

液(1ml/100g),空白对照组腹腔注射同体积的弱碱性生理盐水,连续注射2天。于第1次腹腔注射PCPA28~30h后,大鼠出现昼夜节律消失,表明造模成功。

2.2 给药方法

参芪五味子片组每只大鼠经灌胃给予浓度为0.04g/ml参芪五味子片混悬液10ml/kg,空白对照组与模型对照组每只大鼠经灌胃分别给予生理盐水10ml/kg,每日1次,连用6天。

2.3 大鼠下丘脑内NE含量的测定

参照文献方法^[1]:将大鼠脱颈椎处死,取脑,放在预先冰冷的生理盐水中,去除脑膜血管。在冰冷平皿上分离下丘脑,称重;放在预先冰冷的玻璃匀浆器中,加5ml酸性正丁醇,匀浆,1500r/min离心10min,吸上层正丁醇2ml加入含有1.5ml 0.1mol/L的磷酸缓冲液(pH6.5)的具塞离心管中,振荡10min,NE被抽提到缓冲液中。取1.5ml上述磷酸提取液按文献方法与氧化碘试剂进行反应,反应液在荧光计上以385nm激发、485nm、狭缝5处测定荧光强度。试剂空白和组织空白是将氧化剂和还原剂加入次序颠倒,其他步骤不变。根据标准曲线将各组荧光读数转化为浓度值,进行统计学处理。

2.4 大鼠下丘脑内5-HT、5-HIAA含量的测定

下丘脑分离同上。参照文献方法^[2],组织称重后立即置于含有冷酸性正丁醇(100mg组织/1ml正丁醇)的匀浆器中,在冰浴条件下充分匀浆后,离心(3000r/min,5min),吸取5ml×2上清液,分别加到两支带塞离心管中,分离5-HT、5-HTAA。被提取的5-HT、5-HTAA与OPT作用后,在激发光365nm、发射光480nm、狭缝5条件下测定样品的荧光强度。按文献同时制备标准管、样品空白管。按公式计算5-HT、5-HTAA含量,并进行统计学处理。

3 结果

3.1 参芪五味子片对PCPA化失眠大鼠下丘脑内NE含量的影响

空白对照组、模型对照组、参芪五味子片组鼠数均为10只,NE含量分别为(17.94±2.02)ng/0.2u1、(18.42±3.76)ng/0.2u1、(15.01±2.03)ng/0.2u1。参芪五味子片组大鼠下丘脑内NE含量明显低于空白对照组及模型对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明参芪五味子片可以降低大鼠下丘脑内NE含量。

3.2 参芪五味子片对PCPA化失眠大鼠下丘脑内5-HT、5-HIAA含量的影响

空白对照组、模型对照组、参芪五味子片组鼠数均为10只,5-HT含量分别为(0.91±0.20)ng/mg、(0.70±0.21)ng/mg、(1.05±0.31)ng/mg;5-HTAA含量分别为(0.21±0.03)ng/mg、(0.18±0.03)ng/mg、(0.23±0.04)ng/mg。模型组下丘脑内5-HT、5-HTAA含量明显低于空白对照组,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$);参芪五味子片组下丘脑内5-HT、5-HTAA含量较模型组有显著性升高($P<0.01$),与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 讨论

研究表明,睡眠与觉醒所涉及的神经生理过程非常复杂,

至今仍未完全清楚,它涉及到中枢神经系统不同层次众多的神经网络和一系列的神经递质、神经调节物质^[3]。NE与5-HT是公认的参与睡眠-觉醒机制的经典神经递质,而5-HIAA是脑内5-HT的主要代谢途径。一系列研究表明,脑内5-HT有增加睡眠的作用^[4-6],而NE在维持觉醒中起着重要作用。NE主要位于延髓网状结构、桥脑蓝斑、中脑网状结构,对中枢神经元既有兴奋又有抑制作用,在特定的部位有其特定的作用,常以兴奋作用为主。5-HT主要分布在脑干背侧中线附近的中缝核等处,多呈抑制效应,脑干中的5-HT有利于维持慢波睡眠,而慢波睡眠又有利于疲劳的恢复^[7]。

失眠是人体最为常见的睡眠-觉醒节律紊乱^[8],现代神经生理学研究已明确睡眠和觉醒是中枢神经系统主动活动的结果,多数中枢神经递质在参与睡眠-觉醒节律的调节中发挥了极为重要的作用,而睡眠-觉醒节律的紊乱亦存在着中枢神经递质不同程度的活动异常^[9]。

笔者采用目前较为公认的失眠模型—PCPA化大鼠,研究参芪五味子片对失眠大鼠下丘脑内主要单胺类神经递质的影响,以期明确该方在脑内神经递质方面的作用机制。实验结果显示,服药6天后,参芪五味子片可以降低大鼠下丘脑内NE含量,恢复失眠大鼠下丘脑5-HT和5-HTAA含量,以此可以推测该方改善失眠大鼠睡眠的机制与其可以调节失眠大鼠下丘脑内NE与5-HT含量有关。其中,模型组大鼠下丘脑内NE含量是较空白组有所增加,但两组比较差异无统计学意义,这可能因为PCPA为色氨酸羟化酶(TPH)抑制剂,对NE无直接影响,而模型组NE含量的升高可能是PCPA引起失眠而间接导致的。

参考文献

- [1] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2003:3.
- [2] 方福德,周吕,丁濂,等.现代医学实验技巧全书[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995:12.
- [3] Krueger JM,Obal FJ,Kapas L,et al.Brain organization and sleep function[J].Brain Res,1995,69(2):177-185.
- [4] 靳照宇.5-HT1A和5-HT2受体功能与觉醒、睡眠成分关系的研究[J].中国药理学通报,2000,16(2):208.
- [5] 朱国庆.5-羟色胺和环磷酸腺苷对睡眠的影响[J].中国药理学通报,1999,49(2):135-140.
- [6] 王志.腹侧背盖区DA神经元调节睡眠-觉醒机制的探讨[J].生理学报,1997,49(2):135-139.
- [7] 付乙.中药对运动性失眠单胺类神经递质和免疫功能的影响[J].四川中医,2004,22(4):14-15.
- [8] 梁春莲,陈芬.原发性失眠患者个性及身心健康研究[J].实用医学杂志,2007,23(1):120-121.
- [9] 范利锋,王平仁,兰培敏.睡眠机制的研究概况[J].临床内科杂志,2005,22(10):662-664.

*上海市瑞金医院(200025)

益气活血通络法防治糖尿病周围神经病变的实验研究

张文凤¹ 朴今哲² 苏鑫¹ 栗粟¹

糖尿病周围神经病变(DPN)是糖尿病的慢性并发症之一,随着病程的延长,发病率可达90%以上。DPN的发病机制较为复杂,目前缺乏安全有效的治疗方法及药物。本实验根据糖尿病临床表现特点,从气虚血瘀论治,观察了该方法对糖尿病大鼠坐骨神经

的运动神经传导速度(MNCV)的影响,旨在探讨益气活血通络法对糖尿病神经病变的防治作用及机理。

1 材料与方法

1.1 模型的建立

选用 8 周龄雄性健康 Wistar 大鼠,体重 220~250g。适应性饲养 1 周后,禁食 12h,将链脲佐菌素临用前用 0.1mmol/L 枸橼酸缓冲液(pH 4.2、4℃)配成 2%浓度溶液,按剂量 50mg/kg 左下腹腔内单次注射,72h 后取尾血测血糖,凡血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为糖尿病大鼠。适应性喂养 3d 后将糖尿病大鼠随机分为 3 组,即模型组、中药组、弥可保组,每组 10 只。并取体重、鼠龄相匹配的同批正常大鼠 10 只,用 0.1mmol/L 枸橼酸缓冲液(pH 4.2、4℃)左下腹腔内单次注射,72h 后取尾血测血糖,血糖值在正常范围内的大鼠作为正常组大鼠。大鼠实验期间按组分笼饲养,自由进食、饮水,饲喂大鼠标准饲料。连续观察 8 周后处死。

1.2 观察指标及检测方法

①体重、血糖检测:实验结束前,称其体重,取尾静脉血测其血糖。②电生理检测:大鼠腹腔注射 20%乌拉坦(5ml/kg),麻醉后俯卧固定,分离出右侧坐骨神经,采用 Medlab 生物信号采集处理系统测定坐骨神经 MNCV。刺激点位于坐骨结下,记录电极位于离刺激点 2cm 处,刺激量从较小开始,逐渐增强到超强刺激。神经传导速度以复合动作电位出现的潜伏期与复合动作电位传导的距离比值来表示。

2 结果

附表示,治疗 8 周后,与正常对照组相比,模型组、中药组、弥可保组动物的体重明显减轻,血糖明显升高,与正常组比较差异显著,各治疗组间无明显差异;中药组对血糖有降低作用,与模型组血糖相比差异显著。

治疗 8 周后,与正常对照组相比,模型组、中药组、弥可保组大鼠坐骨神经 MNCV 明显减慢,中药组及弥可保组均能延缓糖尿病大鼠坐骨神经 MNCV 的减慢,与糖尿病模型组相比差异显著;中药组的疗效优于弥可保,二者相比差异显著。

附表 各组大鼠体重、血糖、MNCV 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	血糖(mmol/L)	MNCV(m/s)
正常组	10	321.16 $\pm$ 37.68	4.33 $\pm$ 0.75	54.85 $\pm$ 13.41
模型组	7	230.80 $\pm$ 32.3 **	25.93 $\pm$ 8.55 **	20.27 $\pm$ 3.53**
弥可保组	9	227.30 $\pm$ 43.03 **	23.93 $\pm$ 3.17	36.41 $\pm$ 3.88**#
中药组	9	247.12 $\pm$ 35.28 **	12.43 $\pm$ 6.47*#	43.73 $\pm$ 4.58*# Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$;与弥可保组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

中医认为,DPN 是由于糖尿病日久,气阴两虚、瘀血阻络所致。益气活血通络法方由黄芪、桂枝、延胡索、水蛭、地龙、麦冬、葛根、生地黄组成。具有养阴益气、活血化瘀之功。研究表明,黄芪可扩张血管,改善血行增强机体免疫力;桂枝能使皮肤血管扩张,促进血液循环,又有镇痛解痉的作用。活血化瘀药物具有改善血液流变性,降低血黏度,抑制血小板聚集,扩张微血管等作用,可改善微循环,有助于改善 DPN 的症状和体征。实验证实活血化瘀药物能显著改善不同切变率下血液表观黏度,也能降低血浆黏度,使各级血管的血液流变性普遍趋于正常。

弥可保是维生素 B12(氰钴胺)的衍生物,在 STZ 诱导的糖尿病大鼠早期,给予弥可保治疗可防止有髓鞘神经纤维变性和脱髓鞘。本实验结果显示,对于糖尿病大鼠的体重、血糖、坐骨神经传导速度等方面的改善,益气活血通络法优于弥可保,可能由于弥可保治疗仅针对 DPN 发病的单一因素,而中药复方能起到整体调节作用,充分发挥中医多环节、多靶点、辨证论治的优势和特色有关。本实验结果表明,益气活血通络法能有效改善糖尿病大鼠坐骨神经速度,可用于糖尿病周围神经病变的预防和治疗,值得临床推广应用,但其作用的具体机理还需要进一步探讨。

1 长春中医药大学方剂教研室(130117);

2 延边大学医学部留学生处

丁香降气方对混合反流性食管炎家兔下食管括约肌钙通道调控机制研究

朱生樑* 马淑颖* 王宏伟* 王晓素* 程艳梅*

反流性食管炎(Reflux Esophagitis)是临床常见的上消化道动力障碍性疾病。据北京、上海两地流行病学调查显示反流性食管炎的发病率为 1.92%^[1],其中酸和胆汁混合反流占 63.3%^[2]。丁香降气方在我院胃食管反流病中医特色专科应用多年,前期研究显示良好的临床疗效,临床症状总有效率达 92%,内镜下黏膜炎症改善总有效率达 80%^[3]。本实验通过研究丁香降气方对家兔下食管括约肌(lower Esophageal Sphincter, LES)环行肌钙通道的调控,从动力学角度探讨其治疗混合反流性食管炎作用机制,为临床提供可靠的实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

新西兰兔 48 只,健康雄性,体重 2.0~4.0kg,由上海中医药

大学实验动物中心提供,随机分为正常组、模型组、中药组各 16 只。

1.2 试剂及药物

1.2.1 试剂 盐酸购于国药集团化学试剂有限公司,猪胆汁由上海五丰上食食品有限公司提供,速眠新注射液购于军事医学科学院军事兽医研究所, ACh、nifedipine、2-APB、U-73122、TG(thapsigargin)、DMSO 等均购自 Sigma 公司。NaCl、KCl、MgSO₄、NaH₂PO₄、NaHCO₃、CaCl₂、Glucose 均购于国药集团化学试剂有限公司。Krebs 液(in mM): 115 NaCl, 4.6 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 22 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 11 glucose, pH (7.4 $\pm$ 0.05), 每次实验前新鲜配制 2L。

1.2.2 主要药物 丁香降气方(丁香、赭石、柴胡、枳壳、川