

加味温胆汤对 SAM-P/10 老化痴呆鼠 三个脑区递质氨基酸的影响

王平, 刘玲, 张六通, 邱幸凡, 石学敏
(湖北中医学院老年医学研究所, 武汉 430061)

摘要:目的: 探讨中药加味温胆汤改善脑功能的中枢机制。方法: 采用高效液相技术系统观察 SAM-P/10 鼠脑内皮层、海马、纹状体等与学习记忆关系密切的脑内 8 种氨基酸水平的变化。结果: 加味温胆汤 1 号方对于海马、纹状体异常升高的 γ -GABA 水平表现出明显降低作用。加味温胆汤预防方对皮层降低的 Tau 水平有明显升高 ($P < 0.01$), 1 号方亦有明显升高 ($P < 0.05$), 2 号方和西药仅表现上升趋势。结论: 加味温胆汤 1 号对 SAM-P/10 皮层、海马、纹状体的 Clu 等 EAAs 亢进状态有显著的调节作用, 对于抑制性氨基酸 IAAs 的调节作用表现在对异常升高的 γ -GABA 水平的降低和使降低的 Tau 水平上升。

关键词: 老年痴呆; 动物模型; 中医药疗法; 氨基酸

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)04-0024-04

The Influence of Xinnao Yizhi Prescription on IAAs in Hippocampi, Cortex and Striate Body of Brain of SAM-P/10

WANG Ping, ZHANG Liu-tong, SHI Xue-min, QIU Xingfang, LIU Ling

(Institute of Geriatrics, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Hubei, 430061)

Abstract: Objective: to explore the centre mechanism that Xinnao Yizhi prescription improve the function of brain. Methods: to use high performance liquid chromatography to observe the change of 8 amino acids of SAM-P/10's brain, which has close relation with learning memory. Results: preventive prescription and prescription No. I dropped the level of abnormal increased γ -GABA obviously ($P < 0.01$ or 0.05), so did western medicine ($P < 0.05$), prescription No. II had no obvious effect. Preventive prescription increased the level of Tau in cortex significantly ($P < 0.01$), so did prescription No. I ($P < 0.05$), prescription No. II and western medicine only had increasing tendency. Conclusion: Prescription No. I that reinforces kidney, resolves phlegm, and restores a clear head regulates abnormal increased EAAs obviously, which is better than that of prescription No. II that reinforces kidney, remove stasis. Preventive prescription has the best effect and is better than western medicine. Preventive prescription that drop the level of γ -GABA and reduce the level of Tau has the best effect. It prompts that Xinnao Yizhi prescription can regulated the level of SAM-P/10's EAAs and IAAs obviously, This provide bases for the clinical use of Xinnao Yizhi prescription on the encephalic senility and senile dementia.

Key words: senile dementia/models; animal/therapeutic method of TCM/amino acid

近年来, 兴奋性氨基酸 (EAAs) 与抑制性氨基酸 (IAAs) 和老年痴呆发病以及学习记忆的密切关系已引起重视。IAAs 中的 γ 氨基丁酸 (γ -GABA)、牛磺酸 (Tau) 与学习、记忆的关系也逐渐明了。从而为老年痴呆防治药物的研究开辟了新的途径^[1]。SAM-P/10 老化鼠是日本京都大学继 SAM-P/8 鼠后开发研制的新的以脑萎缩伴学习记忆障碍为主要特征的动物模型, 其脑内氨基酸水平亦有明显改变, 是目前研究老年痴呆较为理想的自然发病模型。本课题采用高效

液相技术拟系统观察 SAM-P/10 鼠脑内皮层、海马、纹状体等与学习记忆关系密切的脑内抑制性氨基酸水平的变化, 并观察加味温胆汤 (JWWD) 的治疗效果, 从而探讨中药改善脑功能的中枢机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 选择 7 月龄 SAM-P/10 痴呆鼠 100 只, 随机分为 5 组, 即加味温胆汤 1 号、2 号、预防组、西药组、空白对照组各 1 组, 每组 20 只, 另选 7 月龄 SAM-R/1 正常老化鼠 20 只, 作同龄青年对照。各组动物均雌雄各半。由天津中医学院一附院动物房提供。

1.2 给药途径、剂量、方法 加味温胆汤 1 号方由

收稿日期: 2001-02-06

基金项目: 湖北省自然科学基金重点资助项目 No: 99J086

法半夏、陈皮、枳实、竹茹、白芥子、石菖蒲、胆星、远志、熟地、制首乌、人参、茯苓等组成;加味温胆汤2号方由法半夏、陈皮、枳实、竹茹、石菖蒲、远志、益智仁、丹参、熟地、制首乌、当归等组成。中药采用江苏天江制药有限公司生产的免煎中药颗粒剂。(批号:961009),用前按配方混匀,煎煮10min。经换算得加味温胆汤1号方小白鼠药量为24g(相当原生药)/kg体重/日,加味温胆汤2号方为19g(相当原生药)/kg体重/日,中药预防组为加味温胆汤1号方12g(相当原生药)/kg体重/日,西药喜得镇(Hydergine,瑞士山德士药厂、天津华津药厂合作生产。批号:970135,)各组均每日1次,0.4~0.6ml/次,灌胃给药,对照组灌以等量自来水。预防组给药1个月后,各组同时开始给药,连续36d。

1.3 仪器与试剂 仪器:日本岛津(Shimadzu)公司IC-6A型高效液相色谱仪(HPLC),IC-6A型高压泵,CTC-6A柱温箱,L-ECD-6A电化学检测器,LC-6B控制系统,C-R4A数据处理机,美国UAQ超纯水器,瑞典LKB公司2021型活动冷室,上海医用分析仪器厂TGL-16G台式高速离心机,SONICATOR XL型细胞超声粉碎仪,BECKMANJ2-21型美国产、低温高速离心机。

试剂:氨基酸标准品均购自Sigma公司,无水乙

酸钠、乙腈、甲醇、无水乙酸等试剂均为国产分析纯。

1.4 样品制备与检测 各组动物同期断头处死,在冰台上快速取出左侧海马、皮层、纹状体(1.5min之内),置于深低温冰箱(-80℃)待测。取样品用0.1mmol/L HCl 1/10(W/V)超声粉碎。蛋白测定采用双缩脲法,取20μl样品液加入碱性铜试剂2.5ml,酚试剂0.5ml,混匀,室温放置0.5h,于650nm处测其浓度。将余下的样品液12000rpm 4℃离心10min,取上清液200μl加入100μl的0.5mmol/L NaHCO₃和2.4硝基氟苯衍生剂25μl,置60℃水浴60min,再加入0.1mmol/L磷酸盐缓冲液稀释至1ml,混合后高速离心12000rpm 10min,取上清待测。取上清20μl注入Shimadzu 6A HPLC。用紫外检测器定量检测8种氨基酸。色谱条件:流动相,乙酸钠:乙腈=73:27,色谱柱ODS-C18,柱温为35℃,检测波长UV-360nm,流速1.0ml/min,L-ECD-6A设定电位±0.7V,检测范围为:2nA(全刻度),机压为138kg/cm²。检测指标为:γ-氨基丁酸(γ-GABA)、甘氨酸(Gly)、牛磺酸(Tau)、丙氨酸(Ala)。用成组样品t检验及方差分析方法进行统计学处理。

2 实验结果

各组动物各部位脑组织氨基酸检测结果见表1~表3。

表1 各组皮层抑制性氨基酸 IAAs 含量(μmol/g)($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	γ-GABA	Tau	Gly	Ala
P/10JWWD 预防组	10	5.53 ± 1.60	54.78 ± 15.07 ^{△△}	2.12 ± 0.29	2.87 ± 0.45
P/10JWWD1 号组	10	5.99 ± 1.19	50.68 ± 8.30 [△]	2.72 ± 0.97	2.42 ± 0.54
P/10JWWD2 号组	10	6.73 ± 1.31	45.37 ± 13.93	3.53 ± 1.51	2.87 ± 0.84
P/10 西药治疗组	10	6.57 ± 3.04	44.11 ± 8.15	2.82 ± 0.64	3.46 ± 3.01
P/10 空白对照组	8	7.38 ± 2.78	36.13 ± 7.22 ^{▲▲}	4.65 ± 1.41	3.17 ± 2.71
R/1 同龄对照组	8	6.71 ± 2.66	58.51 ± 13.94 ^{△△}	3.59 ± 0.27	2.48 ± 1.35

注:与P/10空白组比较[△]P<0.05,^{△△}P<0.01;与R/1组比较[▲]P<0.05,^{▲▲}P<0.01(下同)

表2 各组海马抑制性氨基酸 IAAs 含量(μmol/g)($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	γ-GABA	Tau	Gly	Ala
P/10JWWD 预防组	10	6.37 ± 2.48 ^{△△}	61.36 ± 24.08	4.24 ± 2.37	3.48 ± 1.11
P/10JWWD1 号组	10	6.85 ± 2.29 [△]	53.93 ± 7.92	2.97 ± 1.12	2.89 ± 0.98
P/10JWWD2 号组	10	8.68 ± 3.67	48.0 ± 10.48 ^{▲▲}	2.90 ± 0.82	2.98 ± 1.29
P/10 西药治疗组	10	7.32 ± 3.42	48.59 ± 9.85 [▲]	3.00 ± 1.25	2.69 ± 1.28
P/10 空白对照组	8	11.2 ± 3.99 ^{▲▲}	45.06 ± 11.06 ^{▲▲}	2.97 ± 0.36	2.79 ± 1.49
R/1 同龄对照组	8	6.72 ± 1.97 ^{△△}	75.18 ± 26.25 ^{△△}	3.37 ± 2.59	4.75 ± 2.72

表3 各组纹状体抑制性氨基酸 IAAs 含量比较($\mu\text{mol/g}$) ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	r-GABA	Tau	Gly	Ala
P/10JWWD 预防组	10	8.91 \pm 4.53 ^{△△}	60.56 \pm 28.39	2.47 \pm 0.62	2.29 \pm 0.69
P/10JWWD1 号组	10	9.93 \pm 6.00 ^{△△}	50.25 \pm 8.51 ^{▲▲}	3.33 \pm 1.01	2.91 \pm 1.14
P/10JWWD2 号组	10	10.92 \pm 3.51	51.57 \pm 10.45 ^{▲▲}	4.66 \pm 2.28	2.16 \pm 1.34
P/10 西药治疗组	10	10.11 \pm 4.44 [△]	60.16 \pm 9.79 [▲]	3.33 \pm 1.03	2.22 \pm 1.11
P/10 空白对照组	8	15.81 \pm 4.65 ^{▲▲}	47.7 \pm 9.89 ^{▲▲}	3.92 \pm 0.63	1.58 \pm 0.67 ^{▲▲}
R/1 同龄对照组	8	7.03 \pm 2.35 ^{△△}	82.86 \pm 29.24 ^{△△}	4.13 \pm 3.48	3.38 \pm 1.23 ^{△△}

3 讨论与分析

3.1 SAM-P/10 老化痴呆鼠脑组织氨基酸代谢改变的特点 本研究采用 HPLC-电化学检测法系统观察了与学习、记忆及老年痴呆发病关系密切的海马、皮层及纹状体的氨基酸类递质的变化。实验结果表明,与正常老化的 SAM-R/1 品系比较, SAM-P/10 上述三个部位的氨基酸存在着不同程度的代谢异常,(兴奋性氨基酸的变化另文发表)抑制性氨基酸 IAAs 的变化表现为:

(1) SAM-P/10 空白组皮层、海马、纹状体 r-GABA 均较 R/1 组有明显升高,但皮层无明显差异;牛磺酸(Tau)在三个部位均见明显降低($P < 0.01$),甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)变化不规律,与 R/1 品系比较未见显著差异。

(2) 醒脑预防方、醒脑 1 号方对于海马、纹状体异常升高的 r-GABA 水平表现出明显的降低作用($P < 0.01$ 或 0.05),西药组亦有一定作用($P < 0.05$),而醒脑 2 号方未见明显作用。

(3) 醒脑预防方对皮层降低的牛磺酸(Tau)水平有明显升高作用($P < 0.01$),醒脑 1 号方亦见此作用($P < 0.05$)而 2 号方和西药则仅见上升趋势。治疗各组对海马、纹状体下降的牛磺酸水平均有升高趋势,但与空白组比较无显著意义。

3.2 IAAs 与学习记忆及神经系统衰老的关系 对于抑制性氨基酸与学习、记忆的研究以 r-GABA 和牛磺酸(taurine)为多。在脑内 Glu 由 Glu 脱羧酶催化合成 r-GABA,存在于脑内 20%~40% 的突触内,两者关系密切。正常情况下, Glu 在学习记忆中的作用表现为正性调节作用,而许多实验表明 r-GABA 升高则可明显损害动物的学习记忆和记忆巩固,表现出

一种负性调节作用。新近有学者提出脑内 Glu/GABA 学习记忆调节系统的新理论观点,并针对性地提出开发 Glu 脱羧酶抑制剂型促智药物的新思路。

牛磺酸(Tau)是新生动物脑中含量最丰富的游离氨基酸,随着脑的发育牛磺酸水平下降,成年动物大脑中牛磺酸的含量仅为新生动物的 1/3。在发育成熟的脑中,其含量仅次于谷氨酸。Tau 在脑的发育及神经细胞的分化成熟中发挥着重要作用。衰老时组织脂褐质含量明显增高,而 Tau 可使其下降。Shibanki 等的实验表明细胞外 Tau 水平与 NMDA 受体有密切关系。Tau 可能通过 TCP 和 NMDA 受体间接或直接调节神经系统的可塑性。牛磺酸(Tau)的增智、抗衰老作用正引起广泛的关注。本研究发现 SAM-P/10 老化痴呆鼠表现为皮层、海马、纹状体部位的 r-GABA 升高和 Tau 的下降,对于进一步研究抑制性氨基酸递质在脑老化与老年痴呆中的作用具有重要意义。

3.3 加味温胆汤对 SAM-P/10 脑氨基酸代谢作用的分析 本实验结果表明:补肾化痰醒脑开窍的加味温胆汤 1 号方对 SAM-P/10 皮层、海马、纹状体的 Glu 等 EAAs 亢进状态有显著调节作用,优于以补肾化痰、醒脑开窍为主的加味温胆汤 2 号方。其中又以加味温胆汤 1 号方预防给药组效果最为显著,且明显优于西药组。对于抑制性氨基酸 IAAs 的调节作用表现在对异常升高的 γ -GABA 水平的降低和使降低的 Tau 水平上升,也是以醒脑预防方效果最为明显,其作用部位最明显的是皮层的 Tau 和海马、纹状体的 γ -GABA。提示加味温胆汤对于快速老化的 SAM-P/10 老化痴呆鼠的 IAAs 的代谢亢进和失调有明显调节作用,这为加味温胆汤在脑衰老及老年痴

呆中的运用提供了依据,其作用具体在合成和降解以及旁路转化的哪个环节上,还有待进一步确定和研究。

参考文献:

- [1] 张士善. 脑内 Glu/GABA 学习记忆调节系统[J]. 药学学报, 1997, 32(8): 638-640.
- [2] 王光建. 递质谷氨酸障碍与 Alzheimer 病[J]. 中国心理卫生杂志, 1990, 4(1): 14.
- [3] 韩景献. 日本快速老化模型小白鼠(SAM) 老化诸特征[J]. 实验动物科学与管理, 1995, 4: 21.
- [4] 王平, 张六通, 邱幸凡. 加味温胆汤改良方对 SAM-P/10 老化痴呆鼠行为学的影响[J]. 中国行为医学科学, 1999, (2): 95-96.
- [5] 王平, 张六通, 邱幸凡. 醒脑益智方对 SAM-P/10 老化痴呆鼠脑皮层、海马、纹状体 Ach、AChE 活性的影响[J]. 中国老年医学杂志, 2000, (2): 102-103.