

# 当归芍药散对卵巢摘除小鼠行为学变化的影响

孙 晓, 寇俊萍, 李丁娟, 余伯阳\*

(中国药科大学中药复方研究室, 江苏 南京 210038)

[摘要] 目的: 初步考察当归芍药散(DSS)对卵巢摘除(OVX)小鼠的行为学指标的影响, 为探讨其异病同治原理提供一定药效学基础。方法: 手术摘除小鼠双侧卵巢, 术后第 11 天开始给药, 于给药后第 1、14、28 天分别进行开野试验、热板试验及阈上剂量戊巴比妥钠睡眠试验, 考察 DSS 对卵巢摘除小鼠自发活动、疼痛反应及睡眠情况的影响; 于给药后第 42 天取小鼠下丘脑, 采用放射免疫分析法测定其中促性腺激素释放激素(GnRH)的含量, 同时测量小鼠的子宫指数。结果: DSS  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  能显著减少模型小鼠的直立次数和行走格数, 抑制其增加的自发活动; 提高模型小鼠热板痛阈, 减轻其疼痛反应; 并延长模型小鼠睡眠时间, 缩短其潜伏期, 从而改善其睡眠障碍; 但与阳性对照药  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  戊酸雌二醇( $E_2$ )不同, DSS 对模型小鼠下丘脑 GnRH 含量及子宫指数降低无明显改善作用。结论: 当归芍药散可以显著改善卵巢摘除引起的小鼠行为学的变化, 这些作用可能是其发挥对更年期综合症和老年性痴呆异病同治作用的基础之一。

[关键词] 当归芍药散; 异病同治; 卵巢摘除; 行为; 促性腺激素释放激素

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)05-0044-03

## Effect of Danggui-Shaoyao San on Behavior Changes of Ovariectomized Mice

SUN Xiao, KOU Jun-ping, LI Ding-juan, YU Bo-yan\*

(Department of Complex Prescription of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the preliminary pharmacological basis of treating different diseases with the same therapeutic principle with Danggui-Shaoyao San (DSS), and its effect on various behavior changes were observed in ovariectomized (OVX) mice. **Methods:** The effect of DSS on the motor activity, pain tolerance and sleep condition of OVX mice was observed through the open-field test, hot-plate test and the sleep test induced by pentobarbital at hypnoid dosage respectively. Meanwhile, the hypothalamus gonadotropin-releasing hormone (GnRH) level was measured by radio immunoassay (RIA) and uterus index was calculated. **Results:** DSS at the dose of  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  could remarkably reduce the motor activity of OVX mice by decreasing its ambulation and rearing times, raise the pain threshold to alleviate the pain reaction, improve the sleep condition through shortening the sleep latent period and prolonging the sleep time of OVX mice. But it had no effects on GnRH level in hypothalamus and the uterus index, which was different from the estrogen control. **Conclusion:** DSS can improve the behavior changes of OVX mice. This might be the preliminary pharmacological basis of treating different diseases with the same therapeutic principle.

[Key words] Danggui-Shaoyao San; treating different diseases with the same therapeutic principle; ovariectomy; behavior; gonadotropin-releasing hormone

[收稿日期] 2007-10-08

[基金项目] 教育部重点科研项目(03118)

[通讯作者] \* 余伯阳, Tel: (025) 85391042; E-mail: boyangyu59@163.com

当归芍药散(Danggui-Shaoyao San, DSS)出自张仲景所著《金匱要略》,为主治“妇人怀妊,腹中疼痛”的经典名方,现已被广泛用于临床各科,效果显著,充分体现了祖国医学“异病同治”的治疗思想<sup>[1]</sup>。

本研究室前期对该方防治老年性痴呆药效进行了较为系统的研究,发现其对卵巢摘除等多因素所致小鼠记忆障碍,具有显著改善作用<sup>[2,3]</sup>。本研究拟采用能够同时模拟更年期综合症、老年性痴呆部分症状的卵巢摘除小鼠模型,考察 DSS 对该模型小鼠相关行为学(自发活动、疼痛及睡眠)变化的影响,初步探讨其异病同治的药效学基础。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 当归芍药散水提物由本研究室制备,方法如下:当归、芍药、茯苓、白术、川芎、泽泻按《金匱要略》比例(3:16:4:4:8:8)取总生药材 1 kg,加入 4 L 水回流煎煮 1 h,过滤,滤渣再加入 3 L 水回流煎煮 1 h,合并两次滤液,旋蒸浓缩后冻干成粉,得率为 28.34%,HPLC 测定芍药苷含量为 1.36%。实验所用剂量以该粉末计;戊酸雌二醇片(法国 Delpharm Lille SAS, H20060357);GnRH 放免试剂盒(上海第二军医大学神经生物教研室);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司, Lot. No. WS20060401);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号:T20050609);庆大霉素注射液(江苏涟水制药有限公司,批号:H32023929)。

**1.2 动物** 雌性昆明小鼠,(18~24)g,购自河南省实验动物中心,合格证号:SCXK(豫)2005-0001。

## 2 方法

**2.1 卵巢摘除小鼠模型的制备<sup>[4,5]</sup>** 利用热板法对全部小鼠进行痛阈测定及筛选,选择痛阈值在(5~30)s 内的合格小鼠 70 只,ip 4% 水合氯醛麻醉,待翻正反射消失后,背位固定,背部中线左右约 0.5 cm 处剪毛,75% 酒精消毒,切开皮肤和背肌约 0.2 cm,模型组将卵巢下输卵管用丝线结扎,摘除卵巢,皮肤切口给予 2 滴(2 万 U·mL<sup>-1</sup>)庆大霉素,缝合切口。假手术组只分离卵巢不结扎输卵管及摘除卵巢,其他操作同模型组。手术后第 5 天起进行阴道涂片检查,连续 5 d,以不出现角化上皮细胞为造模成功。

**2.2 动物分组与给药** 将卵巢摘除成功的小鼠随机分为 3 组,分别为模型组、DSS 组、E<sub>2</sub> 组,每组 15 只,于手术后第 11 天开始灌胃给药(0.02 mL·g<sup>-1</sup>),其中假手术组及模型组灌胃给予蒸馏水,DSS 组给

予当归芍药散水提物 500 mg·kg<sup>-1</sup>,阳性对照组给予戊酸雌二醇 0.2 mg·kg<sup>-1</sup>。

## 2.3 行为学指标测定

**2.3.1 开野实验** 小鼠灌胃给药第 1 天时,于给药 1 h 后将小鼠放入自发活动仪中进行自发活动行为观察。自发活动仪底面等分为 13 格,记录小鼠 2 min 内由底面中心开始跑动所穿越的格数、后腿站立(包括扶壁站立和自由站立)的次数,考察 DSS 对卵巢摘除小鼠自发活动的影响。

**2.3.2 热板试验** 小鼠连续灌胃给药 14 d,末次给药 1 h 后,将小鼠置于(55±1)℃的热板上,以放置于热板上至出现小鼠舔后足所需的时间(s)为该鼠的痛阈值,考察 DSS 对卵巢摘除小鼠热板痛阈的影响。

**2.3.3 阈上剂量戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠试验** 小鼠连续灌胃给药 28 d,末次给药 1 h 后,小鼠 ip 45 mg·kg<sup>-1</sup> 戊巴比妥钠(0.01 mL·g<sup>-1</sup>),以 ip 完毕至小鼠翻正反射消失的时间(s)为睡眠潜伏期,以翻正反射消失至翻正反射恢复的时间(min)为睡眠时间,考察 DSS 对卵巢摘除小鼠睡眠情况的影响。

**2.4 下丘脑 GnRH 含量测定** 小鼠灌胃给药 42 d,末次给药 1 h 后,各组小鼠摘眼球取血,迅速断头取出全脑,于冰浴中分离下丘脑,称重,置于 1 mL 玻璃匀浆器中,加入预冷 1 mol·L<sup>-1</sup> HAc 0.5 mL,在冰浴中充分匀浆后转入塑料道夫管中,室温放置 100 min,4℃ 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,取上清并加入等体积的 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH,-20℃ 保存待测。

**2.5 子宫指数计算** 子宫指数(mg·g<sup>-1</sup>)=子宫湿重(mg)/小鼠体重(g)

**2.6 统计学方法** 使用 Office Excel 2003 软件进行统计,数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用组间 t 检验。

## 3 结果

**3.1 DSS 对卵巢摘除小鼠自发活动的影响** 由表 1 可见,小鼠摘除卵巢后,直立次数及走动格数明显增加,与假手术组比较具有显著差异( $P < 0.05$ );DSS 和 E<sub>2</sub> 均能明显减少模型小鼠的直立次数及走动格数,从而抑制模型小鼠增加的自发活动,经统计,与模型组比较具有显著或非常显著差异( $P < 0.05$  或 0.01)。

**3.2 DSS 对卵巢摘除小鼠热板痛阈的影响** 由表 2 可见,小鼠摘除卵巢后,热板痛阈明显降低,与假手术组比较具有显著差异( $P < 0.05$ )。DSS 及 E<sub>2</sub> 均能明显提高模型小鼠的痛阈,降低小鼠对热刺激的敏

感性 ( $P < 0.05$ )。

表 1 当归芍药散对卵巢摘除小鼠自发活动的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	直立次数	走动格数
假手术组	—	5.38 ± 3.33 <sup>1)</sup>	45.3 ± 13.0 <sup>1)</sup>
模型组	—	9.33 ± 4.36	59.7 ± 16.7
DSS 组	500	5.07 ± 4.39 <sup>1)</sup>	43.3 ± 16.4 <sup>1)</sup>
E <sub>2</sub> 组	0.2	2.07 ± 2.05 <sup>2)</sup>	37.2 ± 11.9 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

表 2 当归芍药散对卵巢摘除小鼠热板痛阈的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	痛阈(s)
假手术组	—	19.41 ± 3.89 <sup>1)</sup>
模型组	—	16.81 ± 3.14
DSS 组	500	19.31 ± 3.78 <sup>1)</sup>
E <sub>2</sub> 组	0.2	19.79 ± 3.96 <sup>1)</sup>

3.3 DSS 对卵巢摘除小鼠睡眠情况的影响 由表 3 可见,与模型组比较,DSS 能明显缩短模型小鼠的睡眠潜伏期 ( $P < 0.05$ )、延长睡眠时间 ( $P < 0.01$ ),改善模型小鼠的睡眠情况。

表 3 当归芍药散对阈上剂量戊巴比妥钠睡眠时间的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	睡眠潜伏期(s)	睡眠时间(min)
假手术组	—	267.5 ± 52.4	15.27 ± 5.78
模型组	—	290.3 ± 54.7	11.33 ± 4.54
DSS 组	500	248.9 ± 50.7 <sup>1)</sup>	25.33 ± 9.52 <sup>2)</sup>
E <sub>2</sub> 组	0.2	266.2 ± 54.1	11.60 ± 5.70

3.4 DSS 对卵巢摘除小鼠下丘脑 GnRH 含量及子宫指数的影响 由表 4 可见,小鼠摘除卵巢后,下丘脑 GnRH 含量及子宫指数显著降低,与假手术组比较具有显著差异 ( $P < 0.01$ ),DSS 对上述模型小鼠的变化没有明显影响,而 E<sub>2</sub> 能够明显提高 GnRH 含量、增加子宫指数 ( $P < 0.01$ )。

表 4 当归芍药散对卵巢摘除小鼠子宫指数及下丘脑 GnRH 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量(mg·kg <sup>-1</sup> )	子宫指数 (mg·g <sup>-1</sup> )	GnRH 含量 (pg·mg <sup>-1</sup> )
假手术组	—	1.95 ± 1.26 <sup>2)</sup>	8.16 ± 2.99 <sup>2)</sup>
模型组	—	0.41 ± 0.14	3.49 ± 1.67
DSS 组	500	0.40 ± 0.21	3.37 ± 1.30
E <sub>2</sub> 组	0.2	3.32 ± 0.91 <sup>2)</sup>	9.51 ± 3.02 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

本研究利用可同时模拟更年期综合症及老年性痴呆部分症状的卵巢摘除模型,初步探讨了经典方剂当归芍药散异病同治的原理。

国内外对卵巢摘除模型小鼠的行为学变化已有一定的研究,包括学习记忆障碍<sup>[6]</sup>、抑郁或焦虑<sup>[7]</sup>、睡眠障碍等<sup>[8]</sup>。我们前期对该模型小鼠相关行为学的时程变化进行了初步的考察,为本研究实验时间

点的选择提供一定参考依据。本文结果表明,小鼠摘除卵巢后 2 周左右自发活动明显增加;4 周左右模型小鼠的疼痛敏感性明显增加;6 周左右,模型小鼠表现出一定程度的睡眠障碍,但与假手术组比较无显著性差异,这与 Iizuka S. 等人的研究结果一致<sup>[8]</sup>。DSS 对上述变化均有改善作用,这可能是 DSS 发挥对更年期综合症及老年性痴呆异病同治作用的原理之一。同时,小鼠摘除卵巢后,血清雌激素骤然减少,子宫指数明显降低,下丘脑中 GnRH 含量明显减少。E<sub>2</sub> 能够明显增加模型组小鼠降低的子宫指数,升高其下丘脑 GnRH 的含量,而 DSS 对二者均无明显影响,提示 DSS 的作用途径与 E<sub>2</sub> 有所不同,不是通过直接补充雌激素发挥作用的,可能与调节雌激素受体或者 GnRH 受体表达或活性等环节有关。

上述研究初步显示,当归芍药散(DSS)是通过治疗不同疾病共同表现出的症状来发挥异病同治作用的,其药效作用机制和发挥疗效的途径可能有别于 E<sub>2</sub>,还有待于更深入的研究。

#### [参考文献]

[1] 李 冀,袁立霞.当归芍药散临床研究概述[J]. 中医药学刊,2005,23(6):971-973.

[2] 寇俊萍,禹志领,刘 中,等.当归芍药散对小鼠记忆能力及脑内 SOD MDA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,1997,3(4):24-27.

[3] 林志宏,朱丹妮,严永清,等.当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机理研究 I [J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(1):16-19.

[4] 孙艳红,金若敏.女性更年期综合征动物模型制备的研究进展[J]. 时珍国医国药,2005,16(7):657-659.

[5] 张 森,王 新,韦旭斌,等.大鼠发情周期各阶段的阴道细胞变化观察[J]. 动物医学进展,2006,27(2):69-72.

[6] Xiangdong Hua, Ming Lei, Yongjie Zhang, et al. Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease[J]. Life Sci, 2007, 80(20):1897-1905.

[7] Alicia A. Walf, Cheryl A. Frye. Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats [J]. Pharmacol. Biochem. Behav, 2007, 86(2):407-414.

[8] Iizuka S, Ishige A, Komatsu Y, et al. Effects of Tokishakuyaku-san on electric footshock stress in ovariectomized mice[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1998, 20(1):39-46.