

复方丹参片对阿尔茨海默病大鼠脑内氨基酸类神经递质含量的影响

覃仁安¹, 罗佳波², 陈 矛³, 黄竹英³, 王 虹³, 杨东升³, 陈松光^{3*}

- (1. 第一军医大学 博士后科研流动站、广州医药集团博士后科研工作站、广州白云山中药厂研发中心, 广东 广州 510515;
2. 第一军医大学 中医系, 广东 广州 510515; 3. 广州白云山中药厂, 广东 广州 510515)

摘要:目的 研究复方丹参片对实验性阿尔茨海默病 (AD) 大鼠脑内氨基酸类神经递质含量的影响, 揭示其防治 AD 的作用机制。方法 采用 HPLC 方法检测实验性 AD 大鼠脑内天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)、甘氨酸 (Gly) 和 γ -氨基丁酸 (GABA) 等氨基酸类神经递质的含量。结果 复方丹参片能明显降低实验性 AD 大鼠脑内兴奋性氨基酸 Glu 的含量, 升高抑制性氨基酸 Gly 和 GABA 的含量。结论 复方丹参片降低兴奋性氨基酸含量, 以对抗兴奋性氨基酸的毒性, 这可能是其防治 AD 的机制之一。

关键词: 复方丹参片; 阿尔茨海默病; 氨基酸类神经递质; 高效液相色谱

中图分类号: R286.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2004)08-0905-03

Effect of Compound Danshen Tablets on amino acid neurotransmitters in brain of Alzheimer's disease rats

QIN Ren-an¹, LUO Jia-bo², CHEN Mao³, HUANG Zhu-ying³, WANG Hong³,
YANG Dong-sheng³, CHEN Song-guang³

- (1. Postdoctoral Programme, First Military Medical University, Postdoctoral Programme Station, Guangzhou Pharmaceutical Group Co., Ltd., Research and Development Center of Materia Medica, Guangzhou Bai YunShan Factory of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Guangzhou Bai YunShan Factory of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510515, China)

Abstract: **Object** To study the effect of Compound Danshen Tablets (CDST) on the contents of amino acid neurotransmitters in brain of experimental Alzheimer's disease (AD) rats to reveal the mechanism of CDST in the prevention and treatment to AD. **Methods** Contents of amino acid neurotransmitters Asp, Glu, Gly, GABA in AD rat brain were determined by HPLC. **Results** CDST significantly decreased the excitatory Glu content, and increased the inhibitory Gly and GABA contents. **Conclusion** CDST could lower the toxicity of excitatory amino acid by decreasing its contents, which may be one of the mechanisms of CDST in prevention and treatment to AD.

Key words: Compound Danshen Tablets (CDST); Alzheimer's disease; amino acid neurotransmitters; HPLC

随着人类寿命的普遍延长, 老年痴呆发病率也在大大增加, 已成为严重威胁老年人健康的疾病之一。老年痴呆主要包括阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 和血管性痴呆 (Vascular dementia, VD)。AD 又名早老性痴呆, 是一种多源性因素引起的原发性大脑神经退行性病变, 多伴有乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性降低、氨基酸类神经递质含量改变等, 目前仍无良好的防治措施。复方丹参片由丹参、三七、冰片 3 味中药组成, 前期研究中发现复方丹参片对实验性 AD 大鼠的空间认知障碍有明显改善作用。本实验采用高效液相色谱法检测 AD 大鼠

大脑额叶皮层兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸含量, 探讨复方丹参片改善脑功能的中枢机制。

1 材料

1.1 药品与试剂: 石杉碱甲片, 上海医科大学红旗制药厂生产, 批号 020603; 复方丹参片, 广州白云山中药厂生产, 批号 030435 (每片含丹参酮 A 0.44 mg、丹参素 1.93 mg), 实验前粉碎, 过 80 目筛, 溶于新鲜蒸馏水中, 配成 6.3% 的水溶液贮存于 4℃ 冰箱中备用; D-半乳糖, Amresco 公司分装; 鹅膏蕈氨酸 (ibotenic acid, IBO), Sigma 公司产品; 氨基酸 [天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)、甘氨酸 (Gly)、-

* 收稿日期: 2003-11-13

基金项目: 广州市企业博士后基金资助项目 (200202)

作者简介: 覃仁安 (1964—), 男, 博士, 副主任中医师, 注册执业中医师, 主要研究方向为中药药理与中药制剂工艺。

Tel: (020) 87200301 Fax: (020) 87200876 E-mail: QRA @813zy.com

氨基丁酸 (GABA)] 对照品,进口分装;乙腈(色谱醇),美国 Tedia 公司;无水乙酸钠、甲醇、冰醋酸等试剂均为国产分析纯;检测用水为双蒸水。

1.2 动物:SD 大鼠,体重 300~380 g,雌雄各半,SPF 级,由第一军医大学实验动物中心提供,动物合格证号:粤检证字第 2002A040 号。

1.3 仪器:SN—2 型大鼠立体定位仪,日本产;307—6 型牙科钻车,上海医用分析仪器厂;高速冷冻离心机,Beckman 公司;超声波细胞破碎机,宁波新芝生物科技有限公司;Agilent 1100 系列高效液相色谱仪,Agilent 自动进样器,Agilent DAD 检测器;依利特 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm ×250 mm, 10 μm)。

2 方法

2.1 造模及给药:取 SD 大鼠 60 只,其中 10 只作为假手术对照组,其余 52 只大鼠 ip D-半乳糖 48 mg/(kg·d⁻¹),连续 6 周,第 7 周开始以 IBO 损毁双侧 Meynert 基底核,具体操作见文献方法^[1,2];假手术对照组按同样操作,予以等量生理盐水。术后缝合皮肤,3 d 内 im 青霉素抗感染。将假手术组以外的存活动物随机分为 4 组:模型对照组,石杉碱甲组,复方丹参片大、小剂量(生药 0.630、0.315 g/kg,其中大剂量相当于成人临床等效剂量)组,各组连续 ig 给药 2 个月。实验结束后,各组动物同期断头处死,在冰台上快速取出左侧额叶皮层,置于低温冰箱(-80℃)待测。

2.2 色谱条件:流动相由 A (0.1 mol/L 乙酸钠, pH 6.4) 及 B (乙腈) 组成,体积流量 1.0 mL/min,采用梯度洗脱,0 时为 A 90%-B 10%,经 25 min 至 A 40%-B 60%,柱温为室温,检测波长 360 nm。

2.3 对照品溶液的制备:精密称取氨基酸对照品适量,分别置棕色瓶中,用双蒸水配成 1 mg/mL 的对照品溶液,4℃ 冰箱保存。

2.4 衍生化反应:取氨基酸对照品混合液 200 μL (每种氨基酸各取 50 μL),加 100 μL 0.5 mmol/L NaHCO₃ 和 2,4-二硝基氟苯衍生剂 25 μL,置 60℃ 水浴 60 min,再加入 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液稀释至 1 mL,混合后 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.45 μm 孔径滤膜,进样 5 μL,按 2.2 项色谱条件进行梯度洗脱。

2.5 样品测定^[3]:取待测样品用 0.1 mmol/L HCl 按 1:10 超声粉碎,蛋白测定采用考马斯亮蓝法。将样品液于 12 000 r/min、4℃ 离心 10 min,取上清液 200 μL,按 2.4 项方法进行衍生化反应后,取上

清液过 0.45 μm 孔径滤膜,进样 10 μL,按 2.2 项色谱条件进行梯度洗脱,定量方法采用峰面积外标法(各氨基酸在 0.1~1.2 μg 呈良好线性, $r=0.9993\sim0.9999$)。

2.6 数据处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件包处理。

3 结果

3.1 色谱结果:在上述色谱条件下,经 25 min 梯度洗脱则将 Asp、Glu、Gly、GABA 分离,其保留时间依次为 4.7、6.2、12.6、14.2 min,见图 1。

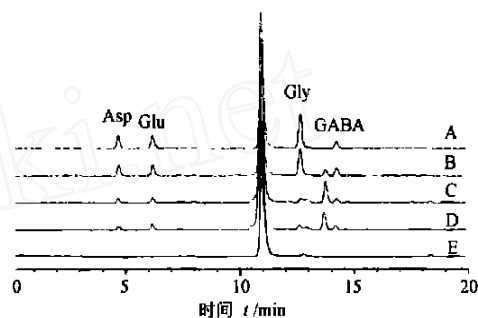


图 1 混合对照品(A)、混合对照品+正常大鼠样品(B)、模型组(C)、复方丹参片大剂量组(D)和溶剂空白(E)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance (A), reference substance + samples for normal rats (B), model group (C), high CDST group (D) and solution blank (E)

3.2 精密度试验:取混合氨基酸对照品溶液(4种对照品溶液等体积混合)5 μL,重复进样5次,按 2.2 项色谱条件测定,其精密度 RSD 均不高于 1.8%。

3.3 样品测定结果:见图 1 和表 1。结果表明,复方丹参片对实验性 AD 大鼠大脑皮层 Glu 升高有明显的抑制作用,能增加 AD 大鼠大脑皮层抑制性氨基酸 Gly 及 GABA 的含量,与模型组比较差异均有显著性 ($P < 0.05, 0.01$)

4 讨论

复方丹参片由丹参、三七、冰片 3 味中药组成。丹参主要含有脂溶性的丹参酮类成分和水溶性的丹参素、丹酚酸两大类成分。现代研究表明,丹参酮对原代大鼠神经细胞缺血性损伤有明显的保护作用^[4];丹参能明显改善单侧颞叶缺血性损害大鼠的空间认知能力障碍^[5],总丹酚酸有抗脑缺血和抑制 Glu 释放的作用^[6]。三七的主要成分为三萜皂苷,是与人参皂苷类似的一类成分,其对实验性脑缺血有明显的保护作用;三七醇提物对樟柳碱造成的小鼠

表 1 复方丹参片对 AD 大鼠大脑氨基酸类神经递质含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of CDST on contents of amino acid neurotransmitters in brain of AD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 /只	剂量 /(g·kg ⁻¹)	蛋白 /(g·L ⁻¹)	Asp /(μmol·g ⁻¹)	Glu /(μmol·g ⁻¹)	Gly /(μmol·g ⁻¹)	GABA /(μmol·g ⁻¹)
假手术	8	-	17.93 ± 2.91 [*]	14.84 ± 3.53	20.25 ± 7.70	9.80 ± 2.37 [*]	36.27 ± 10.83
模型	9	-	14.72 ± 2.28	13.08 ± 2.33	15.62 ± 5.82	7.52 ± 1.90	31.69 ± 5.60
石杉碱甲	7	2.3 × 10 ⁻⁵	17.52 ± 3.15	13.30 ± 2.86	14.22 ± 3.20	10.54 ± 3.31	28.02 ± 7.90
复方丹参片	7	0.315	16.85 ± 2.79	15.37 ± 5.25	10.78 ± 3.83	10.79 ± 2.01 ^{**}	38.97 ± 8.92
	7	0.630	16.41 ± 2.41	15.85 ± 2.02 [*]	10.44 ± 2.67 ^{*#}	11.56 ± 3.87 [*]	41.75 ± 8.72 ^{**#}

与模型组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01; 与石杉碱甲组比较: # P < 0.05 ## P < 0.01

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs model group; # P < 0.05 ## P < 0.01 vs Huperzine A group

记忆障碍、对 NaNO₂造成的小鼠记忆障碍均有明显的改善作用^[7]。冰片有改善血脑屏障通透性的作用^[8],从而能提高脑部的药物浓度,增强丹参、三七的神经药理作用。目前复方丹参片主要用于冠心病、心绞痛的治疗,从目前的研究结果来看,复方丹参片今后在脑血管疾病及老年退行性脑病的防治方面将会发挥积极的作用。

Asp、Glu、Gly 和 GABA 是神经药理中常涉及到的 4 种递质,前两种为兴奋性氨基酸 (EAAs),后两种为抑制性氨基酸 (IAAs)。近年来,有关 EAAs 和 IAAs 与 AD 发病及学习记忆的密切关系已引起重视,一般认为 EAAs 具有神经毒性,其大量释放可致神经细胞损伤,与 Ca²⁺ 超载有关^[9];IAAs 具有突触后抑制作用,可通过减少 Ca²⁺ 内流而发挥神经保护作用。本研究发现,复方丹参片能明显降低实验性 AD 大鼠大脑皮层中兴奋性氨基酸 Glu 的含量,升高抑制性氨基酸 Gly 和 GABA 的含量,这可能是复方丹参片防治 AD 的机制之一。本实验还观察到模型组动物脑内 4 种氨基酸含量都普遍低于假手术对照组,这可能与造模过程加速了动物的衰老和进一步的神经元损伤及退行性病变有关,而复方丹参片能阻止这种由造模引起的氨基酸含量的改变,提示复方丹参片可能有一定的神经保护作用,有关研

究正在进一步进行。

References:

- [1] Hu J Q, Lai S L, Wang Q. Observation on the change of spatial memory induced by D + galactose and IBO in rats [J]. *Chin J Geriatrics* (中华老年医学杂志), 2000, 19(2): 133-134.
- [2] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [3] Wang P, Zang L T, Shi X M. The influence of Xingnao Yizhi Prescription on IAAs in hippocampi, cortex, and striate body of brain of SAM-P/10 [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2001, 7(4): 24-27.
- [4] He L N, He S B, Yang J. Protective effect of tanshinones on primary cultured cortex neurons injury induced by ischemia [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, 17(2): 214-216.
- [5] Jing S J, Wu W P, Kuang P G. *Radix Salviae Miltiorrhizae* (RSM) could improve spatial cognition of rats with left cerebral temporal infarction and expression of HSP32 [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 1999, 16(5): 257-259.
- [6] Wang J, Zhang J T. Anticerebral ischemia action and inhibitory effect on glutamate release of total salvianolic acid [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1999, 13(3): 197-199.
- [7] Shen Y J, Xu Q P, Chen Q. *Pharmacology of Chinese Materia Medica* (中药药理学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [8] Wang N S, Liang M R, Liu Q D. Experimental study on the notion of "Usefulness of adjuvant drug" by applying borneol [J]. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 1994, 35(1): 46-47.
- [9] Barth A, Bath L, Newell D W. Combination therapy of MK-801 aphenyl-terbutyl-nitron enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures [J]. *Exp Neurol*, 1996, 141(2): 330-333.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确,必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022) 27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青