

- 65-72.
- [10] Pei Y X, Wang D H. The measuremental methods of passage rate of digesta through the gut of mammals [J]. *Chin J Zool* (动物学杂志), 2000, 35(6): 48-52.
- [11] Wei Y M. Experimental study on Sijunzi Decoction in rectifying model of spleen deficiency syndrome in rabbits [J]. *J Gansu Agric Univ* (甘肃农业大学学报), 1997, 32(3): 261-266.
- [12] Hu L L, Gao Y F, He Z X. Comparative study on changes of digestive and absorptive functions in three different models of Pi-deficiency syndrome [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2005, 25(9): 813-816.
- [13] Zhao Y L, Xia T. The current situation and expectation of relationship between spleen deficiency syndrome and gastrointestinal hormone [J]. *J Anhui Coll Tradit Chin Med* (安徽中医学院学报), 1999, 18(6): 58-60.
- [14] Li B F, Zheng C H. Effects of smecta on gastrin and motilin contents in diarrhea rat caused by spleen deficiency syndrome [J]. *J Zhejiang Clin Med* (浙江临床医学), 2004, 6(10): 841-842.
- [15] Wang Y P, Li B Q, Qiu S C. Research on immune function of mice with spleen deficiency [J]. *Chin J Integrated Tradit West Med Gastrospine* (中国中西医结合脾胃杂志), 1998, 6(1): 34-36.
- [16] Lei W W, Huang Z Y, Zheng G F, et al. A comparative study on ultrastructures of immune and endocrine organs in kidney-deficiency model rat [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 1999, 10(4): 208-210.

二精丸有效部位对肾阴虚模型大鼠学习记忆障碍的影响及其分子机制

许小强, 黄敬耀*, 罗 荣, 肖百全, 赵 涛, 涂秀英

(江西中医学院 药理教研室, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 探讨二精丸有效部位对肾阴虚模型大鼠学习记忆障碍的影响及其分子机制。方法 采用大鼠 ig 甲状腺素加 im 利水平方法制备肾阴虚模型, 二精丸总黄酮和总多糖 ig 给药结束后 Morris 水迷宫法测定各组的学习记忆能力; 采用酶联免疫法测定血清激素水平; 采用免疫组织化学法测定海马部位 Bcl-2 和 Bax 表达及 Tau 蛋白异常磷酸化水平。结果 二精丸总黄酮和总多糖能显著提高模型大鼠的学习记忆能力; 能显著恢复激素水平及海马区 Bcl-2 和 Bax 表达; 能显著抑制海马区 Tau 蛋白 Ser199/202、Ser396、Thr231 三个磷酸化位点异常磷酸化。结论 二精丸总黄酮和总多糖能提高肾阴虚模型大鼠的学习记忆能力。

关键词:二精丸; 肾阴虚; Morris 水迷宫; 总黄酮; 总多糖; Bax; Bcl-2; Tau 蛋白磷酸化

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)04-0564-06

Effect of active fractions in Erjing Pill on learning dysmnnesia of rat with kidney-YIN deficiency and its molecular mechanism

XU Xiao-qiang, HUANG Jing-yao, LUO Rong, XIAO Bai-quan, ZHAO Tao, TU Xiu-ying

(Department of Pharmacology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of active fractions in Erjing Pill on learning dysmnnesia of rat with kidney-YIN deficiency and its molecular mechanism. **Methods** Model rat with kidney-YIN deficiency was made by ig administrating tetraiodothyronine and im injecting Reserpine. Morris water-maze was used to determine the learning and memory ability of every groups after ig administrating total flavones and polysaccharides; enzyme-linked immunoassay (ELIA) was used to determine the level of serum hormone; immunohistochemical method was used to determine the expression of Bcl-2 and Bax and the level of Tau protein abnormality phosphorylation in HIP. **Results** Total flavones and polysaccharides in Erjing Pill could obviously elevate the learning and memory ability of model rats, they could obviously recover the level of hormone and the expression of Bcl-2 and Bax in HIP; they cold obviously restrain the abnormality phosphorylation in Tau protein Ser199/202, Ser396, and Thr231 phosphorylation situs in HIP. **Conclusion** The total flavones and polysaccharides in Erjing Pill could promote the learning and

收稿日期: 2006-08-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30360123)

作者简介: 许小强 (1979—), 男, 江西广昌县人, 江西中医学院 2004 级硕士研究生, 主要从事抗衰老药理研究。

E-mail: lotus115@163.com

* 通讯作者 黄敬耀 Tel: (0791) 6801463 E-mail: huangjingyao@vip.sina.com

memory ability of model rat with kidney-YIN deficiency.

Key words: Erjing Pill; kidney-YIN deficiency; Morris water-maze; total flavones; total polysaccharides; Bax; Bcl-2; Tau protein phosphorylation

随着全球人口老龄化,同时各年龄段低智人群为数也不少,还有像神经衰弱、脑动脉硬化、脑外伤和其他器质性损害的病人均存在记忆障碍,且记忆障碍牵扯的面颇广。所以人类的记忆功能障碍已经成为医学的一个严重问题,国内外对于改善学习、记忆功能的研究也就特别受到重视,成为世界性研究热点之一。从国内外研究总体来看,尚未发现从肾阴虚-血清皮质酮水平-海马相关基因表达-学习记忆以及药物对其影响的有机联系研究,本研究从上述角度探索二精丸改善肾阴虚动物部分症状和学习记忆功能的某些分子作用机制,为开发研制延缓衰老和防治认知疾病的中药新药提供某些理论与实践依据。

1 材料

1.1 实验动物:健康SD大鼠,雄性,体重(200±20)g,由江西医学院实验动物中心提供。

1.2 实验药物:黄精和宁夏枸杞(南昌市黄庆仁药栈提供);甲状腺素片,浙江尖峰药业有限公司,批号040201;利血平,广东邦民制药厂有限公司,批号040901;吡拉西坦片(脑复康),湖北华中药业有限公司提供,批号20050703。

1.3 实验试剂:血清睾酮(T)酶免定量测定试剂盒;血清雌二醇(E₂)酶免定量测定试剂盒;Catalog血清皮质酮(CORT)酶免定量测定试剂盒;Tau [pS199/202] phospho-/non-phospho peptides (Tau protein)、Ab、purified、BP7243CP; Tau [pT231] positive and negative control peptides (Tau protein)、T1041-04; Tau [pS396] positive and negative control peptides (Tau protein), T1040-05; 3% H₂O₂去离子;水封闭用正常山羊血清工作液;生物素化二抗工作液 SP9001 (生物素标记山羊抗兔 IgG);辣根酶标记链霉卵蛋白素工作液;DAB显色剂,以上均为北京中杉金桥生物技术有限公司提供,其他试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 二精丸水煎液的制备:取黄精和枸杞各1000g,加5倍体积自来水浸泡30min后,煮沸,煎煮两次,第1次煎煮40min,第2次煎煮50min,两次煎煮液滤过后合并,80~100℃水浴浓缩得药液1000mL(含生药量2g/mL),冰箱保存备用。

2.2 二精丸总黄酮和总多糖的制备:枸杞和黄精各

1000g,先后以5倍量石油醚和乙醚水浴回流脱脂,药材脱脂挥干溶剂后以5倍量醋酸乙酯回流提取3次,收集提取液,残渣挥干醋酸乙酯后用5倍量正丁醇回流提取3次,收集提取液,两提取液各自滤过浓缩,挥干溶剂后得固形物,加无水乙醇溶解后合并溶液,取聚酰胺粉末拌样,挥干乙醇后上聚酰胺色谱柱,以蒸馏水洗至无色后,用95%乙醇洗脱,洗脱液浓缩挥干乙醇后得二精丸总黄酮提取物(得率4.19%),二精丸总黄酮提取物含黄酮56.43%。取石油醚、乙醚、醋酸乙酯、正丁醇回流后的药材残渣以80%乙醇回流后挥干溶剂,以5倍蒸馏水温浸提取,提取液浓缩至按生药量计算1g/mL,加6倍95%乙醇沉淀,高速离心,取沉淀用少量95%乙醇冲洗,干燥后得二精丸总多糖提取物(得率11.03%)。二精丸总多糖提取物含多糖96.40%。

2.3 动物分组及造模方法:SD大鼠80只,雄性,(200±20)g,按体重随机分成8组,每组10只,即空白对照组、模型组、阳性组(脑复康,4g/kg)、二精丸原方组(400mg/kg)、二精丸黄酮高剂量组(120mg/kg)、二精丸黄酮低剂量组(60mg/kg)、二精丸多糖高剂量组(600mg/kg)、二精丸多糖低剂量组(300mg/kg)。每天上午9时,除空白对照组外,其余7组动物以15mg/kg剂量ig甲状腺素,然后以0.1mg/kg剂量im利血平。空白对照组以10mL/kg剂量ig生理盐水,连续造模21d。记录每天中午大鼠的体温,每7天称体重1次。造模的同时,每天下午3时除空白对照组、模型组外其他各组动物均按体重ig相应的药物。

2.4 肾阴虚大鼠学习记忆能力的测定方法:从实验第22天起各组大鼠分别进行水迷宫航行定位实验训练。水迷宫分I、II、III、IV4个象限,直径150cm,高50cm,平台高35cm,实验前在迷宫内加水直至高于平台1.5cm,并加入墨汁以肉眼不能看见平台为度,水温保持在(25±1)℃。池壁上标有东南西北4个人水点,随机选取两个人水点,大鼠面壁投入水池中。大鼠连续训练5d,每天2次,每次训练时间为60s,记录找到平台的潜伏期。如大鼠在规定时间内未找到平台,则由实验人员帮其登陆平台,并在平台上站立15s,以帮助记忆,然后再按顺序进行下一次训练。第5天训练结束后将迷宫内的平台

移去,进行空间探索实验,摄像记录 60 s 内大鼠在迷宫内的游泳路径。整个实验过程中应保持迷宫室内的物体原貌,切勿移动,并且应及时清除水迷宫内大鼠产生的粪便以免对实验产生不良影响。

2.5 肾阴虚大鼠 E_2 、T、CORT 的测定方法:水迷宫测试学习记忆能力实验结束后,3% 戊巴比妥 40 mg/kg 将大鼠麻醉。眼眶后静脉丛取血,1 500 r/min 离心 10 min 后,取血清冰冻 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 保存备用。酶联免疫法检测大鼠血清 E_2 、T、CORT,所有操作均按试剂盒说明书进行。

2.6 肾阴虚大鼠海马 Bcl-2、Bax、Tau [pS199/202]、Tau [pS396]、Tau [pT231] 基因表达的测定方法:大鼠眼眶取血后立刻剖开动物胸腔进行心脏灌流,先用生理盐水灌注 (约 30 min/只),直至动物四肢、肺、肝脏无血色。然后再用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液灌注 (约 20 min/只) 直至动物四肢、肝脏完全僵硬。将灌注好的大鼠断头小心分离大鼠的全脑,用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 8 h,然后分别用 20%、30% 的蔗糖磷酸缓冲液脱水至大脑完全沉入瓶底。将脱水后的大脑进行修整,以能清晰的看见海马为度,然后放入冰冻切片机内均匀的切成 $40\text{ }\mu\text{m}$ /片,用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pH 7.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水保存备用。免疫组织化学法检测大鼠海马 Bcl-2、Bax、Tau [pS199/202]、Tau [pS396]、Tau

[pT231] 的表达,切片于显微镜下观测,进行阳性细胞计数统计,所有操作均按说明书进行。

2.7 统计方法:所有的数据均用 SPSS11.0 进行单因素方差分析,结果均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

3 实验结果

3.1 实验过程中动物出现形体消瘦、体毛稀疏、烦躁、易出汗、体重下降,体温变化不明显 (肛温)。

3.2 二精丸总黄酮和总多糖对水迷宫试验平均潜伏期的影响:模型组与空白组相比,第 2、3、4、5 天平均潜伏期显著升高,第 1 天平均潜伏期无明显变化。黄酮高剂量组与模型组相比,第 2 天平均潜伏期显著降低,其他给药组无明显变化;阳性组、原方组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组与模型组相比,第 3 天平均潜伏期显著降低,多糖低剂量组无明显变化;原方组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组、多糖低剂量组与模型组相比,第 4 天平均潜伏期显著降低,阳性组无明显变化;阳性组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组与模型组相比,第 5 天平均潜伏期显著降低,原方组及多糖低剂量组无明显变化。多糖高剂量组与原方组相比,第 5 天平均潜伏期显著升高,第 1、2、3、4 天平均潜伏期均无明显变化;黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖低剂量组与原方组相比,第 1、2、3、4、5 天平均潜伏期均无明显变化。见表 1。

表 1 二精丸总黄酮和总多糖对 Morris 水迷宫试验平均潜伏期的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of total flavones and polysaccharids in Erjing Pill on mean incubation period in Morris water-maze test ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	潜伏期/s				
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
空白	—	55.92±7.02	43.75±13.84	34.39±15.86	36.95±23.44	27.51±15.33
模型	—	55.72±6.81	57.31±5.43 [△]	57.69±4.41 [△]	59.52±1.50 [△]	59.79±0.45 [△]
脑复康	4 000	57.46±5.49	49.66±11.60	33.78±22.81*	36.80±19.01	45.77±14.60*
原方	400	55.49±8.02	50.26±12.00	31.26±21.26*	44.87±16.66*	42.06±20.58
总黄酮	120	58.42±4.91	40.53±22.58*	35.21±15.13*	37.03±14.86*	32.89±11.86*
	60	55.36±8.56	49.63±14.61	32.24±21.87*	33.08±22.60*	40.20±21.90*
总多糖	600	58.21±5.59	48.73±14.32	31.83±20.12*	29.08±20.82*	30.37±19.90* [▲]
	300	58.39±3.35	51.17±10.72	42.02±18.68	39.67±16.16*	45.56±21.41

与空白组比较: $\Delta P<0.05$; 与模型组比较: * $P<0.05$; 与原方组比较: $\Delta P<0.05$

$\Delta P<0.05$ vs blank group; * $P<0.05$ vs model group; $\Delta P<0.05$ vs archeo-prescription group

3.3 二精丸总黄酮和总多糖对搜索策略的影响:搜索策略是反映大鼠学习记忆能力的一个重要指标,大鼠到达平台的策略共 4 种,分别为直线式、趋向式、边缘式、随机式。第 1 天,大部分大鼠采用边缘式和随机式;第 2 天,除模型组外,各组大鼠边缘式和随机式所占比例降低明显,趋向式比例大幅增高,直线式也有出现,但比例较低;第 3 天,除模型组外,各

组大鼠随机式所占比例继续降低,直线式明显增加,部分组出现趋向式比例减少,直线式比例增加的情况。到了第 4、5 天,除模型组外各组的主要搜索方式为趋向式、直线式,模型组的主要搜索方式为边缘式,随机式也占有一定比例,见表 2。在空间探索实验中,各组大鼠搜索方式已稳定。

3.4 二精丸总黄酮和总多糖对水迷宫空间探索实

表 2 二精丸总黄酮和总多糖对肾阴虚模型大鼠
搜索策略的影响 (第 5 天)

Table 2 Effect of total flavones and polysaccharides in
Erjing Pill on searching strategy for model
rats with kidney-YIN deficiency (day 5)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	边缘式/ 次	趋向式/ 次	随机式/ 次	直线式/ 次
空白	—	0	11	3	6
模型	—	14	0	5	1
脑复康	4 000	0	13	4	3
原方	400	0	10	4	6
总黄酮	120	0	9	5	6
	60	0	10	4	6
总多糖	600	0	12	2	6
	300	2	10	3	5

验的影响:模型组与空白组相比,外环区比例显著升高,中环区比例及中心区比例显著降低,穿越平台次数无明显变化。阳性组、原方组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组、多糖低剂量组与模型组相比,外环区比例显著降低,中环区比例显著升高;阳性组、原方组、黄酮高剂量组、多糖高剂量组与模型组相比,中心区比例显著升高,其他给药组无明显变化;多糖高剂量组与模型组相比,穿越平台次数显著升高,其他给药组无明显变化。黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组、多糖低剂量组与原方组相比,外环区、中环区、中心区比例及穿越平台次数无明显变化。见表 3。

3.5 二精丸总黄酮和总多糖对肾阴虚大鼠 E₂、T、CORT、E₂/T 的影响:模型组与空白组相比,血清 E₂及 E₂/T 显著升高,T 及 CORT 显著降低。阳性组、原方组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组与模型组相比,血清 E₂显著降低,多糖低剂量组无明显变化;原方组、黄酮高剂量组、多糖高剂量组与模型组相比,血清 T 显著升高,其他给药组无明显变化;黄酮低剂量组、多糖高剂量组与模型组相比,血清 CORT 显著升高,其他给药组无明显变化;

阳性组、原方组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组与模型组相比,血清 E₂/T 显著降低,多糖低剂量组无明显变化。黄酮低剂量组、多糖高剂量组、多糖低剂量组与原方组相比,血清 E₂显著升高,黄酮高剂量组无明显变化;多糖低剂量组与原方组相比,血清 T 显著降低,其他给药组无明显变化;黄酮低剂量组、多糖高剂量组与原方组相比,血清 CORT 显著升高,其他给药组无明显变化;黄酮低剂量组及多糖低剂量组与原方组相比,E₂/T 值显著升高,其他给药组无明显变化。见表 4。

3.6 二精丸总黄酮和总多糖对大鼠海马 Bcl-2、Bax、Bcl-2/Bax、Tau [pS199/202]、Tau [pS396]、Tau[pT231]表达的影响:模型组与空白组相比,Bax、Tau [pS199/202]、Tau [pS396]、Tau [pT231]显著升高,Bcl-2 及 Bcl-2/Bax 显著降低。原方组及多糖高剂量组与模型组相比,Bcl-2 显著升高,其他给药组无明显变化;阳性组、原方组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组与模型组相比,Bax 显著降低,多糖低剂量组无明显变化;原方组及多糖高剂量组与模型组相比,Bcl-2/Bax 显著升高,其他给药组无明显变化;阳性组、原方组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组、多糖低剂量组与模型组相比,Tau [pS396]显著降低;阳性组、原方组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组与模型组相比,Tau [pT231]显著降低,多糖低剂量组无明显变化;阳性组、原方组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组、多糖低剂量组与模型组相比,Tau [pT199/202]显著降低。黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖低剂量组与原方组相比,Bcl-2 显著降低,其他给药组无明显变化;阳性组、黄酮高剂量组、黄酮低剂量组、多糖高剂量组、多糖低剂量组与原方组相比,Bax、Bcl-2/Bax、Tau [pS199/202]、Tau [pS396]、Tau [pT231]无明显变化。见表 5。

表 3 二精丸总黄酮和总多糖对 Morris 水迷宫空间探索实验的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)
Table 3 Effect of total flavones and polysaccharides in Erjing Pill on space exploration
experiment in Morris water-maze ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	外环区/%	中环区/%	中心区/%	穿越平台次数
空白	—	71.07±14.54	25.41±12.54	3.52±2.53	1.40±1.50
模型	—	97.10± 7.86 [△]	2.39± 6.46 [△]	0.49±1.41 [△]	0.25±0.71
脑复康	4 000	59.61±14.01*	37.04±14.68*	3.35±2.18*	1.20±1.03
原方	400	70.15±13.08*	26.49±12.77*	3.36±3.26*	1.00±0.82
总黄酮	120	68.42±20.70*	27.63±18.33*	3.95±2.83*	1.50±1.72
	60	69.17±10.33*	28.54± 9.69*	2.29±1.68	1.00±1.31
总多糖	600	62.17±14.13*	34.99±13.28*	2.84±2.26*	3.67±3.57*
	300	70.11±11.49*	27.70±10.04*	2.19±2.21	1.00±0.87

与空白组比较: [△]P<0.05; 与模型组比较: *P<0.05

[△]P<0.05 vs blank group; *P<0.05 vs model group

表 4 二精丸总黄酮和总多糖对大鼠血清 E_2 、T、CORT 和 E_2/T 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of total flavones and polysaccharides in Erjing Pill on E_2 , T, CORT, and E_2/T in serum of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	E_2 /(pg · mL ⁻¹)	T/(ng · mL ⁻¹)	CORT/(nmol · L ⁻¹)	E_2/T
空白	—	41.97±11.19	3.06±1.09	10.30±6.30	16.34±9.94
模型	—	59.83±27.14 [△]	0.64±0.24 [△]	1.47±1.44 [△]	106.86±55.39 [△]
脑复康	4 000	42.06±13.97*	1.36±0.35	5.64±3.99	32.76±14.07*
原方	400	43.37±16.44*	2.44±0.71*	4.01±5.11	18.38±8.09*
总黄酮	120	42.80±14.13*	2.76±1.49*	8.12±12.87	21.15±15.29*
	60	53.00±13.66*▲	1.88±1.79	13.94±15.99*▲	51.55±36.75*▲
总多糖	600	51.22±20.63*▲	2.36±1.04*	14.08±12.20*▲	24.19±9.52*
	300	55.56±16.16▲	0.90±0.71▲	8.90±13.52	96.77±65.59▲

与空白组比较: $\Delta P<0.05$; 与模型组比较: * $P<0.05$; 与原方组比较: ▲ $P<0.05$

$\Delta P<0.05$ vs blank group; * $P<0.05$ vs model group; ▲ $P<0.05$ vs archeo-prescription group

表 5 二精丸总黄酮和总多糖对大鼠海马 Bcl-2、Bax、Bcl-2/Bax、Tau[pS199/202]、Tau[pS396]、Tau[pT231]表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Effect of total flavones and polysaccharides in Erjing Pill on Bcl-2, Bax, Bcl-2/Bax, Tau [pS199/202], Tau [pS396], and Tau [pT231] expression in HIP of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	Bcl-2/个	Bax/个	Bcl-2/Bax	Tau[pS396]/个	Tau[pT231]/个	Tau[pS199/202]/个
空白	—	96.11±33.59	22.25±5.28	4.59±0.90	18.22±5.74	28.44±11.00	37.22±10.8
模型	—	33.75±10.42 [△]	31.12±4.55 [△]	1.09±0.36 [△]	63.00±18.73 [△]	57.88±22.98 [△]	78.50±20.23 [△]
脑复康	4 000	90.00±30.04*	24.78±5.19*	3.65±1.05*	25.40±8.47*	32.90±11.82*	37.80±12.27*
原方	400	47.10±15.51	23.86±8.34*	1.78±0.63	37.40±14.05*	40.10±18.57*	47.00±32.71*
总黄酮	120	56.60±10.94▲	24.12±4.73*	1.77±0.59	29.00±12.87*	33.50±19.99*	41.00±23.37*
	60	41.38±11.44▲	23.50±7.71*	2.67±0.94	37.00±13.53*	38.50±12.79*	44.88±12.87*
总多糖	600	64.12±18.97*	24.22±8.15*	4.09±3.39*	30.50±19.69*	35.12±21.70*	48.62±21.65*
	300	51.67±22.03▲	25.38±7.74	2.09±1.11	42.30±15.44*	41.80±18.04	52.00±18.69*

与空白组比较: $\Delta P<0.05$; 与模型组比较: * $P<0.05$; 与原方组比较: ▲ $P<0.05$

$\Delta P<0.05$ vs blank group; * $P<0.05$ vs model group; ▲ $P<0.05$ vs archeo-prescription group

4 讨论

根据中医药理论,笔者选取有补肾填精功效的古方二精丸及其有效部位进行抗实验性肾阴虚的研究。本实验采用甲状腺素加利血平法造肾阴虚模型,结果表明用此法造出的肾阴虚模型无论是在外在表现方面,还是体内激素水平变化以及基因表达方面都与人类肾阴虚证表现十分相似。甲状腺素加利血平所致肾阴虚证模型是较好的肾阴虚模型,稳定可靠。

本实验中使用 Morris 水迷宫系统测定甲状腺素加利血平所致肾阴虚证模型大鼠的学习记忆功能。在航行定位实验中,肾阴虚模型组学习成绩显著下降,平均潜伏期明显长于空白对照组,在迷宫中的搜索方式主要为边缘式和随机式,这说明动物在用甲状腺素加利血平造肾阴虚模型后发生了严重的记忆障碍,这与以前的文献报道一致^[1]。二精丸总黄酮和总多糖组平均潜伏期随训练天数增加而明显缩短,其中第 4、5 天平均潜伏期显著低于模型组 ($P<0.05$),在水迷宫中的搜索策略也随训练天数由主要为边缘式和随机式变成主要为趋向式和直线式(均显著高于模型组, $P<0.05$)。在空间探索实验中,二

精丸总黄酮和总多糖组与模型组相比,中环、中心区域比例显著升高 ($P<0.05$),外环区域比例则显著降低 ($P<0.05$)。给药组与模型组相比,经过平台所在位置次数增多,但无显著性差异。提示二精丸总黄酮和总多糖能有效改善甲状腺素加利血平致肾阴虚模型大鼠的学习记忆功能障碍。

通过本实验观察发现:二精丸总黄酮组血清 E_2 水平显著低于模型组 ($P<0.05$),二精丸总多糖组血清 E_2 水平也低于模型组,但无统计学意义 ($P>0.05$)。二精丸总黄酮和总多糖组 E_2/T 值则显著小于模型组 ($P<0.05$)。这与文献报道^[2~5]相一致,此外甲状腺素加利血平法所致肾阴虚证模型大鼠血清 CORT 水平显著降低 ($P<0.05$),这与文献报道^[6,7]的结果相吻合。性激素的改变和肾虚本质有密切联系,性激素内环境的改变是肾虚发生和发展的重要物质基础,血清性激素的不同水平可反映肾虚证的不同程度,可作为肾虚证的现代科学指标,并且有理由相信 E_2/T (T/E_2) 值的变化比单纯的 E_2 或 T 量的变化更有价值。所以笔者认为二精丸总黄酮和总多糖均能显著恢复肾阴虚大鼠血清皮质酮水平

和降低 E_2 的水平,升高肾阴虚大鼠血清 T 的水平,缩小 E_2/T 的值。

Bcl-2 和 Bax 是近年来发现的一对关系密切的凋亡基因,在中枢神经系统中均有表达,在神经细胞凋亡的调控中起重要作用。Bcl-2/Bax 值高,细胞存活率高,值低,细胞凋亡率高。本实验发现:模型组海马神经元 Bcl-2 蛋白表达较少,而 Bax 蛋白表达增多,Bcl-2/Bax 值显著降低 ($P < 0.05$),导致海马神经元凋亡,造成动物学习记忆功能减退。其机制可能是过低的皮质酮水平导致海马区中具有促进神经生长功能的碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, BFGF) 受体 mRNAs 的水平显著降低,降低海马内神经生长因子 (Nerve growth factor, NGF) 的水平有关。本实验还发现:二精丸总黄酮和总多糖可以使模型大鼠海马 Bcl-2 蛋白表达增多,其中二精丸总多糖大鼠海马 Bcl-2 蛋白表达明显增多 ($P < 0.05$),能明显抑制模型大鼠海马 Bax 蛋白表达 ($P < 0.05$),Bcl-2/Bax 值增高,抑制细胞凋亡。本实验证实了二精丸总黄酮和总多糖能使模型大鼠海马 Bcl-2 蛋白表达增多,Bax 蛋白表达减少,提高大鼠的学习记忆能力,其作用可能是通过下丘脑-垂体-肾上腺轴,使皮质酮水平增高实现的。

Tau 蛋白是脑内神经元细胞支架蛋白之一,是一种微管相关蛋白 (MAP),它在稳定微管和维持神经功能方面起着重要作用。如果 Tau 蛋白生理功能发生了改变,不仅与正常微管相关蛋白 Maps 相互竞争微管蛋白,影响微管形成,而且促进正常微管相关蛋白与微管的分离,使微管崩解,并在脑内形成各种沉积物[如阿尔茨海默病 (AD) 的双螺旋丝状物]沉积在神经元细胞内,引起神经元损害。德国学者、加拿大学者对 AD 患者脑内的神经纤维缠结的主要成分进行了免疫组化方面的研究,认为神经纤维缠结的主要成分为过度磷酸化的 Tau 蛋白,而神经元纤维缠结的数量则与临床痴呆的程度密切相关,而严重的学习记忆功能障碍是老年性痴呆的特

征性临床表现。本实验测定了 Tau 蛋白在 Ser199/202、Ser396、Thr231 3 个位点的异常磷酸化水平,发现模型组大鼠海马 Tau 蛋白在上述 3 个位点的异常磷酸化水平均显著增高,这提示了肾阴虚与 AD 存在着某种关连,而二精丸总黄酮和总多糖组 Ser199/202、Ser396、Thr231 3 个位点上的 Tau 蛋白异常磷酸化水平的表达均明显低于模型组 ($P < 0.05$),这表明二精丸总黄酮和总多糖能有效的降低甲状腺素加利血平所致肾阴虚证模型大鼠海马 Tau 蛋白异常磷酸化,提高学习记忆能力,同时具有潜在的抗 AD 作用。综上所述,二精丸有效部位总黄酮和总多糖改善学习记忆能力的分子机制可能是通过恢复皮质酮的正常水平,降低 E_2 的水平,升高 T 的水平,缩小 E_2/T 值,提高 Bcl-2/Bax 值,抑制 Tau 蛋白异常磷酸化发挥作用的。

References:

- [1] Jiang S H, Miao M S. Nootropic effect on calming the nerves Cognex to mouse of yin asthenia model [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 1997, 4(7): 37-38.
- [2] Yao H. Primary study on acupuncture had influence upon sexual hormone in plasma of the syndrome of deficiency of the kidney [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med* (云南中医中药杂志), 1995, 16(3): 37-40.
- [3] Fang S Q, Lin B H, Ye Y, et al. Study on nephraesthesia syndrome with sex hormone and immune function [J]. *Fujian J Tradit Chin Med* (福建中医药), 2002, 33(2): 1-3.
- [4] Qiu R X, Wu G Z, Jin M H. Effect on Beauty ginseng injection to sex hormone of presby-masculine CAD renal deficiency patient [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 1996, 13(2): 1-3.
- [5] Wu S S, Qiu S D, Lin Q C. Study on relation between gyna-sex hormone level and different nephraesthesia syndrome in meta-old age [J]. *Fujian J Tradit Chin Med* (福建中医药), 2000, 31(1): 3-4.
- [6] Qiu G H. Analysis of thyroid dysfunction blood hydrocortisone density change [J]. *Zhejiang J Prev Med* (浙江预防医学), 2003, 15(7): 63.
- [7] Li Q H, Zhang Y R, Yang X H, et al. The functional change of adrenal cortex in patients with hyperthyroidism [J]. *Chin J Gen Surg* (中华普通外科杂志), 2003, 18(8): 496-497.

《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