

当归芍药散加味方及拆方对老年鼠脑组织和淋巴细胞 β -AR 密度的影响

何宏文, 卢汉平, 谢 瑶, 姚志彬

(中山大学中山医学院人体解剖学教研室, 广东 广州 510089)

摘 要:【目的】研究当归芍药散加味方(DSS)及拆方对老年鼠脑组织和淋巴细胞 β 肾上腺受体(β -AR)的含量的影响。【方法】选用中老年鼠(18个月), 分组灌服 DSS 及拆方水煎液, 3周后, 用放射配基受体结合分析法测定大鼠大脑皮质、海马、小脑皮质、脾细胞和血液淋巴细胞 β -AR 密度。【结果】与中老年对照组比较, DSS 全方组小脑皮质、脾细胞和血液淋巴细胞 β -AR 密度明显增多($P < 0.01$), 大脑皮质、海马 β -AR 密度与老年对照组间差别不明显, 君臣组、佐药组各种组织 β -AR 密度与中老年对照组间差别均不明显($P > 0.05$)。【结论】上述结果表明 DSS 全方可选择性提高老年鼠小脑皮质、淋巴细胞的 β -AR 密度, 这是 DSS 君、臣、佐药共同作用的结果。

关键词: 当归芍药散; 受体; 肾上腺素能 β ; 衰老

中图分类号: R749.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)05-0325-03

Effect of Supplemented Danggui Shaoyao San and its Separating Prescription on β -Adrenergic Receptors of Brain and Lymphocytes in Aged Rat HE Hong-wen, LU Hang-ping, XIE Yao, YAO Zhi-bin. (Department of Anatomy, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract 【Objective】To study the effect of supplemented Danggui Shaoyao San (DSS) and its separating prescription on β -Adrenergic receptors (β -AR) of brain and lymphocytes in aged rat. 【Methods】Aged rats (18 month) were selected and divided into different groups. The rats were fed with different medicine for 21 days. β -AR densities of cerebellar cortex, hippocampus, cerebral cortex, splenocyte and peripheral lymphocytes were analyzed by using radioligand binding assay. 【Results】 β -AR densities in the cerebral cortex, splenocyte and peripheral lymphocytes increase significantly in the DSS group compared with the control group ($P < 0.01$). β -AR densities in the cerebellar cortex, hippocampus were similar between the DSS group and the control group. β -AR density was similar among the control group, the junchen group and the zuo group ($P > 0.05$). 【Conclusion】These results show that DSS can increase β -AR densities selectively in the cerebral cortex and lymphocytes. This results from the interaction of jun, chen, zuo herbs of DSS.

Key words: danggui shaoyao san; receptors; adrenergic; beta; aging

当归芍药散出自《金匱要略》妇科名方, 20 世纪 80 年代末有人用于治疗老年性痴呆取得疗效。之后, 国内外相继出现许多有关当归芍药散治疗老年性痴呆及抗衰老方面的研究资料^[1~3]。研究表明当归芍药散可影响老年机体学习记忆功能及运动功能、提高大脑皮质、海马等脑区的去甲肾上腺素的含量、促进机体免疫功能等。那么是否会影响这些器官和组织内 β -AR 含量, 仍无文章报道。因此, 我们在 1998 年 9 月至 2001 年 6 月用当归芍药散加味方(DSS)及拆方水煎液灌服老年大鼠 3 周后, 测量大鼠大脑皮质、海马、小脑皮质、脾细胞和血液淋巴细胞的 β -AR 含量变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

实验动物选用一级 SD 大鼠, 雌雄兼有, 月龄 18~20 个月, 动物笼养, 昼夜交替环境(由中山医科大学实验动物中心提供)。大鼠分为 5 组, 分别是老年对照组, 人参组, DSS 全方组, 君臣组, 佐药组, 每组 10 只老年大鼠。

1.2 DSS 水煎液制备及给药方法

选用当归、白芍、川芎、白术、泽泻、茯苓、生晒参等中药(均购于广州药材公司, 经广州中医药大学药鉴教研室鉴定)。分别按 DSS 的全方、君臣药、佐药(剂量和方组根据《中药名方进展》)用 8 倍水, 6 倍水分煎, 第 1 次 2 h, 第 2 次 1.5 h, 浓缩至含生药 1 g/mL, 根据分组分别灌服相应的中药水煎液 5 mL, 连续 3 周。

1.3 动物取材

收稿日期: 2001-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070952)

作者简介: 何宏文(1962-), 男, 广东南海人, 博士, 副教授, 硕士生导师。

动物在 10 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg 剂量,腹腔注射)麻醉下,打开腹腔,经下腔静脉抽取血液 5 mL(或用拔眼球直接取血,不麻醉),立即放入含肝素的试管,混匀,同时立即取出脾脏和开颅分离大脑皮质、海马、小脑皮质。

1.4 脑组织 β-AR 含量测定

取大脑皮质、海马、小脑皮质加入 pH 7.2 ~ 7.4 PBS 缓冲液匀浆,以 2.7 g 的速度离心 1 h,取沉淀物,加入 PBS 缓冲液混匀制成膜悬液,置 4℃ 备用。用细胞膜悬液 100 μL 分别加入 ³H-DHA (浓度分别为 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.5 nmol/L)以消旋普奈洛尔为非标记配基(浓度分别为 0.4、1.2、3.4、5.7 μmol/L)做饱和曲线,并以 Tris-HCl 缓冲液补至 250 μL,各管置冰浴中反应 10 min 后迅速经玻璃纤维滤膜滤过,并以 10 mL Tris-HCl 缓冲液连续洗涤,滤膜,在 80℃ 经 30 min 烤干后,置于含有 5 g/L PPO 的甲苯中,以 XH-6010 γ 测显仪测其放射量,从总结合中减去非特异性结合即为特异性结合。将数据经 Scatchard 公式进行处理,并作图,求出其最大结合容量(B_{max}),即 β-AR 含量(公式为 B/F = B_{max}/kd + (-1/kd)B, B 为结合配基的浓度, F 为游离配基的浓度, B_{max} 为最大结合含量,以 B/F 对 B 作图可得一直线。式中斜率为 -1/kd)^[4]。蛋白测定用 Lowry 法。

1.5 脾细胞、血液淋巴细胞 β-AR 测定

常规制备脾细胞和淋巴细胞悬液^[5],并作细胞计数及测定细胞的存活率(用台盼蓝染色)。β-AR 测定方法与 1.4 相同,待测物由细胞膜悬液改为脾细胞悬液或血液淋巴细胞液。

1.6 统计学处理

用 ANOVA 软件包 Student-Newman-keals 方法对各组数据进行统计学处理

2 结 果

2.1 DSS 对老年大鼠脑组织 β-AR 的影响

各组老年大鼠分别灌服不同的中药水煎液 3 周后,大脑皮质、海马、小脑皮质 β-AR 含量变化如表 1。

结果显示,服药 21 d 后,全方组小脑皮质 β-AR 含量高于老年对照组,差别有高度显著性意义(P<0.01)。人参组对大脑皮质、海马、小脑皮质的 β-AR 含量也有明显的升高作用(P<0.05)。

2.2 DSS 对老年大鼠淋巴细胞 β-AR 含量的影响

表 1 DSS 及拆方对老年大鼠脑组织 β-AR 含量的影响
Table 1 Effect of DSS and its separating prescription on β-adrenergic receptor of brain (fmol/mg)

Group	Cerebral cortex	Hippocampus	Cerebellar cortex
Control	40.7±3.4	35.6±3.4	19.3±3.3
Panax	47.4±3.3 ¹⁾	43.3±3.2 ¹⁾	24.2±3.4 ¹⁾
DSS	39.3±3.3	35.5±2.8	28.4±3.4 ²⁾
Junchen	38.7±4.1	33.3±3.8	17.7±2.3
Zuo	40.1±4.1	35.7±4.0	17.3±2.0

Compared with control group, 1) P<0.05; 2) P<0.01

各组老年大鼠分别灌服不同中药水煎液 3 周后,脾细胞和血液淋巴细胞 β-AR 含量变化如表 2。

表 2 DSS 及拆方对老年大鼠脾细胞和血液淋巴细胞 β 受体含量影响
Table 1 Effect of DSS and its separating prescription on β-AR of splenocyte and lymphocytes (site/cell)

Group	Splenocyte	Lymphocyte
Control	3 378±117	3 730±178
Panax	4 940±261 ¹⁾	5 747±197 ¹⁾
DSS	4 513±187 ¹⁾	4 922±197 ¹⁾
Junchen	3 888±221	4 441±227
Zuo	3 773±224	4 513±255

Compared with control group, 1) P<0.01

从表 2 结果显示,全方组脾细胞和血液淋巴细胞 β-AR 含量均高于对照组,差别有高度显著意义(P<0.01),人参组脾细胞和血液淋巴细胞 β-AR 含量均高于对照组,差别有高度显著性意义(P<0.01),但与全方组间差别不明显(P>0.05)。

3 讨 论

3.1 DSS 对老年大鼠 β-AR 含量的不同影响

从我们的研究结果显示,DSS 可明显提高小脑皮质、脾细胞和血液淋巴细胞的 β-AR 含量,但对海马和大脑皮质 β-AR 含量影响不明显,说明 DSS 上调 β-AR 作用有选择性。许多研究表明 β-AR 在中枢和外周主要分为 β₁、β₂ 和 β₃ 型受体。海马和大脑皮质主要含有 β₁ 型受体,而小脑和脾细胞和淋巴细胞主要含有 β₂ 受体。这使我们联想到 DSS 是否选择性上调 β₂ 型受体。至于 DSS 上调 β-AR 的机制,我们认为可能有①通过调节机体的激素分泌,DSS 被认为可调节下丘脑-垂性-性腺,提高机体的性激素水平,可能会影响到 β-AR 含量的表

达^[6];②衰老时机体各组织器官的 β -AR 含量明显减少,其中的主要因素是细胞出现退变,细胞正常表达 β -AR 受到影响,而 DSS 可在通过其抗自由基等作用使细胞功能得于恢复,自然表达 β -AR 增加。而人参可提高中枢海马、大脑皮质、小脑皮质、脾细胞和血液淋巴细胞的 β -AR 含量,说明人参上调 β -AR 的作用无选择性,已有资料证明,人参可提高心肌、肺的 β -AR 含量,并认为与人参的抗衰老作用密切相关^[7]。

3.2 淋巴细胞 β -AR 含量增加对其功能的影响

本实验结果显示 DSS 可明显提高脾细胞和血液淋巴细胞的 β -AR 含量,这是否可影响到淋巴细胞的功能?根据以往的研究显示:刺激淋巴细胞 β -AR 激活细胞内腺苷酸环化酶,使其 cAMP 浓度增加,进而影响淋巴细胞的功能。cAMP 浓度提高可抑制 LPS 刺激的外周血单核细胞 IL-1 产生,持续提高细胞内 cAMP,可促进其 IL-1 基因表达,能抑制 NK 细胞的增殖及细胞毒作用,可抑制 T 细胞增殖及 IL-1 的产生^[8],总之,大多数学者认为 β -AR 兴奋抑制淋巴细胞的功能,而 DSS 上调淋巴细胞 β -AR,在体内可能由于血液中的儿茶酚胺的作用使淋巴细胞功能受到抑制。至于 DSS 上调淋巴细胞 β -AR 的机制可能有:①降低了血液中儿茶酚胺含量导致 β -AR 上调;②直接影响到衰老的淋巴细胞,使其表达 β -AR 增加;③改变血液中各淋巴细胞亚群比例。因为不同的亚群的淋巴细胞 β -AR 差别明显,NK 细胞密度最大辅助性 T 细胞最小。

3.3 小脑 β -AR 增加与 DSS 抗衰老作用

研究表明刺激培养细胞中 β -AR 可增加 NGF 的合成和释放,Fellesa 认为 β -AR 可调节碱性成纤维细胞生长因子(BFGF)和神经生长因子(NGF)的 mRNA 在大脑皮质和海马及小脑的合成^[9],然而许多资料已经显示神经营养因子在中枢神经元的存活、分化成熟及退变过程中发挥重要作用。本研究结果显示 DSS 可明显提高小脑皮质 β -AR 含量,但对大脑皮质、海马 β -AR 含量影响不明显,这与我们在课题设计时的想法认为 DSS 可能会通过影响 β -AR 含量使大脑皮质、海马组织中 BFGF 和 NGF 增多起抗衰老作用不同,说明 DSS 对大脑皮质、海马影响及对衰老的学习记忆功能影响,可能不是通过改变老年机体肾上腺素能系统功能完成的,而小脑的肾上腺素能系统在机体的运动功能、运动学习中起极其重要作用,并认为衰老时小脑该

系统功能下降可明显影响机体的运动学习,运动能力。我们以往研究表明 DSS 可提高老年小鼠通过平衡木的能力^[2],因此本研究认为 DSS 通过提高老年鼠小脑 β -AR 含量,影响小脑肾上腺素功能,进而提高老年小鼠的运动能力。

3.4 DSS 配伍对机体 β -AR 的影响

中药方剂组成中有君、臣、佐、使药,君药是针对主病或主证起到主要的作用,臣药有辅助君药加强治疗主病或主证的药物和针对兼病或兼证起主要治疗作用的药物。而佐药有协助君、臣药加强治疗作用,消除或减少君臣药物的毒性作用,我们发现服 DSS 全方可选择性提高老年鼠小脑皮质 β -AR 含量和淋巴细胞 β -AR 含量,单用 DSS 君臣药或佐药却无此作用,说明这是 DSS 君臣佐药共同作用的结果。表明 DSS 君臣佐使配伍组合的合理性。

总之,本实验显示 DSS 可选择性提高老年鼠小脑皮质 β -AR 含量,进而影响机体与小脑肾上腺素能系统密切相关的运动功能、运动学习,这或许是 DSS 提高老年机体运动功能的机制之一。至于淋巴细胞 β -AR 含量提高对机体免疫功能的影响仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 荻野信义. 当归芍药散的中枢神经系统作用与治疗老年性痴呆[J]. 和汉医药学会志(日), 1989, 6(3): 561.
- [2] 何宏文, 姚志彬. 当归芍药散对老年小白鼠运动功能的影响[J]. 中国行为医学科学, 1998, 7(7): 12.
- [3] Komatsu M, Ueda Y, Hiramatsu M. Different changes in concentrations of monoamines and their metabolites and amino acids in various brain regions by the herbal medicine/Toki-Shakuyaku-San between female and male senescence-accelerated mice (SAMP8) [J]. Neurochem Res, 1999, 24(7): 825.
- [4] 唐铁军, 吴伟康, 别平华, 等. 缺血心肌 β_1 受体脱敏现象及机制探讨[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(4S): 53.
- [5] 单京端, 付国辉, 吕宝璋. 外周血液淋巴细胞 β -肾上腺素受体的放射性配基结合分析法[J]. 军事医学科学院刊, 1988, 12(1): 73.
- [6] 刘平. 当归芍药散对中枢-下丘脑-卵巢内分泌系统的作用[J]. 中成药, 1993, 15(11): 30.
- [7] 刘洁, 赵胜利, 姬沛生, 等. 人参对衰老大鼠 β 受体-cAMP 系统的影响及其机理初探[J]. 中药药理与临床, 1995, 11(6): 22.
- [8] Kalinichenko V V, Mokyr M B, Graf L H. Norepinephrine-mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta-adrenergic receptor mechanism and decreased TNF-alpha gene expression[J]. J Immunol, 1999, 163(5): 2492.
- [9] Fellesa P, Mochetti I. Regulation of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor mRNA by β -adrenergic receptor activation and adrenal steroids in rat central nervous system[J]. Mol Pharmacol, 1993, 43(2): 132.

(编辑 张恩健)