

· 基础研究 ·

加味补阳还五汤对 16 Hz、130 dB 次声损伤的防护效应观察

杨俊峰 范建中 陈景藻 谭晓明

【摘要】目的 探讨加味补阳还五汤对 16 Hz、130 dB 次声暴露下小鼠学习记忆能力、脑组织超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性以及丙二醛(MDA)含量的影响。**方法** 将 50 只 BALB/c 小鼠分为正常对照组、次声对照组及次声药物组(又根据用药剂量不同细分为高、中、低剂量 3 个亚组),分别将次声对照组及次声药物组暴露于次声环境中,次声药物组于次声作用结束后给予加味补阳还五汤治疗,正常对照组也置于次声舱内,但期间不给予次声作用。上述各组小鼠经 14 d 相应处理后测试其记忆功能、SOD、GSH-PX 活性及 MDA 含量变化情况。**结果** 与正常对照组比较,次声对照组记忆功能明显下降($P < 0.05$),SOD 活性有升高趋势(但 $P > 0.05$),GSH-PX 活性以及 MDA 含量均显著升高($P < 0.05$);次声药物组与次声对照组比较,其学习记忆功能有显著性提高($P < 0.05$),SOD 以及 GSH-PX 活性有显著增加($P < 0.05$),MDA 含量显著降低($P < 0.05$)。**结论** 16 Hz、130 dB 次声可引发小鼠脑皮质的脂质过氧化,使其记忆功能受损;加味补阳还五汤通过提高小鼠体内 GSH-PX 和 SOD 活性来清除体内过剩的自由基,使 MDA 含量降低,从而减轻次声对机体的不良作用。

【关键词】 次声; 加味补阳还五汤; 学习记忆; SOD; GSH-PX; MDA

The protecting effects of Jia Wei Bu Yang Huan Wu decoction on the injury of 16 Hz, 130 dB infrasound
YANG Jun-feng*, FAN Jian-zhong, CHEN Jing-zao, TAN Xiao-ming. * Department of Rehabilitation Medicine, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】Objective To study the effects of Jia Wei Bu Yang Huan Wu decoction on learning and memory abilities, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX) activities and the contents of malondialdehyde (MDA) in mice exposed to 16 Hz, 130 dB infrasound. **Methods** Fifty BALB/c mice were divided into a control group (group C), an infrasound-control group (IC group), an infrasound and drug-treated group (ID group). Learning and memory abilities, SOD and GSH-PX activities and MDA contents were measured 14 d after corresponding treatment. **Results** Compared with those in group C, learning and memory abilities was significantly decreased ($P < 0.05$), and GSH-PX activity and MDA contents were obviously increased ($P < 0.05$), but SOD activity was increased slightly ($P > 0.05$) in IC group. Compared with those in IC group, learning and memory abilities was increased ($P < 0.05$), GSH-PX and SOD activities were increased ($P < 0.05$), and MDA contents was decreased ($P < 0.05$) in ID group. **Conclusion** Learning and memory abilities could be damaged by 16 Hz, 130 dB infrasound, causing lipid peroxidation reaction in mice's cortex, while Jia Wei Bu Yang Huan Wu decoction could alleviate infrasound injury by enhancing the activities of GSH-PX and SOD, cleaning free radical, and decreasing the contents of MDA.

【Key words】 Infrasound; Jia Wei Bu Yang Huan Wu Decoction; Learning and memory

次声是频率在 0.000 1 ~ 20 Hz 之间的声波,人耳一般听不到,它在各类工业生产环境、交通环境、军事环境及自然环境中都广泛存在^[1]。次声作为公共噪声和生产噪声的重要组成部分之一,已日益受到人们重视。波兰已制定相应法律对工作环境中次声噪声的最大允许值作出严格规定^[2]。由于次声在一定条件下可对人体组织造成损害,但国内目前有关其防护研究方面的报道甚少^[3]。本实验通过观察加味补阳还五汤对暴露于 16 Hz、130 dB 次声环境中小鼠学习记

忆能力、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性以及丙二醛(MDA)含量的影响,从而探讨对次声损伤的防治措施,并初步阐明其防护机制,为次声的防治研究提供实验依据。现报道如下。

材料与方法

一、仪器与试剂

本研究所采用的次声声源及检测系统由第四军医大学制作完成,声源为电动扬声器,次声压力舱系统由低频信号发生器(1110B 型,北京强度环境研究所研制)、功率放大器(7101 型,航天工业总公司第 702 所研制)和 4 个电动扬声器(YD500-8XA 型,南京电声器

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院康复医学科(杨俊峰、范建中、谭晓明);第四军医大学西京医院康复医学科(陈景藻)

材公司研制)组成。检测系统主要包括次声传声器(1425型,丹麦B&K公司研制)和次声信号数据采集系统。次声声源输出的次声声压、频率及波形稳定,频率测量结果误差为 $-1.7\% \sim +3.7\%$,声压级波动为 $2.8\% \sim 5.2\%$ 。

二、实验动物与分组

选用雄性BALB/c小鼠50只,体重20g左右,由第四军医大学实验动物中心提供。于实验前4d分笼饲养于安静环境中,期间小鼠自由摄食、进水。动物室温度控制在 $20 \sim 24^{\circ}\text{C}$,湿度控制在50%左右。将上述小鼠分为正常对照组、次声对照组以及次声药物组(该组又根据其用药剂量不同进一步划分为高、中、低剂量3个亚组),每组各有10只动物。

三、实验处理方法

将次声药物组小鼠置入次声舱内暴露2h(次声频率16Hz,强度130dB),待暴露结束1h后,高、中、低剂量各亚组小鼠按每千克体重20、10及5ml分别灌注加味补阳还五汤。该汤由生黄芪、当归尾、红花、赤芍、地龙、桃仁、川芎、杭白菊等组成(购于南方医科大学南方医院中药房),水煎2次,生药含量为3g/ml。次声对照组小鼠于次声舱内亦暴露2h,次声作用参数同上,待暴露结束1h后按10ml/kg体重灌注生理盐水。正常对照组小鼠同样也置入次声舱内2h,但期间无次声能量输出,出舱1h后按10ml/kg体重灌注生理盐水。各组动物均采用灌胃法给药,上述实验操作每天1次,共持续14d。

四、观察指标测定

1. 记忆功能测定:各组于次声处理前,均采用Morris圆形水迷宫评定其记忆功能,水迷宫直径75cm,高度50cm,水深35cm,水温为 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,加入硫酸钡使其呈乳白色混悬液,将平台固定于水迷宫直径3/4处,平台表面没于水下2cm。于水迷宫内距平台最远处放小鼠入水,测定其到达平台所需时间(即逃逸时间),并以此作为学习记忆功能指标。各组小鼠每天训练4次,上、下午各2次,每次间隔时间为1h,共训练7d,待训练结束时若逃逸时间超过60s者剔出本次研究。以小鼠最后一天的逃逸时间平均值作为小鼠实验前的记忆功能指标;各组小鼠分别经上述

次声处理14d后再次评定其记忆功能,并将该结果作为实验后的记忆能力指标。

2. 脑组织生化检测:各组小鼠于记忆能力测定结束后断头处死,取脑组织,用冰生理盐水冲洗后置入 -80°C 冰箱内待测。随后将脑组织混于生理盐水中制成10%脑组织匀浆,其中GSH-PX活性选用化学比色法测定;SOD活性选用黄嘌呤氧化酶法测定;MDA含量选用硫代巴比妥酸法测定;蛋白质含量选用考马斯亮蓝法测定。MDA、GSH-PX和SOD试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

五、统计学分析

研究所得数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用SPSS 10.0版统计软件(统计方法采用ONE-ANOVA检验方法)进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组小鼠学习记忆功能比较

实验前各组小鼠的逃逸时间差异无统计学意义($P > 0.05$),实验后次声对照组的逃逸时间较正常对照组明显延长($P < 0.05$);各不同剂量药物亚组小鼠与次声对照组比较,其逃逸时间均有明显缩短($P < 0.05$);但不同剂量药物亚组间的逃逸时间差异无统计学意义($P > 0.05$)。具体数据详见表1。

二、各组小鼠SOD、GSH-PX及MDA含量比较

次声对照组的SOD活性较正常对照组有升高趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),各药物亚组小鼠的SOD活性较次声对照组、正常对照组均有明显升高($P < 0.05$),其中以高、中剂量亚组尤为明显,它们与低剂量亚组间的差异有统计学意义($P < 0.05$);次声对照组的GSH-Px活性较正常对照组有明显升高($P < 0.05$);各药物亚组小鼠的GSH-Px活性较次声对照组、正常对照组亦有显著升高($P < 0.05$),其中以高剂量亚组最为明显,它与中、低剂量亚组间有明显差异($P < 0.05$);次声对照组的MDA含量较正常对照组有明显升高($P < 0.05$),各药物亚组的MDA含量均较次声对照组有明显降低($P < 0.05$),但各剂量亚组间未见明显差异($P > 0.05$)。具体数据详见表1。

表1 各组小鼠逃逸时间及脑组织生化结果比较

组 别	逃逸时间($\bar{x} \pm s$)		SOD(U/mg 蛋白)	GSH-PX(U)	MDA(nmol/mg 蛋白)
	实验前	实验后			
高剂量药物组	7.40 $\pm$ 1.53	7.73 $\pm$ 0.54 [#]	99.32 $\pm$ 22.05 ^{*#}	125.00 $\pm$ 10.68 ^{*#}	8.37 $\pm$ 1.28 [#]
中剂量药物组	8.13 $\pm$ 2.12	8.75 $\pm$ 2.24 [#]	98.31 $\pm$ 11.25 ^{*#}	99.77 $\pm$ 11.19 ^{*#}	7.64 $\pm$ 1.55 [*]
低剂量药物组	8.36 $\pm$ 2.41	11.21 $\pm$ 2.02 [#]	80.13 $\pm$ 13.18 ^{*#}	109.01 $\pm$ 8.60 ^{*#}	7.35 $\pm$ 1.01 [#]
次声对照组	9.22 $\pm$ 1.79	20.07 $\pm$ 3.93 [*]	61.11 $\pm$ 13.68	67.44 $\pm$ 10.39 [*]	11.65 $\pm$ 1.62 [*]
正常对照组	10.59 $\pm$ 2.73	13.45 $\pm$ 2.63 [#]	52.29 $\pm$ 8.69	40.21 $\pm$ 5.60 [#]	5.30 $\pm$ 0.67 [#]

注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$;与次声对照组相比,[#] $P < 0.05$

讨 论

有研究指出,16 Hz、130 dB 次声可引起大鼠在明暗箱实验中的明箱停留时间减少,而且 130 dB 组大鼠的上述现象较 90 dB 组明显,14 d 组较 7 d 组明显^[4];频率为 8 Hz,强度为 90 dB、100 dB 及 130 dB 的次声均可影响大鼠的空间记忆功能,使其在 Morris 水迷宫实验中找到隐匿平台的时间延长,其中以 130 dB 组尤为明显^[5]。叶琳等^[6]研究发现,将大鼠暴露于 8 Hz、130 dB 次声环境中,其大脑皮层 GSH-Px 活性及 MDA 含量均显著升高,从而提示大鼠经次声作用后,可引发其大脑皮层的脂质过氧化物水平增高,造成脑损伤。根据次声作用后受试者的临床表现以及动物实验结果,从中医辨证角度分析,可以大致将受试者临床表现归为肝肾亏虚、气虚血瘀,故选用中药治疗重点在于补益肝肾、活血化瘀。本实验采用的补阳还五汤始载于《医林改错》,由清代名医王清任创制,具有补气活血、通经活络之功效^[7]。现代医学研究发现,该方具有增加脑血流量、改善脑组织循环、清除体内过量自由基、抗过氧化及促进神经元生长等功效^[8]。补阳还五汤中以补气药与活血祛瘀药相配伍,以益气固摄为主、化瘀通络为辅,故重用生黄芩,且辅以小剂量活血药物。在研究中还发现,次声受试者除了肝肾亏虚、气虚血瘀外,还有肝阳上亢等表征,而杭白菊具有疏风散热、明目、平降肝阳、清热解毒之功效^[9],因此我们在补阳还五汤里加杭白菊来平肝潜阳,借此对次声损伤进行全面有效防护。

本研究发现,小鼠经 16 Hz、130 dB 次声暴露后,其大脑 SOD 活性升高不明显($P > 0.05$),GSH-Px 活性有显著性升高($P < 0.05$),MDA 含量亦增高明显($P < 0.05$),逃逸时间延长($P < 0.05$)。各药物组小鼠于次声暴露后给予加味补阳还五汤治疗,其大脑 SOD 活性及 GSH-Px 活性均显著升高($P < 0.05$),MDA 含量较次声对照组明显降低($P < 0.05$),逃逸时间也显著缩短($P < 0.05$)。由于 GSH-Px 和 SOD 是体内重要的抗氧化酶,GSH-Px 可特异性地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢(H_2O_2)的还原反应;SOD 可有效地清除超氧化物阴离子(O_2^-),使机体组织细胞免受自由基损伤^[10],故体内 GSH-Px 和 SOD 活性可在一定程度上反映体内抗氧化能力的大小,如 MDA 含量可以反映机体内脂质过氧化的水平,能间接了解机体细胞受自由基攻击的程度。在本实验中,小鼠接受次声暴露后其脑组织 MDA 含量明显增高,证明次声作用可以产生过量的自由基而损害细胞功能,同时 GSH-Px 以及 SOD 活性在一定时期内出现增加现象,这是机体提高抗氧化能力的代偿性反应。小鼠经加味补阳还五汤治疗后,其大脑 GSH-Px 及 SOD 活性均有显著增加,而 MDA 含量明显降低,说明加味补阳

还五汤能加强体内清除自由基的能力,可以降低脂质过氧化物浓度,减轻对生物膜等组织的损伤。既往有研究提示,次声对人体的损伤可能是因为激活了氧化系统,产生了自由基而损害细胞功能,同时发现次声长时间作用可引起学习能力降低,其原因与次声导致的脂质过氧化有关^[11];另外还有报道认为,小鼠学习记忆功能的衰退与脑内脂褐素含量的升高有对应性关系^[12]。在本实验中,各次声药物亚组小鼠大脑 SOD 及 GSH-Px 活性增强,使其清除自由基的能力提高,促使 MDA 含量下降,相应的记忆功能也有所改善,这与以往的研究一致,进一步证实了体内抗氧化物水平与学习记忆功能存在着对应关系,也说明了抗自由基药物对次声损伤具有一定的防护作用。

本实验还观察了不同用药剂量与小鼠记忆成绩、抗氧化物水平间的关系,发现小鼠的记忆成绩及抗氧化物水平与用药剂量间并无明显相关性,例如给予小鼠低剂量药物就能产生较好的次声防护效果,并且其疗效并不随药物剂量的增加而提高。由于次声对人体的损伤效应是多层次、多方面的,脂质过氧化只是其中的一个方面,对于其它的防护机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈景藻. 次声的存在及其基本生物效应和研究意义. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21: 131-133.
- 2 Pawlaczyk LM. Evaluation of occupational exposure to infrasonic in Poland. Int Occup Med Environ Health, 1999, 12: 159-176.
- 3 杜宝东, 刘淑芳. 次声对人体及动物影响的研究进展. 国外医学耳鼻喉科学分册, 2001, 25: 99-102.
- 4 魏智钧, 李玲, 陈景藻, 等. 次声暴露对大鼠记忆功能及隔内侧核和斜角带核胆碱能神经元表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 79-82.
- 5 谭永霞, 李玲, 陈景藻. 次声对大鼠学习记忆行为及海马和颞叶皮层 5-HT, 5-HT_{1A} 的影响. 中国行为医学科学, 2004, 13: 17-19.
- 6 叶琳, 龚书明, 陈耀明, 等. 次声暴露对大鼠大脑皮层脂质过氧化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24: 360-362.
- 7 张健康, 王岳, 刘春燕. 试论补阳还五汤的实际应用. 中医药信息, 2000, 5: 18-20.
- 8 廖春来, 佟丽, 陈育尧. 补阳还五汤对脑缺血大鼠 nNOS 免疫阳性神经元的影响. 第一军医大学学报, 2004, 24: 864-868.
- 9 蒋惠娣, 夏强, 徐万红, 等. 杭白菊的心血管药理作用及其机制研究进展. 世界科学技术中药现代化, 2002, 4: 31-33.
- 10 Xu XH, Wang LB, Yang SW, et al. Relationship between ability of learning-memory and lipofuscin content of brain in mice of different age. Chin J Geriatr, 1998, 17: 80-82.
- 11 王斌, 陈景藻, 易南. 次声对小鼠学习记忆能力的影响及防护. 航空军医, 1997, 25: 142-143.
- 12 马虹, 徐镡, 田苏平, 等. 不同水温游泳对小鼠行为、记忆和脂质过氧化影响的研究. 中国应用生理学杂志, 1999, 15: 222-225.

(收稿日期: 2004-11-20)

(本文编辑: 易 浩)