

- [6] 张淳,李志英,李景恒.益气活血开窍明目中药治验视野缺损2例[J].中外医疗,2008(24):86.
- [7] 贺燕,戴宏伟,姬林,等.活血化瘀中药对脑出血大鼠神经功能和脑组织形态及血流灌注的影响[J].临床神经病学杂志,2010,23(5):363-366.
- [8] 黄静,周平.放射性视神经病变研究进展[J].医学综述,2006,12(5):291-293.
- [9] Levy RL, Miller NR. Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced optic neuropathy[J]. Ann Acad Med Singapore, 2006, 35(3): 151-157.
- [10] Delanian S, Lefaix JL, Pradat PF. Radiation-induced neuropathy in cancer survivors [J]. Radiother Oncol, 2012, 105(3): 273-282.
- [11] Sen U, Tyagi N, Patibandla PK, et al. Fibrinogen-induced endothelin-1 production from endothelial cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(4): 840-847.
- [12] 吴志美,许亮亮,王伟鹏.Hcy、vWF在糖尿病视网膜病变患者中的水平及关系[J].牡丹江医学院学报,2010,31(5):30-31.
- [13] 吴沂旒,郝进.川芎嗪对视网膜保护作用机制的研究及临床应用[J].中国中医眼科杂志,2012,22(1):72-75.
- [14] 王世龙,林原,唐泽耀.川芎嗪在各类神经系统损伤中的保护作用及其机制研究进展[J].中国药理学通报,2010,26(4):438-442.
- [15] 任重,李鸿章.黄芪注射液药理作用及临床应用概述[J].中医研究,2009,22(10):62-64.
- [16] 郑文龙,楼正家,李廷谦,等.黄芪和川芎嗪对慢性阻塞性肺疾病血瘀证血浆内皮素-1及内毒素水平的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(3):142-145.
- [17] 黄川峰.醒脑静注射液对脑缺血再灌注损伤小鼠血清IL-6和TNF- α 水平影响[J].中国实用医药,2012,7(35):244-245.
- [18] 徐元虎.醒脑静注射液的药理药效学研究与应用现状[J].现代中西医结合杂志,2010,19(4):507-510.

(责任编辑:黎国昌)

清热利胆解毒方对铜负荷大鼠学习记忆行为的影响

方向, 金珊, 鲍远程, 陈怀珍

安徽中医药大学第一附属医院脑病中心, 安徽 合肥 230031

[摘要] 目的: 观察清热利胆解毒方对铜负荷饮食大鼠空间学习记忆行为的影响。方法: 100只雄性大鼠适应性喂养1周后, 随机分为空白对照组, 模型对照组, 清热利胆解毒方组, 清热利胆解毒方加青霉胺组, 青霉胺组。每组20只。正常对照组喂食普通饲料, 其余各组予含硫酸铜1g/kg的粉状饲料和含量为0.185%硫酸铜的去离子水喂养, 第7周开始药物治疗, 第8周后采用Morris水迷宫实验测试大鼠学习记忆能力。结果: 平均潜伏期模型对照组较空白对照组明显延长 ($P < 0.01$), 清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较空白对照组延长 ($P < 0.05$); 清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较模型对照组平均潜伏期显著减少 ($P < 0.01$)。穿越原平台位置次数模型对照组较空白对照组明显减少 ($P < 0.01$), 清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较空白对照组减少 ($P < 0.05$); 清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较模型对照组平均潜伏期显著减少 ($P < 0.01$)。结论: 清热利胆解毒方可以改善铜负荷大鼠的学习记忆障碍。

[关键词] 清热利胆解毒方; 肝豆状核变性; 学习记忆; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 08-0188-02

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.08.085

[收稿日期] 2013-03-14

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (编号: 81102592); 安徽省高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2013Z170)

[作者简介] 方向 (1976-), 男, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合神经病学。

肝豆状核变性(Wilson disease, WD)是一种常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病^[1],临床上WD患者除常见神经系统、肝脏损害症状外,一些高级神经活动如记忆和智能等都受到影响,其中脑型WD患者存在有严重的记忆障碍,而无神经系统症状的WD患者也存在有记忆商的轻度损害。提示铜损害造成的神经细胞损伤对WD患者的学习记忆功能产生了一定的影响^[2]。前期研究发现以清热利胆解毒方为主的中西医结合治疗可以使WD患者智商总体水平有不同程度的提高,尤其可使视空间技能显著提高,体现在观察能力、长时间视觉记忆能力、远见性、计划性和结构综合判断能力均增强^[3]。本实验通过Morris水迷宫试验,观察清热利胆解毒方对铜负荷大鼠学习记忆行为的影响,为WD的基础研究及WD患者学习记忆功能障碍的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级健康3月龄Wistar大鼠100只(安徽省实验动物中心提供),均为雄性,体重180g~200g(合格证号:SCXR-2011-002)。Morris水迷宫,北京友诚嘉业生物科技有限公司。去离子水由安徽大东方药业提供。硫酸铜、硝酸为优级纯,由合肥大药房提供。

1.2 动物及分组 实验大鼠采用标准基础饲料适应性喂养1周后随机分成5组:空白对照组,模型对照组,清热利胆解毒方组,清热利胆解毒加青霉胺组,青霉胺组。每组20只大鼠于专用实验室中分笼饲养,室温保持在(22~25)℃,自然昼夜循环非直射光照下生活。在整个饲养期间和此后的试验期间均定期对动物的健康状况进行检查,凡患有慢性呼吸性疾病、感染和肿瘤的动物均被剔除。对于死亡大鼠及时查明死因,妥善处理。

1.3 实验药物 清热利胆解毒方:由大黄、黄连、姜黄、金钱草、三七组成。所有药材均购自安徽省中医院中药房,取6倍于药材量的冷水浸泡药材由20min,武火煎至水沸,改用文火煎煮40min,滤出药液后加适量冷水,复煎至水沸,改用文火煎30min,滤出药液,两煎合并。按人与大鼠剂量转换公式(按大鼠200g体重计算),配制成相当于含生药0.7g/mL的药液。阳性对照药物青霉胺(penicillamine, PCA):0.125g/片,上海信谊药厂有限公司生产。

1.4 实验方法 空白对照组予以普通饲料,其余4组均参照文献方法制作铜负荷模型大鼠,即予含硫酸铜1g/kg的饲料和含0.185%硫酸铜的水,饲养12周,各组大鼠每天自由饮水、进食。清热利胆解毒方组:从第7周第1天开始每只大鼠均予以清热利胆解毒方灌胃(剂量按1.3中计算量给予),每天1次,共6周。青霉胺对照组:从第7周第1天开始每只大鼠按青霉胺0.09g/kg灌胃给药,每天1次,共6周。清热利胆解毒方加青霉胺组:从第7周第1天开始每只大鼠均予以清热利胆解毒方灌胃,同时给予青霉胺灌胃,每天1次,用量同清热利胆解毒方组及青霉胺组,共6周。空白对照组

和模型对照组:给予等量生理盐水,连续6周。

1.5 观察指标 每天定时观察大鼠一般状况,包括体重、精神状态、活动情况、摄食、二便等变化情况。Morris水迷宫测试在安徽中医学院新安医学研究中心动物行为学研究室进行,主要包括定位航行试验和空间探索试验,实验方法按文献要求进行。

1.6 统计学方法 应用SPSS13.0统计分析软件进行统计分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较均用 t 检验。

2 结果

2.1 一般状况 正常对照组大鼠生长状态良好,体重增长快,皮毛光泽度好,活动、进食良好。其余各组大鼠大鼠造模1周后出现活动明显减少,精神萎靡,饮食减少、体重增加不明显甚至下降,皮毛光泽度差,部分有毛发脱落,腹泻等。造模第3周开始出现部分大鼠明显消瘦、行走不稳。开始给药后,除模型组外的各组大鼠精神状况有所好转,饮食、饮水量明显增加。给药6周后,除模型对照组外的各组大鼠体重均明显增加。在整个实验期间,空白对照组大鼠无死亡。模型对照组大鼠死亡3只,各给药组在给药过程中因药液误入气管窒息死亡共5只。不明原因死亡2只。最后每组随机抽取15只进行检测。

2.2 各组大鼠定位航行试验平均潜伏期比较 见表1。平均潜伏期模型对照组较空白对照组明显延长($P < 0.01$),清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较空白对照组延长($P < 0.05$);清热利胆解毒加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较模型对照组平均潜伏期显著减少($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠定位航行试验平均潜伏期比较($\bar{x} \pm s$) s

组别	n	平均潜伏期
空白对照组	15	20.07 ± 3.11
模型对照组	15	40.63 ± 2.02
清热利胆解毒方组	15	29.12 ± 3.57
青霉胺组	15	27.11 ± 2.05
清热利胆解毒方加青霉胺组	15	26.05 ± 2.01

与空白对照组比较,① $P < 0.01$,② $P < 0.05$;与模型对照组比较,③ $P < 0.01$

2.3 各组大鼠穿越原平台位置次数比较 见表2。穿越原平台位置次数模型对照组较空白对照组明显减少($P < 0.01$),清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较空白对照组减少($P < 0.05$);清热利胆解毒方加青霉胺组、清热利胆解毒方组及青霉胺组较模型对照组平均潜伏期显著减少($P < 0.01$)。

3 讨论

中医古代文献对WD缺乏系统的阐述,但根据其临床表现,中医学将该病归于瘕症、颤证、黄疸、积聚、鼓胀等范畴。中医学认为患者先天禀赋不足导致肾的开合失司引起铜毒

表2 各组大鼠穿越原平台位置次数比较($\bar{x} \pm s$) 次

组别	n	穿越原平台位置次数
空白对照组	15	8.11±2.23
模型对照组	15	3.28±1.76
清热利胆解毒方组	15	6.02±2.07
青霉胺组	15	6.61±2.15
清热利胆解毒方加青霉胺组	15	6.95±2.11

与空白对照组比较, ① $P < 0.01$, ② $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ③ $P < 0.01$

内聚, 铜毒郁久, 外泄无路而酿生湿热痰浊、可使脾失运化, 湿浊蕴而化热, 可见口中臭秽、口苦口腻、心烦易怒、小便短赤、脘腹胀闷、舌质红、苔黄或黄腻、脉弦或弦滑等症^[4]。本病发生虽然以虚为主, 但往往可因虚致实而形成本虚标实或虚实夹杂, 其本为肝肾亏虚, 或阴损及阳导致脾肾阳虚; 其标为铜毒湿热、肝气郁结、痰瘀互结^[5]。故“铜毒内聚、肝胆湿热内蕴”为本病的主要病机。采取清热解毒、利胆燥湿、通腑利尿之法, 由大黄、黄连、姜黄、金钱草、三七等组成的清热利胆解毒方治疗, 既往研究结果表明清热利胆解毒方具有显著的细胞内排铜和使细胞内锌含量增加的作用; 增加胆汁、大便及尿的排铜效果; 可以通过间接提高血清基质蛋白酶-1对细胞外基质的降解活性, 而发挥抗肝纤维化作用。方中的三七能改善肝脏功能、调节免疫、对神经细胞缺氧损伤具有明显的保护作用^[6], 姜黄中所含的姜黄素对小鼠急性肝损伤和四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化有治疗作用, 可显著抑制肝星型细胞的增殖和分泌细胞外基质, 并诱导其凋亡^[7]。大黄内含的结合蒽醌类物质能促使肠蠕动而致泻增加胆道排铜^[8]。金钱草可以促进胆汁分泌, 改善胆汁代谢^[9]。

学习和记忆是脑的高级神经活动之一, WD造成的铜沉积可以造成神经系统变性引起整个神经系统受累^[10], 铜是许多功能蛋白如过氧化物歧化酶、酪氨酸环化酶等必需的微量元素, 当铜代谢失衡时可以通过对功能分子构象的直接损害和/或造成活性氧族、活性氮族的生成而造成持续的氧化应激反应和线粒体损伤而导致神经元凋亡和神经退行性变, 影响了突触传导功能, 引起神经行为的改变。而铜沉积在肝组织中导致的隐匿性肝性脑病和(或)代谢异常也可能影响患者的脑功能。

本研究表明, 铜负荷饮食造模后, 大鼠的平均潜伏期明显

延长, 穿越平台次数减少, 结合既往研究中发现铜负荷模型大鼠脑铜含量升高情况, 提示铜过量负荷可以引起大鼠的学习记忆功能障碍。清热利胆解毒方中药应用后大鼠的平均潜伏期, 穿越平台次数等指标较模型组均有明显差异, 清热利胆解毒方组无论从反映空间学习记忆获取能力的定位航行实验, 还是从反映信息贮存能力的空间搜索实验来看, 都低于正常对照组而优于模型对照组的成绩, 清热利胆解毒方组与青霉胺组比较无明显差异。结果表明清热利胆解毒方中药能显著改善铜负荷模型大鼠的学习记忆能力。

[参考文献]

- [1] Gitlin JD. Wilson's disease [J]. Gastroenterology, 2003, 125(6): 1868-1877.
- [2] 王共强, 韩永竹, 杨任民, 等. 肝豆状核变性患者流体智力的神经心理学研究[J]. 中国临床神经科学, 2005, 21(7): 491-493.
- [3] 蔡永亮, 杨任民, 许圣弘. 中西医结合治疗对肝豆状核变性患者智商影响的前瞻性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(11): 6-8.
- [4] 杨文明, 陈彪, 鲍远程, 等. 肝豆状核变性病中医临床思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(6): 66-69.
- [5] 杨文明, 张春海, 李瑞娟, 等. 毒邪在肝豆状核变性致病中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 109-111.
- [6] 胡锦涛, 张锦生. 肝纤维化的病理诊断实践与理论[J]. 诊断学理论与实践, 2005, 4(1): 71-74.
- [7] 吕继红. 三七总皂苷对氧糖剥夺的皮质神经元损伤的保护作用[J]. 中国社区医师, 2010, 12(9): 65-67.
- [8] 赵珍东. 姜黄素抗肝纤维化作用及机理研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 55-57.
- [9] 刘康永, 韩咏竹, 杨任民. 中药肝豆汤对遗传性肝豆状核变性患者铜锌代谢的影响[J]. 现代康复, 2001, 5(13): 37-39.
- [10] 杨任民. 肝豆状核变性的药物治疗[J]. 中风与神经疾病杂志, 2005, 22(3): 196-199.

(责任编辑: 马力)