

## 四逆汤对血管性痴呆大鼠学习记忆力的影响

李建华<sup>1</sup>, 纪双泉<sup>2</sup>, 陈福泉<sup>2</sup>, 彭妙茹<sup>2</sup>, 刘筱蔼<sup>2</sup>, 赵坤婷<sup>2</sup>, 高天明<sup>1\*</sup>

(1. 南方医科大学神经生物学教研室, 广州 510515; 2. 广州医学院生理学教研室, 广州 510182)

**[摘要]** 目的:探讨四逆汤(SND)对血管性痴呆(VD)大鼠学习记忆能力的影响及作用机制。方法:将大鼠随机分为假手术组、VD模型组和SND组,ip 硝普钠后反复夹闭及再通双侧颈总动脉复制VD大鼠模型,SND组给予四逆汤(3.5 g·kg<sup>-1</sup>) ig 28 d。Y型电迷宫和水迷宫检测大鼠学习记忆能力,测定脑组织中一氧化氮合酶(NOS)、一氧化氮(NO)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量。结果:与假手术组比较,VD模型组大鼠错误反应次数明显增多,全天总反应时间明显延长( $P < 0.05$ ),逃避潜伏期和总路程明显延长( $P < 0.05$ ),脑组织NOS及NO含量升高( $P < 0.05$ ),GSH-Px活性下降( $P < 0.05$ )。与VD模型组比较,SND能提高脑组织GSH-Px活性( $P < 0.01$ ),降低NOS及NO含量( $P < 0.01$ ),大鼠错误反应次数明显减少,全天总反应时间明显缩短( $P < 0.05$ ),潜伏期和总路程均缩短( $P < 0.01$ )。结论:SND可以改善VD大鼠学习记忆能力,其机制可能与增强抗氧化能力有关。

**[关键词]** 四逆汤;血管性痴呆;学习记忆;一氧化氮;谷胱甘肽过氧化物酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0188-04

## Effect of Sini Decoction on Learning and Memory Ability in Rats with Vascular Dementia

LI Jian-hua<sup>1</sup>, JI Shuang-quan<sup>2</sup>, CHEN Fu-quan<sup>2</sup>, PENG Miao-ru<sup>2</sup>,  
LIU Xiao-ai<sup>2</sup>, ZHAO Shen-ting<sup>2</sup>, GAO Tian-ming<sup>1\*</sup>

(1. Neurobiology Department, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Physiology Department, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Sini Decoction (SND) on learning and memory ability of vascular dementia (VD) in rats and the related mechanism. **Method:** VD model of rat was established by repeated cerebral ischemia/reperfusion after the decrease in blood pressure induced by sodium nitroprusside. Thirty rats were randomly divided into Sham-operated group; VD model group and SND group (3.5 g·kg<sup>-1</sup>, ig 28 d). The learning and memory ability was tested with Y-maze and water maze. The production of NOS, NO and glutathione peroxidase (GSH-Px) in cerebral cortex and hippocampus was detected. **Result:** Learning and memory abilities were decreased, NOS and NO were increased, the activities of GSH-Px were reduced in VD group, compared with those in the sham-operated group ( $P < 0.05$ ). In SND group, the learning and memory ability was increased, NOS and NO were decreased and the activity of GSH-Px was increased, compared with those in the VD group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** These findings suggested that SND could improve the learning and memory ability in VD rats, which may be due to the increased anti-oxidative ability of brain tissue.

**[Key words]** Sini Decoction; vascular dementia; learning and memory; nitric oxide; glutathione peroxidase

**[收稿日期]** 20110221(002)

**[第一作者]** 李建华, 博士研究生, 副教授, 研究方向: 生理学, Tel: 020-81340536, Email: lijianh@hotmail.com

**[通讯作者]** \*高天明, 教授, Tel: 020-61648215; E-mail: tgao@fimmu.com

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是由脑血管疾病导致的一种慢性进行性、持续性智能及认知功能障碍的临床综合征,是老年痴呆的主要类型之一,其发病率仅次于阿尔茨海默病(AD)<sup>[1]</sup>。近年常采用脑缺血再灌的方法建立血管性痴呆模型。四逆汤是汉代张仲景《伤寒杂病论》中所创经典名方,由附子、干姜和炙甘草组成。文献报道,四逆汤具有抗心脏<sup>[2]</sup>、肺<sup>[3]</sup>、肠<sup>[4]</sup>和脑<sup>[5]</sup>等器官缺血-再灌注损伤的作用,但其对脑缺血所致学习记忆能力障碍的影响尚未见报道。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康SD大鼠30只,雌雄兼用,体重(250±30)g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号粤鉴证号2008A022。

**1.2 药物制备** 附子、干姜、甘草购于中山大学中山医学院附属一院药剂科,以5:3:2比例混合3味药同煎,浓缩至每升含生药1kg药液。

**1.3 试剂** 硝普钠(批号080120,北京双鹤现代医药技术有限责任公司);一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,批号20090911。

**1.4 仪器** Y-迷宫(张家港生物仪器厂);水迷宫视频跟踪分析系统(成都泰盟科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及模型制备** SD大鼠随机分为VD模型组、假手术组和四逆汤组,每组10只。假手术组和VD模型组术后第2天ig生理盐水,四逆汤组术后第2天ig四逆汤,剂量3.5g·kg<sup>-1</sup>,连续28d。血管性痴呆模型参照王蕊<sup>[6]</sup>等报道的方法加以改进。3%的戊巴比妥钠25mg·kg<sup>-1</sup>ip麻醉后,分离双侧颈总动脉(CCA),ip硝普钠2.5mg·kg<sup>-1</sup>,血压下降后夹闭双侧CCA10min,再通7min,再次ip硝普钠2.5mg·kg<sup>-1</sup>,血压下降后再夹闭双侧CCA10min,再通后缝合伤口,放回笼中保温饲养。

**2.2 Y-迷宫测试** 所有实验动物均在造模后第21d进行Y-迷宫测试。将大鼠放入迷宫适应5min后,置于某一臂通电电击,若其一次性逃至安全区为正确反应,否则为错误反应。每只大鼠进行20次测试,每次间隔30s,记录错误反应次数(EN)及总反应时间(TRT,指全天20次测试所需的总时间),作为学习成绩。24h后重复以上实验,作为记忆成绩。

**2.3 水迷宫测试** 所有实验动物均在造模后第28d用Morris水迷宫观察大鼠的学习记忆情况。实验前在水中加入适量的奶粉,使水池成为不透明的乳白色以隐蔽平台,水面高出平台1cm,水温控制在(25±2)℃。将大鼠面向池壁从四个不同象限入水,记录大鼠自入水到找到平台并爬上平台所需时间作为潜伏期(escape latency),设定120s为最长潜伏期,超过120s的记录为120s,并引导其找到平台。待动物在平台上站立10s后将其拿下,休息30~60s后进行下一次训练。记录大鼠寻找平台的潜伏期及总路程,作为学习成绩。24h后重复上述实验作为记忆成绩。

**2.4 脑组织中NOS,NO含量及GSH-Px活性的测定** 各组大鼠Morris水迷宫测试结束后,脱颈处死,取出脑组织,在冰盘上分离大脑皮层及海马,制成10%脑组织匀浆,离心(531×g,10min),取上清液置4℃备用。按照试剂盒说明书测定大脑皮质及海马区的NOS,NO含量和GSH-Px活性。

**2.5 统计学处理** 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用SPSS 13.0统计软件进行分析,所有计量资料间比较在确定方差齐性后采用单因素方差分析,组间的多重比较采用LSD-t检验(Least-significant difference test);如果方差不齐则用Welch法,组间的多重比较采用Dunnett's T3检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 行为学检测** Y-迷宫检测结果显示,与假手术组比较,VD模型组大鼠错误反应次数明显增多,全天总反应时间明显延长( $P < 0.05$ );而SND组与模型组比较错误反应次数明显减少,全天总反应时间明显缩短( $P < 0.05$ ),见表1。Morris水迷宫检测结果显示,与假手术组比较,VD模型组大鼠逃避潜伏期和总路程明显延长( $P < 0.05$ ),而SND组与模型组比较大鼠潜伏期和总路程均缩短( $P < 0.01$ )。见表2。

**3.2 各组大鼠脑组织中NOS,NO含量和GSH-Px活性** 与假手术组比较,VD模型组大鼠大脑皮层及海马区NOS和NO含量明显升高,而GSH-Px的活性显著降低( $P < 0.05$ );SND组与模型组比较大鼠大脑皮层及海马区NOS和NO的含量显著下降( $P < 0.01$ ),GSH-Px活性明显升高( $P < 0.01$ )。见表3。

表 1 各组大鼠 Y 型电迷宫学习记忆成绩 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	学习成绩		记忆成绩	
		错误数/次	总时间/s	错误数/次	总时间/s
假手术	-	9.50 ± 2.26	299.67 ± 66.95	8.00 ± 2.97	261.83 ± 60.74
VD 模型	-	15.00 ± 2.53 <sup>2)</sup>	505.33 ± 54.47 <sup>2)</sup>	12.17 ± 2.40 <sup>1)</sup>	352.33 ± 76.66 <sup>1)</sup>
四逆汤	3.5	10.17 ± 1.60 <sup>4)</sup>	277.17 ± 75.73 <sup>4)</sup>	8.33 ± 1.97 <sup>3)</sup>	234.33 ± 47.63 <sup>4)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~3 同)。

表 2 各组大鼠水迷宫实验记忆成绩 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	学习成绩		记忆成绩	
		总路程/cm	潜伏期/s	总路程/cm	潜伏期/s
假手术	-	186.74 ± 72.74	32.01 ± 6.80	177.13 ± 61.75	30.75 ± 4.36
VD 模型	-	302.30 ± 97.47 <sup>2)</sup>	43.71 ± 8.88 <sup>2)</sup>	272.01 ± 72.18 <sup>2)</sup>	39.48 ± 6.98 <sup>2)</sup>
四逆汤	3.5	135.82 ± 59.79 <sup>4)</sup>	27.37 ± 4.81 <sup>4)</sup>	121.30 ± 19.37 <sup>4)</sup>	26.55 ± 3.92 <sup>4)</sup>

表 3 各组大鼠脑组织中 NOS, NO 含量和 GSH-Px 活性的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	皮层			海马		
		NOS	NO	GSH-Px	NOS	NO	GSH-Px
		/ $U \cdot mg^{-1}$	/ $\mu mol \cdot g^{-1}$	/ $U \cdot mL^{-1}$	/ $U \cdot mg^{-1}$	/ $\mu mol \cdot g^{-1}$	/ $U \cdot mL^{-1}$
假手术	-	3.80 ± 0.45	8.18 ± 1.60	71.55 ± 15.11	4.67 ± 0.28	3.44 ± 1.30	61.01 ± 12.87
VD 模型	-	6.31 ± 1.08 <sup>1)</sup>	16.97 ± 3.99 <sup>2)</sup>	24.71 ± 3.11 <sup>1)</sup>	8.33 ± 1.51 <sup>2)</sup>	8.62 ± 2.01 <sup>2)</sup>	37.87 ± 2.22 <sup>1)</sup>
四逆汤	3.5	4.24 ± 0.81 <sup>4)</sup>	6.06 ± 1.56 <sup>4)</sup>	61.33 ± 2.26 <sup>4)</sup>	4.04 ± 0.62 <sup>4)</sup>	3.48 ± 1.03 <sup>4)</sup>	76.37 ± 20.50 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

血管性痴呆属于中医“中风痴呆病”的范畴。2000 年中国中医药学会内科分会延缓衰老委员会制定了血管性痴呆的中医诊断、辨证及疗效判定标准,对血管性痴呆的临床诊治进行了规范<sup>[7]</sup>,认为其病在脑,涉及心、肝、脾、肾。病机为本虚标实,以精气亏虚为本,风火痰瘀为标。中药治疗已逐渐成为防治 VD 的一条重要途径,常用补肾、填精、益智治其本,益气化痰、活血祛瘀治其标。四逆汤为《伤寒杂病论》中经典名方,其君药为附子。《本草汇言》云:附子,回阳气,散阴寒,逐冷痰,通关节之猛药也;《本草备要》谓其“补肾命火,逐风寒湿”;《本草纲目》记载附子可用于“治三阴伤寒,阴毒寒疝,中寒中风,痰厥气厥,风湿麻痹,头风,肾厥头痛……”;因此用附子治疗 VD,可谓标本兼顾。方中配干姜温中散寒,回阳通脉,燥湿消痰;配甘草补脾益气,清热解毒,调和诸药,三药一暴一调一缓,配伍精当。现代医学研究表明,四逆汤具有扩张血管、降低红细胞的聚集性和改善其变形能力、改善细胞能量代谢以及抗氧化损伤等<sup>[8-10]</sup>的作用。Morris 水迷宫和 Y-迷

宫结果显示,与假手术组比较,VD 模型组大鼠学习记忆能力显著下降,而脑缺血再灌后给予四逆汤,大鼠的错误反应次数、全天总反应时间、逃避潜伏期和总路程均明显减少,提示四逆汤能提高 VD 大鼠的学习记忆能力,对脑缺血再灌引起的学习记忆能力减退有一定的预防和改善作用。

脑缺血再灌可引起大量自由基产生,自由基可直接或通过脂质过氧化反应引起神经细胞膜破坏,致使神经细胞凋亡。NO 广泛存在于中枢和外周神经系统中,是多功能的生物信使,它能在神经细胞间传递信息,维持正常的神经细胞生理功能。近年来研究发现,NO 在脑缺血再灌的病理生理过程中发挥重要作用,脑缺血再灌脑组织 NO 含量增高,过量的 NO 可以与氧化阴离子迅速反应,产生过氧化亚硝基盐阴离子( $ONOO^-$ )。  $ONOO^-$  是一种具有强破坏作用的自由基,其分解产生的活性氧化物可以诱导强烈的氧化应激反应导致脂类的过氧化并且改变蛋白和 DNA 的功能,最终导致神经元死亡<sup>[11]</sup>。GSH-Px 是机体内清除自由基的关键酶,它可以保护机体使其免受自由基的损伤。本实验结果显示,VD 模型组

大鼠脑缺血再灌后大脑皮层及海马区内 NOS 及 NO 含量升高,GSH-Px 活性明显下降;而 SND 组与 VD 模型组比较脑组织内 GSH-Px 活性增加,NOS 及 NO 含量下降,提示 VD 大鼠发病过程中产生了大量的 NO,而四逆汤能增加细胞内谷胱甘肽过氧化物酶的水平,提高对自由基的清除能力,降低 NOS 活性,减少 NO 含量。

综上所述,四逆汤可显著改善脑缺血再灌引起的学习记忆障碍,该作用可能与四逆汤能抑制一氧化氮合酶活性、降低脑组织内 NO 含量以及增强 GSH-Px 活性有关,从而提高了脑组织的抗氧化水平,抑制了脂质过氧化物的生成,发挥其神经保护作用。

#### [参考文献]

[1] Knopman D S, Parisi J E, Boeve B F, et al. Vascular dementia in a population-based autopsy study [J]. Arch Neurol, 2003, 60 (4) : 569.

[2] 孙慧兰, 吴伟康, 罗汉川, 等. 四逆汤有效部位抗心肌缺血-再灌注损伤作用 [J]. 中草药, 2006, 37 (1): 77.

[3] 刘筱嵩, 刘国辉, 李建华, 等. 四逆汤对缺血-再灌注离体鼠肺的保护作用 [J]. 中国病理生理杂志,

2008, 24(4): 680.

[4] 刘克玄, 吴伟康, 何威, 等. 四逆汤对大鼠肠缺血再灌注损伤后肠黏膜的保护效应 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 329.

[5] 姜之全, 陈前芬, 田鹤村. 四逆汤对小鼠全脑缺血-再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国脑血管病杂志, 2004, 12(1): 556.

[6] 蒲传强, 郎森阳, 吴卫平. 脑血管病学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2008: 117.

[7] 田金洲, 韩明白, 涂晋文, 等. 血管性痴呆的诊断、辨证及疗效判定标准 [J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(5): 16.

[8] 张玉萍, 李锦, 时一兵. 四逆汤的抗氧化作用研究 [J]. 中草药, 2001, 32(10): 922.

[9] 吴伟康, 黑子清, 孙惠兰, 等. 四逆汤对高胆固醇喂饲所致动脉粥样硬化形成和氧化损伤的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(6): 505.

[10] 杨学伟, 郭云良, 崇卓, 等. 四逆汤(附子、干姜、甘草)对肾血管性高血压大鼠血压调节作用的实验研究 [J]. 中华高血压杂志, 2007, 15(3): 206.

[11] Dawson V L, Dawson T M. Nitric oxide actions in neurochemistry [J]. Neurochem Int, 1996, 29(2): 97.

[责任编辑 聂淑琴]

---

### 本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 [www. syfjxzz. com](http://www.syfjxzz.com) 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。详见本刊稿约第 7 条:投稿及缴费。