

· 基础研究 ·

β -细辛醚对痴呆小鼠皮质神经元细胞内钙离子浓度的影响*

江 湧¹ 何玉萍¹ 邹衍衍¹ 方永奇¹

摘要 目的:探讨 β -细辛醚对三氯化铝引起的痴呆小鼠脑皮质神经元凋亡的保护机制。**方法:**选用 NIH 小鼠, 正常培养 3 个月, 随机分为正常对照组, 模型对照组, β -细辛醚 1.06mg/100g/d 组。除正常对照组给予生理盐水外, 其他各组均灌胃三氯化铝, 并分别给予生理盐水或 β -细辛醚, 计 6 个月。用流式细胞术测量脑皮质神经元内钙离子浓度及 DNA 周期分析, 观察细胞的凋亡率。**结果:**1.06mg/100g/d β -细辛醚组神经功能缺损较非治疗组明显减轻, 相应的 β -细辛醚治疗组细胞内钙离子浓度增高受抑、细胞凋亡减少。**结论:**1.06mg/100g/d β -细辛醚可以减轻脑组织神经元痴呆损伤和抑制神经元凋亡; 抑制受损神经元细胞内钙离子浓度增高可能是其保护作用的机制之一。

关键词 β -细辛醚; 老年性痴呆; DNA 周期; 钙离子浓度

中图分类号: R749.1, R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-06-0490-02

Effects of β -asarone on the variability of Calcium levels in mice cortical neurons/JIANG Yong, HE Yuping, ZOU Yanyan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(6):490-491

Abstract Objective: To investigate the protective effect of β -asarone on calcium level and DNA content of cerebral cortex cell apoptosis induced by $AlCl_3$ in mice. **Method:** Thirty NIH mice were randomized into normal group, model group, β -asarone treatment group (1.06mg/100g/d). $AlCl_3$ injured mice was used as model of Alzheimer's disease. After three months the concentration of intracellular Ca^{2+} and DNA cycle analysis were detected. **Result:** The concentration of intracellular Ca^{2+} in model group was increased significantly compared with normal group, while decreased remarkably between β -asarone treatment group and model group. **Conclusion:** β -asarone has a significant relieving effect on the lesion of learning and memory in AD model mice by decrease the intracellular Ca^{2+} concentration and DNA apoptosis rate.

Author's address The Central Lab of First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guang Zhou, 510405

Key words β -asarone; Alzheimer's disease; DNA cycle; Calcium concentration

石菖蒲是芳香开窍药, 临床应用于治疗老年性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 等病症。石菖蒲挥发油是对中枢神经系统有保护作用的有效成份, 其中 β -细辛醚 (63.2%—81.2%) 是挥发油的主要成分^[1]。哈佛医学院对其药理作用的研究曾做了 β -淀粉样蛋白毒性损伤 PC12 细胞的实验, 结果表明, β -细辛醚对通过调节 PC12 细胞内钙离子浓度起到对 PC12 细胞的保护作用^[2]。 β -细辛醚对于中枢神经系统还具有多种药理作用, 如保护神经细胞、镇静、抗惊厥。本实验室在对石菖蒲系列研究过程中, 已采用气相色谱-质谱联用法证实 β -细辛醚等 4 种成分能透过血脑屏障进入脑组织^[3], 对作用于痴呆模型的半数致死剂量及有效剂量已进行了筛选, 其作用于痴呆小鼠后, 明显改变了小鼠的学习记忆能力和调节了部分自由基, 对脑组织多个靶基因起作用。^[4] Ca^{2+} 是细胞信号传导途径中的第二信使, 中药进入人体发挥作用的大多是通过信号转导来调节放大信号来最终诱导一系列生理变化的, 对于在体实验研究 β -细辛

醚作用于痴呆小鼠后, 使 Ca^{2+} 离子发生了哪些变化, 目前尚无研究报道。脑痴呆损伤与神经无凋亡相关, 为此, 本研究探讨小鼠痴呆性损伤时 β -细辛醚对皮质神经元细胞内 Ca^{2+} 离子浓度及神经元凋亡的影响及机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

Fluo3 钙荧光探针为 Biorad 公司产品, 碘化丙啶 PI 为 Beckman Coulter 公司产品, 其他试剂均为 Sigma 公司分析纯产品。贝克曼库尔特公司产 Altra Epics 型流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备: 选用 NIH 小鼠, 雌雄

* 基金项目: 广东省自然科学基金 (编号 04300378); 广东省中医药管理局基金 (编号 2040007)

1 广州中医药大学第一附属医院实验中心, 广州市机场路 16 号, 510405

作者简介: 江湧, 女, 博士

收稿日期: 2006-09-26

不限(由广东省实验动物中心提供), 体重 18—20g, 分笼自由饲养, 将 AlCl_3 配制成浓度为 8g/100ml 的溶液, 每日上午以 $800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃给药, 共 3 个月, 体重达到 48—50g, 痴呆模型的制造参照李文彬、吴子明的方法^[5-6], 略作修改。

1.2.2 小鼠分组及用药: 随机分组, 每组 10 只, 共分 3 组: 正常对照组(对照组), 痴呆模型组(模型组), β -细辛醚组($1.06\text{mg}/100\text{g}/\text{d}$)。正常对照组于每日上午, 灌服 0.5ml 灭菌生理盐水, 其他时间自然饮食; 其余组每日上午灌服 0.5ml AlCl_3 溶液, 3 周后, 正常对照组于每日上午、下午各灌服 0.5ml 灭菌生理盐水, 其他时间自然饮食; 模型组每日上午灌服 0.5ml AlCl_3 溶液, 下午灌服 0.5ml 生理盐水; β -细辛醚各剂量组每日上午灌服 0.5ml AlCl_3 溶液, 下午灌服 0.5ml β -细辛醚溶液, 持续累计 3 个月。

1.2.3 脑皮质神经元细胞悬液制备: 取小鼠额顶背外侧皮质和基底核约 0.5g, 剪去包膜, 用冰冻生理盐水洗净后, 剪碎, 用吸管轻轻吹打制成单细胞悬液, 备用。

1.2.4 DNA 周期分析: 将单细胞悬液用 100 目筛网过滤, 1000r/min 离心, PBS 洗涤 2 次, 置 70% 冰乙醇固定, 4℃ 冰箱放置 24h。检测前去固定液, 并用 PBS 洗涤 2 次后, 用 300 目尼龙网过滤, 加入 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 的碘化丙锭(PI)染色液, 避光孵育 30min, 上流式细胞仪进行检测, EXPO32 软件采集 30000 个细胞, 应用 MultiCycle 分析软件进行 DNA 周期分析。

1.2.5 细胞内钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)检测: 取单细胞悬液, 加入 flour-3/AM, 终浓度为 $5\mu\text{mol}/\text{ml}$, 37℃ 育 40min 后, 再用无钙 PBS 反复洗涤 3 次, 用无钙 PBS 悬浮上机。运用 EXPO32 软件采集 20000 个细胞, 分析钙离子荧光强度。

1.3 统计学分析

用 SPSS11.0 统计软件进行数据处理分析, 实验数据以均数±标准差表示, 组间差异用 t 检验, 显著性差异为 $P<0.05$, 极显著性差异为 $P<0.01$ 。

2 结果

2.1 对小鼠神经元胞内 Ca^{2+} 荧光强度的影响

见表 1, 正常对照组 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 最低, 脑痴呆模型组的最高, $1.06\text{mg}/100\text{g}/\text{d}$ β -细辛醚组给药组的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 较痴呆模型组下降约 40%。

2.2 β -细辛醚对小鼠神经元凋亡的影响

从表 1 可以看出模型组小鼠神经元凋亡明显增加, 差异有显著性($P<0.01$), 给药后缺血侧神经元凋亡率明显下降。

表 1 小鼠神经元细胞内钙离子浓度与 DNA 周期分析($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Ca^{2+} (道数)	细胞 DNA 周期(%)
正常对照组	10	19.375 ± 5.55	1.12 ± 0.16
模型对照组	10	$50.54\pm 9.19^{\text{①}}$	$3.22\pm 0.62^{\text{①}}$
β -细辛醚组	10	$22.86\pm 3.46^{\text{②}}$	$1.4\pm 0.12^{\text{②}}$

①与正常对照组相比, $P<0.01$; ②与模型对照组相比, $P<0.01$

3 讨论

细胞凋亡与中枢神经系统的衰老和 AD 的发生有关。研究认为, 神经细胞内 Ca^{2+} 通道破坏, 影响细胞内外 Ca^{2+} 的交换, 造成细胞内钙离子浓度增高, 引起神经元细胞去极化, 影响了细胞的正常代谢, 是造成神经元损伤、凋亡、死亡的关键因素之一。神经痴呆损伤的形成和发展是一个 DNA 凋亡的过程, 如果能阻止凋亡的发展, 就有可能减轻脑损伤程度。中医认为老年性痴呆的病因, 不外乎“虚、瘀、痰”三方面为害, 阴血虚少则见脑失所养, 痰阻、血瘀则脑窍不通, 精髓阴血不能上荣于脑^[7]。中药在治疗 AD 方面具有预防和治疗的三重作用。从钙离子通道治疗的角度来看, 钙拮抗剂能预防 AD, 已作为 AD 治疗的辅助药物, 寻找钙拮抗作用的药物已取得一定进展, 单体研究中, 双苄异喹啉类如粉防己碱、姜黄素和川芎嗪等对钙通道有阻滞作用^[8-9]。本试验结果显示, β -细辛醚对 AlCl_3 诱导的小鼠皮质神经元凋亡具有明显的保护作用, 可以阻滞胞内钙积累, 减少神经细胞凋亡, 但其调控受损神经细胞内钙离子浓度的详尽机制还不清楚, 有待进一步探讨, 有理由推测 β -细辛醚在痴呆神经元损伤中具有保护作用, 深入研究 β -细辛醚的作用机制具有一定的临床意义。

参考文献

- [1] 魏刚, 方永奇, 刘东辉. GC-MS 建立石菖蒲挥发油特征指纹图谱方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(8):764—768.
- [2] Yoshifumi Irie, Wing Ming Keung. R hizoma acori graminei and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid- β peptide[J]. Brain Research, 2003, 963:282.
- [3] 方永奇, 魏刚, 柯雪红. GC-MS 分析石菖蒲挥发油透大鼠血脑屏障的成分研究[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(3):181.
- [4] 方永奇, 李翎, 吴启端. β -细辛醚对小鼠脑组织基因表达谱的影响[J]. 中药材, 2003, 26 (9):650—652.
- [5] 李文彬, 张炳烈, 马向晨, 等. 吡乙酰胺对三氯化铝中毒大白鼠回避反应受损的对抗作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1988, 2(2):132.
- [6] 吴子明, 彭建龙. 益智灵冲剂对实验性痴呆病理模型的作用[J]. 中国中西医结合杂志, 1992, 12(10):622.
- [7] 杨济发. 老年性痴呆的中医论治 [J]. 中医药研究, 2001, 17(2): 58.
- [8] 朱丽霞, 董志, 廖红, 等. 粉防己碱对大鼠拟痴呆模型脑保护作用研究[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25:78—80.
- [9] 张书刚, 胡梅, 周其冈, 等. 姜黄素对血管性痴呆大鼠学习记忆的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2006, (04):246—250.