

# 参麻益智胶囊对大鼠海马神经细胞内游离钙离子动态变化的影响

罗增刚<sup>1\*</sup>, 周文泉<sup>2</sup>, 李瑞午<sup>3</sup>, 张金玲<sup>3</sup>

(1. 中国中医科学院, 北京 100700;

2. 中国中医科学院西苑医院全国中医老年病医疗中心, 北京 100091;

3. 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 观察大鼠海马神经细胞在正常状态以及药物干预作用下游离钙离子的分布变化, 从而探讨参麻益智胶囊改善学习记忆的作用机制。方法: 采用培养 5~7 天细胞之间突触连接成网状的大鼠海马神经细胞, 给予参麻益智胶囊含药血清, 并与吡拉西坦组对照, 通过激光共聚焦显微镜观察大鼠海马神经细胞内游离钙离子动态变化。结果: 参麻益智胶囊可以降低神经细胞内游离钙离子的含量。结论: 参麻益智胶囊可以改善实验动物的记忆和认知功能, 其机理与抑制神经细胞钙离子内流、拮抗钙超载有关。

**[关键词]** 参麻益智胶囊; 学习记忆; 钙离子; 激光共聚焦显微镜

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)03-0069-04

随着全社会老龄人口的增多, 老年期痴呆已经成为老年人的常见病、多发病。我们的以往研究已经证实, 参麻益智胶囊治疗痴呆患者疗效肯定<sup>[1]</sup>, 并可以调节神经递质含量<sup>[2]</sup>。本研究拟从实验动物神经细胞钙离子分布变化方面, 进一步探讨参麻益智胶囊改善学习记忆功能的作用机制。

## 1 实验材料

**1.1 细胞** 培养到 5~7 d 细胞之间突触连接成网状的大鼠海马神经细胞。

**1.2 试剂和药物** 参麻益智胶囊, 由中国中医科学院西苑医院药厂提供, 批号: 20031101, 每 g 药粉相当于含生药 1.05 g。吡拉西坦片, 0.4 g/片, 由烟台鲁银药业有限公司生产, 国药准字 H37020060, 批号: 0306042。将上述药物制备成大鼠含药血清, 方法同前文献。Fluo-3/AM, 购自美国 Molecular Probes 公司。

**1.3 仪器** 35 mm 培养皿(北京鼎国生物技术发展中心), ACAS575 型激光共聚焦显微镜(美国), Computer Image Recorder (CIR-340, 美国), Olympus C35AD-2 WINDING(VANOX-207272, 日本)。

## 2 方法

**2.1 荧光染色和激光共聚焦显微镜观察** 取培养好的神经细胞用 PBS 冲洗后, 以 (7~8)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Fluo-3 染色(标记游离钙离子)后, 放回  $\text{CO}_2$  温箱孵育 40 min 后, PBS 冲洗两次去掉浮色, 放入测量小池中, 上机检测。用激光预扫描的(488 nm/530 nm, 150 mw, 7% 滤片)同时调节仪器参数, 使荧光图像清晰、层次明显, 并选择某一平面以一定的扫描时间间隔长时间的连续快速扫描, 扫描的时间间隔是决定所记录到的动态变化真实性的重要参数(实验中可根据实验对象的动态变化时相确定)。激光共聚焦显微镜动态观察的参数为 Pinhole 1600, PMT35, 激光电压为 300 V, 每隔 20 s 测一帧。

选取生长状态好的神经细胞观察, 先观测 4~5 帧做为正常前对照, 第 5 帧加入含药血清药物(参麻益智胶囊、吡拉西坦含药血清以及正常对照血清) 50  $\mu\text{L}$  再继续观察 40~50 帧。分别选取细胞体和轴突等部位观察其细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  变化。用动态图像分析软件定量分析加药前后细胞内整个区域或局部区域游离钙离子的动态变化。

**2.2 统计方法** 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  动态变化, 按其上升速率、持续时间等动力学特征归纳总结分类。细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化, 用 Fluo-3 荧光强度的变化表示。

**[收稿日期]** 2007-02-13

**[通讯作者]** \* 罗增刚, Tel: (010) 64014411-2268; E-mail:

luozenggang@sina.com

### 3 结果

**3.1 神经细胞内 Fluor-3 荧光强度分布** 神经细胞经钙离子特异性荧光探针 Fluor-3 ( $7\sim 8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 染色 45 min 后, 在细胞中部焦平面, 不包含细胞核的区域荧光比贯通细胞核的区域强, 在细胞核周围亮度最强, Fluor-3 荧光值最高, 胞浆内荧光强度由内向外逐渐减弱。结果表明, 细胞内游离钙离子的分布并不象溶液中的均匀分布, 在细胞内不同区域其浓度差异很大, 且  $\text{Ca}^{2+}$  主要分布在细胞核周区(如图 1 所示)。而轴突内的钙离子含量很低, 荧光值几乎为零, 对药物无敏感性(如图 2 所示)。

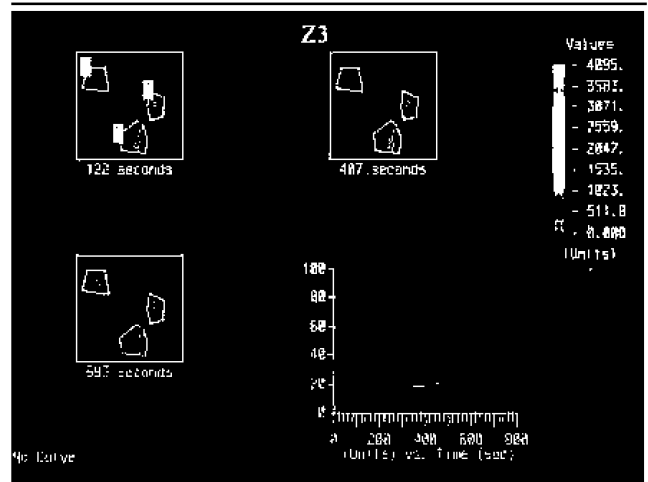


图 3 正常组

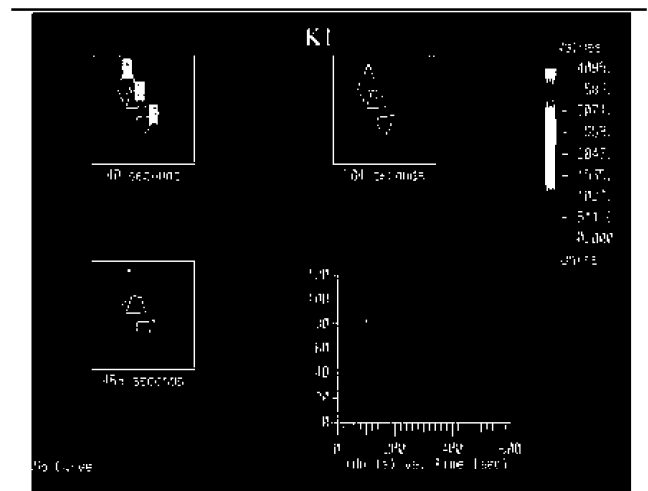


图 4 空白血清组

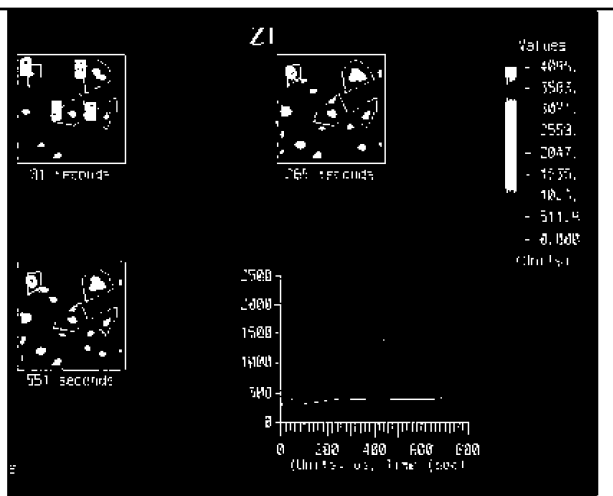


图 1 细胞核周围

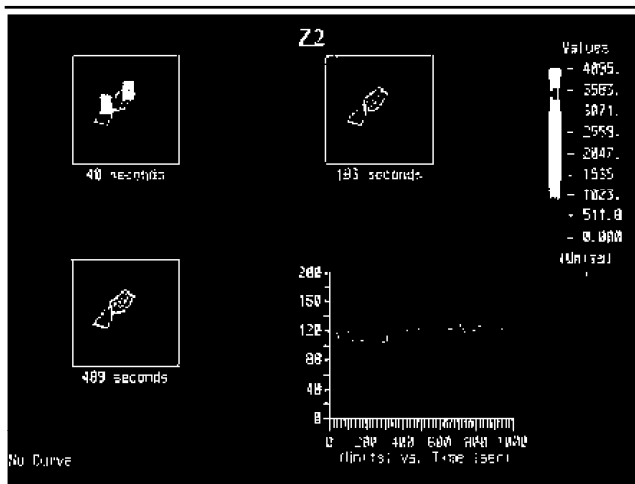


图 2 轴突

**3.2 各组神经细胞内 Fluor-3 荧光强度图形随时间的变化特征** (1) 正常组正常神经细胞内游离钙离子经 Fluor-3 染色后, 其荧光值在观察 13 min 内呈现相对稳定的曲线变化形式-平稳型, 提示正常神经细胞游离钙离子内流与外流处在一个动态的环境之中(如图 3 所示)。

(2) 空白血清组 快速上升型: 经空白鼠血清作用后, 细胞内游离钙离子荧光值迅速上升, 升高幅度是原来的 3~ 4 倍, 并在较长时间内持续维持在一个较高的水平(如图 4 所示)。

(3) 阳性对照组 ①稳定增高型: 经吡拉西坦血清作用后, 细胞内游离钙离子荧光值迅速上升, 升高幅度是原来的 2~ 3 倍, 在 60 s 后小幅下降, 下降范围在 50 s 以内, 之后维持在相对稳定较起始点增高的水平(如图 5 所示)。②经吡拉西坦血清作用后, 细胞内游离钙离子荧光值小幅度迅速上升, 之后迅速下降, 在 60 s 后回到起始点, 并维持在缓慢下降而又相对稳定的水平(如图 6 所示)。

(4) 参麻益智胶囊组 按动态变化过程的特征表现为抛物线下降型以及振荡下降型。①抛物线下降型: 经参麻益智胶囊血清作用后, 细胞内游离钙离子荧光值一直持续缓慢上升, 在作用后 300 s 到达最高值, 上升幅度为 50~ 100, 之后呈现缓慢的下降趋

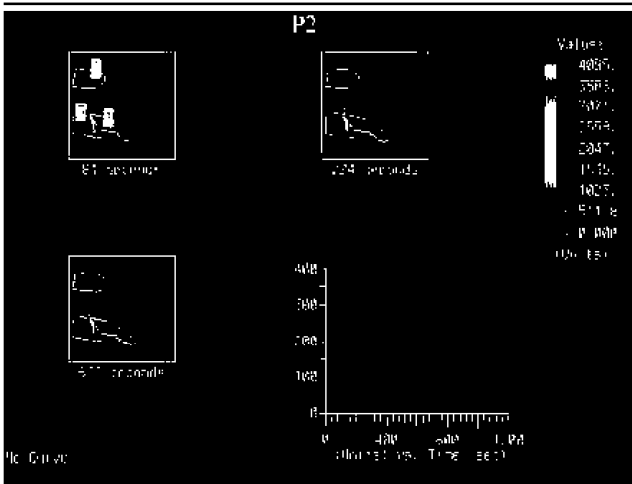


图 5 吡拉西坦血清 ①

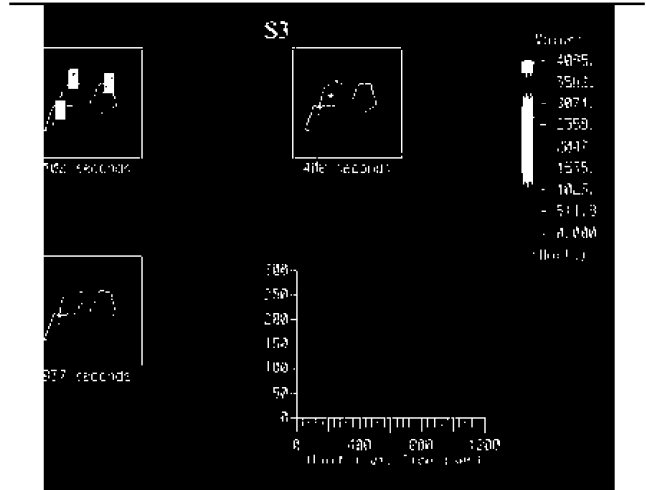


图 7 参麻益智胶囊 ①

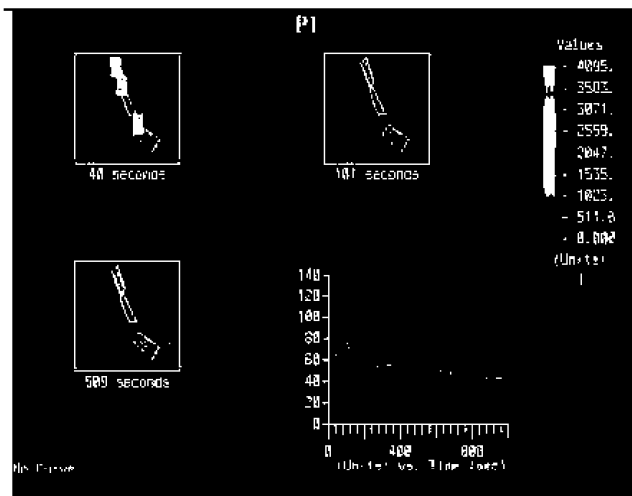


图 6 吡拉西坦血清 ②

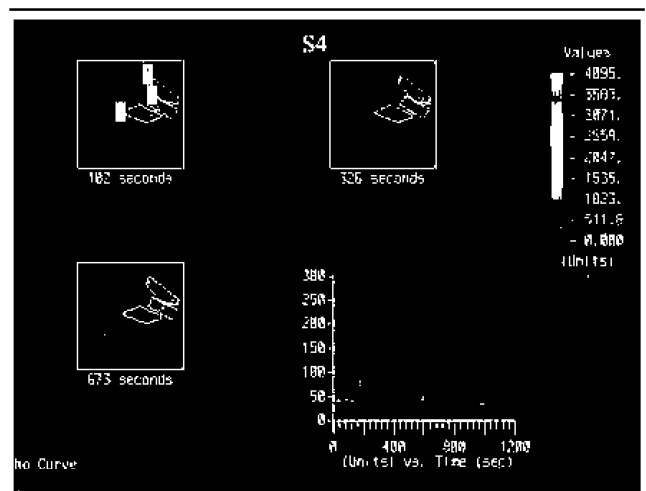


图 8 参麻益智胶囊 ②

势, 大约在 400 s 时回到起始点。此类变化的细胞中, 荧光强度的增强并不一致, 有些细胞荧光强度明显增强, 而有些细胞只轻度增强(如图 7 所示)。② 振荡下降型: 参麻益智胶囊血清作用后, 神经细胞内 Fluor-3 的荧光度在 10~20 s 之内快速增强, 达到最高值后又快速减弱, 达到参麻益智胶囊作用以前平均水平, 其尖峰宽度为 50~200 s 不等, 之后 Fluor-3 的荧光强度又快速增强、减弱, 在所观察的实验时间内振荡 2~4 次, 其振幅每次有所递减(如图 8 所示)。

#### 4 讨论

海马区是大脑边缘系统一个非常重要的结构区域, 与学习记忆、情感行为及神经内分泌等高级神经活动密切相关。1973 年 Bliss 等在家兔海马区应用高频刺激引起群体峰电位及突触后膜电位呈现长时间持续增强, 并将这一现象称为长时程增强效应(Long-term potentiation, LTP), 其与学习、记忆功能密切

相关, 是学习和记忆储存的功能单位, LTP 的诱发及维持, 尤其在诱发阶段  $Ca^{2+}$  作为信使, 起到了非常重要的作用。

近年来, 脑细胞钙代谢失衡与老化的关系引起了广泛的关注。随着年龄的增长, 人体逐渐出现钙自体平衡失调, 细胞内钙浓度过高或钙超载。当脑缺血缺氧性损伤时, 氧自由基的大量产生导致  $Ca^{2+}$  浓度异常升高, 出现钙超载。若钙超载发生在神经细胞, 干扰 LTP, 可引起神经可塑性及认知功能障碍。研究发现, 大鼠脑缺血再灌注 5 min 后, 在皮层、海马出现明显钙积累, 随着再灌时间延长到 60 min 钙积累加重。人参皂甙  $Rb_1$ 、三七皂甙  $Rb_1$  对整体或单体细胞内  $Ca^{2+}$  有明显的下调作用, 降低了海马钙积累引起的神经毒性<sup>[3-5]</sup>。唐民科等<sup>[6]</sup>通过结扎大鼠大脑中动脉突触体, 使  $Ca^{2+}$  增加,  $Na^+$ 、 $K^+$ -ATPase、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ -ATPase 活性明显下降。益脑冲剂可使其活性增强, 减轻  $Ca^{2+}$  超载。

我们既往的实验研究证实, 参麻益智胶囊可增强 LTP 效应。本次实验结果表明, 正常神经细胞游离钙离子内、外流处在一个动态的环境之中, 加入空白血清后, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  含量明显上升, 而吡拉西坦与参麻益智胶囊血清均可拮抗  $\text{Ca}^{2+}$  含量上升作用, 但吡拉西坦血清组下降较缓慢, 且幅度较小, 表明参麻益智胶囊血清在降低神经细胞内游离钙离子的含量方面优于吡拉西坦血清组。考虑其机理, 我们认为其一可能是该药通过抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 适度调节了乙酰胆碱对突触后受体的兴奋作用, 使 G 蛋白偶联钙通道及钙泵的活化, 改善钙通道与钙泵的功能, 从而阻止过多的  $\text{Ca}^{2+}$  流入细胞内, 同时也促进  $\text{Ca}^{2+}$  外排; 调节 NO 功能, 改善氧自由基代谢, 抑制钙超载。以上两种药理作用均可降低海马神经细胞游离  $\text{Ca}^{2+}$ , 拮抗钙超载, 对神经细胞起保护作用, 进而增强 LTP 效应, 增加实验动物的学习记忆能力。

## [参考文献]

- [1] 罗增刚, 周文泉, 高 普, 等. 参麻益智胶囊治疗老年血管性痴呆的临床研究[J]. 中医杂志, 2001, 42(8): 470-473.
- [2] 罗增刚, 周文泉, 段有金. 参麻益智胶囊对血管性痴呆模型大鼠神经递质含量的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1(2): 84-85.
- [3] 张英鸽, 刘天培. 人参总皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8(1): 7-12.
- [4] 李麟仙, 王子灿, 李盈盈. 三七皂甙 D1 对家兔急性脑缺血的保护作用[J]. 中国药理学通报, 1991, 7(5): 350-353.
- [5] 唐民科, 徐秋萍. 益脑冲剂抗实验性脑缺血损伤的机制研究[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(2): 29-31.
- [6] 蒋学英, 张均田, 石成璋. 人参皂甙 Rb1 降低细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  作用的机制[J]. 药学报, 1996, 31(5): 321-325.