

白香丹胶囊及白芍提取物对过表达 5 - HTR2C 诱导的海马神经元中 PKC 的影响

王杰琼 宋春红 魏盛 李芳 张浩 李艺杰 王帅

(山东中医药大学 山东 济南 250355)

摘要:目的:根据前期对愤怒模型大鼠基因芯片研究,构建大鼠 5 - HTR2C 过表达海马神经元,研究白香丹胶囊及君药白芍提取物对 5 - HTR2C 及 PKC α / β 2 的影响,为阐明白香丹胶囊调整愤怒情绪的作用机制提供科学依据。方法:采用基因工程技术,构建 5 - HTR2C 真核表达载体,应用电转染技术,使 5 - HTR2C 在大鼠原代神经元中过量表达,建立 5 - HTR2C 体外高表达的细胞模型,结合中药血清药理学,制备白香丹胶囊和白芍提取物的含药血清,以氟西汀为阳性对照药,干预转染后的神经元,提取各组蛋白后,Western - blot 技术检测 5 - HTR2C 及 PKC α / β 2 中相应基因的蛋白表达。结果:与正常组相比,5 - HTR2C 转染组中 5 - HTR2C 的蛋白表达显著升高($P < 0.001$),PKC α 的蛋白表达显著下降($P < 0.001$),P - PKC α 的蛋白表达显著升高($P < 0.001$),PKC β 2 的蛋白表达显著下降($P < 0.001$),P - PKC β 2 的蛋白表达显著升高($P < 0.001$);与 5 - HTR2C 过表达组相比,白香丹、白芍提取物及氟西汀干预组中 5 - HTR2C 的蛋白表达均显著下调($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$),PKC α 的蛋白表达均显著上调($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$),P - PKC α 的蛋白表达显著下降($P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05$),PKC β 2 的蛋白表达均显著上调($P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05$),P - PKC β 2 的蛋白表达显著下降($P < 0.001, P < 0.001, P < 0.01$)。结论:白香丹胶囊能够调整 5 - HTR2C 高表达引起的 PKC α / β 2 及其磷酸化水平的异常变化,且作用比氟西汀稍强,充分显示了整体调节的优势。但是,作为其中主要组分的白芍提取物无显著的调节作用,推测白香丹胶囊其他组分 - 香附酮及丹皮酚在愤怒致病治疗中也有一定的作用,需进一步研究。

关键词:白香丹胶囊;白芍提取物;过表达 5 - HTR2C;海马神经元;PKC α / β 2

中图分类号:R285 文献标志码:A 文章编号:1000-4719(2019)06-1143-04

Effects of *Baixiangdan* Capsule and *Radix Paeoniae Alba* Extract on PKC Expression in 5 - HTR2C Induced Hippocampal Neurons

WANG Jieqiong SONG Chunhong WEI Cheng LI Fang ZHANG Hao LI Yijie WANG Shuai
(Shandong University of TCM Jinan 250355 Shandong China)

Abstract:Objective:On the basis of the early research about gene Microarray of the rat model of anger ,we studied the effect of *Baixiangdan* Capsule and Jun - drug radix paeoniae alba extract on 5 - HTR2C and PKC α / β 2 by constructing the 5 - HTR2C overexpression hippocampus neurons. And to clarify the mechanism of the effect of *Baixiangdan* Capsule on adjusting anger emotion. Methods:First ,we prepared the 5 - HTR2C overexpression cell model by importing the 5 - HTR2C eukaryotic expression vector into rat hippocampus neurons by using electric transfection technique. Second ,we prepared the serum containing the *Baixiangdan* Capsules and white peony extract. After that ,we intervened the transfected neurons by using the serum and detected protein expression of 5 - HTR2C and PKC α / β 2 with fluoxetine as positive control. Results:Compared with the normal group in 5 - HTR2C transfected group protein expression of the 5 - HTR2C significantly increased($P < 0.001$) ,PKC α decreased significantly($P < 0.001$) ,P - PKC α significantly increased($P < 0.001$) ,PKC β 2 decreased($P < 0.001$) and P - PKC β 2 significantly increased($P < 0.001$) . Compared with the 5 - HTR2C transfected group ,in the *Baixiangdan* Capsule group ,white peony root extract group and fluoxetine group ,the 5 - HTR2C protein expression was significantly lowered($P < 0.01, P < 0.001, P < 0.05$) , PKC α significantly upregulated($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$) ,P - PKC α significantly decreased($P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05$) ,PKC β 2 significantly raised($P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05$) and P - PKC β 2 significantly with decreased($P < 0.001, P < 0.001, P < 0.01$) . Conclusion:*Baixiangdan* Capsule can adjust the abnormal changes of PKC α / β 2 and its phosphorylation level caused by 5 - HTR2C high expression ,and the effect is slightly stronger than fluoxetine ,which shows the advantages of overall regulation. However as one of the main components ,the peony extract had no significant regulatory effect. It is presumably other components - incense of *Baixiangdan* Capsule such as cyperone and paeonol also has a certain role in anger pathogenic treat-

基金项目:国家自然科学基金项目(81603510 81403294);山东省中医药科技发展计划项目(2015 - 021)

作者简介:王杰琼(1982 -) ,女 山东寿光人 副教授 博士 研究方向:情志病症发病机理及调肝方药药理研究。

通讯作者:宋春红(1980 -) ,女 山东郓城人 副教授 博士 研究方向:情志病症发病机理及药物干预机制 E - mail:sch - 64552@126.com。

ment. So the above research findings need further research.

Keywords: *Baixiangdan* Capsule; White peony root extract; 5 - HTR2C; hippocampus neurons; PKC α/β 2

中医“肝主疏泄”理论认为愤怒、抑郁是肝疏泄失常的典型表现,且二者联系密切^[1]。其中枢神经生物学机制在整体上与调节下丘脑-垂体-肾上腺轴有关。本课题组前期从分子生物学角度,对调肝方药白香丹胶囊治疗愤怒致病的机理进行了初步探索。通过基因芯片技术大规模、高通量检测愤怒、郁怒模型大鼠及白香丹胶囊干预模型大鼠的海马基因表达,发现愤怒、郁怒情志可导致海马多种基因的表达水平改变,其中愤怒组中 5 - HTR2C 基因表达差异性增高^[2],且白香丹胶囊治疗组能够纠正这一现象。

研究报道 5 - HTR2C 属于 Gq 蛋白偶联受体,激活后可经 PLC 介导,进而激活 PKC 通路。H. R. Melowic 等^[3]学者研究发现 PKC α 、 β 2 C2 区的 Thr250 在受到 PMA 刺激时会发生磷酸化,是 PKC 活化的标志;而 PKC α 、 β 2 可以被酪氨酸激酶 Src 家族磷酸化,激活 Ras/ERK 相关信号通路。因此,本研究选择 PKC 第二信使通道为研究对象,观察白香丹胶囊及君药白芍提取物与 PKC α 、 β 2 的关联性,探讨该方药的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 24 h 内 Wistar 新生鼠(由山东中医药大学动物中心提供,许可证号: SCXK(鲁)20050015)。

1.1.2 细胞培养试剂 Neurobasal (500 mL, cat. no. 12348017, Gibco), DMEM/F12 1:1 (500 mL, cat. no. SH30023.01B, Hyelone), B27 (10 mL, cat. no. 0050129SA, Gibco), Fetal Bovine Serum (100 mL, cat. no. 12003C, Sigma - JRH), L - Glutamine (200 mM, 100 mL, cat. no. 25030 - 081, Gibco), Poly - D - lysine (5 mg, cat. no. P6407, sterile lyophilized 135kD, Sigma)。

1.1.3 电转染试剂 Amaxa[®] Rat Neuron Nucleofector[®] Kit 电转染试剂盒 (cat. No. VPG - 1003, 德国, Amaxa 公司)。

1.1.4 载体构建试剂 UNIQ - 10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (SK1321, 上海生工生物工程技术服务有限公司); 克隆质粒载体 PMD18 - T、EcoR I、Hind III、ApaI、BamHI (TAKARA 公司); DNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司); 质粒回收提取试剂盒 (天泽基因工程有限公司); 真核表达质粒载体 pcDNA3.1 - His - lacZ (Invitrogen 公司); 大肠杆菌菌株 EcoLi. DH5 α (济南博倍兴有限公司); 引物合成、测序鉴定服务 (由南京金斯瑞生物技术有限公司提供)。

1.1.5 Western - blot 试剂 5 - HTR2C 一抗 (sc - 17797, Santa cruz); PKC α 一抗 (ab32376, abcam); P - PKC α 一抗 (ab23513, abcam); PKC β 2 一抗 (ab32026, abcam); P - PKC β 2 一抗 (ab75837, abcam); β - actin 一抗 (sc - 47778, Santa cruz); HRP 标记山羊抗兔二抗 (SB200, 晶美生物技术有限公司); HRP 标记山羊抗鼠二抗 (SB200, 晶美生物技术有限公司)。

1.1.6 实验药物 白香丹胶囊 (产品批号: 20110220,

青岛阳光海川医药科技发展有限公司); 白芍提取物 (产品批号: 20110324, 青岛阳光海川医药科技发展有限公司); 盐酸氟西汀胶囊 (百忧解) (产品批号: 0955A 2010.08, 礼来苏州制药有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 白香丹及白芍提取物含药血清制备 将大鼠随机分为 3 组, 每组 6 只, 分别为白香丹胶囊给药组、白芍提取物组和氟西汀给药组。白香丹胶囊溶液 1 mL/(100 g · d) [相当于成人临床 8 倍剂量, 1 mL 药液含原生 9 g], 白芍提取物给药剂量为 40 mg/(kg · d) (相当于芍药苷 14 mg/(kg · d)), 氟西汀给药剂量为 10 mg/(kg · d), 每天给药两次, 连续给药 3 d, 末次给药后, 下腔静脉取血, 其中白香丹胶囊给药组、白芍提取物组取血时间根据药时曲线确定为末次给药后 2 h^[4], 氟西汀组的取血时间则根据文献^[5]所说末次给药后 3.7 h。之后, 常温放置 1 h, 3000 r/min 4 °C 离心 15 min, 收集上清, 以备检测。

1.2.2 5 - HTR2C 高表达神经元模型制备 根据前期研究^[6]提取大鼠海马中 mRNA, 采用 RT - PCR 对基因 5 - HTR2C 进行克隆, 测序后应用基因重组技术构建真核表达载体, 按质粒回收提取试剂盒说明书方法提取 5 - HTR2C 重组质粒。

另取新生 24 h 内 Wistar 乳鼠, 断头, 分离海马, 制备细胞悬液, 将 3 μ g 5 - HTR2C 重组质粒与 100 μ L 细胞悬液合并, 按 maxa[®] Rat NeuronNucleofector[®] Kit 电转染试剂盒说明书方法进行电转染; 电转后, 细胞孵育在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中, 4 h 后用新鲜培养基 II (Neurobasal:FBS:B27:L - Glutamine = 95:5:2:1) 全量替换培养基 I (DMEM/F12:Fetal Bovine Serum = 90:10), 以便移除细胞碎片; 24 h 后用新鲜培养基 II 半量替换; 电转 48 h 后可以提取细胞蛋白进行相关基因表达检测。

1.2.3 Western - blot 法检测蛋白表达及磷酸化水平

将“1.2.1”获得含药血清于细胞转染后 24 h 干预模型细胞, 共培养 24 h 后, 提取蛋白, 即得 5 - HTR2C 转染组 (5 - HTR2C Group)、5 - HTR2C 转染 + 白香丹组 (5 - HTR2C + BXD Group)、5 - HTR2C 转染 + 白芍提取物组 (5 - HTR2C + Radix paeoniae alba Group)、5 - HTR2C + RPA Group) 和 5 - HTR2C 转染 + 氟西汀组 (5 - HTR2C + FXT Group) 样本; 另设正常细胞组 (Normal Group) 和空质粒组 (Vector Group) 作为对照。以 β - actin 作为内参, 采用 Western - blot 的方法对上述基因进行检测。

所用抗体与 5% 脱脂牛奶稀释比例如下: 5 - HTR2C 一抗: 1:1000; PKC α 一抗: 1:1000; P - PKC α 一抗: 1:1000; PKC β 2 一抗: 1:500; P - PKC β 2 一抗: 1:5000; β - actin 一抗: 1:2000; HRP 标记山羊抗兔二抗: 1:2000; HRP 标记山羊抗鼠二抗: 1:2000。

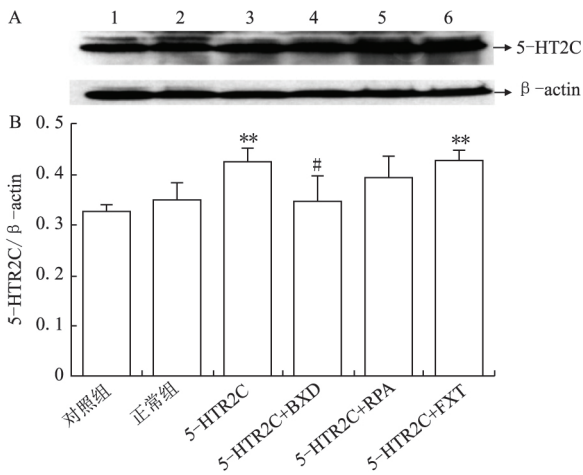
2 结果

2.1 5 - HTR2C 的蛋白表达

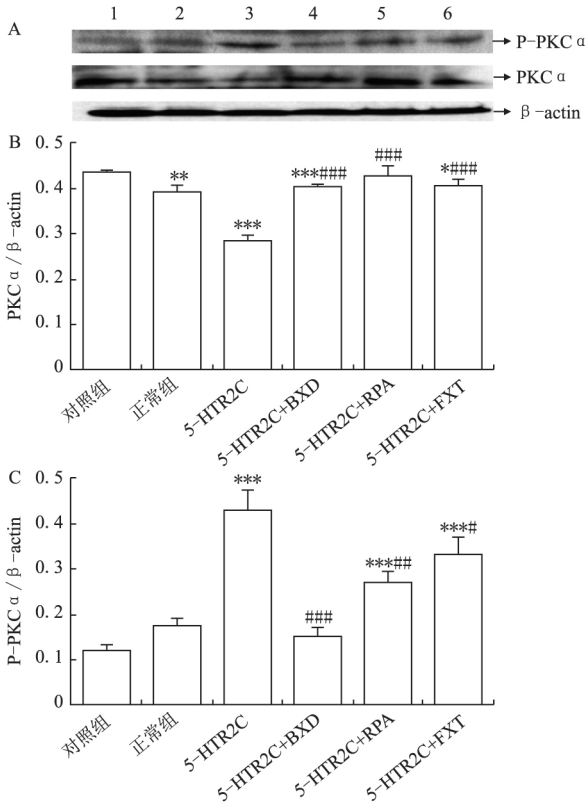
见图 1。

结果显示,与正常组相比,5-HTR2C 转染组中 5-HTR2C 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$);与 5-HTR2C 转染组相比,白香丹干预组中 5-HTR2C 的蛋白表达均显著下调 ($P < 0.05$),但白芍提取物及氟西汀干预组中 5-HTR2C 的蛋白表达均无显著性差异。

2.2 PKC α 、PKC β 2 的蛋白表达及其磷酸化水平
见图 2 ~ 图 3。



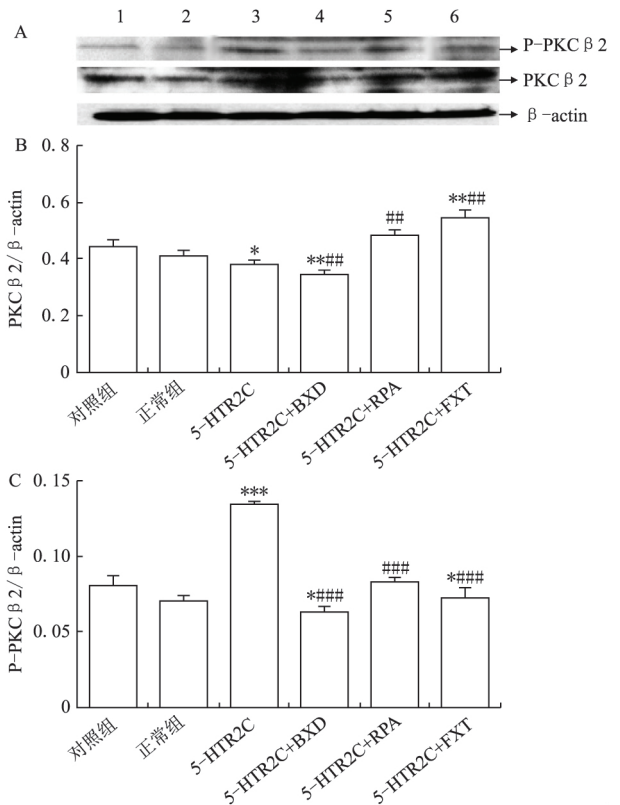
注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与 5-HTR2C 组比较 # $P < 0.05$
图 1 5-HTR2C 蛋白表达



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;
与 5-HTR2C 组比较 # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$
图 2 PKC α 的蛋白表达

结果显示,与正常组相比,5-HTR2C 转染组中 PKC α 的蛋白表达显著下降 ($P < 0.001$),5-HTR2C 转染组中 P-PKC α 的蛋白水平显著升高 ($P < 0.001$);与 5-HTR2C 转染组相比,白香丹、白芍提取物及氟西汀干预组中 PKC α 的蛋白表达均显著上调

($P < 0.05$ $P < 0.01$ $P < 0.01$),P-PKC α 的蛋白水平显著下降 ($P < 0.001$ $P < 0.01$ $P < 0.05$)。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;
与 5-HTR2C 组比较 ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

图 3 PKC β 2 的蛋白表达

结果显示,与正常组相比,5-HTR2C 转染组中 PKC β 2 的蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$),5-HTR2C 转染组中 P-PKC β 2 的蛋白水平显著升高 ($P < 0.001$);与 5-HTR2C 转染组相比,白香丹、白芍提取物及氟西汀干预组中 PKC β 2 的蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$ $P < 0.01$ $P < 0.01$),P-PKC β 2 的蛋白水平显著下降 ($P < 0.001$ $P < 0.001$ $P < 0.001$)。

3 讨论

3.1 白香丹胶囊对 5-HT2C 受体的调节作用

越来越多的证据表明,5-HT2C 受体拮抗是非典型抗精神病药物 (APS) 发挥临床疗效的重要机制之一。非典型抗精神病药通过对 5-HT2C 受体的拮抗,增强额叶皮质的 DA 释放从而起到改善认知功能和阴性症状的效果。但是,尚无 5-HT2C 受体拮抗剂应用于临床。前期研究发现愤怒应激大鼠脑组织及血清中 5-HT 的含量降低^[7],因此本研究选择 5-HT 再摄取抑制剂氟西汀作为阳性药。

本研究通过观察调肝方药白香丹胶囊及其主要组分白芍提取物对 5-HTR2C 高表达细胞模型的作用特点,发现白香丹胶囊能够显著下调 5-HTR2C 的表达,而白芍提取物及 5-HT 再摄取抑制剂氟西汀作用稍显不足。

本课题组前期研究已得知白香丹胶囊能够调节愤怒模型大鼠海马中 5-HTR2C 的高表达,但复方中的何种成分起主要作用尚不可知,由本研究的结果可初步了解到白芍提取物能够对抑制 5-HTR2C 表达起到

一定作用,但是尚不及复方作用强,提示该复方中其他组分能够在 5-HTR2C 的调节作用中也可能起到一定的作用,而氟西汀虽然能够增加 5-HT 的含量,但是对于 5-HTR2C 的调节作用很小,可推测氟西汀的作用机制不在此。

3.2 白香丹胶囊对 PKC 的调节作用

5-HTR2C 是 G 蛋白偶联受体,其转导机制通过偶联 Gq 和 G11 蛋白,激活 PLC 促进磷酸肌醇水解,进而启动细胞反应。当细胞受刺激时,PKC 转化为活化型,活化的 PKC 进一步修饰某些蛋白质或酶的磷酸化反应,表现其信息效应^[8]。近几年,已有研究报道 PKC 的表达在情绪稳定剂发挥效应的机制中起着至关重要的作用^[9],表明 PKC 与人的情绪和感情的表达密切相关。

本研究选择海马神经元为研究对象,发现在 5-HTR2C 转染组即 5-HTR2C 高表达组,PKC α / β 2 蛋白表达是下调的,磷酸化 PKC α / β 2 (P-PKC α / β 2) 蛋白水平却是上调的。发现白香丹胶囊、白芍提取物以及氟西汀均能纠正 PKC α / β 2 和 P-PKC α / β 2 的异常变化。但是对于 PKC α / β 2,白芍提取物的作用不明显,白香丹胶囊的作用较氟西汀要显著;对于 P-PKC α / β 2,白香丹胶囊下调该蛋白表达的能力较氟西汀要强,白芍提取物的作用在两者之间;提示白香丹胶囊可能上调 P-PKC α / β 2 的水平,白芍提取物在此作用环节尚显不足,可能是因为白香丹胶囊中的其他物质在治疗上起到协同作用,尚需进一步探明。

已有研究表明心理精神疾病患者 PKC 的含量是不正常的,例如:具有心理障碍的青少年自杀患者额叶前部活化 PKC 的磷脂酶 C 含量减少^[10],长期应用锂治疗双相情感患者可以引起脑内 PKC 含量的减少^[9]。另外,Hahn 等^[11]发现在抑郁障碍患者中存在 PKC 功能的亢进,而许晶等^[12]认为抑郁大鼠大脑皮层 PKC 蛋白表达较对照组减弱。可见各学者的研究结果并不一致。

本研究结果与以往类似研究有不同之处。具体原因分析如下:已有研究表明,细胞新合成的 PKC,需要经历一系列磷酸化后修饰成熟过程,才能有效接受上游信号刺激而活化,完成信号转导功能^[13]。秦至臻等^[14]在综述中提到,PKC 的成熟过程可以归结为如下几步骤:①新合成的 PKC 在细胞膜上接受 PDK1 对其 A-loop 的磷酸化;②PDK1 从 PKC 上解离,随后 TM 和 HM 发生 mTOR 调控的自体磷酸化,这三个位点的磷酸化帮助 PKC 正确折叠,此后形成一个稳定的闭合态的构象,储存在细胞浆中,准备接受 DAG 等第二信使的刺激活化。PKC α / β 2 相应的氨基酸残基在这三个磷酸化位点磷酸化过程中起到关键作用,因此,可以考虑 PKC α / β 2 在 5-HTR2C 高表达组表达下调可能是 5-HTR2C 的高表达影响 PKC 成熟过程中某些物质的作用,尚需进一步确证。另一方面,PKC 活化能增加谷氨酸等兴奋性神经递质释放,诱发持续同步放电,参与癫痫的兴奋过程。PKC α 可能参与谷氨酸致痫的细胞内机制^[15]。前期研究中发现 PMS 肝气逆证模型大鼠海马中谷氨酸的含量是升高的^[16],这与本研究中 P-PKC α / β 2 在 5-HT2C 高表达组中表达升高是一致的,与癫痫的发病类似,PKC α / β 2 的活化能够

增加谷氨酸等兴奋性神经递质的释放,参与愤怒致病的过程。

综上所述,由于 5-HTR2C 高表达引起的 PKC 及 P-PKC 发生了不同程度的变化,白香丹胶囊能够调整该变化,且作用比氟西汀稍强,推测可能作为 5-HT 再摄取抑制剂的氟西汀在愤怒及致病治疗中作用比较局限,而白香丹胶囊作为组分配伍的药物充分显示了复方整体调节的优势。作为其中主要组分的白芍提取物虽然有调节作用,但不及复方,可见白香丹胶囊中的其他组分也发挥了不可忽视的作用,因此,对于白香丹胶囊其他组分的进一步研究,有助于了解白香丹胶囊的深层作用机制。

参考文献

- [1] 严灿,徐志伟.肝主疏泄调畅情志功能的中枢神经生物学机制探索[J].中国中西医结合杂志,2005,25(5):459-461.
- [2] 王杰琼,张惠云.愤怒、郁怒反应模型大鼠海马 5-HTR2C 的基因表达[J].中国药理学通报,2011,27(3):325-328.
- [3] HR Melowic,RV Stahelin,NR Blatner,et al. Mechanism of Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C θ [J].J Biol Chem,2007,282(29):2146-2147.
- [4] 王杰琼,高冬梅,于艳红,等. HPLC 法对白香丹胶囊中芍药苷在大鼠体内药时曲线的测定[J].世界科学技术:中医药现代化,2016,18(2):302-306.
- [5] 邵继红,韩珍,杨艳,等.白芍抗抑郁作用的实验研究[J].宁夏医学杂志,2008,30(6):490.
- [6] 王杰琼,高冬梅,于艳红,等.5-HTR2C 重组质粒电转染至大鼠海马神经元对细胞活性的影响[J].世界科学技术:中医药现代化,2015(4):794-799.
- [7] 詹向红,李伟,赵君玫,等.慢性愤怒应激对大鼠衰老进程及其神经内分泌免疫机制的影响[J].中国中医药杂志,2010,25(1):111-113.
- [8] DiMatteo V,Marisa C,DiGiulio C,et al. Role of serotonin(2C) receptors in the control of brain dopaminergic function[J].Pharmacology Biochemistry and Behavior,2002,71(4):727.
- [9] Manji HK,Lenox RH,Ziskind. Protein kinase C signaling in the brain:molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness[J].Biol Psychiatry,1999,46(10):1328-1351.
- [10] Manji HK,McNamara R,Chen G. Signalling pathways in the brain:cellular transduction of mood stabilisation in the treatment of manic depressive illness[J].Aust NZJ Psychiatry,1999,33:65-83.
- [11] Hahn CG,Umapathy,Wang HY,et al. Lithium and valproic acid treatments reduce PKC activation and receptor-G protein coupling in platelets of bipolar manic patients[J].J Psychiatr Res,2005,39(4):355-363.
- [12] 许晶,刘晶.行为缺损抑郁大鼠脑环磷酸腺苷含量及蛋白激酶 C 表达的变化[J].中华精神科杂志,2002,35(3):173-176.
- [13] Kim SH,Kim MK,Yu HS,et al. Electroconvulsive seizure increases phosphorylation of PKC substrates,including GAP-43,MARCKS and neurogranin,in rat brain[J].Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry,2010,34(1):115-121.
- [14] 秦至臻,戚欣,李静.蛋白激酶 C 分子的成熟与活化[J].现代生物医学进展,2011,11(15):2992-2995.
- [15] Fuortes MG,Faria LC,Merlin LR. Impact of protein kinase C activation on epileptiform activity in the hippocampal slice[J].Epilepsy Res,2008,82(1):38-45.
- [16] 孙丽.经前期综合征肝气逆证大鼠模型血清及不同脑区孕酮及氨基酸检测分析[D].济南:山东中医药大学,2008.