

逍遥散对 AD 模型小鼠行为学、形态学及神经递质活性的影响

王虎平^{1,2} 吴红彦^{1,2}

摘要 目的 研究逍遥散及其各配伍组方对 D-半乳糖所致老年性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 模型小鼠行为学、形态学及神经递质活性的影响,探讨逍遥散防治 AD 的作用及其机理,阐释疏肝、养血、健脾相结合的配伍机制。**方法** 60 只 SPF 级小鼠随机分为空白对照组、模型组、逍遥散全方组、疏肝养血组、疏肝健脾组、健脾养血组 6 组,每组 10 只。腹腔注射 D-半乳糖复制 AD 小鼠模型。同时,空白对照组和模型组小鼠每天灌胃生理盐水 24 mL/kg,逍遥散全方组、疏肝养血组、疏肝健脾组、健脾养血组小鼠分别灌胃各组对应药物水煎液进行对抗治疗,灌胃容积皆为 24 mL/kg,对应生药量分别为 2.485、1.136、1.775 及 2.059 g/kg。第 41 天进行学习能力训练,第 42 天进行记忆能力测试。后取脑组织,一半用于测定小鼠脑组织匀浆乙酰胆碱酯酶 (acetyl cholinesterase, AchE)、胆碱乙酰转移酶 (choline acetyl transefrase, ChAT) 及单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 含量,一半用于病理切片进行形态学观察。**结果** 逍遥散全方组、疏肝养血组、疏肝健脾组、健脾养血组等各治疗组均可提高小鼠学习记忆能力,降低潜伏时间;可提高脑组织匀浆 AchE 及 MAO,降低 ChAT;可改善神经元细胞形态、数量及分布,但行为学、形态学及神经递质活性的改善皆以逍遥散全方组最为明显。**结论** 逍遥散能较好的改善 AD 模型小鼠行为学、形态学及神经酶学,对 AD 具有较好的防治作用,阐释了疏肝、养血、健脾相结合的配伍方法和组方思路用于防治 AD 的合理性。

关键词 逍遥散;老年性痴呆;行为学;形态学;神经递质;配伍机制

Effect of Xiaoyao Powder on the Ethology, Morphology, and Activities of Neurotransmitters of Alzheimer's Disease Model Mice WANG Hu-ping^{1,2} and WU Hong-yan^{1,2} 1 Basic Medical School, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou (730000), China; 2 Gansu Provincial Key Lab for Pharmacology and Toxicology, Lanzhou (730000), China

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Xiaoyao Powder (XP) and its compatible prescriptions on the ethology, morphology, and activities of neurotransmitters, thus exploring their effects and mechanism in preventing and treating D-galactose induced Alzheimer's disease (AD) model mice, and clarifying the compatibility mechanism for soothing Gan, nourishing blood, and invigorating Pi. **Methods** Sixty SPF mice were randomly divided into the blank control group, the model group, and the XP group, Shugan Jianpi group (SJ), Shugan Yangxue group (SY), and Jianpi Yangxue group (JY), 10 in each group. The AD mouse model was prepared by peritoneal injecting D-galactose. Meanwhile, mice in the blank control group and the model group were administered with physiological saline (at the daily dose of 24 mL/kg) by gastrogavage. Mice in the XP group (2.485 g/kg), the SY group (1.136 g/kg), the SJ group (1.775 g/kg), and the JY group (2.059 g/kg) were administered with corresponding medicated decoction by gastrogavage, with the gastric volume of 24 mL/kg. On the 41st day the training of capability for learning and memory was started. On the 42nd day capability for learning and memory was tested. The brain tissue was cut. One half was used to determine the contents of homogenate acetyl cholinesterase (AchE), choline acetyltransferase (ChAT), and monoamine oxidase (MAO). Another half was used to carry out morphological observations. **Results** The capability for learning and memory could be improved and the latency time could be lowered in all the treatment groups. Besides, the homogenate AchE and MAO could also be elevat-

基金项目:甘肃中医学院中青年基金资助项目 (No. 2010-11);国家自然科学基金资助项目 (No. 81060284)

作者单位:1.甘肃中医学院基础课部(兰州 730000); 2.甘肃省中药药理与毒理学重点实验室(兰州 730000)

通讯作者:王虎平, Tel:0931-8765409, E-mail:whupboy@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.04.0471

ed, ChAT could be lowered; the morphology, number, and distribution of neurons could be improved. But the improvement of ethology, morphology, and activities of neurotransmitters were most obviously seen in the XP group. Conclusions XP could improve the ethology, morphology, and activities of neurotransmitters, and showed better effects on prevention and treatment of AD. The rationality of compatibility methods and combination thinking ways of soothing Gan, nourishing blood, and invigorating Pi were clarified.

KEYWORDS Xiaoyao Powder; Alzheimer's disease; ethology; morphology; neurotransmitter; compatibility mechanism

随着世界人口结构的老龄化,老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)已成为严重威胁老年人生活质量甚至生命健康的杀手之一。在现代医学对其没有特效疗法的形势下,中医药将具有广泛的开发前景。笔者认为,肝主疏泄,畅情志;肝主藏血,养神魂;肝主筋,司运动,其与 AD 情志及行为的失常密切相关,因此,我们提出了从肝论治 AD 的科研假说。逍遥散作为调肝名方,全方行气养血,气血并调,补体复用,体用并治,既可疏肝气,调情志,又可养肝血,舍神魂,还可柔筋脉,便行为,对 AD 情志及行为失常的防治具有很好的理论针对性。药理研究表明,逍遥散具有很好的抗自由基氧化、营养保护神经元、调节免疫、抗焦虑及抗抑郁等作用^[1-7],符合自由基氧化、中枢神经损害及免疫失调等多种现代医学对于 AD 的病机学说,具有防治 AD 的药理学基础。虽然目前没有逍遥散直接用于防治 AD 的临床报道,但逍遥散、黑逍遥散及丹栀逍遥散用于调节情志及行为失常的相关报告却俯拾皆是^[8],为其用于 AD 的防治提供了临床依据。故本研究基于从肝论治 AD,以调肝的代表方逍遥散开展实验研究,探讨其作用及配伍机制。

材料与方

1 动物 SPF 级昆明种小鼠 60 只,雌、雄各半,体重(20±2)g,由甘肃中医学院科研实验动物中心提供,合格证号:SCXK(甘)2004-0006-0000994。

2 药物、试剂与仪器 药物:逍遥散各组成生药由甘肃中医学院附属医院中药房提供。试剂:D-半乳糖由北京中泰化学试剂公司提供,批号:20100514;乙酰胆碱酯酶(acetyl cholinesterase, AchE)试剂盒、胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)试剂盒、单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)试剂盒及考马斯亮蓝蛋白测试盒均为南京建成生物化学试剂有限公司提供。仪器:Y 型水迷宫,甘肃中医学院基础医学实验中心自制。

3 分组及小鼠 AD 模型制备 60 只 SPF 级小鼠随机分为空白对照组、模型组、逍遥散全方组(由柴

胡、当归、白芍、茯苓、白术、煨姜、甘草、薄荷组成)、疏肝养血组(由柴胡、当归、白芍、薄荷组成)、疏肝健脾组(由柴胡、茯苓、白术、煨姜、甘草、薄荷组成)、健脾养血组(由当归、白芍、茯苓、白术、煨姜、甘草组成)6 组,每组 10 只。根据代谢障碍和自由基损伤理论,长期大剂量使用 D-半乳糖可使动物出现衰老和弱智的状态,表现为学习记忆力下降,皮质神经元中细胞器减少,线粒体膨胀呈空泡样变性,粗面内质网脱颗粒,蛋白质合成减少,神经元丢失,这与 AD 的表现相似,可拟 AD 模型^[9],故本实验参照文献^[10],以腹腔注射 D-半乳糖复制 AD 模型。除空白对照组小鼠每天腹腔注射生理盐水 24 mL/kg 外,其余各组小鼠每天腹腔注射 D-半乳糖 120 mg/kg(浓度为:5 mg/mL,即 24 mL/kg,相当于成人每天 312 mL)复制 AD 小鼠模型,并以水迷宫法测定模型小鼠学习记忆力,其学习记忆力下降则为模型制备成功^[11]。

4 给药方法 造模同时,空白对照组和模型组小鼠每天灌胃生理盐水 24 mL/kg,逍遥散全方组、疏肝养血组、疏肝健脾组、健脾养血组小鼠分别灌胃各组对应药物水煎液进行对抗治疗。各组对应生药量均按照 2005 版《中华人民共和国药典》^[12]中的逍遥丸剂量(相当于成人每天服用生药量 32 g,其中柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、煨姜各 4.615 g,甘草 3.692 g,薄荷 0.923 g)换算得到,分别为 2.485、1.136、1.775 及 2.059 g/kg,各组对应灌胃药液皆以体积 10 倍于药物剂量的自来水煮沸 2 次,每次 20 min,纱布过滤并浓缩至各组小鼠灌胃水煎液容积皆为 24 mL/kg。对抗给药 42 天^[10]。

5 检测指标及方法 动物处理第 41 天,开始使用甘肃中医学院基础医学实验中心自制 Y 型水迷宫进行学习能力训练,小鼠从入水臂直接游至安全臂停靠台为正确,进入另一臂则为错误。学习能力以连续 9 次正确所需的次数为指标,超过 30 次则记为 30,并记录每次达到安全台所需的时间为潜伏时间;第 42 天进行记忆能力测试,记忆能力以 15 次中正确的次数为指标,并记录每次的潜伏时间^[13]。记忆能力

测试后,处死动物,取脑组织,一半脑组织以生理盐水中漂洗并称重,加入小烧杯中,用移液管量取体积 9 倍于脑组织重量的生理盐水倒入匀浆管中进行匀浆,将制备好的 10% 匀浆用普通离心机 3 000 r/min 离心 10~15 min,吸取上清液测定小鼠脑组织匀浆 AchE、ChAT 及 MAO 含量,测定严格按试剂盒要求进行;一半用 10% 甲醛溶液固定,采用石蜡包埋,常规切片,进行 HE 染色,光镜观察各组小鼠海马回结构变化。

6 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先以 SPSS 13.0 统计软件进行方差齐性检验,然后进行单因素方差分析,若有差异再进行 *Dunnett-t* 检验或两组间比较的 *Student-Newman-Keuls* (SNK) 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 动物死亡情况 由于实验周期较长,且每只小鼠每天既要腹腔注射,又要灌胃给药,外力所致机体伤害较大,加之游泳训练耗费体力,出现了个别组实验小鼠的死亡。其中空白对照组及逍遥散全方组各 1 只、疏肝健脾组 2 只死亡。

2 各组小鼠学习能力及学习潜伏时间比较(表 1) 模型组小鼠学习能力低下、潜伏时间较长,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,逍遥散全方组及各配伍方药组均能提高小鼠学习能力、降低其潜伏时间,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),但以逍遥散全方组最为明显,与其他各配伍方药组方组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠学习能力及学习潜伏时间比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	学习能力(次)	学习潜伏时间(s)
空白对照	9	12.54 ± 2.85	7.68 ± 3.26
模型	10	24.64 ± 4.23 *	16.43 ± 5.45 *
逍遥散全方	9	13.63 ± 2.49 ^{△△}	8.01 ± 3.22 ^{△△}
疏肝健脾	8	19.98 ± 5.26 ^{△△}	11.58 ± 1.32 ^{△△}
疏肝养血	10	19.78 ± 5.86 ^{△△}	10.11 ± 2.15 ^{△△}
健脾养血	10	19.56 ± 3.43 ^{△△}	10.11 ± 2.15 ^{△△}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与逍遥散全方组比较,[▲] $P < 0.05$;下表同

3 各组小鼠记忆能力及记忆潜伏时间比较(表 2) 模型组记忆能力低下、潜伏时间较长,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);逍遥散全方组及各配伍方药组均能提高小鼠记忆能力、降低潜伏时间,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),但以逍遥散全方组最为明显,与其他各配伍方药组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠记忆能力及记忆潜伏时间比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	记忆能力(次)	记忆潜伏时间(s)
空白对照	9	12.81 ± 1.72	6.91 ± 1.28
模型	10	7.11 ± 1.52 *	11.06 ± 1.35 *
逍遥散全方	9	11.95 ± 1.94 ^{△△}	7.96 ± 1.46 ^{△△}
疏肝健脾	8	9.64 ± 1.15 ^{△△}	9.86 ± 1.23 ^{△△}
疏肝养血	10	9.81 ± 2.53 ^{△△}	9.82 ± 1.49 ^{△△}
健脾养血	10	9.90 ± 1.69 ^{△△}	9.96 ± 1.52 ^{△△}

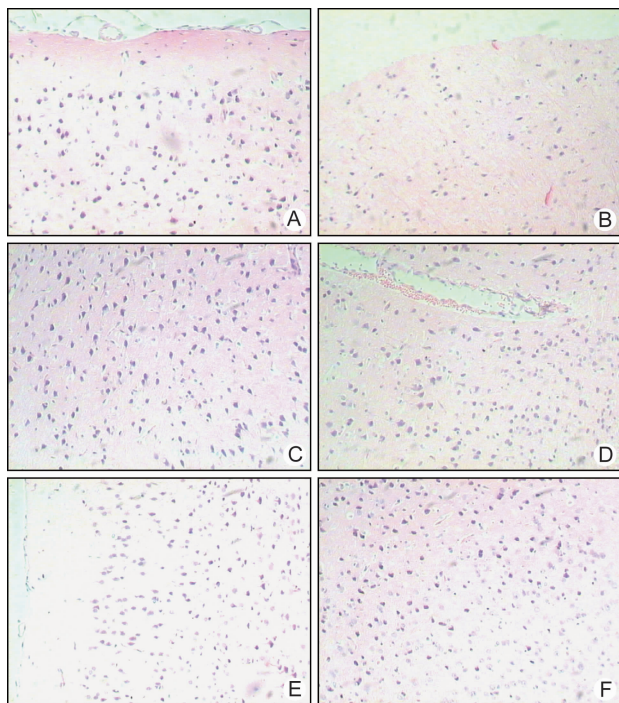
4 各组小鼠脑组织 AchE、ChAT、MAO 活性比较(表 3) 模型组小鼠脑组织 AchE、MAO 活性增高,ChAT 活性降低,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);逍遥散全方组及各配伍方药组均能显著升高小鼠脑组织 ChAT 活性,降低 AchE、MAO 活性,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),但以逍遥散全方组最为明显,与其他各配伍方药组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠脑组织 AchE、ChAT、MAO 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	AchE (U/mg pro)	ChAT (U/g)	MAO (U/mg pro)
空白对照	9	1.16 ± 0.17	87.44 ± 9.5	5.89 ± 1.45
模型	10	1.93 ± 0.25 *	68.90 ± 7.58 *	9.30 ± 1.33 *
逍遥散全方	9	1.25 ± 0.24 ^{△△}	86.33 ± 4.90 ^{△△}	6.11 ± 1.62 ^{△△}
疏肝健脾	8	1.59 ± 0.17 [△]	78.38 ± 9.32 ^{△△}	7.76 ± 1.42 ^{△△}
疏肝养血	10	1.48 ± 0.25 ^{△△}	79.60 ± 10.82 [△]	7.93 ± 0.94 ^{△△}
健脾养血	10	1.61 ± 0.20 ^{△△}	77.40 ± 10.11 ^{△△}	7.91 ± 1.29 ^{△△}

5 各组小鼠海马区形态学比较(图 1) 模型组神经元细胞数量减少,排列稀疏,细胞萎缩,体积变小,小胶质细胞增多,散见许多空泡。全方组神经元细胞数量大致正常,分布合理,细胞形态规则,结构完整清楚。疏肝养血组、疏肝健脾组、健脾养血组神经元细胞大部分形态尚好,排列较规则,细胞膜结构清楚,散见少量小胶质细胞。

讨 论

AD 是一种包括记忆力、判断力、推理能力、抽象思维力及空间关系等正常活动丧失的神经退化性疾病,主要表现为精神与行为失常两方面,而此二者恰恰与中医学对肝的功能认识联系密切。《素问·灵兰秘典论》云:“肝者,将军之官,谋虑出焉”,《素问·六节藏象论》载:“肝者,罢极之本,魂之居也”,肝喜调达主疏泄,藏血而主魂,体阴而用阳,为神魂之居,其华在筋,主司运动,为行为之主。据此,我们提出了 AD 从肝论治的假说,并结合临床经验及现代药理研究,选择具有疏肝解郁,养血健脾之功的逍遥散用于防治 AD 的相关实验研究,取得了良好效果^[14-16]。



注:A 为空白对照组; B 为模型对照组; C 为逍遥散全方组;
D 为疏肝健脾组; E 为疏肝养血组; F 为健脾养血组

图 1 各组小鼠海马区形态学比较 (HE 染色, $\times 100$)

本研究表明,逍遥散确实能改善 AD 模型小鼠的行为学、形态学及神经递质活性和数量,对 AD 有很好的防治作用,且各组指标都显示逍遥散全方组明显优于其他配伍组方组,这不仅确立了 AD 从肝论治的正确性及“调肝”治法的有效性,而且充分体现了逍遥散中疏肝、养血、健脾三者结合的配伍结构对防治 AD 的高效性及协同性。

逍遥散虽然总体以调肝为核心,但其却以疏肝、养血、健脾各配伍药组为基础。方中柴胡、薄荷辛散行走,疏肝理气,调气机,畅情志,启清窍,醒脑神,悦神魂,怡精神;当归、白芍阴柔滋补,益阴养血,补阴血,藏肝魂,柔肝体,舒筋脉,又可补肝体,助肝用,协柴、薄疏肝畅情,还可养血补精,填髓益智;白术、茯苓、煨姜、甘草直入中焦,投脾所好,去脾所恶,健运脾土,培补后天之本,滋生气血之源,既可补阴血,强肝体,又可健中土,抑肝木,还可泄浊毒,解蒙蔽。全方虽由疏肝、养血、健脾配伍组成,但 3 组密切协作,互为促进,气血同调,体用并治,补泻兼施。如此,肝疏气行则情畅神安,血充精足则筋柔神怡,邪去蔽解则脑醒神清。3 组携手共进,并驾齐驱,展示了中医学

的整体观和动态观,对 AD 的防治具有很好的针对性。至于逍遥散防治 AD 的深层作用机理及配伍机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 吕志平.“肝郁”大鼠的脂质过氧化反应及逍遥散的保护作用[J]. 山东中医学院学报, 1995, 19(3): 199.
- [2] 徐志伟, 敖海清, 吴丽丽, 等. 逍遥散对慢性心理应激损伤大鼠海马神经元的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(1): 5-9.
- [3] 赵益业. 肝郁症的免疫学探讨[J]. 山东中医药大学学报, 1997, 21(1): 28-32.
- [4] 吴春福, 李逢利, 刘雯, 等. 逍遥散对大鼠脑中单胺类神经递质含量的影响[J]. 中药药理与临床, 1993, 9(2): 8.
- [5] 王静怡, 石玉琨, 查鹏洲, 等. 逍遥散的药理研究[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(8): 489-490.
- [6] 杨玉峰, 杨瑛. 加味逍遥散对女性黄褐斑血清性激素水平的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2000, 23(5): 41-42.
- [7] 王霞灵, 周大桥. 加味逍遥散治疗肝郁患者高泌乳素血症的研究[J]. 湖北中医杂志, 2003, 25(3): 8-9.
- [8] 陈晓天, 史欣德. 逍遥散在精神神经系统疾病中的应用概况[J]. 江苏中医药, 2007, 39(6): 66-67.
- [9] 蔡大勇, 赵雁, 黄启福. D-半乳糖致原代培养神经元损伤模型的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(7): 794-797.
- [10] 蔡大勇, 黄启福, 贾旭. 丹栀逍遥散对 D-半乳糖拟老年性痴呆大鼠脑病理学变化的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(1): 114-117.
- [11] 龚国清, 徐献本. 小鼠衰老模型[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(2): 10.
- [12] 中华人民共和国药典 2005 年版第一部[S]. 2005: 564.
- [13] 陈勤. 抗衰老研究实验方法学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 94.
- [14] 吴红彦, 王虎平. 逍遥散及其拆方对痴呆模型小鼠学习记忆能力及抗氧化能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10): 102-104.
- [15] 吴红彦, 王虎平. 以肝脾论治老年性痴呆及逍遥散对老年痴呆模型小鼠学习记忆能力、中枢胆碱能神经元活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 168-170.
- [16] 吴红彦, 王虎平, 王彩霞. 黑逍遥散对老年性痴呆的防治作用及其机制研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 912-913.

(收稿: 2012-08-01 修回: 2013-02-20)