

补肾活血方对糖尿病小鼠学习记忆功能及中枢神经递质的影响

田国庆¹ 卢贺起² 郭赛珊¹ 张玲² 樊莎莎³

(1. 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院, 北京市东城区王府井帅府园1号, 100730;

2. 中国中医科学院中医基础理论研究所; 3. 首都医科大学中医药学院)

[摘要] **目的** 观察补肾活血方对糖尿病小鼠学习记忆功能及中枢神经递质的影响。**方法** 40只 ICR 小鼠随机分为正常对照组、模型组、尼膜同组和中药组, 每组10只。采用四氧嘧啶尾静脉注射复制糖尿病模型, 造模4周后灌胃, 中药组给予补肾活血方, 尼膜同组给予尼膜同, 其余两组给予等量蒸馏水, 共8周。观察各组小鼠血糖的变化; Morris 水迷宫法测定小鼠学习记忆功能; 测定大脑皮质去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT) 和5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA) 的含量。**结果** 造模后小鼠血糖升高, 与正常对照组比较有统计学差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 尼膜同组和中药组小鼠 Morris 潜伏期均较模型组明显缩短 ($P < 0.01$); 中药组小鼠大脑皮质 NE 含量较模型组升高 ($P < 0.01$)。**结果** 补肾活血方能够改善糖尿病小鼠学习记忆功能, 其作用机制可能与大脑皮质 NE 含量变化有关。

[关键词] 补肾活血方; 糖尿病; 学习记忆功能; 神经递质; 小鼠

Effect of Bushen Huoxue Formula on the Learning and Memory Function and Cerebral Neurotransmitter of Diabetic Mice

TIAN Guoqing¹, LU Heqi², GUO Saishan¹, et al.

(1. Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730; 2. Institute of Basic Theory of TCM, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT **Objective** To observe the Effect of Bushen Huoxue Formula (Formula for Reinforcing Kidney and Activating Blood) on the study-memory function and cerebral neurotransmitter of diabetic mice. **Methods** Totally 40 ICR mice were randomized into normal control group, model group, Nimotop group and Chinese medicine group, with 10 in each. Alloxan tail intravenous injection was applied to duplicate diabetes models. Four weeks later, the intragastric administration with Bushen Huoxue Formula for the Chinese medicine group, Nimotop for the Nimotop group, and isometric distilled water for the other two groups were given respectively for 8 weeks. The changes of blood sugar of all groups were observed. Morris labyrinth test was used to determine their study-memory function. And the contents of cerebral cortical nor epinephrine (NE), dopamine (DA), 5-hydroxyl tryptamines (5-HT), and 5-hydroxyl indole acetic acid (5-HIAA) were measured. **Results** The blood sugar of diabetic models was increased compared with those of normal control group, the difference was significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Morris latency of Nimotop group and Chinese medicine groups was obviously shortened in comparison with that of model group ($P < 0.01$). The content of cerebral cortical NE of Chinese medicine group was higher than that of the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Bushen Huoxue Formula is effective in improving the study-memory function of diabetic mice, its mechanism is possibly related to increase of cerebral cortical NE of mice.

Key Words Bushen Huoxue Formula (Formula for Reinforcing Kidney and Activating Blood); Diabetes; Study and memory function; Neurotransmitter; Mice

随着生活水平的提高、人口老龄化及生活方式的改变糖尿病患病人数正在迅速增加^[1]。近年来, 由糖尿病引起的中枢神经系统损害日益受到重视, 许多资料显示, 糖尿病患者存在认知功能损害, 主要表现为学习记忆功能的障碍^[2,3]。我们既往的研究观察到补肾活血方能够改善脑缺血小鼠学习记忆功能障碍, 提高脑组织胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 及 N 受体 (NR)、M 受体 (MR) 的活性^[4], 减轻海马神经细胞凋亡的作用^[5]。本研究进一步探讨补肾活血方对糖尿病小鼠学习记忆功能及大脑皮质去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT) 和5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA) 的影响, 为该方药治疗糖尿病所致学习记忆障碍提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物及分组

ICR 小鼠40只, 雄性, 体重(22±1)g, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2007-0001。所有小鼠称量体重, 按随机数字表随机分为4组, 即正常对照组、模型组、尼膜同组及中药组, 每组10只。

1.2 实验药品

补肾活血方: 由生黄芪30g、枸杞子15g、水蛭6g、地龙10g 等12味中药组成, 饮片购自北京同仁堂药店, 经鉴定符合药典要求。水煎提取制成浓度为每毫升含1g 生药的水煎剂, 4℃存放备用。尼膜同(尼莫地平片): 拜耳医药保健有限公司, 批号107938。四氧嘧啶: 上海化学试剂厂, 批号 F20060409, 用生理盐水配制成浓度为14mg/ml 溶液。

1.3 实验试剂和仪器

标准品:NE(批号A 0937)、DA(批号H 9523)、5-HT(批号H 8502)、5-HIAA(批号H 8876)。内标物:3,4-二羟基苜胺(DHBA,批号37616)、1-庚烷磺酸钠、一水柠檬酸、柠檬酸三钠。以上试剂均为Sigma产品。甲醇为Merck公司产品;高氯酸、焦亚硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠及其他试剂均为国产AR级;实验用水为超纯水电阻抗>18MΩ。主要仪器:5600A型高效液相色谱-8通道库仑阵列电化学检测器(Model 5600A Coularray Detector-8,美国ESA公司);Morris水迷宫测试系统,型号:CRIMSON-XT S-20107;血糖测定仪:美国Optium公司,型号:QA 0961-2496。

2 方法

2.1 造模方法

参考文献[6],动物均按70mg/kg剂量尾静脉注射四氧嘧啶。于72h尾静脉取血测定非禁食血糖,血糖≥16.7mmol/L者为糖尿病模型小鼠。

2.2 给药剂量及方法

造模4周后,中药组予补肾活血方25g/kg灌胃,尼膜同组予尼膜同15mg/kg灌胃;根据浓度梯度换算等体积给药,两组小鼠灌胃量均为0.5ml/只;正常对照组、模型组灌胃蒸馏水,0.5ml/只。每日1次,连续灌胃8周。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 血糖 造模后72h、12周尾静脉取血测定非禁食血糖。

2.3.2 学习记忆能力 具体方法见文献[5],造模后第5天及第12周以Morris水迷宫测定小鼠找到站台所需要的时间即潜伏期,代表小鼠的学习记忆能力。采用连续测定2次,每次测定2min的方案,两次测定间隔1h。以第二次测定结果作为学习记忆能力。第一次测定时,若动物2min内尚未找到站台,将动物抓放在站台上并使其停留20s,以促进其学习记忆。

2.3.3 中枢神经递质含量的测定 实验结束时,脱颈法处死动物,立即低温下(0℃)取全脑,分离脑皮质,以库仑阵列电化学HPLC法测定脑皮质组织NE、DA、5-HT、5-HIAA含量。

2.4 统计学方法

以Millenium³²软件采集并处理原始数据,应用SPSS10.0统计软件进行统计分析,组间比较采用Student's t检验。

3 结果

3.1 各组小鼠血糖测定值比较

表1示,小鼠注射四氧嘧啶72h后血糖明显升高,与正常对照组比较有统计学意义(P<0.01)。实验第12周,造模各组血糖仍高于正常对照组(P<0.01)。

表1 各组小鼠血糖测定值比较(mmol/L, x±s)

组别	鼠数	72h	12周
正常对照组	10	10.15±1.80	10.38±0.81
模型组	8	26.50±1.65*	25.93±2.08*
尼膜同组	9	26.05±3.15*	25.57±3.69*
中药组	8	27.52±1.56*	25.02±2.30*

注:与正常对照组相比较,*P<0.01

3.2 各组小鼠Morris水迷宫潜伏期比较

表2示,造模后第5天各组小鼠潜伏期差异无统计学意义(P>0.05);第12周模型组与正常对照组比较,潜伏期延长(P<0.01)。中药组和尼膜同组潜伏期缩短,与模型组比较差异均有统计学意义(P<0.01),而两组之间比较差异无统计学意义(P>0.05)。

表2 各组小鼠Morris水迷宫潜伏期比较(s, x±s)

组别	鼠数	第5天	第12周
正常对照组	10	35.80±33.08	18.11±17.13
模型组	8	39.90±35.74	60.89±28.71*
尼膜同组	9	33.20±32.51	18.53±17.12△
中药组	8	37.90±21.58	19.10±13.85△

注:与正常对照组比较,*P<0.01;与模型组比较,△P<0.01

3.3 各组小鼠脑皮质NE、DA、5-HT、5-HIAA含量比较

表3示,与正常对照组比较,模型组小鼠大脑皮质NE升高、5-HT降低(P<0.05),DA、5-HIAA改变不明显(P>0.05),中药组NE进一步升高,与模型组比较差异有统计学意义(P<0.05),DA、5-HT及5-HIAA改变不明显。

4 讨论

学习记忆功能与多种因素有关,特别是与脑皮质的神经递质含量、血流量供给和相关受体数量变化等密切相关。库仑阵列电化学HPLC法能准确测定

表3 各组小鼠脑皮质组织NE、DA、5-HT和5-HIAA含量比较(μg/ml, x±s)

组别	鼠数	NE	DA	5-HT	5-HIAA
正常对照组	10	22.74±6.54	196.2±33.39	52.33±19.80	14.63±5.48
模型组	8	31.12±3.84*	193.6±18.71	24.72±7.92*	11.02±2.32
尼膜同组	9	29.17±7.29	176.8±45.31	26.92±2.13*	14.30±3.01
中药组	8	37.39±4.98**△	212.1±38.31	26.50±4.72*	13.50±3.27

注:与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,△P<0.05

NE、DA、5-HT 和5-HIAA 含量,灵敏度高,已被美国FDA 认可^[7]。

学习记忆障碍属中医“健忘”等范畴,与肾脏关系密切,《医学心悟》中有“肾主智,肾虚则智不足”之说,因此学习记忆障碍患者多有肾虚,我们认为,肾虚血瘀是糖尿病学习记忆障碍的基本证型。许多研究表明^[8],补肾药和活血化瘀药有改善学习记忆、改善血液流变性、改善微循环、改善血液动力学、增加血流量及组织的血灌流量的作用。补肾活血方为北京协和医院中医科郭赛珊教授治疗脑血管病智能下降的临床经验方,主要由生黄芪、枸杞子、水蛭、地龙等12味药组成,具有补肾活血、益气养阴之功效。研究资料显示,黄芪提取物对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用,并可增强小鼠的学习记忆能力^[9,10];枸杞子可减少老年大鼠脑组织线粒体DNA 缺失,提高线粒体三磷酸腺苷(ATP)的合成及脑线粒体呼吸链复合酶Ⅰ活力,对老年大鼠线粒体DNA 的氧化损伤有保护作用^[11];水蛭水煎醇提取液可降低缺血再灌注后脑细胞凋亡率,对缺血脑细胞起保护作用^[12]。

本实验观察到小鼠注射四氧嘧啶72h 后血糖升高,均大于16.7mmol/L(300mg/dl),且高血糖持续存在,表明糖尿病模型复制成功。造模后第5天以 Morris 水迷宫测定潜伏期,各组小鼠学习记忆无差别,第12周模型组潜伏期延长,表明造模后小鼠学习记忆能力下降,糖尿病学习记忆障碍小鼠模型制作成功。对于糖尿病学习记忆障碍目前尚无有效的治疗药物,研究证实尼膜同(尼莫地平片)可以改善学习记忆障碍,因此本实验选用尼莫地平为阳性对照。本研究观察到补肾活血方给药组 Morris 水迷宫测定潜伏期缩短,与尼膜同组作用相似,表明该方药能够改善糖尿病小鼠学习记忆功能。与正常对照组比较,造模后小鼠大脑皮层组织NE 升高、5-HT 降低,DA、5-HIAA 改变不明显,补肾活血方干预后,NE 进一步升高,DA、5-HT、5-HIAA 无变化,提示糖尿病小鼠学习记忆功能可能与中枢神

经递质含量的变化有关,但具体机制有待今后进一步研究证实。

参考文献

[1] Lefebvre P. Diabetes yesterday, today and tomorrow · The action of the International Diabetes Federation[J]. Rev Med Liege, 2005, 60(5-6): 273-277.

[2] Awad N, Gagnon M, Messier C. The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function[J]. J Clin Exp Neuropsychol, 2004, 26(8): 1044-1080.

[3] van Harten B, de Leeuw FE, Weinstein HC, et al. Brain imaging in patients with diabetes: a systematic review [J]. Diabetes Care, 2006, 29(11): 2539-2548.

[4] 郭赛珊,张孟仁,左萍萍,等. 补肾活血方对脑缺血小鼠智能及大脑皮层胆碱能系统的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(基础理论研究特辑): 42-44.

[5] 田国庆,郭赛珊,卢贺起,等. 补肾活血方对缺血再灌注损伤小鼠学习记忆功能及海马神经细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(2): 123-127.

[6] 徐叔云,卞如濂,陈修主编. 药理实验方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社. 1991:1269-1279.

[7] 张向晖,刘军,苏林雁. 库仑阵列电化学高效液相色谱法测定大鼠脑组织中单胺类神经递质及代谢产物[J]. 医学临床研究, 2007, 127(1): 1-3.

[8] 张小勤,郭赛珊. 补肾活血法的临床应用概况[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(6): 376-378.

[9] 曹曦,李卫平,王绍斌,等. 黄芪提取物对局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2005, 40(5): 408-411.

[10] 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[J]. 中药通报, 1986, 11(9): 47-49.

[11] 王学美,富宏,刘庚信. 淫羊藿、枸杞子对老年大鼠线粒体DNA 缺失、线粒体呼吸链酶复合体和ATP 合成的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2002, 34(1): 68-71.

[12] 曹翠丽,马常升,马文领,等. 中药水蛭对缺血/再灌注后脑细胞的抗凋亡作用[J]. 河北医科大学学报, 2000, 21(4): 193-195.

(收稿日期:2008-10-30,修回日期:2009-04-04)

[编辑:邓媛]

第六次国际中医糖尿病学术交流会暨糖尿病专科医师培训与名医经验传承研修班通知

世界中医药学会联合会糖尿病专业委员会第六次国际中医糖尿病学术交流会议,拟于2009年9月12日~13日在北京召开。会议将邀请国内外知名专家就糖尿病的热点、难点问题及最新进展进行专题报告,讨论糖尿病及其并发症诊治规范,就国内外糖尿病及其并发症的临床、科研成果等进行交流,并交流“如何传承中医学术”,邀请名老中医及其学术继承人介绍授徒带教、学术传承的经验和体会。会议还将关注糖尿病的中医药科普工作,召开“吕仁和名医传承工作站”学术会议及新一届专业委员会理事会议,并编写论文集。论文作者颁发论文证书、授予继续教育学分。征稿截止日期:2008年6月15日,邮箱:tnb2009@126.com。2009年9月14~20日(7天)安排国家中医药继续教育项目——糖尿病专科医师培训与名医经验传承研修班,共42学时。授课针对糖尿病及其并发症中医药治疗现状,讲解本专业优势病种治疗的新理念、好方案,传授糖尿病及其并发症、合并症诊治临床经验,提高糖尿病专科医师的诊治水平及临床疗效。本研修班依托“薪火传承3+3”吕仁和名中医工作站,传授名老中医药专家临床辨证和用药经验。教师为北京中医药大学、中国中医科学院等著名专家教授、副高糖尿病专科医师。

地点:北京市东城区海运仓1号京东宾馆。学费:800元(食宿自理),开班当天或前1天报到。授予继续教育学分及培训证书。电话:84013122(赵进喜)、13910965659(王世东)、13693332059(傅强)。