艾燃烧生成物对 ApoE 基因敲除小鼠脑内神经递质 5-HT、GABA 的影响

王 昊 杨 佳 赵百孝 哈 略 刘耀萌 黄 畅 于梦芸 惠 鑫 和 蕊 韩 丽
(北京中医药大学针灸推拿学院,北京,100029)

摘要 目的:观察艾燃烧生成物即艾烟对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠($ApoE^{-/-}$)大脑内神经递质 5 羟色胺(5-HT)和 γ-氨基丁酸(GABA)含量变化的影响。方法:本实验选用 8 周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠($ApoE^{-/-}$小鼠)21 只,7 只同龄相同遗传背景非转基因小鼠 C57BL/6 作为空白对照组。$ApoE^{-/-}$小鼠随机平均分为艾烟组、模型对照组、氯吡格雷组。艾烟组小鼠 5 ~ 15 mg/m^3 浓度艾烟干预,空白对照组和模型对照组小鼠空白抓取,氯吡格雷组口服给予氯吡格雷溶液 14 mg/kg(1 次/d),各组干预 6 d/周,16 周后牺牲动物,使用 LC-MS/MS 同时测定脑组织中神经递质 GABA、5-HT 含量。结果:艾烟组其脑内 5-HT、GABA 的含量显著高于模型组($P<0.05$),氯吡格雷组脑内 5-HT 与模型组无明显差异,GABA 的含量显著高于模型组($P<0.05$),3 组间均具有统计学意义($P<0.05$)。结论:适当施灸时,一定浓度范围之内的艾燃烧生成物可以治疗性提高 $ApoE^{-/-}$小鼠脑内 5-HT 及 GABA 的含量。

关键词 艾燃烧生成物;ApoE 基因敲除小鼠;神经递质;5-HT;GABA

Effects of Moxa Smoke on Brain 5-HT and GABA in Apolipoprotein E-deficient Mice

Wang Hao, Yang Jia, Zhao Baixiao, Ha Lue, Liu Yaomeng, Huang Chang, Yu Mengyun, Hui Xin, He Rui, Han Li
(*School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029, *China*)

Abstract **Objective**: To observe the effect of moxa smoke (Artemisia vulgaris) on neurotransmitters 5-HT and GABA in the brain of apolipoprotein E-deficient mice (ApoEKO) and explore the antiaging effect of moxa smoke. **Methods**: Seven eight-week old C57BL/6 mice were collected as control group, and twenty-one eight-week old ApoEKO mice were randomly divided into 3 groups ($n=7$/group): model group, moxa smoke group, and clopidogrel group. Mice in the smoke group was exposed to smoke, whose concentration is controlled within 5 ~ 15 mg/m^3; mice in model group and control group were exposed to normal air. Mice in clopidogrel group were treated with 14 mg/kg clopidogrel orally once/day. After 16 weeks interference, the levels of 5-HT and GABA in the mice brain were measured. **Results**: Compared with the model group, the brain 5-HT and GABA levels of moxa smoke group were decreased significantly ($P<0.05$). There is no significant difference between the clopidogrel group and control group in 5-HT concentration, while GABA level was higher in clopidogrel group with significant difference ($P<0.05$), besides, the differences among the three groups have significant difference ($P<0.05$). **Conclusion**: Within appropriate concentration, moxa smoke can obviously increase brain 5-HT and GABA levels in ApoEKO mice.

Key Words Moxa smoke; Apolipoprotein E-deficient mice; Neurotransmitter; 5-HT; GABA
中图分类号:R245.81 **文献标识码**:A **doi**:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.08.005

艾灸是用艾叶制成灸材,点燃后通过热辐射刺激体表穴位或特定部位激发经气和通过呼吸吸入具有芳香气味的艾烟,共同调整人体生理功能,从而达到防病治病目的一种传统中医疗法。艾灸疗法的作用主要有温通经脉、升阳举陷、散寒祛湿、消肿散结、祛瘀通络、回阳救逆等作用,其保健强壮、鼓舞正气的效果较好,故该疗法广泛应用于日常养生。艾燃烧生成物即艾烟,可通过呼吸或皮肤吸收等途径进入人体[1],其成分复杂,主要作用成分可能为桉油精、龙脑、侧柏酮、β-石竹烯等挥发油[2-3],但目前仍尚未探明具体是哪种成分及其作用机制。

本课题组致力于艾灸及艾燃烧生成物作用机制

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81373730);国家自然科学基金项目(编号:81574068);国家青年自然基金项目(编号:81403449);国家国际科技合作专项项目(编号:2011DFA31370)

作者简介:王昊(1991.01—),男,北京中医药大学 2015 级在读硕士研究生,研究方向:艾灸与艾燃烧生成物的效应机制,E-mail:wh_bucm@126.com

通信作者:赵百孝(1963.03—),博士,教授,博士研究生导师,北京中医药大学针灸推拿学院院长,研究方向:艾灸作用与原理,Tel:(010)64286737,E-mail:baixiao100@vip.sina.com

的相关研究。在之前的研究中，我们发现艾烟具有抗氧化、光谱杀菌、抗病毒、抗肿瘤、调节脑内氨基酸类神经递质、减少血小板聚集、改善微循环[4]、保护海马 CA3 区、减少 Aβ 沉淀[5]等作用，从而改善小鼠学习记忆能力，进而起到延缓脑组织衰老，预防和改善阿兹海默病症状的作用。

ApoE 载脂蛋白基因敲除（$ApoE^{-/-}$）小鼠是由美国 Rockefeller 大学生化遗传与代谢实验室和北卡罗莱那大学病理遗传实验室于 1992 年采用胚胎干细胞基因敲除（gene knockout）技术培育成功，能够在自然膳食下形成严重的高脂血症，并自发形成纤维斑块和复合斑块，病理学改变与人类极为相似，因此广泛应用于动脉粥样硬化的研究中[6]。随着 ApoE4 与阿兹海默病（Alzheimer Disease，AD）间相关性的发现与逐步证实，$ApoE^{-/-}$ 小鼠成为研究 ApoE 在神经系统内功能以及 ApoE 基因缺失后可能出现的神经功能障碍的最佳动物模型。研究发现 $ApoE^{-/-}$ 小鼠在受到缺血性损害后，神经细胞的损害更加严重，而给予植入 ApoE 基因后，神经损害又大大减轻，这进一步支持 ApoE 的神经保护功能[7-8]。$ApoE^{-/-}$ 小鼠出现认知障碍与胆碱能神经功能障碍[9-11]，而这两者又是 AD 的主要特征，胆碱能神经受损被认为是 AD 认知功障碍的主要原因，因此 $ApoE^{-/-}$ 小鼠已经被作为一种新型动物模型，应用于研究 ApoE 缺失在乙酰胆碱神经损害所致认知障碍过程中发挥的作用[12]。刘钧天[5]证明了 $ApoE^{-/-}$ 小鼠可以作为阿茨海默病的动物模型，并说明艾烟的确可以降低 $ApoE^{-/-}$ 小鼠的脑内淀粉蛋白沉淀，改善其学习记忆功能，进而起到延缓脑组织衰老，防治 AD 的作用。

本实验选用 ApoE 基因敲除小鼠，观察艾烟干预对小鼠脑内神经递质 5-HT、GABA 含量变化的影响，探讨艾烟抗衰老的作用效应。

1　实验材料

1.1　实验动物　本实验选用 8 周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠（$ApoE^{-/-}$ 小鼠）21 只，7 只同龄相同遗传背景非转基因小鼠 C57BL/6 作为空白对照组。小鼠均购自于北京大学医学部实验动物科学部。$ApoE^{-/-}$ 小鼠采用高脂饲料（北京维通利华实验动物有限公司提供，含 15% 猪油、2% 胆固醇、0.05% 胆酸）喂养，C57BL/6 采用常规饲料喂养。所有小鼠均可自由进食饮水；饲养环境温度为（22 ± 2）℃，湿度为 50% ~60% 左右。采用人工控制室内照明，保持 12 h 光照（8:00—20:00）和黑暗（20:00—次日 8:00）交替循环。

1.2　主要仪器与试剂　Q-Trap 5500 型串联四级杆-离子阱质谱分析仪（美国 Applied Biosystems 公司），Sorvall Legend Micro 17R 微量离心机（美国 Thermo 公司），超低温冰箱，日本三洋公司产，XS105S 十万分之一电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司），Gilson 移液器（法国 Gilson 公司）。特制细艾条（φ0.5 cm ×20 cm，河南南阳汉医艾绒有限公司）；小鼠固定笼（自制，圆柱形，底面直径 5 cm，高 10 cm）；带孔玻璃缸（自制，80 cm ×80 cm ×60 cm，顶层玻璃正中设有直径为 5 mm 的圆孔；光散射式数字粉尘测试仪（北京宾达绿创科技有限公司）。5-HT，GABA 均购自美国 Sigma 公司，甲醇、乙腈为色谱纯，实验用水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2　实验方法

2.1　分组　小鼠适应性饲养 1 周之后，将 $ApoE^{-/-}$ 小鼠按随机数字表法随机平均分为艾烟组、模型对照组、氯吡格雷组，每组 7 只，高脂喂养，空白组选用 C57BL/6 小鼠作为对照，普通饮食喂养。

空白组小鼠：采用固定器固定小鼠头、尾、四肢部位，不予任何处理，每日抓取固定 20 min；

模型组：采用固定器固定小鼠头、尾、四肢部位，不予任何处理，每日抓取固定 20 min；

艾烟干预组小鼠：采用固定器固定小鼠头、尾、四肢部位，暴露于 10 ~ 15 mg/m^3 艾烟环境下 20 min；

阳性药组小鼠：采用固定器固定小鼠头、尾、四肢部位，不予任何处理，每日抓取固定 20 min；口服给予氯吡格雷溶液 14 mg/kg（1 次/d）；

各组干预 6 d/周，16 周后牺牲动物，检测各项指标。

2.2　干预方法　模型组与空白组小鼠：分别用自制小鼠固定笼固定后放入玻璃缸内，不做其他处理，20 min 后取出。

艾烟干预组小鼠：将调试好的粉尘测试仪置于玻璃缸中间，将小鼠用自制小鼠固定笼固定后放于玻璃缸内。点燃细艾条，从玻璃缸上方圆孔中将燃烧的一端插入，令艾烟充满玻璃缸。用粉尘测试仪测试其浓度达到预定范围 10 ~ 15 mg/m^3 后（此过程艾条燃烧约 15 s），将艾条取出，迅速封闭圆孔。此后每隔 3 min 记录 1 次浓度数值，使数值保持在 10 mg/m^3 左右。若数值高于 15 mg/m^3，可将上方玻璃盖稍微移动，令艾烟散去部分后迅速将盖子移回；若数值低于 5 mg/m^3，可再将点燃的艾条由圆孔插入，

以补充艾烟。每次艾烟干预结束后，打开玻璃缸释放艾烟，并擦拭玻璃缸清除艾燃烧残留物，以便下次实验操作。

2.3 取材 在干预 16 周后，将所有小鼠处死，冰台上快速取脑。将取得的脑组织放入标记的冻存管中，液氮冻存数分钟后移入 -70 ℃冰箱待检。

2.4 指标检测 脑样品称重后，彻底剪碎（约 100 下）；下丘脑中分别加入 0.2 mL 生理盐水，然后在冰浴中超声匀浆得脑匀浆液。取各脑匀浆液 0.15 mL，加入 0.3 mL 冰冷的乙腈，混匀后于 4 ℃放置 30 min，然后于 4 ℃低温离心（8 000 r/min，3 min），取上清液 200 μL，在其中加入 10 μL 内标，然后 5 000 g 低温离心 10 min 后取上清液在 LC-MS 上测试。

TSKgel Amide-80 色谱柱（2.0 mm × 15 cm，3 μm），柱温 35 ℃，流动相乙腈-15 mmol · L^{-1}甲酸铵水溶液（pH5.5）（60∶40），流速 0.4 mL · min^{-1}。质谱检测器采用电喷雾电离方式进行离子化，以正离子多反应检测（MRM）模式进行扫描，离子源及其他相关参数优化为喷雾电压 4 500V，加热温度 500 ℃，Gas1 50Psi，Gas2 70Psi。

3 统计学方法

统计软件使用 SPSS 20.0。所有数据以平均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，各组组间差异采用方差分析，若不符合正态分布或方差不齐，则选用非参数检验。

4 结果

各组小鼠脑内神经递质 5-HT 和 GABA 含量比较见表 1 和图 1、图 2。

与空白对照组对比，模型组小鼠脑内 5-HT、GABA 含量明显下降，差异有统计学意义。艾烟组脑内神经递质 5-HT 和 GABA 含量介于模型组和空白组之间，显著高于模型组，$P < 0.01$，差异有统计学意义。氯吡格雷组小鼠脑内 5-HT 和 GABA 含量略高于模型组，但差异无统计学意义，低于艾烟组，$P < 0.05$，差异有统计学意义，见图 1。

表 1 各组小鼠脑内神经递质 5-HT 和 GABA 含量比较（$\bar{x} \pm s$，ng/mL）

组别	只数	5-HT	GABA
艾烟组 A	7	878.79 ± 85.09**	525552.20 ± 9462.01**
模型组 B	7	542.69 ± 94.82#	407389.28 ± 20085.82#
氯吡格雷组 C	7	579.89 ± 82.76#	482005.31 ± 22867.17*
空白组 D	7	1073.40 ± 62.49**	531822.01 ± 8871.45**

注：与空白对照组比较，# $P < 0.05$；与模型组比较，* $P < 0.05$，** $P < 0.01$。

5 讨论

中枢系统的 5-HT 神经元胞体主要集中在低位脑干的中线附近，称为中缝核群，向前投射至前脑，向两侧投射至新皮质的广泛区域，5-HT 为单胺类神经递质。作为中枢神经系统重要的神经递质，其含量占全身总量的 1% ~2%，而脑内 5-HT 能神经递质在记忆功能中起着非常重要的作用，另外同样重要的还有胆碱能、儿茶酚胺能神经递质[13]。5-HT 被认为可通过与脑内乙酰胆碱的交互作用直接与记忆发生联系。

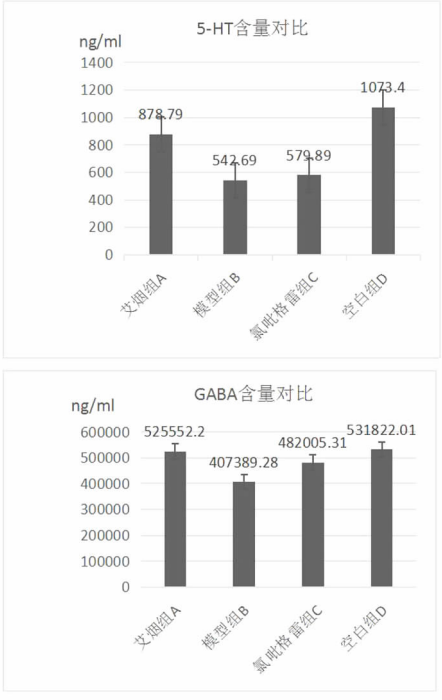

图 1 各组 5-HT 和 GABA 含量对比

GABA 是一种重要的抑制性神经递质，正常的工作记忆功能取决于背外侧前额皮层适量的 GABA 的神经传递，GABA 的过少和过多释放都会损害记忆[14]。衰老时 GABA 含量的下降可进一步造成机体的抗氧化能力减弱，继而引发一系列的病理生理变化，最终导致神经元的损伤、凋亡，出现记忆力下降、认知障碍、思维迟缓等脑老化的表现。

中枢神经系统是一个耗能高、耗氧高的高代谢系统，其本身又含有高浓度易于氧化的物质，这导致中枢神经系统极易受到氧化应激的损伤，脂质过氧化是最早的改变之一。杨秀丽[12]发现，$ApoE^{-/-}$小鼠脑内的氧化性产物增多，其抗氧化系统受到明显的损害，这导致小鼠脑内氧化-抗氧化系统失衡，产生氧化应激，而这可能是最终导致小鼠认知功能障碍的根本原因。

本实验结果显示，使用艾烟处理小鼠后神经递质含量明显高于模型组，接近于空白组水平，说明其治疗效果良好，艾烟生成物即艾烟作为艾灸作用因

素之一可有效提高脑内神经递质 5-HT 和 GABA 含量,起到延缓脑组织衰老的作用。本课题组之前的试验已证明艾烟可减少 ApoE$^{-/-}$小鼠的脑内 Aβ 蛋白沉淀[5],降低 GFAP 蛋白在海马的表达水平[15],改善学习记忆功能,其作用途径可能是艾烟中有效挥发油成分,被呼吸系统和皮肤的黏膜吸收,调节神经递质和脂质代谢,增强神经系统兴奋性,改善脑内氧化应激损伤和炎性反应,从而起到预防和改善阿兹海默病症状的作用。

参考文献

[1]许焕芳,崔莹雪,黄茶熙,等. 艾燃烧生成物对 SAMP8 小鼠血清 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(5):1387-1390.

[2]刘美凤,周惠. 艾叶挥发油与燃烧烟雾的化学成分比较[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2012,40(1):30-34.

[3]靳然,赵百孝,于密密,等. 艾燃烧生成物组分固相微萃取气相色谱质谱法定性分析[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(9):632-636.

[4]杨佳,赵百孝,韩丽,等. 不同浓度艾烟长期干预对大鼠血清 vWF 及 ox-LDL 表达的影响[J]. 世界中医药,2013,8(8):859-861.

[5]刘钧天,崔莹雪,黄玉海,等. 艾烟与香烟对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠学习记忆功能与海马 β 淀粉样蛋白沉淀的影响[J]. 环球中医药,2015,8(5):527-531.

[6]Jawien J,Nastalek P,Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis[J]. Journal of Physiology and Pharmacology,2004,55(3):503-517.

[7]Horsburgh K,Kelly S,McCulloch J,et al. Increased neuronal damage in apolipoprotein E-deficient mice following global ischaemia[J]. NeuroReport,1999,10:837-841.

[8]Horsburgh K,McCulloch J,Makoto K. Intraventricular infusion of apolipoprotein E ameliorates acute neuronal damage after global cerebral ischemia in mice[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism,2000,20:458-462.

[9] Mashah E,MalloryM,Ge N,et al. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice[J]. Experimental Neurology,1995,136:107-122.

[10]P. Krzywkowski O. Ghribi J. Gagnu*P* > C. Chabot S. Kar J. Rochford G. Massicotte and J. Poirier. Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice[J]. Neuroscience,1999,92:1273-1286.

[11]Chapman S,Michaelson DM. Spacific neurochemical derangements of brain projecting neurons in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Journal of Neurochemistry,1998,70(2):708-714.

[12]杨秀丽. 脂欣康益智作用临床观察及干预 ApoE 基因敲除小鼠认知功能障碍的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2007.

[13]于平,尹文娟,于萍. 5-羟色胺受体对记忆的调节作用[J]. 首都师范大学学报:社会科学版,2009,S4:141-145.

[14]袁水霞,李霞,于萍. 脑内 GABA 受体在学习记忆中的作用[J]. 首都师范大学学报:社会科学版,2009,S4:156-160.

[15]刘钧天,崔莹雪,黄玉海,等. 艾烟与香烟对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠自主行为与海马 GFAP 表达的影响[J]. 上海针灸杂志,2015,34(10):1009-1012.

(2016-06-28 收稿　责任编辑:洪志强)

(上接第 1409 页)

参考文献

[1]Shishehbor M H,Hazen S L. Inflammatory and oxidative markers in atherosclerosis:relationship to outcome[J]. Current atherosclerosis reports,2004,6(3):243-250.

[2]Tedgui A,Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis:pathogenic and regulatory pathways[J]. Physiological reviews,2006,86(2):515-581.

[3]Cathcart M K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages contributions to atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis,thrombosis,and vascular biology,2004,24(1):23-28.

[4]Plotnikov M B,Plotnikov D M,Aliev O I,et al. Hemorheological and antioxidant effects of Ascovertin in patients with sclerosis of cerebral arteries[J]. Clinical hemorheology and microcirculation,2003,30(3-4):449-452.

[5]Gałecki P,Szemraj J,Bieńkiewicz M,et al. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment[J]. Pharmacological reports,2009,61(3):436-447.

[6]苏显明,马丙寅,王东琦,等. 冠心病患者血中 SOD 及 MDA 测定分析[J]. 陕西医学杂志,2003,23(12):1070-1072.

[7]Heinecke J W,Baker L,Rosen H,et al. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells[J]. Journal of Clinical Investigation,1986,77(3):757.

[8]Steinbrecher U P. Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism,1988,959(1):20-30.

[9]Ohashi M,Runge M S,Faraci F M,et al. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice[J]. Arteriosclerosis,thrombosis and vascular biology,2006,26(10):2331-2336.

[10]Tanriverdi H,Evrengul H,Kuru O,et al. Cigarette smoking induced oxidative stress may impair endothelial function and coronary blood flow in angiographically normal coronary arteries[J]. Circulation Journal,2006,70(5):593-599.

[11]Pittilo M. Cigarette smoking,endothelial injury and cardiovascular disease[J]. International journal of experimental pathology,2000,81(4):219-230.

[12]刘耀萌,崔莹雪,哈略,等. 艾灸及艾烟对动脉粥样硬化模型小鼠血清 TNF-α、hs-CRP 及 vWF 的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,31(4):1377-1379.

(2016-06-28 收稿　责任编辑:洪志强)