

寒热性中药的成分对薄荷醇受体离子通道蛋白功能的影响

隋 峰,张畅斌,杜新亮,杨 娜,赵保胜,翁小刚,刘洪斌,李兰芳,郭淑英,霍海如*,姜廷良
(中国中医科学院中药所唐氏中药研究中心,北京 100700)

[摘要] **目的:**探讨寒热中药成分对瞬变感受器离子通道蛋白(TRP)家族中薄荷醇受体离子通道蛋白(TRPM8)功能的影响。**方法:**以薄荷醇为通道激动剂,采用共聚焦显微成像法在体外观察原代培养背根神经节(DRG)神经元胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。**结果:**寒性中药的成分黄芩甙和大黄素均可显著上调 TRPM8 通道蛋白的功能;热性中药的成分桂皮醛可显著下调 TRPM8 通道蛋白的功能,热性成分吴茱萸碱对 TRPM8 通道蛋白功能虽未见显著影响,但有下调趋势。**结论:**寒热性中药成分对 TRPM8 功能的调节可能与中药的寒热药性相关,这可能是寒热性中药临床上发挥寒热调节作用的分子机制之一。

[关键词] 中药药性;瞬变感受器离子通道蛋白;背根神经节神经元

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0068-03

瞬变感受器电位离子通道蛋白(Transient receptor potential ion channel protein, TRPs)是近年来发现存在于细胞膜或胞内细胞器膜上的一类非选择性阳离子通道,其编码的蛋白质广泛分布于包括人类在内的哺乳动物不同组织中^[1~2]。TRPM8 是 TRP 家族中亚家族成员之一,在感觉神经元中呈多量表达。研究表明,TRPM8 作为冷觉感受体之一,与机体的寒热调节关系密切^[3]。其被激活后以钙离子等阳离子进入胞内和胞内细胞器上相应通道开放后释放等形式转导外界冷刺激信号^[4~5]。因此,本实验在以往就寒热性中药成分对 TRPM8 基因表达研究的基础上,进一步以其受体激动剂-薄荷醇(Menthol)为工具药,以细胞内游离钙变化为评价指标,探讨寒热性中药的成分在 TRPM8 环节上的干预和调节作用机理,以期发现与寒热特征相关的生物学内涵。

1 材料

1.1 实验动物 新生 SD 大鼠购于中国中医科学院实验动物中心,许可证号:SCXK-(军)2002-001。

1.2 主要试剂 喜树碱(CPT,纯度>99%)购于四川黄石飞云制药有限公司;Leibovitz's L15 培养基、

Neurobasal 培养基、胎牛血清(FBS)、葡萄糖、B27 添加剂、胶原酶 I 均购自 Gibco 公司;神经生长因子(NGF),多聚赖氨酸(PLL)、层黏连蛋白(LN)、胰蛋白酶(trypsin)均购自 Sigma 公司;桂皮醛,购于北京旭东化工厂;黄芩苷、大黄素、吴茱萸碱及薄荷醇均购于中国药品生物制品检定所;Fluo-4, F-127, Invitrogen 产品。

1.3 主要仪器 共聚焦显微成像系统,OLYMPUS-CK 光学显微镜,均为日本奥林巴斯公司产品;BB16 型 CO₂ 培养箱,德国 Heraeus 公司;医用净化工作台,北京半导体设备一厂;BDS260 电热三用水箱,北京医疗设备厂。

2 方法

2.1 背根神经节(DRG)神经元的分离与培养 参考本课题组以往建立的方法^[6],将新生大鼠乳鼠置于 75% 乙醇消毒后剪除头部,在解剖显微镜下用眼科剪从背部剖开皮肤并沿脊椎将髓腔打开,暴露椎管内的脊髓,用显微镊小心将脊髓两侧 DRG 从椎管内取出,剔除神经根和包膜后,置于 4℃ L15 培养基中备用。将 DRG 自 L15 培养基移入 0.1% 胶原酶中 37℃ 消化 15 min 后,用吸管小心吸除胶原酶,再换入 0.25% 胰蛋白酶(trypsin)内,37℃ 消化 40 min。1000r·min⁻¹离心 5 min,小心吸去胰酶消化液,加入 FBS 中止消化,1000r·min⁻¹离心 5 min,吸除 FBS 换入常规培养基,并用细头吸管反复吹打制

[收稿日期] 2009-08-21

[基金项目] 国家自然科学基金(30672677);973 项目(2006CB504701)

[通讯作者] *霍海如,Tel:(010)64041008;E-mail:huohr@yahoo.com.cn

成单细胞悬液。细胞计数后,按 10^6 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ 密度接种于预先已包被 PLL 和 LN 的 35 mm 细胞培养皿内,37 ℃,5% CO $_2$ 条件下培养 48 h 后,换入终浓度 20 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 的 CPT 培养基中。作用 48 h 后,更换 DRG 常规培养基,每周换液 2 次,观察 DRG 神经元的形态特征。

2.2 所试药物成分的浓度及刺激温度的选择 根据相关的参考文献及我室以往的研究结果,选择所试成分的试验浓度及作用时间,并在 HepG $_2$ 细胞株上进行体外毒性测试;在实验时观察对原代 DRG 神经细胞的活性状态的影响。

2.3 DRG 神经细胞的体外药物处理 纯化后的细胞随机分组后,除对照组外均加入不同药物,37 ℃ 刺激各组放入 CO $_2$ 培养箱中继续培养 24 h;39 ℃ 负荷各组,在 CO $_2$ 培养箱中(37 ℃)作用 22 h 后,放入 39 ℃ 温度条件下继续刺激 2 h;19 ℃ 负荷各组,在 CO $_2$ 培养箱中(37 ℃)作用 21 h 后,放入 19 ℃ 温度条件下继续刺激 3 h,然后将含有药物的培养液吸除,并用 PBS 缓冲液冲洗 3 次,加入终浓度为 5 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 的 Fluo-4 AM 荧光染料(含 0.1% F-127),在 25 ℃ 避光负载 30 min,然后用 PBS 缓冲液冲洗 3 次,以除去多余的染料,加入终浓度为 100 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 的薄荷醇进行胞内 Ca $^{2+}$ 浓度检测。

2.4 激光共聚焦显微镜观察及检测 将培养皿放在激光共聚焦显微镜的载物台上,选定荧光显色好的细胞视野,再用氩离子激光预扫描,然后设置以下各种条件:1. 激光波长为 488 nm,发射波长 516 nm;2. 扫描方式:xyt(时间扫描);3. 扫描密度:512 $\times$ 512(分辨率);4. 物镜倍数:40;5. 电子放大倍数(zoom):1;6. 激光功率:1.4%;7. 时间间隔:5 s。再根据预扫描的结果选取最清晰的焦平面进行扫描,然后随机圈定细胞,进行动态观察,同步记录背景荧光值。记录每个细胞的荧光强度变化并随机软件自动分析,细胞内 Ca $^{2+}$ 浓度变化以荧光强度值(Intensity)表示,此数值与细胞[Ca $^{2+}$] $_i$ 变化成正相关。胞内 Ca $^{2+}$ 浓度变化程度(Δ [Ca $^{2+}$] $_i$)以给药前后荧光强度变化值与给药前荧光强度值的百分比值来表示,即: Δ [Ca $^{2+}$] $_i$ =(给药后的荧光强度峰值 F-给药前的荧光强度基础值 F $_0$)/给药前的荧光强度基础值 F $_0$ $\times$ 100%。所有试剂在有效剂量范围内都经证明不产生荧光干扰,染色条件和激光扫描参数在整个实验中不变。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 11.0 软件进行数据处理,运用方差分析和组间 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 寒热中药的成分在测试温度范围内对 DRG 神经元活性的影响 在所测试药物成分的药物浓度和温度范围内,DRG 神经元的形态完整,贴壁良好,折光度明显,神经突起相互连接成网络,提示功能状态良好,测试温度和药物成分在所选的范围内未对其活性产生明显影响。

3.2 不同温度条件下寒性中药的成分对 TRPM8 通道效应的影响 37 ℃ 条件下,寒性中药的成分对 TRPM8 通道效应均未见显著影响(*P* > 0.05),但黄芩甙对其有一定的上调趋势;寒性中药成分对热(39 ℃)处理后的 DRG 神经元通道效应的作用较为明显,其中,大黄素的高、中剂量组、黄芩甙高剂量组显著上调 TRPM8 通道效应(*P* < 0.01 或 *P* < 0.05);寒性中药的成分对寒(19 ℃)处理后的 DRG 神经元通道 TRPM8 的影响均不明显,各组均未显著变化(*P* > 0.05),见表 1。

表 1 不同温度条件下寒性中药的成分对 TRPM8 通道效应的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 (μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)	Δ [Ca $^{2+}$](%)		
37 ℃	-	117.05 $\pm$ 17.28	121.14 $\pm$ 12.09	115.49 $\pm$ 11.29
39 ℃	-	-	101.50 $\pm$ 9.82 ²⁾	-
19 ℃	-	-	-	135.54 $\pm$ 12.80 ²⁾
黄芩苷	50	121.70 $\pm$ 18.05	111.43 $\pm$ 12.46 ³⁾	138.05 $\pm$ 14.28
	25	119.20 $\pm$ 14.19	109.19 $\pm$ 11.50	135.90 $\pm$ 13.05
	12.5	108.97 $\pm$ 13.46	107.80 $\pm$ 13.14	134.02 $\pm$ 11.08
大黄素	60	112.65 $\pm$ 12.18	115.93 $\pm$ 15.28 ⁴⁾	142.02 $\pm$ 11.52
	30	115.41 $\pm$ 10.27	111.83 $\pm$ 13.27 ³⁾	138.10 $\pm$ 13.43
	15	117.83 $\pm$ 12.61	104.08 $\pm$ 14.82	136.00 $\pm$ 12.56

注:与 37 ℃ 相比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与 39 ℃ 相比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01;与 19 ℃ 相比⁵⁾ *P* < 0.05(下同)

3.3 不同温度条件下热性中药的成分对 TRPM8 通道效应的影响 37 ℃ 条件下,热性中药的成分对 TRPM8 通道效应的影响均未见显著差异(*P* > 0.05),但两成分的各剂量组具有下调趋势;热性中药的成分对热(39 ℃)负荷后的 DRG 神经元 TRPM8 通道效应均未见显著影响(*P* > 0.05),但吴茱萸碱各剂量组均有下调趋势;热性中药的成分对寒(19 ℃)负荷的 DRG 神经元 TRPM8 通道效应的作用较为明显,其中,桂皮醛高剂量组可显著下调寒负荷后的 TRPM8 通道的效应(*P* < 0.05),其余各组虽未见

显著差异,见表 2。

表 2 不同温度条件下热性中药的成分
对 TRPM8 通道效应的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		$\Delta[\text{Ca}^{2+}](\%)$		
37 ℃	—	114.86 ± 14.16	116.16 ± 13.78	115.30 ± 11.86	
39 ℃	—	—	99.95 ± 10.85 ²⁾	—	
19 ℃	—	—	—	135.71 ± 14.63 ²⁾	
吴茱萸碱	15	102.54 ± 10.70	93.84 ± 11.34	132.60 ± 14.29	
	7.5	104.44 ± 11.42	97.71 ± 11.28	133.68 ± 14.06	
	3.75	104.23 ± 11.98	99.56 ± 12.54	135.21 ± 13.57	
桂皮醛	60	101.60 ± 15.08	100.14 ± 10.45	123.36 ± 12.80 ³⁾	
	30	103.36 ± 15.49	98.50 ± 9.20	127.28 ± 13.85	
	15	104.72 ± 15.17	98.32 ± 11.51	134.45 ± 12.65	

4 讨论

前期我们参考相关文献,通过优化各环节的试验条件,建立了稳定的 DRG 神经元的体外培养体系。在此基础上,采用荧光定量 PCR 的方法在 mR-NA 层面上研究了寒热性中药的成分对 TRPM8 表达的影响。鉴于基因表达从转录起始到最终的具有特定生理功能的蛋白需经过多个复杂的调节过程和环节,本部分实验又采用共聚焦显微成像法进一步探讨寒热性中药成分对 TRPM8 的效应环节- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 调节功能的影响。

钙离子在机体内广泛存在,作为各种信号传递的第二信使,可将各种不同胞外刺激信号转换成胞内功能各异的活动,从收缩到分泌,从增殖到死亡。钙离子所扮演的这种多效性角色源于其被胞外激动剂激活后可在胞内形成多种时空变化,然后募集相应的效应器而启动特定的生理功能。现已明确,TR-PM8 作为冷感受通道,其信号介导和传递主要以通道开放后 Ca^{2+} 等阳离子进入的方式发挥作用^[7~9]。

从本实验的总体来看,来自寒性中药的单体成分可上调 TRPM8 通道效应,热性中药的成分可下调 TRPM8 通道介导的胞内 Ca^{2+} 水平。这些研究结果与前期基因表达的检测结果相似,表明多数寒热性中药的成分对 TRPM8 mRNA 表达的影响作用亦同样表现在通道蛋白的效应环节上。本研究尚发现,寒性成分对热负荷后 DRG 神经元 TRPM8 通道的影响显著,而热性成分对寒负荷后的 TRPM8 通道的影响更为明显,这似与中医临床上“寒者热之,热者寒之”的治则相吻合,以此推之,寒热性中药的成分对 DRG 神经元 TRPM8 通道的调节作用可能是寒热性中药临床上发挥调寒调热作用的分子机理之一。本

实验也发现一些基因表达和蛋白终效应并不完全一致,如桂皮醛的高剂量组在 19 ℃ 温度条件下对蛋白的终效应-TRPM8 通道介导的胞内 Ca^{2+} 水平有显著影响,而在相应的基因表达实验中却未发现它们对相应通道 mRNA 表达有显著影响。这些实验结果进一步表明,从基因的转录起始、转录过程、翻译到翻译后的基因调节过程,转录产物和蛋白丰度乃至蛋白的活性和功能可能会不一致,有些在基因转录阶段发挥生物效应的成分未必能够完全体现在最终的功能上,而有些成分可能只针对蛋白翻译或合成后的环节起作用,并没有影响基因的转录过程(如桂皮醛对 TRPM8 通道的影响),因此,在前期基因的 mR-NA 表达层面上未能显示出差异,当然,其具体差异环节和更深入的分子机理仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Clapham DE. SnapShot: mammalian TRP channels[J]. Cell, 2007, 129(1): 220.
- [2] Caterina MJ. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 292: 64.
- [3] Koji T, Kiyoshi M, Kaori K, *et al.* Application of menthol to the skin of whole trunk in mice induces autonomic and behavioral heat-gain responses [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 293: 2128.
- [4] Sidorov VY, Holcomb MR, Woods MC, *et al.* Effects of unipolar stimulation on voltage and calcium distributions in the isolated rabbit heart [J]. Basic Res Cardiol, 2008, 103(6): 537.
- [5] Welling A, Felbel J, Peper K, *et al.* Hormonal regulation of calcium current in freshly isolated airway smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1992, 262(3): 351.
- [6] 隋 峰,杜新亮,张畅斌,等. 一种原代培养大鼠 DRG 神经元的新方法[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7): 971.
- [7] Okada T, Shimizu S, Wakamori M, *et al.* Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Receptor-activated TRP Ca^{2+} Channel from Mouse Brain [J]. J Biol Chem, 1998, 273(17): 10279.
- [8] Ana YE, Kevin S. Calcium feedback mechanisms regulate oscillatory activity of a TRP-like Ca^{2+} conductance in *C. elegans* intestinal cells[J]. J Physiol, 2005, 567(1): 239.
- [9] Chen G, Charles Y. Tandem Transcription and Translation Regulatory Sensing of Uncharged Tryptophan tRNA [J]. Science, 2003, (5630): 211.