

实验研究

补肾活血方对拟血管性痴呆小鼠脑 NMDA 受体和一氧化氮合酶的影响

张孟仁* 郭赛珊*

摘要 探讨补肾活血方防治拟血管性痴呆(Vascular dementia, VD)小鼠的药理机制,用双颈总动脉闭塞—缺血—再灌注造成拟 VD 小鼠模型,观察补肾活血方对拟 VD 小鼠学习记忆能力、脑海马 N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体及一氧化氮合酶(NOS)活性的影响。结果证实,补肾活血方能明显缩短拟 VD 小鼠在 Morris 水迷宫中找到站台所需时间,改善学习记忆能力,抑制 VD 小鼠脑海马 NMDA 受体及 NOS 活性的升高,对抗兴奋毒性和 NO 对神经元的损伤,从而保护神经元免受损伤。

主题词 痴呆,血管性/中医药疗法 @ 补肾活血方

血管性痴呆(VD)是脑血管病后的主要并发症,随着人口的老齡化及脑血管病发病率的增加,VD 患者呈明显增长趋势。脑缺血后局部兴奋性氨基酸剧增、激活 N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体、 Ca^{2+} 内流、可激活一氧化氮合酶(NOS),NO 过量产生等过程是导致神经元死亡的主因^[1]。许多补肾活血中药能益脑增智、改善脑部供血、治疗痴呆^[2,3],因此我们观察了郭赛珊教授的经验方补肾活血方对拟血管性痴呆小鼠水迷宫实验、脑海马 NMDA 受体及 NOS 的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组及给药方法:实验动物选用昆明系 6~7 周龄雄性小鼠,体重 20~22g,由中国医学科学院实验动物中心提供,自然光线,饲养温度 20~25℃,自由进食进水。动物采用完全随机法分为 8 组,各组再分为 3 天组和 7 天组,每组 12 只小鼠。A 组:正常对照组;B 组:假手术组;C 组:缺血模型组,分别以生理盐水灌胃,1ml/d;D 组:正常给药组,以补肾活血方(简称 BSH)灌胃,40mg/10g 体重,1ml/d,3 天和 7 天;E 组:BSH 防治组,动物在术前以 BSH 40mg/10g 体重灌胃,1ml/d 7 天,术后继续以 BSH 灌胃 3 天和 7 天;F 组:BSH 治疗组,动物术后以 BSH 40mg/10g 体重灌胃,1ml/d,3 天和 7 天;G 组:川芎嗪(简称 Lig)治疗组,动物术后肌肉注射川芎嗪注射液(北京永康制药

厂,批号 98091012)每日 0.025ml/10g 体重,3 天和 7 天;H 组:阿尼西坦(简称 Ani)治疗组,动物术后以 Ani 灌胃(无锡艾西恩制药有限公司,批号 980201)0.8mg/10g 体重,1ml/d,3 天和 7 天。

1.2 药物:补肾活血方由生黄芪、枸杞子、女贞子、水蛭、地龙等中药组成,购自北京同仁堂药店并由其加工成粉末,加水煎煮 30 分钟,生药含量为 78.7mg/ml。

1.3 试剂: ^3H -MK801、L-nitroarginine 等均购自 Sigma 公司。

1.4 缺血模型的制备:参考李巍等^[4]方法,用双颈总动脉闭塞—缺血—再灌注造成拟 VD 小鼠模型。小鼠用 10%乌拉坦(1g/kg 体重)腹腔注射麻醉后,仰面固定在手术台上,取颈部正中切口,钝性分离两侧颈总动脉及并行的神经,用动脉夹夹闭两侧颈总动脉 20 分钟,再恢复血供 20 分钟,重复缺血再灌 3 次后缝合皮肤。假手术组手术只分离双颈总动脉,不行缺血再灌注。

1.5 小鼠学习记忆能力测定:采用 Morris 水迷宫测试。水迷宫主要由一漆成暗灰色的圆柱形水池和一金属站台组成。水池高 50cm,直径 80cm,站台直径 6.9cm。水池上方通过一数字摄像机与计算机监视屏相连接。小鼠在水池中的全部活动情况可在监视屏中看到,利用计算机软件对其活动进行全程跟踪,并显示整个活动轨迹。当设定的训练时间已到或动物已爬上站台,计算机停止跟踪并记录下游泳轨迹和自动计算出动物在水池中所游过的路程,及找到站台所需的时间即潜伏期。用找到站台所需的时间表示小鼠的学习记忆能力。水池里的清水因加入碳素墨水而成为不透明的黑色,再注入清水使水面高出站台 2cm,水温控制在 $22 \pm 0.5^\circ C$ 。实验在一半隔音的房间内进行,水池、日光灯、鼠笼等实验室各种物件的位置保持不变。实验采用一天训练 2 次,每次训练 2 分钟的方案。若动物 2 分钟尚未找到站台,将动物拿到站台上并使它上面停留 20 秒。3 天组于术后第 1 天训练,术后第 2、3 天进行水迷宫测试;7 天组于术前训练 5 天,术后进行水迷宫测试 7 天。

* 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院,北京市东城区帅府园 1 号(100730)

收稿日期:1999-04-02;修回日期:2000-08-18

1.6 NOS 的提取和活性测定:参照 Bredt 等^[5]的方法,所有操作过程在 4℃ 下进行。称取冻存脑组织(−70℃),按 1:5(w/v)比例加入预冷的 50mmol Hepes, pH 7.4, 内含 0.32mol 蔗糖、1mmol EDTA、0.1mmol EGTA、1mmol PMSF、1mmol DTT、1μmol Leupeptin、2μmol Pepstatin A。在冰浴中用 Tekmer 组织匀浆器匀浆,20000r/分离心 60 分钟,上清即为 NOS 提取液。采用 ³H-精氨酸转化生成 ³H-胍氨酸测定法提取 50μl 反应 Buffer,使其终浓度为 50mmol Hepes, pH 7.4, 内含 0.1mmol NADPH、30μmol BH₄、10nmol CaM、1.25mmol CaCl₂、1mmol EGTA、0.2μCi ³H-精氨酸(100000~150000cpm),反应管中加入 1mmol L-nitroarginine 作为本底,于 37℃ 水浴中反应 15 分钟,用 2ml 预冷的 Buffer C 中止反应,再经 0.5~0.7ml Dowex 50W×8(Na⁺型)阳离子交换树脂层析柱分离反应液中的 ³H-精氨酸和新生成的 ³H-胍氨酸。上样前层析柱先用 1ml 中止反应 Buffer (20mmol Hepes, pH 5.5, 内含 2mmol EDTA、0.2mmol EGTA、1mmol L-胍氨酸)平衡。上样后收集 2ml 流出液和 2ml 蒸馏水洗脱液,将收集的样品混匀后取出 1ml 于闪烁杯中,加入甲苯-Triton×100 闪烁液 7ml,在液体闪烁计数仪(FJ2100)上测定样品的每分钟放射性活性(CPM),由此计数计算 ³H-胍氨酸的生成量。结合蛋白质浓度计算 NOS 的比活性(以每分钟每毫克蛋白质生成的 ³H-胍氨酸的 pmol 数表示)。

$$cNOS = \frac{\text{样品 CPM} - \text{本底 CPM}}{\text{总计数 CPM}} \times 3.3333 / \text{mg prot} / 15 \text{ 分钟}$$

1.7 脑突触粗膜制备和 ³H-MK801 结合实验^[6]:采用和 NOS 提取同样的方法,21000r/分离心 60 分钟,沉淀悬浮于 10ml 50mmol Tris-醋酸缓冲液(TAB)中,21000r/分离心 20 分钟洗涤 2 次。最后将沉淀悬浮于灭菌的 0.32mol 蔗糖溶液中冻存于 −70℃ 冰箱内。此即为脑突触粗膜,简称突触膜。实验时从 −70℃ 冰箱中取出并解冻突触膜,加入 50mmol TAB 10ml,21000r/分离心 20 分钟洗涤 1 次,用 50mmol TAB 稀释突触膜。取 100μl 突触膜稀释液,加入 200μl 50mmol TAB;在非特异性结合管中加入 100μl 30μmol 非标记的 MK801 和 100μl 50mmol TAB,每管加入 0.1μCi ³H-MK801,在 30℃ 水浴中孵育 30 分钟,反应结束后加入预冷的 50mmol TAB 5ml,抽滤在纤维素滤膜上,并用预冷的 TAB 20ml 洗涤。将滤膜置于闪烁杯中,75℃ 左右烘烤 30 分钟后加入甲苯闪烁液 7ml,于液体闪烁计数仪上测定 CPM 值,结合突触膜蛋白质浓度

计算 ³H-MK801 结合量(以每毫克蛋白质结合的 ³H-MK801 pmol 数表示)。

$$^3\text{H-MK801 Binding} = \frac{\text{样品 CPM} - \text{非特异结合 CPM}}{\text{总计数 CPM}} \times 4.926 \text{ pmol/mg prot}$$

1.8 统计方法:统计检验用 *t* 检验。

表 1 8 组小鼠水迷宫测试结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	寻找平台所需时间(秒)	
		术后第 2 天	术后第 3 天
正常对照组	12	49.0 ± 33.5	24.0 ± 20.1
假手术组	9	50.6 ± 31.2	31.7 ± 26.8
缺血模型组	11	84.7 ± 37.5 *	79.3 ± 49.0 **
正常给药组	12	39.8 ± 31.0	15.2 ± 8.4
BSH 防治组	8	69.1 ± 44.8	50.1 ± 33.7
BSH 治疗组	11	55.4 ± 35.5	41.6 ± 32.3 ^Δ
Lig 治疗组	9	46.5 ± 24.3 ^{ΔΔ}	32.0 ± 29.2 ^Δ
Ani 治疗组	10	40.2 ± 39.2 ^Δ	39.3 ± 28.3 ^Δ

与缺血模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 8 组小鼠海马 NMDA 受体活性测试结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	MK-801 特异性结合(nmol · mg · prot ⁻¹)	
	术后 3 天	术后 7 天
正常对照组	883 ± 172(12)	802 ± 218(11)
假手术组	840 ± 208(8)	877 ± 153(12)
缺血模型组	972 ± 220(11)	802 ± 121(10)
正常给药组	646 ± 233(11)	835 ± 175(10)
BSH 防治组	724 ± 160(8) ^Δ	893 ± 128(10)
BSH 治疗组	704 ± 202(11) ^{ΔΔ}	855 ± 166(8)
Lig 治疗组	689 ± 77(9) ^{ΔΔ}	901 ± 145(8)
Ani 治疗组	697 ± 191(9) ^{ΔΔ}	825 ± 224(9)

与缺血模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 表中括号内为实验所用鼠数, 下表同

表 3 8 组小鼠大脑海马 NOS 活性改变比较($\bar{x} \pm s$)

组别	NOS 活性(pmol · mg prot ⁻¹ · min ⁻¹)	
	术后 3 天	术后 7 天
正常对照组	453 ± 37(12)	460 ± 44(11)
假手术组	463 ± 41(8)	498 ± 64(12)
缺血模型组	519 ± 56(10) **	579 ± 69(10) **
正常给药组	450 ± 61(11)	458 ± 51(10)
BSH 防治组	478 ± 39(8)	502 ± 42(8) ^{ΔΔ}
BSH 治疗组	485 ± 34(11)	529 ± 34(8)
Lig 治疗组	498 ± 53(9)	556 ± 40(8)
Ani 治疗组	514 ± 74(9)	453 ± 32(9) ^{ΔΔ}

与缺血模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2 实验结果

2.1 8 组小鼠水迷宫测试结果比较:表 1 示,小鼠经脑缺血再灌注后,水迷宫测试结果显示,术后第 2 天寻找站台所需的时间(s)比正常对照组明显增加($P < 0.05$),术后 3 天差异更加显著($P < 0.01$);术后 7 天所需时间(14.3 ± 6.7)比正常对照组(6.5 ± 2.1)也有显著性差异($P < 0.01$)。补肾活血方、川芎嗪、阿尼西

坦等药治疗后,小鼠术后 3 天寻找站台所需的时间比模型组明显缩短($P<0.05$);术后 7 天各药物治疗组寻找站台所需的时间比缺血模型组有改善,但统计学处理无意义(数据略)。

2.2 8 组小鼠海马 NMDA 受体活性测试结果比较:表 2 示,小鼠脑缺血再灌损伤后 3 天海马的 ^3H -MK801 比正常对照组结合增强,7 天后恢复正常。术后 3 天补肾活血方防治组和治疗组、Lig 治疗组、Ani 治疗组 NMDA 受体活性与缺血模型组比较明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.3 8 组小鼠海马 NOS 活性改变比较:表 3 示,小鼠脑缺血再灌损伤后 3 天及 7 天海马的 NOS 活性比正常对照组明显升高,有显著意义,术后 7 天补肾活血方防治组、Ani 治疗组 NOS 活性与缺血模型组比较明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

智能损害是 VD 病人的主要症状,其中学习记忆能力减退尤为明显,生活质量受到严重影响,因此对 VD 的发病机理及药物治疗机制的研究日益受到重视。NMDA 受体在脑缺血损伤中的中心作用引起人们极大的关注并为许多实验所证实^[7]。生理情况下 NO 作为弥散性介质具有第二信使作用,并参与了学习记忆的调控^[8]。但在脑缺血等病理状态时 NOS 过度表达,合成过量的 NO,引起神经毒性作用,可能是导致神经元缺血性坏死的重要原因^[9]。我们的实验结果表明,小鼠经反复双侧颈总动脉闭塞缺血再灌术后,寻找站台所需时间明显延长,表明脑缺血再灌术可造成小鼠学习记忆功能障碍。补肾活血方等药可明显改善由脑缺血损伤所致学习记忆障碍,缩短小鼠在 Morris 水迷宫中寻找站台所需的时间,补肾活血方与川芎嗪、阿尼西坦作用相近,说明补肾活血方等药对脑缺血再灌损伤所致学习记忆功能障碍具有明显改善作用。神经生化结果证实,脑缺血再灌术可引起小鼠海马 NMDA 受体活性的升高及 NOS 活性显著持续升高,提示脑缺血再灌术可导致 NMDA 受体通道开放,从而介导了兴奋性神经毒损伤;并引起 NOS 活性升高、NO 过量生成,从而引起神经元损伤。补肾活血方等药可明显对抗由脑缺血引起的 NMDA 受体、NOS 活性的升高,提示补肾活血方等药具有对抗脑缺血再灌损伤引起的兴奋性氨基酸的毒性作用,并可抑制 NOS 活性的升高,对抗 NO 对神经元的损伤。这一作用可能是补肾活血方保护脑缺血损伤的重要机制之一,与其改善学习记忆能力相一致。

《医学心悟》中说“肾主智,肾虚则智不足”,VD 又

是脑血管病后的并发症,属血瘀的范畴,血瘀致髓海失养,即可引起智能障碍,故肾虚血瘀是 VD 的基本证型。现代中药药理研究资料表明,补肾活血方中的黄芪对双侧颈动脉结扎所致的实验动物脑缺氧有显著对抗作用^[10],并可增强小鼠的学习记忆能力^[11];枸杞子具抗衰老作用^[12];女贞子既能抗衰老,又可抑制血小板聚集^[13];地龙、水蛭均可明显抑制血栓形成,改善血液循环,增加脑血流量,对缺血性脑病有较好的治疗作用^[14,15]。因此补肾活血方能补肾活血益智,调节中枢神经系统兴奋与抑制的平衡,增加脑的血液供应,提高脑细胞对缺血缺氧的耐受力,抑制 NMDA 及 NOS 活性的升高,从而改善学习记忆能力,为补肾活血方用于防治 VD 提供了可靠的实验依据,其他作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Buisson A, Margail I, Callebort J, et al. Mechanisms involved in the neuroprotective activity of a nitric oxide synthase inhibitor during focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, 1993, 61(2): 690-696.
- 2 莫启忠, 马骏, 官斌, 等. 补肾中药对拟痴呆小鼠胆碱能 M-受体功能及胆碱酯酶活性的影响. *中国中西医结合杂志*, 1996, 16(2): 99-101.
- 3 陈楷, 陈可冀, 周文泉, 等. 益智胶囊治疗老年血管性痴呆临床研究. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17(7): 393-397.
- 4 李巍, 张世仪, 赵惠敏, 等. 小鼠脑缺血性学习记忆障碍模型的建立. *基础医学与临床*, 1995, 15(6): 46-49.
- 5 Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(2): 682-685.
- 6 Yoneda Y, Ogita K. Neurochemical aspects of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Neurosci Res*, 1991, 10(1): 1-33.
- 7 Yoneda Y, Suzuki T, Ogita K, et al. Excitatory amino acid receptor binding in hippocampus of gerbils with transient global brain ischemia. *Brain Res*, 1993, 613: 21-31.
- 8 张世仪, 陈纪君, 左萍萍, 等. 学习过程脑内一氧化氮变化的研究. *中国医学科学院学报*, 1997, 19(1): 17.
- 9 应赛霞, 程介士. 一氧化氮在脑缺血时的神经毒作用. *中国药理学通报*, 1994, 10(6): 415-417.
- 10 李先荣, 康永, 程霞, 等. 注射用黄芪多糖药理作用的研究. *中成药*, 1989, 11(3): 27-28.
- 11 潘思源, 侯家玉, 姜名瑛, 等. 黄芪对小鼠中枢神经系统的药理作用. *中药通报*, 1986, 11(9): 47-49.
- 12 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用(1). 北京: 学苑出版社, 1993: 477-480.
- 13 阴健. 中药现代研究与临床应用(2). 北京: 中医古籍出版社, 1995: 30-37.
- 14 高云端, 孙尚奎, 李光泽, 等. 溶栓丸对家兔实验性血栓形成的影响. *中药药理与临床*, 1989, 5(2): 36-37.
- 15 尹宝光, 李艳荣, 李连达, 等. 水蛭对实验性脑水肿及皮下血肿的影响. *中国中西医结合杂志*, 1986, 6(7): 407.

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Clinical Observation on Spasticity Treated with Comprehensive Rehabilitation Therapy of TCM in 60 Cases of Hemiplegia due to Apoplexy

Zhang Wensheng, Zou Yihuai, Xie Yingzhen, et al

The revised Ashworth assessment of spasm, simplified Fugl-Meyer assessment method and Barthel's ADL index were used to evaluate spasm extent, functional level of motor and daily living ability, respectively, to reflect functional level of the patient. 90 Cases of hemiplegia due to apoplexy were randomly divided into treatment group (60 cases) and control group (30 cases). Comprehensive rehabilitation exercises of TCM were used in the treatment group and modern rehabilitation exercises were used in the control group. Results indicated that the improving action of comprehensive rehabilitation method of TCM on spasticity was superior to that of the control group, with marked improvement of motor function level and living ability in the two groups. It is suggested that rehabilitation method of TCM has distinct advantage, and rehabilitation methods of TCM and Western medicine are of complementarity.

Authors' address: Insititute of Resource Science, Beijing Teachers Training University, Beijing 100875

Key words: apoplexy, sequelae/TCM therapy: hemiplegia/TCM therapy

(Original article on page 723)

Clinical Observation on 120 Cases of Male Infertility Treated with Sheng Jing Zhu Yu Decoction

Li Jinkun, Shen Ming, Xu Xiaolin, et al

One hundred and twenty cases of male infertility were treated by oral administration of Sheng Jing Zhu Yu Decoction, one dose daily for 2 consecutive months and 72 cases were used as control group. Sperm analysis was made before and after treatment. Results showed that after treatment the motility rate, rapid mobility rate and various mobility indices of sperm were improved in the treatment group and among the 120 cases treated, 16 cases's spouses had pregnancy. It is proved that Sheng Jing Zhu Yu Decoction has a definite therapeutic effect on male infertility, and the therapeutic mechanism might be increase of mobility rate, rapid mobility rate and improvement of mobility indices of sperm.

Authors' address: First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032

Key words: infertility, male/TCM therapy, @ Sheng Jing Zhu Yu Decoction

(Original article on page 728)

Relation of Serum Apoprotein A₁ and B₁₀₀ Contents and Their Ratio with Deficiency and Excess Syndromes of TCM in the Patient of Malignant Tumor

Li Xiaofeng, Lin Hexi, Huang Weixian, et al

One hundred and sixteen cases of malignant tumor were divided into deficiency syndrome group, excess syndrome group, and deficiency with excess syndrome group, and 100 cases were used as control group. Serum apoprotein A₁ (ApoA₁) and apoprotein B₁₀₀ (ApoB₁₀₀) levels and their ratio were determined. Results indicated that proportion of abnormal serum apoproteins in the patient of malignant tumor was higher than that of the control group; and there were very significant differences between the patient of malignant tumor and the control in ApoA₁ and ApoB₁₀₀ levels and their ratio all ($P < 0.01$), suggesting that the patient of malignant tumor has disturbance of apoprotein metabolism. In the deficiency syndrome group level of ApoA₁ decreased, and in the excess syndrome group ApoB₁₀₀ level increased and A/B ratio in the deficiency and excess syndrome group lowered significantly all ($P < 0.01$). It is indicated that changes of the level and ratio of ApoA₁ and ApoB₁₀₀ can be used as reference of differentiation of clinical deficiency and excess syndromes.

Authors' address: Quanzhou Municipal Hospital of TCM, Fujian Province, Quanzhou City 362000

Key words: tumor/blood, apoprotein/blood

(Original article on page 743)

Effects of Bu Shen Huo Xue Fang on NMDA Receptor and Nitric Oxide Synthase of Brain in Mice of Vascular Dementia

Zhang Mengren, Guo Saishan

The present paper approached to mechanisms of Bu Shen Huo Xue Fang preventing and treating vascular dementia (VD) in mice. The effects of Bu Shen Huo Xue Fang on study and memory ability, and NMDA receptor and activity of nitric oxide synthase (NOS) in hippocampus were observed in VD mice. Results prove that Bu Shen Huo Xue Fang can markedly shorten the time of the mice of VD looking out the platform in Morris'water maze, improve study and memory ability, inhibit NMDA receptor in hippocampus and increase NOS activity, antagonize excitatory toxicity and neuron injury induced by NO, so as to protect neurons from damage.

Authors' address: Beijing Union Hospital, China Union Medical University, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730

Key words: dimentia, vascular/TCM therapy

(Original article on page 745)