

释放增多是造成 DND 现象的一个重要原因<sup>[11]</sup>。随着缺血时间的延长,可能有诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的激活,从而产生大量具有神经毒性作用的 NO,在海马迟发性神经元凋亡及 VD 的形成中发挥了一定作用。

已有研究表明,GP 对大鼠全脑缺血再灌注损伤及家兔急性不完全性脑缺血具有保护作用,认为 GP 对缺血脑组织的保护作用不仅与其抑制自由基的产生和脂质过氧化有关,而且与其对缺血脑组织的神经细胞膜及微血管的稳定性的保护作用相关<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,VD 组大鼠在饲养 4 周后海马内 nNOS 神经元表达明显减少,这可能与缺血早期 NOS 大量表达产生大量具有神经毒性作用的 NO 有关。而 GP 组海马内 nNOS 神经元表达与正常对照组相似,表明 GP 可保护海马内 nNOS 阳性神经元免受大量的 NO 所导致的 DND。GP 的这一保护作用可能与其抑制由 NO 产生大量 $\cdot\text{OH}$ 及 $\text{NO}_2\cdot$ 自由基有关。

脑缺血再灌注损伤不完全是一种被动的神经元坏死的过程,尚伴有细胞凋亡。一般认为海马 CA<sub>1</sub>区、CA<sub>3</sub>区为脑缺血再灌注的易损区,脑缺血再灌注可导致细胞浆内钙离子增多,激活钙镁依赖的核酸内切酶,将 DNA 切割成大小不一的寡核苷酸片段,即形成 DNA 梯(DNA laddering),是神经元凋亡的重要特征之一。本研究结果显示脑缺血再灌注模型组海马 CA<sub>1</sub>区、CA<sub>3</sub>区 DNA 和 RNA 荧光反应强度明显减低,即 DNA 及 RNA 含量降低。GP 对全脑缺血再灌注大鼠海马具有保护作用,减少了缺血再灌注对海马 CA<sub>1</sub>区、CA<sub>3</sub>区 DNA 和 RNA 的影

响。DNA 和 RNA 与蛋白质的合成密切相关,此作用的机制及其与 GP 抗衰老、改善学习记忆及对 VD 保护作用的关系,有待于进一步研究。

## References

- [1] Zhang J T. Pathogenesis and therapeutic strategies of senior dementia [J]. *Acta Pharma Sin* (药学报), 2000, 35: 635-640.
- [2] Xu D Y, You G X, Miao J T, et al. An experimental study of the nitric oxide mechanism in acute cerebral ischemia and during the process of vascular dementia formation [J]. *Chin J Geriatr* (中华老年医学杂志), 1999, 18: 240-243.
- [3] Kato H, Kogure K, Liu Y, et al. Induction NADPH-diaphorase activity in the hippocampus in rat model of cerebral ischemia and ischemia tolerance [J]. *Brain Res*, 1994, 652: 71-75.
- [4] Jiang B. *Apoptosis Basis and Clinic* (细胞凋亡基础与临床) [M]. Beijing: People Military Surgeon Publishing House, 1999.
- [5] Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule [J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63: 175-178.
- [6] Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide: a novel neuronal messenger [J]. *Neuron*, 1992, 8: 3-5.
- [7] Vincent S R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central system [J]. *Prog Neurobiol*, 1994, 42: 129-131.
- [8] Benzing W C, Mufson E J. Increase number of NADPH-diaphorase positive neurons within the substantia innominata in Alzheimer's disease [J]. *Brain Res*, 1995, 670: 351-353.
- [9] Beckman JS, Beckman T W, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1620-1624.
- [10] Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia [J]. *Brain Res*, 1982, 239: 57-69.
- [11] Xie M, Gu Y M, Yao Z B. Changes of NADPH-diaphorase activity in rat hippocampus following transient cerebral ischemia [J]. *Chin J Neuroanat* (神经解剖学杂志), 1998, 14: 8-12.
- [12] Wang Z Y, Qiu P L. Protective effect of gypenosides on acute incomplete cerebral ischemia in rabbits [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1992, 6: 204-206.

## 槲皮素对阿尔茨海默病大鼠学习记忆影响及与海马细胞凋亡关系的研究

李永金<sup>1</sup>, 顾振纶<sup>2</sup>, 陈月芳<sup>3</sup>, 周文轩<sup>4</sup>, 郭次仪<sup>4\*</sup>

(1. 江苏大学医学院 药理教研室, 江苏 镇江 212001; 2. 苏州大学医学院 药理教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 3. 江苏大学医学院 机能实验室, 江苏 镇江 212001; 4. 香港保健协会, 香港)

**摘要:**目的 观察槲皮素 (Que) 对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 模型大鼠学习记忆影响并探讨其与海马细胞凋亡的关系。方法 用立体定位技术对海马 CA<sub>1</sub>区微量注射喹啉酸 (QA) 造成 AD 模型; Y 形迷宫检测

\* 收稿日期: 2002-09-27

作者简介: 李永金 (1968-), 男, 江苏仪征人, 药理学硕士, 讲师, 从事药理学教学科研工作, 中国药理学会会员, 江苏省药理学会常务理事, 主要研究方向为神经药理学。

Tel (0511) 5038157 E-mail lyj3600@163.com

大鼠学习记忆水平;电子显微镜、流式细胞仪检测海马细胞凋亡。结果 Que 可明显提高 QA 所致痴呆大鼠学习记忆水平,显著降低海马细胞凋亡率。结论 Que 对 AD 大鼠的保护作用与降低海马细胞凋亡率有关。

关键词:阿尔茨海默病;细胞凋亡;槲皮素;学习记忆

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)07-0632-04

## Study on relationship between effects of quercetin on learning and memory in Alzheimer's disease rats and apoptosis of hippocampus cells

LI Yong-jin<sup>1</sup>, GU Zhen-lun<sup>2</sup>, CHEN Yue-fang<sup>3</sup>, ZHOU Wen-xuan<sup>4</sup>, GUO Gi-yi<sup>4</sup>

(1. Department of Pharmacology, Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China; 2. Department of Pharmacology, Medical School of Suzhou University, Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Suzhou 215007, China; 3. Functional Laboratory, Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China; 4. The Hong Kong Association for Health Care, Hong Kong, China)

**Abstract Object** To observe the relationship between effects of quercetin (Que) on learning and memory in Alzheimer's disease (AD) rats and apoptosis of the hippocampus cells. **Methods** The AD pathological model was made by hippocampal CA<sub>1</sub> lesions due to stereotaxic mini-injection of quinolinic acid (QA), the rat's learning and memory were observed by Y-maze; the apoptosis of hippocampal cells were detected by using flow cytometry and electronic microscope. **Results** Que was shown to improve learning and memory deficiency in rats with bilateral hippocampal lesions induced by QA, to decrease apoptosis rate in hippocampal cells significantly. **Conclusion** These results suggested that Que for the protective effects of AD rats may be related to its ability to decrease apoptosis rate of hippocampal cells.

**Key words** Alzheimer's disease (AD); apoptosis; quercetin (Que); learning and memory

槲皮素 (quercetin, Que) 是黄酮苷类化合物,有较强的抗氧化、降血压、抗辐射等药理作用<sup>[1]</sup>。最近研究表明黄酮苷类化合物可以拮抗兴奋性氨基酸介导的神经毒性,但关于 Que 对阿尔茨海默病 (Alzheimer disease AD) 的影响未见报道。AD 的发病机制有多种学说,目前认为其神经元最终死亡形式为细胞凋亡<sup>[2,3]</sup>。本实验拟从整体水平观察 Que 对 AD 模型大鼠学习记忆功能的改善作用,并从细胞凋亡方面探讨其机制。基于 Maragos 提出的 AD-Glu 能假说<sup>[4]</sup>,在富含谷氨酸 (Glu) 能神经通路,并与学习记忆密切相关的海马 CA<sub>1</sub>区注入喹啉酸 (quinolinic Acid, QA),通过其神经毒性选择性破坏 Glu 能神经元,制备成 Glu 损毁的 AD 动物模型。

### 1 材料

1.1 动物:雄性 Wistar 大鼠,体重 (280±5) g,由苏州医学院动物中心提供

1.2 试剂:槲皮素 (Que),中国预防医学科学院劳卫所产品,批号 911015;喹啉酸 (QA),Sigma 公司产品;盐酸氯胺酮 (ketamine, Ket) 注射液为上海新冈制药厂产品,批号 951020;其余为国产分析纯。

1.3 仪器:江湾 I 型脑立体定位仪,第二军医大学产品;MG-2 迷宫,江苏省沙洲县三兴声电公司产品;流式细胞仪 EPICS XL, Coulter, USA; SCR 型冰冻切片机,浙江金华无线电厂产品。

### 2 方法

2.1 AD 动物模型制备<sup>[5]</sup>:实验动物用 3% 戊巴比妥 1 mL/kg ip 麻醉,固定在脑立体定位仪上,颅顶正中切开,参照大鼠脑立体定位图谱 (AP-3.3 mm, Dv 2.0 mm),对双侧海马 CA<sub>1</sub>区立体定位后,钻开颅骨,用 10 μL 微量注射器垂直进针,将用 0.01 mol/L (pH 7.4) PBS 缓冲液溶解的 QA 2 μL (含 150 nmol QA) 缓慢注入海马 CA<sub>1</sub>区,假损伤组注入 0.01 mol/L (pH 7.4) PBS 2 μL。每侧注入时间为 5 min,留针 5 min,起针局部消毒后缝合皮肤。连续 3 d 用青霉素防止感染。

2.2 分组与给药:将大鼠随机分假损伤组、模型组、Que 高、中、低 (200, 100, 50 mg/kg) 3 个剂量组及阳性药氯胺酮组 [8 mg/(kg·d)]。术前 5 天 Que 组开始 ig 给药,假损伤组及模型组 ig 蒸馏水,氯胺酮组 ip 给药,共 20 d,术前 15 min 加给药一次。

2.3 海马细胞凋亡的测定<sup>[6]</sup>:分别于术后 12 h, 20 d 取 Que 中剂量组、假损伤组、模型组及氯胺酮组各 4 只大鼠,断头取脑,迅速剥离海马置于冷 PBS 液中,机械法制成单细胞悬液,用 20% 冷乙醇固定,4℃ 保存过夜。染色前用 PBS 液离心沉淀去除固定液,加入 200 μL RNase A 37℃ 水浴 30 min,再加入 300 μL 染色液混匀,置 4℃ 避光 30 min,用流式细胞仪检测。

2.4 透射电子显微镜形态学观察:海马局部注射 QA 后 12 h 速取假损伤、Que (100 mg/kg)、模型及

氯胺酮各组大鼠海马 CA1区组织,经 3% 戊二醛固定,1% 锇酸固定 1 h,丙酮梯度脱水,树脂包埋,醋酸铀 枸橼酸铅染色,透射电镜下观察细胞形态并摄片。

2.5 Y 迷宫检测大鼠学习记忆水平<sup>[7]</sup>: Y 迷宫分 3 等分辐射式反射箱,通过刺激控制仪电击动物足部,电击电压为 70 V,延迟 2 s,反射箱 3 个臂的顶端有信号灯,实验时根据动物所在位置随机改变安全信号灯方位,此时有灯光信号的一个臂不通电,另外两个臂通电,凡大鼠受电击能从起步区逃至有灯光信号的安全区为正确反应,否则为错误反应。每次训练后休息 30 s,每天训练 20 次,共训练 5 d,记录每天错误次数。此值越低,说明记忆力越好。术后 15 d 给

表 1 槲皮素对 QA 损伤海马致 AD 大鼠的学习记忆影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of Que on learning and memory in AD rats induced by hippocampal lesions due to QA ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂 量 /(mg·kg <sup>-1</sup> )	错误次数 次				
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假损伤	-	10.30± 1.70	6.30± 1.30	5.00± 1.22	2.50± 1.70	2.00± 0.80
模型	-	12.20± 2.30	10.60± 0.60 <sup>△△</sup>	9.80± 2.38 <sup>△△</sup>	9.40± 3.70 <sup>△</sup>	6.00± 1.70 <sup>△△</sup>
Que	50	9.20± 0.50 <sup>*</sup>	6.60± 1.50 <sup>*</sup>	5.40± 2.20 <sup>*</sup>	3.80± 2.00 <sup>*</sup>	2.60± 1.30 <sup>*</sup>
	100	9.00± 0.10 <sup>*</sup>	6.50± 0.60 <sup>*</sup>	5.30± 0.50 <sup>*</sup>	3.30± 1.30 <sup>*</sup>	1.80± 1.50 <sup>*</sup>
	200	10.00± 2.10	7.20± 1.30 <sup>*</sup>	4.60± 2.41 <sup>*</sup>	4.40± 2.40 <sup>*</sup>	3.40± 2.60 <sup>*</sup>
氯胺酮	8	10.50± 3.70	7.30± 1.70 <sup>*</sup>	5.30± 2.80	4.25± 2.36	3.50± 0.87

与模型组比较: \* P < 0.05 \*\* P < 0.01; 与假损伤组比较: △ P < 0.05 △△ P < 0.01

\* P < 0.05 \*\* P < 0.01 vs model group △ P < 0.05 △△ P < 0.01 vs sham-lesion group

响: 流式细胞仪检测,在 DNA 直方图上出现二倍体峰减少, G<sub>1</sub> 峰左侧出现亚二倍体细胞峰群,即 A<sub>p</sub> 峰。实验结果显示,150 nmol QA 注射海马 CA1 区 12 h 后,即有 A<sub>p</sub> 峰出现,模型组海马细胞凋亡率为 11.1% ± 1.3%, 20 d 后模型组凋亡率达 21.4% ± 1.8%,与假损伤组相比差异非常显著 (P < 0.01); 而 Que 组,氯胺酮组大鼠海马细胞凋亡率明显低于模型组 (P < 0.01),见表 2

表 2 Que 对 QA 致 AD 大鼠海马细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Que on apoptosis of hippocampal cells in AD rats induced by QA ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂 量 /(mg·kg <sup>-1</sup> )	海马细胞凋亡率 %	
		12 h	20 d
假损伤	-	3.9± 1.0	3.4± 0.4
模型	-	11.1± 1.3 <sup>△△</sup>	21.4± 1.8 <sup>△△</sup>
Que	100	4.2± 0.4 <sup>*</sup>	7.3± 1.4 <sup>*</sup>
氯胺酮	8	5.9± 0.4 <sup>*</sup>	9.5± 0.3 <sup>*</sup>

与模型组比较: \*\* P < 0.01; 与假损伤组比较: △△ P < 0.01

\*\* P < 0.01 vs model group △△ P < 0.01 vs sham-lesion group

3.3 Que 对 QA 致 AD 大鼠海马细胞透射电镜观察: 模型组海马细胞有典型的坏死神经改变,细胞胀大,胞浆及细胞核电子密度普遍明显降低,呈急性水

肿状态,染色质在核内不均匀分布,胞浆线粒体及内质网胀大,甚至崩解;同一标本中能见到许多细胞膜出现皱缩,细胞体积缩小或近似正常,胞浆电子密度增加,胞浆减少,细胞核膜完整,但呈皱缩状态,整个细胞密度明显增加,染色质呈较大块状,有些有明显的核固缩,出现凋亡小体,另外有神经元在上述变化基础上,胞浆中出现较多自食性空泡。而 Que 组海马细胞基本正常,整个核形态规则,线粒体无肿胀。

### 4 讨论

AD 是近年全世界研究的热点,AD 与细胞凋亡的关系也已引起人们的重视,在培养细胞、动物模型及 AD 病人的尸解中,均发现细胞凋亡的证据。秦正红等在研究兴奋性神经毒与神经退行性变中发现,大鼠纹状体给予 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体激动剂 NMDA 及 QA 12~ 48 h 均诱导产生 DNA 片断,用 TUNEL 方法发现凋亡细胞的阳性核<sup>[8]</sup>。本实验试图探讨 Que 是否有抗老年性痴呆的作用,及其与细胞凋亡之间的关系。结果表明 QA 所致痴呆大鼠,连续给药 25 d,进行迷宫实验,发现其对 AD 大鼠有较好的改善学习记忆功能,在一定范围内有剂量依赖关系。说明 Que 具有抗 QA 引起学习记忆障碍作用。

细胞凋亡目前已成为生物学研究热点之一, AD 与细胞凋亡关系密切, 但海马注射兴奋性氨基酸 QA 所致的 AD 大鼠模型中, 是否有凋亡出现, 国内外文献未见报道。本实验结果显示: QA 注射 12 h, 20 d 后流式细胞仪检测, 发现模型组海马细胞凋亡率分别达  $11.1\% \pm 1.3\%$ ,  $21.4\% \pm 1.8\%$ , 透射电镜下发现有典型的凋亡细胞特征, 且在一般凋亡形态特征基础上, 出现大量自食性空泡, 内质网膨胀, 有人称此为 II 型凋亡细胞<sup>[9]</sup>。提示 QA 所致 AD 动物模型中神经元死亡形成为细胞凋亡。实验中还发现预给药 5 d, 海马微注射 QA 12 h 后, 流式细胞仪检测海马细胞凋亡率, Que 组明显低于模型组, 电镜下海马细胞结构明显好于模型组; 再继续给药 15 d 检测海马细胞凋亡率, 与模型组相比有显著差异。说明其有明显抑制 QA 诱导海马细胞凋亡的作用。而预先给予 Que 及阳性药氯胺酮 (非竞争性 NMDA 受体拮抗剂) 也有拮抗 QA 诱导海马细胞凋亡的作用, 表明 Que 可以拮抗兴奋性氨基酸介导的神经毒性。也从一个侧面证明了细胞凋亡是 AD 最终结局, 抗海马细胞凋亡有抗 AD 的作用。

## References

- [1] Gu Z L, Xie M L, Qian Z N. Effect of quercetin on chemiluminescence of human platelets induced by arachidonic acid [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1993, 14(3): 263-265.
- [2] Cotman C W. A potential role for apoptosis neurodegeneration and Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 1995, 10: 19-21.
- [3] Li Y J, Gu Z L. Apoptosis and gene regulation in Alzheimer's disease [J]. *Foreign Medical Sciences-Geriatrics* (国外医学·老年医学分册), 1998, 19(4): 169-172.
- [4] Stone T W, Perkins M N. Quinolinic acid: A potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS [J]. *Eur J Pharmacol*, 1981, 72: 411-412.
- [5] Li Y J, Gu Z L, Liang Z Q. Effect of aspirin on learning and memory in Alzheimer's disease rats and its molecular mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2000, 16: 570-573.
- [6] Nicoletti I, Migliorati G. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 139(1): 271.
- [7] Xu S Y, Bian R L, Chen X, et al. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [8] Qin Z H. Stimulation of *N*-methyl-D-aspartate receptors induces apoptosis in rat brain [J]. *Brain Res*, 1996, 725: 166.
- [9] Marlangue C C, Zouaoui A D, Repressa A, et al. Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp 120 toxicity [J]. *TIN S*, 1996, 19: 109-111.

## 白芥子提取物的镇咳、祛痰及平喘作用研究

张学梅<sup>1</sup>, 刘凡亮<sup>2</sup>, 梁文波<sup>1</sup>, 王永奇<sup>3</sup>, 邢福有<sup>3</sup>, 张巍峨<sup>3</sup>, 乌兰<sup>3</sup>, 付子栋<sup>4</sup>, 吴丽霞<sup>4\*</sup>

(1. 大连大学医学院 药理教研室, 辽宁 大连 116622; 2. 大连大学 科研处, 辽宁 大连 116622; 3. 大连大学生物工程学院, 辽宁 大连 116622; 4. 金泽大学药学部 天然医药分子化学研究室, 日本)

**摘要:** 目的 研究白芥子不同溶媒提取物的镇咳、祛痰、平喘药理作用。方法 浓氨水喷雾法、毛细玻璃管法、喷雾致喘法。结果 炒白芥子醇提取物有明显的镇咳作用; 白芥子水提取物有良好的祛痰作用; 炒白芥子石油醚提取物可显著对抗 4% 氯化乙酰胆碱诱导的豚鼠哮喘。结论 白芥子具有镇咳、祛痰和平喘作用。其镇咳成分极性偏小; 祛痰成分极性偏大, 水溶性大; 平喘成分的极性小, 脂溶性大。

**关键词:** 白芥子; 镇咳; 祛痰; 平喘

中图分类号: R286.4 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)07-0635-03

### Antitussive, expectorant and antiasthmatic effects of *Brassica alba* extracts

ZHANG Xue-mei<sup>1</sup>, LIU Fan-liang<sup>2</sup>, LIANG Wen-bo<sup>1</sup>, WANG Yong-qi<sup>3</sup>,  
XING Fu-you<sup>3</sup>, ZHANG Wei-e<sup>3</sup>, WU Lan<sup>3</sup>, FU Zi-dong<sup>4</sup>, WU Li-xia<sup>4</sup>

(1. Department of Pharmacology; 2. Department of Scientific Research; 3. College of Bio-engineering, Dalian University, Dalian 116622, China; 4. Pharmacal Department of Kanazawa University, Japan)

**Key words** *Brassica alba* (L.) Boiss.; antitussive; expectorant; antiasthma

收稿日期: 2002-10-12

作者简介: 张学梅 (1970-), 女, 湖南宁乡人, 1993年毕业于大连医科大学获医学学士学位, 2002年 9月大连医科大学获医学硕士学位, 现在大连大学医学院药理教研室工作, 讲师, 主要从事抗炎、抗过敏中药的研究和开发, 1999年所参与的大连市科委项目“复方雷公藤多苷的研究”获大连市科学技术进步三等奖。