

巴戟天水提液对自然衰老小鼠脑组织中单胺类神经递质含量的影响

张 鹏 陈地灵 林 励 林 辉 邓 韬 吴俊生

摘 要 **目的** 研究巴戟天水提液对自然衰老小鼠脑组织中多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)和 5-羟色胺(5-HT)含量的影响,探讨巴戟天益脑的作用机制。**方法** 17 个月龄昆明种小鼠连续给药 15 天后进行力竭性负重游泳实验,并采用高效液相-库伦阵列(HPLC-ECD)法检测小鼠脑组织中单胺类神经递质含量,比较分析各给药组与空白组的差异。**结果** 巴戟天水提液能提高小鼠负重游泳时间,与空白组相比,巴戟天水提液高、中、低剂量组脑组织中 NE、E、DA 的含量均升高,且 E 和 DA 的含量存在明显的量效关系,5-HT 的含量则降低。**结论** 巴戟天水提液能明显提高大鼠脑中能提高记忆的 NE、E、DA 的含量,同时降低能抑制记忆的 5-HT 的含量,表明巴戟天水提液可以通过改变脑内单胺类神经递质的含量而益脑。

关键词 巴戟天水提液 衰老 单胺类递质 高效液相-库伦阵列

[中图分类号] R285 [文献标识码] A

Effects of Radix Morindae Officinalis Decoction on Contents of Monoamine Neurotransmitters in Brain Tissues of Natural Aging Mice.

Zhang Peng, Chen Diling, Lin Li, et al. Guangzhou University of TCM, Guangdong 510006, China

Abstract Objective To study the effects of Radix Morindae officinalis decoction (RMOD) on contents of dopamine (DA), nor-epinephrine (NE), epinephrine (E) and 5-hydro-xytryptamine (5-HT) in natural aging mice, then to explore its Brain-nourishing mechanism. **Methods** Exhaustive swimming test on 17months Kunming mice was taken after successive administration 15 d, and the contents of monoamine neurotransmitters in brain tissues was determined by HPLC-ECD. Then a comparative analysis between each drug administration group and blank group way made. **Results** RMOD could extend the swimming duration of loaded mice. Compared to blank group, the levels of NE, E, DA increased in the groups of RMOD high dose group, middle dose group and low dose group, but 5-HT decreased, while the trend between content changes and the dose of E and DA is obvious. **Conclusion** RMOD can markedly increase the levels of NE, E and DA in brains of natural aging mice, which makes the process of memory easy, while decrease the level of 5-HT which blocks the memory. It suggested it could have relation between the contents of monoamine neurotransmitters and the action of beneficial-brain of RMOD.

Key words Radix Morindae officinalis decoction; Natural aging; Monoamine neurotransmitters; HPLC-ECD

补肾中药巴戟天为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How. 的干燥肉质根。巴戟天中主要含有蒽醌、糖类、氨基酸、脂类、有机酸等化合物及无机元素。现有的研究资料表明巴戟天的许多临床疗效与糖类成分有关,研究已证实巴戟天富含的糖类物质达 49.79%~58.20%,糖类为巴戟天有效部位之一,具有补肾助阳、抗抑郁、抗骨质疏松、增强记忆等活性^[1-3]。而现代研究表明补肾中药对神经内分泌免疫网络具有多层次、多靶点的药理作用,充分体现了中医从多方面调节治疗的优势,由此可见巴戟天作用

于神经系统机制值得深入研究。

单胺类神经递质包括肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺等,其与很多疾病密切相关。在老年型痴呆症、学习记忆、抑郁症等疾病与药物治疗效果等方面的研究中,发现很多都与单胺类神经递质有关^[4,5],如 5-羟色胺可抑制记忆过程^[6]。所以研究单胺类神经递质及其代谢产物在生物体内浓度的变化对疾病的诊断治疗具有重要意义。

材料与方法

1. 仪器设备:库伦阵列电化学高效液相色谱仪(美国 ESA 公司;Model 5600A-16 通道检测器,Model 582 solvent Delivery System,Model 542 自动进样器,CoularrayWin 工作站),Dionex Tcc-100 型柱温箱(美国戴安公司),Thermo D-37520 型高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司),GenPure 超纯水系统(德

作者单位:510006 广州中医药大学(张鹏、林励、林辉、邓韬、吴俊生);510631 广州,华南师范大学药物研究院(陈地灵)

通讯作者:林励,研究员,博士生导师,电子信箱:ll76611@126.cn

国 TKA 公司), 3K 超滤管 (PALL 公司), XS - 225A 标准电子天平 (0.1mg, 瑞士 Prscisa 公司), BP211D 电子天平 (0.01mg, 德国 Sartorius 公司)。

2. 试药: 巴戟天水提液 (生药浓度分别为 0.5g/ml, 1.0g/ml, 2.0g/ml), 重酒石酸去甲肾上腺素 (NE, 批号: 100169 - 199402), 肾上腺素 (E, 批号: 100154 - 200503), 盐酸多巴胺 (DA, 批号: 100070 - 200405), 5 - 羟色胺盐酸盐 (5 - HT, 批号: 111656 - 200401), 乙腈 (色谱纯, 德国默克公司), 辛烷磺酸钠、磷酸、高氯酸、磷酸二氢钠均为分析纯。

3. 实验动物: 昆明种小鼠, 雄性, 体重 18 ~ 25g, 购于广州中医药大学实验动物中心。实验动物许可证号: SCXK (粤) 2008 - 0020。

4. 给药: 17 个月龄健康昆明种雄性小鼠 32 只, 随机分成 4 组, 分别为空白组、巴戟天低、中、高剂量组 (分别给予生药浓度为 0.5、1.0、2.0g/ml 的巴戟天水提液 1ml), 隔天灌胃给药 1 次, 空白组给予等体积蒸馏水, 连续给药 15 天。

5. 负重游泳时间和脑湿重指数计算: 上述实验用昆明种小鼠于末次给药 3h 后进行力竭性负重游泳试验^[7], 负重量为对应小鼠重量的 1/10, 测定力竭时间时人工驱赶小鼠不停游泳至完全没入水中 8 ~ 10s 不出水面即可定为力竭, 记录游泳时间。小鼠在进行力竭性游泳后当天晚上开始禁食, 第 2 天脱颈椎处死, 快速分离出完整的脑组织, 用预冷的生理盐水冲洗。最后用滤纸吸干水分后称重, 计算脑湿重占体重的比例。脑组织置 -80℃ 存放。

6. 单胺类神经递质含量的测定: (1) 色谱条件: 色谱柱: Phenomenex luna C18 (150mm × 4.6mm, 5μm), Phenomenex C18 预柱 (KJO - 4282, 4.0mm × 2.0mm); 流动相: A - B (87:13), A 为磷酸二氢钠水溶液 (每 1L 超纯水中加入磷酸二氢钠 31.2g、辛烷磺酸钠 1g), B 为乙腈, 流速为 1ml/min; 自动进样器温度: 4℃; 柱温: 35℃; 检测电压: 350mV、700mV; 进样量: 10μl。 (2) 混合对照品溶液的制备: 取 NE、E、DA 和 5 - HT 对照品各约 1mg, 精密称定, 分别用 0.1mol/L 高氯酸定容至 2ml, 得对照储备液。取以上 4 种储备液各 0.2ml 于同一 2ml 容量瓶中定容即得混合对照品溶液。 (3) 样品溶液的制备^[7,8]及测定的方法: 按照本文材料与方法中“负重游泳时间和脑湿重指数计算”项下取冷冻的脑组织, 放入预冷的玻璃匀浆器中, 加入一定量预冷的 0.1mol/L 高氯酸溶液, 在冰水浴中充分研磨使组织匀浆化, 4℃ 离心 10min (12000r/min), 上清液 0.22μm 微孔滤膜滤过, 用 3K 超滤管再次离心, 收集滤液既得样品溶液^[9]。各实验组小鼠脑组织照上述处理后, 按照本

文材料与方法中混合对照品溶液的制备方法对各对照品及混合对照品分别注入高效液相色谱仪以上述条件进行电化学检测, 记录结果, 计算各组脑组织样品中各神经递质的平均含量。

7. 统计学方法: 采用“简明统计分析”软件, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 负重游泳时间: 各组小鼠负重游泳时间见表 1, 巴戟天水提液低、中及高剂量组均能显著提高自然衰老小鼠负重游泳时间 ($P < 0.01$), 且剂量越高, 小鼠负重游泳时间越长。巴戟天水提液对生物体耐力的提高有很大作用, 是一种很好的助力剂, 巴戟天水提液具有明显抗疲劳效果。

表 1 巴戟天水提液对小鼠负重游泳时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	给药剂量	负重游泳时间 (min)
空白对照组	给予蒸馏水, 1ml/2d	1.17 ± 0.38
巴戟天低剂量	0.5g/ml, 1ml/2d	1.87 ± 0.45 *
巴戟天中剂量	1.0g/ml, 1ml/2d	2.37 ± 0.83 *
巴戟天高剂量	2.0g/ml, 1ml/2d	2.82 ± 0.95 *

与空白对照组比较, * $P < 0.01$

2. 脑湿重指数: 如表 2 所示, 巴戟天水提液低剂量组能明显提高自然衰老小鼠脑湿重指数 ($P < 0.05$), 而中高剂量组无明显效果, 说明巴戟天对自然衰老小鼠脑的退化具有保护作用, 而且与剂量有关系, 相应作用机制及最佳剂量仍需继续研究。

表 2 巴戟天水提液对小鼠脑湿重指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	给药剂量	脑湿重/体重 (%)
空白对照组	给予蒸馏水, 1ml/2d	1.08 ± 0.20
巴戟天低剂量	0.5g/ml, 1ml/2d	1.27 ± 0.09 *
巴戟天中剂量	1.0g/ml, 1ml/2d	1.07 ± 0.09
巴戟天高剂量	2.0g/ml, 1ml/2d	1.06 ± 0.13

与空白对照组比较, * $P < 0.05$

3. 单胺类神经递质含量: 如表 3 所示, 各组与空白对照组相比, 巴戟天水提液高、中、低剂量组脑组织中 NE、E、DA 的含量均升高, 且 E 和 DA 的含量存在明显的量效关系, 5 - HT 的含量则降低。

表 3 巴戟天水提液对小鼠脑中单胺类神经递质含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	含量 (μg/g)			
	NE	E	DA	5 - HT
空白对照组	11.6 ± 2.5	6.2 ± 2.1	310.8 ± 39.4	152.9 ± 47.2
巴戟天低剂量	13.1 ± 2.2	7.2 ± 2.3	344.1 ± 72.6	93.2 ± 24.9 **
巴戟天中剂量	13.1 ± 3.6	9.2 ± 2.9 *	385.6 ± 72.2 *	120.0 ± 37.4
巴戟天高剂量	15.1 ± 3.7 *	9.9 ± 2.4 **	409.2 ± 56.2 **	129.3 ± 28.9

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

研究发现异烟酰异丙肼和丙咪嗪均具有振奋情绪、缓解抑郁的作用,并被证明能够提高 5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)在细胞外液中的浓度,作用机制是抑制其分解代谢酶的活性或阻断递质再摄取,故有研究者提出抑郁症可能是由于相关脑区中单胺类递质缺乏所致,这就是经典的单胺假说。单胺假说在近 50 多年来一直是抑郁症发病及治疗研究的核心内容。然而,这种仅因物质浓度变化就能导致复杂心境障碍的理论,已受到广泛的质疑,人们开始关注抗抑郁药作用于单胺系统后的下游改变(如基因表达、神经网络变化等)^[10]。

蔡兵等应用小鼠悬尾法、5-羟色胺酸诱发小鼠甩头法、阿扑吗啡诱导小鼠刻板行为法以及小鼠全脑单胺递质含量测量法等,综合评价巴戟天中的菊淀粉型低聚糖类 4 种单体成分的抗抑郁药理作用。实验结果表明它们在不影响小鼠自发活动的剂量下显著缩短小鼠悬尾抑郁模型的不动时间,并影响单胺类递质神经系统,初步表明这些寡糖的抗抑郁作用可能主要通过 5-羟色胺能神经系统起作用。

谭宝璇等研究发现,巴戟素可提高衰老大鼠学习、记忆能力,其作用可能与增强海马突触传递的 LTP 效应有关。林芳花等研究发现,巴戟甲素可提高正常雄性小鼠交配能力和免疫力,并且能显著增加正常小鼠体重和胸腺重量,提示巴戟甲素具有增强体质,提高机体免疫力的作用,并初步认为巴戟甲素为巴戟天补肾壮阳主要有效成分。

本实验结果显示,巴戟天水提液能显著提高自然衰老小鼠负重游泳时间,且在一定浓度范围内呈剂量

关系,并提高大鼠脑中能提高记忆的 NE、E、DA 的含量,同时降低能阻抑记忆的 5-HT 的含量,表明巴戟天水提液可以通过改变脑内单胺类神经递质的含量而益脑。

参考文献

- 1 林励,王素英,黎鸿华,等.分光光度法测定巴戟天糖含量[J].江西中医学院学报,1993,5(2):20-23
- 2 陈地灵,帅欧,林励,等.炮制方法对巴戟天糖类成分的影响研究[J].中国药房,2012,23(1):167-169
- 3 肖凤霞,林励.巴戟天补肾壮阳作用的初步研究[J].食品与药品,2006,8(5A):45-46
- 4 谭炳炎,郑琳,冯翔.高效液相色谱/电化学法测定大鼠血液和脑组织中单胺类物质的含量[J].分析测试学报,2006,25(2):90-92
- 5 王晓良.应用分子药理学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2005:150
- 6 韩新功.负重游泳实验小鼠接受刺五加多糖干预后生化学指标的变化[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(51):10300-10303
- 7 Kim C, Speisky MB, Kharouba SN. Rapid and sensitive method for measuring norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and their major metabolites in mt brain by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1987, 86: 25-35
- 8 Philip J, Gunasingh JM, Kirubakaran R, et al. The protective role of DL-a-lipoic acid in biogenic amine catabolism triggered by Aβ amyloid vaccination in mice [J]. Brain Research Bulletin, 2005, 65: 361-367
- 9 周改莲,王莲婧,林励,等.脑忆源片对大鼠脑组织中 5 种单胺类递质含量的影响[J].中药新药与临床药理,2011,22(1):72-75
- 10 郭雨欣,邢国刚.抑郁症的生物学机制研究进展[J].中国神经精神疾病杂志,2012,38(1):57-60

(收稿日期:2013-12-05)

(修回日期:2014-01-02)

肺癌患者外周血 Th17/Treg 细胞与维生素 D 检测的临床价值

王茂峰 王攀 应俊 陈德宝 蒋小伟 楼永刚 张巧红 万汝根

摘要 目的 探讨肺癌患者外周血 Th17、Treg 细胞与 25-羟基维生素 D 检测的临床价值。**方法** 收集笔者医院 2012 年

基金项目:浙江省金华市科学技术研究计划项目(2012-3-083)

作者单位:322100 浙江省东阳市人民医院检验科(王茂峰、陈德宝、蒋小伟、楼永刚、张巧红、万汝根);317700 浙江省台州市中心医院医学检验科(王攀);325035 温州医科大学检验学院(应俊)

通讯作者:王茂峰,电子信箱:wzmcmf@163.com