

台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學

作品名稱：桂皮醛對神經細胞鈣離子濃度之影響

學 校：台北市建國高級中學

作 者：張淳皓

桂皮醛對神經細胞 Ca^{2+} 離子濃度之影響

一、前言

(一)研究動機

桂枝為樟科植物肉桂之嫩枝，依古籍記載具解熱、鎮痙、抗菌及對消化液分泌有拮抗作用，藥理作用廣泛。近年來，國內外學者對其進行了大量的研究，且達到了較高的水平，查閱國內大量文獻，發現研究者對桂枝的成分、藥理等方面進行了深入的研究，其中較大比例的研究是對桂枝中有效成分桂皮醛(Cinnamic aldehyde)的討論，而我們希望能用新技術、新方法探討其藥理作用機制。

(二)研究目的

- 1、檢驗天然植物肉桂中桂皮醛的藥理作用
- 2、檢驗桂枝粹取液對細胞內 Ca^{2+} 離子濃度的影響

(三)文獻探討

①、桂枝(參考資料二)

A. 古典典籍上的記載

神醫百草經(神農本草經):

牡桂：主上氣欬逆，結氣喉痹，吐吸利關節；即今之桂枝、

桂皮也。菌桂，即今之肉桂、厚桂。

新修本草:

曰:大枝小枝皮俱是簡桂。然大枝皮不能重卷，味極淡薄，

不入藥用……。

本草綱目:

列入牡桂條下，曰：其嫩枝皮半卷多紫，而肉中皺起，肌理虛弱，謂之桂枝。

B. 現代中藥的桂枝

現代中藥學桂枝有下列作用

- a. 抗菌作用：桂枝醇提物在體外能抑制多種細菌，有效濃度為 25mg/ml。
- b. 抗病毒作用：桂枝煎劑在雞胚上，對流感病毒有抑制作用，以 70%醇浸劑作用較好。
- c. 利尿作用：桂枝是五苓散中的主要利尿成分之一，其作用方式可能似汞撒利。
- d. 鎮靜作用：桂皮醛口服後使小鼠自主和被動活動減少，與中樞興奮和抑制藥應有拮抗和協同作用。
- e. 抗驚厥作用：桂皮醛腹腔給藥時延遲小鼠土的寧驚厥及死亡時間。柴胡桂枝湯連續給藥 11 天，對小鼠聽源性驚厥有明顯抗驚效果。
- f. 解熱作用：桂枝醛及煎劑等，對小鼠、家兔有解熱作用。
- g. 柴胡桂枝湯等臨床用於治療感冒水腫癩癩等症有效。

其中以第 d、e 的作用經我們討論後認為應與神經有相當的影響，這便是我們測定的主要目的。

②FURA-2 原理

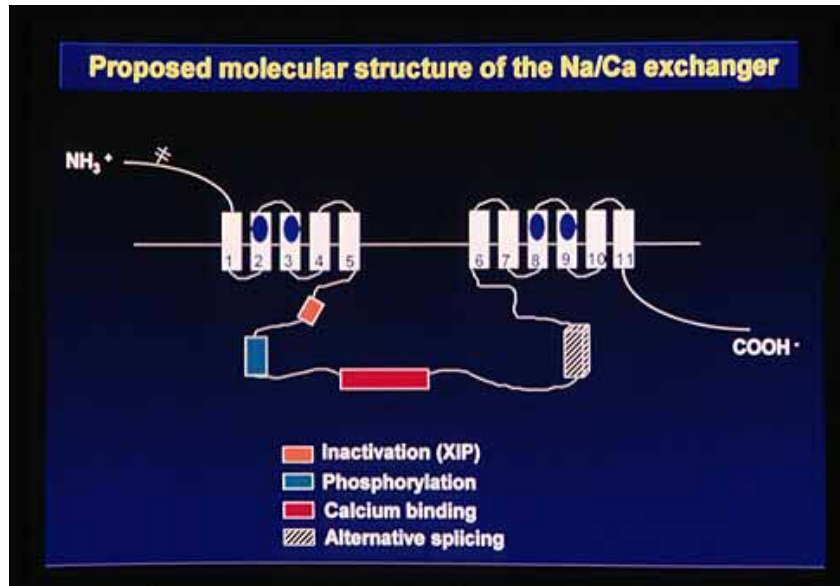


圖 1.NA-CA 交換蛋白

所謂的鈉-鈣交換蛋白 (Na^+ / Ca^{2+} exchanger) 分佈於各種胞器的膜上，主要功能是利用胞膜兩側的鈉離子濃度進行鈉離子及鈣離子的交換，在平常的情況下，因為胞外鈉離子較多，因此方向是輸入鈉、排出鈣(通常比例是 2:1，但在心肌或一些特例上則否)，但是在特殊情況下是可以反向的。

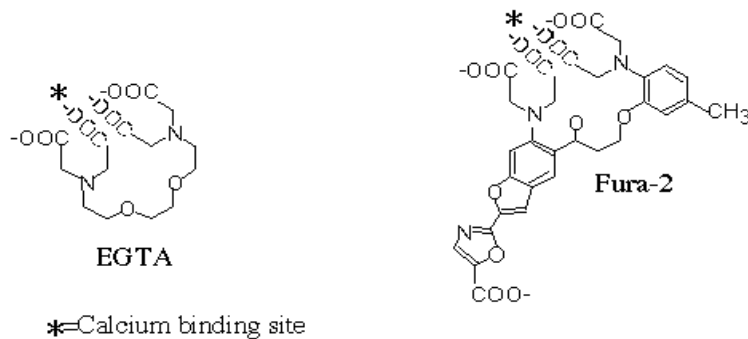


圖 2. EGTA 與 FURA-2 之結構

我們是採用螢光染劑 Fura-2 來量測胞內的鈣離子濃度。如圖所示，當 Ca^{2+} 沒有出現，結合處就會連到苯環，氮原子就很容易丟出電子；假如 Ca^{2+} 進入，就會改變其構型，電子就難以失去，密度變小，則波峰向左移。(*)處為 Ca^{2+} 的結合位，當 Ca^{2+} 與 Fura-2 結合後，就可讓其激發波峰向左移動。

在測量螢光的值上我們通常都是使用螢光的比值(ratio)來測定細胞內 Ca^{2+} 的值。

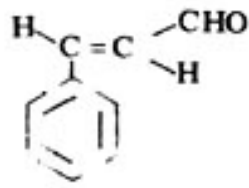
$$Ca^{2+} = K_{eff}(R-R_0)/(R_1-R)$$

③實驗細胞

再來就是實驗使用的細胞及藥品，細胞是使用牛的腎上腺髓質的嗜鉻性細胞(Bovine Chromaffin Cell)，牛的腎上腺髓質的嗜鉻性細胞，在胚胎學上及解剖學上觀察和從神經突出的神經節較為相似，受到典型的節前交感神經末梢的支配，而釋放出的神經傳導物質是乙醯膽鹼，因具有神經細胞的特性及可大量取用培養，故成為實驗使用細胞。實驗所使用的 Buffer 是 LB(Lower Tris Buffer)，讓細胞維持在等張的狀態下實驗，使實驗結果不受影響。

④化學分析

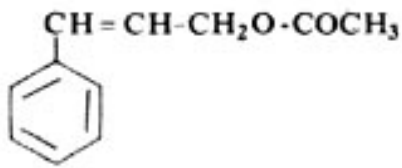
含揮發油 1.5%，油中主要成分為桂皮醛(cinnamaldehyde)，含量達 85%，並含少量桂皮酸乙酯等。



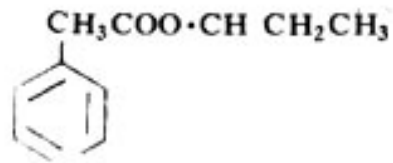
桂皮醛



桂皮酸



乙酸桂皮酯



乙醚苯丙酯

圖 3. 桂枝內所含的化學成分

二、 研究設備器材

(一)、 腎上腺髓嗜鉻性細胞

(Bovine Chromaffin Cell, B.C.)

(二)、 小鼠腦神經細胞

(三)、 Fura-2 鈣螢光指示劑

(四)、 DMPP(1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide)

(五)、 LB(Lower Tris Buffer)

(六)、 Metaphor

(七)、 Metaphor Analyst

(八)、 桂枝藥粉

三、 研究過程及方法

(一) 實驗方法：

1. 利用顯微螢光測定術 (microfluorimetry)，以 Fura-2/AM 等螢光顯示劑連續測量在各種處理下細胞內鈣離子濃度的變化。

2. 原理：

將 Fura-2 導入細胞後，Fura-2 與鈣離子結合。由於染劑與 Ca^{2+} 離子結合前後之螢光性質不同，故可用比例法測得或直接測得的螢光強度得到鈣離子濃度的相對值(340/380)，實際濃度需經校對後獲得。

(二) 實驗過程：

1. 配製溶液：

將 0.1g 桂枝藥粉加入 10c. c. 蒸餾水內煮沸，1 分鐘後取出溶液低速離心，再取上清液使用(溶液成黃褐色)。

2. 培養細胞：

在腎上腺髓嗜鉻性細胞中加入 Fura-2 染色，放置在暗處約 100 分鐘後，將其放置在儀器中。

3. 圈選細胞：

在顯微鏡下找尋細胞，並利用 Metaphor 將其圈選出來。

4. 測量變化：

利用顯微螢光測定術，測量細胞內鈣離子濃度的變化。

我們於測定開始 30 秒時加入上清液，並於第 300 秒時結束測量。

四、 研究結果

我們選取五個細胞的結果如下：

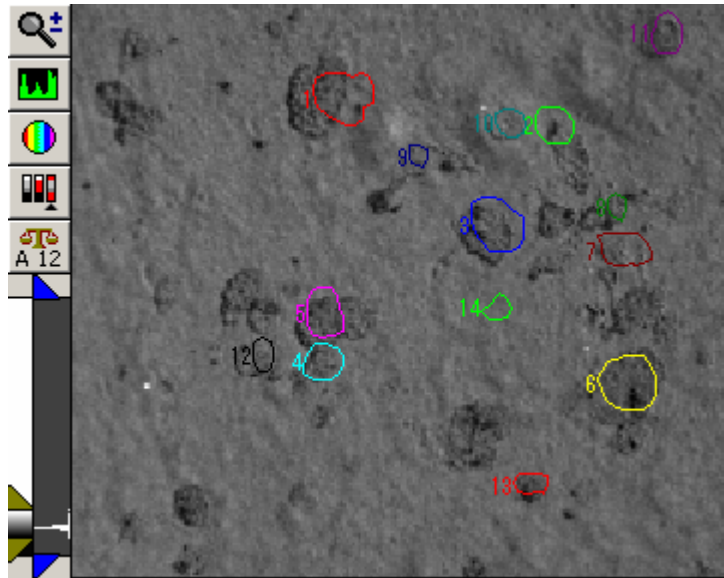


圖 4 顯微鏡下的細胞明視野圖

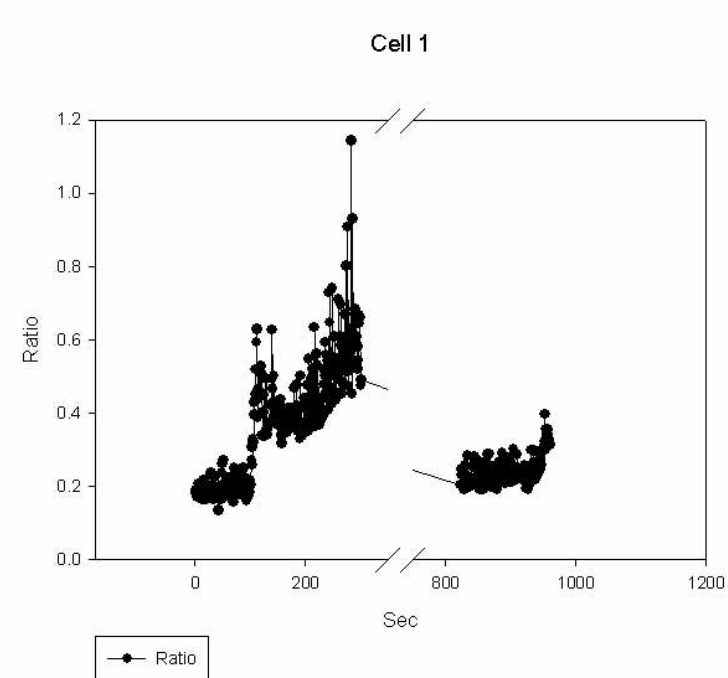


圖 5 細胞一的 Ratio 值

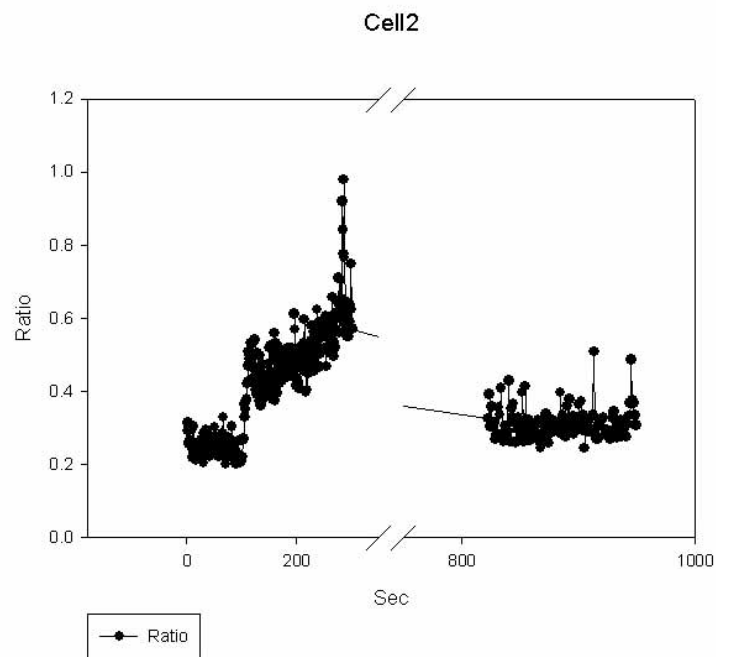


圖 6 細胞二的 Ratio 值

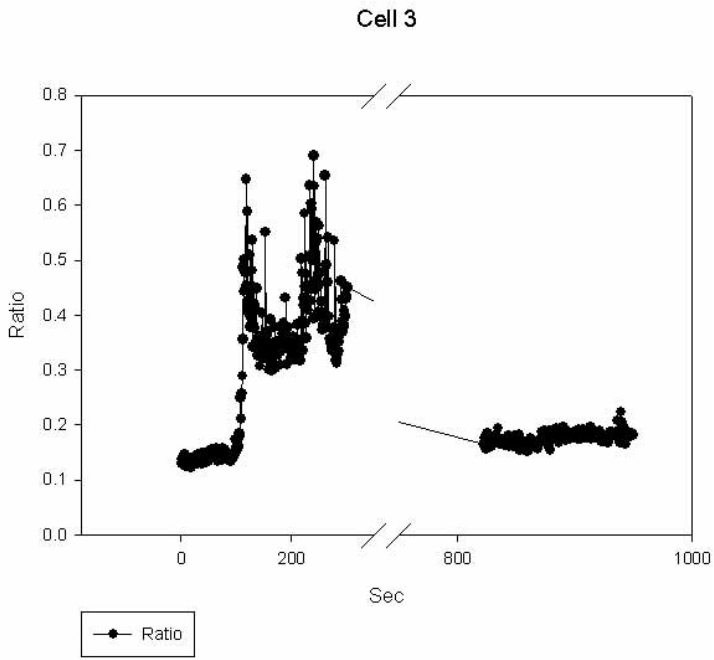


圖 7 細胞三的 Ratio 值

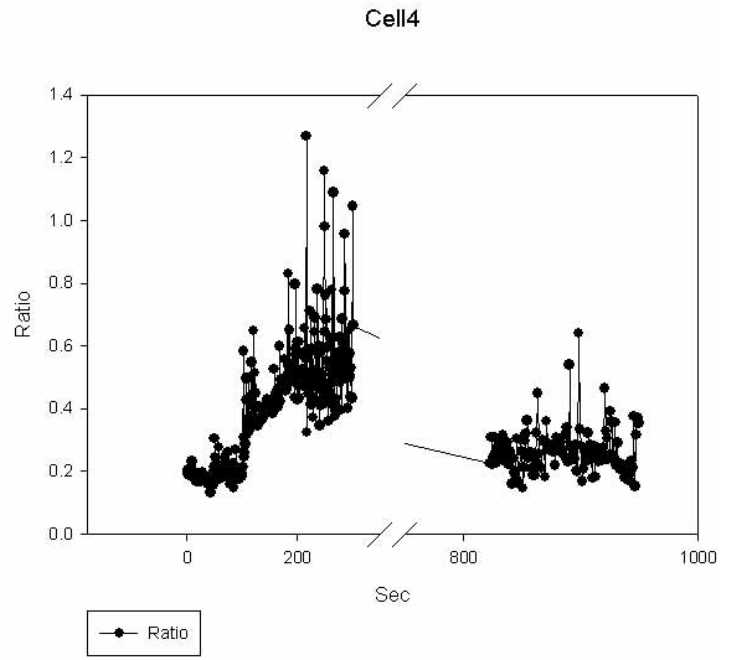
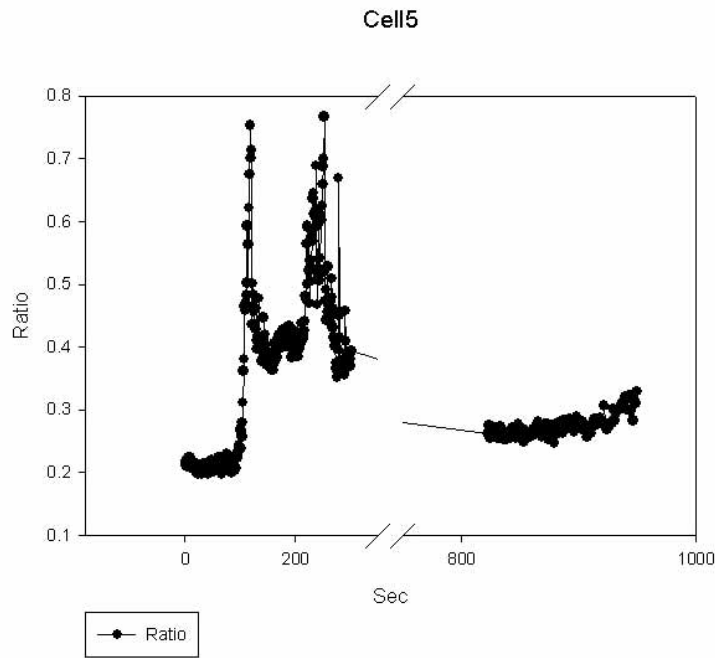


圖 8 細胞四的 Ratio 值



圖九 細胞五的 Ratio 值

由圖中可見在桂枝粹取液加入後，約在 60 秒時鈣離子濃度急速上升，在 300 秒之後漸漸下降。

五、 討論

(一)鈣離子濃度急速上升可能的原因為：

1. 所取用的細胞有可以與桂枝中的成分結合的受器。
2. 細胞十分敏感，只要周圍的溶液一有變化，即會產生反應。

(二) 反應幅度過小：

1. 桂枝粹取液濃度過低，達不到反應條件。
2. 桂枝粹取液的顏色造成光屏障，使讀數下降。

(三) 實驗結束後經過一段時間，發現細胞的 Ratio 值有回復的現象，可能的原因為：

1. 桂枝的藥效為暫時性的，不會對細胞造成長久的影響。
2. 細胞內 Ca^{2+} 在失去桂枝的刺激後，能以穩定的速率排出。

六、 結論

(一)桂枝粹取液可能使腎上腺髓嗜鉻性細胞內鈣離子濃度上升。

(二)桂枝粹取液能對細胞造成暫時性的反應。

七、 參考資料及其他

(一)、 徐銘寶 黃燕蘋 盛梓松 莫晨

川芎嗪對大鼠胰腺腺泡細胞內游離鈣離子濃度的影響及其機制研究

中華中西醫雜誌 2003 年 第 4 卷 第 5 期

(二)、 <http://www.100md.com/>

小社醫藥博覽

(三) 、D. Aunis and K. Langley , 1999, Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla

Acta Physiol Scand , 167, 89-97

(四) 、De-Ming Yang and Lung-Seng Kao, 2001, Relative contribution of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger

mitochondria and endoplasmic reticulum in the regulation of cytosolic Ca²⁺ and catecholamine secretion of bovine adrenal chromaffin cells

Journal of Neurochemistry, 76, 210-216

(五) 、Molecular Probes Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators

(六) 、S. Fedoroff and A. Richardson Protocols for Neural Cell Culture^{3rd} Ed. Chapter 2, 18, 26, 30, 31