

• 药理 •

当归芍药散精简方对小鼠学习记忆障碍改善作用的物质基础与作用机理研究

王 鹏, 余伯阳, 林志宏, 朱丹妮, 严永清
(中国药科大学中药复方研究室, 南京 210038)

摘要: 目的: 筛选当归芍药散精简方(FBD)抗血管性痴呆的有效部位; 方法: (1) 氢溴酸东莨菪碱与脑部反复缺血再灌注诱导小鼠记忆障碍, 水迷宫实验和避暗实验检测小鼠游泳时间、避暗潜伏期与错误次数; (2) 连二亚硫酸钠和谷氨酸钠诱导 PC12 细胞损伤, MTT 法测定细胞活力; 结果: (1) 等生物剂量下, 3 个 FBD 化学部位组合[多糖+挥发油]、[多糖+挥发油+正丁醇部位]、[多糖+挥发油+水部位]可显著缩短小鼠游泳时间($P < 0.05$), 显著延长避暗潜伏期并减少 5min 内的错误次数($P < 0.05 \sim 0.01$); (2) 10% 浓度的 3 个部位组合含药血清均可改善 PC12 细胞损伤($P < 0.1 \sim 0.05$), [多糖+挥发油]对小鼠记忆障碍的改善作用与抗 PC12 细胞损伤作用表现一致, 均有显著性($P < 0.05 \sim 0.01$); 结论: [多糖+挥发油]可能为 FBD 的防治血管性痴呆的有效部位。

关键词: 当归芍药散精简方; 血管性痴呆; 有效部位; 记忆障碍; 血清药理学方法

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)02-0018-04

Study on Basis and Mechanism of Action of Optimized Danggui Shaoyao San in the Improvement Effect on Learning and Memory Impairment in Mice

WANG Peng, YU Bo-yang, LIN Zhi-hong, YAN Yong-qing

(Department of Chinese Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract: Objective: To distinguish the active fraction extracted from the optimized Danggui Shaoyao San (FBD), which can prevent and treat vascular dementia. Method: (1) The dysmnnesia model of learning and memory induced by scopolamine and ischemia-reperfusion was used. The ability of learning and memory was measured by step-through task and water maze task. (2) PC12 cell was injured by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and glutamine and the viability of cell was measured by MTT method. Results: At the same dosage of herbal medicine, the three compositions composed by four fractions extracted from FBD, [Polysaccharide+ Volatile oil], [Polysaccharide+ Volatile oil+ n-Butanol-fraction] and [Polysaccharide+ Volatile oil + Water-fraction], shortened swimming time obviously ($P < 0.05$), prolonged significantly step-through latency and decreased number of errors in 5 minutes ($P < 0.05 \sim 0.01$). (2) 10% Serum containing FBD and the three compositions were manifested to increase viability of injured PC12 cell ($P < 0.1 \sim 0.05$). [Polysaccharide+ Volatile oil] worked most obviously ($P < 0.05 \sim 0.01$) at behavior and cellular levels. Conclusion: [Polysaccharide+ Volatile oil] might be the active fraction of optimized Danggui Shaoyao San for preventing and treating VD.

Key words: Optimized Dangui Shaoyao San; Vascular Dementia; Active fraction; dysmnnesia; Serum-Pharmacological method

当归芍药散源于张仲景《金匱要略》, 近年来用于防治老年性痴呆取得良好的效果^[1], 本室通过对当归芍药散进行拆方研究, 将原方精简为三味药——茯苓: 白术: 当归 = 10: 5: 3 (已申请专利), 发现

该精简方对血管性痴呆模型的治疗作用相当甚至优于原方^[2], 为了使该精简方药效更突出且质量标准易于控制, 对该方的四个化学部位——多糖部位、挥发油部位、正丁醇部位和水部位进行防治血管性痴呆有效部位筛选, 前期筛选工作显示该方并没有单一有效部位, 说明全方的作用很大程度上是由单化学部位协同作用的结果, 本研究设计三种化学部位

收稿日期: 2003-06-16

基金项目: 国家新药基金资助项目(96-901-05-38); 国家自然科学基金资助项目(30271604)

组合,以期确定最优化的有效部位组合。

1 实验材料

1.1 动物 雄性昆明小鼠,18~22g,由中国药科大学新中新药研究中心提供,合格证号:SCXK 苏-2002-0011。

1.2 细胞 PC12 细胞(大鼠肾上腺嗜铬肿瘤细胞株),中国科学院上海生化细胞所提供。

1.3 药品与试剂 白茯苓、炒白术、当归,均购自南京市药材公司。经本中药复方研究室余伯阳教授鉴定,其原植物分别为 *Poria cocos* (Schw) Wolf *Atractylodes macrocephala* Koidz、*Angelica sinensis* (Oliv) Diels,均符合 2000 年版药典规定。从 FBD 全方中分离出的四种化学部位,由中国药科大学中药复方研究室分离提供:多糖(polysaccharide,得率 3.8%)、挥发油(volatile oil,得率 2.3%)、正丁醇部位(n-Butanol fraction,得率 6.8%)、水部位(Water fraction,得率 14.9%),以多糖+挥发油为基础,可设计三组不同部位组合:多糖+挥发油、多糖+挥发油+正丁醇部位、多糖+挥发油+水部位,各组分化学部位质量按提取得率计算。

氢溴酸东莨菪碱购自上海禾丰制药有限公司;连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)购自中国医药上海化学试剂公司;高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;新生小牛血清购自杭州四季青生物工程公司;谷氨酸钠、多聚赖氨酸(Poly-L-Lys)、MTT[溴化-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑]购自 Sigma 公司。

1.4 仪器 SMG-2 型水迷宫程序自动控制仪,中国医学科学院药物研究所;被动回避反射仪,中国中医研究院中药研究所;细胞培养箱,德国 Heraeus;XSZ-D 倒置生物显微镜,重庆光学仪器厂;洁净工作台,苏净集团安泰公司;Z323K 冷冻高速离心机,德国 Hermle labor technik;Sunrise 酶标仪,奥地利 Tecan GmbH。

1.5 统计 使用 NDST4.4 软件进行统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性检验均采用组间 *t* 检验。

2 方法与结果

2.1 FBD 全方及化学部位组合对缺血再灌注致小鼠记忆障碍的影响 取雄性昆明小鼠按文献^[3]进行脑部缺血再灌注手术,保留 10 只小鼠仅分离动脉,不断流再灌,作为假手术组。第二天将造模存活小鼠随机分为 5 组:(1)FBD 全方组 1.2g 生药量 $\cdot\text{kg}^{-1}$;(2)[多糖+挥发油]组;(3)[多糖+挥发油+正丁醇部位]组;(4)[多糖+挥发油+水部位]组;(5)模型

组;(6)假手术组。(2)至(4)组药物每个化学部位的剂量折算成全方 FBD 生药量均为 1.2g $\cdot\text{kg}^{-1}$, (1)至(4)组连续 ig 给药 6d(bid),所有小鼠均以 20mL $\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重的容量给药。(5)、(6)组 ig 等量蒸馏水,第 4 至 6d 连续 3d 逐日用单盲端、双盲端与三盲端水迷宫训练并检测小鼠游泳时间,3min 游不出者按 3min 记录。

表 1 FBD 及不同化学部位组合对反复缺血再灌注致小鼠记忆障碍的影响(水迷宫实验)($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g 生药/kg)	Log 游泳时间(LogS)		
			单盲端	双盲端	三盲端
假手术组	10		0.95 ± 0.22	1.33 ± 0.31	1.67 ± 0.31
模型组	9		1.32 ± 0.24 ^Δ	1.66 ± 0.23 ^Δ	1.84 ± 0.31 ^Δ
FBD 全方组	8	1.2	1.14 ± 0.19*	1.35 ± 0.30*	1.53 ± 0.43*
[多糖+挥发油]组	8	1.2+ 1.2	1.04 ± 0.25*	1.33 ± 0.27*	1.55 ± 0.29*
[多糖+挥发油+正丁醇部位]组	8	1.2+ 1.2+ 1.2	1.08 ± 0.23*	1.41 ± 0.31	1.64 ± 0.10
[多糖+挥发油+水部位]组	9	1.2+ 1.2+ 1.2	1.13 ± 0.19*	1.57 ± 0.23	1.52 ± 0.07*

注:与假手术组相比, ^Δ*P* < 0.05, ^{ΔΔ}*P* < 0.01, ^{ΔΔΔ}*P* < 0.001;与模型组相比,**P* < 0.05, ***P* < 0.01

由表 1 可见模型组小鼠游泳时间较假手术组显著延长(*P* < 0.05),显示脑中缺血再灌注造成小鼠明显的空间记忆障碍,FBD 及三种部位组合对小鼠空间记忆障碍都有一定的改善作用,其中[多糖+挥发油]组作用最为显著(*P* < 0.05),与全方 FBD 组相比无显著性差异(*P* > 0.05)。

2.2 FBD 全方及化学部位组合对氢溴酸东莨菪碱致小鼠记忆障碍的影响 小鼠分组与给药剂量同上,第(6)组为正常组,ig 等量蒸馏水,第 5d(1)至(5)组 ip 氢溴酸东莨菪碱 2mg $\cdot\text{kg}^{-1}$,第(6)组 ip 等容量生理盐水,20min 后用被动回避反射仪进行避暗训练,电压 38V,24h 后检测小鼠避暗潜伏期以及 5min 内错误次数。

表 2 FBD 及不同化学部位组合对氢溴酸东莨菪碱致小鼠记忆障碍的影响(避暗实验)($\bar{x} \pm s$; *n* = 10)

组别	潜伏期(S)	错误次数
正常组	212 ± 113	0.50 ± 0.53
模型组	87 ± 46 ^{ΔΔ}	1.89 ± 0.93 ^{ΔΔ}
FBD 全方组	156 ± 116*	0.86 ± 0.69*
[多糖+挥发油]组	213 ± 114**	0.78 ± 0.67**
[多糖+挥发油+正丁醇部位]组	164 ± 107*	0.88 ± 0.64*
[多糖+挥发油+水部位]组	170 ± 104*	0.70 ± 0.48**

由表 2 可见模型组小鼠较正常组避暗潜伏期明显缩短, 错误次数明显增多 ($P < 0.01$)。FBD 全方及三种化学部位组合对东莨菪碱致小鼠记忆障碍均有显著的改善作用 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 其中[多糖+挥发油]组作用最为显著 ($P < 0.01$), 与全方 FBD 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 含药血清抗 PC12 细胞损伤作用

2.3.1 PC12 细胞的培养 复苏后的 PC12 细胞接种于 $4 \times 6\text{cm}$ 玻璃培养瓶中, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞铺满单层, 接种于用多聚赖氨酸包被处理过的 96 孔培养板中, 每孔 100 μL , 细胞密度 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同样条件下继续培养 2 至 3d 即可用于实验。

2.3.2 含药血清的制备 小鼠分组与给药剂量同 2.1 (6 只/组), (1) 至 (4) 组连续 ig 5d (bid), (5) 组为正常组, ig 等量蒸馏水, 在第 5d 第二次给药后 1h 各组摘眼球取血, 4°C 下 4000rpm \times 15min, 分离上清, 56°C 水浴 30min 灭活, 4°C 冰箱保存。

2.3.3 含药血清对连二亚硫酸钠诱导 PC12 细胞缺氧缺糖损伤的影响 取长满单层 PC12 细胞的 96 孔培养板, 弃原培养液, D-Hank's 洗涤细胞 2 次, 用 D-Hank's 配制的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液 $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与细胞作用 50min, 造成细胞缺氧缺糖损伤, D-Hank's 洗涤细胞一次, 换无血清 DMEM 培养液, 对照组与模型组加入终浓度 10% 的正常血清, 给药组加入终浓度 10% 的含药血清继续培养 16h, MTT 法测定各组细胞活力, 每组 4 孔, 实验重复两次, 含药血清对 PC12 细胞损伤的保护率计算公式为:

$$\text{保护率} = (\text{含药血清组 OD}_{490} - \text{模型组 OD}_{490}) / (\text{对照组 OD}_{490} - \text{模型组 OD}_{490}) \times 100\%$$

结果如表 3 所示。

由表 3 可见 FBD 全方及三个化学部位组合的含药血清在 10% 浓度下对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导 PC12 细胞缺氧缺糖损伤有一定的改善作用, 其中[多糖+挥发油]的含药血清组作用有显著性 ($P < 0.05$), 与 FBD 全方血清组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3.4 含药血清对谷氨酸钠诱导 PC12 细胞兴奋性氨基酸损伤的影响 取长满单层 PC12 的 96 孔培养板, 弃原培养液, 无 Mg^{2+} -Earle's 洗涤细胞 2 次, 用无 Mg^{2+} -Earle's 配制的 $500\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸钠与细胞作用 40min, 造成细胞兴奋性氨基酸损伤, 无 Mg^{2+} -Earle's 液洗涤细胞一次, 换无血清 DMEM 培养液, 同 2.3.3 步骤加入各组血清继续培养 16h,

MTT 法测定各组细胞活力, 每组 4 孔, 实验重复两次。

由表 3 可见 FBD 及三个化学部位组合的含药血清在 10% 浓度下对谷氨酸钠诱导 PC12 细胞兴奋性氨基酸损伤有明显改善作用, 其中以[多糖+挥发油]的含药血清组作用最为显著 ($P < 0.05$), 与 FBD 全方血清组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 3 FBD 及不同化学部位组合的含药血清对 PC12 细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s; n = 8$)

组别	缺氧损伤		兴奋性氨基酸损伤	
	吸光度 (OD ₄₉₀)	保护率 (%)	吸光度 (OD ₄₉₀)	保护率 (%)
对照	0.597 \pm 0.031		0.583 \pm 0.036	
模型	0.284 \pm 0.043 ^{AAA}		0.272 \pm 0.059 ^{AAA}	
血清-[FBD 全方]	0.321 \pm 0.034	11.8	0.314 \pm 0.017*	13.5
血清-[多糖+挥发油]	0.340 \pm 0.053*	17.9	0.364 \pm 0.040*	29.6
血清-[多糖+挥发油+正丁醇部位]	0.306 \pm 0.055	7.0	0.340 \pm 0.044*	21.9
血清-[多糖+挥发油+水部位]	0.312 \pm 0.037	8.9	0.344 \pm 0.056*	23.2

3 讨论

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指各种脑血管疾病引起的获得性智能损害综合症, 研究资料表明有相当多的脑血管病患者梗死灶体积与痴呆的发生并无必然联系^[4], 所以脑血管疾病是否引发痴呆取决于某些与学习记忆相关的中枢结构的损害程度^[5]。有研究表明 VD 认知功能障碍主要是由于中枢胆碱能神经元受损, 导致脑内学习记忆的神经生化基础——海马环路损害而致^[6]。脑反复缺血再灌注可以造成小鼠大脑皮质和海马区神经细胞的损害, 从而表现出显著的学习记忆障碍。M 受体拮抗剂东莨菪碱可以通过影响胆碱能神经系统引起学习记忆障碍, 因此这两种模型可用于 FBD 防治 VD 的有效部位筛选研究。已做的药理学研究已经证实 FBD 可以显著改善不同模型诱导的小鼠学习记忆障碍^[2], 所以我们以 FBD 作为阳性药进行其有效部位的筛选。行为学实验结果表明, 多糖+挥发油部位可明显改善小鼠学习记忆障碍, 且其作用相当或优于 FBD 全方。

脑缺血再灌注过程中, 脑部缺氧缺糖可诱导神经元去极化、兴奋性氨基酸的过量释放、钙超载等一系列下游事件, 最终导致神经细胞损伤和死亡。因此 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导 PC12 细胞缺氧缺糖损伤以及谷氨

酸钠诱导 PC12 细胞兴奋性氨基酸损伤, 均可模拟神经细胞缺血再灌注损伤。前期研究发现 FBD 全方的正丁醇部位和水部位成分复杂, 若直接用于体外细胞实验, 易于出现假阴性和假阳性结果, FBD 多糖和挥发油部位因为具有抗肿瘤活性^[7-9], 对 PC12 细胞的直接杀伤会掩盖它对 PC12 细胞损伤模型的影响, 所以不论是单部位还是多部位组合都不适于直接用于体外细胞实验。本研究采用血清药理学方法^[10], 发现含药血清对 PC12 细胞缺氧缺糖损伤和兴奋性氨基酸损伤均有较明显的改善作用, 其中多糖+ 挥发油部位效果最好, 且其作用相当甚至优于 FBD 全方。

整体动物行为学和细胞药理学筛选结果表现一致, 均显示 FBD 防治血管性痴呆的有效部位可能为总多糖和挥发油部位。

参考文献:

- [1] 刘孟渊, 刘惠纯. 当归芍药散治疗老年期痴呆的研究 [J]. 中成药, 1999, 21(8): 428-430.
- [2] 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 II ——抗脑老化组方功效相似性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8

(4): 18-20.

- [3] 李巍, 严徽瑾, 赵慧敏. 脑缺血再灌对小鼠学习记忆的影响及药物防护 [J]. 中国康复医学杂志, 1995, 10(2): 67-69.
- [4] 苗建亭, 游国雄, 王者晋, 等. 脑脊液胆碱酯酶测定对血管性痴呆诊断价值的探讨 [J]. 中风与神经疾病杂志, 1999, 16(6): 364-366.
- [5] Hulette C, Nochlin D, McKeel D, et al. clinical neuropathologic findings in multiinfarct dementia [J]. Neurology, 1997, 48(3): 668-674.
- [6] 苗建亭, 游国雄, 王者晋. 血管性痴呆大鼠记忆障碍与海马胆碱能神经元关系的研究 [J]. 中华老年医学杂志, 1997, 16(3): 327-329.
- [7] 徐琳本, 肖梅英, 樊湘红. 羧甲基茯苓多糖口服液的免疫作用及抗肿瘤作用研究 [J]. 中成药, 2000, 22(3): 222-224.
- [8] 王翕, 刘玉瑛, 史天良, 等. 白术挥发油抗实体瘤的作用研究 [J]. 中国药物与临床, 2002, 2(4): 239-240.
- [9] 王瑾, 刘君炎, 夏丰年. 当归多糖促进疫苗抗癌作用初探 [J]. 辽宁中医杂志, 1999, 26(1): 39-40.
- [10] 包金凤, 刘国卿, 李子中. 脑力智宝对 PC12 细胞缺血性损伤的保护作用 [J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(2): 126-129.