

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.005

淫羊藿苷调节大鼠脑内 N-甲基-D-天冬氨酸受体分子机制研究*

陈静, 高瑜, 夏海建, 黄富宏, 王蓓蓓[△]

(扬州大学附属医院药剂科, 江苏 扬州 225001)

摘要:目的 探讨淫羊藿苷对大鼠海马体中脑源性神经营养因子(BDNF)/TrkB 下游信号通路的调节作用, 以及其调节 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体可能的分子机制。方法 应用 MK-801 处理未成年大鼠, 构建精神分裂症动物模型。大鼠口服淫羊藿苷 2 周, 采用蛋白质印迹(WB)法检测淫羊藿苷对 BDNF、TrkB 及其下游 PKC/Raf-1/ERK 信号通路及 NMDA 受体蛋白表达的调节作用。结果 MK-801 可降低 NMDA 受体的表达水平, 同时可抑制 BDNF、TrkB、PKC、Raf-1、ERK1/2 的表达水平; 淫羊藿苷可逆转 MK-801 的作用, 即上调上述蛋白的表达水平, 其效果与现有抗精神病药利培酮相近。结论 淫羊藿苷可能通过激活 BDNF/TrkB 介导 PKC/Raf-1/ERK 信号通路而增进 NMDA 受体的功能。

关键词:淫羊藿苷; 脑源性神经营养因子; N-甲基-D-天冬氨酸受体; 精神分裂症; 大鼠

中图分类号: R965; R971

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)11-0018-04

Molecular Mechanism of Icaritin Regulating the NMDA Receptor in the Brain of Rats

CHEN Jing, GAO Yu, XIA Haijian, HUANG Fuhong, WANG Beibei

(Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China 225001)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of icaritin on the downstream signal pathway of brain-derived neurotrophic factor(BDNF)/TrkB in rat hippocampus, and to explore the possible molecular mechanism of icaritin regulating the N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor. **Methods** MK-801 and adolescent SD rats were used to establish the schizophrenia animal model. The rats were treated with icaritin orally for two weeks. Western Blot(WB) was used to detect the regulatory effects of icaritin on the expression of BDNF, TrkB and its downstream PKC/Raf-1/ERK signaling pathway, as well as NMDA receptors. **Results** MK-801 decreased NMDA receptor expression and inhibited the expression of BDNF, TrkB, PKC, Raf-1 and ERK1/2, respectively. Icaritin could reverse the effects of MK-801, i.e., up-regulate the expression of the aforementioned proteins, and its effects were similar to those of an existing antipsychotic drug-risperidone. **Conclusion** Icaritin may enhance the function of the NMDA receptor by activating BDNF/TrkB-mediated PKC/Raf-1/ERK signaling pathway.

Key words: icaritin; brain-derived neurotrophic factor; N-methyl-D-aspartate receptor; schizophrenia; rats

精神分裂症是由一组症状群所组成的临床综合征, 其破坏性严重^[1]。中枢神经系统谷氨酸, 尤其是 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)系统功能低下是精神分裂症的病因之一^[2]。淫羊藿为小檗科植物淫羊藿的全草, 是一种补益中药。淫羊藿苷是其主要活性成分, 可改善 NMDA 系统功能低下的精神分裂症动物的异常行为^[3]。但淫羊藿苷调节 NMDA 系统的分子机制未见报道。脑源性神经营养因子(BDNF)是由 BDNF 基因编码在脑内合成的一种具有神经营养作用的蛋白质, 广泛分布于中枢神经系统内, 在中枢神经系统发育过程中, 对神经元的存活、分化、生长发育起重要作用。BDNF 基因也是精神分裂症致病基因之一, 主要表现精神分裂症患者体内 BDNF 的表达发生异常^[4-6]。以淫羊藿为主药的中药方剂可治疗精神分裂症, 并调节海马体内 BDNF 的表达^[7-10]。同时, 淫羊藿苷对中枢神经中 BDNF mRNA 的表达具有调节作用^[11]。BDNF 可通过自分泌, 与细胞膜

上的 TrkB 受体结合, 并激活 TrkB 受体。激活的 TrkB 受体可活化下游蛋白磷脂酶 C γ (PLC γ)^[12]; 激活的 PLC γ 使 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP₂)水解产生二酰甘油(DAG), DAG 进一步激活蛋白激酶 C δ (PKC δ); PKC δ 通过活化 Ras 蛋白激活 Raf-1, 进一步激活其下游丝裂原活化蛋白激酶(MAPKK 或 MEK)及胞外调节蛋白激酶(ERK)。而 ERK 的激活可上调 NMDA 受体 NR1 亚基的活性^[13]。本研究应用 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 构建精神分裂症动物模型^[14], 探讨了淫羊藿苷对 BDNF/TrkB 介导的 PKC/Raf-1/ERK 信号通路的调节作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: CM1950 型冰冻切片机(德国 Leica Biosystems 公司)。

试剂: MK-801(M107), 5% 小牛血清蛋白(BSA, 批

*基金项目: 江苏省扬州市科技计划项目[YZ2016131]。

第一作者: 陈静, 女, 大学本科, 副主任中药师, 研究方向为临床中药学, (电子信箱)dentgaj@126.com。

[△]通信作者: 王蓓蓓, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为临床药学, (电子信箱)22381807@qq.com。

号为 B2064), 利培酮(批号为 PHR1631), 均购自美国 Sigma - Aldrich 公司; anti - BDNF(批号为 ab108319), anti - TrkB(批号为 ab18987), anti - Raf - 1(批号为 ab137435), anti - NMDA NR1(批号为 ab109182), 均购自英国 Abcam 公司; anti - PKC δ (批号为#2058), Anti - ERK1/2(批号为#4696), β - actin(批号为#3700, 1 : 5 000), 均购自美国 Cell Signal 公司; NP40 裂解液(碧云天生物技术公司, 批号为 P0013F); SDS - PAGE 电泳凝胶(批号为 1656020), PVDF 膜(批号为 1620177), 均购自美国 Bio - Rad 公司; 淫羊藿苷(南京本草益康生物科技有限公司)^[11]。

动物: SPF 级健康雄性 SD 大鼠 24 只, 4 周龄, 体重 90 ~ 110 g, 购自南京青龙山动物养殖中心, 实验动物使用许可证号为 SYXK(苏)2017 - 0044, 动物实验证书编号为 2150541。

1.2 方法

精神分裂症模型的构建: 采用 MK - 801 制备精神分裂症动物模型。选取大鼠 24 只, 清洁饲养, 饲养环境温度控制在 21 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$, 12 h 昼夜节律(8:00 ~ 20:00), 自由进食和饮水。将 MK - 801 溶于生理盐水中, 腹腔注射, 每日 1 次, 剂量为 0.2 mg/kg; 空白对照组注射生理盐水; 所有动物接受连续 2 周的 MK - 801 或生理盐水注射。

实验分组与给药: MK - 801 处理后, 动物行为异常(尤其是认知障碍和空间记忆障碍)可持续数周至数月^[15], 故 MK - 801 动物模型构建完成后, 对大鼠使用药物。将 MK - 801 处理的大鼠随机分为模型组、药物组(淫羊藿苷组)和阳性对照组(利培酮组), 每组 6 只。将相应药物混入糖丸(含玉米粉 40%、白砂糖 40%、全脂奶粉 18%、明胶 2%), 喂饲大鼠, 1 日 3 次, 每 8 h 1 次。对照组喂饲不含药物的糖丸; 模型组喂饲不含药物的糖丸; 药物组喂饲含淫羊藿苷[30 mg/(kg · d)]^[11]的糖丸; 阳性对照组喂饲含利培酮[0.3 mg/(kg · d)]的糖丸。连续喂饲 1 周。

蛋白质印迹(WB)法检测蛋白质的表达: 采用冰冻切片法切取大鼠海马体组织, 在冰冻切片机上切成 500 μm 厚度的切片, 再对照脑图谱^[16]切取海马体。加入含蛋白酶抑制剂的 NP40 裂解液匀浆脑组织。匀浆后的组织加热变性, 以每孔 10 μg 蛋白上样, 进行 SDS - PAGE 电泳, 电泳结束后转至 PVDF 膜上, 5% 小牛血清蛋白(BSA)于室温封闭 1 h。再加入相应抗体, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 过夜。采用 Bio - Rad Image Lab 软件进行灰度分析, 所有实验重复 3 次, 以确保重复性。

1.3 统计学处理

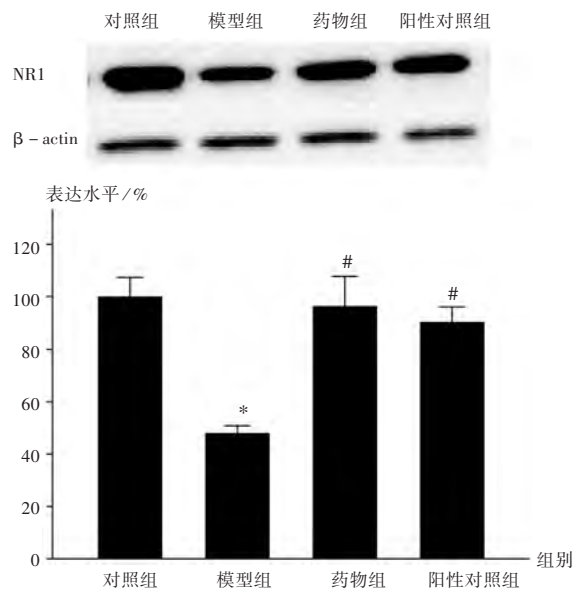
实验数据采用 $\bar{X} \pm SE$ 表示, 采用 SPSS 25.0 统计学软件进行分析, 利用 Kolmogorov - Smirnov Z - test 检

测数据呈正态分布。若数据呈正态分布, 则利用单因素方差分析(One - way ANOVA)及 Dunnett t 检验比较组间差异; 若数据不呈正态分布, 则使用 Kruskal - Wallis H 检验及 Mann - Whitney U 检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对海马体中 NMDA NR1 亚体表达的调节作用

结果见图 1。MK - 801 模型组中, NMDA NR1 亚体的表达水平显著下降($P < 0.01$); 药物处理后, 与模型组相比, MK - 801 导致的 NMDA NR1 亚体的表达水平显著上升($P < 0.05$), 使其恢复至正常水平, 且其效果接近利培酮($P < 0.05$)。



注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图2, 图6同。

图1 淫羊藿苷对 NMDA 受体 NR1 亚基表达水平的调节作用

2.2 对海马体中 BDNF 表达的调节作用

结果见图 2。MK - 801 处理 2 周后可显著降低海马体中 BDNF 的表达水平($P < 0.01$); 与模型组相比, 药物处理后淫羊藿苷可显著提升被 MK - 801 下调的 BDNF 的表达水平($P < 0.05$), 使其恢复至接近正常水平, 其效果与利培酮相似。

2.3 对海马体中 TrkB 受体表达的调节作用

TrkB 受体是 BDNF 的主要作用受体。由图 3 可见, TrkB 受体的表达水平在 MK - 801 处理 2 周后显著下降($P < 0.01$)。与模型组相比, 药物处理后, 淫羊藿苷可显著提升被 MK - 801 下调的 TrkB 受体的表达水平($P < 0.05$), 使其恢复至接近正常水平, 其效果与利培酮相似。

2.4 对海马体中 PKC 表达的调节作用

结果见图 4。MK - 801 可显著下调 PKC 的表达水平($P < 0.01$)。与模型组相比, 药物处理后, 淫羊藿苷可

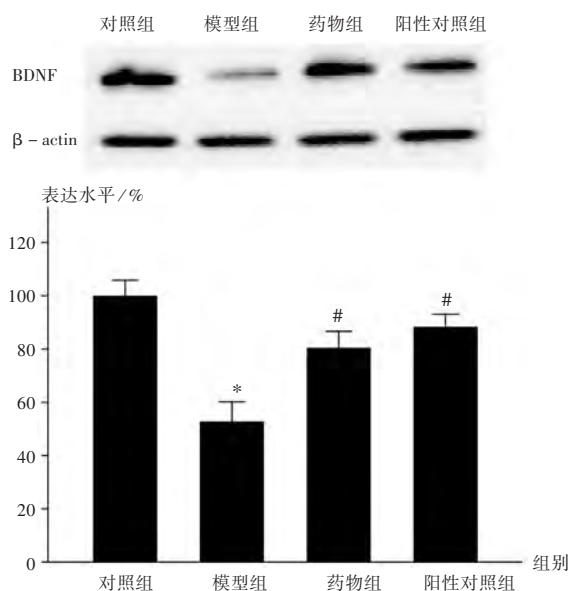


图2 淫羊藿苷对 BDNF 表达水平的调节作用

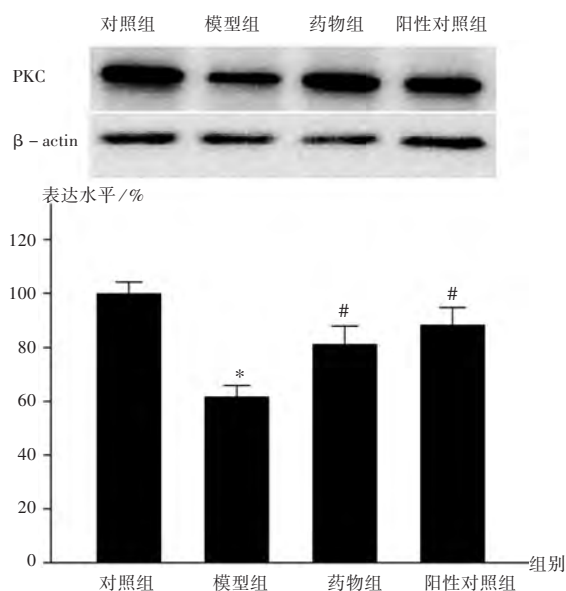
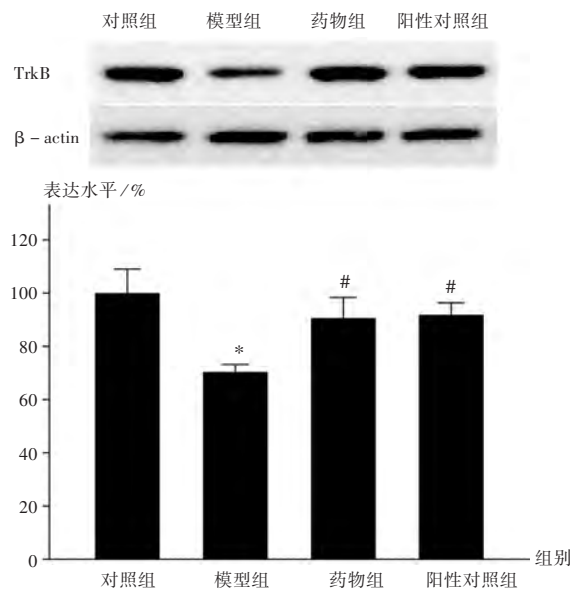


图4 淫羊藿苷对 PKC 表达水平的调节作用



注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。图4及图5同。

图3 淫羊藿苷对 TrkB 受体表达水平的调节作用

显著上调被 MK-801 下调的 PKC 表达水平($P < 0.05$),其效果与利培酮相似。

2.5 对海马体中 Raf-1 表达的调节作用

结果见图5。MK-801 可显著下调 Raf-1 的表达水平($P < 0.01$)。与模型组相比,药物处理后,淫羊藿苷虽上调了 Raf-1 的表达水平,但差异无统计学意义($P = 0.068$);而利培酮可显著提升 Raf-1 的表达水平($P < 0.05$)。

2.6 对海马体中 ERK1/2 表达的调节作用

结果见图6。可见,MK-801 可显著下调 ERK 的表达水平($P < 0.01$)。药物处理后,与模型组相比,药物组的 ERK 表达水平显著上升($P < 0.05$),使其恢复至接近正常水平,其效果与利培酮相似。

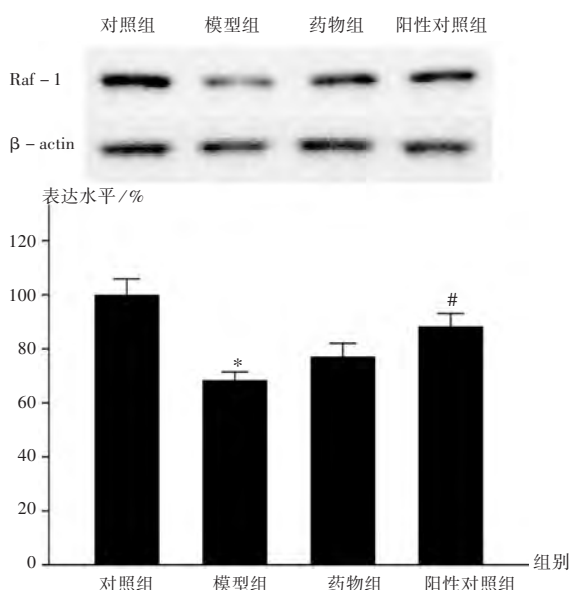


图5 淫羊藿苷对 Raf-1 表达水平的调节作用

3 讨论

谷氨酸受体功能低下被认为是精神分裂症的发病机制之一。MK-801 作为 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂,能通过降低脑内 NMDA 受体功能引起类似精神分裂症的症状,在啮齿类动物中引起一系列复杂的行为学改变,常作为筛选抗精神分裂症潜在药物的经典动物模型^[2]。本研究应用 MK-801 腹腔给药处理未成年大鼠,阻断其脑内 NMDA 受体,从而破坏大鼠脑部 NMDA 系统的发育,致使动物成年后出现 NMDA 受体功能低下导致的相关症状,如认知障碍和空间记忆障碍^[14]。本研究结果显示,淫羊藿苷可上调海马体中 NMDA 受体 NR1 亚体的表达水平,从分子层面证实淫羊藿苷可增强 NMDA 受体的功能。

抗精神病药物可通过 BDNF 介导的通路调节 NMDA

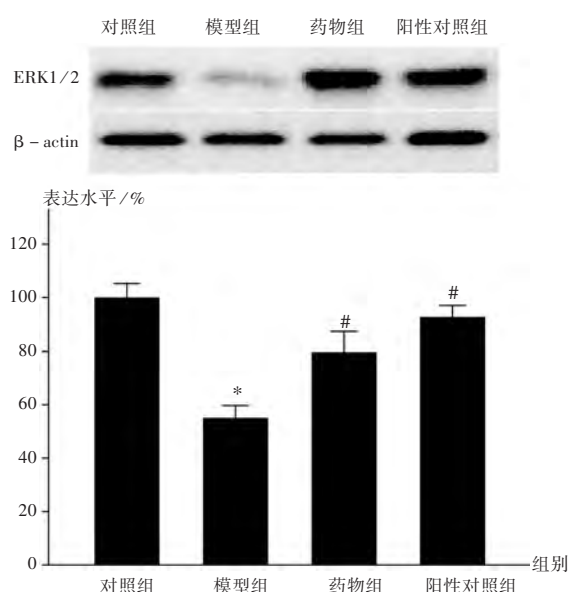


图6 淫羊藿苷对 ERK1/2 表达水平的调节作用

受体的功能。TrkB 受体是 BDNF 的主要功能受体,表达在细胞膜上,BDNF 可通过自分泌,与 TrkB 受体结合并使其活化,而 PKC,Raf-1,ERK 是 TrkB 受体下游信号通路之一,其蛋白表达水平与 TrkB 受体表达相关。

本研究结果显示,淫羊藿苷可上调被 MK-801 抑制的 TrkB 受体的表达水平,可能是由于其上调了 BDNF 的表达,致使 TrkB 受体的表达水平上升;可改善被 MK-801 下调的 BDNF 的表达水平,其很有可能通过 BDNF 介导的通路调节 NMDA 受体功能;PKC,Raf-1,ERK 的表达水平均受到抑制,但淫羊藿苷可显著提升这些蛋白的表达水平。结果显示,淫羊藿苷很有可能通过激活 BDNF/TrkB 介导 PKC/Raf-1/ERK 信号通路增进 NMDA 受体的功能,进而治疗 NMDA 受体功能低下导致的精神分裂症。

本研究中,采用抗精神病药物利培酮作为阳性对照。结果显示,淫羊藿苷的疗效接近利培酮,且调节 NMDA 受体的分子机制与利培酮相似,提示其在精神分裂症治疗领域具有良好的应用前景。现有抗精神病药物都具有毒副作用(如锥体外系反应),也未见患者长期使用淫羊藿苷有明显的毒副作用;相反,淫羊藿苷和现有抗精神病药物联用可改善患者的生活质量^[7],故淫羊藿苷很有可能成为现有抗精神病药物的优良替代品,但仍需进一步探索淫羊藿苷对多种不同精神分裂症的治疗效果。但由于本研究属中短期实验,淫羊藿苷的毒副作用可能尚未表现出来,后续研究中应对比现有抗精神病药物,系统研究长期使用淫羊藿苷可能引起的毒副作用;且淫羊藿苷是否还通过其他信号通路调节 NMDA 受体也有待进一步研究。

参考文献:

[1] VAN OSJ, KAPUR S. Schizophrenia [J]. Lancet, 2009, 374(9690):635-645.

[2] HOWES O, MCCUTCHEON R, STONE J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century[J]. J Psychopharmacol, 2015, 29(2):97-115.

[3] 陈溪,谷洪顺,张兰,等. 淫羊藿苷对 MK-801 致精神分裂症小鼠模型的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(4):395-398.

[4] BIRNBAUM R, WEINBERGER DR. Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2017, 18(12):727.

[5] XIONG P, ZENG Y, WU Q, et al. Combining serum protein concentrations to diagnose schizophrenia: a preliminary exploration[J]. J Clin Psychiatry, 2014, 75(8):e794-e801.

[6] ISLAM F, Mulsant BH, VOINESKOS AN, et al. Brain-derived neurotrophic factor expression in individuals with schizophrenia and healthy aging: testing the accelerated aging hypothesis of schizophrenia[J]. Curr Psychiatry Rep, 2017, 19(7):36.

[7] CHEN ZH, WANG GH, WANG XP, et al. Effect of Warm-Supplementing Kidney Yang(WSKY) added to risperidone on quality of life in patients with schizophrenia: a randomized controlled trial[J]. Clin Rehabil, 2009, 23(11):963-972.

[8] 秦丽,陈振华,王高华,等. 补肾壮阳胶囊对精神分裂症模型大鼠认知行为的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2015, 36(5):699-701.

[9] 周本宏,张红盼,郭敏,等. 补肾壮阳胶囊对小鼠认知功能障碍的改善作用及机制研究[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(20):1739-1744.

[10] GUO X, CHEN ZH, WANG HL, et al. WSKY, a traditional Chinese decoction, rescues cognitive impairment associated with NMDA receptor antagonism by enhancing BDNF/ERK/CREB signaling[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(4):2927-2934.

[11] 吴芹,陆远富,张锋,等. 淫羊藿苷对自然衰老大鼠海马组织 BDNF 和 TrkB mRNA 表达的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(7):548-551.

[12] ZHANG Z, FAN J, REN Y, et al. The release of glutamate from cortical neurons regulated by BDNF via the TrkB/Src/PLC-gamma1 pathway[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(1):144-151.

[13] SLACK SE, PEZET S, MCMAHON SB, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord[J]. Eur J Neurosci, 2004, 20(7):1769-1778.

[14] LI JT, SU YA, GUO CM, et al. Persisting cognitive deficits induced by low-dose, subchronic treatment with MK-801 in adolescent rats[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 652(1-3):65-72.

[15] WIESCHOLLECK V, MANAHAN-VAUGHAN D. Long-lasting changes in hippocampal synaptic plasticity and cognition in an animal model of NMDA receptor dysfunction in psychosis[J]. Neuropharmacology, 2013, 74:48-58.

[16] Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 7/e[M]. London: Academic Press, 2014:146-168.

(收稿日期:2019-11-11)