

补益阳明津气方药对雌性初老大鼠下丘脑单胺类神经递质的影响[※]

● 吴湔婷^{1*} 张英杰² 李 燕³ 指导:谭万信⁴

摘 要 目的:经实验研究探讨“补益阳明津气”方药对雌性初老大鼠下丘脑单胺类神经递质的影响。方法:4月龄~6月龄雌性大鼠为正常对照组;10月龄~12月龄,阴道细胞学表现动情期延长的雌性大鼠作为初老大鼠模型。模型动物随机分为:(1)益胃汤高剂量组、(2)益胃汤中剂量组、(3)益胃汤低剂量组、(4)己烯雌酚组、(5)模型对照组。各模型组灌药4周后,下丘脑制成匀浆,荧光分光分析法测定5-HT、NE、DA。结果:与模型对照组比较,“补益阳明津气”方药益胃汤能明显升高下丘脑5-HT水平及5-HT/NE比值,降低下丘脑DA水平及DA/NE比值。结论:“补益阳明津气”方药益胃汤能调节雌性初老大鼠下丘脑神经递质的紊乱,进而起到延缓生殖轴机能衰老的作用。

关键词 补益阳明津气 初老雌性大鼠 神经递质 实验研究

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 雌性大鼠,10~12月龄,符合初老模型动物50只,体重 (310 ± 20) g;4月龄~6月龄,体重 (230 ± 20) g,10只;由成都中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂 益胃汤由成都中医药大学中医药大学药学院根据文献工艺制备。^[1]己烯雌酚:1mg/片由成都制药二厂生产(批号:20021106)。

标准品多巴胺(DA)购自Fluka公司;去甲肾上腺素(NE)购自SERVA公司;5-羟色胺硫酸肌酐(5-HT)由中国医药公司上海化学试剂采购站进口分装。

1.3 仪器与设备 3K18型低温离心机;AE240型电子天平;960CRT型荧光分光光度计;

1.4 造模与实验方法 造模方法参照文献,10~12月龄雌性大鼠,体重在 (310 ± 20) g者,采取阴道脱落

细胞涂片巴氏染色^[2]连续观察20天,以阴道细胞学表现动情周期长、之后持续动情、反复假孕者,作为初老大鼠模型。4月龄~6月龄雌性大鼠,体重在 (230 ± 20) g者,进行阴道细胞学涂片连续观察五天,以角化细胞指数高于50%,且有正常动情周期者作为正常对照大鼠。

初老模型大鼠随机分为5组。正常对照组及模型对照组:予等容积生理盐水 $13.5\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。益胃汤高剂量组:给予益胃汤 $27\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于成人剂量的20倍)灌胃;益胃汤中剂量组:给予益胃汤 $13.5\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于成人剂量的10倍)灌胃;益胃汤低剂量组:给予益胃汤 $6.75\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于成人剂量的5倍)灌胃。己烯雌酚组:给予己烯雌酚 $0.042\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于成人剂量的5倍)灌胃。以上各组每天灌胃一次,连续四周,末次灌胃后24小时,断头处死。

1.5 观察指标

1.5.1 大鼠下丘脑匀浆的制备 大鼠断头取脑,剥离硬脑膜后用手术刀片沿大脑皮层后缘与小脑前缘交界分离下丘脑组织。将组织置沸生理盐水中煮5分钟,取出后迅速冷却,加0.1N盐酸1ml,置玻璃匀浆器中研磨制成匀浆,置4℃1小时~2小时后再用0.1N的氢氧化钠1ml中和酸,2000rpm离心15分钟,

※基金项目 国家自然科学基金资助项目(No:30371795)

*作者简介 吴湔婷,女,医学博士。主要从事中医妇科临床、科研和教学工作。

•作者单位 1.福建省厦门市中医院(361009);2.成都中医药大学2004级博士生(610075);3.贵阳中医学院第一附属医院(550001);4.成都中医药大学妇科教研室(610075)

取上清液 -20℃ 保存。

1.5.2 单胺类神经递质的检测^[3] 采用分光光度法测定(1)置少量酸化正丁醇于匀浆器中;(2)取组织称重后放于匀浆器中;(3)将匀浆转移至刻度离心管,用酸化正丁醇补至 4ml;(4)振荡 5min;(5)离心 5min,取上清液 2.5ml 放入另一离心管;(6)每管加入正庚烷 5ml 和 0.1M HCL 1.2ml;(7)振荡 5min;(8)离心 5min,此时溶液分为两相,从水相中分别取 0.5ml 于两支试管中,分 1 组和 2 组。1 组:加 1/15M 磷酸缓冲液 1.7ml,再加碘试剂 0.1ml 后,静置 2min;加碱性亚硫酸钠 0.5ml,静置 2min;加 6M HAC 0.6ml,沸水浴 2min 后,冷水冷却,在 480nm/365nm 处测定 NE 荧光强度;再加入 45% 磷酸 0.1ml,沸水浴 15min 后,在 370nm/310nm 处测定 DA 荧光强度。2 组:加 0.5% 半胱氨酸 0.1ml,再加 0.004% OPT3ml,沸水浴 10min 后,冷水冷却,在 480nm/365nm 处测定 5-

HT 荧光强度。

1.6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 统计软件进行处理,定量指标用 One-Way ANOAY 方差分析,组间比较采用 LSD、S-N-K 和 Tamhane's T2 检验。

2 结果

2.1 对下丘脑 NE、DA、5-HT 的影响 经统计学处理,NE 值各组之间并无显著差异, $P > 0.05$;模型对照组大鼠下丘脑 DA 水平升高,与正常对照组比较有显著差异, $P < 0.05$;己烯雌酚组和益胃汤高、中剂量组 DA 水平较明显下降,与模型对照组比较有显著差异, $P < 0.05$;模型对照组大鼠 5-HT 明显上升,与正常对照组比较有极显著差异, $P < 0.01$;各用药组 5-HT 均有下降趋势,其中益胃汤高、中剂量组和己烯雌酚组与模型对照组比较有显著差异, $P < 0.05$ 。见表 1。

表 1 各组大鼠下丘脑 NE、DA、5-HT 含量比较($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	5-HT	DA	NE
正常对照组	8	0.9955 ± 0.2172	1.2043 ± 0.2538	0.4469 ± 0.1200
模型对照组	8	0.6385 ± 0.1646◆◆	1.5619 ± 0.5145◆	0.5068 ± 0.1860
己烯雌酚组	8	0.8397 ± 0.1926◆◇	1.3287 ± 0.2314◇	0.4209 ± 0.1544
益胃汤高剂量组	8	0.8714 ± 0.3236◆◇	1.2611 ± 0.2850◇	0.6579 ± 0.4398
益胃汤中剂量组	8	0.7550 ± 0.2807◆◆◇	1.3312 ± 0.3705◇	0.4641 ± 0.1425
益胃汤低剂量组	8	0.6566 ± 0.0863◆◆	1.4043 ± 0.2725	0.6508 ± 0.1915

注:与正常对照组比较,◆ $P < 0.05$,◆◆ $P < 0.01$;与模型对照组比较,◇ $P < 0.05$,◇◇ $P < 0.01$ 。

2.2 对下丘脑 5-HT/NE、DA/NE 的影响 模型对照组 5-HT/NE 明显上升,与正常对照组比较有极显著差异, $P < 0.01$;用药各组 5-HT/NE 均有不同程度下降,其中己烯雌酚组、益胃汤高、中剂量组与模型对照组比较有极显著差异, $P < 0.01$,益胃汤低剂量组与模

型对照组比较有显著差异, $P < 0.05$;模型对照组与正常对照组比较 DA/NE 比值显著升高有显著差异, $P < 0.05$,各用药组 DA/NE 比值均有下降趋势,益胃汤高剂量组最为明显,但是各组与模型对照组比较均无显著差异, $P > 0.05$ 。见表 2。

表 2 各组大鼠下丘脑 5-HT/NE、DA/NE 比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	5-HT/NE	DA/NE
正常对照组	8	2.2768 ± 0.3166	2.2307 ± 0.4075
模型对照组	8	1.0797 ± 0.3282◆◆	3.3546 ± 0.9822◆
己烯雌酚组	8	1.9620 ± 0.7110◇◇	2.8654 ± 0.7452◆
益胃汤高剂量组	8	1.6477 ± 0.5969◆◇◇	2.7431 ± 0.8088◆
益胃汤中剂量组	8	1.5866 ± 0.3628◆◆◇	2.8696 ± 0.7770◆
益胃汤低剂量组	8	1.4770 ± 0.5052◆◆★	2.8749 ± 0.8699◆

注:与正常对照组比较,◆ $P < 0.05$,◆◆ $P < 0.01$;与模型对照组比较,◇ $P < 0.05$,◇◇ $P < 0.01$;与己烯雌酚组比较,★ $P < 0.05$ 。

3 讨论

女子在“五七”时出现“阳明脉衰”，阳明气血由盛转衰，进而引起“三阳”乃至全身的气血虚衰。“阳明脉衰”是女性最早出现的衰老变化，而且在此生理病理变化的基础上，可进一步发展、演变为“三阳脉衰”、“任脉虚，太冲脉衰少”，从而引起容颜、肌肤、毛发，甚至身体机能的逐步衰退。故张景岳有“女为阴体，不足于阳，故其衰也，自阳明始”之论。

益胃汤中重用生地、麦冬，味甘性寒，功擅养阴清热，生津润燥，为甘凉益胃之上品，共为君药；配伍北沙参、玉竹养阴生津，助君药益胃养阴之力，共为臣药；冰糖润肺养胃，调和药性，用为佐使。五药甘凉清润，清而不寒，润而不膩，药简力专。全方五药合用，具较强“益胃生津”，补阳明津气不足之功。因此，在本实验中，我们采用益胃汤作为补益阳明津气的代表性中药方剂。

中枢单胺类神经递质在神经内分泌调节中具有重要作用。下丘脑神经递质能促使神经内分泌细胞产生并释放神经激素和细胞因子，调节腺垂体相应激素的合成和分泌^[3]。

本实验结果显示，各组之间 NE 并无显著差异，说明初老模型大鼠下丘脑 NE 水平与正常对照组比较并无明显改变，实验用药也对模型大鼠的 NE 水平无明显影响。初老模型组大鼠下丘脑 DA 水平较正常对照组升高。己烯雌酚组和益胃汤高、中剂量组 DA 水平较模型对照组明显下降， $P < 0.05$ 。初老模型组大鼠 5-HT 明显上升，与正常对照组间 $P < 0.01$ 。各用药组 5-HT 均有下降趋势，其中益胃汤高、中剂量组和己烯雌酚组与模型对照组间 $P < 0.05$ 。

5-HT 与 NE 的比值能反映下丘脑单胺类神经递质中儿茶酚胺与吲哚类的比例，由此可判断神经递质是否有紊乱。本实验结果显示模型大鼠后 5-HT/NE 明显上升，与正常对照组比较有显著差异，结合实验中 5-HT 显著升高的结果，提示下丘脑内 5-HT 的代谢及神经活性有所增强，而 DA 能神经活性可能有所减弱。用药各组 5-HT/NE 比值均有不同程度下

降，其中己烯雌酚组、益胃汤高、中剂量组与模型对照组间 $P < 0.01$ ，益胃汤低剂量组与模型对照组间 $P < 0.05$ 。说明益胃汤和己烯雌酚可以改善去势大鼠下丘脑儿茶酚胺与吲哚类神经递质的紊乱。

DA 是 NE 生成过程中的中间产物，DA/NE 可以粗略反映二者之间转化的关系，初步判断它们之间代谢的变化发生在哪个环节。本实验结果显示初老模型组大鼠 DA 明显高于正常对照组而 NE 无显著差异，导致初老模型组大鼠 DA/NE 较正常对照组显著升高， $P < 0.05$ 。此可能由初老大鼠 DA 转化成 NE 的过程受阻（可能与多巴胺 β -羟化酶的含量或活性降低有关），或是 NE 的分解代谢有所增强（即 MAO 或儿茶酚胺氧位甲基转移酶的活性增强）所致。用药后各组比值均有降低趋势，但与初老模型组比较均无显著差异，说明益胃汤和己烯雌酚对二者之间的代谢紊乱无明显改善。

相关研究表明，随着年龄的增长，机体多个系统会出现相应的退行性变，尤其是 NEI-N 在结构和功能上都有一定的改变。女性雌激素水平过度降低引起下丘脑-垂体-卵巢生殖轴或肾上腺等功能紊乱所致的神经递质、激素、细胞因子等失衡，是围绝经期及老年期多种疾病发生的主要原因。^[4,5]

“补益阳明津气”方药益胃汤可使雌性初老大鼠降低的下丘脑 β -EP 升高，能使降低的下丘脑 5-HT 含量和 5-HT/NE 比值升高，升高的 DA 含量和 DA/NE 比值（趋势）降低，从而改善中枢单胺类神经递质功能紊乱。这可能是其调节神经内分泌的机制之一。

参考文献

- [1] 谢秀琼. 中药新制剂开发与运用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [2] 李 维主编. 实用阴道脱落细胞学诊断图解[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [3] 张殿明, 徐隆绍主编. 神经内分泌学[M]. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1991: 150.
- [4] 叶雪清, 葛杏林主编. 更年期综合征 - 神经内分泌免疫网络的变化[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1996: 57.
- [5] 叶雪清. 围绝经期神经 - 内分泌 - 免疫网络的变化[J]. 实用妇产科杂志, 1997, 13(2): 59 - 60.