

• 药理 •

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

林志宏, 朱丹妮, 严永清, 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: 观察茯苓、白术与当归合用组方(FBD)与当归芍药散(DSS)抗脑老化作用相似性; 方法: 筛选记忆功能异常小鼠, 连续6w sc D-半乳糖致脑老化, 用穿梭仪检测小鼠记忆功能, 测定大脑皮层与海马蛋白质含量、皮层丙二醛(MDA)含量与海马乙酰胆碱酯酶(AchE)活性; 结果: 2.3g/kgFBD与2.8g/kgDSS可缩短模型组小鼠遭受电击时间, 显著抑制D-半乳糖诱导的蛋白质含量下降, MDA含量升高, 及AchE活性增强($p < 0.05$ 或 0.01); 结论: FBD与DSS在抗脑老化上可能存在作用相似性。

关键词: 当归芍药散; 老化; 脑; D-半乳糖; 动物模型

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)04-0018-03

Study II on Substance Basis and Mechanism of Action of Danggui Shaoyao San in the Protection and Treatment of Senile Dementia —— Similar Efficacy in the Treatment of Brain Aging

LIN Zhi-hong, ZHU Dun-ni, YAN Yong-qing, YU Bo-yang

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

Abstract: To observe the similarity between Danggui Shaoyao San(DSS) and FBD made up of *poria*, *rhizoma atractylodis macrocephalae* and *radix angelicae sinensis* in the treatment of brain aging, the mice with innate memory dysfunction were screened in water maze test beforehand, then brain aging model was established with D-galactose(D-gal) for 6 weeks. Once each weekend from 3rd to 6th week, the stimulate time taken by mice to avoid passively electric stimulate had been detected in shuttle box test for 4 times in total. In addition, soluble protein content in cortex and hippocampus, melondialdehyde(MDA) content in cortex, and acetylcholinesterase(AchE) activity in hippocampus were examined after memory detection. Results showed 2.3g/kg FBD and 2.8g/kg DSS shortened stimulate time taken by brain aging mice, and inhibited obviously the decreasing soluble protein content, the increasing MDA content, and the growing AchE activity induced by D-gal in cortex and hippocampus($p < 0.05$ or 0.01).

Key words: Danggui Shaoyao San; D-galactose; aging; brain; animal model

当归芍药散(Danggui Shaoyao San, DSS)源于汉·张仲景《金匱要略》,由当归、白芍、川芎、茯苓、白术、泽泻6味药组成,具有活血补血,健脾利湿功效。本实验室研究发现DSS可对抗D-gal诱导的亚急性衰老小鼠出现的记忆损害,并明显升高其脑内SOD活性、降低MDA含量,可治疗老年期痴呆^[1]。已有报道显示DSS中茯苓、白术与当归各自具有抗衰老、抗脂质过氧化与清除自由基作用^[2-4]。方剂学上,如果3药合用其功效与全方相似,也具有活血补血,健

脾利湿功效。我们推测茯苓、白术与当归合用(简称FBD)的药理作用至少在某些方面可能也与DSS全方相似。本研究应用D-gal诱导老年前期先天记忆功能异常小鼠亚急性脑老化,以观察比较FBD与DSS对拟脑老化小鼠记忆功能与一些神经生化学指标的影响。

1 实验材料

1.1 制剂 当归、炒白芍、白茯苓、炒白术、川芎、炒泽泻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 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels, *Paeonia lactiflora* Pall, *Poria cocos* (schw) Wolf, *Atractylodes macrocephala* Koidz, *Ligusticum chuan-*

收稿日期: 2001-09-29

基金项目: 国家新药基金资助项目(96-901-05-38)

nxiong Holt. *Alisma orientale*(Sam.) Juzep.。DSS 各药用量按《金匱要略》比例: 当归: 白芍: 茯苓: 白术: 川芎: 泽泻= 3: 16: 4: 4: 8: 8; FBD 各药用量按自拟比例: 当归: 茯苓: 白术= 3: 10: 5。各混合加水冷浸 3h, 16 倍量水煮沸 2 × 1h, 合并 2 次滤液分别制成浓度为 0.046 0.092g 生药/ml FBD 水提液与 0.110g 生药/ml DSS 水提液, 4℃下保存备用, 实验中所用的 FBD 与 DSS 剂量均以各水提液计算。

1.2 药品 D-半乳糖(D-galactose, D-gal), 上海试剂二厂生产(批号: 20000825), 临用前用生理盐水溶解, 高速分散配成 3% 溶液。

1.3 动物 雄性昆明种小鼠, 6 月龄, 体重 40 ± 5g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。

1.4 仪器 XCS-2 小鼠穿梭程序自动控制仪与 SMG-2 水迷宫程序自动控制仪配备行为学实验 1.0 软件, 中国医学科学院药物研究所; Z323K 冷冻高速离心机, 德国 Hermle labor technik; DU640 核酸蛋白分析仪, 美国 Beckman coulter; XHF-1 高速分散器, 上海金达生化仪器厂; 电热恒温水浴锅, 江苏省医疗器械厂。

1.5 统计分析 使用 NDST4.4 软件包进行统计, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计时资料用调和均数法将资料对数转换后行组间 t 或 t' 检验, 计量资料行组间 t 或 t' 检验。

2 实验方法

在正式实验前, 用单盲端水迷宫对小鼠进行空间记忆能力测试, 记忆正常小鼠游泳时间为 15 ± 10s, 连续 2 次游泳时间超过 30s 且运动机能正常小鼠作为先天记忆功能异常小鼠, 用于实验。将 40 只小鼠随机均分为 5 组: 对照组、模型组、FBD 高、低剂量组与 DSS 组。模型组与给药组每天无菌颈背部 sc 1.0ml 3% D-gal, 连续 6w; 对照组 sc 等量生理盐水。给药组给药量为 0.5ml 水提液/20g 体重, 从 4w 开始, 连续 2w (4-5w), ig 1.2, 2.3g/kg FBD 与 2.8g/kg DSS, qd × 14d, 其中 1.2g/kg FBD 与 2.8g/kg DSS 所给当归药量相等。

分别于 3w、4w、5w 与 6w 最后 1d, 用小鼠穿梭程序自动控制仪让小鼠完成穿梭作业 1 次, 设定作业参数: 循环次数: 10; 间隔时间: 3s; 蜂鸣时间即条件刺激时间: 3s; 刺激时间即非条件刺激时间: 10s。微机记录小鼠遭受的电击时间(stimulate time)以判断小鼠记忆功能。

7w 断头处死小鼠, 冰台上迅速取大脑皮层与海

马组织, 冷生理盐水(0.86%)清洗吸干后, 电子天平称重, 以冷生理盐水为介质, 用高速分散器与玻璃匀浆器制备 10% 组织匀浆, 4000rpm × 10min 离心匀浆, 按试剂盒[蛋白质定量试剂盒(批号: 20010315)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号: 20010315)与乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)测定试剂盒(批号: 20000905), 均购自南京建成生物工程研究所]说明操作, 分别取 50μl 皮层或海马匀浆上清双缩脲法测组织蛋白质含量, 100μl 皮层匀浆上清测皮层 MDA 含量, 30μl 海马匀浆上清测海马 AchE 活性。

3 实验结果

3.1 行为学检测 小鼠穿梭程序自动控制仪可用于连续观察小鼠被动回避反应能力; 电击时间是指动物在被动回避过程受到电刺激的时间和, 该值愈小, 说明动物被动反应愈敏捷。在实验上半期连续 sc D-gal 3w 后, 模型组小鼠在穿梭仪中的电击时间, 显著长于对照组($p < 0.05$), 提示模型组小鼠存在明显记忆障碍; 进而, 在 4w 与 5w, 模型组小鼠电击时间更加长于对照组($p < 0.01$), 提示模型组小鼠记忆障碍继续加重; 直到 6w, 模型组小鼠刺激时间有所缩短, 但与对照组比较仍然差异显著($p < 0.05$), 表明 D-gal 确可加重小鼠记忆障碍, 模型可靠。在 4~5w 给药期间, 1.2、2.3g/kg FBD 与 2.8g/kg DSS 均可缩短小鼠遭受的刺激时间, 但以 2.3g/kg FBD 作用显著($p < 0.05$); 1.2g/kg FBD 与 2.8g/kg DSS 虽有一定改善作用, 但无显著意义($p > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 FBD 与 DSS 对穿梭仪中 D-gal 损伤小鼠遭受电击时间的影响($\bar{x} \pm s; n = 8$)

组别	剂量 (g/kg)	电击时间(Lgs)			
		3w	4w	5w	6w
对照组	—	1.17 ± 0.16	1.18 ± 0.13	1.13 ± 0.05	1.17 ± 0.11
模型组	—	1.33 ± 0.14 [△]	1.45 ± 0.21 ^{△△}	1.36 ± 0.16 ^{△△}	1.31 ± 0.12 [△]
DSS 组	2.8	1.27 ± 0.22	1.37 ± 0.14	1.40 ± 0.22	1.24 ± 0.20
FBD 组	2.3	1.25 ± 0.14	1.24 ± 0.16*	1.23 ± 0.07*	1.18 ± 0.20
	1.2	1.28 ± 0.14	1.31 ± 0.21	1.31 ± 0.13	

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs 对照组;

刺激参数: 循环次数: 10; 间隔时间: 3s; 蜂鸣时间: 3s; 刺激时间: 10s

3.2 神经生物化学测定 经 D-gal 处理的小鼠在与记忆关系密切的脑区大脑皮层与海马组织, 多项生化指标表现异常: 与对照组比较, 皮层与海马可溶性蛋白质含量下降, 皮层脂质过氧化加重, MDA 含量

升高, 海马 AchE 活性增强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 2.3g/kgFBD 与 2.8g/kgDSS 均可极显著升高皮层蛋白质含量 ($P < 0.01$), 也显著升高海马蛋白质含量 ($P < 0.05$); 此外, 2.8g/kgDSS 可显著降低皮层 MDA 含量 ($P < 0.05$), 极显著抑制海马 AchE 活性 ($P < 0.01$); 同样, 2.3g/kgFBD 也可极显著降低皮层 MDA 含量 ($P < 0.01$) 且抑制海马 AchE 活性 ($P < 0.01$)。1.2g/kgFBD 组实验后期数量逐渐下降, 故未进行神经生化测定。结果见表 2。

表 2 FBD 与 DSS 对 D-gal 损伤小鼠大脑皮层与海马蛋白质含量、皮层 MDA 含量与海马 AchE 活性的影响 ($\bar{x} \pm s; n = 8$)

组别	剂量 (g/kg)	蛋白质(mg/ml)		MDA (nmol/mg pro)	AchE (Hmol/ml)
		皮层	海马		
对照组	-	2.75 ± 1.09	7.68 ± 1.91	21.94 ± 6.39	0.34 ± 0.17
模型组	-	1.73 ± 0.89 [△]	4.96 ± 0.97 ^{△△}	34.64 ± 13.43 [△]	0.87 ± 0.12 ^{△△}
DSS 组	2.8	2.87 ± 0.38 [*]	6.60 ± 1.64 [*]	18.59 ± 3.27 [*]	0.67 ± 0.05 [*]
FBD 组	2.3	3.40 ± 0.91 [*]	6.70 ± 1.18 [*]	15.43 ± 5.85 [*]	0.55 ± 0.21 [*]

4 讨论

本实验首先用水迷宫筛选出老年前期先天记忆功能异常小鼠, 进而连续 6w sc 3% D-gal, 可使模型小鼠在穿梭仪中的电击时间较对照组明显延长, 使老年前期小鼠先天记忆功能异常进行性加重。FBD 与 DSS 均可缩短模型小鼠的电击时间, 改善其记忆功能障碍。而且, 经 D-gal 处理的小鼠与对照组比较在大脑皮层与海马的可溶性蛋白质含量下降明显, 皮层 MDA 含量显著升高, 符合衰老的差误学说、蛋白质变性学说与自由基学说^[6]。FBD 与 DSS 均可显著增加大脑皮层与海马的可溶性蛋白质含量, 这可能与促进基因表达, 提高 RNA 合成与抑制蛋白质变性等有关^[5]。FBD 与 DSS 也可明显降低皮层 MDA 含量, 这可能源于组方药物的抗氧化与清除自由基作用^[2-4]。值得注意的是, 自然衰老的 AchE 活性应降低而非升高, 本实验因为采用 D-gal 处理老年前期先天记忆功能异常小鼠, 故 AchE 活性变化有别于自然衰老情形。过高活性的 AchE 将加速记忆相关神经递质乙酰胆碱 (Ach) 分解, 使其含量下降, 这一定程度上会加重小鼠记忆障碍。FBD 与 DSS 均可显著抑制 AchE 活性, 从而有可能减缓 Ach 分解, 改善记

忆障碍。总体上, FBD 与 DSS 抗脑老化作用相似。

老年期痴呆, 属中医学“老年呆证”、“文痴”、“癡”、“言语错乱”、“郁证”等范畴。本病病位在脑, 与心、肾、肝、脾关系密切, 其共同病因为虚、痰、瘀^[7]。DSS 为一有效防治老年期痴呆经典古方, 具有补血活血化瘀、健脾利湿化痰功效, 其补中寓泻又泻中求补, 既益气养血, 又化痰逐瘀, 切中虚、痰、瘀。在 DSS 中, 当归、白芍与川芎均为血分药, 川芎活血, 白芍养血, 当归则兼具活血养血之功, 其药性辛温与川芎同, 其归经肝脾与白芍同, 且三者配伍关系以相须相使为主, 故当归似可作三药代表; 茯苓与泽泻均药性甘淡归肾经, 为利水渗湿药, 故茯苓似可作两药代表; 白术性甘温归脾胃经, 功专补气健脾, 燥湿利水, 似为他药不可代替。因此, 方剂学上, FBD 与 DSS 在药性、归经与功效方面均极为相似, 故临床主治存在相似, 顺理成章。同时, 这种组方相似性也内在决定了二者在现代医学中的药理作用与临床应用上可能也存在相似性。

参考文献:

- [1] 寇俊萍, 禹志领, 刘中, 等. 当归芍药散对小鼠学习记忆及脑内 SOD、MDA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1997, 3(4): 24-27.
- [2] 林晓明, 冯建英, 龙珠, 等. 银耳、茯苓、绞股蓝对小鼠免疫功能和清除自由基的作用[J]. 北京医科大学学报, 1995, 27(6): 455-457.
- [3] 李怀荆, 郭忠兴, 毛金军, 等. 白术水煎剂对老年小鼠抗衰老作用的影响[J]. 佳木斯医学院学报, 1996, 19(1): 9-10.
- [4] 吴慧平, 孔令东, 吴美娟, 等. 当归不同炮制品清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(10): 599-601.
- [5] 李文彬, 韦丰, 范明, 等. D-半乳糖在小鼠上诱导的拟脑老化效应[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(2): 93-95.
- [6] 韩太真, 吴馥梅. 学习与记忆的神经生物学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 349.
- [7] 谢颖楨, 梅建勋, 王同胜, 等. 中医药治疗老年期痴呆的研究概况[J]. 北京中医药大学学报, 1997, 20(5): 61-64.