P <0.001

图 1 各组大鼠治疗前后的旷场实验结果(n =6)

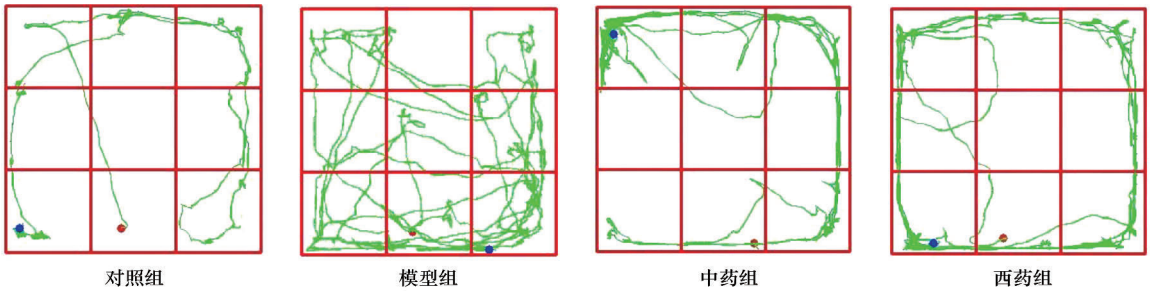


图 2　各组大鼠的旷场实验代表性运动轨迹

2.2　龙牡宁心方对大鼠空间学习记忆的影响

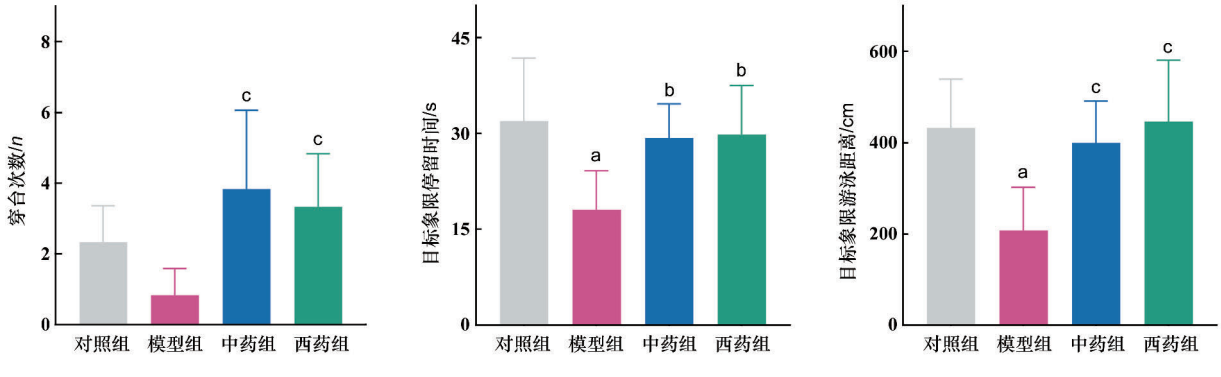
定位巡航实验期间，各组的逃避潜伏期均随训练逐渐下降，经双因素重复测量方差分析，模型组 d 3、d 4、d 5 的逃避潜伏期显著高于对照组；中药组和西药组 d 3、d 4、d 5 的逃避潜伏期均低于模型组（P 均 <0.05），见表 7。

表 7　各组大鼠连续 5 d 的逃避潜伏期　　$\bar{x} \pm s, n=6$

组别	d 1/s	d 2/s	d 3/s	d 4/s	d 5/s	F^e	P
对照组	43.86 ± 11.96	32.25 ± 4.97	18.46 ± 3.44	14.69 ± 8.33	9.84 ± 2.18	12.281	< 0.001
模型组	48.16 ± 10.89	33.48 ± 10.11	31.11 ± 6.77[a]	30.40 ± 2.92[a]	23.26 ± 7.64[a]	5.134	0.007
中药组	42.34 ± 12.92	22.57 ± 8.01	13.60 ± 2.34[d]	16.74 ± 8.42[b]	11.78 ± 4.16[c]	8.434	0.001
西药组	43.48 ± 10.38	21.05 ± 8.09	14.46 ± 6.21[d]	11.14 ± 6.19[c]	10.01 ± 6.05[c]	10.658	< 0.001
F^f	0.291	3.872	15.412	9.113	8.450		
P	0.832	0.025	< 0.001	0.001	0.001		

与同一天对照组相比，a：$P<0.01$；与同一天模型组相比，b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，d：$P<0.001$；e：组内不同时间点简单效应分析的检验统计量，f：同一时间点组间简单效应分析的检验统计量

空间探索实验中，与对照组相比，模型组的穿台次数没有统计学差异（$P=0.096$），模型组的目标象限停留时间与目标象限游泳距离低于对照组（P 均 <0.01）；与模型组相比，中药组与西药组的穿台次数显著增多（P 均 <0.01），目标象限的停留时间显著增加（P 均 <0.05），目标象限的游泳距离显著增加（P 均 <0.01），见图 3。各组大鼠的空间探索实验代表性运动轨迹见图 4。



与对照组相比，a：$P<0.01$；与模型组相比，b：$P<0.05$，c：$P<0.01$

图 3　各组大鼠的空间探索实验结果（$n=6$）

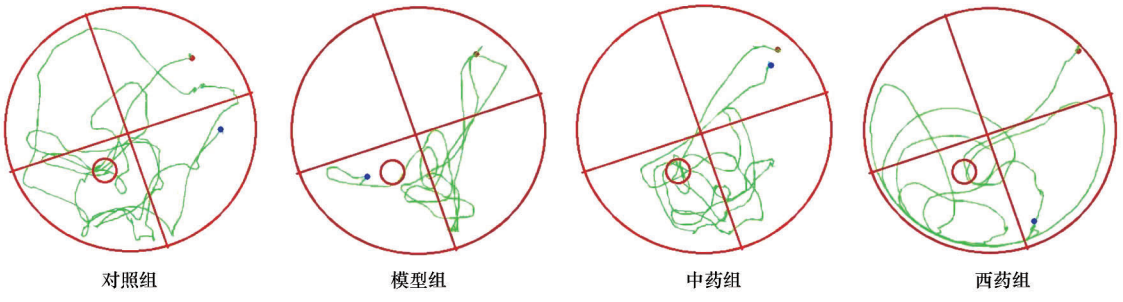
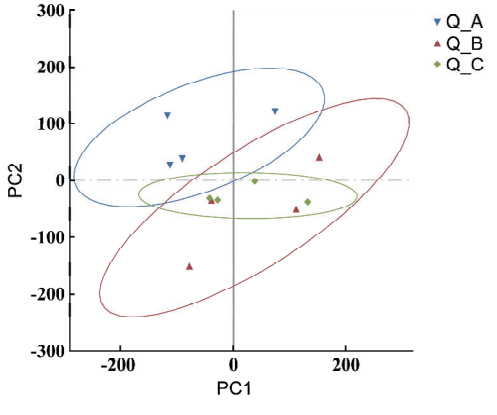


图 4 各组大鼠的 Morris 水迷宫空间探索实验代表性运动轨迹

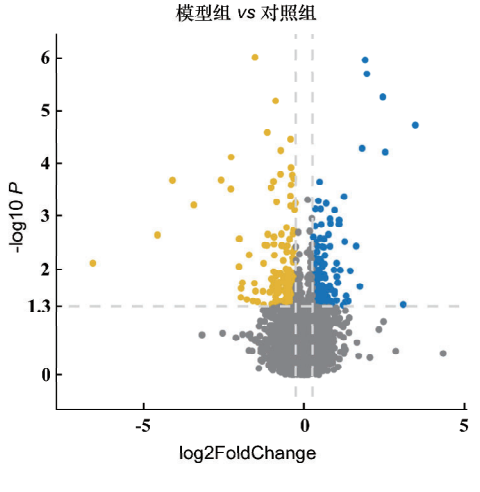
2.3 DIA 定量蛋白质组学分析

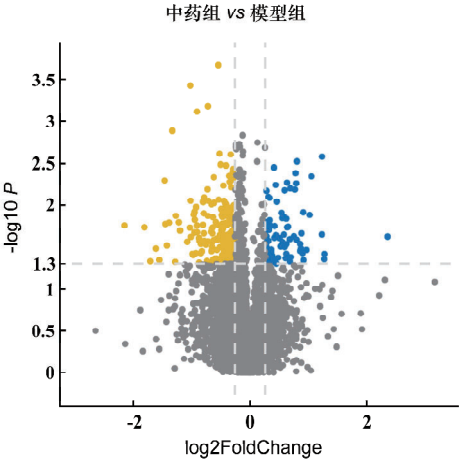
经 PCA 分析，样本重复性较好，见图 5。蛋白质组学技术共鉴定与定量出蛋白质 10 628 种。与对照组比较，模型组差异蛋白 364 个，其中上调蛋白 181 个，下调蛋白 183 个；与模型组比较，中药组差异蛋白 273 个，其中上调蛋白 82 个，下调蛋白 191 个，见图 6。



Q_A：对照组，Q_B：模型组，Q_C：中药组；PCA 分析为基于所有定量蛋白的归一化表达值，PC1 = 19.46%，PC2 = 11.51%

图 5 PCA 分析结果



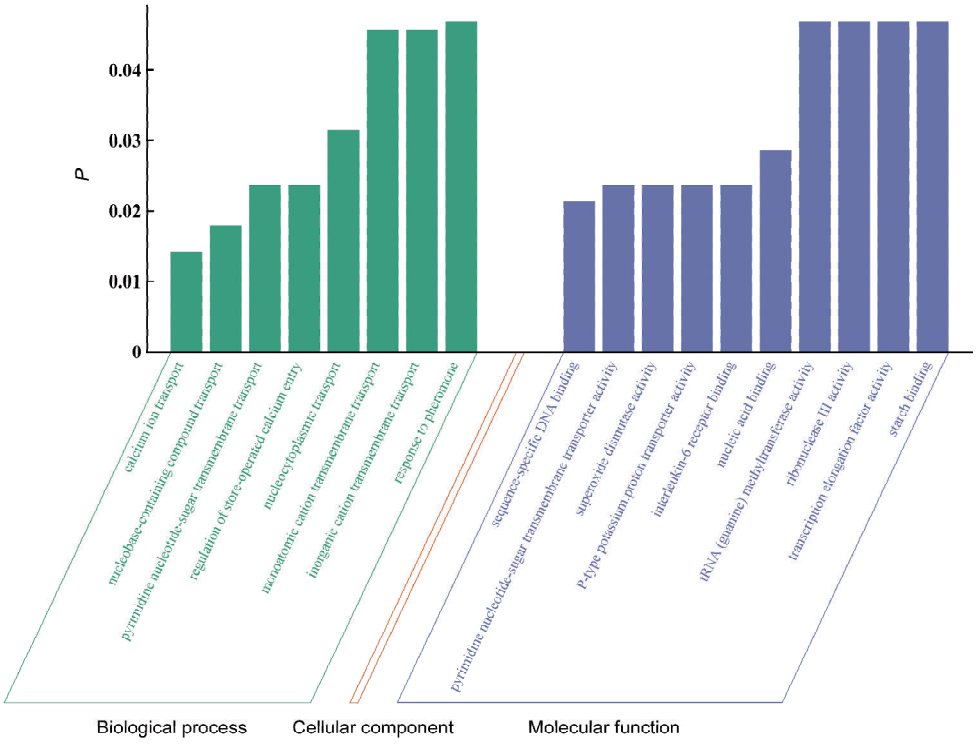


以 Foldchange > 1.2 或 < 0.83、P < 0.05 为阈值

图 6 差异表达蛋白火山图

2.4 龙牡宁心方干预后差异表达蛋白的 GO 富集分析

基于中药组 *vs* 模型组的差异表达蛋白，进行 GO 富集分析共得到生物过程 71 条、分子功能 78 条、细胞组分 20 条，选择 P < 0.05 的条目进行可视化。在生物学过程方面，差异表达蛋白主要参与钙离子转运、含核碱基化合物的转运、嘧啶核苷酸-糖的跨膜转运、储存依赖性钙离子内流的调控、核质转运、单原子阳离子的跨膜转运、无机阳离子的跨膜转运、对信息素的响应等 8 种生物过程。在分子功能方面，特定序列 DNA 结合、嘧啶核苷酸-糖跨膜转运蛋白活性、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性、P 型钾离子：质子转运体活性、IL-6 受体结合、核酸结合、鸟嘌呤（tRNA）甲基转移酶活性、核糖核酸酶Ⅲ活性、转录延伸因子活性等 10 种分子功能被显著富集；细胞成分各条目 P 均 > 0.05，未进行展示，见图 7。

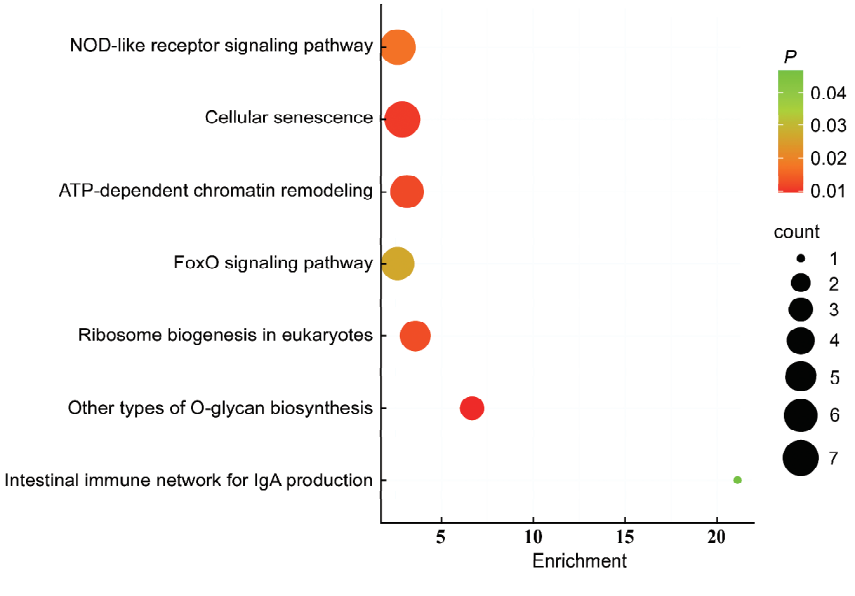


显著性阈值：$P<0.05$

图 7　GO 富集分析图

2.5　龙牡宁心方干预后差异表达蛋白的 KEGG 通路富集分析

基于中药组 *vs* 模型组的差异表达蛋白，进行 KEGG 富集分析共获得 125 条通路，选择 $P<0.05$ 的条目进行可视化。结果显示，NOD 样受体信号通路、细胞衰老、ATP 依赖性染色质重塑、FoxO 信号通路、真核生物中的核糖体生物合成、其他类型的 *O*-糖链生物合成、肠道免疫网络与 IgA 合成等 7 条通路被显著富集（见图 8）。其中，NOD 样受体信号通路较为突出。

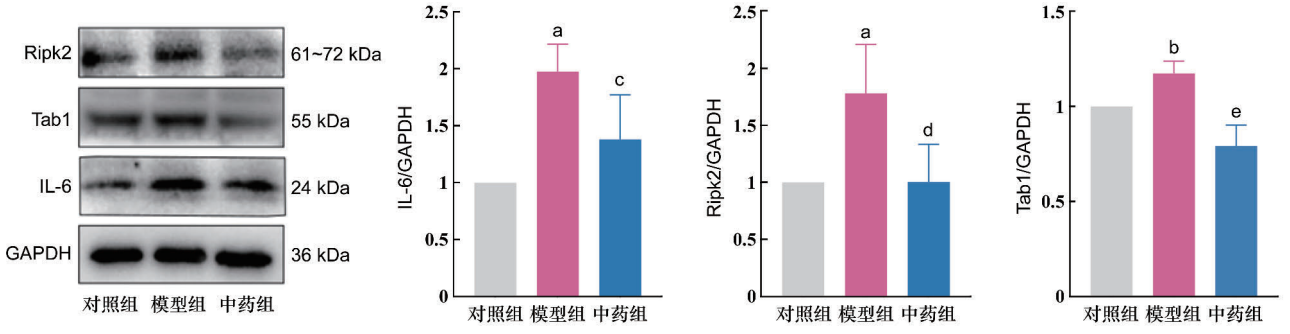


显著性阈值：$P<0.05$

图 8　KEGG 通路富集分析气泡图

2.6 龙牡宁心方对大鼠前额叶差异表达蛋白的影响

我们选择通路富集分析中较为突出的 NOD 样受体信号通路进行 Western Blot 分析，灰度值经 GAPDH 归一化后进行统计分析，结果显示，与对照组相比，模型组 Tab1、Ripk2、IL-6 蛋白表达显著升高（$P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.01$）；与模型组比较，中药组 Tab1、Ripk2、IL-6 蛋白表达显著降低（$P<0.001$、$P<0.01$、$P<0.05$），见图 9。



与对照组相比，a：$P<0.01$，b：$P<0.05$；与模型组相比，c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，e：$P<0.001$

图 9 各组大鼠 IL-6、Ripk2 与 Tab1 蛋白相对表达量比较（$n=4$，独立泳道）

讨　论

根据 ADHD 的临床表现，中医学认为本病属“脏躁”“妄动”“失志”等范畴，课题组负责人根据徐氏儿科学术思想认为本病病机核心在于肾阴亏虚，髓海不充，心阳偏旺，扰动神窍。临床表现为注意力不集中、多动冲动、烦躁不宁，同时可伴见盗汗、健忘、遗尿、舌红少苔、脉细数等。治疗当以“滋阴潜阳，安神益智”为根本大法。龙牡宁心方中熟地黄味甘性微温，质润滋腻，大补肾阴，益精填髓；龟板禀壬癸之气而生，味咸甘性寒，质地沉重，性擅滋阴潜阳，益肾健骨；龙骨味甘涩性平，生品可重镇安神，《冯氏锦囊秘录·杂症痘疹药性主治合参卷四十七（虫鱼部）》言其“收敛三经（肝、心、肾）之神气，则神魂自安”，有养精神、定魂魄、安五脏之妙；牡蛎禀寒水之精而生，味咸涩性微寒，可潜阳补阴，重镇安神，《长沙药解·卷四》言其可“安神魂而保精液”。此四味为君，一补一镇，即可益精填髓，又使心阳得潜，共为安神定志之核心。天冬主入肺肾，滋阴降火力强，能助君药清降虚火；麦冬主入心肺胃，长于养心阴，清心热，除烦安神；二冬合用，上养心阴以制偏旺之心阳，下润肾燥以助君药滋水；石菖蒲辛香开窍，醒神益智，能开心窍之蒙蔽，使神志清明；远志苦辛性温，能安神益智，祛痰开窍，并能沟通心肾之气，引肾水上济心火。此四味为臣，助君药养阴清热、安神益智。茯神宁心安神，淮小麦甘凉平和，养心除烦；五味子酸甘温，益气生津，补肾宁心，收敛固涩，既能助滋阴，又能收敛耗散之心神与阴液；磁石质重沉降，潜阳安神，益肾纳气，助君药加强镇潜浮阳、安定神志之力；山药甘平，补脾益肺，固肾涩精，以后天补先天；当归甘辛温，补血活血，滋润通和，使阴有所载，且其辛温性动，能升能降，故和阴清火，使气血各有所归，补而不滞；益智仁辛温，暖肾固精缩尿，温脾开胃摄唾，且其性温可防全方过于寒凉滋腻。全方补阴为主，清火为辅，佐安神开窍益智，调和制伏，使肾阴充盈，心阳得潜，神归于舍，共奏滋阴潜阳，安神益智之功。

本研究中，龙牡宁心方治疗肾阴不足、心阳偏旺型的 ADHD 患儿具有较好的疗效，治疗后 SNAP-IV 评定量表、Weiss 功能缺陷量表、Conners 儿童行为量表、中医主次症积分均显著下降，且在中医主次症积分、Weiss 功能缺陷量表与 Conners 儿童行为量表评分的改善程度上优于盐酸哌甲酯。在动物实验行为学测试中，龙牡宁心方对 SHR 大鼠的多动冲动与空间学习记忆缺陷亦有显著改善。进一步的定量蛋白质组学结果显示，龙牡宁心方干预后引起 SHR 大鼠前额叶中 82 种蛋白上调，191 种蛋白下调。

差异蛋白的 GO 富集分析显示，龙牡宁心方的干预作用主要与钙离子的转运调控、SOD 活性、IL-6 受体结合等有关。钙离子作为中枢神经系统中至关重要的离子型第二信使，受多种调控机制共同控制，包括细胞器钙存储、膜通道与泵以及细胞内钙结合蛋白等。临床前证据表明，ADHD 与细胞内钙离子稳态失调有关，其中，SHR 大鼠作为 ADHD 常用动

物模型,已被证实存在脑组织质膜钙离子摄取功能受损[12]。用于治疗 ADHD 的一种 α2A 肾上腺素受体激动剂可乐定的作用机制之一便是通过抑制突触前膜的 N 型钙通道,减少钙离子内流,来限制去甲肾上腺素的过度释放,帮助改善前额叶皮层的执行功能[13]。SOD 是人体内重要的抗氧化酶之一,研究表明,SHR 大鼠前额叶皮质中的 SOD 活性与表达水平显著降低,存在线粒体氧化损伤[14];通过上调 SOD 水平与活性,提高细胞抗氧化能力,降低丙二醛、活性氧等对细胞膜磷脂结构的破坏与氧化损伤是治疗 ADHD 的策略之一[15]。IL-6 是一种具有双重角色的炎症/免疫系统信使,过度产生的促炎因子 IL-6 是导致神经炎症的主要驱动因子,使神经元死亡、胶质细胞活化等。与 WKY 大鼠相比,SHR 大鼠中可以观察到升高的 IL-6 水平[16]。并且在临床研究中也发现 ADHD 患儿具有比健康儿童更高的 IL-6 水平[17]。总的来说,GO 分析表明龙牡宁心方的治疗作用与前额叶的钙稳态调节、抗氧化能力提高、神经炎症抑制有关。

通过 KEGG 通路富集分析发现,龙牡宁心方的治疗作用主要与影响 NOD 样受体信号通路、细胞衰老、ATP 依赖性染色质重塑、FoxO 信号通路、真核生物中的核糖体生物合成、其他类型的 O-糖链生物合成、肠道免疫网络与 IgA 合成等 7 条通路有关。其中 NOD 样受体信号通路较为突出。受体相互作用蛋白激酶 2(receptor-interacting protein kinase 2,Ripk2)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1(transforming growth factor β activated kinase 1 binding protein 1,Tab1)与 IL-6 是 NOD 样受体信号通路上的关键差异蛋白。Ripk2 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,Tab1 属于 TAK1 结合蛋白家族,本身不具有激酶活性,主要通过特定结构域与 TAK1 结合来稳定和激活 TAK1;Ripk2 能够以其核心结构(CARD 结构域)为基础与 NOD1/2 结合,从而激活 Ripk2,激活的 Ripk2 招募并激活 TAK1 与 Tab1、Tab2/3 的复合体,进一步磷酸化 IκB 激酶复合体使 IκB 降解,促进核因子-κB(nuclear factor-kappa B,NF-κB)的核转位,导致大量促炎因子如 IL-6 的转录表达[18-19]。既往研究发现,Ripk2 是治疗神经炎症的重要靶点[20];其中帕金森模型小鼠 *NOD2* 和 *Ripk2* 基因的敲除能够改善其焦虑情绪,并能减轻造模剂诱导的神经炎症反应,降低促炎因子水平[21]。TAK1 与 Tab1 复合物的形成是炎症反应的信号中枢[22]。有研究证实,脂多糖诱导的星形胶质细胞神经炎症主要与 TAK1、Tab1 的结合有关,而 DRD2 激动剂依赖于 β-抑制蛋白 2 与 Tab1 的竞争性结合来发挥抑制神经炎症的作用[23]。此外,对差异蛋白进行的 Western blot 分析也与蛋白质组结果一致,Ripk2、Tab1 与 IL-6 在 SHR 大鼠中均显著上调,临床等效剂量龙牡宁心方干预 4 周后,上述指标显著下调。

综上所述,龙牡宁心方疗效确切,其对 ADHD 的治疗作用可能与调控前额叶皮层 Ripk2、Tab1、IL-6 蛋白表达抑制 NOD 样受体信号通路介导的神经炎症有关,但本研究仅通过蛋白质组学对龙牡宁心方的潜在机制进行了初步预测和验证,后续仍需通过基因敲除、敲低/过表达技术在体内和体外实验中进行深层次的机制研究,为临床儿童 ADHD 的中医药治疗提供药理学依据。

[参 考 文 献]

[1] GALLO EF, POSNER J. Moving towards causality in attention-deficit hyperactivity disorder: overview of neural and genetic mechanisms[J]. *Lancet Psychiatry*, 2016, 3(6): 555-567.

[2] KELLY BD. Attention-deficit hyperactivity disorder: a clinical review of the concept, diagnosis and management[J]. *Ir J Psychol Med*, 2018, 35(3): 157-161.

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

[4] NIMMO-SMITH V, MERWOOD A, HANK D, *et al*. Non-pharmacological interventions for adult ADHD: a systematic review [J]. *Psychol Med*, 2020, 50(4): 529-541.

[5] POSNER J, POLANCZYK GV, SONUGA-BARKE E. Attention-deficit hyperactivity disorder[J]. *Lancet*, 2020, 395(10222): 450-462.

[6] MECHLER K, BANASCHEWSKI T, HOHMANN S, *et al*. Evidence-based pharmacological treatment options for ADHD in children and adolescents[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 230: 107940.

[7] 鲍梦依, 赵家靖, 严晨毓, 等. 儿童 ADHD 数字药物的神经机制、应用进展与临床挑战[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(22): 3945-3953.

[8] 王新月, 王昕, 杨健. 经颅直流电刺激应用于儿童青少年注意缺陷多动障碍治疗研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2025, 40(10): 853-859.

[9] 美国精神医学学会. 精神障碍诊断与统计手册[M]. 第 5 版. 伦敦: 美国精神医学学会, 2013: 59-65.

[10] 中华中医药学会. 中医儿科临床诊疗指南[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2020.

[11] LI YQ, YUAN HX, SONG YC, *et al*. An Shen Ding Zhi Ling ameliorates the symptoms of attention deficit hyperactivity disorder via modulating brain-derived neurotrophic factor-related signaling pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 5471586.

[12] HORN JL, JANICKI PK, FRANKS JJ. Diminished brain synaptic plasma membrane Ca^{2+}-atpase activity in spontaneously hypertensive rats: Association with reduced anesthetic requirements [J]. *Life Sci*, 1995, 56(22): PL427-PL432.

[13] 卢凤凤, 卢学春, 周培岚, 等. 基于生物信息学的右美托咪定药理学机制研究[J]. 军事医学, 2021, 45(2): 104-109.

[14] 袁海霞, 倪新强, 韩新民, 等. 熟地黄对 ADHD 模型大鼠前

额叶皮质线粒体的保护作用[J]. 中成药, 2020, 42(8): 2025 - 2031.
[15] 赵子瑜, 刘启玲, 姚金余, 等. 低氧导致小鼠注意缺陷多动障碍样行为及其突触损伤机制[J]. 空军军医大学学报, 2023, 44(3): 229 - 234.
[16] 章嘉琦, 孙茹欣, 杨宇婷, 等. 基于 NF-κB-NLRP3 通路探讨补肾开窍方对注意缺陷多动障碍大鼠神经炎症的干预机制[J]. 广东医学, 2025, 46(6): 801 - 809.
[17] 李雪军, 王淑敏, 张奕星, 等. 血液炎症标志物水平与儿童注意缺陷多动障碍关系的 Meta 分析[J]. 医学研究杂志, 2023, 52(11): 74 - 83.
[18] 曾美芳. NOD2-RIPK2 对化学物诱导小鼠肺癌发生和培养肺癌细胞增殖、迁移的影响[D]. 福州: 福建医科大学, 2022.
[19] BAO SY, SUN QX, YAO CL. The interaction of TAK1 and TAB1 enhances LPS-induced cytokine release via modulating NF-κB activation (Larimichthys crocea)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 74: 450 - 458.
[20] XU Y, LIN F, LIAO GL, *et al*. Ripks and neuroinflammation[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(9): 6771 - 6787.
[21] 黎鑫. NOD2-RIPK2 通路在 MPTP 诱导的小鼠帕金森病模型的作用[D]. 福州: 福建医科大学, 2022.
[22] XU YR, LEI CQ. TAK1-TABs complex: a central signalosome in inflammatory responses[J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 608976.
[23] DU RH, ZHOU Y, XIA ML, *et al*. α-Synuclein disrupts the anti-inflammatory role of Drd2 via interfering β-arrestin2-TAB1 interaction in astrocytes[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 258.

编辑:毕晓帆/接受日期:2026 - 02 - 06