

◆实验研究论著◆

逍遥散对抗慢性应激状态下大鼠海马神经细胞 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 (NR) 各亚基 mRNA 表达的影响

马晓平, 孙琪, 焦妃, 陈思馨, 王全年

宁夏医科大学中医学院, 宁夏 银川 750004

[摘要] 目的: 观察逍遥散对抗慢性应激状态下大鼠海马神经细胞内 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 (NR) 各亚基 mRNA 表达的影响。方法: 用 Taqman 荧光定量 PCR 法测定 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 相对定量法计算 NR 各亚基表达量相对值。结果: 慢性应激微环境导致海马神经细胞内 NR 的各亚基 mRNA 表达有不同程度的改变; 在拟慢性应激作用前对细胞进行对应血清处理, 逍遥散含药血清使 NR2AmRNA 表达水平明显上调, NR2B mRNA、NR1mRNA 表达水平亦上调, 作用明显但未达到正常水平。结论: 逍遥散治疗血清能改变 NR 的各亚基 mRNA 表达, 从而达到保护神经元并抵抗慢性应激损伤起到一定的作用。

[关键词] 慢性应激; 逍遥散; 细胞培养; N-甲基-D-天门冬氨酸受体 (NR); 海马神经细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 06-0265-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.06.125

与慢性应激相关的疾病与 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NR)通过谷氨酸(Glu)诱导兴奋性毒性有关, 海马是慢性应激损伤的主要脑区, 而损伤的重要机制是 NR 被过度激活及因此引发的一系列级联反应^[1]。分布在海马的 NR 主要是 NR1/NR2A、NR1/NR2B, 本实验为证实慢性应激和在逍遥散干预下的海马神经细胞内 NR 各亚基(NR1、NR2A、NR2B)mRNA 表达情况, 观察慢性应激损伤及逍遥散抗慢性应激损伤的某些机制, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 SPF 级新生 24 h 内的 Wistar 乳鼠由甘肃中医学院实验动物中心提供; 体质量 190~230 g 的 8 周龄雄性 Wistar 大鼠 27 只, 用于制备含药血清, SPF 级, 由成都达硕动物有限公司提供, 合格证号: SCXK(川)2008-24。

1.2 仪器及试剂 Suprafuge 22 高速冷冻离心机(德国 Heraeus

公司), BioPhoto-meter6131 分光光度计(德国 Eppendorf 公司), PRISM7000 荧光定量 PCR 仪及分析软件(美国 ABI 公司), Primer5.0 引物设计软件。DMEM/F12 培养基、Neurobasal 培养基、B27 均为 Gibco 公司产品, 胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品, 2.5%胰蛋白酶、双抗、D-hankps 液均为 Genom 公司产品, 多聚赖氨酸、L-谷氨酰胺均为 Sigma 公司产品, Trizol Reagent、Rnase Inhibitor、Super ScriptTM^o 反转录试剂盒均为美国 Invitrogen 公司产品, DNase I (RNase Free)、荧光定量 PCR 试剂为 Takara 公司产品, 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 引物及探针 见表 1。根据 GenBank 提供的基因序列, 利用引物设计软件设计特异性 NR1、NR2A、NR2B、 β -actin 引物及探针序列, 所有引物及探针均由 Invitrogen 公司合成。

表 1 引物及探针

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物长度(bp)	探针(fam-5'-3'-tamra)
NR1	CCTCAGACAAGTTCATCTAAGCAAC	TCTCGTAATTGTGTTTTTCATGTG	114	CAGAGCTCGTGGACATCTACTTCGG
NR2A	GAAGTTGGACGCTTTCATCTATGAC	TAGCCTGTGGTAGCAAGATGTACC	114	CGTCTTGAAGTACAAGGCGGGGAGG
NR2B	TCTGGTGTAAACAACCTCGTACCT	ACATACTCCTCTGGATCATGAAGG	149	AAGGGGACACCTCCAAGATCATGG
β -actin	AGAAGATTTGGACACACTTTCTA	TCTCAAACATGATCTGGTCATCTT	129	TGAGCTGCGTGTGGCCCTGAGGAG

[收稿日期] 2015-01-02

[基金项目] 宁夏医科大学科学研究基金资助项目(XT2011014); 宁夏自然科学基金项目(NZ11129)

[作者简介] 马晓平(1985-), 男, 2012 级在读研究生。

[通讯作者] 孙琪, E-mail: 753384458@qq.com。

1.4 慢性应激模型血清及逍遥散含药血清制备

1.4.1 逍遥散水煎剂制备 按柴胡:当归:白芍:白术:茯苓:甘草:薄荷:煨姜=2:2:2:2:2:1:1:1比例配方。先将饮片(薄荷除外)以蒸馏水浸泡1h,后以武火急煎至沸腾,再以文火煎煮1h,于起锅前10min放入薄荷,过滤取汁后以4层纱布过滤;药渣再加蒸馏水武火急煎至沸腾,再以文火煎煮0.5h,过滤取汁。两次药汁合并,以旋蒸仪将药物浓缩至含生药2g/mL(约相当于60kg人用药剂量的10倍),高温高压灭菌,置4℃冰箱保存备用。

1.4.2 慢性应激动物模型及血清制备 采用Carter等^[2]的多相性应激模型并加以改进,应激原包括:足底电击(电压30V,电击频率0.1Hz,每次持续1s,共30次)、冰水游泳(4℃左右,5min)、禁水(24h)、禁食(24h)、束缚(4h),每天不定时随机安排一种应激刺激,避免相邻2天出现重复形成规律性而造成大鼠适应性,连续21天。电击箱为自制的可以调节电流、电压并自动控制电击频率的装置;冰水游泳操作时以温度计测量温度,以冰块及室温下的自来水调节并保持温度;束缚器为自行设计并于厂家订制的有机不锈钢器械,实验时以刚好容纳1只大鼠,使其不能进退及转身为度。实验动物随机分为3组:正常对照组(每天每只灌胃生理盐水2mL,不进行应激刺激)、慢性应激模型组(每天每只灌胃生理盐水2mL后,进行应激刺激)、逍遥散治疗组(每天每只灌胃逍遥散水煎剂2mL后,进行应激刺激),连续给药、刺激21天,于末次给药1~2h后麻醉条件下腹主动脉采血。血液以离心半径8cm、3000r/min离心,分离血清,每组血清分别混合后于56℃水浴中灭活30min。置超净台内,无菌条件下以0.22μm滤器抽滤除菌,按1mL分装并标记,-20℃冰箱保存备用。

1.5 Wistar大鼠海马神经细胞原代培养

1.5.1 分离海马组织 多聚赖氨酸处理培养板:无菌条件下取配制好的多聚赖氨酸储备液(1mg/mL)1mL,用PBS稀释至10mL,24孔培养板每孔加400μL,使之浸没孔底面,静置1~2h后吸除,用PBS洗3遍,最后一次吸去所有液体,置超净台或培养箱中备用。乳鼠全身皮肤消毒:取新生24h内的Wistar乳鼠数只,先于准备间内用70%~75%酒精棉球擦拭乳鼠全身皮肤,置洁净培养皿(足够盛装所有实验用乳鼠即可)中,由传递窗传入细胞培养操作室。于超净台内进行海马剥离操作前,再次用70%~75%酒精对乳鼠进行全身皮肤彻底消毒。迅速分离乳鼠海马组织:无菌条件下于超净台内,用镊子夹住乳鼠眼眶以固定头部,用眼科剪从颈后部先横向剪开,再从开口中部沿头骨中线纵向将头皮及颅骨剪至嗅球部,取眼科直镊分别向外侧掀开左右两侧颅骨,暴露大、小脑及嗅球,用显微镊先沿大、小脑分界线横向切断大、小脑连接,再沿正中矢状位(左、右半球分界线)纵向切开左、右半球连接(目的是方便掀开大脑皮质并暴露海马回),另取眼科直镊小心向外侧掀开大脑皮质表面,即可见清晰豌豆型海马,左右各一,用显微

镊小心夹取海马从边缘组织分离,即可得到整个海马。修净海马组织:剥离的海马组织常因操作者的习惯和技术水平差异而不同程度地挟带残留脑膜和血管,剃除此类组织有利于下一步消化分离操作及获得纯度较高的海马神经元。将上一步新剥离的海马迅速投入冰浴的盛有PBS液的平皿中,在解剖显微镜下仔细地剃除残留的脑膜和血管,剃净的海马组织移入另一只冰浴的盛有PBS液的平皿中。

1.5.2 消化分离海马神经细胞 终止液为含体积百分数90%的DMEM/F12培养基、体积分数10%胎牛血清;种植液为体积分数86%DMEM/F12培养基、体积分数10%胎牛血清、体积分数2%B27、双抗溶液(青霉素工作浓度100U/mL、链霉素工作浓度0.1mg/mL)、终浓度为2mmol/L的谷氨酰胺;饲养液为体积分数96%Neurobasal培养基、体积分数2%B27、双抗溶液(青霉素工作浓度100U/mL、链霉素工作浓度0.1mg/mL)、终浓度为2mmol/L的谷氨酰胺,均以0.1mol/LNaOH调整pH值至7.2~7.4,0.22μL滤器除菌,4℃保存备用。无菌条件下对新生24h内的Wistar乳鼠进行急性海马剥离,迅速置预冷的PBS液中清理海马上残留的脑膜及血管,适当剪碎后加等体积的PBS液和2.5%胰蛋白酶消化液,轻轻吹打40~60次,静置片刻,取上清(部分细胞悬液)至另一洁净试管中,终止消化该部分细胞悬液。剩余组织再次加入适量等体积的PBS液和2.5%胰蛋白酶消化液,继续重复上述吹打消化过程数遍,直至海马组织基本消化完全,剩余极少量碎片可弃去。收集全部终止消化的细胞悬液,以离心半径8cm、1500r/min离心5min,弃上清,收集海马细胞沉淀,以种植液清洗2次,再加适量种植液重悬细胞,倒置显微镜下进行细胞计数,将分离获得的海马神经细胞以 5×10^6 /mL密度种植于用多聚赖氨酸(PLL)预先处理过的24孔板内,每孔1mL,置37℃、体积分数5%CO₂培养箱中培养。24h后全量换成无血清饲养液,以后每3天进行半量换液。

1.6 神经元鉴定实验 在细胞培养到一定阶段,需要对培养物进行鉴定,以确定所培养的细胞是否为实验所需以及其纯度如何。一般神经元在培养第7~14天时状态最佳^[3],因此本实验选择在海马神经细胞培养到第8天时进行鉴定,采用神经元微管相关蛋白-2(Map-2)细胞免疫荧光染色法。将培养第8天的细胞取至实验操作台,吸去培养液,用PBS轻轻漂洗2遍,加入4%多聚甲醛固定30min;弃去多聚甲醛,用PBS轻轻漂洗3遍,每次10min。也可适当增多漂洗次数而缩短漂洗时间,以充分洗去残留多聚甲醛;用10%山羊血清封闭30min,弃去不洗;直接加入小鼠抗Map-2,4℃湿盒过夜;第2天取出培养板(或皿),PBS轻轻漂洗3次,每次10min;加入二抗(CY3标记羊抗小鼠IgG);避光用PBS漂洗3次,每次10min;避光加入稀释好的DAPI,2min后用PBS漂洗2~3次,尽量在短时间内完成漂洗;荧光显微镜下观察,拍照,进行计数。CY3在554nm激化,568~574nm发射荧光,呈鲜艳红

色,本实验中该标记物显示的是神经元胞体及树突;DAPI与DNA结合后在364 nm激化,454 nm发射蓝色荧光,本实验中标记所有细胞核,代表细胞总数。根据公式可计算出神经元纯度: $[\text{Map-2 阳性细胞数} / \text{细胞核数(总细胞数)}] \times 100\% = \text{神经元阳性率(即神经元纯度)}$ 。

1.7 对细胞进行分组处理 细胞培养至第8天,进行分组:实验分为空白对照组、正常血清组、模型血清组和逍遥散治疗血清组4组。空白对照组为正常培养细胞,不加药物和血清。操作:吸去原培养液,用PBS液轻轻荡洗2次,加正常培养液1 mL(无血清培养液);正常血清组均加入正常对照组大鼠血清(用培养液稀释,终浓度为体积分数10%);模型血清组加入慢性应激模型组大鼠血清(用培养液稀释,终浓度为体积分数10%);逍遥散治疗血清组加入逍遥散治疗组血清(用培养液稀释,终浓度为体积分数10%)。作用30 min之后进行RNA提取及PCR检测。

1.8 荧光定量PCR (Taqman 探针法) 检测各组 NR1mRNA、NR2AmRNA、NR2BmRNA 表达 用 Trizol 法提取各组总 RNA, Dnase I(Rnase Free)去除基因组 DNA,采用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度,分别测定 230、260、280 nm 处吸光度(OD)值,并计算其比值,所测定的定值为空白对照组 585.5 nm、正常血清组 409 nm、模型血清组 360 nm、逍遥散治疗血清组为 615.5 nm。每组取 RNA 2 μ g 进行逆转录反应(合成 cDNA),按说明书操作步骤进行。每组的每种基因均按照 3 倍平行孔实验,50 μ L 体系分别扩增 NR1 mRNA、NR2A mRNA、NR2B mRNA。体系内含 cDNA 模板 1 μ L,荧光定量 PCR MasterMIX 25 μ L,25 μ mol/L 上、下游引物分别取 1 μ L,25 pmol/L Taqman 荧光探针 12.5 μ L,ddH₂O 8.5 μ L,95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 1 s,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,共 40 个循环。

1.9 统计学方法 采用 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算各组 NR1mRNA、NR2AmRNA、NR2BmRNA 表达相对量,每组 ΔCt 值以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。采用 SPSS13.0 软件对各组数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐时采用多组间两两比较的 SNK 检验法检验,方差不齐时采用 Dunnett-tt3 检验法。

2 实验结果

各组 NR 各亚基 mRNA 表达相对量比较, NR1mRNA 逍遥散治疗血清组结果接近于正常血清组,正常血清组稍高于空白对照组,模型血清组表达相比更低一些,逍遥散治疗血清组比模型血清组高。空白对照组 NR2AmRNA 表达比正常血清组高,模型血清组刺激 NR2AmRNA 表达较正常血清组作用要高很多;逍遥散治疗血清组明显上调 NR2AmRNA 表达。正常血清组对 NR2BmRNA 与空白对照组相比具有明显的下调,而模型血清组对其影响也有明显的下调,但没有正常血清组的明

显,逍遥散治疗血清组下调,但相对正常血清组与比模型血清组稍高。

表2 各组 NR 各亚基 mRNA 表达相对量比较 (n=12)

组别	NR1mRNA		NR2AmRNA		NR2BmRNA	
	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
空白对照组	36.2527 \pm 3.65	1.00000	32.1737 \pm 0.59	1.0000	35.10 \pm 4.80	1.00000
正常血清组	36.4640 \pm 3.97	2.01697	30.0317 \pm 2.29	10.8866	33.77 \pm 1.10	13.0576
模型血清组	32.1638 \pm 3.23	3.33447	36.2128 \pm 6.92	0.20144	30.51 \pm 0.62	10.462
逍遥散治疗血清组	33.2739 \pm 0.60	24.3687	35.0089 \pm 3.21	7.32047	34.41 \pm 5.43	11.1256

3 讨论

海马是 NR 含量最高的脑区之一,若 NR 因某些原因过度激活,会出现兴奋性毒性脑损害,故海马最容易被兴奋性神经毒的侵害。本实验结果表明,以血清模拟的慢性应激微环境对 NR 各亚基的 mRNA 调节表现有不同程度的改变,尤其是 NR2AmRNA 调节升高最为明显。模型血清组 NR2AmRNA 表达显著,可能与兴奋性神经毒作用增强关系密切。逍遥散治疗血清组在减轻神经兴奋性毒性的同时也可能通过某些信号通路启动神经元保护机制,最终起到抗应激损伤作用。逍遥散治疗血清组对 NR1mRNA 表达改善很明显,可对维持海马神经细胞的稳定起到一定作用^[4]。该结论与课题组前期在体实验研究结论取得一致:逍遥散可以显著下调慢性应激大鼠海马神经元细胞中的 NR 各亚基的表达,起到缓减诸应激症状的疗效^[5]。

[参考文献]

- [1] Suzuki Y, Takagi Y, Nakamura R, et al. Ability of NMDA and non-NMDA receptor antagonists to inhibit cerebral ischemia damage in aged rats [J]. Brain Res, 2003, 964(1): 116.
- [2] Carter WR, Herman J, Stokes K. Promotion of diabetes onset by stress in BB rat [J]. Diabetologia, 1987, 30: 674.
- [3] 梁传栋, 赵文清, 李文玲, 等. 新生大鼠皮质神经元的体外原代培养及鉴定[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(7): 90.
- [4] 孙琪, 敖海清, 富文俊. 逍遥散抗慢性应激损伤中枢 Glu-NR-Ca²⁺-GR 信号通路机制探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 627-632.
- [5] 富文俊. 逍遥散对慢性应激损伤大鼠 HPA 轴负反馈功能及 GR、NR 亚型调节机制的研究[D]. 广州: 广州中医药大学博士学位论文, 2009: 62.

(责任编辑: 骆欢欢)