

的 ED₅₀分别为 13. 99 (7. 60~ 19. 27) mg /kg, 15. 53 mg /kg 结果见表 2
(7. 30~ 20. 08) mg /kg 及 44. 05 (25. 32~ 76. 65) 4 讨论

表 2 夏天无胶囊剂、口服液及片剂对小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n= 10$)

Table 2 Effects of Xiatianwu capsule, oral liquid and tablet on writhing body response in mice ($\bar{x} \pm s, n= 10$)

组 别	剂 量 /(mg° kg ⁻¹)	给药后扭体次数 / (次° 10 min ⁻¹)			
		30~ 40 min	抑制率 %	40~ 50 min	抑制率 %
对照	-	22. 90± 6. 77	-	16. 20± 2. 66	-
夏天无片剂	63. 68	8. 50± 3. 84 *	62. 88	6. 20± 3. 19 *	61. 73
	31. 84	13. 70± 6. 17 *	40. 17	10. 20± 5. 60 *	37. 04
	15. 92	19. 53± 6. 02	14. 72	14. 65± 5. 82	9. 57
夏天无胶囊剂	24. 20	6. 30± 3. 47 *	72. 49	5. 20± 3. 01 *	67. 90
	12. 10	12. 90± 4. 46 *	43. 67	10. 20± 4. 21 *	37. 04
	6. 05	18. 70± 6. 48	18. 34	13. 20± 6. 02	18. 52
夏天无口服液	24. 20	7. 40± 3. 47 *	67. 69	5. 40± 2. 46 *	66. 67
	12. 10	13. 80± 5. 03 *	39. 74	11. 60± 5. 58 *	28. 40
	6. 05	19. 10± 5. 63	16. 59	15. 20± 4. 00	6. 17

与对照组比较: * P < 0. 05 ** P < 0. 01
* P < 0. 05 ** P < 0. 01 vs control group

实验结果表明: 夏天无胶囊剂及口服液在热板法及扭体法两种疼痛模型上均呈现出与夏天无片剂相似的镇痛作用,镇痛作用于给药后 30~ 60 min 达高峰,维持 120 min;且夏天无胶囊剂及口服液在两种疼痛模型上测得的 ED₅₀均明显小于夏天无片剂,说明夏天无胶囊剂及口服液的镇痛作用均强于夏天无片剂。这可能是夏天无胶囊剂及口服液与夏天无片剂的制备方法、工艺的差异而引起它们的生物利

用度不同所致

References

[1] Chen R, Yang S H, Tang X L. Progress in studies on Xiatianwu [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (12): 948-949.
[2] He X M, He X N. Experimental studies on the analgesia of Xiatianwu alkaloids [J]. *Guangdong Pharm J* (广东药学), 1998, 18(4): 23.
[3] Hu F L. Clinical use of compound Xiatianwu tablet [J]. *Shandong Med Pharm J* (山东医药), 1999, 39(5): 38.

补肾方对去卵巢大鼠学习记忆的调整作用

王悦芬¹,王彦刚²,葛喜珍¹,李 恩^{1*}

(1. 河北医科大学中西医结合研究所,河北 石家庄 050017; 2 河北医科大学中医院,河北 石家庄 050011)

摘 要:目的 探讨补肾方对去卵巢大鼠学习记忆的调整作用,为中医“肾”与“智”的关系及补肾治疗阿尔茨海默病 (Alzheimer’s disease, AD) 提供实验基础。方法 将雌性 SD 大鼠 40 只,随机分成卵巢切除组、假手术组、卵巢切除+ 补肾方治疗高、低剂量组。治疗 12 周,测定各组动物血清雌二醇 (E₂)、血清钙含量; Y 电迷宫检测学习记忆能力;测定海马组织乙酰胆碱 (ACh) 含量、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性; HE 染色观察海马组织形态学变化。结果 去卵巢 18 周,大鼠学习记忆力明显下降;海马组织 ACh 含量下降;海马锥体细胞层、分子层、多形细胞层细胞浓缩,出现大小不同空泡,锥体细胞顶树突消失,细胞排列紊乱,嗜银染色可见神经纤维增粗,大脑皮质颗粒出现老年斑。补肾方能提高血清 E₂、血清钙水平 (P < 0. 05),明显提高学习记忆成绩,并能提高海马组织 ACh 含量及 AChE 活性 (P < 0. 05),对海马神经元的变性具有明显的改善作用。结论 补肾方对雌激素缺乏所致的学习记忆能力下降具有明显的改善作用,其机制可能是通过提高血清 E₂水平,调节 Ca²⁺、P 代谢,从而提高中枢胆碱能神经系统功能实现的。

关键词: 补肾方; 卵巢切除; 阿尔茨海默病

中图分类号: R285. 5 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2003) 12- 1119- 04

* 收稿日期: 2003-03-21
作者简介: 王悦芬 (1968-),女,河北省人,河北医科大学中西医结合研究所在读博士生,专业方向为老年退行性疾病。
Tel (0311) 6265639 E-mail WYF1222@ eyou. com

Regulation of Tonifying Kidney Recipe on memory of ovariectomied rats

WANG Yue-fen¹, WANG Yan-gang², GE Xi-zhen¹, LI En¹

(1. Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Key words tonifying kidney recipe (TKR); ovariectomy; Alzheimer's disease (AD)

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种随年龄增长发生的由于神经系统进行性退变引起的痴呆性疾病,在 AD 的预防和治疗中,目前尚无疗效明确的药物,因此筛选有效的中药复方延缓神经系统退行性病变,在预防和治疗 AD 中具有重要意义。资料表明^[1],女性 AD 患病率为男性的 1.5~3 倍,排除男女年龄构成不同之后,女性患病率仍高于男性。绝经后特别是有心肌梗死、髋部骨折等病史的妇女,AD 发病率比无前述病史者高,提示雌激素缺乏在女性 AD 发生发展中具有重要意义。中医学认为“肾为先天之本,主骨生髓,主藏精和生殖”、“脑为髓之海”,绝经后妇女出现的骨质疏松、AD 等疾病的发生往往与肾虚有关,因此治疗上多采用补肾填精之法。本实验通过切除大鼠双侧卵巢造成雌激素缺乏,观察雌激素迅速丢失后学习记忆能力的变化及补肾方对学习记忆的调整作用,为中医“肾主智,肾虚则智不足”与补肾治疗 AD 提供理论基础。

1 材料

- 1.1 动物: 选用 8 月龄 SD 雌性大鼠,体重 320~380 g,由河北省实验动物中心提供。
- 1.2 药物: 补肾方: 熟地、淫羊藿、肉苁蓉、川芎等,由石家庄地区药材公司提供,经本校药用植物教研室鉴定为正品,水煎取汁。

2 方法

2.1 动物模型的建立和分组: 将 40 只 SD 雌性大鼠随机分为假手术组 (Sham 组)、卵巢切除组 (OVX 组)、卵巢切除+ 补肾方低剂量治疗组 (T1 组) 和卵巢切除+ 补肾方高剂量组 (T2 组),每组 10 只。OVX 组、T1 组、T2 组行背部切口切除双侧卵巢,Sham 组切除同样大小的脂肪。6 周后 T1、T2 组每日 ig 中药 1 次,剂量为 6.3、32 g (生药) /kg; OVX 组和 Sham 组 ig 等体积自来水。治疗 12 周后,将全部大鼠股动脉放血处死,分离血清,分装, -20℃ 放置备用。于 4℃ 迅速剥离大脑,左半侧脑组织置于 4% 的多聚甲醛中;迅速剥离右侧海马组织,并置于 -70℃ 冰箱保存备用。

2.2 各项指标的测定: 雌二醇 (E₂) 的测定采用放射免疫法,试剂盒由中国科学院核医学研究所提供。

血清钙的测定采用甲基麝香草酚蓝比色法,试剂盒由石家庄试剂公司提供。Y 迷路学习记忆能力检测^[2]: 实验采用 Y 电迷路箱 (江苏张家港生物医学仪器厂产品) 在暗室中进行。训练开始时,给予灯光信号使之适应 60 s,然后操纵电击控制器,予以 90 V、10 次 /s 的电刺激,以大鼠直接逃避至安全区为正确反应,训练 15 次,记录正确与错误次数及达正确反应时所需的时间。中枢胆碱能功能检测: 海马组织乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性和乙酰胆碱 (ACh) 含量的测定,采用改良的微量羟胺比色法^[3]; 蛋白测定采用考马斯亮蓝法。脑组织病理分别作 HE 常规染色和嗜银 (改良的 Bielschow-sky 法) 染色,光镜下观察皮层及海马各区的病理变化。

2.3 统计学方法: 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 SPSS 统计软件进行 *t* 检验。

3 结果

3.1 动物的一般表现: 实验中 OVX 组动物体重明显增加,毛发干枯; T1、T2 组和 Sham 组状况均较好,毛发光泽,体重增加不明显。

3.2 血清钙、血清 E₂ 的变化: 与 Sham 组比较, OVX 组血清 E₂ 明显降低 ($P < 0.05$),血清钙差异不显著 ($P > 0.05$); 与 OVX 组比较, T1 组血清 E₂、血清钙均明显升高 ($P < 0.05$), T2 组血清 E₂ 明显升高 ($P < 0.05$),血清钙差异不显著,见表 1。

表 1 治疗 12 周后血清钙、血清 E₂ 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Changes of Ca ²⁺ and E ₂ level in serum after 12-week treatment ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)			
组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	血清钙 / (mmol · L ⁻¹)	血清 E ₂ / (pg · mL ⁻¹)
Sham	-	2.456 ± 0.467	23.842 ± 8.407
OVX	-	2.07 ± 0.503	10.723 ± 6.777
T1	6.3	2.504 ± 0.283 [△]	20.173 ± 9.492 [△]
T2	32.0	2.364 ± 0.205	23.17 ± 7.170 [△]

与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 OVX 组比较: [△] $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ vs OVX group

3.3 学习记忆能力的变化: 与 Sham 组比较, OVX 组 Y 电迷宫测试逃避正确率明显降低 ($P < 0.01$),逃避潜伏期差异不显著; 与 OVX 组比较, T1 组 Y-迷路测试逃避正确率明显提高 ($P < 0.01$),逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.01$); T2 组 Y 迷路测试逃避正确率明显提高 ($P < 0.05$),逃避潜伏期差异不显

著 ($P>0.05$),见表 2

表 2 治疗 12周后各组大鼠学习记忆能力的变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Changes of learning and memory ability in rats after 12-week treatment ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	逃避正确率/%	逃避潜伏期/ s
Sham	-	65.00±13.30	8.9±8.71
OVX	-	45.33±15.42*	8.73±7.91
T1	6.3	63.08±15.53 $\Delta\Delta$	6.92±4.35 $\Delta\Delta$
T2	32.0	59.55±11.78 Δ	9.02±5.48

与 Sham 组比较: ** $P<0.01$;

与 OVX 组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$

** $P<0.01$ vs Sham group;

$\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs OVX group

3.4 中枢胆碱能系统的变化:与 Sham 组比较,OVX 组海马组织 Ach 含量明显降低 ($P<0.01$);海马组织 AchE 活性差异不显著 ($P>0.05$) 与 OVX 组比较, T1 组海马组织 Ach 含量及 AchE 酶活性明显升高 ($P<0.05$); T2 组海马组织 AchE 酶活性明显升高 ($P<0.05$), Ach 含量有升高的趋势 ($P>0.05$),见表 3

表 3 治疗 12周后各组大鼠海马组织 Ach 含量、AchE 酶活性的变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Changes of Ach and AchE in rat hippocampal after 12-week treatment ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	Ach/($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	AchE/($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
Sham	224.18±39.72	0.712±0.436
OVX	166.56±62.48*	0.742±0.302
T1	205.80±58.01 Δ	1.084±0.084 $\Delta\Delta$
T2	181.65±48.72	0.923±0.474 Δ

与 Sham 组比较: ** $P<0.01$;

与 OVX 组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$

** $P<0.01$ vs Sham group;

$\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs OVX group

3.5 脑组织病理形态改变: Sham 组海马锥体细胞排列整齐,海马组织层次清楚,胞膜核膜完整,顶树突起直、粗而长; OVX 组海马锥体细胞层、分子层、多形细胞层细胞浓缩,并且出现大小不同空泡,锥体细胞顶树突消失,细胞排列紊乱,嗜银染色可见神经纤维增粗,大脑皮质颞叶出现老年斑。与 OVX 组相比, T1、T2 组海马组织锥体细胞、颗粒细胞核仁清晰可见,胞膜、核膜完整,细胞排列比较整齐,颗粒变性细胞减少但仍有空泡,嗜银染色神经纤维增粗现象得到改善。

4 讨论

雌激素水平与老年妇女认知能力变化有关, AD 是一种由于神经系统进行性退变引起的痴呆性疾病

病,通常以进行性记忆丧失为首发症状。AD 妇女患者血浆中雌激素水平较同龄妇女低,手术绝经常伴有亚临床认知功能障碍等^[4]。雌激素对胆碱能系统具有重要的作用^[1,5]: AD 患者 Ach 和 AchE 活性明显降低,表明胆碱能神经系统处于低代谢状态。而神经生长因子 (NGF) 是对中枢胆碱能神经元具有生长分化和形态分化作用的生长因子,在大鼠和人的海马等神经细胞同时具有 NGF 受体 (NGFR) 和雌激素受体 (ER), NGFR 受雌激素调节,而且 ER 反应元件在 NGFR 基因的启动子区域。因此去卵巢后,由于雌激素水平下降,反馈性导致 ER 表达下降, NGFR 表达下调,影响胆碱能神经系统功能,海马组织 Ach 含量和 AchE 活性明显降低,学习记忆力明显下降。

本实验大鼠去卵巢 18 周,模型组大鼠学习记忆力明显下降,海马组织 Ach 含量明显降低,海马神经元出现颗粒空泡变性,嗜银染色可见神经纤维增粗,大脑皮质颞叶出现老年斑,这些表现与 AD 患者记忆力下降、胆碱能神经功能低下及脑组织特征性病理改变 (老年斑、颗粒空泡性、神经纤维缠结) 有许多相似之处。本实验为去除双侧卵巢复制 AD 动物模型提供参考,为进一步深入研究雌激素缺乏学说在 AD 中的作用及预防 AD 提供了依据。

“肾主智、肾虚则智不足” (《医学心悟》),说明脑髓也有赖于肾精不断化生和充养,如果肾中精气不足,气血两亏则脑失滋养而枯萎,萎则神机失用,愚笨呆痴、遇事遗忘,出现思维缓慢、兴趣减退、易疲劳等 AD 症状。因此对于老年性疾病,多采用补肾壮阳、填补精血疗法。补肾方是在此疗法指导下研制的复方。现代药理研究表明:熟地具有性激素样作用,能降低血清胆固醇和甘油三酯,并能改善脑灌流量,降低血清中过氧化脂质含量,具有清除自由基作用;淫羊藿具有提高动物耐缺氧能力和降低血清胆固醇和甘油三酯的作用;肉苁蓉含有雌二醇类似物;川芎中川芎嗪具有扩张血管、改善脑灌注的作用, H 川芎嗪能透过血脑屏障,并具有钙离子通道阻滞作用,可能为一种新的钙离子拮抗药,并具有清除自由基的作用。本研究表明补肾方治疗 12 周能明显改善卵巢切除大鼠体内的代谢紊乱状态,提高血清 E₂ 水平,增强胆碱能神经元活性,使海马组织 Ach 含量及 AchE 活性明显提高,并延缓神经细胞退行性变,从而提高学习记忆能力及反应的灵敏性。

References

[1] Henderson V W. Estrogen, cognition and a woman's risk of

- Alzheimer's disease [J]. *Am J Med*, 1997, 103(3A): 11.
- [2] Li Y K. *Methodology in Pharmacological Experiment on Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1991.
- [3] Yang H X, Wang W X, Ke J S, *et al.* Detection of whole blood acetylcholine by the method of alkali hydroxylamine compared with color [J]. *J Clin Lab Sci* (临床检验杂志), 1995, 10(2): 84-85.
- [4] Asthana S, Craft S, Baker L D, *et al.* Cognitive and neuroendocrine response to transdermal estrogen in postmenopausal woman with Alzheimer's disease: results of a placebo-controlled, double-blind, pilot study [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 1999, 24(6): 657.
- [5] Dong H T, Zhang T S, Chen Y L, *et al.* Survey and analysis on Alzheimer's disease treated by traditional Chinese medicine [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2000, (4): 17-19.
- [6] Li Q B, Mei R. *Traditional Chinese and Western Medical Diagnosis and Treatment of Senile Dementia* (老年痴呆症的中西医结合诊断与治疗) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1999.

甘草苷对四氯化碳肝脏毒性的保护作用

逮胜,戴德哉*

(中国药科大学 药理研究室,江苏 南京 210009)

离体肝灌流技术最初由英国生理学家 Trowell 于 1942 年创立,1951 年 Miller 等人改进了灌流方法,首次以此技术进行了血浆蛋白质合成的研究。近年来,离体肝灌流技术得到普遍使用,被广泛用于药理毒理学研究,适用于研究药物或化学物质引起的肝毒性^[1]。本实验采用离体肝灌流技术,通过灌流一定量的 CCl₄ 造成肝脏毒性,同时给予一定量的甘草苷,观察甘草苷对肝脏毒性的保护作用,据此分析甘草解毒的物质基础及机制。

1 材料

1.1 药品与试剂:甘草苷由本实验室分离纯化制得,经 UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 等结构测定与文献报道甘草苷一致, HPLC 检测为单一成分,纯度达到 98% 以上。RPMI Medium 1640, GIBCO BRL (Life Technologies, Inc. Grand Island N. Y. 14072 U. S. A)。ALT/GPT 测试盒,南京建成生物工程研究所,批号 20000908 AST/GO T 测试盒,南京建成生物工程研究所,批号 20000909

1.2 仪器:SHZ-B 水浴恒温振荡器,上海跃进医疗器械厂。BT03-200 恒流泵,河北保定兰格恒流泵有限公司。754 型分光光度计,上海第三分析仪器厂。

1.3 动物:SD 大鼠,体重 200~250 g,雌雄各半,由南京医科大学实验动物中心提供

2 方法

2.1 离体大鼠肝灌流模型制备^[1]:取健康大鼠,体重 200~250 g,雌雄兼用,用 3% 戊巴比妥钠 0.3

mL/100 g ip 麻醉,将麻醉大鼠仰置手术板上,沿腹部正中作工字型切口,翻开腹部两侧皮肤,将肠管推向左侧,充分暴露肝门区域。用玻璃分离针分离出门静脉,同时分离出肾静脉。在离肝门及门下约 5~6 mm 处分别用 2 根线穿过门静脉底部,各扣一个松节,用 1 根线穿过肾静脉并从肾静脉注入 6% 肝素钠 0.1 mL/mg,稍后关闭灌流泵,将离肝门远端下约 6 mm 处的线结扎,系紧门静脉,并同时结扎肾静脉的线。迅速在近端用手术剪剪一斜形切口(防止剪断),立即插入口径约 0.5 mm 塑胶管,深度约 3~4 mm,经检查插管确已入门静脉(塑胶管内有血液进入),调节深浅合适后即行节扎,开动蠕动泵剪断腹部下静脉,肉眼观察肝脏内血液基本冲洗将尽时随后分离肝脏,以正常位置置肝脏于水浴恒温 37℃ 灌流杯(防止门静脉扭曲)。

2.2 离体肝灌流:先以经过纯度 > 99.5% 氧气饱和、水浴恒温 37℃ 的 Krebs-Henseleit 等渗缓冲液,非循环性的灌流冲洗肝脏中的血液。流速约 2 mL/(g·min),灌至肝脏颜色呈土黄色,稳定 5 min 后,将塑胶管插入经过纯度 > 99.5% 氧气饱和、水浴恒温 37℃ 的 RPMI-1640 缓冲灌流液中,看到从肝脏中流出液呈红色(1640 灌流液呈红色)时,将肝脏从盛 Krebs-Henseleit 的杯中移至盛 1640 灌流液的杯中,循环性前向性的灌流(顺流),流速约 2 mL/(g·min)。不同剂量的药物用严密消毒的注射器缓慢注入盛 1640 灌流液的杯中,分别在给药

* 收稿日期:2003-04-15

基金项目:江苏省教育厅自然科学基金资助课题(KJB360003)

作者简介:逮胜(1962-),男,安徽省广德人,博士,现在中国药科大学药学院博士后流动站从事博士后研究工作。

Tel (025) 3271270 E-mail dxs0162@sina.com