

百合知母汤对自然衰老型围绝经期综合征肾虚证大鼠 中枢神经递质含量的影响^{*}

★ 王华富^{1**} 蔡宝昌^{1,2} 高钦¹ 崔姣¹ 陈敏敏¹ 许惠琴^{1***} (1. 南京中医药大学药学院 南京 210046; 2. 江苏省中药炮制重点实验室 南京 210046)

摘要:目的:观察百合知母汤(BHZMT)对自然衰老型围绝经期综合征肾虚证大鼠脑内中枢神经递质含量的影响。方法:采用自然衰老雌性15~16月龄SD大鼠,随机分为:围绝经期组、围绝经期+BHZMT组、围绝经期+TX肾阴虚组、围绝经期+TX+BHZMT组、围绝经期+ADE肾阳虚组、围绝经期+ADE+BHZMT组,另设一青年对照组共7组,造模1周后,各组连续灌胃给予BHZMT3周。于末次给药次日,脱颈椎处死大鼠,迅速分离下丘脑,分别采用高效液相色谱——电化学方法测定单胺类神经递质NE、DA、5-HT的含量和免疫组化方法测定P物质和 β -内啡肽的含量。结果:围绝经期大鼠NE、 β -内啡肽水平下降,DA、5-HT、P物质水平明显升高;肾阴虚证大鼠NE、DA、5-HT、P物质水平明显升高, β -内啡肽则明显减少;肾阳虚证大鼠5-HT水平明显升高;经BHZMT治疗后,肾阴虚大鼠下丘脑NE、DA、5-HT($P<0.01$)、P物质的含量降低, β -内啡肽的含量升高;肾阳虚大鼠下丘脑NE、DA含量升高,5-HT水平降低,但无显著性差异。结论:BHZMT可有效调节围绝经期肾阴虚大鼠脑内中枢神经递质含量,从而改善围绝经期综合征。

关键词:百合知母汤(BHZMT);围绝经期综合征;肾虚证;中枢神经递质

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Effect of bai-he-zhi-mu-tang on the level of central neurotransmitter in hypothalamus of natural-aging Shenxu zheng climacteric syndrome rats

WANG Hua-fu¹, CAI Bao-chang^{1,2}, GAO Qin¹, CUI Jiao¹, CHEN Min-min¹, XU Hui-qin¹

1. College of pharmacy, Nanjing university of traditional Chinese medicine, Nanjing 210046;

2. Chinese herbal drugs Key lab of Jiangsu province, Nanjing 210046

Abstract: Objective: To observe bai-he-zhi-mu-tang (BHZMT) on the level of the central nervous transmitter in hypothalamus of natural-aging Shenxu Zheng climacteric syndrome rats. Method: 15~16 month old female SD rats are divided randomly into 6 group: Climacteric, Climacteric + BHZMT, Climacteric + TX Shenyangxu Zheng, Climacteric + TX + BHZMT, Climacteric + ADH Shenyangxu Zheng, Climacteric + ADH + BHZMT, then set a youth group with three-month old female SD rats. one week later, we begin to ig BHZMT for three weeks, At the end of the meeting the next day delivery, Death from cervical rats, Rapid separation of the hypothalamus, We detect the level of NE, DA and 5-HT in hypothalamus by using HPLC with electrochemical detection and the level of SP, β -EP by using immunohistochemical method. Result: Compared to normal group, the level of NE, β -EP reduce, DA, 5-HT, SP increased significantly in climacteric syndrome rats, the level of NE, DA, 5-HT, SP increased significantly, the level of β -EP reduced in Shenyangxu Zheng rats, the level of 5-HT increased significantly in Shenyangxu Zheng rats. After treatment of BHZMT, Shenyangxu Zheng group NE, DA, 5-HT ($P<0.01$), SP reduce, β -EP levels rise, ShenyangXu-type group NE, DA increased, 5-HT reduce, but no significant difference. Conclusion: BHZMT can effectively regulate the content of central nervous transmitter of ShenyangXu-type climacteric rats rat ShenyangXu-type rats of the central nervous transmitter content so as to improve the climacteric syndrome.

Key words: bai-he-zhi-mu-tang; Shenxu Zheng Climacteric Syndrome; Central Nervous transmitter

百合知母汤出自张仲景《金匱要略》,主治百合病。百合病虽不能等同于现代医学的围绝经期综合征,但其所描述的临床表现与围绝经期综合征的常见症状有明显的相似之处,百合知母汤已成为目前

临床治疗该病的常用方剂。由于百合知母汤具有镇静催眠等作用,可以改善绝经期综合征患者的中枢神经系统的症状,因此本试验从脑内神经递质方面探讨百合知母汤治疗围绝经期综合征的作用机理。

* 基金项目:国家自然科学基金(C03050105)

** 作者简介:王华富(1985-),男,硕士研究生,从事内分泌药理学研究,Email:whf850405@126.com

*** 通讯作者:许惠琴(1961-),女,博士,教授,研究方向:内分泌药理学,Tel: 025-51998167, E-mail: hqxu309@sohu.com

1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性SD大鼠,体重350~550 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。实验动物生产许可证:SCXK(沪):2007-0005。

1.2 药物及试剂 百合知母汤浓缩液,含生药量为0.4 g/ml(临床等效量),由江苏省中药炮制重点实验室提供;氢化可的松(HVB),天津金耀氨基酸有限公司,批号:0602051;甲状腺素片(TX),浙江尖峰药业有限公司,批号:060703;腺嘌呤(ADE),南京赛吉科技有限公司;甲醇,Tedia. USA,批号707108;无水乙酸钠,南京化学试剂厂,批号:05339;柠檬酸,兴达化工试剂厂,批号:990601;辛烷磺酸钠,东京化成工业株式会社,批号:FHF01;二正丁胺,常州市光明化学研究所,批号:960308;乙二胺四乙酸二钠,汕头金砂化工厂,批号:010304;高氯酸,上海桃浦化工厂,批号:950504;L-半胱氨酸,惠兴生化试剂有限公司,批号:20061128;多巴胺(DA)批号:272212;去甲肾上腺素(NE)批号:253863,均购自Fluka;5-羟色胺(5-HT),Sigma,批号:29H7011;内标,Aldrich,批号:09804HU;PBS缓冲液,柠檬酸盐抗原修复液(PH=6.0),批号:610110066S,DAB试剂盒,批号:703210031,均购自福州迈新;多聚甲醛,上海实意化学试剂有限公司,批号:20060806,临用前用PBS配成4%的多聚甲醛溶液;双氧水,上海久亿化学试剂有限公司,批号:20070201;即用型SABC免疫组化试剂盒,批号:200708、抗体稀释液均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 DY89-I型电动玻璃匀浆机购自宁波新芝科器研究所;LGR16-W低温高速离心机购自北京医用离心机厂;上皿电子天平购自上海精科;SHB-III循环水式多用真空泵购自郑州长城科工贸有限公司;KQ-500DE型医用数控超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司;LC-10A高效液相色谱仪购自日本岛津;TP1020全自动组织处理仪、RM2145石蜡切片机购自德国LEICA公司;切片漂烘温控仪购自安徽电子科学研究所;DP71荧光显微镜购自日本OLYMPUS;DHG-9123A型电热恒温鼓风干燥箱购自上海精宏实验设备有限公司;江苏捷达图像分析软件。

1.4 动物筛选、分组、模型制备 选取15~16月龄雌性SD大鼠80只,体重350~550 g,连续进行阴道涂片15 d,取呈现不规则动情周期的作为围绝经期大鼠。随机分为6组:围绝经期组(cs),cs+BHZMT组,cs+TX肾阴组,cs+TX+BHZMT组,cs+ADE肾阳虚组,cs+ADE+BHZMT组。另取3月龄青年

雌鼠作为青年对照组(Normal)。cs+TX肾阴组、cs+TX+BHZMT组大鼠每日同一时间灌胃TX 2.5 mg/只,连续21 d,造成肾阴虚模型。cs+ADE肾阳虚组、cs+ADE+BHZMT组大鼠每日同一时间灌胃ADE 200 mg/kg,造模全过程为21 d,第1~10 d每日给药1次,第10 d后隔日给药,造成肾阳虚模型。

1.5 给药方法 于造模1周后,各组大鼠开始同时灌胃给药。cs+BHZMT组、cs+TX+BHZMT组、cs+ADE+BHZMT组按4 g/kg剂量给予BHZMT,其余各组给予等量生理盐水,每日给药1次,连续给药3周。

1.6 NE、DA、5-HT的测定 于末次给药后次日断头处死大鼠,于4℃冰台上迅速分离出下丘脑,液氮冷冻,固化后精确称重,加入475 μ l 0.1 mol·L⁻¹高氯酸(含0.5 mmol·L⁻¹的EDTA,47.5 ng半胱氨酸)和25 μ l内标液,于冰浴下快速玻璃匀浆,4℃条件下15 000 r/min离心15 min,取上清液作为待测样品。采用高效液相色谱——电化学法测定样品中NE、DA、5-HT的含量。流动相参照文献^[1]的方法略作改进:乙酸钠:60 mmol·L⁻¹;柠檬酸:100 mmol·L⁻¹;辛烷磺酸钠:1.2 mmol·L⁻¹;EDTA:0.1 mmol·L⁻¹;甲醇:水=1:9。流速为1 ml/min,柱温:25℃,进样量:20 μ l,Ag/AgCl参比电极,工作电压为+0.75 V。

1.7 P物质、 β -内啡肽的测定 于末次给药后次日断头处死大鼠,迅速取出大脑,置4%多聚甲醛中固定,上行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,参照包新民等^[2]绘制的大鼠脑立体定位图谱作下丘脑冠状切片,采用SABC免疫组化方法测定下丘脑中P物质和 β -内啡肽的含量。采用江苏捷达图像分析系统进行图像分析,统计平均光密度值。

1.8 统计学处理 本试验统计分析采用微软Excel软件,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 NE、DA、5-HT的测定结果 见表1。围绝经期组大鼠下丘脑NE含量降低、DA和5-HT含量升高,DA/NE和5-HT/NE比值也明显增加($P<0.05$ 、 $P<0.01$),用百合知母汤治疗3周后,上述指标改善不明显。围绝经期肾阴虚大鼠NE、DA和5-HT升高($P<0.01$);经百合知母汤治疗后,含量均明显下降,其中DA和DA/NE比值有显著性差异($P<0.05$);围绝经期肾阳虚大鼠5-HT含量略有下降,给予百合知母汤后DA和5-HT含量增加,但无显著性差异。

表1 百合知母汤对围绝经期综合征肾虚证大鼠单胺类神经递质的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂/g·kg ⁻¹	鼠数	NE/ng·g ⁻¹	DA/ng·g ⁻¹	5-HT/ng·g ⁻¹	DA/NE	5-HT/NE
Normal	-	9	271.5 ± 30.1	971.3 ± 96.0	499.7 ± 37.1	3.61 ± 0.48	1.86 ± 0.26
CS	-	8	244.8 ± 40.2	1095.6 ± 70.4 [#]	569.8 ± 70.6 [#]	4.57 ± 0.74 ^{##}	2.37 ± 0.45 [#]
CS + BHZMT	4	8	247.9 ± 15.4	1154.0 ± 139.7	555.1 ± 90.0	4.66 ± 0.58	2.23 ± 0.24
CS + TX	-	9	272.3 ± 28.7	1297.1 ± 155.9 ^{△△}	589.8 ± 54.3	4.77 ± 0.42	2.19 ± 0.32
CS + TX + BHZMT	4	9	246.0 ± 69.5	932.0 ± 265.2 ^{##}	490.4 ± 125.7	3.83 ± 0.61 ^{△##}	2.05 ± 0.38
CS + ADE	-	8	247.0 ± 39.5	1015.5 ± 346.4	647.3 ± 43.2	4.02 ± 0.91	2.66 ± 0.39
CS + ADE + BHZMT	4	8	264.2 ± 83.2	1157.9 ± 70.6	610.2 ± 59.9	4.65 ± 1.21	2.43 ± 0.61

注: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, vs Normal; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$, vs CS; ^{##} $P < 0.01$, vs CS + TX

2.2 P物质、 β -内啡肽的测定结果 见表2。围绝经期大鼠下丘脑内P物质含量明显升高, β -内啡肽含量明显下降,和青年对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。百合知母汤能降低围绝经期和围绝经期肾阴虚证大鼠下丘脑内P物质含量,明显提高 β -内啡肽含量($P < 0.05$)。对围绝经期肾阳虚大鼠无明显作用。

表2 百合知母汤对围绝经期综合征
肾虚证大鼠下丘脑内SP和 β -EP的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	鼠数	SP(OD值)	β -EP(OD值)
Normal	-	9	0.344 ± 0.066	0.737 ± 0.116
CS	-	8	0.689 ± 0.141 ^{##}	0.540 ± 0.106 ^{##}
CS + BHZMT	4	8	0.541 ± 0.121 [△]	0.524 ± 0.116
CS + TX	-	9	0.739 ± 0.095	0.551 ± 0.066
CS + TX + BHZMT	4	9	0.534 ± 0.094 ^{△##}	0.632 ± 0.074 [#]
CS + ADE	-	8	0.706 ± 0.096	0.643 ± 0.089
CS + ADE + BHZMT	4	8	0.683 ± 0.129	0.611 ± 0.132

注: ^{##} $P < 0.01$, vs Normal; [△] $P < 0.05$, vs CS; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, vs CS + TX

3 讨论

在女性生殖系统中 β -EP可以抑制GnRH神经元活动和LH的分泌^[3],是抑制LH释放的主要因子,它还可以抑制NE释放。GnRH神经元上没有性激素受体,而下丘脑弓状核 β -EP神经元内有雌激素受体(ER)存在,故雌激素在对GnRH进行反馈调节中, β -EP起重要作用^[4]

雌性大鼠的下丘脑、垂体和卵巢中均含有一定量的SP,且SP的含量变化与大鼠的性周期有关。章功良等^[5]发现,下丘脑腹外侧视前区中的SP有促进睡眠,特别是提高深慢波睡眠的作用。研究还发现,NE在记忆保持方面起重要作用,而改善记忆与促进DA的释放有关,5-HT则参与调节情绪、动机和食欲等。围绝经期妇女由于卵巢功能减退,下丘脑-垂体-性腺轴平衡失调,性激素分泌紊乱,引起植物神经功能失调,下丘脑内NE、 β -内啡肽(β -EP)含量下降、DA、5-HT和P物质(SP)含量明显增高^[6],进而出现潮热、多汗、烦躁不安、失眠等症状。

本研究发现百合知母汤能明显降低围绝经期综合征肾阴虚大鼠升高的DA含量和DA/NE比值,对

NE和5-HT也有调节作用,但对围绝经期肾阳虚大鼠却无明显的改善作用,由此我们认为百合知母汤具有部分纠正围绝经期肾阴虚大鼠中枢单胺类神经递质紊乱的作用,从而达到调节中枢神经系统,缓解围绝经期阴虚内热、烦躁不安、失眠等症状的目的。以往研究发现,给予中药治疗后可以提高围绝经期大鼠下丘脑 β -EP含量,降低SP水平^[7,8],本实验结果与上述报道一致,百合知母汤可以下调围绝经期和围绝经期肾阴虚证大鼠下丘脑内SP水平,提高 β -EP含量,上调肾阳虚大鼠下丘脑NE、DA水平,提高5-HT含量,但无显著性差异,这与临床上百合知母汤大多用于肾阴虚证,少数用于肾阳虚相符。

以上提示结合本研究我们推测,百合知母汤可有效调节围绝经期肾阴虚大鼠下丘脑内单胺类神经递质和P物质和 β -内啡肽的含量,这可能是百合知母汤治疗围绝经期综合征肾阴虚证的作用机制之一。

参考文献

- [1] 侯艳宁,王娜,吴红海,等. 孕酮对大鼠吗啡位置偏爱效应及中枢单胺递质水平的影响[J]. 中国药理学通报,2006,22(8):980-983.
- [2] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:41.
- [3] 闫丽隽,王小青,郭述真. 阿片肽及其受体与女性生殖内分泌[J]. 山西医科大学学报,2003,34(4):374-376.
- [4] Gruenewald DA, Matsumoto AM. Age-regulated decrease in ProPiomelanocortin(POMC) gene expression in the arcuate nucleus(RAC) of the female rat[J]. Proc Soc Neurosci Mtg,1993,15:343.
- [5] 章功良,张景行,钟明奎,等. 大鼠腹外侧视前区P物质对睡眠的影响及其作用机制的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2005,7(5):301-303.
- [6] Ranceh NE, Young S. Hypertrophy and increased gene expression of neurons containing neurokinin-B and substance-P Messenger ribonucleic acids in the hypothalamus of postmenopausal women[J]. Endocrinology,1991,128:2239-2247.
- [7] 孙丽珍. 康妇宁合剂对围绝经期综合征大鼠 β -内啡肽的影响[J]. 浙江中医药大学学报,2007,31(2):156-157.
- [8] 步世忠,孙梅,张沅,等. 更年期上调老年雌性大鼠下丘脑雌激素受体mRNA表达对P物质和 β -内啡肽的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1998,18(1):28-31.

(收稿日期:2009-03-18)