

· 实验研究 ·

还少丹的脑保护机制研究*

左萍萍 刘 娜 雒蓬轶 沈 琦 唐利军 胡韶毅

内容提要 目的:为探讨中药古成方“还少丹”的脑保护机制,观察了该药对脑兴奋性损伤模型的预防及治疗作用。方法:利用小鼠双侧颈总动脉结扎及反复再灌的手术造成小鼠智力下降(避暗实验次数增多)的脑损伤模型,从行为学方面观察了还少丹对脑损伤小鼠学习记忆能力的改善作用,并进一步利用受体研究方法考察了该药的脑保护机制。结果:还少丹可明显减少术后小鼠避暗实验的错误次数(模型组为 2.00 ± 0.34 次/5min,单纯治疗组为 0.75 ± 0.25 次/5min, $P < 0.01$;预防加治疗组为 0.38 ± 0.18 次/5min, $P < 0.01$)。受体结合实验表明,还少丹明显抑制小鼠脑损伤后引起的大脑皮层、海马两部位 N-甲基-D-天冬氨酸(即 NMDA)受体的激活,与模型组比较,有明显差异(P 均 < 0.01);同时发现用药后胆碱乙酰化转移酶(CAT)的活性明显提高($P < 0.01$)。结论:揭示该药具有对抗兴奋性氨基酸毒性的作用。还少丹还可明显增强脑损伤模型的皮层、海马部位的 CAT 活性。

关键词 还少丹 脑损伤 学习记忆 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 胆碱乙酰化转移酶

Protection Mechanism of Huanshaodan Decoction in Brain ZUO Ping-ping, LIU Na, LUO Peng-yi, et al Peking Union Medical College, Institute of Basic Medical Sciences, Department of Pharmacology, Beijing(100005)

Objective: To observe the protective effect of Huanshaodan (HSD) in mouse brain in a steady ischemia-reperfusion model. **Methods:** Step-through experiment, receptor binding test and choline acetyl-transferase (CAT) activity determination was performed. **Results:** After HSD treatment, mice made much less mistakes in step-through experiment than sham groups. Meanwhile the ^3H -MK801 binding of cerebral cortex and hippocampus tissues was significantly decreased. CAT activity of cerebral cortex and hippocampus tissue were increased respectively. **Conclusion:** HSD might antagonize ischemia injury of brain through modulating excessive activation of glutamate N-methyl-D-Aspartic acid receptors.

Key words Huanshaodan, brain injury, N-methyl-D-Aspartic acid receptor, learning and memory, choline acetyl-transferase

“还少丹”是以补肾健脾著称的中药古成方,动物实验证明,其具有抗衰老和治疗肾阳虚的作用⁽¹⁾,而临床观察对老年的心理衰老、瞬时记忆及自由基损伤的外周血相关指标有明显改善作用⁽²⁾。在衰老的诸多因素中,脑部供血不足是一重要因素,而脑缺血可造成脑的基本功能单位——脑细胞的自由基的累积和兴奋性氨基酸引起的迟发性损伤,成为诱发老年痴呆的重要原因。为进一步研究还少丹抗衰老作用的中枢作用机

制,本实验初步观察了该方对脑缺血后兴奋性氨基酸损伤的动物模型的治疗作用和有关生化指标。

材料和方法

1 动物分组及给药方法 实验动物选用雄性昆明系小鼠 6~7 周龄,体重 28~35g,由中国医学科学院实验动物中心提供,饲养温度为 20~25℃,12h 明暗轮流光照,自由饮食。动物分为 4 组。假手术组,以生理盐水灌胃,1ml/d;模型组,也给予生理盐水灌胃;还少丹预防及治疗组,动物在手术前、后分别灌胃给还少丹水煎剂(40mg/10g 体重,1ml/d)1 周;还少丹单纯治疗组,动物在手术后灌胃给还少丹水煎剂(40mg/10g 体重,1ml/d)1 周。还少丹组方为:人参 30g 远志 10g

*国家自然科学基金资助项目(No. 3970764)

中国医学科学院基础医学研究所,中国协和医科大学基础医学院药理室(北京 100005)

熟地 15g 枸杞子 12g 石菖蒲 15g 山药 15g 怀牛膝 12g 肉苁蓉 15g 山茱萸 12g 巴戟天 12g 茴香 3g 楮实子 15g 大枣 15g 茯苓 12g。以上材料均购自北京同仁堂药店并由其加工成粉末,再加 10 份蒸馏水 95~100℃ 煮 1h,即成还少丹水煎剂。

2 模型制备 用 0.1%阿托品 1g/kg 体重给小鼠腹腔注射,5min 后,用 5%乌拉坦 20mg/kg 体重麻醉,仰卧固定于手术台上,颈部正中切口,分离左右颈动脉并分离伴行的神经,套以 0 号丝线扣,加垫橡皮筋条后结扎双侧颈动脉。缺血 20min 后,解开线扣,恢复脑血流 20min,然后重复缺血 20min,再灌注 20min 操作两次,最后恢复血供,缝合皮肤。假手术组同上处理,但只游离双侧颈动脉而不进行缺血再灌注。术后护理动物。

3 自发活动测定和避暗实验测定 全部动物在手术前及术后第 8 天进行自发活动测定及避暗实验测定。将自制的 24cm×25cm×15cm 自发活动箱置于暗室中,以消除环境噪音的影响。箱底划“十”字分为 4 部分。在实验前抚摸动物 2min 使其熟悉实验者,然后观察 3min 动物的横向和纵向活动。以跨越划线次数为横向活动指标,以前肢抬起或后肢站立的次数为直立活动指标。避暗箱分为明、暗两室,暗室箱底铺有铜栅,通以 25V 直流电,小鼠因喜暗滞留暗室中,当接通电源电路受到电刺激后返回明室。由数据采集器经电脑同步监测处理数据,记录 5min 内动物往返于明暗室的次数,作为判断动物学习记忆的指标。各组动物于行为测试后断头取脑。

4 NMDA 及乙酰胆碱 M、N 受体活性测定 新鲜鼠脑先分离出大脑皮层与海马组织,然后采用 Yoneda^[3]的方法经匀浆、洗膜等过程提取脑突触膜(富含受体)。³H-MK801(MK801 为 NMDA 受体离子通道拮抗剂)实验取 50mmol/L Tris-醋酸缓冲液(即 TAB)稀释的突触膜 100μl(调整蛋白浓度为 100~200μg),加入 0.1μCi ³H-MK801,非特异结合管中加入 0.1mmol/L 非标记 MK801,于 30℃ 水浴中孵育 30min,反应结束后加入预冷的 50mmol/L TAB 5ml,抽滤在纤维素膜上,用 20ml 冷 TAB 液洗涤。滤膜烘干后加入甲苯闪烁液 7ml,于液闪计数器上测定放射活性。胆碱能 M 和 N 受体测定程序同上,前者使用 50mmol/L 磷酸缓冲液(即 PBS, pH 7.4),加入 0.5nmol ³H-QNB(QNB 为 M 受体配基)于 25℃ 反应 60min;后者使用 TAB(pH 8.0),加入 20 nmol ³H 标记的烟碱(即 ³H-nicotine,为 N 受体配基)于 4℃ 反应 10min。

5 胆碱乙酰化转移酶(CAT)测定 采用 Fonnum

的方法,即反应系统中加入 10mmol/L 氯化胆碱,300mmol/L 氯化钠,50mmol/L PBS(pH 7.4),1 mmol/L 硫酸毒扁豆碱及 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(即 EDTA),加入 20μl 新鲜突触膜匀浆和 10μl ³H-CoA(终浓度 0.1 mmol/L),于 37℃ 反应 30min 后,加入 5ml 和含有 10mg 四苯硼钠的乙腈 2ml,再加入 5ml 甲苯闪烁液,轻轻振摇,使生成的 ³H-Ach 移向有机溶煤层,10min 后测其放射活性。

6 统计方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计检验用 *t* 检验比较配对资料间的显著性差异。

结 果

1 小鼠缺血性脑损伤后自发活动和学习记忆的变化 经缺血-再灌注术后小鼠自发活动与术前无明显变化,见表 1。但避暗实验结果显示术后错误次数(2.00 ± 0.34)比假手术组(0.90 ± 0.18)明显增加($P < 0.05$),见表 2。表明该手术可造成以小鼠学习记忆功能减退为显著特征的脑损伤模型。

2 还少丹预防及治疗给药对小鼠学习记忆的影响 还少丹预防加治疗组和单纯治疗组给药后,小鼠避暗实验错误次数比手术组明显减少,其中预防加治疗组(0.38 ± 0.18)更为显著($P < 0.01$),见表 2。说明还少丹对脑缺血所致学习记忆功能障碍具有显著改善作用。

表 1 缺血-再灌注术对小鼠自发活动的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	水平运动(次数/3min)		垂直运动(次数/3min)	
		术前	术后	术前	术后
假手术	12	21.3 ± 1.2	18.0 ± 1.3	28.1 ± 1.2	25.1 ± 1.0
模 型	12	21.2 ± 1.4	22.0 ± 1.4	27.3 ± 1.0	26.3 ± 1.2

表 2 还少丹对小鼠脑缺血后学习记忆功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	避暗错误(次数/5min)
假手术	10	$0.90 \pm 0.18^*$
模 型	9	2.00 ± 0.34
预防治疗	8	$0.38 \pm 0.18^{**}$
单纯治疗	8	$0.75 \pm 0.25^{**}$

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 NMDA 受体活性的变化及还少丹的预防治疗作用 见表 3。脑缺血损伤后皮层及海马部位的 ³H-MK801 结合明显增强,有显著意义,表明缺血-再灌注导致 NMDA 受体通道大量开放,从而介导了兴奋性神经毒损伤。我们曾在大鼠及小鼠模型上均观察到这种 NMDA 受体持续性激活可达 1 周以上,而海马部位的变化最明显,这与文献报道的大鼠全脑缺血选择性易

感区的分布一致⁽⁴⁾。经过还少丹预防和治疗的两组, NMDA 受体活性与模型组比较明显下降, 提示该药有对抗脑缺血引起兴奋性氨基酸毒性的作用。

表 3 还少丹对小鼠大脑皮层、海马组织的 NMDA 受体活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NMDA 受体活性(fmol/mg 蛋白)	
		大脑皮层	海马
假手术	10	9.4 ± 0.7*	21.0 ± 1.0*
模型	9	14.9 ± 1.0	34.2 ± 6.0
预防治疗	8	5.3 ± 1.0**	18.5 ± 1.4*
单纯治疗	8	7.1 ± 1.1**	21.0 ± 1.4*

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 4 还少丹对小鼠大脑皮层胆碱能受体活性及大脑皮层、海马 CAT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	受体活性(pmol/mg·pro)		CAT 活性(fmol·mg·pro ⁻¹ ·min ⁻¹)	
		M 受体	N 受体	大脑皮层	海马
假手术	10	739.7 ± 21.2	12.7 ± 0.7	99.5 ± 4.0	42.0 ± 0.5
模型	9	737.2 ± 18.0	10.6 ± 0.6	99.6 ± 6.7	50.4 ± 1.8
预防治疗	8	807.0 ± 23.7	15.2 ± 2.7	154.2 ± 10.1*	123.3 ± 6.7*
单纯治疗	8	825.3 ± 45.9	12.0 ± 0.9	109.2 ± 6.9*	89.4 ± 4.9*

注:与模型组比较, * $P < 0.01$

讨 论

近年,脑血管发病率随着人口的老化而逐年增加,其主要并发症之一——血管性痴呆也有明显增加的趋势,而其中 60%~70% 是由脑缺血引起。晚近, NMDA 受体在脑缺血损伤中的中心作用引起人们极大的关注并为许多实验所证实⁽⁵⁾,而中枢胆碱能神经系统又与学习记忆有密切关系⁽⁶⁾。在中医疑难病辨证施治中,对脾肾亏虚型老年性痴呆症,有人主张首选传统古方还少丹加减⁽⁷⁾。临床及动物实验已初步验证,还少丹具有抗衰老、治疗肾阳虚的作用^(1,2)。我们的实验结果进一步证实,无论在脑缺血术前给药预防还是术后给药治疗,还少丹均可明显改善由脑缺血损伤所致学习记忆障碍,使小鼠避暗错误次数明显减少,而该缺血模型对小鼠的自发活动无明显影响。神经生化结果表明,还少丹对正常鼠脑内与学习记忆密切相关的大脑皮层、海马两部位 NMDA 受体活性无明显影响,但可明显对抗由脑缺血引起的两部位 NMDA 受体活性的激增,这一作用可能是还少丹重要的脑保护机制之一。此外,还少丹还明显增强脑内 CAT 的活性,促进乙酰胆碱合成,这一作用在缺血后的海马部位尤为明显,也与其改善学习记忆的行为变化相吻合。现代中药药理研究资料表明⁽⁸⁾,还少丹组方中的主要成分如远志、石菖蒲、茯苓、山药、五味子等均为代表性的

4 胆碱能受体活性的变化及还少丹的作用 各实验组无论在皮层还是在海马,其 M 受体、N 受体活性均无显著性差异,见表 4。说明小鼠缺血一再灌损伤后皮层及海马胆碱能受体活性无明显变化,还少丹也未能影响胆碱能受体的活性。

5 CAT 活性的变化及还少丹的预防治疗作用见表 4。模型组与假手术组相比, CAT 活性无明显变化。用还少丹后, CAT 活性显著升高,尤以预防加治疗组明显,其中海马部位的增高(约增 2 倍)又明显超过皮层(约增 1.5 倍)。说明还少丹可增强皮层和海马的 CAT 活性,具有促进乙酰胆碱合成的作用。

健脑益智中药,能调节中枢神经系统兴奋与抑制的平衡,增强神经功能的灵活性,提高脑细胞对缺血、缺氧的耐受力。尽管其作用的详细机制尚未明了,但这些药物所含的多种氨基酸、微量元素、维生素以及卵磷脂、蛋白质、糖类、激素、胆碱等成分,均有营养细胞的作用,可以推测在这些有效成分的综合作用下,可产生防治脑细胞受损伤并促进细胞的再生与修复过程的有利效果。

(台湾台中市中国医药学院叶丰次博士给予本研究帮助,深表谢忱)

参 考 文 献

1. 南京中医学院. 中医方剂学讲义. 北京:人民卫生出版社, 1980:198—200.
2. 杜 辛, 杨仁旭, 陈小沁, 等. 还少丹胶囊抗衰老及治疗肾阳虚临床观察. 中国中西医结合杂志 1992;12(1):20—22.
3. Yoneda Y, Ogita K. Neurochemical aspects of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. Neurosci Res 1991;10:1—33.
4. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res 1982;239:57—60.
5. Yoneda Y, Suzuki T, Ogita K, et al. Excitatory amino acid receptor binding in hippocampus of gerbils with transient brain ischemia. Brain Res 1993;613:21—24.
6. 周隆武, 叶智文. 老年记忆衰退与中枢神经递质和神经肽. 老年学杂志 1988;(2):118—121.
7. 黄泰康. 中医疑难病方药手册. 第 1 版. 北京:中国医药科技出版社, 1994:120—123.
8. 丛法滋. 脑病的中医论治. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社, 1993:264—267.

(收稿:1996—11—05 修回:1997—03—30)