

- [7] Wang Y. Research and development of p53 gene [J]. *Foreign Med Sci; Cancer Sect* (国外医学:肿瘤学分册), 1993, 29(3): 129.
- [8] Xiao C J. Apoptosis and correlated genes and tumors [J]. *Jiangxi Med J* (江西医药), 1996, 31(5): 300.
- [9] Oh S J, Im M Y. The p53 mutation which abrogates transactivation while maintaining its growth suppression activity [J]. *Mol Cells*, 2000, 10(4): 386-391.
- [10] Kaneuchi M, Yamasita T, Shindoh M, et al. Induction of apoptosis by the p53-273L (Arg→Leu) mutant in HSC3 cells without transactivation of p21 Waf1/Cip1/Sd1 and bax [J]. *Mol Carcinog*, 1999, 26(1): 44-52.
- [11] Yu C C, Filipe M I. Update on proliferation associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffine embedded tissue and their clinical applications [J]. *Histochem J*, 1993, 25(12): 843-853.

苁蓉总苷对血管性痴呆大鼠学习记忆的影响及机制研究

卓 聪¹, 王传社^{2,3}, 巫冠中¹, 胡 梅¹, 屠鹏飞^{2,4*}

(1. 中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009; 2. 北京大学 中医药现代研究中心, 北京 100083;

3. 北京大学 基础医学院, 北京 100083; 4. 北京大学 药学院, 北京 100083)

人口的老齡化已使寻找安全有效的防治老年痴呆症药物成为药物研究的热点。近年来, 中医学使用以补肾益髓为主、兼补心脾的方法治疗老年痴呆症取得了较大的进展。肉苁蓉始载于《神农本草经》, 具有补肾阳、益精血、润肠通便之功效, 现广泛用于治疗老年性痴呆、阳痿、习惯性便秘等病症^[1,2]。研究表明其具有抗痴呆、抗氧化、抗缺氧、抗辐射、增强免疫功能等作用, 主要成分为苯乙醇苷类^[3~6]。苁蓉总苷是从管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schrenk) R. Wight 的干燥肉质茎中提取精制而成的, 含苯乙醇苷类 90.7%, 其中含主要成分松果菊苷 (echinacoside) 44.3%。本实验研究苁蓉总苷对血管性痴呆大鼠学习记忆障碍以及正常大鼠血栓形成和血小板聚集的影响, 为其开发成为促智和防治老年性痴呆症的新药提供依据。

1 材料

1.1 动物: SD 大鼠, 雄性, 体重 470~570 g, 由上海西普马-必凯实验动物有限公司提供, 合格证号: 沪动合格字第 152 号。

1.2 药物与试剂: 苁蓉总苷, 管花肉苁蓉的提取物, 含苯乙醇总苷 90.7%、松果菊苷 44.3%, 深褐色粉末, 由北京大学中医药现代研究中心化学室提供, 批号为 980601。吡拉西坦片, 宜兴制药厂生产, 批号为 980521。阿司匹林肠溶片, 南京第二制药厂生产, 批号为 000402。各药用前以蒸馏水配制。肝素钠, 中国医药(集团)上海化学试剂公司产品, 批号为 F000128。戊巴比妥钠, 中国医药(集团)上海化学试

剂公司进口分装, 批号为 971104。二磷酸腺苷二钠 (ADP), 中科院上海生化所东风生化技术公司产品, 批号为 9305122, 用前配成 1 mg/mL 储备液冰箱保存, 用时以磷酸缓冲液稀释 3 倍。

1.3 仪器: MG-3 型 Y 型电迷宫, 张家港教学实验器械厂生产。SPA-4 多功能血小板聚集仪, 上海科达测试仪器厂生产。

2 方法

2.1 大鼠局灶性脑缺血-再灌注致血管性痴呆模型制备及检测

2.1.1 分组与给药: 将大鼠按体重随机分为 6 组, 分别为假手术组、模型组、阳性对照组 (吡拉西坦 300 mg/kg) 及苁蓉总苷高、中、低剂量 (200、100、50 mg/kg) 组。各组 ig 给药, 0.5 mL/100 g, 每日 1 次, 假手术组和模型组给予等体积的蒸馏水, 连续给药 30 d。

2.1.2 模型的制备^[7]: 于给药的 16 天, 大鼠以水合氯醛 360 mg/kg ip 麻醉。正中切开颈部皮肤, 分离右侧颈部肌肉, 游离颈总动脉和颈外动脉, 结扎并剪断颈外动脉分支。分离颈内动脉, 直至暴露翼腭突动脉。用动脉夹夹闭该侧颈总动脉, 颈外动脉切口, 将头端钝圆、直径 0.28 mm 的碳素渔线从大鼠颈外动脉插入颈内动脉并进入颅内, 直到有轻微阻力, 这时大脑中动脉的所有血供被阻断。缺血 40 min 后将渔线抽出, 结扎颈外动脉, 再通颈总动脉, 消毒、缝合, im 青霉素防止感染。假手术组只分离和结扎颈外动脉, 不插渔线、不夹闭颈总动脉。

收稿日期: 2005-01-20

基金项目: 科技部创新药物与中药现代化专项 (96-910-05-248)

作者简介: 卓 聪 (1967-), 男, 讲师, 主要从事神经药理学研究工作。E-mail: gacongcepu@163.com

* 通讯作者 屠鹏飞 Tel/Fax: (010) 82802850 E-mail: pengfeitu@bjmu.edu.cn

2.1.3 学习记忆测试^[8]:于手术后第 7 天,采用 Y 型电迷宫进行学习记忆训练和测试。实验在安静、暗环境下进行,将大鼠置于其中的一臂(固定的起步区),在灯光下适应 2 min,然后给予电击。在左臂设灯光信号,为安全区,右臂有电流无灯光,为危险区。电击强度以大鼠受电击后能奔跑为准,电压为 50~60 V。大鼠受电击后逃至安全区为正确,逃至危险区为错误,每次训练后在安全区停留 30 s 以巩固记忆。再次训练时在起步区灯光下休息 10 s,反复 10 次,记录正确和错误次数,计算正确反应率。每次训练均在给药后 1 h 进行,连续测定 4 d。然后以左右臂交替为安全区再测定 4 d,记录正确和错误次数,并计算正确反应率。

正确反应率 = 正确反应数 / 训练次数

2.2 大鼠动-静脉旁路血栓形成及检测^[8]:将大鼠按体重随机分为 5 组,分别为模型组、阳性对照组(阿司匹林 100 mg/kg)、苁蓉总苷高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)组。各组 ig 给药,0.5 mL/(100 g),模型组给等体积的蒸馏水,连续给药 7 d。末次给药后,ip 戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉,仰卧位固定,分离右颈总动脉和左颈外静脉。将一根长 7 cm 的 4 号手术丝线称质量后放入 3 段聚乙烯管的中段,使接触血液的丝线长 6 cm,以 50 U/mL 的肝素生理盐水充满整个聚乙烯管。将静脉端插入左颈外静脉后,从动脉端准确地注入 50 U/kg 的肝素生理盐水抗凝,然后将动脉端插入右颈总动脉。给药后 1 h 打开动静脉旁路,开放 15 min 后中断血流,迅速取出丝线置称量纸上,用电子分析天平称湿质量,计算血栓抑制率。

血栓抑制率 = (模型组血栓质量 - 给药组血栓质量) / 模型组血栓质量 × 100%

2.3 大鼠血小板体外聚集的检测^[8]:将大鼠按体重

随机分为 5 组,分别为正常对照组、阳性对照组(阿司匹林 100 mg/kg)及苁蓉总苷给药组(剂量同上)。给药方法同 2.2 项。末次给药前禁食 12 h,于末次给药后 1 h 从腹主动脉取血,以 3.8% 枸橼酸钠(1:9)抗凝,轻轻混匀后,以 1 000 r/min 离心 3 min,吸出上层富含血小板血浆(PPR),余血继续在 3 000 r/min 离心 10 min,上清为贫血小板血浆(PPP)。比浊管中加入 200 μL PPR,并以 PPP 调零点,预保温 5 min 后加入 50 μL ADP 溶液诱导血小板聚集,测定血小板聚集强度,计算血小板聚集抑制率。

聚集抑制率 = (正常组最大聚集率 - 给药组最大聚集率) / 正常组最大聚集率 × 100%

2.4 统计处理:结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用组间比较的 *t* 检验对数据进行统计处理。

3 结果

3.1 对局灶性脑缺血-再灌注致血管性痴呆模型大鼠学习记忆功能的影响:结果见表 1。测试的前 4 d 各组平均正确反应率逐日提高,第 4 天各组平均正确反应率均达到 90% 以上。前 3 d 苁蓉总苷各剂量组和阳性组的平均正确反应率均高于模型组,差异显著 ($P < 0.05, 0.01$),说明苁蓉总苷 50、100、200 mg/kg ig 给药能明显提高局灶性脑缺血-再灌注的血管性痴呆大鼠迷宫训练时的正确反应率,即苁蓉总苷对该模型所致的学习记忆功能障碍有明显的保护作用。第 4 天各组的平均正确反应率无明显的差异,第 5 天以左右臂交替作为安全区后,各组的平均正确反应率均明显下降,但各组之间无明显差异。随后各组的平均正确反应率又逐步提高,但各组之间平均正确反应率亦无显著差异。表明苁蓉总苷只能使脑损伤大鼠学习记忆功能恢复到一定程度,且学习方式的改变不影响已获得的学习记忆能力。

表 1 苁蓉总苷对局灶性脑缺血-再灌注致血管性痴呆大鼠学习记忆功能的影响

Table 1 Effect of cistanchis glycosides on learning and memory function of vascular dementia rats induced by focal cerebral ischemia-reperfusion

组别	动物/ 只	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	训练时程内的平均正确反应率/%							
			固定一臂作为安全区				两臂交替作为安全区			
			第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天
假手术	10	—	72 ± 19**	85 ± 11*	90 ± 7*	93 ± 9	67 ± 15	87 ± 9	94 ± 8	97 ± 5
模型	11	—	38 ± 26	61 ± 31	77 ± 19	91 ± 16	74 ± 17	93 ± 11	95 ± 8	91 ± 10
阳性	11	300	64 ± 27*	83 ± 14*	92 ± 10*	97 ± 5	79 ± 17	90 ± 15	91 ± 10	98 ± 4*
苁蓉总苷	10	200	63 ± 21*	84 ± 16*	91 ± 7*	96 ± 5	68 ± 5	84 ± 15	94 ± 7	94 ± 7
	10	100	79 ± 16**	86 ± 14*	93 ± 8*	96 ± 7	72 ± 20	87 ± 12	92 ± 9	97 ± 7
	10	50	73 ± 15**	91 ± 10**	98 ± 4**	96 ± 7	71 ± 15	92 ± 11	90 ± 15	96 ± 7

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 对大鼠动-静脉旁路血栓形成的影响:结果见表 2。与模型组比较,苁蓉总苷 200、100 mg/kg ig 给药能明显抑制大鼠动-静脉旁路血栓形成,但其作用均明显弱于 100 mg/kg 阿司匹林。苁蓉总苷 50 mg/kg 对大鼠动-静脉旁路血栓形成无影响。说明苁蓉总苷对整体动物动-静脉旁路血栓的形成有一定抑制作用。

表 2 苁蓉总苷对大鼠动-静脉旁路血栓形成的影响 (n=10)

Table 2 Effect of cistanchis glycosides on arteriovenous shunt thrombosis of rats (n=10)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血栓湿质量/mg	血栓抑制率/%
模型	—	44.9±3.83	—
阳性	100	29.2±4.00**	34.97
苁蓉总苷	200	37.7±7.42*	16.04
	100	36.1±5.16*	19.60
	50	42.6±7.12	5.12

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

3.3 对 ADP 诱导的大鼠血小板体外聚集的影响:结果见表 3。与正常组比较,苁蓉总苷 200、100、50 mg/kg ig 给药均能明显抑制 ADP 诱导的大鼠体外血小板聚集,以 200 mg/kg 组的抑制率最高,达到 59.48%。

表 3 苁蓉总苷对 ADP 诱导的大鼠体外血小板聚集功能的影响

Table 3 Effect of cistanchis glycosides on platelet aggregation in vitro induced by ADP

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	最大聚集率/%	聚集抑制率/%
模型	—	10	54.82±7.88	—
阳性	100	11	32.73±11.14**	40.30
苁蓉总苷	200	10	22.21±6.23**	59.48
	100	11	34.54±15.69*	36.99
	50	10	31.65±12.81**	42.26

与正常组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs normal group

4 讨论

老年性痴呆一般可分为 4 种,即阿尔茨海默病(AD)、血管性痴呆(VD)、混合性痴呆(前两者并存)及由全身性疾病引发的老年人痴呆。流行病学调查显示,西方国家 AD 的发病率高于 VD,而我国则不同,根据 11 个城市的普查,VD 的患病率高于 AD^[9]。VD 系由脑血管因素导致脑组织损害所引起的痴呆综合征的总称。中医认为本病多属本虚标实,随着年龄的增加,机体肾中精气渐亏,髓海渐虚,脏腑功能渐衰,脏衰则致机体水液输布、气血运行失常,进而出现痰浊血瘀等病理产物堆积体内,痰瘀交

阻而致脑络受损,气血无以渗灌,窍络升降不利,神机失统,记忆匮乏,发为痴呆。因此,本病的特点是因虚致实、虚实夹杂,肾虚是老年性痴呆发生发展的根本原因,痰浊停聚和脉络瘀阻后化毒为害,损伤脑络则是该病发病过程中的基本病理环节。

肉苁蓉是传统的补益壮阳药,具有补肾填精及润肠作用,《本草经疏》称其为补精血、滋肾之要药,对肾虚所致倦怠、健忘、听力减退及遗尿等症状有较好的疗效。朱志明等对治疗老年性痴呆的 46 个复方的药物组成进行了分析,发现肉苁蓉是常用药物之一^[1]。本实验中,大鼠在 ig 给药的第 16 天,进行局灶性脑缺血-再灌注致 VD 模型制备,继续给药的第 7 天开始进行学习记忆的训练和测试。在测试的前 3 d,模型组的平均正确反应率明显低于假手术组大鼠,说明脑缺血-再灌注损伤造成模型大鼠学习记忆功能障碍;而苁蓉总苷各剂量组大鼠的平均正确反应率明显高于模型组,与假手术组大鼠的水平相当,说明肉苁蓉对 VD 大鼠的学习记忆障碍确有预防和治疗作用,苁蓉总苷为其抗痴呆的有效成分。

VD 的发病原因及发病机制相当复杂,目前尚不十分清楚。近年研究表明,VD 的危险因素包括与卒中有关和与卒中无关的因素,总结为高血压、心脏病、高血脂、糖尿病、血容积比容、教育水平、年龄、性别等,而其发病机制则与多发性梗死、重要部位的单个梗死、脑白质缺血等有关^[10,11]。本实验中,ig 给予苁蓉总苷 7 d 的大鼠动-静脉旁路血栓湿质量明显低于模型组,即苁蓉总苷能明显抑制整体动物体内血栓形成;结果还表明苁蓉总苷体内给药可明显抑制 ADP 诱导的大鼠体外血小板聚集。综合两个实验结果,可以发现苁蓉总苷预防和治疗 VD 的机制可能与抑制机体血小板聚集有关。

References:

[1] Zhu Z M, Zhou Y S, Ouyang J H. Analysis of 46 traditional Chinese medical compound for the treatment of senile dementia [J]. *Hunan J Tradit Chin Med* (湖南中医杂志), 2001, 17(1): 60-61.
 [2] Yu F. Research advances of cistanche in clinical application [J]. *Inner Mongolia Med J* (内蒙古医学杂志), 2003, 35(6): 535-536.
 [3] Liang M H, Sun P Y, Cao Y. Effect of glycosides of cistanche on lipid peroxidation in hemorrhagic shock/reperfusion injury rabbits [J]. *J Chin Microcirc* (中国微循环), 2000, 4(4): 230-231.
 [4] Shang X Y, Wang X W, Wang X F, et al. Protective effect of glycosides of cistanche on immune function of ⁶⁰Co-ray irradiated mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(2): 139-142.
 [5] Wu L Y, Wang X W, Zao R M. The protective effect of the glycosides of cistanche on the cerebral hypoxia in mice [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2003, 26(6):

- 561-562.
- [6] Muteliefu G, Liu M J, Lu J F. Effect of cistanoside compounds on oxidative stress and immunity [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2001, 10(3): 157-160.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理学实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing, People's Medical Publishing House, 2002.
- [9] Wu F Q. Cerebrovascular dementia [J]. *Adv Cardiovasc Dis* (心血管病学进展), 1993, 14(2): 90-92.
- [10] Skoon I. Status of risk factors for vascular dementia [J]. *Neuroepidemiology*, 1998, 17(1): 2-6.
- [11] Loeb C. Mental deterioration related to lacunar infarctions [J]. *Heart Dis Stroke*, 1994, 23: 75-81.

氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞动作电位和单通道钠电流的影响

陈霞¹, 张文杰², 吕文伟¹, 李英骥², 钟国赣^{2*}

(1. 吉林大学基础医学院 药理教研室, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学基础医学院 生理教研室, 吉林 长春 130021)

氧化苦参碱 (oxymatrine) 是从豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 中提取的一种生物碱。氧化苦参碱对心血管系统的作用较为显著, 具有强心、抗心律失常、抑制细胞凋亡、清除自由基及抑制豚鼠心室肌全细胞钠电流等多方面的药理作用^[1,2]。但关于氧化苦参碱对豚鼠心室肌单细胞动作电位及单通道钠电流的影响尚未见报道, 因此本实验拟在细胞和单通道水平观察氧化苦参碱的作用, 为探讨氧化苦参碱抗心律失常作用机制提供理论依据。

1 材料

豚鼠, 雌雄兼用, 体重 300~350 g, 由吉林大学实验动物部提供。氧化苦参碱 (质量分数 >99%) 由中国药品生物制品检定所提供。CEZ-2400 型膜片钳放大器为日本产品。

2 方法

2.1 单细胞动作电位的记录方法: 应用胶原酶常规分离豚鼠心室肌细胞^[3]。将尖端直径为 0.8~1.5 μm 的微电极抛光后冲灌电极液, 电阻为 1~3 MΩ。将已加正压的微电极缓缓插入溶液, 直至接触心肌细胞, 去除正压, 用注射器抽吸以形成 0.98~1.96 kPa 的负压。当电极尖端与细胞膜表面形成 1~5 GΩ 封接电阻时, 用力吸破电极尖端上的膜片, 形成全细胞记录。应用电流钳方法, 给予时程 10 ms、每秒 1 次, 幅度为 1~2 nA 的内向电流脉冲, 引导出豚鼠心室肌细胞的动作电位, 并输入计算机分析动作电位的各项指标^[4]。在细胞外液中加入 1 mmol/L 氧化苦参碱 3 min 后, 同样的方法引导动作电位, 测

量静息膜电位 (RMP)、动作电位幅值 (APA)、动作电位上升最大速率 (V_{max})、动作电位复极 50% 时程 (APD₅₀) 和动作电位复极 90% 时程 (APD₉₀) 等指标。

2.2 单通道钠电流的记录方法: 用记录单通道钠电流的电极液充灌电极后, 在显微镜下进行抛光处理, 一般电极电阻为 1~1.5 MΩ。将玻璃微电极置于细胞的表面, 通过负压吸引作用形成 10 GΩ 以上的高阻封接, 使电极尖端下的细胞膜片在电学上与周围膜片相隔离, 形成细胞贴附式的记录方式。

2.3 记录动作电位及单通道钠电流所需溶液: 记录动作电位所用灌流液 (mmol/L): NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 1.8, HEPES 5, 葡萄糖 10, 用 5 mol/L NaOH 将 pH 值调至 7.4; 记录动作电位的电极内液 (mmol/L): KCl 140, MgCl₂ 2, EGTA 2, CaCl₂ 1.8, HEPES 5, Na₂ATP 10, 用 1 mol/L KOH 将 pH 值调至 7.2。记录单通道钠电流所用的细胞外液 (mmol/L): KCl 140, NaCl 4.5, MgCl₂ · 6H₂O 0.5, EGTA 1.0, 葡萄糖 5.5, HEPES 5.0, 用 KOH 将 pH 值调至 7.3。记录单通道钠电流所用的电极液 (mmol/L): NaCl 140.0, KCl 4.0, MgCl₂ · 6H₂O 1.0, CaCl₂ 0.1, 葡萄糖 5.5, 用 NaOH 将 pH 值调至 7.3。

2.4 数据的采集和统计处理: 在实验中应用 Pclamp6.01 程序记录出原始的单通道钠电流图形, 应用 Fetchan 和 Pstat 程序分析单通道钠电流记录中得到的 64 条原始曲线, 用单指数曲线拟和统计

收稿日期: 2005-03-15

基金项目: 吉林省中医药管理局资助项目 (2004-077)

作者简介: 陈霞 (1964—), 女, 吉林省长春市人, 博士, 副教授, 主要从事药物对心脑血管系统的影响及其机制研究。

Tel: (0431) 5619799 E-mail: xiachen616@yahoo.com.cn

* 通讯作者 钟国赣 Tel: (0431) 5619472