

· 实验研究 ·

补肾、健脾、活血三类中药复方对脑室内注射 白细胞介素-1 大鼠下丘脑单胺类 神经递质变化的影响*

段元丽 张新民[△] 沈自尹 王文健 陈伟华

内容提要 目的:探索补肾、健脾、活血三类中药复方对免疫因子引起的下丘脑单胺类神经递质的不同影响。方法:用侧脑室注射白细胞介素-1 β (IL-1 β),观测大鼠下丘脑匀浆液中单胺类神经递质的变化,建立一个下丘脑单胺类神经细胞功能对免疫因子的反应状态,以此观察三类中药对这一反应状态的不同影响。结果:侧脑室内注射 IL-1 β 能使下丘脑匀浆液中去甲肾上腺素(NE)含量明显降低;补肾的右归饮能使因侧脑室注射 IL-1 β 引起下丘脑匀浆液中去甲肾上腺素(NE)含量下降进一步明显降低;而健脾的四君子汤和活血的桃红四物汤则无明显变化。结论:补肾中药能增强下丘脑去甲肾上腺素神经元的活动,未能观察到健脾、活血中药有类似的作用。

关键词 中药复方 白细胞介素-1 β 脑内注射 下丘脑 单胺类神经递质

Effect of Three Composite Recipes on Content of Monoamine Transmitters in Hypothalamus Induced by Intracerebroventricular Injection of Interleukin-1 of Rats Duan Yuanli, Zhang Xinmin, Shen Ziyin, et al *The Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)*

Objective: To explore the different effects of Youguiyin decoction, Sijunzi decoction, Taohong Siwu decoction on the content of monoamine transmitters in the hypothalamus induced by cytokines. **Methods:** A reactive status of hypothalamic monoamine transmitters to cytokine in rat was built by observing the content change of monoamine transmitters in hypothalamic homogenate after intracerebroventricular (icv) injection of human recombinant interleukin-1 β (IL-1 β). On this basis, the different effect of three composite recipes on this status was observed. **Results:** The content of norepinephrine (NE) declined significantly compared with control group after icv injection of IL-1. Compared with IL-1 group, Youguiyin further reduced the content of NE induced by icv injection of IL-1, while Taohong Siwu decoction and Sijunzi decoction did not show any effect on this status. **Conclusions:** It seems that Youguiyin for tonifying Kidney could increase the reactivity of hypothalamic NE neuron, Sijunzi decoction for invigorating Spleen and Taohong Siwu decoction for promoting blood circulation did not show this effect.

Key words composite recipe, interleukin-1 β , intracerebroventricular injection, hypothalamus, monoamine transmitters

随着神经内分泌-免疫网络学说研究的不断深入,人们越来越多地发现免疫细胞所分泌的多种细胞因子对神经内分泌系统产生广泛的生理、病理作用。

其中对白细胞介素-1(IL-1)激活下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPAA)、以及下丘脑神经递质是否介导了这一过程的研究倍受关注。本研究就大鼠侧脑室注射 IL-1 后下丘脑单胺类神经递质的变化情况作一探讨,并在此基础上探索三类中药复方对这一变化的作用。

*国家自然科学基金重点项目(No. 3923370)

上海医科大学中西医结合研究所(上海 200040)

[△] 导师

材料与方法

1 材料

1.1 动物 3 月龄 SD 雄性大鼠, 体重 200g 左右, 由上海医科大学实验动物部提供。

1.2 药物与试剂 右归饮由熟地 10g 淮山药 10g 仙灵脾 10g 枸杞子 10g 山萸肉 6g 附子 6g 肉桂 3g 炙甘草 3g 组成。四君子汤由党参 10g 白术 10g 茯苓 10g 炙甘草 6g 组成。桃红四物汤由桃仁 10g 当归 10g 熟地 10g 白芍 10g 红花 10g 川芎 10g 组成。三方分别以 1:10 加水浸泡过夜、文火水煎 2h; 分别浓缩至含生药 1.9g、1.2g、2.0g/ml, 4℃ 冰箱保存备用。主要试剂: 人重组白细胞介素-1 β (IL-1 β): Sigma 公司产品, 批号: 1-4356。去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE)、多巴胺 (Dopamine, DA)、3, 4-二羟基苯乙酸 (3, 4-Dihydroxyphenylamine, DOPAC)、5-羟色胺 (Serotonin, 5-HT)、5-羟基吲哚乙酸 (5-Hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) 均为 Fluka 产品。

1.3 主要仪器 高效液相色谱仪, Waters 公司产品。高速离心机, 日立公司产品 (20PR-52D)。立体定位仪 (江湾 2 型), 第二军医大学研制。

2 实验方法

2.1 动物分组和用药 取 54 只 SD 雄性大鼠, 随机分成活血化瘀组 (10 只)、健脾益气组 (10 只)、补肾益精组 (10 只)、IL-1 对照组 (12 只) 和正常对照组 (12 只), 以上 3 个用药组大鼠分别灌服桃红四物汤、四君子汤和右归饮浓缩煎剂 2ml。用药剂量为成年人 60kg 体重剂量的 20 倍。两个对照组灌服生理盐水 2ml, 前后灌胃 14 天。

2.2 侧脑室插管术 大鼠称重后, 腹腔注射 0.35% (ml/g) 戊巴比妥 (100ml/100g), 麻醉后置立体定位仪上, 固定; 碘酒、酒精常规消毒后, 切开头皮、暴露头颅骨, 前后囟门定位, 前囟旁开 1mm, 向后 2mm, 用直径 2mm 牙钻钻洞, 插入用 8 号针管做成的长 12mm 针管 (内有针芯), 深 4mm, 用塑料片和 502 胶水固定, 然后用牙托粉再次固定插管, 手术以见到脑脊液为成功, 术后单独分笼喂养。

2.3 侧脑室内注射及采集标本 实验大鼠灌服中药复方第 7 天后行侧脑室插管术; 术后单笼饲养, 继续喂药 7 天后, 在安静条件下, 将大鼠以最小的刺激固定于木架上, 移去插管内芯, 用塑料管连接微量注射器, 以 1 μ l/min 的速度缓慢注入 IL-1 β 10 μ l (5ng/ μ l), 正常对照组以同样的方式注入生理盐水 10 μ l。30min 后迅速断头, 1min 内取出全脑置于干冰中。在大鼠全

脑腹侧视交叉后, 用 4mm 套管刀打孔取材, 组织柱 2~3mm, 称重后置于内有 1ml 0.05mol/L HClO₄ 的离心管中, 用内切式组织匀浆器以 20000r/min 匀浆 30s, 然后以 25000r/min 离心 30min, 取上清液置于 -70℃ 冰箱中待测单胺类神经递质以及代谢产物的含量 (所有实验在 11Am~2Pm 之间完成)。

2.4 下丘脑单胺类神经递质的测定 高效液相色谱法 (HPLC) 测定单胺类神经递质的含量。高效液相色谱仪由 WatersM6000A 泵、660 梯度控制器、U6K 进样阀、LC-4B/17 型电化学检测器等组成。色谱柱为 uBondapakC18, 30 $\times$ 0.5cmID, 填料 BP-18, 10 μ m。洗脱液为 0.15mol/L 氯乙酸-氢氧化钠缓冲液 (含 EDTA0.83 mmol/L 和 CSAD-樟脑-B-磺酸 9mmol/L, pH4.2) 与甲醇的混合液 (95:5), 使用前以 0.22 μ m 滤膜过滤, 超声波脱气。电化学检测工作电压 750mV, 检测灵敏度为 5nA。数据处理仪信号衰减比 128。室温 18~20℃。标准 NE、DA 分别溶于 0.1mol/L HCl; 5-HT、5-HIAA、DOPAC 分别溶于超纯水, 终浓度进样含量为 5ng, 样品进样量为 20 μ l。外标法定量, 峰面积计算含量。标准曲线各成分峰分离完全, 未见重叠现象。

3 统计学处理 各组数据间比较均用 *t* 检验。

结 果

1 三类中药复方对脑室注射 IL-1 大鼠下丘脑儿茶酚胺类神经递质含量的影响 见表 1。IL-1 对照组大鼠下丘脑中 NE 含量与正常对照组相比明显下降 ($P<0.05$); DA 及其代谢产物 DOPAC 含量变化不明显。活血化瘀组大鼠下丘脑 NE、DOPAC 含量与 IL-1 对照组比较, 无明显变化; DA 含量稍有上升, 但也无显著性差异。健脾益气组大鼠 NE 含量与 IL-1 对照组比较无明显变化; DA、DOPAC 含量有下降趋势, 但无统计学意义。补肾益精组大鼠 NE 含量与 IL-1 对照组比较明显下降 ($P<0.05$); DA 含量有下降趋势, 但无统计学意义; DOPAC 含量没有变化。

2 三类中药复方对脑室注射 IL-1 大鼠下丘脑吲哚类神经递质含量的影响 见表 1。IL-1 对照组大鼠下丘脑中 5-HT 含量与正常对照组比较略有下降, 其代谢产物 5-HIAA 含量略有上升, 但均无显著性差异。活血化瘀组、健脾益气组大鼠下丘脑 5-HT 含量与 IL-1 对照组比较略有上升, 但无显著性差异; 5-HIAA 含量无明显变化。补肾益精组大鼠 5-HT 含量与 IL-1 对照组比较无明显变化, 5-HIAA 含量略有下降, 但无显著性差异。

表 1 三类中药复方对脑室注射 IL-1 大鼠下丘脑单胺类神经递质的影响 (ng/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NE	DA	DOPAC	5-HT	5-HIAA
正常对照	12	5.560 ± 1.990	0.424 ± 0.288	0.458 ± 0.147	0.479 ± 0.209	0.393 ± 0.230
IL-1 对照	12	3.927 ± 1.594*	0.451 ± 0.231	0.388 ± 0.090	0.358 ± 0.188	0.516 ± 0.123
活血化瘀	10	4.613 ± 3.325	0.584 ± 0.523	0.388 ± 0.121	0.542 ± 0.251	0.496 ± 0.029
健脾益气	10	3.983 ± 1.583	0.346 ± 0.268	0.337 ± 0.054	0.478 ± 0.283	0.516 ± 0.158
补肾益精	10	2.583 ± 0.950 [△]	0.264 ± 0.227	0.391 ± 0.135	0.361 ± 0.096	0.414 ± 0.030

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 IL-1 对照组比较, [△] $P < 0.05$

讨 论

Dunn AJ 曾将 IL-1 注入小鼠腹腔, 观察 30、60、120、240、480min 后血浆皮质酮浓度的变化, 并用高效液相色谱仪测量下丘脑匀浆上清液中 NE 及其代谢产物的含量变化, 结果发现: 在血浆皮质酮浓度升高的同时, 下丘脑中 NE 含量下降, 其代谢产物 3-甲基氧, 4-羟苯己二醇(MHPG)升高; NE 代谢率即 MHPG/NE 比值升高; 而且 MHPG/NE 比值-时间曲线与皮质酮浓度-时间曲线呈现出一致性, 表明 IL-1 激活肾上腺皮质机能与下丘脑内去甲肾上腺素能神经元的活动增加密切相关, 并认为下丘脑 NE 浓度的下降是其代谢增加所致⁽¹⁾。

下丘脑中去甲肾上腺素能神经末梢的 80% 由腹侧去甲肾上腺素神经元上升束(VNAB)投射而来, Melik Parsadaniantz S 等用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)阻断双侧 VNAB, 然后腹腔注射 IL-1, 发现下丘脑中 NE 含量下降了 85%, 同时血浆 ACTH 浓度也明显降低^(2,3), 提示中枢儿茶酚胺类神经递质介导了 IL-1 对 HPA 轴的激活过程。本实验观察到: 侧脑室内注射 IL-1, 30min 后, 下丘脑匀浆上清液中 NE 含量明显降低, 与上述报道的实验结果相一致, 表明 IL-1 能加强下丘脑去甲肾上腺素神经元的代谢, 而下丘脑匀浆上清液中 DA 及代谢产物 DOPAC、5-HT 及其代谢产物 5-HIAA 的含量均未见明显变化。

在此基础上, 我们研究了三类中药复方对 IL-1 引起下丘脑单胺类神经递质改变的作用, 结果发现: 补肾益精组大鼠下丘脑 NE 含量与 IL-1 对照组相比进一步明显下降, DA 含量有下降趋势, 但无明显差异; DOPAC 无明显变化, 表明补肾的右归饮能进一步增强下丘脑去甲肾上腺素神经元的代谢。健脾益气组大鼠下丘脑中 DA 含量也有降低趋势, 但无统计学意义; NE、DOPAC 无明显变化。活血化瘀组大鼠下丘脑儿茶酚胺类递质含量均无明显变化。表明健脾的四君子汤和活血的桃红四物汤没有进一步增强下丘脑儿茶酚胺类神经元代谢的作用。在观察三类中药复方对 IL-

1 引起下丘脑的儿茶酚类神经递质变化的影响过程中, 未发现各组大鼠下丘脑 5-HT、5-HIAA 含量有任何明显的变化。

我们以前的工作表明, 补肾中药(寿而康)能明显延缓 24 月龄大鼠下丘脑 NE、DA 的下降, 增加 5-HT 的合成与代谢, 健脾中药(四君子)也有一定的类似作用, 从而首次证明补益中药能对自然衰老大鼠下丘脑单胺类神经递质的老年性改变具有一定的延缓作用⁽⁴⁾。以后我们的工作多次证明补益中药能在不同的状态下对下丘脑单胺类神经细胞的代谢发生作用⁽⁵⁾。本实验结果再次表明, 补益中药能使下丘脑单胺类神经递质含量发生变化, 增加下丘脑单胺类神经元的代谢活动。但是补益中药对衰老状态下丘脑神经元的作用与下丘脑神经元对 IL-1 反应状态下的作用可能在程度上、性质上和机理上有所不同, 即补益中药对机体的不同状态可能有不同的作用、不同的作用机制, 有待进一步研究。

参 考 文 献

1. Dunn AJ. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. *Life Science* 1988;43:429—435.
2. Weidenfeld J, Abramsky O, Ovadia H, et al. Evidence for the involvement of central adrenergic system in the interleukin-1-induced adrenocortical response. *Neuropharmacology* 1989;28:1411—1414.
3. Melik Parsadaniantz S, Gaillet S, Malaval F, et al. Lesions of the afferent catecholaminergic pathways inhibit the temporal activation of the CRH and POMC gene expression and ACTH release induced by human interleukin-1 β in the male rat. *Neuroendocrinology* 1995;62:586—595.
4. 张新民, 沈自尹, 王文健, 等. 补益中药对老年雄性大鼠下丘脑单胺类神经递质作用的研究. *上海医科大学学报* 1989;16(3):209—211.
5. 沈自尹. 肾阳虚证的定位研究. *中国中西医结合杂志* 1997;17(1):50—52.

(收稿:1998-07-15 修回:1998-11-02)