

• 药理与临床 •

石菖蒲及其有效成分 α -细辛醚对癫痫幼鼠脑海马神经元凋亡的影响杨立彬¹, 李树蕾^{2*}, 黄艳智³, 王宇虹⁴, 梁建民¹, 张淑琴⁴

(1. 吉林大学第一医院 儿科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学基础医学院 组胚教研室, 吉林 长春 130021;
3. 长春市儿童医院, 吉林 长春 130051; 4. 哈尔滨医科大学附属第一医院 神经内科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:目的 探讨石菖蒲及其有效成分 α -细辛醚对戊四氮 (PTZ) 诱发的幼鼠癫痫发作所激发的海马区神经元凋亡的影响。方法 利用光电镜技术观察癫痫幼鼠海马神经元的病理改变, TUNEL 法检测凋亡细胞, 免疫组织化学法检测 Bax 和 Bcl-2 的表达情况。结果 致痫对照组癫痫幼鼠海马 CA₁ 和 CA₃ 区大量神经元凋亡; 药物治疗后凋亡细胞数明显减少 ($P < 0.01$); PTZ 致痫各组幼鼠海马 CA₁ 和 CA₃ 区 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数量较正常对照组均有明显增加 ($P < 0.01$)。其中, 苯巴比妥钠组、石菖蒲组、 α -细辛醚组 Bcl-2 阳性细胞数量增加较致痫对照组显著 ($P < 0.01$); Bax 阳性细胞数量各致痫组之间无显著性差异。正常对照组 Bcl-2/Bax 的值约为 6.0; 致痫对照组约为 0.7; 其余 3 组均约为 1.0。结论 石菖蒲和 α -细辛醚可能通过增强 Bcl-2 表达, 抑制幼鼠癫痫发作激发的海马神经元凋亡。

关键词: 石菖蒲; α -细辛醚; 癫痫; 苯巴比妥钠; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)08-1196-04

Effect of *Acorus gramineus* and its active component α -asarone on apoptosis of hippocampal neurons in epileptic young rats

YANG Li-bin¹, LI Shu-lei², HUANG Yan-zhi³, WANG Yu-hong⁴, LIANG Jian-min⁴, ZHANG Shu-qin⁴

(1. Department of Pediatrics, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China;
3. Children Hospital of Changchun City, Changchun 130051, China; 4. Department of Neurology, The First Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of *Acorus gramineus* and its active component α -asarone on apoptosis of hippocampal neurons in young rats with epilepsy induced by pentylenetetrazol (PTZ). **Methods** The pathological changes of hippocampal neurons were observed by light microscope and electronic microscope. The apoptotic cells were detected by TUNEL and the expression of Bax and Bcl-2 were detected by immunohistochemistry. **Results** There were numerous apoptosis of hippocampal neurons in CA₁ and CA₃ region in young rats of epilepsy control group. After medication, the number of apoptotic neurons was decreased significantly ($P < 0.01$). The number of Bcl-2 or Bax positive cells of CA₁ and CA₃ region in all of four group of epileptic young rats induced by PTZ was increased obviously compared with normal control group ($P < 0.01$). The number of Bcl-2 positive cells in phenobarbital sodium, *A. gramineus*, and α -asarone groups was more than that of epilepsy control group significantly ($P < 0.01$). But the number of Bax positive cells was no markedly difference among the each groups. The ratio of Bcl-2 vs Bax was approximate 6.0 in epilepsy control group, 0.7 in phenobarbital sodium group, 1.0 in other three groups. **Conclusion** *A. gramineus* and α -asarone could prevent neurons from apoptosis induced by epileptic attack in young rats.

Key words: *Acorus gramineus* Soland.; α -asarone; epilepsy; phenobarbital sodium; apoptosis

研究发现, 癫痫发作所致的早期脑损伤可能为细胞坏死, 而晚期脑损伤伴有程序性细胞死亡^[1], 尤

其在癫痫发作后一周时达高峰^[2]。前期研究发现石菖蒲和 α -细辛醚能够有效抑制戊四氮 (PTZ) 诱发

收稿日期: 2005-11-02

基金项目: 吉林省科技厅资助项目 (20030430); 吉林省中医药管理局资助项目 (2004079)

作者简介: 杨立彬 (1968—), 男, 吉林省长春市人, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事儿科神经医学。

E-mail: yanglibin1968@tom.com

* 通讯作者 李树蕾

的幼鼠癫痫发作,逆转幼鼠多次惊厥发作对其行为运动能力和空间学习记忆能力的损害,提示石菖蒲及其主要成分 α -细辛醚对癫痫幼鼠具有脑保护作用^[3]。本实验旨在从蛋白质和 DNA 水平探讨石菖蒲及 α -细辛醚对癫痫发作激发的幼鼠海马神经元凋亡的影响,以进一步明确其作用机制。

1 材料

1.1 动物:3 周龄 Wistar 幼鼠,体重 35~40 g (长春市高新医学动物实验研究中心)。

1.2 试剂:石菖蒲冲剂(江阴天江药业有限公司,批号 0307113,每袋含石菖蒲根茎干燥粉末 6 g)。 α -细辛醚片剂(沈阳天维制药厂,批号 030219,每片含 α -细辛醚 30 mg)。苯巴比妥钠片剂(上海新亚药业有限公司,批号 020608,每片含苯巴比妥钠 30 mg)。戊四氮、兔抗大鼠 Bcl-2 抗体和 Bax 抗体(Sigma 公司),TUNEL 凋亡细胞试剂盒(TBD. Bio 公司)。

1.3 仪器:Olympus 光学显微镜,莱卡石蜡切片机,日立 H—600 透射电镜。

2 方法

2.1 分组及给药:3 周龄 Wistar 幼鼠 ip PTZ 60 mg/kg 建立癫痫模型,按 Racine 分级^[4]判断模型是否成功。癫痫模型幼鼠随机分为致病对照组、苯巴比妥钠组、石菖蒲组、 α -细辛醚组,另设正常对照组,每组各 10 只。采用 ig 给药,对照组给予生理盐水(每次 0.5 mL),其余各组参考临床用药剂量及人和动物药物剂量换算法,分别给予苯巴比妥钠 18 mg/(kg·d)、石菖蒲 2 350 mg/(kg·d)、 α -细辛醚 29 mg/(kg·d),每日 2 次。给药 7 d 后,处死动物,取材备用。

2.2 HE 染色:4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注固定,取大脑,常规石蜡包埋,连续切片,染色。

2.3 透射电镜:每组随机选取 3 只幼鼠的海马,固定后制作超薄切片。

2.4 TUNEL 法:取 HE 染色切片的邻片,按照试剂盒说明操作。

2.5 SABC 法免疫组织化学检测:取 TUNEL 标记切片的邻片。TUNEL 法和 SABC 法,每张切片分别观察脑海马 CA₁ 和 CA₃ 区 5 个高倍镜视野(400×),计数 TUNEL 阳性和 Bcl-2、Bax 阳性细胞数,以 5 个高倍视野中阳性细胞总数表示。每只动物各取 3 张切片,取平均值。

2.6 统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,依资料性质分别进行 *F* 方差分析、*t* 检验、*q* 检验。

3 结果

3.1 海马 CA₁ 和 CA₃ 区神经元微细结构改变:正常对照组神经元细胞轮廓清晰,胞质丰富,嗜碱性,细胞核圆,居中,核仁清楚。癫痫模型各组神经元界限不清晰,胞膜皱缩,体积缩小,呈三角形或不规则形;核浓缩深染,核仁消失;胞浆空化或浓缩变暗,呈红色神经元表现;神经元周围出现空隙,神经元消失后遗留“空穴”。其中致病组病变神经元最多,苯巴比妥钠组和石菖蒲组神经元形态较 α -细辛醚组略好。

3.2 海马 CA₁ 和 CA₃ 区神经元超微结构改变:正常对照组神经元体积较大,胞质内各种细胞器形态正常,核膜完整,核膜间隙清晰,核仁清楚。癫痫组神经元形态异常,其中致病组可见有大量暗细胞,神经元体积缩小,细胞膜出现皱褶;核膜不完整、皱缩,核膜间隙消失,染色质浓集、边集;胞浆电子密度增加,可见较多自噬性空泡、肿胀的内质网和线粒体;神经元之间的神经毡疏松。用药后,苯巴比妥钠、石菖蒲、 α -细辛醚组神经元上述病理改变有不同程度的改善,结构趋于正常。

3.3 海马 CA₁ 和 CA₃ 区神经元凋亡:正常对照组的幼鼠海马 CA₁ 和 CA₃ 区检测到少量 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞。癫痫发作后 1 周,幼鼠海马 CA₁ 和 CA₃ 区检测到大量 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞。致病组最多,与苯巴比妥钠、石菖蒲、 α -细辛醚组比较差异显著($P < 0.01$),见表 1。

表 1 PTZ 致病幼鼠海马 CA₁ 和 CA₃ 神经元 TUNEL 阳性细胞计数 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Number of TUNEL positive hippocampal neurons of CA₁ and CA₃ region in young rats with epilepsy induced by PTZ ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	TUNEL 阳性细胞数	
		CA ₁	CA ₃
正常	—	5.2±1.1	6.1±0.9
致病	—	183.4±31.2**	191.6±30.6**
苯巴比妥钠	18	113.1±26.8**△△	117.4±29.1**△△
石菖蒲	2 350	120.5±28.5**△△	114.8±27.9**△△
α -细辛醚	29	118.3±25.7**△△	111.5±26.4**△△

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与致病组比较: △△ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group; △△ $P < 0.01$ vs epilepsy group

3.4 海马 CA₁ 和 CA₃ 区神经元中 Bcl-2 和 Bax 的表达:Bcl-2 阳性细胞体积正常,核大而圆。Bax 阳性细胞主要有两种:一种细胞体积正常,核大而圆;另一种细胞形态不规则,体积小,核固缩。正常对照组 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数量较少,其中 Bax 阳性细胞以体积正常、核大而圆的细胞为主,Bcl-2/Bax 的比值约为 6.0。癫痫发作后 1 周,PTZ 致病各组幼鼠海

马 CA₁和 CA₃区 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数量较正常对照组均有明显增高 ($P<0.01$),其中 Bax 阳性细胞增多尤为显著,并以体积较小、核固缩的细胞为主,但是致病对照、苯巴比妥钠、石菖蒲、 α -细辛醚组之间 Bax 阳性细胞数量差异无显著性,而苯巴比妥钠、石菖蒲、 α -细辛醚 3 组的 Bcl-2 阳性细胞数量均较致病对照组明显增多 ($P<0.01$)。致病对照组 Bcl-2/Bax 的值约为 0.7;苯巴比妥钠、石菖蒲、 α -细辛醚组 Bcl-2/Bax 的值均约为 1.0,见表 2 和 3。

表 2 PTZ 致病幼鼠海马 CA₁区 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞计数 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Number of Bcl-2 and Bax positive hippocampal neurons of CA₁ region in young rats with epilepsy induced by PTZ ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	Bcl-2	Bax	Bcl-2/ Bax
正常	—	48.2±5.3	8.4±3.7	5.7
致病	—	128.4±21.2**	185.4±22.5**	0.7
苯巴比妥钠	18	193.1±23.9** $\Delta\Delta$	186.4±21.6**	1.0
石菖蒲	2 350	181.5±22.8** $\Delta\Delta$	188.4±22.4**	1.0
α -细辛醚	29	186.3±22.7** $\Delta\Delta$	191.5±24.9**	1.0

与正常组比较: ** $P<0.01$; 与致病组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

** $P<0.01$ vs normal group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs epileptic group

表 3 PTZ 致病幼鼠海马 CA₃区 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞计数 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Number of Bcl-2 and Bax positive hippocampal neurons of CA₃ region in young rats with epilepsy induced by PTZ ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	Bcl-2	Bax	Bcl-2/ Bax
正常	—	47.5±5.6	7.8±2.4	6.1
致病	—	136.6±20.8**	183.4±21.3**	0.7
苯巴比妥钠	18	187.4±22.4** $\Delta\Delta$	189.4±21.1**	1.0
石菖蒲	2 350	176.8±23.5** $\Delta\Delta$	182.4±22.6**	1.0
α -细辛醚	29	185.5±24.9** $\Delta\Delta$	190.4±21.5**	1.0

与正常组比较: ** $P<0.01$; 与致病组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

** $P<0.01$ vs normal group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs epilepsy group

4 讨论

α -细辛醚是石菖蒲挥发油的主要成分,也是石菖蒲发挥醒脑开窍和镇静、抗惊厥作用的主要活性成分^[5]。本实验探讨了 α -细辛醚抗癫痫作用与神经元凋亡的关系,为改善癫痫的预后开辟了一条新的防治及干预途径。

Fujikawa 等^[6,7]报道,癫痫发作所致的脑细胞坏死具有细胞凋亡的特点,与本实验结果一致。治疗组凋亡神经元数量较少,说明石菖蒲和 α -细辛醚均能有效抑制癫痫幼鼠海马神经元的凋亡,具有一定的脑保护作用。这与石菖蒲提取液对脑缺血-再灌注

诱导的神经元凋亡的保护作用^[8]相吻合。

Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 基因家族中与细胞凋亡关系密切的两个基因。低水平的 Bcl-2 广泛分布于发育中和成熟的大鼠脑中,Bcl-2 表达的上调反映了一种保护神经元积极生存的机制。Bax 广泛分布于神经元,不仅能和 Bcl-2 形成二聚体抑制凋亡,而且其自身还能形成二聚体诱导凋亡。Bax 蛋白过度表达时,Bax 同源二聚体增多,细胞对诱导凋亡的刺激因素更加敏感^[9]。Bcl-2 和 Bax 表达的比例决定了细胞在受到凋亡刺激信号后是生存还是凋亡^[10]。

本研究结果显示,正常对照组海马区 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞很少。致病组海马区 Bax 阳性细胞明显增多,以体积小、核固缩的细胞为主,说明这些神经元已经发生凋亡。Bcl-2 阳性细胞随之代偿性增多,细胞形态正常,但是较 Bax 阳性细胞数量少,结果导致 Bcl-2/Bax 比值显著降低。药物治疗后,苯巴比妥钠、石菖蒲、 α -细辛醚组 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞均明显增多,Bax 染色阳性细胞胞体趋于正常,Bcl-2/Bax 值上调。结果提示,癫痫发作可通过增强 Bax 表达促进细胞凋亡;中药石菖蒲及 α -细辛醚则可能通过提高 Bcl-2 的表达,抑制癫痫诱导的神经元凋亡。与石菖蒲相比, α -细辛醚组 TUNEL 阳性细胞略少,提示其保护作用可能略强于石菖蒲。 α -细辛醚具有抗 PTZ 诱导的癫痫幼鼠海马神经元凋亡的作用,为开辟 α -细辛醚治疗癫痫的临床新用途提供了理论依据。

References:

- [1] An R Z, Yin Y R, Jin C J, et al. Relationship between programmed cell death mechanisms and neuronal necrosis induced by seizures [J]. *Chin J Pediatr* (中华儿科杂志), 2003, 41: 290-292.
- [2] Zhang S Q, Lin W H, Zhao L M. The observation of the apoptosis in different brain regions in epilepsy rats kinkled by electrical amygdala [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 2002, 19(4): 205-207.
- [3] Yang L B, Li S L, Huang Y Z, et al. Effect of *Acorus gramineus* and its active component α -asarone on behavior and memory function of epileptic young rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(7): 1035-1038.
- [4] Vourliotis M E, Riechert U, Mayer P, et al. Pentylene-tetrazole (PTZ)-induced c-fos expression in the hippocampus of kindled rats is suppressed by concomitant treatment with naloxone [J]. *Brain Res*, 1998, 792: 299-308.
- [5] Lai X Y, Liang H, Zhao Y Y. Research survey of chemical component and pharmacological characteristic of *acorus* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(3): 161-165.
- [6] Fujikawa D G, Shinmei S S, Cai B. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats [J]. *Eur J Neurosci*, 1991, 11: 1605-1614.
- [7] Fujikawa D G, Shinmei S S, Cai B. Kainic acid-induced

- seizures produce necrotic, apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage; implications for programmed cell death mechanisms [J]. *Neuroscience*, 2000, 98: 41-53.
- [8] Kuang Z S, Xie Y H, Li L, *et al.* Protective effect of the extract of *Acrous tatarinowii* Schott on neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Guangdong Med J* (广东医学), 2002, 23(5): 459-460.

- [9] Sermadiras D M, Joly B R. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain [J]. *Br J Dermatol*, 1997, 137: 883-889.
- [10] Oltvai Z N, Millman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74: 609-619.

黄蘑多糖对荷瘤小鼠化疗的减毒增效作用

马 岩¹, 张 锐¹, 于小凤², 曲绍春², 徐华丽², 睢大员^{2*}

(1. 吉林大学基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 吉林 长春 130021;

2. 吉林大学药学院 药理教研室, 吉林 长春 130021)

摘要:目的 研究黄蘑 *Hohenbuehelia serotina* 多糖对环磷酰胺 (CTX) 化疗 H₂₂ 荷瘤小鼠的减毒和增效作用。方法 建立小鼠体内移植性肝癌模型; 小、中、大剂量治疗组分别 ip 黄蘑多糖提取物 20、40、80 mg/kg, 连续给药 10 d, 测定荷瘤小鼠的生命延长率和化疗药物 CTX 的毒副作用以及黄蘑多糖对 CTX 的减毒和增效作用。同时检测黄蘑多糖对淋巴细胞转化率、IL-2 水平等免疫系统功能的影响。结果 中、大剂量黄蘑多糖具有抑制肿瘤生长, 延长荷瘤小鼠的生存率的作用。与 CTX 伍用可发挥协同作用, 提高抑瘤率 ($P < 0.05, 0.01$); 提高荷瘤小鼠生存质量, 体重、白细胞计数及免疫器官指数, 与 CTX 阳性对照组比较均显示显著差异 ($P < 0.05, 0.01$); 实验结果显示黄蘑多糖与 CTX 伍用具有良好的减毒和增效作用, 可增强荷瘤小鼠机体免疫力, 提高淋转和 IL-2 的水平 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 黄蘑多糖作为生物反应调节剂可提高机体的免疫力, 增强 CTX 的抗肿瘤作用, 同时减轻 CTX 的毒性。

关键词: 黄蘑多糖; 环磷酰胺; 减毒; 增效

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)08-1199-04

Decreasing toxicity and synergistic effects of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharide extracts to tumor-bearing mice treated by cytoxan

MA Yan¹, ZHANG Rui¹, YU Xiao-feng², QU Shao-chun², XU Hua-li², SUI Da-yuan²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: **Objective** To study the toxicity-decreasing and synergistic effect of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides on H₂₂ mice treated by cytoxan (CTX). **Methods** The tumor-bearing mice models with Hepatoma-22 were established and divided into three groups. *H. serotina* polysaccharides extracts were administered with dosages of 20, 40, and 80 mg/(kg · d) through ip for 10 d, respectively to observe their life prolongable rates, the side and toxic reactions of CTX, lymphocyte transformations, and IL-2 levels. **Results** The group treated with large and medium dosages showed *H. serotina* polysaccharides could inhibit the tumor development with increasing the survival rate, have good synergism and attenuation of toxicity with CTX, enhance the inhibition on growth of Hepatoma ($P < 0.05, 0.01$), increase the weight, WBC count, and immune system index of tumor-bearing mice ($P < 0.05, 0.01$), stimulate the immune system, and improve lymphocyte transformation and IL-2 levels ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** As biological response modifier, *H. serotina* polysaccharides can increase the activity of body immunity, improve the anti-tumor effects of CTX, and attenuate the toxicity of CTX as well. They should be studied and exploited furtherly.

Key words: polysaccharides of *Hohenbuehelia serotina* (Schrad.) Sing.; cytoxan (CTX); decreasing toxicity; synergistic effect

收稿日期: 2005-12-22

基金项目: 吉林省科技发展计划项目资助课题 (20020803)

作者简介: 马 岩 (1952-), 女, 吉林长春人, 教授, 主要从事多糖抗肿瘤作用及机制研究。

Tel: (0431) 5621905 E-mail: mayan@email.jlu.edu.cn

* 通讯作者 睢大员 Tel: (0431) 5778520 E-mail: dayuansui@163.com