

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

付艳丽, 万红娇*, 朱金华, 马广强

(江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:探讨温胆汤对精神分裂症模型大鼠脑组织中神经胶质细胞连接蛋白(Cx43) mRNA 的影响。方法:将健康的 SD 大鼠 50 只随机分为 5 组:正常组(A)、模型组(B)、温胆汤高、中、低剂量组(C, D, E 组, 剂量为生药 40, 20, 10 g·kg⁻¹)。A, B 组生理盐水 ig, C, D, E 组温胆汤 ig, 1 次/d, 21 d 后, 按照 0.6 mg·kg⁻¹ 一次性 ip 地卓西平马来酸盐(MK-801) 建立拟精神分裂症模型, 然后行为学观察 3 d, 处死大鼠。应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法, 检测大鼠 Cx43 mRNA 的表达量。结果:模型组 Cx43 mRNA 的表达量低于正常组, 有显著性意义($P < 0.05$);温胆汤 3 个剂量组 Cx43 mRNA 的表达量明显高于模型组, 有显著性意义($P < 0.05$)。结论:温胆汤能够增强精神分裂症模型大鼠脑组织中 Cx43 mRNA 的表达。

[关键词] 温胆汤; 精神分裂症; 缝隙连接; 神经胶质细胞连接蛋白 mRNA

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0173-03

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1214.059.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 12:14

Effect of Wendan Decoction on Connexin 43 mRNA Expression of in Rat Brain Tissue with Schizophrenia Induced by Dizocilpine Maleate

FU Yan-li, WAN Hong-jiao*, ZHU Jin-hua, MA Guang-qiang

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Wendan decoction on connexin 43 (Cx43) mRNA expression in brain tissue of rats with schizophrenia. **Method:** Fifty SD rats were divided five groups by random, including normal group (A), model group (B), Wendan decoction high-dosage group (C), medium-dosage group (D) and low-dosage group (E), respectively. The A and B groups were given normal saline and the C, D, E groups were given Wendan decoction (40, 20, 10 g·kg⁻¹) every day, which lasted for 21 days. Dizocilpine maleate (MK-801) 0.6 mg·kg⁻¹ was ip given to establish the rat schizophrenic model. Then rat behaviors were observed for 3 days all rats were sacrificed. Then RT-PCR method was used to detect Cx43 mRNA expression in the nerve cells of the every group rats. **Result:** The Cx43 mRNA expression of group B was lower than that of group A ($P < 0.05$). And the Cx43 mRNA expression of group C, D and E was rose compared with that of group B ($P < 0.05$). **Conclusion:** Wendan decoction can reinforce the expression of Cx43 mRNA in the brain tissue of rats with schizophrenia.

[Key words] Wendan decoction; schizophrenia; gap junction; Cx43 mRNA; expression

气滞痰凝是精神分裂症(schizophrenia)的潜在病机,祖国医学治疗多从“痰”入手,强调理气化痰。

[收稿日期] 20111204(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160423);江西省自然科学基金项目(2010GZY0162);江西省卫生厅基金项目(2010Z02)

[第一作者] 付艳丽,医学硕士,从事中医药与病原性疾病研究, Tel:15239566132, E-mail: fyl12@163.com

[通讯作者] *万红娇,医学博士,教授,硕士生导师,从事中医药与病原性疾病研究, Tel:0791-7118860, E-mail: ann.wan@163.com

温胆汤^[1]具有理气化痰,和胃利胆的功效。精神分裂症的发病机制主要与神经递质功能异常有关^[2],神经递质通过其受体活动可调节神经细胞的细胞间隙连接通讯(GJIC)。本实验对精神分裂症模型大鼠脑组织神经胶质细胞连接蛋白 43(Cx43) mRNA 表达水平的检测,以便从分子生物水平阐明温胆汤对精神分裂症模型大鼠 Cx43 mRNA 表达量的影响,为今后更深入地研究工作提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 50 只,雌性,体重(250 ± 20)g,动物合格证号 JZDW(赣)2011-0493,由江西中医学院实验动物中心提供。

1.2 中药汤剂组成及制备 温胆汤组成及比例:清半夏 6 g,茯苓 4.5 g,竹茹 6 g,枳实 6 g,陈皮 9 g,炙甘草 3 g 配伍,每剂含生药 34.5 g,由江西中医学院附属医院提供。经鉴定合格,全方各药物先加水浸泡 30 min,煎加药材量的 8 倍水,沸腾后煎 40 min,过滤取汁,二煎加药材量的 6 倍水,沸腾后煎 30 min,过滤,合并水煎液,用旋转蒸发仪浓缩为 0.5,1,2 g·mL⁻¹,于 4 °C 冰箱保存备用。

1.3 仪器 CR 15T 低温高速离心机(日本),PTC-100 PCR 仪(美国),核酸蛋白分析仪(上海尤尼克仪器有限公司),凝胶成像系统(美国,Sigma 公司)。

1.4 试剂 地卓西平马来酸盐(MK-801,美国,Sigma 公司),TransZol(北京全式金生物技术有限公司),TransScript™ Two-Step RT-PCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司),Trans DNA Marker I(北京全式金生物技术有限公司),琼脂糖(agarose,美国,Promega 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 大鼠随机分为 5 组,正常组(A)、模型组(B)、温胆汤高剂量组(C)、温胆汤中剂量组(D)、温胆汤低剂量组(E)(C,D,E 组剂量为生药 40,20,10 g·kg⁻¹),每组 10 只。温胆汤高、中、低剂量组在造模前连续 ig 温胆汤,每次给药容积为 20 mL·kg⁻¹;正常组和模型组用等量生理盐水 ig,1 次/d,共 21 d。

2.2 模型建立^[3] 动物适应性喂养 5 d 后,ig 给药 21 d,在最后 1 次给药 2 h 后,一次性 ip MK801 0.6 mg·kg⁻¹,诱发 SD 大鼠精神分裂症模型,正常组予以等量生理盐水注射。造模后行为学观察大鼠的精神活动、皮毛、呼吸、大小便等,10 min 记录 1 次,观察 4 h,3 d 后处死大鼠。

2.3 指标检测 大鼠行为学观察 3 d 后,用乙醚麻

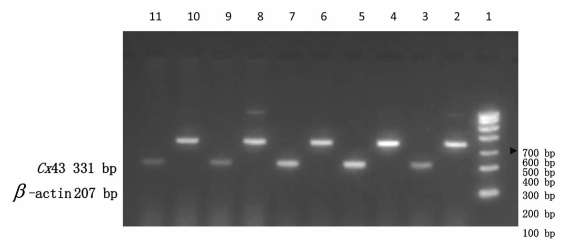
醉,从心脏灌注生理盐水以固定脑组织,然后取脑组织,用冰生理盐水洗净残血,在无菌操作台切取称重 100 mg,冰上研磨提取总 mRNA,采用 RT-PCR 半定量的方法,对脑组织 Cx43 mRNA 表达量进行分析。严格按照试剂盒说明操作。

2.4 统计学处理 使用凝胶图像分析软件 Bandscan 4.5 测定目的条带和 β-actin 的灰度值,以两者的比值表示 RT-PCR 目的产物的相对含量,进行半定量分析。应用 SPSS 15.0 统计软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。RT-PCR 数据,采用单因素方差分析方法进行统计学处理。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 行为学观察 正常组大鼠活泼好动,皮毛光泽发亮,呼吸平稳,抓取时能迅速逃避。模型组大鼠在注入 MK-801 8 min 后,出现精神躁动,呼吸急促,头部不自主摇动,身体瘫软抽动,四肢舞动不安不能直立,对刺激反应过度灵敏,皮毛可见倒立;尿液增多,大便未见异常。温胆汤组大鼠精神稍好于模型组,能饮水,但仍躁动不安,尿量稍增多,大便正常。

3.2 脑组织 Cx43 mRNA 表达检测 模型组 Cx43 mRNA 的表达量明显低于正常组($P < 0.05$);而温胆汤高、中、低剂量组 Cx43 mRNA 的表达水平平均高于模型组,有显著性差异($P < 0.05$)(图 1,表 1),提示:温胆汤可升高脑组织神经胶质细胞 Cx43 mRNA 的表达量。



- 1. 700 bp Marker; 2. 正常组目的基因; 3. 正常组内参;
- 4. 模型组目的基因; 5. 模型组内参; 6. 温胆汤 40 g·kg⁻¹组目的基因;
- 7. 温胆汤 40 g·kg⁻¹组内参; 8. 温胆汤 20 g·kg⁻¹组目的基因;
- 9. 温胆汤 20 g·kg⁻¹组内参; 10. 温胆汤 10 g·kg⁻¹组目的基因;
- 11. 温胆汤 10 g·kg⁻¹组内参

图 1 温胆汤对精神分裂症大鼠脑组织 Cx43 mRNA 表达的影响

表 1 温胆汤对精神分裂症大鼠脑组织 Cx43 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Cx43 mRNA/β-actin 相对含量
正常	-	1.399 ± 0.054 ²⁾
模型	-	1.121 ± 0.044 ¹⁾
温胆汤	40	1.267 ± 0.061 ^{1,2)}
	20	1.360 ± 0.041 ^{1,2)}
	10	1.270 ± 0.066 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05。

4 讨论

缝隙连接^[4-5] (gap junction, GJ) 广泛存在于中枢神经系统中,是介导相邻细胞间直接通讯的特殊膜结构。相邻细胞膜上相对应的两个连接小体构成缝隙连接通道,物质信息通过此通道进行能量和物质的交换,参与细胞间物质交换的代谢偶联和电信号传递的电偶联,对细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程起着重要的调控作用。而连接蛋白^[6] (connexin, Cx) 是组成连接小体的基本蛋白亚单位。在哺乳类动物脑组织神经细胞中,连接蛋白 43 (Cx43)^[7-8] 大部分在神经胶质细胞上表达,中枢神经系统的 GJ 主要存在于神经胶质细胞。

研究表明,蛋白激酶 A (PKA) 可使 Cx43 磷酸化而改变 Cx43 的构象,从而下调 GJIC 功能^[9]。氧化应激、生长因子等刺激因素可引起相应受体酪氨酸蛋白激酶 (TPK) 激活,导致丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、细胞外信号调节激酶 (ERK) 激活,最终使 Cx43 发生磷酸化,影响 GJIC 功能^[10]。从而对细胞的生理活动起到调节作用。神经胶质细胞间的 GJIC 改变及连接蛋白 (Cx) 表达种类和水平的变化可能与精神分裂症的发病具有重要关系。

实验研究已证实了温胆汤具有改善精神分裂症模型鼠学习记忆、抗氧化损伤、调节免疫、病理损伤保护作用^[11-13]。Gajda 等^[14] 诱导幼鼠癫痫发作实验中,经逆转录 PCR 技术检测,原发灶 Cx43 基因表达水平显著提高。Yao L F 等^[15] 对 14 例癫痫患者海马组织中 Cx43 的表达水平进行研究,对照组中 Cx43 表达水平较低,癫痫组表达显著升高。在 Siushansian 等^[16] 的实验中,提示增加星形胶质细胞的 GJIC 功能对缺血损伤有保护作用。Huang 等^[17] 应用 RT-PCR 检测脑内肿瘤,发现其 CX43 表达很低,推测肿瘤细胞间由于缺乏缝隙连接,抑制细胞生长因子不能通过缝隙连接传导,而导致瘤细胞生长失控。易华等^[18] 在其试验中得出肝癌模型鼠 Cx43 蛋白表达降低,与缝隙连接有关。本实验通过脑组织匀浆,对 Cx43 mRNA 的表达水平进行研究,从以上实验结果中可以得出,温胆汤具有升高精神分裂症模型大鼠脑组织神经胶质细胞 Cx43 mRNA 的表达量,从而增强其表达的作用,但温胆汤是否通过上调 Cx43 mRNA 的表达来加强 GJIC 功能,从而影响精神分裂症模型鼠的发病和治疗还有待进一步的研究和证实。

【参考文献】

[1] 李祖佑. 温胆汤方药分析及临床初探[J]. 中国实验

方剂学杂志,2001,7(4):59.

- [2] 杨娜,隋峰,姜延良. 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.
- [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.
- [4] 肖波,苏曼. 中枢神经系统缝隙连接研究进展[J]. 国外医学:生理病理科学与临床分册,2003,22(3):205.
- [5] 许学兵,姚尚龙,余守章. 神经系统缝隙连接及其调节[J]. 国外医学:麻醉与复苏分册,2005,26(1):43.
- [6] 辛莉,郭国庆,沈伟哉. 间隙连接蛋白家族的研究进展[J]. 中国病理生理学杂志,2007,23(6):1240.
- [7] 王琪. 缝隙连接蛋白 43 研究进展[J]. 中西医结合研究,2010,2(6):312.
- [8] 李喜涛,许文灿. 连接蛋白 43 磷酸化状态与缝隙连接通道功能的关系[J]. 汕头大学医学院学报,2008,21(3):185.
- [9] Bao X, Reuss L, Altenberg G A. Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by protein kinase c mediated phosphorylation of Serine 368[J]. J Biol Chem,2004,279(19):20058.
- [10] Aravindakshan J, Cyr D G. Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38 mitogen activated protein kinase pathway[J]. Biol Rep Rod,2005,72(5):1232.
- [11] 万红娇,杨翠萍,朱金华,等. 温胆汤对 MK801 诱发精神分裂症模型鼠学习记忆的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(1):83.
- [12] 万红娇,杨翠萍,贺又舜,等. 温胆汤对精神分裂症模型鼠免疫调节及抗氧化的影响[J]. 江西中医学院学报,2008,20(4):58.
- [13] 杨翠萍,蔡长春,杨晓金,等. 温胆汤对精神分裂症模型鼠海马谷氨酸和 N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):152.
- [14] Gajda Z, Hermes E. The functional significance of gap junction channels in the epileptogenicity and seizure susceptibility of juvenile rats[J]. Epilepsia,2006,47(6):1009.
- [15] 姚丽芬,王真奎,王真刚,等. 缝隙连接蛋白 Cx32、Cx43 在难治性颞叶癫痫患者脑中表达的研究[J]. 中华医学杂志,2009,89(43):3058.
- [16] Siushansian R, Bechberger S F, Cechetto D F, et al. Connexin 43 null mutation increases infarct size after stroke[J]. J Comp Neurol,2001,440(4):387.
- [17] Huang R P, Hossain M Z, Sehgal A. Reduced connexin 43 expression in high grade human brain cells[J]. J Surg Oncol,1999,70(1):21.
- [18] 易华,杜标炎,谭宇蕙,等. 基因治疗联合六味地黄丸对肝癌荷瘤小鼠缝隙连接蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):114.

【责任编辑 聂淑琴】