

填精补血化瘀方对老龄大鼠 脑内单胺递质和 M 受体的影响

黄 晖 颜正华* 徐秋萍*

(中国中医研究院中药研究所 北京 100700)

摘要 采用高效液相色谱-电化学检测法和放射配基受体结合分析法(RBA)观察了填精补血化瘀方对老龄大鼠大脑皮层单胺类神经递质及其代谢物和 M 胆碱受体的影响,结果表明,该方有提高中枢单胺递质代谢活动,其趋向与青年鼠相近,并能增加 M 受体数量。

关键词 填精补血化瘀方 老龄大鼠 脑内单胺递质 M 受体

Effects of Tianjing Buxue Huayu Decoction on Monoamine Mediators and M Receptor in Aging Rats

Huang Hui, Yan Zhenghua and Xu Qiuping

*(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy
of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700)*

Abstract: Using HPLC with an electrochemical detector and radioligand receptor binding assay, effects of Tianjing Buxue Huayu decoction on monoamine mediators and their metabolites, and M receptor of cerebral cortex were investigated in aging rats. The data revealed that the decoction stimulated metabolic activities of the monoamine mediator up to their normal level in adult rats. In addition, the number of M receptor was increased because of the decoction treatment.

Key words: Tianjing Buxue Huayu Decoction, Aging Rat, Cerebral Monoamine Mediators, M Receptor

中枢神经系统的递质及受体在思维和记忆 方面有重要作用,填精补血化瘀方是根据颜正

* 北京中医药大学博士生导师 100029

华教授多年的临床经验总结的抗老缓衰有效方剂,对缺血性脑血管病、冠心病总有效率达87%以上,实验研究也证实该方具有降低脑组织过氧化脂质的作用,能明显改善中枢抑制剂所致小鼠学习记忆障碍等作用^[1],推测该方可能有改善老年脑老化而出现中枢神经系统功能减退的功效。为此,我们观察了该方对老龄大鼠中枢单胺类神经递质去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)及其代谢产物3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇(MHPG)、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)、5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)、高香草酸(HVA)以及M-胆碱受体的影响,试图从中枢神经递质代谢及中枢受体水平了解该方抗脑老化、提高智能的机制。

1 材料与方剂

1.1 动物及分组 Wistar 老龄大鼠,♀♂各半,月龄24月,体重350~450g,随机分为填精补血化瘀方组和空白对照组各8只,另设青年对照组(3月龄)大鼠,体重180±20g。

1.2 给药 填精补血化瘀方(由熟地、人参、制首乌、黄精、枸杞、当归、川芎,按3:3:2.5:2:2:2:2比例组成)经北京永定制药厂加工成口服液(每ml含生药1g)供试。连续自然饮水给药(口服液)15d,再改为灌胃给药(口服液)10d,剂量10g生药/kg,对照组同法予以饮用水。末次给药12h断头处死,取大脑皮层额极侧,置干冰内保存。

1.3 方法

1.3.1 单胺递质及其代谢产物采用高效液相色谱-电化学检测法^[2]

仪器:恒流泵、六通进样阀(Rheodyne 7125, USA)、电化学检测器(PU4022, Electrochemical Detector, 玻璃碳检测电极, Ag/AgCl 参比电极)检测器电极外加电压0.76V;不锈钢色谱柱(250×4.6mm)及保护柱(50×4.6mm),固定相均为 ODS (YWG - C₁₈, 10μm, 天津试剂二厂)。

试剂及药品:NE 酒石酸盐、DA 盐酸盐、5-HT 盐酸盐, MHPG、DOPAC、5-HIAA、

HVA 均为 Sigma 产品,流动相选用乙酸钠(100mmol/L)-柠檬酸(85mmol/L)缓冲液, pH3.7, 含0.4mmol/L 正二丁胺, 1.09mmol/L 辛烷基硫酸钠, 0.2mmol/L EDTA 及18%甲醇(V/V), 过滤, 真空脱气, 流速为0.9ml/min。将标准品及内标各溶解在0.05mol/L 高氯酸溶液(含0.1%半胱氨酸)中使成0.4mg/ml, -30℃保存, 临用前定量混合, 并用流动相稀释至适当浓度。

组织样品的制备及含量计算, 称取大脑皮层100mg, 放入350ul 冰冷的0.4mol/L 高氯酸溶液(含0.5mmol/L EDTA, 0.01%半胱氨酸), 加适量内标, 匀浆, 离心(4℃, 10000g, 10min), 取上清液与1/2体积的钾盐溶液(含柠檬酸钾20mmol/L, K₂HPO₄ 300mmol/L, EDTA 2mmol/L)混合, 冰浴静置10min, 离心(同前), 取上清液20ul 注入色谱分析。将标准品与内标(与样品中加入量相同)定量混合, 作为标准对照, 比较两者中相应物质与内标的峰高比, 估计组织中相应物质含量(ng/g 湿重组织)。

1.3.2 M 胆碱受体采用放射配基受体结合分析法^[3]

M 受体的制备:将大脑皮层以冷磷酸缓冲液0.32mol/L 1:20(wt/vol)匀浆, 4℃ 40000g 离心10min, 沉淀再用50mmol/L 磷酸缓冲液洗涤, 40000g 离心10min, 最后沉淀加入磷酸缓冲液, 置-20℃备用。膜制备中蛋白质的含量按 Lowry 法测定。

M 受体结合试验:总反应管和非特异管中用一系列不同浓度的 [³H]-QNB(系 Amersham International Radiochemical Center England 产品, 配制成0.03~4.5nmol/L 作为放射配基(作7个点), 非特异管另加入阿托品0.5μmol/L。反应液为磷酸缓冲液50mmol/L, pH7.4。总反应管和非特异管均加入上述制备的膜蛋白100ug, 终容量200ul, 混匀后于37℃水浴温孵1h, 再用冰冷的缓冲液中止反应, 49型滤纸过滤。80℃干

燥箱烘干,置于含 5ml 甲苯 PPO 闪烁液中用 Beckman5801 液闪计数器测定放射强度,结果用总反应管的 dpm 减去非特异管 dpm 数,求出 [³H]QNB 对 M 受体的特异性结合, Scatchard 分析法作图,求出 B_{max} 及 K_D 值。

2 结果

2.1 对大脑皮层单胺递质代谢的影响 从表 1 可知,老龄对照组 NE、DA 和 5-HT 含量明显高于青年组,三者都有显著性差异;而 NE 的主要代谢产物 MHPG 老龄组则明显

低于青年组,5-HIAA 和 HVA 也较老龄组低,也有显著性差异。而填精补血化瘀方组大脑皮层 NE、DA 含量也较老年组低,有显著性意义;5-HT、5-HIAA 及 HVA 略低于老龄组,但无显著性差异,MHPG 则略高于老龄组,但无显著差异,填精补血化瘀方组 NE、DA、5-HT、5-HIAA、HVA 均高于青年组而低于老龄组,而 MHPG 则高于老龄组而低于青年组,仅 DOPAC 低于老龄和青对照组。

表 1 填精补血化瘀方对老龄大鼠脑内单胺递质及其主要代谢产物的影响(X±SD)

分组	NE	MHPG	DA	DOPAC	5-HT	5-HIAA	HVA
老龄组	3.14±0.15	0.72±0.29	8.62±1.00	1.34±0.53	2.76±0.49	2.46±0.47	0.41±0.13
老龄给药组	2.47±0.30 * *	0.37±0.46	7.85±1.38	0.75±0.25 *	2.37±0.68 [△]	1.97±0.81	0.40±0.25 ^{△△}
青年对照组	1.33±0.17 * *	1.07±0.45	5.25±0.93 * *	0.92±0.26	1.64±0.38 * *	1.16±0.26 * *	0.20±0.06 * *

注:与老龄组比较 * P<0.05 ** P<0.01 与青年组比较[△]P<0.05 ^{△△}P<0.01

2.2 对 [³H]-QNB 与老龄大鼠大脑皮层 M-R 结合 B_{max} 和 K_D 值的影响

表 2 填精补血化瘀方对 [³H]-QNB 与大鼠脑皮质中 M-R 结合 B_{max} 和 K_D 值的影响

组别	例数	剂量	B _{max} (fmol/mg 蛋白)	K _D (nM)
青年对照组	8	4ml/只	356±59	0.276±0.003
老年对照组	8	4ml/只	190±52 [△]	0.269±0.055
填精补血化瘀方组	8	10g/kg	304±2 *	0.275±0.047

注:与青年对照组比较 [△]P<0.05 与老年对照组比较 * P<0.05

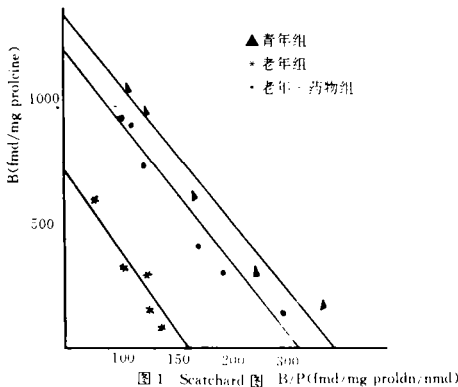


图 1 Scatchard 图

由表 2 可知,青年组大脑皮层 M-R 的 B_{max} 较老龄组明显高,有非常显著性意义,而 K_D 值两组间无显著差异;老龄填精补血化瘀方组 M-R 的 B_{max} 明显高于老龄对照组,两组间有非常显著性差异,而 K_D 值也略高于老龄组,但无显著性意义。此外填精补血化瘀方对老龄大鼠大脑皮层 M-R 有向上调节作用,比老龄对照组约升高 78%。

3 讨论

年龄对脑内单胺类神经递质系统的影响已有较广泛的研究。国内外学者发现老年机

体内单胺类神经递质有明显变化,虽然研究结果还不一致,但这些变化可能是老年脑功能衰退的重要原因^[4]。据文献报道^[5]在中、老年大鼠不同脑区的单胺递质变化并不完全相同,但随着衰老,DA、NE含量主要是降低的,而5-HT含量不定。根据中枢神经系统单胺能神经元之间相互协调关系,有人认为5-HT与NE或DA的比值增高可能是衰老的指征之一^[6]。本实验发现,老龄大鼠大脑皮层NE、DA和5-HT均明显高于青年组,而5-HT与NE或DA的比值两组之间也没有明显差异,与上述报道并不一致。这可能与所用动物的种类、年龄或测定方法的不同有关,但同时也说明不同脑区的单胺递质变化不一。本实验检测部位为大脑皮层额极侧,实验结果与周隆武等^[6]报道老龄大鼠大脑皮层,下丘脑NE含量明显高于青年组的结果相一致,从有关文献来分析,脑内NE主要是通过 α_1 受体的结合而刺激神经活动,衰老机体内酪氨酸羟化酶活性变化不大,老年大鼠脑内NE高于青年组,而多巴胺 β 羟化酶(D β H)活性却与青年大鼠相比并没有变化,脑电生理研究观察到,老龄大鼠额、顶、枕叶自发脑电总功率明显降低。本实验测得老龄大鼠NE、DA含量增高的同时,MHPG反较青年组低,DOPAC与青年组也无明显差异,已知脑内MAO活性随增龄增加,但近年来一些报道认为随增龄增加的是MAOB活性,而MAOB主要存在于脑内神经之外胶质细胞,MAOA则存在于神经元内。MAOB活性的增加可能与神经元内NE的合成降解过程关系不大^[7]。因此,我们认为本实验测得老龄大鼠脑内NE、DA含量增高不可能用递质合成增加来解释,而是神经末梢摄取减少、单胺

递质降解减退,神经元调节功能减退的结果。老龄鼠服用填精补血化瘀方后,脑皮层NE、DA含量低于老龄对照组,与青年组相近,而单胺递质代谢产物MHPG、HVA并不低于老龄对照组,表明该方有可能增加单胺递质的重摄取、提高单胺递质降解,使神经元功能加强,促进了老龄大鼠中枢单胺递质代谢活动,其趋势与青年组相近。

业已表明,老年记忆减退的原因最主要是由于中枢胆碱能神经系统功能减退,实验证明老年大鼠学习记忆减退与脑内M-R数量减少有关,与其亲和力关系不大^[8]。本实验表明,填精补血化瘀方具有增加老年大鼠大脑皮层M-R数量,比老龄对照组提高约78%,显示填精补血化瘀方对M-R有向上调节作用。

我们曾证实了填精补血化瘀方具有改善胆碱能抑制剂,东莨菪碱所致小鼠记忆获得障碍、中枢抑制剂戊巴比妥钠和乙醇所致学习记忆障碍的作用^[1],结合本项实验结果分析,我们认为:填精补血化瘀方健脑益智的作用可能与其提高中枢单胺能神经系统和胆碱能神经系统功能活动密切相关。

参 考 文 献

- [1]黄 晖等. 中成药 1995;(12): 28
- [2]张林魁等. 药学学报 1987;22(8): 591
- [3]Lowry OH et al. J. Biol. Chem 1951;193: 265
- [4]周隆武. 老年学杂志 1986;4(2): 35
- [5]李洪珍等. 白求恩医科大学学报 1990;16(1): 13
- [6]周隆武等. 中日友好医院学报 1987;1(4): 122
- [7]Fowler CJ, et al. J Neu Yal Transm. 1980;49: 1
- [8]俞霭瑶等. 老年学杂志 1987;7(4): 17