

· 基础研究 ·

16 Hz、130 dB 次声对小鼠记忆功能和脑超微结构的影响及姜黄素的治疗作用研究

张元菊 陈景藻 杨俊峰 李玲 王斌 刘静

【摘要】目的 观察 16 Hz、130 dB 次声对小鼠记忆功能和脑超微结构的影响及不同剂量姜黄素的治疗作用。**方法** Morris 水迷宫成绩相近的 BALB/C 小鼠接受 16 Hz、130 dB 的次声作用, 2 h/d, 同时给予不同剂量的姜黄素, 14 d 后再次评定水迷宫成绩, 并取大脑额叶皮层做透射电镜, 观察小鼠脑超微结构的变化。**结果** 单纯次声暴露后, 小鼠记忆功能下降(和空白组相比, $P < 0.05$), 神经细胞缺血性改变, 胞浆内脂褐素增加, 髓鞘变性, 毛细血管水肿; 姜黄素各组记忆功能改善(与单纯次声组比较, $P < 0.05$), 神经细胞轻度或没有缺血性改变, 脂褐素少或没有, 髓鞘变性及毛细血管水肿无明显改善。**结论** 16 Hz、130 dB 次声可引发小鼠脑皮质的脂质过氧化, 使记忆功能受损。姜黄素可明显减轻次声引发的这些损害, 机制可能与其抗氧化作用有关。其治疗作用有一定的部位选择性, 主要集中在神经细胞内。

【关键词】 姜黄素; 次声; 记忆; 超微结构; 脂褐素

Therapeutic effects of curcumin on memory and cerebral ultrastructure of mice exposed to 16Hz and 130dB infrasound ZHANG Yuan-ju*, CHEN Jing-zao, YANG Jun-feng, LI Ling, WANG Bin, LIU Jing. * Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, the 4th Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】Objective To explore the influence on memory function and cerebral ultrastructure of mice of exposure to 16Hz, 130dB infrasound and the therapeutic effects of various doses of curcumin. **Methods** The BALB/C mice with equal learning capacity determined by Morris maze test were exposed to 16Hz, 130dB infrasound for 2 hours daily for 14 days, and various doses of curcumin were given by intragastric administration after each time of the exposure. The learning capacity and cerebral ultrastructure of all the mice were observed and compared among groups. **Results** The memory function of the mice in the infrasound exposure groups decreased. Anoxic changes and lipofuscin accumulation were observed in cytoplasm of the neurons. Myelin degeneration and capillary vessels edema were also observed. Compared with the pure infrasound exposure group, the memory function of curcumin-treated infrasound group mice improved significantly, the neurons showed little or no anoxic changes and only slight lipofuscin accumulation. But myelin degeneration and capillary vessels edema were not significantly ameliorated. **Conclusion** 16Hz, 130dB infrasound may induce lipid peroxidation and decrease the memory function of mice, while curcumin can lighten these damages, the mechanism possibly lies in its effects of anti-peroxidation.

【Key words】 Curcumin; Infrasound; Memory; Ultrastructure; Lipofuscin

次声是 0.000 1 ~ 20 Hz 的低频声波振动, 在自然界及人工环境中广泛存在。高强度次声对人体是有害的, 大脑是其最敏感的靶器官之一^[1]。研究表明, 次声可通过引发脑组织的脂质过氧化而使鼠学习记忆能力降低^[2,3], 据此, 我们选择抗氧化剂姜黄素作为次声性脑损伤治疗药物的筛选, 这在次声相关文献中为首次。观察 16 Hz、130 dB 次声对小鼠记忆功能的影响和姜黄素的治疗作用, 并应用透射电镜观察了小鼠脑皮质超微结构的变化。

材料和方法

一、实验动物与分组

记忆能力相近的 BALB/C 小鼠 40 只(由第四军医大学动物实验中心提供), 雄性, 体重 20 ~ 25 g, 随机分为空白组、单纯次声作用组、姜黄素低剂量组(每日 40 mg/kg 体重)、姜黄素中剂量组(每日 80 mg/kg 体重)、姜黄素高剂量组(每日 160 mg/kg 体重), 每组各 8 只。除空白组小鼠每日放于次声舱中 2 h, 不予次声暴露外, 其余各组均给予 16 Hz、130 dB 的次声暴露, 每日 2 h, 共 14 d, 其中姜黄素低、中、高剂量 3 组均于每次次声暴露后 1 h 灌胃给予相应剂量的姜黄素。

二、实验方法

1. 药物来源与制备: 姜黄素购自美国 Sigma-Ad-

基金项目: 全军医学科学技术研究“十五”计划指令性课题(No. 011L071)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院康复医学理疗科(张元菊、陈景藻、李玲、王斌、刘静); 第一军医大学南方医院康复与理疗科(杨俊峰)

rich 公司,浓度 97%。生理盐水制成 10 mg/ml 的悬浮液,使用前摇匀。

2. 记忆功能的评定与保持:采用 Morris 圆形水迷宫(直径 75 cm,高度 50 cm,水深 35 cm),水温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,加入硫酸钡使其浑浊。平台固定置于其直径 3/4 处,平台面没入水面下 2 cm。训练方法——在距平台最远处放入小鼠,测量其到达平台所用的时间,即潜伏期,以此作为记忆功能的指标。超过 60 s 未达到者计为 60 s,每日训练 4 次,上、下午各 2 次,每次间隔时间 1 h,共训练 7 d。7 d 后评定成绩,以最后一天的平均成绩作为处理前成绩,并剔除成绩进步过快或过慢的小鼠。次声或药物处理后 1 d 再次评定成绩。

3. 电镜标本的制备:14 d 后用脱臼法处死动物,快速取脑额叶皮质经 30 ml/L 戊二醛前固定、10 g/L 锇酸后固定、0.1 mol/LD 的 PBS 漂洗、丙酮梯度脱水、丙酮+包埋剂(1:1)浸透,环氧树脂包埋及修块,超薄切片后,在透射电镜下观察。

4. 仪器与设备:①次声压力舱系统及检测系统(第四军医大学、航天工业总公司第 41 所、中科院声学研究所协作研制),压力舱系统由低频信号发生器(1110B 型,北京强度环境研究所)、功率放大器(7101 型,航天工业总公司第 702 所)和 4 个电动扬声器(YD500-8XA,南京电声器材公司)组成,压力舱有效面积 1.96 m^2 ,体积为 1.92 m^3 。检测系统主要包括次声传感器(1425 型,丹麦 B&K 公司)和次声信号数据采集分析系统。②JEM-2000EX 透射电镜(日本电子光学有限公司制造)。

三、统计学分析

用 SPSS 10.0 统计软件分析,采用单因素方差分析,结果用($\bar{x} \pm s$)表示。

结 果

一、小鼠记忆功能的变化

单纯次声组和空白组相比,小鼠到达平台的时间(即潜伏期)明显延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各姜黄素治疗组潜伏期较单纯次声组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中以中剂量组下降最明显,高剂量组较中剂量组潜伏期又有所回升,但二者差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 16 Hz、130 dB 次声对小鼠潜伏期的影响及姜黄素的作用($s, \bar{x} \pm s$)

组 别	n	潜伏期
空白组	8	11.90 ± 1.87
单纯次声组	8	$22.3 \pm 6.12^{\#}$
姜黄素低剂量组	8	$16.77 \pm 4.99^*$
姜黄素中剂量组	8	$14.58 \pm 3.25^*$
姜黄素高剂量组	8	$17.33 \pm 3.45^*$

注:与单纯次声组相比,* $P < 0.05$;与空白组相比, $^{\#}P < 0.05$

二、小鼠脑超微结构的变化

1. 单纯次声组:神经细胞呈缺血缺氧性改变,细胞外形不规则,胞质浓缩。胞浆内溶酶体、脂褐素明显增多。少部分神经细胞胞浆内有高尔基复合体扩张及线粒体肿胀。胞核形态正常,异染色质增加,部分出现边集现象。星形胶质细胞出现水肿。大量髓鞘出现变性特征,即板层分离现象。毛细血管内皮细胞及基膜完整,结构正常,但有水肿,与周围组织有明显间隙(图 1)。

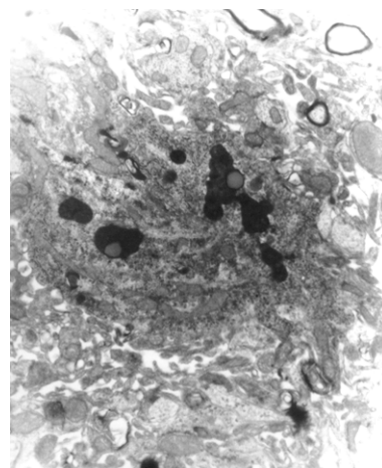


图 1 单纯次声作用组,胞浆内见大量脂褐素($\times 7500$)

2. 姜黄素低剂量组:神经细胞有轻度缺血性改变,胞浆内线粒体、内质网形态基本正常,溶酶体增多,脂褐素数量少。胞核、核仁形态正常,异染色质稍增加。个别神经细胞之间有单个有核细胞浸润。神经纤维髓鞘有板层分离现象。毛细血管内皮细胞与基膜完整,结构正常,仍有水肿,与周围组织有间隙(图 2)。

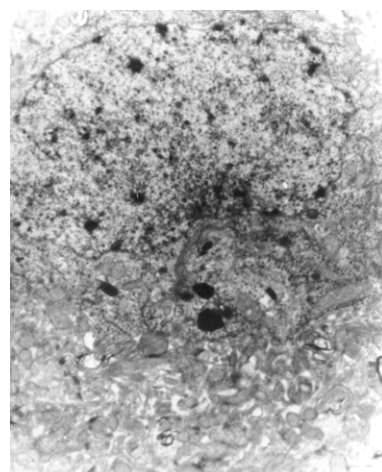


图 2 姜黄素低剂量组,胞浆内见少量脂褐素($\times 6000$)

3. 姜黄素中剂量组:神经细胞结构接近正常,线粒体、内质网、胞核、核仁及染色体形态正常,溶酶体稍增多,但脂褐素极少见。神经纤维髓鞘仍有板层分离现

象。毛细血管结构正常,轻度水肿,与周围组织仍有间隙(图 3)。

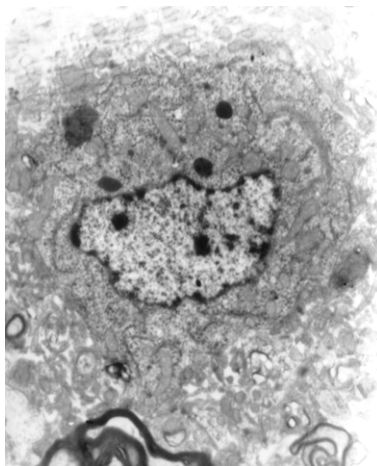


图 3 姜黄素中剂量组,胞浆内见少量溶酶体,但未形成脂褐素 ($\times 7\,500$)

4. 姜黄素高剂量组:与姜黄素中剂量组差别不大。神经细胞结构接近正常,几乎没有脂褐素。部分神经纤维髓鞘有板层分离现象。毛细血管结构正常,轻度水肿,与周围组织有少许间隙(图 4)。

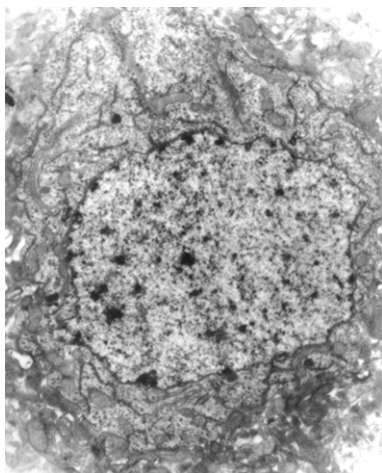


图 4 姜黄素高剂量组,胞浆内未见脂褐素 ($\times 7\,500$)

讨 论

研究发现,次声作用可引起中枢神经系统功能紊乱并导致其结构损伤。8 Hz、120 dB 次声作用大鼠 14 d,可见胞核部分溶解,胞质空泡化,脂褐素增加^[4]。8 Hz、90 dB 次声作用小鼠 14 d 后,其学习能力降低,电镜观察脑皮质神经细胞出现脂褐素增多及线粒体肿胀^[5]。脂褐素是不饱和脂肪酸过氧化的产物,与体内活性氧类物质生成过度有关^[6]。活性氧类物质包括超氧自由基、羟自由基和过氧化氢,可使脂质、蛋白质和 DNA 氧化而损害细胞。细胞内同时存在生成活性

氧类物质体系和拮抗其生成的抗氧化体系。而在各种病理情况下,活性氧类物质生成增多,即可导致细胞损伤。其中不饱和脂肪酸氧化后生成的过氧化脂质可与蛋白质结合形成复合物,积累而形成脂褐素,它可毒害细胞,阻碍细胞内物质和信息的传递。老年人及各种消耗性疾病患者细胞内可出现较多脂褐素的沉积。因此认为次声可引起脑内活性氧类物质生成增多,使脑皮层脂质过氧化而损害脑组织,其标志之一即是神经细胞内脂褐素的增加。

姜黄素是从植物姜黄中提取的一种植物多酚,应用时安全性很高,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗辐射等多种药理作用^[7]。其中抗自由基、抗脂质过氧化作用已得到较肯定的证实。体外实验发现,姜黄素可有效清除 Fenton 反应中生成的羟自由基,抑制由 2-偶氮二盐酸盐诱发的红细胞脂质过氧化性溶血^[8]。临床研究发现,姜黄素可有效抑制活性氧的产生^[9]。程司坤等^[10]用电化学的方法直接观测到了姜黄素对 H_2O_2 及 $OH\cdot$ 的抑制作用。有研究报道姜黄素可通过抑制中性白细胞的应答功能而阻断氧自由基的生成^[11]。因此认为姜黄素对体内活性氧类物质的影响发挥着双重作用,一方面减少其生成,另一方面又加强其清除。同时姜黄素还可影响对氧化、抗氧化有关的酶类而发挥强大的抗氧化保护作用,保护生物大分子免遭自由基的毒性作用,从而保护机体组织器官^[12,13]。

本研究表明,次声作用后小鼠记忆功能下降,神经细胞内脂褐素数量增加,这与以前的研究报告一致^[2,3],提示大脑皮质活性氧类物质生成增多,发生了脂质过氧化。过氧化脂质与蛋白质结合形成脂褐素,而脂褐素的增加可影响记忆功能。有研究表明,小鼠学习记忆衰退与脑脂褐素积累增加有对应平行关系^[14]。本实验观察到姜黄素治疗组脂褐素增加不明显,尤其姜黄素中、高剂量组神经细胞内脂褐素极少,已和正常细胞接近。同时小鼠记忆功能的减退有一定改善,以中、高剂量组为明显。进一步说明了学习记忆衰退与脑脂褐素的增加有直接关系。提示姜黄素可通过抗氧化、抑制脂褐素生成而发挥一定的脑保护作用。

叶琳等^[3]的研究发现,8 Hz、130 dB 次声作用大鼠 14 d,神经细胞内不但见到脂褐素颗粒,还可见核膜模糊、线粒体及高尔基体畸变等。8 Hz、120 dB 作用大鼠 14 d,也可见类似变化^[4]。在本实验中,16 Hz、130 dB 次声作用后,神经细胞内脂褐素明显增多,但未发现细胞器有明显变形、破坏,这与以上研究有较大区别,提示次声对鼠脑超微结构的影响可能与频率有一定关系。

研究结果同时显示,姜黄素可减轻次声引发的异染色质增加及边集现象,但对次声引发的髓鞘变性及

毛细血管水肿无明显改善。表明姜黄素对生物大分子可起到一定的保护作用,这可能与其抗氧化作用有关,但确切机理需进一步论证。以上结果表明,姜黄素对 16 Hz, 130 dB 次声的保护作用有一定的部位选择性,主要集中在神经细胞内,而胞外作用轻微。

次声影响学习记忆功能的机制是复杂、多方面的,脂质过氧化只是机制之一。同时,姜黄素除了抗氧化这一作用外,还有其它很多药理活性,涉及体内上百种分子,包括酶、炎性介质、调节因子等,还可能涉及其它机制,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈景藻. 次声的产生及生物学效应. 见, 中国人民解放军总后勤部卫生部, 编. 医药卫生科学技术进展. 北京: 军事医学科学出版社, 1997. 194-197.
- 2 王斌, 陈景藻, 易南. 不同声强 8Hz 次声对小鼠学习能力的影响. 第四军医大学学报, 1997, 18: 442-445.
- 3 叶琳, 龚书明, 陈耀明, 等. 次声作用对大鼠大脑皮层脂质过氧化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24: 360-362.
- 4 费周, 章翔, 王小峰, 等. 次声作用后鼠脑超微结构与血脑屏障改变. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21: 134-135.
- 5 王斌, 陈景藻, 易南. 不同声强 8Hz 次声对小鼠学习能力的影响. 第四军医大学学报, 1997, 18: 442-445.
- 6 王学敏. 生物氧化. 见: 周爱儒, 主编. 生物化学. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 159.
- 7 Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. Crit Rev Food Sci Nutr, 2004, 44: 97-111.
- 8 王建舜, 容维祺, 康九红. 姜黄素对羟自由基及红细胞氧化性溶血的影响. 中国现代应用药学, 2000, 17: 469-471.
- 9 Balasubramanyam M, Koteswari AA, Kumar RS, et al. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. J Biosci, 2003, 28: 715-721.
- 10 程司坤, 刘智广, 曹云新, 等. 姜黄素的化学测定的新方法. 第四军医大学学报, 2000, 21: 241-243.
- 11 Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (Curcuma longa). J Altern Complement Med, 2003, 9: 161-168.
- 12 Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, et al. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischemia in rats. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36: 1967-1980.
- 13 李侠, 陈炳卿, 宋其林. 姜黄素对大鼠肝 CytP450 系统及谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响. 卫生毒理学杂志, 1997, 11: 293-29.
- 14 徐晓虹, 王良斌, 杨少伟, 等. 小鼠学习记忆行为与脑内脂褐素含量的关系. 中华老年医学杂志, 1998, 17: 80-82.

(修回日期: 2004-12-04)

(本文编辑: 阮仕衡)

· 消息 ·

中华医学会泌尿外科学会第五届全国尿流动力学学术会议暨学习班征文通知

中华医学会泌尿科学分会定于 2005 年 4 月 15 日至 18 日在湖北武汉召开第五届全国尿流动力学学术会议暨学习班, 本次会议由湖北省医学会泌尿外科学分会承办。我们诚邀全国各地的泌尿外科医生参加本次大会, 同时, 热诚欢迎全国医院对女性泌尿疾病有兴趣的妇产科医生、从事老年和残疾人的排尿障碍康复工作的老年病学和康复科医生、从事小儿排尿功能障碍诊断治疗工作的小儿外科医生等参加本次大会和学习班。本次大会将邀请国际和国内著名的泌尿外科专家前来, 就各自领域内的最新进展做专题演讲和学术交流。

会议主题: ①与排尿控制相关的解剖、生理、病理、分子生物学等基础研究; ②尿流动力学技术的创新和应用研究; ③压力性尿失禁的诊断和治疗; ④膀胱过度活动症的诊断和治疗; ⑤前列腺增生症的诊断和治疗新进展; ⑥脊髓损伤并发症和神经源性膀胱的诊断、治疗、康复和护理; ⑦女性盆底功能障碍及女性泌尿相关疾病; ⑧慢性前列腺炎; ⑨小儿泌尿的特殊问题; ⑩老年泌尿的特殊问题。

交流方式: 包括专家论坛、专题讨论、论文交流、新技术演示、展板展示等方式。国内正式参会代表将获得国家级继续教育项目 I 类学分 6 学分。学习班期间将安排系列知识讲座、普通尿流动力学和影像尿流动力学检查演示、盆底功能障碍的手术治疗和生物反馈治疗演示、尿失禁手术观摩等。

投稿须知: 摘要 300-500 字, 包括目的、方法、结果及结论四部分。以 A4 纸打印, 并附 Word 格式的软盘或经由电子邮件复投。截稿日期为 2005 年 3 月 8 日, 以邮戳为准。论文录用通知和学习班录取通知将在 3 月 20 日寄出, 并同时在电子邮件中通知。也可登陆网站 www.luts.cn 进行网上投稿、查询稿件录用情况并动态了解本次会议的最新安排。

会议时间: 2005 年 4 月 15 日至 4 月 19 日。

联系地址: 武汉解放大道 1095 号, 同济医院泌尿外科尿控中心, 邮编 430030。

联系电话: 027-83662844。

电子邮件地址: luts@luts.cn。

联系人: 杜广辉, 陈忠, 蔡丹。

中华医学会泌尿外科学分会第五届尿流动力学学术会议组委会