

温胆汤对精神分裂症模型鼠海马 PKC, p38 MAPK 及 P-Cx43 的影响

魏妍妍, 刘丹丹, 戎文娟, 熊怀亮, 朱金华, 万红娇*
(江西中医药大学 基础医学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**研究温胆汤对精神分裂症模型鼠大脑蛋白激酶 C (PKC), p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 及磷酸化连接蛋白 Cx43 (P-Cx43) 蛋白表达的影响。**方法:**将 72 只清洁级 SD 大鼠随机平均分为 6 组: 正常组 (A, 生理盐水 20 mL·kg⁻¹), 模型组 (B, 生理盐水 20 mL·kg⁻¹), 氯氮平组 (C, 20 mg·kg⁻¹), 温胆汤高剂量组 (D, 40 g·kg⁻¹), 温胆汤中剂量组 (E, 20 g·kg⁻¹), 温胆汤低剂量组 (F, 10 g·kg⁻¹)。A, B 组 *ig* 生理盐水; C 组 *ig* 氯氮平; D, E, F 组分别 *ig* 温胆汤, 1 次/d, 21 d 后, B, C, D, E, F 组一次性 *ip* 地卓西马来酸盐 (MK-801) 0.6 mg·kg⁻¹, 建立精神分裂症模型, 行为学观察 3 d 后, 处死大鼠, 取海马组织, 采用蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测海马组织中 PKC, p38 MAPK 及 P-Cx43 蛋白的含量。**结果:**与正常组相比, 模型组大鼠出现刻板行为; 海马组织 PKC, p38 MAPK 及 P-Cx43 含量明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 温胆汤各组及氯氮平组均不同程度改善了模型鼠的一般状况; 明显降低海马组织 PKC, p38 MAPK 及 P-Cx43 的含量 ($P < 0.05$)。Cx43 的磷酸化程度也有统计学意义 ($P < 0.05$), 且模型组磷酸化水平最高。**结论:**温胆汤可明显降低 PKC, p38 MAPK 及 P-Cx43 蛋白的浓度, 进而调节缝隙连接通讯 (GJIC) 的功能。

[关键词] 温胆汤; 蛋白激酶 C; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 磷酸化连接蛋白 43; 缝隙连接通讯

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2015) 11-0103-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110103

Effect of Wendan Tang on PKC, p38 MAPK and P-Cx43 of Hippocampus in Rats with Schizophrenia
WEI Yan-yan, LIU Dan-dan, RONG Wen-juan, XIONG Huai-liang, ZHU Jin-hua, WAN Hong-jiao (*Basic Medical College of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Wendan Tang on protein kinase C (PKC), p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) and phosphorylated connexin43 (P-Cx43) of hippocampus in rats with schizophrenia. **Method:** Seventy-two SD rats were randomly averaging divided six groups: normal group (A, 20 mL·kg⁻¹), model group (B, 20 mL·kg⁻¹), Clozapine group (C, 20 mg·kg⁻¹) and Wendan Tang high-dosage group (D, 40 g·kg⁻¹), Wendan Tang medium-dosage group (E, 20 g·kg⁻¹), Wendan Tang low-dosage group (F, 10 g·kg⁻¹). The A and B groups were given normal saline, the C group was given Clozapine, the D, E, F groups were respectively given Wendan Tang, every day, for 21 days. The B, C, D, E, F groups were *ip* given dizocipine maleate (MK-801) 0.6 mg·kg⁻¹ to establish rat schizophrenia model, and stereotyped behavior of rats were observed. After three days, the rats were sacrificed and the hippocampus tissue was tested. The expressions of PKC, p38 MAPK, P-Cx43 in hippocampus tissue was determined by Western blotting. **Result:** Compared with A group, rats of B group appeared stereotyped behavior, the expressions of PKC, p38 MAPK, P-Cx43 in hippocampus tissue was increased ($P < 0.05$). Compared with B group, stereotyped behavior was improved, Wendan Tang could significantly decrease the expression of PKC, p38 MAPK, P-Cx43 in hippocampus tissue ($P < 0.05$). The degree of phosphorylation of Cx43 is also statistically significant ($P < 0.05$) and the highest level of phosphorylation in the model group. **Conclusion:** Wendan Tang can significantly reduce concentration of

[收稿日期] 20141127(020)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160423); 2012 级江西中医药大学校级创新基金项目(JZYC12B08)
[第一作者] 魏妍妍, 在读硕士, 从事中医药与病原性疾病研究, Tel: 13155829366, E-mail: 791579063@qq.com
[通讯作者] * 万红娇, 医学博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药与病原性疾病的研究, Tel: 0791-87118816, E-mail: ann.wan@163.com

PKC, p38 MAPK and P-Cx43, thereby regulating gap junction intercellular communication (GJIC) function.

[**Key words**] Wendan Tang; protein kinase C; p38 mitogen activated protein kinase; phosphorylated connexin-43; gap junction intercellular communication

精神分裂症是一种常见的精神疾病,中医辨证多属痰湿内阻型,以沉默痴呆、语无伦次、静而多郁为特征,并与谷氨酸(glutamate, Glu) 功能低下引起的精神分裂症的阴性症状相似。温胆汤是化痰经典名方,具有理气化痰,和胃利胆的功效,临床上用于“无形之痰”所致的精神疾病,疗效得到了肯定^[1-2]。本实验通过对精神分裂症模型鼠海马组织中蛋白激酶 C(PKC),p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK) 及磷酸化连结蛋白 43(P-Cx43) 3 种蛋白含量的检测,从分子生物学水平来解释温胆汤对缝隙连接通讯(GJIC) 功能的影响。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 72 只,雌性,体重(200 ± 20) g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2013-0004。

1.2 药物与试剂

1.2.1 中药汤剂制备 温胆汤方的组成:法半夏 6 g,茯苓 4.5 g,竹茹 6 g,枳实 6 g,陈皮 9 g,炙甘草 3 g,每剂含生药 34.5 g,由江西中医药大学附属医院提供,鉴定合格。全方先加水浸泡 30 min,一煎加水为药材量的 8 倍,沸腾后再煎 40 min,过滤后取其汁,二煎加水为药材量的 6 倍,沸腾后再煎 30 min,合并 2 次的水煎液,再用旋转蒸发仪浓缩为 0.5,1,2 g·mL⁻¹,pH 7.0,装入消毒容器内,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 试剂 地卓西平马来酸盐(MK-801, Sigma 公司),氯氮平片(上海信谊黄河制药有限公司,批号 131004),蛋白酶抑制剂(PMSF, Solarbio 公司,批号 503B031),磷酸酶抑制剂(Protease Inhibitor Cocktail, Sigma 公司,批号 083M4020V),Anti-PKC alpha antibody[Y124](ab32376, Abcam 公司,批号 GR136627-4),p38 MAPK(D13E1)XP® Rabbit mAb (Cell Signaling 公司,批号 8690P),P-Cx43 Antibody (Ser368, Cell Signaling 公司,批号 3511S),Cx43 Antibody(Affinity 公司,批号 19071),3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH, D16H11)XP® Rabbit mAb (Cell Signaling 公司,批号 5174P),辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H + L)(北京中杉生物技术有限公司,批号 112586)。

1.3 仪器 CR15T 型台式低温高速离心机(日

本),Thermo Multiskan FC 型酶标仪(上海赛默飞世尔仪器有限公司),PowerPacTW 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),小型垂直电泳槽,小型转印电泳槽和 Fluor Chem M 型凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司)。

2 方法

2.1 分组、给药与模型建立^[3] 将大鼠随机平均分为 6 组,即正常组、模型组、氯氮平组、温胆汤高、中、低剂量组。适应性喂养 5 d 后,正常组和模型组分别用 20 mL·kg⁻¹ 的生理盐水 ig,氯氮平组 ig 氯氮平原药 20 mg·kg⁻¹,温胆汤高、中、低剂量组按 40, 20,10 g·kg⁻¹,ig 20 mL·kg⁻¹,1 次/d,共 21 d。在最后 1 次 ig 给药 2 h 后,分别对模型组、氯氮平组及温胆汤高、中、低剂量组 1 次性 ip MK-801 0.6 mg·kg⁻¹,以诱发精神分裂症模型,正常组 ip 给予等容积的生理盐水。造模后观察并记录各组大鼠的行为状况,观察 3 d 后,处死并取其海马组织待测。

2.2 指标检测

2.2.1 海马组织中蛋白的制备 大鼠行为学观察 3 d 后,用乙醚麻醉,从心脏灌注冰生理盐水冲洗脑血管中的血液,并迅速在 0 ℃ 冰盘上取海马组织 100 mg,使其在 0 ℃ 下剪成小块并放入组织匀浆器中,加入 1 mL 的裂解液,2 μL 的 PMSF,(如果提的是磷酸化的蛋白,再加入 10 μL 磷酸酶抑制剂),进行匀浆,再置于冰上 0.5 h 后,将组织匀浆液于 4 ℃ 10 000 × g 离心 5 min,取上清液,分装后 -20 ℃ 保存,以供 Western blotting 检测蛋白,PKC,p38 MAPK, P-Cx43。

2.2.2 海马组织中 PKC,p38 MAPK,P-Cx43 浓度测定 取 2.2.1 中制备的上清液,应用 BCA 试剂盒在酶标仪上测定蛋白浓度以供免疫印迹用。Western blotting 步骤:取上述等量(总蛋白 50 μg)蛋白提取液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, 10% 分离胶),用湿转方法将蛋白转移至 PVDF 膜上,37 ℃ 封闭 1 ~ 2 h(封闭液:含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液)、洗膜后分别加入 PKC I 抗(1:8 000 稀释),p38 MAPK I 抗(1:1 000 稀释)及磷酸化 Cx43 I 抗(1:1 000 稀释)4 ℃ 摇床过夜,洗膜后以相应的 II 抗(1:10 000 稀释)37 ℃ 孵育 1 h,用化学发光试剂盒,在凝胶成像系统上曝光。为避免目的蛋白量

不同给实验造成影响,上述目的蛋白的结果应用内参 GAPDH 进行校正。采用凝胶成像系统自带的图像分析软件 Alphaview SA 分析蛋白条带的吸光度 A ,以目的蛋白的 A 与相应的 GAPDH 的 A 的比值反映目的蛋白的半定量表达。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠行为学观察 大鼠在造模过程中没有死亡,正常组活泼好动,皮毛发亮,呼吸平稳,大小便正常;模型组在造模后,出现骚动不安,头部不自主的摇

动,身体瘫软扭动,四肢乱舞且不能站立,对刺激反应异常灵敏,皮毛偶有倒立,尿液增多,大便正常;氯氮平组及温胆汤各组与模型组相似。但随着时间的延长,模型组仍可见躁动不安,四肢乱舞,饮食减少;氯氮平组及温胆汤各组的精神均较模型组有明显改善,能饮水,大便正常,其中,温胆汤中剂量组改善稍好。

3.2 大鼠海马组织 PKC, p38 MAPK 及 P-Cx43 含量变化 与正常组比较,模型组大鼠海马组织 PKC, p38 MAPK 及 P-Cx43 含量明显升高 ($P < 0.05$),Cx43 含量降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,温胆汤各组及氯氮平组均明显降低海马组织 PKC, p38 MAPK 及 P-Cx43 的含量 ($P < 0.05$),Cx43 蛋白显著降低 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1 ~ 3。

表 1 蛋白免疫印迹法检测 PKC, p38 MAPK, P-Cx43 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 1 Expression of PKC, p38 MAPK and P-Cx43 proteins by Western blotting ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PKC/GAPDH	p38 MAPK/GAPDH	P-Cx43/GAPDH	Cx43/GAPDH	P-Cx43/Cx43
正常	-	0.623 ± 0.080 ²⁾	0.973 ± 0.136	0.060 ± 0.034 ²⁾	1.056 ± 0.011 ²⁾	0.036 ± 0.004 ²⁾
模型	-	1.152 ± 0.114 ¹⁾	1.217 ± 0.077	0.192 ± 0.069 ¹⁾	0.707 ± 0.005 ¹⁾	0.208 ± 0.004 ¹⁾
氯氮平	0.02	0.980 ± 0.046 ²⁾	0.944 ± 0.199	0.115 ± 0.051 ²⁾	0.797 ± 0.077	0.102 ± 0.017 ²⁾
温胆汤	40	0.898 ± 0.041 ²⁾	0.977 ± 0.084	0.130 ± 0.044	0.914 ± 0.099 ²⁾	0.105 ± 0.015 ²⁾
	20	0.743 ± 0.116 ²⁾	0.786 ± 0.119 ²⁾	0.105 ± 0.048 ²⁾	0.836 ± 0.063	0.073 ± 0.026 ²⁾
	10	1.009 ± 0.128	1.050 ± 0.039	0.136 ± 0.055	0.753 ± 0.045	0.102 ± 0.043

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

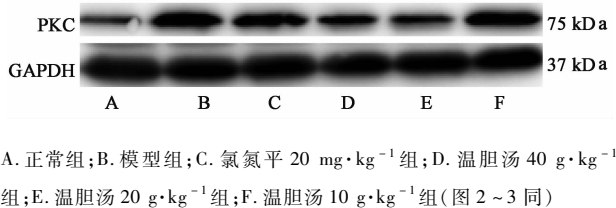


图 1 大鼠海马组织 PKC 的蛋白印迹条带图片
Fig.1 Western blotting picture of PKC protein in rat hippocampus

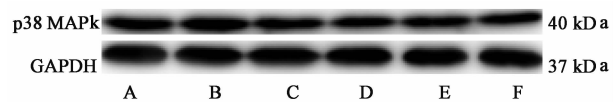


图 2 大鼠海马组织 p38 MAPK 的蛋白印迹条带图片
Fig. 2 Western blotting picture of p38 MAPK protein in rat hippocampus

4 讨论

精神分裂症的发病与多种因素有关,其中与神经递质的传递功能异常有密切关系^[4],而神经递质可以通过其受体活动来调节神经细胞的 GJIC 功能^[5]。Kim 等证明精神分裂症患者的脑脊液中谷氨酸浓度低下,并首次提出精神分裂症的 Glu 功能兴

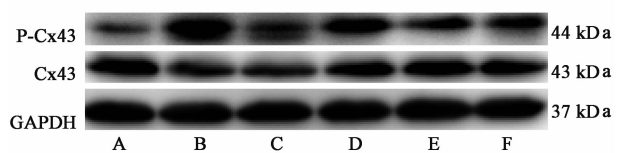


图 3 大鼠海马组织 P-Cx43 的蛋白印迹条带图片
Fig. 3 Western blotting picture of P-Cx43 protein in rat hippocampus

奋异常假说, Glu 是哺乳动物体内重要的兴奋性神经递质,与突触的适应性、记忆以及神经、胶质细胞的死亡密切相关^[4]。此假说认为,谷氨酸 N -甲基- D -天冬氨酸(NMDA)受体功能障碍在该病的病理过程中起着关键作用。MK-801 是一种选择性较强的非竞争性 NMDA 受体拮抗剂,常被应用于谷氨酸功能低下的精神分裂症动物模型中,可诱导动物产生一系列异常行为,如活动增多、刻板行为、认知和感觉运动门控障碍等,所造模型具有可重复性,有较好的稳定性,并且比 NMDA 受体的特异性拮抗剂——苯环己哌啶和氯胺酮,对脑内其他受体的亲和力更低,并可减少 Glu 的毒性,因此,用 MK-801 建立精

精神分裂症的动物模型是行得通的,用 MK-801 诱发的精神分裂症模型鼠与谷氨酸功能低下引起的精神分裂症的阴性症状相似^[3,6-8]。

缝隙连接(gap junction,GJ)是沟通相邻细胞间的通道,广泛存在于神经胶质细胞中,由间隙连接蛋白(Cx)组成,这些通道紧密聚集成簇就构成了 GJIC,而物质信息就是通过 GJIC 进行能量和物质交换的^[5-6]。连接蛋白(Cx)中大多数属于磷蛋白,而磷酸化是调控细胞信号转导的主要方式,也是蛋白转译后较普遍的一种修饰,它通过蛋白激酶和蛋白磷酸化酶的直接或间接作用,控制着许多细胞内的过程,如 Cx 转运、组装、解离、降解以及通道的门控等^[9]。其中,Cx43 在星形胶质细胞中含量最多,并在神经系统信号传递中发挥重要作用^[10]。

蛋白激酶 C(PKC)是 Ca²⁺ 和磷脂等依赖的丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员^[11]。它参与调控细胞的增殖与分化,并对大脑的记忆和认知功能产生非常重要的影响^[12]。PKC 的激活剂佛波醇酯(PMA/TPA)通过降低单一通道传导性或者使细胞增生增强,直接或者间接磷酸化 Cx43 的 Ser372 和 Ser368 等位点,以此来降低 GJIC 的功能^[13-16]。MAPK 也可以磷酸化 Cx43 的 Ser79 和 Ser282 等位点,使 GJIC 功能迅速短暂性降低,MAPK 调节 Cx43 的表达是通过使其磷酸化来实现的,因此,p38 等 MAPK 的亚型与 Cx43 磷酸化的调节密切相关^[17-18]。Cx43 多位点的氨基酸磷酸化状态,可影响 Cx43 的含量、装配、分布与传导特性,从而改变 GJIC 通道的通透性,进而影响其功能^[19]。

本研究显示,Cx43 蛋白磷酸化的程度均与 PKC,p38 MAPK 蛋白表达量呈正相关,温胆汤各组 PKC,p38 MAPK,P-Cx43 的浓度较模型组均有所降低,其中温胆汤中剂量组较明显,可能是因为中剂量的浓度达到了最大有效量,提示温胆汤能够降低 MK-801 诱导的精神分裂症模型鼠海马组织中 PKC,p38 MAPK 及 P-Cx43 的浓度,它们可能通过上述机制上调 GJIC 的功能,但温胆汤是如何通过降低海马组织中 PKC,p38 MAPK 及 P-Cx43 的浓度来调节 GJIC 功能的,尚需进一步的研究。

【参考文献】

[1] 刘婷婷,刘远新.从温胆汤看历代医家对痰病的论治及发挥[J].新疆中医药,2009,27(2):8-11.

[2] 龚帆影.温胆汤为主治疗精神分裂症 11 例[J].江苏中医药,2003,24(8):25.

[3] 吴金华,邹洪,于军,等.用不同实验小鼠品系建立精神分裂症的动物模型[J].生理学报,2003,55(4):381-387.

[4] 杨娜,隋峰,姜廷良.神经性疾病相关的谷氨酸转运体研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):255-258.

[5] 付艳丽,万红娇,朱金华,等.温胆汤对地卓西平马来酸盐诱发精神分裂症模型大鼠脑组织中 Cx43 mRNA 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(20):173-175.

[6] 朱金华,孙昊鑫,万红娇,等.温胆汤对 MK-801 诱发精神分裂症模型鼠海马组织 PKC 含量及其超微结构的影响[J].时珍国医国药,2014,25(3):513-515.

[7] Bubenikova V,Votava M,Horacek J,et al. The effect of zotepine,risperidone,clozapine and olanzapine on MK-801-disrupted sensorimotor gating [J]. Pharmacol Biochem Behav,2005,80(4):591-596.

[8] 苏允爱,司天梅,周东丰,等. MK-801 建立谷氨酸功能低下精神分裂症小鼠模型的研究[J].中国神经精神疾病杂志,2006,32(6):558-560.

[9] 王荣,张存泰,王琳.缝隙连接蛋白 Cx43 的磷酸化对缝隙连接通讯的调控[J].中国心血管杂志,2008,13(2):150-153.

[10] Mathieu Vinken,Tamara Vanhaecke,Peggy Papeleu,et al. Connexins and their channels in cell growth and cell death[J]. Cell Signal,2005,18(5):592-600.

[11] 孙桂丽,王大鹏. 蛋白激酶 C 在细胞及肿瘤细胞凋亡中的作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(7):1360-1363.

[12] 杨红,董海松,林逸玲,等.蛋白激酶 C 神经保护作用的研究进展[J].医学综述,2009,15(18):2736-2738.

[13] Lampe P D, TenBroek E M, Burt J M, et al. Phosphorylation,of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication [J]. J Cell Biol,2000,149(7):1503-1512.

[14] Lampe P D, Lau A F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication [J]. Int J Biochem Cell Biol,2004,36(7):1171-1186.

[15] Solan J L, Lampe P D. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly [J]. Biochim Biophys Acta,2005,1711(2):154-163.

[16] Véronique Cruciani,Svein Ole Mikalsen. Connexins,gap junctional intercellular communication and kinases [J]. Biol Cell,2002,94(7/8):433-443.

[17] Schulz Rainer,Heusch Gerd. Connexin 43 and ischemic preconditioning [J]. Adv Cardiol,2006(42):213-227.

[18] Warn-Cramer B J, Cottrell G T, Burt J M, et al. Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase [J]. J Biol Chem,1998,273(15):9188-9196.

[19] 颜建英,黄科华,刘青闽,等.产妇子宫平滑肌组织中 MAPK 信号转导通路及 CX43 表达与产后出血关系的研究[J].实用妇产科杂志,2012,28(7):565-570.

[责任编辑 聂淑琴]