

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.02.007

壮精合剂对初老大鼠行为学及脑单胺类神经递质的影响*

蔡浩斌¹, 黄忠仕², 黄岑汉^{2△}

(1. 广州中医药大学临床药理研究所, 广州 510405; 2. 右江民族医学院, 广西百色 533000)

摘要:目的 观察壮精合剂对初老大鼠行为学及脑单胺类神经递质的影响, 探讨其抗衰老的作用机制。方法 选用 12 月龄, 体质量(300±20)g。雌性初老大鼠 50 只, 建立模型, 分为 5 组: 空白对照组、壮精合剂高剂量组、壮精合剂中剂量组、壮精合剂低剂量组、阳性对照组, 每组 10 只。各组分别灌胃相应药物 8 周后, 采用 Morris 水迷宫检测各组大鼠的空间学习记忆行为能力及采用高效液相色谱-荧光检测法检测各组大鼠大脑皮层、海马单胺类神经递质含量。结果 与空白对照组比较, 壮精合剂高、中剂量组及阳性对照组均能使初老大鼠学习记忆能力有所改善, 并能提高其大脑皮层及海马区单胺类神经递质含量。壮精合剂高剂量组与阳性对照组比较在改善学习记忆能力方面差异有统计学意义($P < 0.05$), 在提高大脑皮层及海马区单胺类神经递质含量方面效果最为显著($P < 0.05$)。结论 壮精合剂能有效改善初老大鼠的学习记忆能力, 其作用机制可能与调节大脑内单胺类神经递质有关。

关键词: 生物源单胺类; 记忆; 壮精合剂; 初老大鼠

中图分类号: R339.3

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)02-0165-03

Effects of Zhuang Jing mixture on behavior of primary senile rat and monoamine neurotransmitters in it's brain*

Cai Haobin¹, Huang Zhongshi², Huang Cenhan^{2△}

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Zhuang Jing mixture (ZJM) on behavior of primary senile rat and monoamine neurotransmitters in it's brain, and to study its mechanism of anti-aging. **Methods** Fifty senile female rates which average weight was(300±20)g were randomized divided into 5 groups: blank control group, low-, mid-and high-dose group of ZJM, positive control group, with 10 rats in each group. After medication for 8 weeks, Morris water maze test was used to evaluate the spatial learning and memory ability of primary senile rats. High performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD) was used to detect the monoamine neurotransmitter content in rat's cerebral cortex and hippocampus. **Results** Compared with blank control group, high-, middle-dose group of ZJM and positive control group were improved the ability of learning and memory of primary senile rat, as well as the cerebral cortex and hippocampus monoamine neurotransmitters levels. High-dose group of ZJM had significant difference compared with positive control group in improving the ability of learning and memory($P < 0.05$), and in improving the cerebral cortex and hippocampus monoamine neurotransmitters($P < 0.05$). **Conclusion** ZJM could significantly improve the learning and memory abilities of primary senile rats, and its mechanism may be related to adjust the monoamine neurotransmitter in brain.

Key words: biogenic monoamines; memory; Zhuang Jing mixture(ZJM), primary senile rat

壮药补精合剂(简称壮精合剂)是壮族民间医生根据壮医学理论的治疗原则,从精血论治的角度,用壮药(土人參、绞股蓝、扶芳藤、大地棕根等)配伍而成的经验方。方中重用土人參补精血、清虚热、调经带,为填精补血之要药;扶芳藤通龙路火路,舒筋脉,散淤血、止出血,通路活血以强土人參补精血之势;绞股蓝能除虚热、促食欲,促睡眠,抗疲劳、抗衰老,含有多种人參皂苷和氨基酸,有“南方人參”之称;大地棕根能补肾填精,活血化瘀,具有补虚通路之效。全方用药精专,配伍得当,剂量适宜,共奏补精益气、养血调经之功效,从而使精气盛、气血调、龙路通。本研究主要根据最新的衰老发生机制及新时期探讨衰老机制的新途径,以壮精合剂作用于初老大鼠模型,研究壮精合剂对初老大鼠行为学、单胺类神经递质等因素的影响,探讨壮精合剂抗衰老的作用及其机制,为开发广西的抗衰老中草药及申报抗衰老新药提供理论依据。现将实验方法及结果报道

如下。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用 12 月龄健康雌性 SD 大鼠 50 只,体质量平均(300±20)g,由右江民族医学院实验动物中心提供(许可证:SCXK 桂 2012-0003)。自动控制光照,在通风、温度及湿度适宜的动物室内常规饲养。

1.1.2 药物及试剂 壮精合剂(土人參 30 g,绞股蓝 25 g,扶芳藤 20 g,大地棕根 10 g);阳性对照药:古汉养生精(批号 902630-126904);标准品:去甲肾上腺素(NE),批号 100169-201103;多巴胺(DA),批号 100070-201006;5-羟色胺(5-HT),批号 111656-50679,均购自中国药品生物制品检定所;流动相:乙腈、纯净水;磷酸二氢钾;EDTA-2Na;样品前处理试剂:高氯酸。

1.1.3 仪器 Morris 水迷宫(中国科学院药研所制),微电极脑立体定位仪(WDT-11,西北光明仪器厂)。FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂),高速冷冻离心机(BACKMAN 公司,美国),高效液相-荧光检测器(Waters 公司,美国),电子分析天平(Sartorius 公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 采用自然老化法。初老大鼠模型:选 12 月龄雌性大鼠,采取阴道脱落细胞涂片巴氏染色,连续观察 4 个动情周期,以阴道细胞学表现动情周期长。之后持续动情、反复假妊娠时,作为自然衰老的初老大鼠模型^[1-2]。

1.2.2 分组与给药 将造模成功的 50 只龄雌性 SD 初老大鼠随机分为 5 组,分别为空白对照组、壮精合剂高剂量组、壮精合剂中剂量组、壮精合剂低剂量组、阳性对照组,每组 10 只。空白对照组给予纯净水 10 mL/kg,阳性对照组给予古汉养生精 4.8 g/kg,壮精合剂低、中、高剂量组分别给予壮精合剂 6 g/kg、15 g/kg、30 g/kg。以上各组每天灌胃给药 1 次,连续 8 周。

1.2.3 观察项目及方法

1.2.3.1 学习记忆能力测试^[3] 采用 Morris 水迷宫检测各

组大鼠的空间学习记忆行为能力,包括定位航行实验和空间探索实验。其中定位航行实验历时 5 d,每天将大鼠面向池壁分别从不同象限(靶象限除外)置入池中,记录其寻找到隐藏在水面下平台的时间即逃避潜伏期。大鼠登上站台 1 s 后终止记录,最长记录时间为 100 s,若大鼠在 100 s 内不能上台,则引导其登上站台适应 20 s。空间探索实验是在定位航行实验后撤掉平台,然后将大鼠随机从不同象限(靶象限除外)面壁置入池中,记录其在 100 s 内的游泳轨迹,穿过站台的次数,考察大鼠对原平台的记忆。

1.2.3.2 脑组织内单胺类神经递质含量的测定^[4-5] 采用高效液相-荧光测定法检测大鼠大脑皮层、海马区单胺类神经递质含量。

1.2.3.2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C18 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)。流动相为水:乙腈(90:10),其中水相每升含磷酸二氢钾 0.2 mol、EDTA-2Na 0.1 mol,用磷酸调 pH 值至 3.0,流速 0.5 mL/min。发射波长 338 nm,激发波长 220 nm。柱温:28 ℃,进样量 10 μL。在本色谱条件下,NE,DA 和 5-HT 各峰均达基线分离的效果。色谱图见图 1。

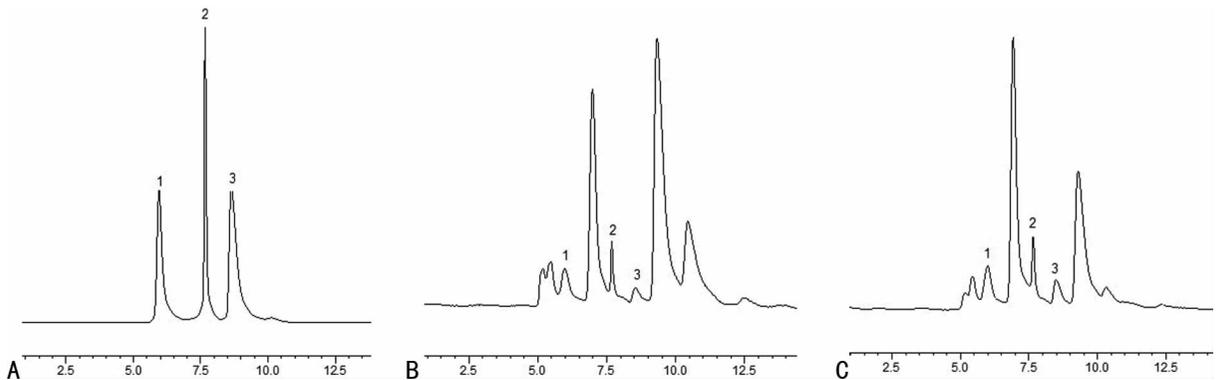


图 1 色谱图
A:混合标准品;B:中剂量组的海马样品;C:中剂量组的皮层样品。1:NE($t_R = 5.95$ min);2:DA($t_R = 7.67$ min);3:5-HT($t_R = 8.64$ min)。

图 1 色谱图

1.2.3.2.2 对照品溶液的制备 取混合对照品贮备液适量,置 6 个容量瓶中,各加入 5% $HClO_4$ 稀释成不同质量浓度的混合对照品溶液,使所含对照品的质量浓度分别为 0.002、0.010、0.050、0.500、1.000、5.000 μg/mL,分别精密吸取 10 μL 进样。以各组分的质量浓度为横坐标,各组分的峰面积为纵坐标进行线性回归,并计算相关系数 r 。结果表明,各标准曲线线性良好。各回归方程如下:DA; $Y = 230.178X + 3.227.2, r = 0.9999$;NE; $Y = 219.207X + 2.087.9, r = 0.9999$;5-HT; $Y = 386.571X - 7.865.5, r = 0.9999$ 。

1.2.3.2.3 样品处理 实验大鼠断头处死后,迅速取出全脑,用冰冷生理盐水冲洗除去血液,滤纸拭干,冰上迅速分离出大鼠大脑皮层、海马组织,称质量后,加入 1 mL 5% $HClO_4$,超声粉碎成 10% 匀浆,冷冻高速离心 14 000 r/min 15 min,取上清液,即得脑组织样品。取上清液进样 10 μL。记录各样品的峰面积,代入相应标准曲线计算出相应浓度,统计结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验结果 定位航行:壮精合剂中剂量组

及阳性对照组与空白对照组比较所用时间更少($P < 0.05$)。壮精合剂高剂量组比空白对照组、阳性对照组所用时间更少($P < 0.05$)。空间探索实验:壮精合剂中剂量组及阳性对照组与空白对照组相比次数更多($P < 0.05$)。壮精合剂高剂量组与空白对照组、阳性对照组相比次数较多($P < 0.05$)。结果说明壮精合剂能明显提高初老大鼠的学习能力和记忆能力,且高剂量组效果最为显著,见表 1。

表 1 隐秘平台实验与空间探索实验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	定位航行 (潜伏期, s)	穿越平台次数 (n)
空白对照组	22.62 ± 4.18	5.15 ± 2.57
壮精合剂低剂量组	21.67 ± 3.49	4.51 ± 2.50
壮精合剂中剂量组	18.84 ± 3.50 ^a	7.50 ± 1.85 ^a
壮精合剂高剂量组	15.14 ± 3.64 ^{bc}	9.42 ± 2.27 ^{bc}
阳性对照组	18.77 ± 3.90 ^a	7.40 ± 1.88 ^a

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; ^c: $P < 0.05$, 与阳性对照组比较。

大鼠 Morris 水迷宫实验轨迹类型分为 4 种:趋向型、直线

型、随机型、边缘型。其中每只大鼠共游泳 10 次,对比各组大鼠游泳轨迹,阳性对照组大鼠趋向型、直线型游泳轨迹有 63 次,空白对照组大鼠趋向型、直线型游泳轨迹有 44 次,两者相比差别显著($P < 0.05$)。壮精合剂中剂量组大鼠趋向型、直线型游泳轨迹有 68 次,与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。壮精合剂高剂量组大鼠趋向型、直线型游泳轨迹有 80 次,与空白对照组、阳性对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果说明壮精合剂能明显提高衰老大鼠的学习能力和记忆能力,且高剂量组效果最为显著(表 2、图 2)。

2.2 各组大鼠大脑皮层内单胺类神经递质含量 各组大鼠大脑皮层内单胺类神经递质 NE、DA、5-HT 含量均比空白对照组高,且壮精合剂高剂量组效果显著(与空白对照组比较, $P <$

0.01;与阳性对照组比较, $P < 0.05$),见表 3。

表 2 大鼠 Morris 水迷宫游泳轨迹类型($n, n=10$)

组别	随机型	边缘型	趋向型	直线型
空白对照组	35	21	27	17
壮精合剂低剂量组	31	19	30	20
壮精合剂中剂量组	21	11	35 ^a	33 ^a
壮精合剂高剂量组	12	8	37 ^{bc}	43 ^{bc}
阳性对照组	24	13	33 ^a	30 ^a

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,与空白对照组比较;^c: $P < 0.05$,与阳性对照组比较。

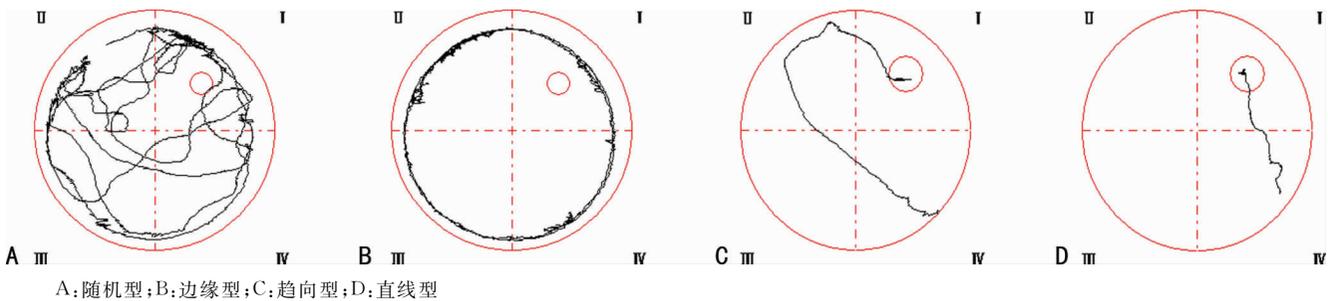


图 2 Morris 水迷宫轨迹图

表 3 各组大鼠大脑皮层内单胺类神经递质含量比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/g}, n=10$)

组别	DA	NE	5-HT
空白对照组	387.3 ± 84.5	253.6 ± 46.3	114.3 ± 29.1
壮精合剂低剂量组	403.8 ± 64.1	287.1 ± 36.5	136.2 ± 25.5
壮精合剂中剂量组	468.3 ± 73.8 ^a	313.5 ± 41.9 ^b	168.4 ± 33.2 ^b
壮精合剂高剂量组	527.3 ± 81.5 ^{bc}	373.6 ± 46.3 ^{bc}	211.8 ± 27.7 ^{bd}
阳性对照组	457.5 ± 61.6 ^a	328.4 ± 39.1 ^b	166.7 ± 31.1 ^b

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,与空白对照组比较;^c: $P < 0.05$,与阳性对照组比较。

2.3 各组大鼠海马单胺类神经递质含量 各组大鼠海马内单胺类神经递质 NE、DA、5-HT 含量均比空白对照组高,且壮精合剂高剂量组效果显著(与空白对照组比较 $P < 0.01$;与阳性对照组比较 $P < 0.05$),见表 4。

表 4 各组大鼠海马单胺类神经递质含量比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/g}, n=10$)

组别	DA	NE	5-HT
空白对照组	117.4 ± 32.3	53.6 ± 16.6	44.9 ± 11.5
壮精合剂低剂量组	133.1 ± 24.2	67.3 ± 19.2	49.3 ± 15.7
壮精合剂中剂量组	168.6 ± 23.1 ^b	74.6 ± 19.3 ^a	63.8 ± 13.1 ^b
壮精合剂高剂量组	187.9 ± 21.5 ^{bd}	108.5 ± 26.4 ^{bd}	77.4 ± 17.9 ^{bd}
阳性对照组	152.1 ± 31.5 ^a	73.5 ± 19.1 ^a	56.3 ± 12.6 ^a

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,与空白对照组比较;^c: $P < 0.05$,与阳性对照组比较。

3 讨论

衰老是指在正常状况下生物发育成熟后,随年龄增加,自身机能减退,内环境稳定能力与应激能力下降,结构、组分逐步

退行性变,趋向死亡的不可逆转现象^[6]。中医药以其独特疗效,在抗衰老抗氧化的研究中占有越来越重要的地位。中医认为衰老主要是肾虚,其次是脾虚,再次是气血两虚。所以补肾、健脾、益气是延缓衰老的基本途径,活血化瘀是延缓衰老的主要方法^[7]。

学习记忆是高级神经功能之一,中枢单胺类神经递质在此过程中发挥了重要的作用^[8]。其过程伴随着复杂的神经生理和生化机制,其作用机制与单胺类神经递质含量密切相关^[9]。研究表明,去甲肾上腺素在记忆保持方面起着重要作用,而改善记忆与多巴胺的释放有关^[10]。去甲肾上腺素和多巴胺含量的减少是造成学习记忆能力减退的重要原因^[11]。它们的前体是酪氨酸和色氨酸,酸性代谢产物有 3,4-二羟苯乙酸、5-羟吲哚乙酸等。这些物质在正常生物体内存在动态平衡,参与中枢神经系统中多种生理过程。分析单胺类神经递质及其相关物质可为多种疾病的诊断和治疗以及疾病机制的研究提供重要依据^[12-15]。

在正常情况下,中枢内神经递质的分泌保持在一定水平,并且它们相互之间比例协调,从而维持功能的稳定;随着机体的老化,学习记忆能力的下降,脑内单胺类神经递质的代谢亦发生紊乱,出现 NE、DA、5-HT 含量的下降,提示衰老过程中脑内单胺类神经递质的平衡遭到破坏,这与一些老年性疾病如帕金森病、老年痴呆及脑功能的减退也有关^[16]。

本实验结果显示给予壮精合剂灌胃 8 周以后,各组大鼠大脑皮层及海马内单胺类神经递质 NE、DA、5-HT 含量均比空白对照组高,且壮精合剂高剂量组效果显著。结合 Morris 水迷宫实验结果说明壮精合剂可明显改善初老大鼠的学习记忆能力及提高大脑皮层、海马内单胺类神经递质 NE、DA、5-HT 含量,提示壮精合剂可有效调整中枢神经递质的合成,恢复大脑皮层、海马内单胺类神经递质的平衡,改善大脑皮层、海马神经内分泌细胞的功能,且壮精合剂高剂量效果较好。

(下转第 170 页)

- [3] Johnson CD, Charnley R, Rowlands B, et al. UK guidelines for the management of acute pancreatitis[J]. *Gut*, 2005, 54 Suppl 3:1-9.
- [4] Pittard AJ, Banks RE, Galley HF, et al. Soluble E-cadherin concentrations in patients with systemic inflammatory response syndrome and multiorgan dysfunction syndrome[J]. *Br J Anaesth*, 1996, 76(5):629-631.
- [5] Sewpaul A, French JJ, Khoo TK, et al. Soluble E-cadherin; an early marker of severity in acute pancreatitis[J]. *HPB Surg*, 2009;397375.
- [6] Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, et al. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(3):960-967.
- [7] Tummala P, Tariq SH, Chibnall JT, et al. Clinical predictors of pancreatic carcinoma causing acute pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2013, 42(1):108-113.
- [8] Zheng YJ, Zhou B, Ding G, et al. Effect of serum from patients with severe acute pancreatitis on vascular endothelial permeability[J]. *Pancreas*, 2013, 42(4):633-639.
- [9] Rinderknecht H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? [J]. *Int J Pancreatol*, 1988, 3(2/3):105-112.
- [10] 李鑫, 刘静, 王东. VEGF 在大鼠重症急性胰腺炎中的表

达及意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(28):2951-2953.

- [11] Okamoto R, Irie K, Yamada A, et al. Recruitment of E-cadherin associated with alpha-and beta-catenins and p120ctn to the nectin-based cell-cell adhesion sites by the action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in MDCK cells[J]. *Genes Cells*, 2005, 10(5):435-445.
- [12] Minami K, Okano H, Okumachi A, et al. Role of cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic exocrine-to-endocrine transdifferentiation[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(20):13753-13761.
- [13] Mayerle J, Schnekenburger J, Krüger B, et al. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(4):1251-1267.
- [14] Czako L, Takács T, Varga IS, et al. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis; inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin [J]. *J Physiol Paris*, 2000, 94(1):43-50.
- [15] Meriläinen S, Mäkelä J, Sormunen R, et al. Effect of acute pancreatitis on porcine intestine; a morphological study [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2013, 37(2):127-138.

(收稿日期:2014-09-12 修回日期:2014-10-22)

(上接第 167 页)

参考文献:

- [1] 谢启文. 现代神经内分泌学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1999:385-389.
- [2] 程化奇, 熊舜华, 殷新尤, 等. 大鼠更年期实验模型研究[J]. *上海实验动物科学*, 1993, 13(4):192-196.
- [3] 陈罗西, 郭玲玲, 李亮. Morris 圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(8):55-57.
- [4] 魏元锋, 汪益涵, 张宁, 等. HPLC-荧光检测法测定大鼠血浆及脑组织中 5 种单胺类神经递质[J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(9):1942-1943.
- [5] 张璐璐, 冯芳, 叶小敏, 等. 高效液相色谱-荧光法测定小鼠脑组织中单胺递质及其相关物质[J]. *中国医科大学学报*, 2010, 41(4):367-371.
- [6] 邹承鲁. 当代生物学[M]. 北京:中国致公出版社, 2000:394-396.
- [7] 石雪蓉. 衰老机制和抗衰老药物的研究现状[J]. *四川解剖学杂志*, 2008, 16(3):43-45.
- [8] 朱蕾, 张茹, 李廷利. 刺五加对睡眠剥夺大鼠学习记忆及海马单胺类神经递质的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4):219-222.
- [9] BIRTHELMER A, STEMMELIN J, JACKISCH R, et al. Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenalin, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory impairments[J]. *Brain Res Bull*, 2003, 60(3):283-296.

- [10] Nowakowska E, Chodera A, Kus K, et al. Reversal of stress-induced memory changes by moclobemide; the role of neurotransmitters[J]. *Pol J Pharmacology*, 2001, 53(3):227-233.
- [11] De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, et al. Characterization of monoamine systems in brain regions of prematurely ageing mice[J]. *Neurochemistry Int*, 2003, 43(2):165-172.
- [12] Hamaue N, Ogata A, Terado M, et al. Entacapone, a catechol-O-methyltransferase inhibitor, improves the motor activity and dopamine content of basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease induced by Japanese encephalitis virus[J]. *Brain Res*, 2010, 1309:110-115.
- [13] Meyer U, Feldon J. Neural basis of psychosis-related behavior in the infection model of schizophrenia[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 204(2):322-334.
- [14] Moreno FA, Parkinson D, Palmer C, et al. CSF neurochemicals during tryptophan depletion in individuals with remitted depression and healthy controls[J]. *Eur Neuropsychopharm*, 2010, 20(1):18-24.
- [15] Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression[J]. *J Clin Psychiatry*, 2000, 61(Suppl 6):4-6.
- [16] Rehman Hu, Masson EA. Neuroendocrinology of aging [J]. *Age Ageing*, 2001, 30(4):279-287.

(收稿日期:2014-09-21 修回日期:2014-10-22)