

• 药理 •

# 六味地黄汤含药血清对海马神经元突触活动的影响

杨 胜, 刘振伟, 周文霞, 张永祥(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:**目的: 研究六味地黄汤益智作用的机理。方法: 应用血清药理学和电生理方法, 观察六味地黄汤含药血清对原代培养大鼠海马神经元自发突触活动的影响。结果: 含药血清作用 48h 可明显增加海马神经元自发动作电流(spontaneous action current, sAC) 和微小兴奋性突触后电流(miniature excitatory post synaptic current, mEPSC) 的产生频率, 但并不影响 mEPSC 的幅度。结论: 六味地黄汤可作用于突触前位点对海马神经元突触活动产生调节作用, 该作用可能是其调节海马神经元的兴奋性进而发挥益智作用的机制之一。

**关键词:** 六味地黄汤; 突触活动; 膜片钳; 海马

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)04-0022-04

## Effect of the Serum from Liuwei Dihuang Decoction-treated Rats on Excitatory Synaptic Activity of Hippocampal Neurons

YANG Sheng, LIU Zhen-wei, ZHOU Wen-xia, ZHANG Yong-xiang  
(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850)

**Abstract:** Aim To investigate the mechanism underlying the cognition-enhancing effect of Liuwei Dihuang decoction (LW). Method Whole-cell recording technique was used to observe the spontaneous synaptic activity of rat hippocampal neurons cultured with the serum from LW-treated rats, termed LW-containing serum(LWCS). Results After the hippocampal neurons were treated with LWCS for 48h, the frequency of spontaneous action current(sAC) and miniature excitatory post-synaptic current(mEPSC) were significantly increased, but the amplitude of mEPSC remained unchanged. Conclusion LWCS enhanced spontaneous synaptic activity of the hippocampal neurons possibly by affecting the pre-synaptic site of the neurons and this may contribute to the cognition-enhancing effect of LW.

**Key words:** Liuwei Dihuang decoction(LW); synaptic activity; hippocampal; patch clamp

六味地黄汤(LW)是中医滋补肾阴的经典代表名方,由熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮及茯苓组成,用于“滋补肾阴、填补肾精”,主治肝肾阴虚、腰膝酸软、头晕目眩、耳鸣耳聋、遗精、消渴、盗汗、骨蒸潮热、小便淋沥等肾阴不足之证。近年来我们从神经内分泌免疫调节(NIM)网络的角度对 LW 的药理作用进行了系统研究,发现 LW 具有益智作用<sup>[1]</sup>。研究表明,口服给予 LW 可明显改善快速老化模型小鼠(Senescence Accelerated Mouse, SAM)的学习记忆功能<sup>[2]</sup>,对正常及卵巢切除大鼠海马齿状回 LTP 的诱发均具有明显增强作用<sup>[3,4]</sup>。进一步研究发现, LW 及其活性成分对下丘脑-垂体-肾上腺及性腺轴的平衡具有调节作用<sup>[5,6]</sup>,对脑内学习记忆功能有关基因的表达具有调节作用<sup>[7]</sup>。聂伟等应用血清药理学方

法观察了 LW 含药血清(LW-containing serum, LWCS)对大鼠原代培养海马神经元存活的影响,结果表明, LWCS 可提高神经元的存活<sup>[8]</sup>。以上结果提示, LW 的益智作用是通过多途径、多环节而实现的,其中易化海马的突出传递过程是重要环节之一。本研究应用血清药理学和电生理方法,观察 LWCS 对原代培养大鼠海马神经元自发突触活动的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 药物** 六味地黄汤汤剂由本所植化室协助制备,方中熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮和茯苓按 8:4:4:3:3:3 的比例混合,加入 6 倍量蒸馏水煎煮 3h 取煎液,药渣同法再煎煮一次,过滤,与第一次煎煮滤液混合,减压浓缩至浓度为 1g(生药)/ml,灭菌后 4℃保存备用。

**1.2 含药血清制备** 取 Wistar 大鼠(200~250g)随机分为对照组和 LW 给药组,每组 6 只。给药组口服给予 LW 10g/kg,每日 1 次,连续 3d,对照组口服给

予等容积生理盐水。于末次给药后 1h 股动脉取血,离心分离血清,56℃ 孵温 30min,真空冷冻干燥,然后用等体积 DMEM 溶解,过滤除菌,-30℃ 保存备用。

**1.3 新生大鼠海马神经元培养** 出生 24h 内的 Wistar 大鼠冷冻麻醉后,无菌条件下分离海马并投入冰冷 0.01M PBS(含 10mM 葡萄糖)中,剪碎后用 0.125% 胰蛋白酶(Gibco, USA)于 37℃ 消化 20min,然后用小牛血清终止反应。用无血清 DMEM 洗涤神经细胞后重新悬浮于 DMEM 培养基(含 2mM 谷氨酰胺,25mM 葡萄糖,10% 胎牛血清和 10% 马血清)中,计数后调整细胞浓度。将细胞悬液(30 万/ml)加入预先用 50 $\mu$ g/ml 多聚赖氨酸(sigma, USA)包被的 35mm 培养板中,于 37℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>-95% 空气条件下培养,24h 后进行首次换液(DMEM 培养液中含 10% 胎牛血清),然后每周换液 2 次。于培养第 4d 时加入 3 $\mu$ g/ml 阿糖胞苷作用 48h,以抑制胶质细胞等非神经元的生长,培养至 8~9d 时分别换为对照正常血清和含药血清,使血清终浓度为 10%,继续培养 48h 后进行全细胞膜片钳记录。

**1.4 全细胞膜片钳记录<sup>[9]</sup>** 将培养细胞的饲养液换为 1.5ml 细胞外液,其组成(mmol/L)为 NaCl 140, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, Glucose 10, 用 NaOH 将 pH 值调至 7.2~7.4。应用微电极拉制仪(PC-10, Narishige Co., 日本),采用 2 步法将玻璃管拉制成尖端开口约 2 $\mu$ m 的微电极,经抛光仪(MF-830 型, Narishige Co. 日本)进行抛光处理,使充满电极内液时玻璃微电极的电极电阻约 3~5M $\Omega$ 。电极内液的组成(mmol/L)为 KCl 140, HEPES 10, EGTA 10, Na<sub>2</sub>ATP 2, 调 pH 为 7.2~7.4。在倒置相差显微镜下,通过微操纵仪将充满电极内液的记录电极轻轻压向细胞表面,并通过示波器监测电极电阻的变化。当记录电极一接触到细胞膜表面时,由于电极电阻的突然增加,此时观察到由刺激器输出到示波器上显示的封接测试脉冲所代表的电流值下降。然后再使电极稍稍下降,并迅速通过记录电极内部施加 10~30cm H<sub>2</sub>O 负压,使电极和细胞表面形成紧密封接,通常在 2~5G $\Omega$  左右。在此基础上继续施加负压或用 1.5V 5~20ms 的短时脉冲冲击破细胞膜,即形成全细胞记录,其特征是在示波器上观察到来自整个细胞膜的跨膜电容电流。全细胞记录状态通常可维持数分钟到数十分钟。

实验用的膜片钳放大器是 Axoclamp 2B, (Axon Instrument, 美国)。采样频率是 1KHz。数据采集和

处理数据用的 pClamp8.0 软件包(Axon Instrument, 美国)。

**1.5 统计学处理** 所有实验数据均以均数 $\pm$ 标准差(S)表示,两组间均数的比较采用 t 检验进行。

## 2 结果

**2.1 突触活动的基本特点** 在体外培养 7d 后,海马神经元之间由突起形成许多联系通路,表现出较活跃的突触活动。在本实验条件下,记录到的海马神经元自发突触活动以兴奋性为主,包含了如下三个部分:微小兴奋性突触后电流(miniature excitatory post synaptic current, mEPSC),自发兴奋性突触后电流(spontaneous excitatory post synaptic current, sEPSC)和自发动作电流(spontaneous action current, sAC),另有少量神经元表现有串放电(burst firing)现象。mEPSC 幅度很低,是由突触前神经元末梢囊泡中递质释放所引起的突触后膜反应,通常情况下,其频率增高反映单位时间内谷氨酸递质随机量子释放的数目增加,它不受 TTX 的影响;sEPSC 是突触前膜由自发动作电位诱发的递质释放作用于突触后神经元而引起的突触后膜反应;sAC 是神经元自发的动作电流,相当于电流钳时的动作电位(action potential, AP)。当由突触前膜自发动作电位所诱发的递质量子释放量增大,达到动作电流的阈值时,则突触后膜在 sEPSC 的基础上引起神经元兴奋,产生 sAC。

**2.2 增大 sAC 频率** 本实验所记录的 sAC 的幅度和半数复极时间等参数与文献报道基本一致。LWSC 作用 48h 后, sAC 的频率由 0.8 $\pm$ 0.1Hz 增加到 1.6 $\pm$ 0.6Hz ( $P < 0.05$ ,  $n = 10$ ),但幅度无明显变化,对照组与给药组分别为 -1833 $\pm$ 192 和 -1792 $\pm$ 152 pA ( $P > 0.3$ ,  $n = 10$ )。(图 1)

**2.3 增大 mEPSC 频率** 应用 TTX(0.5 $\mu$ M)阻断 sAC 和 sEPSC 后,可记录到 mEPSC。LWSC 作用 48h 后, mEPSC 的频率从 5.2 $\pm$ 0.5Hz 增加到 6.5 $\pm$ 0.7Hz ( $P < 0.05$ ,  $n = 10$ ),其幅度无明显变化,对照组与给药组 pA 分别为 35.2 $\pm$ 16.5 和 40.0 $\pm$ 16.6 ( $P > 0.2$ ,  $n = 10$ )。(图 2)

## 3 讨论

神经系统活动的特点是能在由神经元及其突起组成的各级神经环路中进行快速而准确的信息传输,因此,突触活动是完成各种信息传递的基础。在体外培养条件下,突触活动的出现是神经元之间形成功能性突触联系的标志。本实验条件下所记录到的突触活动主要是由谷氨酸所介导的兴奋性突触活

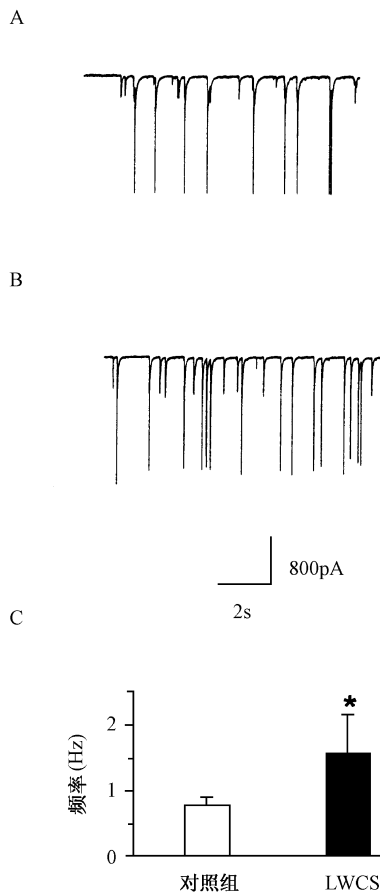


图1 LWCS对大鼠海马神经元自发动作电流的影响

A: 对照血清处理组的海马神经元动作电流图例; B: LWCS处理组的海马神经元动作电流图例; C: 自发动作电流频率比较; 与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ,  $n = 10$ 。

动,应用 CNQX (10mM) 可阻断绝大多数突触活动,表明 AMPA 受体亚型介导了所记录到的突触活动,这种突触活动对于神经系统的生长发育过程是十分重要的。在神经元兴奋的过程中,神经元之间的突触更加稳定和成熟,并可激活胞内信号传导途径,启动一系列细胞生理过程如诱导神经营养因子的分泌等,进一步促进突起的生长和分枝,形成更多的突触联系等。

本研究应用血清药理学的方法,观察了 LWCS 对大鼠原代培养海马神经元突触活动的影响,发现 LWCS 能明显增加神经元的 sAC 发放频率,但不影响其时程和幅度。神经元突触活动的改变可由多种原因所引起,如突触前量子释放频率改变、突触后受体数量或反应性改变等。在含药血清的作用下,海马神经元 mEPSC 的产生频率明显增加,但幅度无明显变化。LWCS 的这一作用特点与一些神经营养因子的作用具有类似之处。McLean 等应用原代培养海马神经元研究了 BDNF 的作用,发现 BDNF 使 AM-

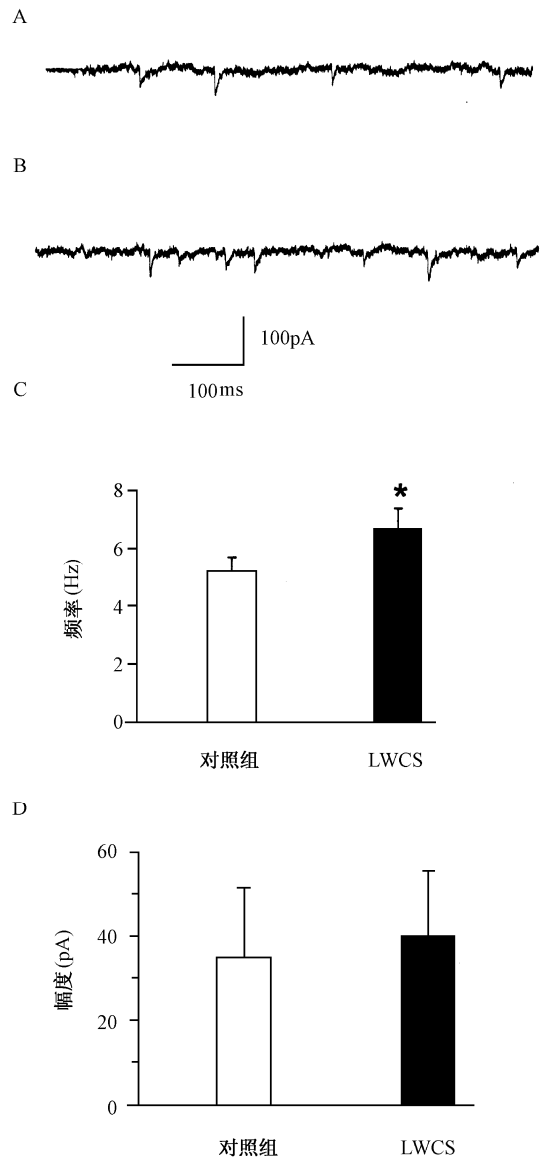


图2 LWCS对大鼠海马神经元 mEPSC 的影响

A: 对照血清处理组的海马神经元 mEPSC 图例; B: LWCS 处理组的海马神经元 mEPSC 图例; C: mEPSC 频率比较; D: mEPSC 幅度比较。与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ,  $n = 10$ 。

PA 受体所介导的 mEPSP 幅度明显增加,增强突触的兴奋性传递过程,导致 sAP 的发放频率增加<sup>[10]</sup>。Li 等也观察到 BDNF 可使 sEPSC 的频率增加 1 倍, mEPSC 的频率增加 2 倍,而对其幅度无明显影响<sup>[11]</sup>。目前认为, mEPSC 频率改变而幅度不变的现象是由突触前量子释放的频率变化所造成的, LWCS 的作用与 BDNF 相似,可能也作用于突触前膜,使囊泡的量子释放增加。因而有理由认为,含药血清中所含的活性物质作用于神经元的突触前,通过促进谷氨酸的量子释放而增强兴奋性突触活动,这一作用可能是 LW 易化海马的突触传递过程、发挥益智作用的重要机制之一,进一步的研究正在进行当中。

参考文献:

- [1] 张永祥. 六味地黄汤现代药理学及化学的初步研究[J]. 基础医学与临床, 2000, 20(5): 15-19.
- [2] 周建政, 张永祥, 周金黄. 六味地黄汤对快速老化模型小鼠(SAM)学习记忆能力的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(4): 29-33.
- [3] ZHOU Jian Zheng, ZHANG Yong Xiang, LIU Chuan Gui, et al. Inhibitory effect of corticosterone on the formation of long-term potentiation in rat hippocampal dentate gyrus[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 1999, 13(4): 241-244.
- [4] 聂伟, 张永祥, 周金黄. 雌激素对卵巢切除大鼠海马长时程增强的影响[J]. 中国神经科学杂志, 2001, 17(4): 335-337.
- [5] Zhou Jian Zheng, Zhang Yong Xiang and Zhou Jian Huang. Neurotoxic effect of corticosterone on primary cultured hippocampal neurons and its relationship with excitatory amino acids[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 1999, 13(3): 161-164.
- [6] 聂伟, 张永祥. 雌激素对卵巢切除动物认知功能的影响及对海马神经元的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(5): 321-325.
- [7] 魏小龙, 张永祥, 周金黄. 海马学习记忆有关基因及六味地黄汤益智作用与基因表达关系的研究[J]. 生理科学进展, 2000, 31(3): 227-230.
- [8] 聂伟, 张永祥, 周金黄. 六味地黄汤及其活性组分含药血清对原代培养海马神经元的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(6): 14-17.
- [9] 刘振伟, 李立君, 刘传贵. 海马脑片盲法膜片钳全细胞记录技术[J]. 生理学报, 2001, 53(5): 405-408.
- [10] McLean BM, Pittman AJ, Lo DC. Brain-Derived Neurotrophic Factor Differentially Regulates Excitatory and Inhibitory Synaptic Transmission in Hippocampal Cultures[J]. J Neurosci, 2000, 20(8): 3221-3232.
- [11] Li YX, Zhang Y, Lester HA, et al. Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons[J]. J Neurosci, 1998, 18(24): 10231-10240.