

當歸補血湯對缺血性大鼠被動迴避學習反應障礙之影響

林穎志 謝明村 吳龍源 彭文煌
中國醫藥學院 中國藥學研究所

摘要

本研究以被動迴避學習反應儀探討當歸補血湯水抽取物及95%乙醇抽取物對雙側頸動脈缺血大鼠被動迴避學習反應之影響，結果顯示雙側頸動脈缺血大鼠於缺血第二天及第十天會產生被動迴避學習反應障礙，當給予當歸補血湯水抽取物及95%乙醇抽取物每天一次，連續給二天或十天對雙側頸動脈缺血大鼠產生之被動迴避學習反應障礙有顯著改善作用。電痛刺激實驗顯示，當給予當歸補血湯水抽取物及95%乙醇抽取物每天一次，連續給二天或十天對雙側頸動脈缺血大鼠之痛閾值並無影響。運動量實驗結果顯示，當給予當歸補血湯水抽取物及95%乙醇抽取物每天一次，連續給二天或十天對雙側頸動脈缺血大鼠之運動量降低有明顯增加作用。

綜合以上結果顯示，當給予當歸補血湯水抽取物及95%乙醇抽取物每天一次，連續給二天或十天對雙側頸動脈缺血大鼠之被動迴避學習反應障礙有顯著改善作用。

關鍵詞：當歸補血湯；腦缺血大鼠；被動迴避。

前言

腦部缺血容易引起中樞神經系統之神經元損害，產生神經功能喪失，嚴重者會導致神經元死亡，此神經功能失常常反應於行為及記憶功能失常。臨床上，痴呆症中以老年痴呆症及腦血管性痴呆症的出現頻率最高。老年痴呆症及腦血管性痴呆症屬於多發梗塞性痴呆，必須早期加以治療，目前大多採對症療法，主要以修復受損傷之腦組織及提高腦代謝活性為目的，臨床上多使用腦循環改善劑及腦代謝賦活劑。然這些治療劑(如 cal-

cium hopantenate, amantadine)使用高劑量或長期服用時，會有失眠、不安及譫語惡化等不良副作用產生⁽¹⁾，因此尋找對學習記憶有所助益且副作用少之理想藥物，以改善老年痴呆症患者的記憶力減退，實為目前刻不容緩的工作。

中醫方劑典籍為我國古聖先賢臨床經驗的累積，方劑之記載至明李時珍之本草綱目總共收載萬餘方，為我國重要的醫療資源。中醫對於老年痴呆症之臨床用藥上多以活血化瘀及補氣寧神為主，具有促進腦部血液流通，防止或減少腦動脈硬化及腦血栓形成等作用，然對於其藥理機轉則大多未見有探討。著者因此進行本研究，擬從活血化瘀方劑中找出具有促進學習記憶之中藥方劑。

當歸補血湯最早記載於李東垣所著內外

聯絡人：彭文煌

通訊處：台中市學士路 91 號

電話：(04)4825415

傷辨惑論，全方由黃耆一兩、當歸二錢所組成，具有補氣生血作用，研究證實當歸補血湯具有抗ADP誘發大鼠血小板的聚集作用、促進造血功能、抗溶血作用⁽²⁾、提高小鼠紅血球免疫功能、增強小鼠腹腔巨噬細胞的吞噬功能⁽³⁾及增強小鼠的耐缺氧能力⁽⁴⁾。其單味藥材中當歸具有擴張血管、增加循環血流量及血流速度⁽⁵⁾、顯著抑制血小板聚集、抗血栓形成作用^(6,7)、鎮痛作用⁽⁸⁾。

Pulsinelli 及 Brierley 以阻塞一般頸動脈及永久遮斷頸錐動脈法可在未麻醉大鼠產生腦部缺血⁽⁹⁾，雖然此方法操作耗時且需要精細的處理，然現今一般仍被用為一種學習與記憶損害的動物模式⁽¹⁰⁻¹²⁾。又 Nabeshima 研究證實阻塞雙側頸動脈可產生腦部缺血，於阻塞後第二天，會產生被動迴避學習反應障礙，主要是因為海馬回 CA1 區神經元損害，甚至死亡或運動量增加所致；於阻塞後第十天，亦會產生被動迴避學習反應障礙，主要與海馬回 CA1 區神經元損害有關⁽¹³⁾。

因此本研究擬以被動迴避儀 (passive avoidance task) 來探討當歸補血湯對缺血性大鼠學習記憶障礙之作用，並以自發運動量測定儀測定缺血性大鼠的運動量，以探討運動量變化是否影響被動迴避學習反應，以找尋對缺血引起之學習記憶障礙有改善作用的方劑，提供瘀血性痴呆症患者其他可改善學習記憶障礙的新藥物。

材料與方法

一、實驗藥材之製備：

本實驗所用之當歸補血湯組成藥材，經生藥學鑑定，確定其基原如下：

- (1) 當歸：為傘形科植物當歸 [*Angelica sinensis* (Olive.) Diels.] 的乾燥塊根。
- (2) 黃耆：為豆科植物黃耆 (*Astragalus membranaceus* Bge.) 的乾燥根。

本研究將當歸補血湯方劑以 95% 乙醇或蒸餾水浸潤後，在 50°C 下迴流抽取四~五次，每次約四小時，合併抽取液，經減壓濃縮乾燥後，即得當歸補血湯醇及水粗萃取物。

二、實驗動物

本研究所使用之動物為：

1. Sprague-Dawley 系雄性大鼠，體重 250~300 公克。

三、實驗方法：

1. 缺血性大鼠 (ischemic rats) 之處理：

實驗大鼠以 pentobarbital 麻醉，將麻醉大鼠仰臥，由腹頸部中線切開，並游離出頸動脈，以動脈夾夾塞兩側頸動脈 30 分鐘，實驗期間以恆溫板及 40W 檯燈光照控制實驗動物肛溫在攝氏 36-37 度，手術後動物置於飼養籠，並給予光照至其翻正反射 (righting reflex) 產生為止。

2. 對缺血性大鼠自發運動量之影響：

運動量之測定是使用「動物運動量測定裝置」(1-Opto-Varimex-3 Animal Activity Meter, Columbus, USA)，記錄缺血性大鼠經口服給予不同劑量之當歸補血湯醇及水粗萃取物後之各種活動行為的變化 (包括水平走動，垂直走動及移動總距離等)。實驗分二天給藥組及十天給藥組；二天給藥組，於動物頸動脈阻塞處理後口服給予不同劑量之當歸補血湯醇及水粗萃取物，隔天再口服給藥一次，於口服給藥 55 分鐘後放入此裝置內適應 5 分鐘，再開始記錄，觀察並連續記錄五分鐘。十天給藥組，動物於頸動脈阻塞處理後口服給予不同劑量之當歸補血湯醇及水粗萃取物，每天給藥一次，連續給藥十天，於最後一次口服給藥後 55 分鐘，放入此裝置內適應 5 分鐘，再觀察並連續記錄五分鐘⁽¹⁴⁾。對照組均給予 vehicle。

3. 對缺血性大鼠在不同電流強度下之痛刺激影響：

將手術後大鼠分成二組 (控制組及給藥組)，給藥組經給藥 60 分鐘後，將實驗缺血性大鼠放置於實驗箱之地板上，同時地板通以不同強度的電流 (0.6, 0.8, 0.9, 1.0mA)，在不同電流強度下測定其有無嘶叫聲，經 5 分鐘後，再測之，連測三次，凡連續二次電刺激引起嘶叫者，表示該動物之痛閾值，最後分別求各組之最低痛閾值⁽¹⁵⁾。

4. 對缺血性大鼠被動迴避反應障礙之影響：
本實驗是使用「條件反應測定裝置」

(Muromachi Kikai Co. Ltd. Japan)，此裝置分成兩部份：實驗箱(Shuttle Box)係為一經中間閘門分隔為相同大小明、暗二室(48×20×30cm)的箱子及其控制器 (MCU-101 Controller, Muromachi Kikai Co. Ltd. Japan)；二室地板由不銹鋼條組成，上方置一 15W 之電燈泡。

訓練期：將缺血性大鼠置入實驗箱之暗室地板上並打開閘門，當動物進入明室後，關上閘門，同時於明室底板通以電流(1mA, 2sec)，5 秒後才自室內取出，歸回飼養籠。

測定期：於訓練後 24 小時，再將實驗大鼠置於明室，記錄大鼠由明室至暗室之滯留時間。當動物於明室之滯留時間大於 5 分鐘(300 秒)時，則稱大鼠之學習記憶能力正常⁽⁵⁾。

實驗分二天給藥組及十天給藥組。二天給藥組，動物於頸動脈阻塞處理後立刻口服給予不同劑量之當歸補血湯各組藥材粗萃取物，隔天於訓練前 60 分鐘再口服給藥一次，口服給藥 60 分鐘後，依前法，將實驗動物分別放入實驗箱進行訓練，訓練後，將實驗動物歸回飼養籠；待 24 小時後，再將動物置於明室，進行測定，記錄動物由明室至暗室之滯留時間；十天給藥組，動物於頸動脈阻塞處理後口服給予不同劑量之當歸補血湯各組藥材粗萃取物，每天給藥一次，連續給藥十天，於最後一次口服給藥 60 分鐘後，依前法，將實驗動物分別放入實驗箱進行訓練，訓練後，將實驗動物歸回飼養籠；待 24 小時後，再將動物置於明室，進行測定，記錄動物由明室至暗室之滯留時間。

5. 統計學分析：

本實驗所得之數據，自發運動量實驗，均以 one-way ANOVA 分析其變異數，再以 Duncan's multiple range test 檢定，統計並分析其間差異之顯著性，凡 P 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。

而於鎮痛實驗及單向被動迴避學習反應實驗，則以無母數分析法統計，先以 Kruskal-Wallis 單因子變異數分析各組間之變異數差異，再以 Mann-Whitney U-test 檢定其間差異之顯著性，凡 P 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。

結果

一、對缺血性大鼠自發運動量之影響：

如圖一所示，0.5 g/kg, 1.0 g/kg 當歸補血湯水抽取物或乙醇抽取物每天口服給藥一次，

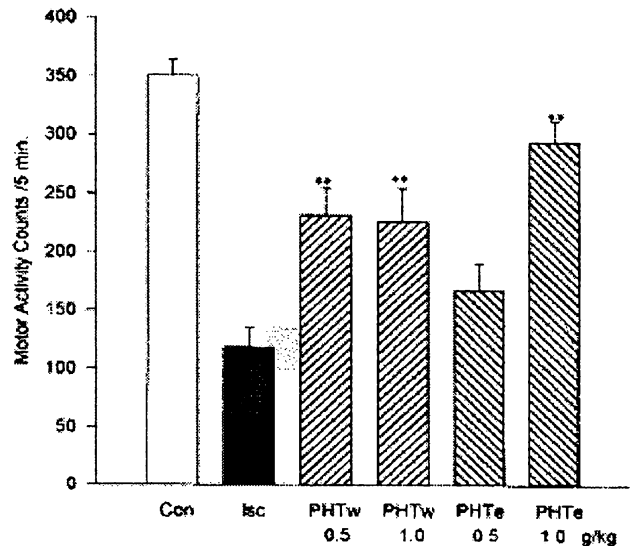


Fig 1. Effects of water/ ethanol extracts of Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang for two days administration on the locomotor activity induced by cerebral ischemia rats after two days occlusion. Isc: ischemia rats, PHT: Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang. **P < 0.01 as compared with the Isc group

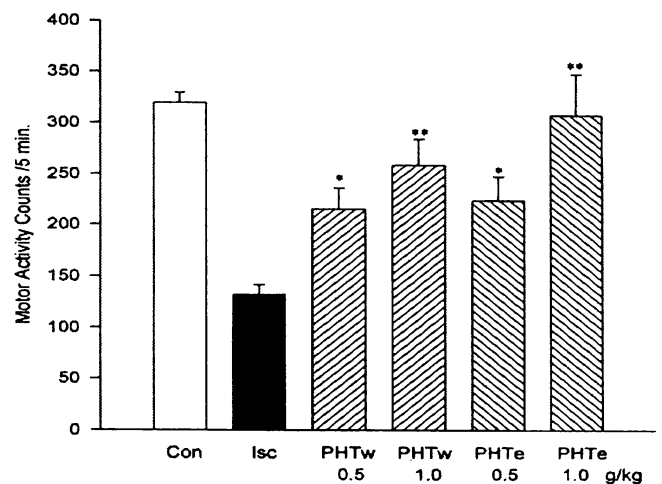


Fig 2. Effects of water/ ethanol extracts of Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang for ten days administration on the locomotor activity induced by cerebral ischemia rats after ten days occlusion. Isc: ischemia rats, PHT: Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang. *P < 0.05, **P < 0.01 as compared with the Isc group

連續給藥二天，可增加缺血性大鼠之自發運動量。

如圖二所示，0.5 g/kg 當歸補血湯水抽取物或乙醇抽取物每天口服給藥一次，連續給藥十天，可增加缺血性大鼠之自發運動量。

Table1. Effects of water/ ethanol extracts of Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang on the electric foot-shock in rats.

Drug	Dose(g/kg,p.o.)	Threshold(mA)	
		Flinch	Jump/Vocalization
Control		0.76±0.02	0.84±0.02
Isc		0.75±0.01	0.83±0.02
PHTw	0.5	0.77±0.02	0.86±0.01
PHTw	1.0	0.76±0.01	0.85±0.02
PHTe	0.5	0.77±0.01	0.87±0.02
PHTe	1.0	0.78±0.02	0.85±0.01

Isc : Ischemia rats;PHT:Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang

二、對缺血性大鼠在不同電流強度下之痛刺激影響：

如表一所示，當歸補血湯乙醇或水提取物 0.5, 1.0 g/kg 每天口服給藥一次，連續給藥十天，對缺血性大鼠之最低痛閾值並無影響。

三、對缺血性大鼠被動迴避反應障礙之影響：

如圖三所示，當歸補血湯 0.5, 1.0 g/kg 水提取物或乙醇提取物每天口服給藥一次，連續給二天，對缺血性大鼠第二天的 step-through latencies 有顯著延長的作用。如圖四

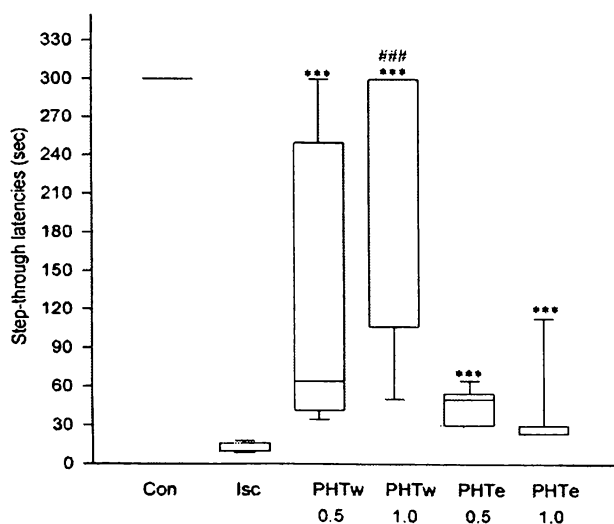


Fig 3. Effects of water/ ethanol extracts of Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang for two days administration on the impairment of step-through latencies induced by cerebral ischemia rats after two days occlusion. Isc: ischemia rats, PHT: Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang. ***P < 0.001 as compared with the Isc group. ### P < 0.001 as compared with PHTe 1.0 group.

所示，當歸補血湯 0.5, 1.0 g/kg 水提取物或乙醇提取物每天口服給藥一次，連續給十天，對缺血性大鼠第十天的 step-through latencies 有顯著延長的作用。

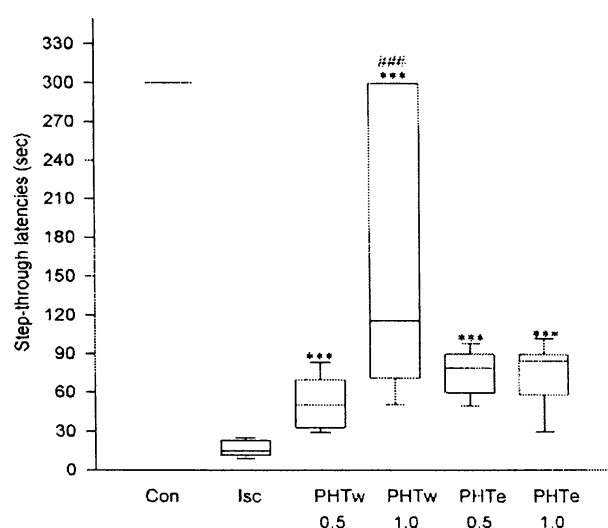


Fig 4. Effects of water/ ethanol extracts of Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang for ten days administration on the impairment of step-through latencies induced by cerebral ischemia rats after ten days occlusion. Isc: ischemia rats, PHT: Dan-Quei-Pu-Hsueh-Tang. ***P < 0.001 as compared with the Isc group. ### P < 0.001 as compared with PHTe 1.0 group.

討論

如圖一至圖四所示，大鼠雙側頸動脈結紮，於第二天及第十天會導致被動迴避學習反應障礙，其自發運動量與正常大鼠比較有顯著降低，而其痛閾值並無改變，顯示大鼠雙側頸動脈結紮於第二天及第十天時會導致記憶獲得障礙。此結果與 Nabeshima 研究結果相似。如圖一、圖二所示，大鼠雙側頸動脈結紮，於第二天及第十天會導致自發運動量降低現象，當歸補血湯水或 95% 乙醇提取物每天給藥一次，連續給予二天或十天，對腦缺血大鼠自發運動量降低現象有改善作用，此改善作用並不影響缺血性大鼠被動迴避學習反應障礙，又當歸補血湯乙醇或水提取物

0.5, 1.0 g/kg 每天口服給藥一次，連續給藥十天，對缺血性大鼠之最低痛閾值並無影響，顯示當歸補血湯水或 95%乙醇抽取物對大鼠雙側頸動脈結紮於第二天及第十天之記憶獲得障礙之改善作用不受運動量及痛閾值之影響。

據研究報告指出，當歸對腦缺氧、缺血後再灌注之腦組織脂質過氧化物增高有明顯的抑制作用，顯示當歸具有抗氧化、抑制自由基作用，進而減輕腦缺氧，對缺血後再灌注損傷有治療作用⁽¹⁵⁾。其活性成分阿魏酸具有直接消除自由基、抑制氧化反應和自由基反應、及與生物膜脂質結合保護膜脂質等機理拮抗自由基對組織的損害⁽¹⁶⁾。當歸具有擴張血管、增加循環血流量及血流速度⁽¹⁷⁾、顯著抑制血小板聚集、抗血栓形成作用⁽¹⁸⁾。黃耆口服或黃耆多糖腹腔注射對兩側頸動脈結紮小鼠所致的腦缺氧均有顯著對抗作用，可明顯延長小鼠的存活時間^(19,20)，老年大鼠的主動脈和肺中膠原含量明顯高於青年大鼠，服用黃耆水煎劑劑後，可明顯降低老年大鼠主動脈和肺中膠原含量，使之接近青年大鼠，提示長期服用黃耆對預防老年性動脈硬化、改善衰老的肺功能有一定意義⁽²¹⁾。當歸補血湯由黃耆一兩、當歸二錢所組成，具有補氣生血作用，研究證實當歸補血湯具有抗ADP誘發大鼠血小板的聚集作用、促進造血功能⁽⁷⁾及增強小鼠的耐缺氧能力⁽⁹⁾。當歸補血湯改善缺血性大鼠被動迴避學習反應障礙之機轉是否與其具有抗ADP誘發大鼠血小板的聚集作用、促進造血功能及增強小鼠的耐缺氧能力有關，仍有待進一步研究。

綜合上述，當歸補血湯水抽取物及乙醇抽取物對缺血性癡呆大鼠具有治療作用。

謝辭

本研究承蒙行政院衛生署中醫藥委員會精會補助 (CCMP86-RD-030)，得以順利完成，謹此誌謝。

參考文獻

1. Preston J, Johnson J. *Clinical Psychopharmac-*

ology made Radiculously Simple. MedMaster, Inc., Miami 1992: 128-141.

2. 吳琦、王娟娟、越琳：當歸補血湯及其單味藥對 ⁶⁰Co⁵ 照射小鼠免疫功能的影響。北京中醫學院學報 1993; 16(4) : 53-55。
3. 馬世平、楊漢祥、瞿融、杭秉蓓、李珮珍：當歸補血湯及其組成藥物對紅細胞免疫功能的影響。中成藥 1992; 12(8): 23-24。
4. 宋延平、謝人明、劉小平、成雪花：當歸補血湯的心血管作用及耐缺氧作用。陝西中醫 1993; 14(10): 472-473。
5. 周金黃, 王筠默: 中藥藥理學, 上海科技出版社 1986; 181,.
6. 尹鐘洙: 藥學學報 1980; 15:321.
7. 沉翠娟: 山西醫藥雜誌 1979: 1: 46
8. 周金黃, 王筠默: 中藥藥理學, 上海科技出版社 1986; 307.
9. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the anesthetized rats. *Stroke* 1979; 10:267-272.
10. Davis HP, Baranowski JR, Pulsinelli WA, Volpe BT. Retention of reference memory following ischemic hippocampal damage. *Physiol Behav* 1987; 39: 783-786.
11. Davis HP, Tribuna J, Pulsinelli WA, Volpe BT. Reference and working memory of rats following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. *Physiol Behav* 1986; 37: 387-392.
12. Ohno M, Yamamoto T, Ueki S. Effect of the k-receptor agonist, U-50,488H, on cerebral ischemia-induced impairment of working memory assessed in rats by a three-panel runway task. *Eur J Pharmacol* 1991; 193: 375-361 .
13. Amano M, Hasegawa M, Hasegawa T, Nabeshima T. Characteristics of transient cerebral ischemia-induced deficit on various learning and memory tasks in male Mongolian gerbils. *Jpn J Pharmacol* 1993; 63: 469-477.
14. 李儀奎：中藥藥理實驗方法學。上海科技出版社，上海，1991: 355-356。
15. 張亞卓、薛慶澄：當歸，川芎秦對腦缺氧缺血後再灌注損傷的影響。佳木斯醫學院

- 學報 1990; 3(2): 210-213,.
- 16.張明發：阿魏酸抗動脈粥樣硬化研究進展。中草藥 1990; 21(1): 41-43,.
- 17.彭仁琇、楊德章、葉青、俞平、劉惟堯、鄧文瑾、肖德芳：當歸對心血管系統的藥理作用。中草藥 1981; 12(7): 33-36,.
- 18.湖北醫學院基礎部藥理教研室：科技通訊 1997; 4:19,.
- 19.康永、李先榮、程霞、牛豔豔：黃耆口服液藥理作用的研究。中草藥 1989; 20(11): 21-23.
- 20.李先榮、康永、程霞、牛豔豔、劉德寬：注射用黃耆多糖藥理作用的研究--1. 對應激反應的實驗研究。中成藥 1989; 11(3): 27-29.
- 21.徐品初、金國琴：黃芩對老年大鼠主動脈和肺內膠原蛋白含量的影響。中國中藥雜誌 1991; 16(1): 49-50.

Effect of TANG-KUEI-PU-HSUEH-TANGS on the impairment of passive avoidance learning in rats exposed to cerebral ischemia

Ying-Chih Lin, Ming-Tsuen Hsieh, Long-yuou Wu, Wen-Huang Peng*

*Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences,
China Medical College
Corresponding author

Abstract

In this study, we used the passive avoidance task to investigate the effects of the water or ethanol extracts of Tang-Kuei-Pu-Hsueh-Tangs (PHT) on the impairment of passive avoidance learning in rats exposed to cerebral ischemia.

The rats after the occlusion of carotid vessels for two days or ten days produced the impairment of passive avoidance learning. The water or ethanol extracts of PHT at 0.5, 1.0 g/kg dose administered for two or ten days improved the impairment of passive avoidance learning produced by cerebral ischemia rats. This impressive effects of PHT were not affected by the changes of the pain threshold. The water or ethanol extracts of PHT also improved the hypomotilities produced by cerebral ischemia rats.

In conclusion, the water or ethanol extracts of PHT improved the impairment of passive avoidance learning produced by cerebral ischemia rats.

Key words : Tang-Kuei-Pu-Hsueh-Tangs (PHT) ; Cerebral ischemia rats ; Passive avoidance.