

人参调节海马星形胶质细胞兴奋性氨基酸转运功能拮抗小鼠应激障碍的研究

王中立^{1,2}, 易本谊¹, 干丽君¹, 李秀丽¹, 卞尧尧³

(1. 九江学院护理学院, 江西 九江 332000; 2. 九江学院江西省系统生物医学重点实验室, 江西 九江 332000; 3. 南京中医药大学护理学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 观察应激对小鼠海马星形胶质细胞兴奋性氨基酸转运功能的影响,并探讨人参水煎液对此功能紊乱的调节作用。方法 100 只雄性 ICR 小鼠随机分为 10 组,对照组和模型组各 5 组。应激模型采用腹腔注射皮质酮,10 组动物分配至 5 个时间点(1、2、3、4、5 周)进行实验。另取 30 只雄性 ICR 小鼠分为对照组、模型组和人参干预组,每组 10 只。2 组实验独立开展,实验周期均为 5 周。实验结束后,检测体质量、行为学、神经元结构/功能指标(NF-L、SYP)、星形胶质细胞生物标志指标(GFAP)和兴奋性氨基酸转运功能指标(EAATs),进行统计学分析。结果 皮质酮注射 1~3 周小鼠海马星形胶质细胞标志蛋白反应性高表达,第 3 周末表达水平下调($P<0.05$),同时神经元结构功能指标表达下调提示神经元损伤,实验动物出现体质量和行为学的显著改变($P<0.05$)。进一步检测星形胶质细胞兴奋性氨基酸转运蛋白,显示表达下调,并与神经元损伤呈正相关性。人参干预组对模型小鼠 EAATs、GFAP、NF-L 和 SYP 的表达下降均有显著改善作用($P<0.05$)。结论 腹腔注射皮质酮可使小鼠海马神经元损伤并出现行为学异常,其机制可能是应激影响星形胶质细胞兴奋性氨基酸转运功能所导致,人参水煎液可通过此机制发挥抗应激作用。

关键词: 人参; 应激; 星形胶质细胞; 神经元; 兴奋性氨基酸; 转运

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2019)06-0682-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0682

引文格式: 王中立, 易本谊, 干丽君, 等. 人参调节海马星形胶质细胞兴奋性氨基酸转运功能拮抗小鼠应激障碍的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(6): 682-686.

Stress-Induced Dysfunction of Excitatory Amino Acid Transport in Hippocampal Astrocytes of Mice

WANG Zhong-li^{1,2}, YI Ben-yi¹, GAN Li-jun¹, LI Xiu-li¹, BIAN Yao-yao³

(1. School of Nursing, Jiujiang University, Jiujiang, 332000, China; 2. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Systems Biomedicine, Jiujiang University, Jiujiang, 332000, China; 3. School of Nursing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of stress on the excitatory amino acid transport function of hippocampus astrocytes in mice. **METHODS** 100 male ICR mice were randomly divided into 10 groups, 5 control groups and 5 model groups. The stress model was made by intraperitoneal injection of corticosterone. Ten groups of animals were allocated to five time points (1, 2, 3, 4, 5 weeks). Another 30 male ICR mice were divided into control group, model group and ginseng intervention group. Two groups of experiments were conducted independently, and the experimental period was 5 weeks. At the end of the experiment, body weight, ethology, neuron structure/function index (NF-L, SYP), astrocyte biomarker index (GFAP) and excitatory amino acid transport function index (EAATs) were measured and analyzed statistically. **RESULTS** The expression of astrocyte marker protein was highly expressed in the hippocampus of mice 1 to 3 weeks after corticosterone injection. The expression level was down-regulated at the 3rd week and showed a significant difference ($P<0.05$), and the expression of neuronal structural function index was down-regulated. Neuronal damage, experimental animals showed significant changes in body weight and behavior ($P<0.05$). Further detection of astrocyte excitatory amino acid transporter protein showed down-regulation of expression and a positive correlation with neuronal damage. **CONCLUSION** Intraperitoneal injection of corticosterone can damage the hippocampus neurons of mice and exhibit behavioral abnormalities. The mechanism may be caused by stress affecting the astrocyte excitatory amino acid transport function.

收稿日期: 2019-07-21

基金项目: 国家自然科学基金(81603529); 江西省自然科学基金青年基金(20181BAB215035); 江西省教育厅科技项目(GJJ170969); 江西省卫生厅科技项目(20195630); 江苏省高校自然科学基金(16KJB360002); 江苏高校“青蓝工程”项目

第一作者: 王中立, 男, 讲师, E-mail: zhongliwangtcm@126.com

通信作者: 卞尧尧, 男, 副教授, 主要从事人参防治情志病靶点及机制研究, E-mail: 1691@163.com

KEY WORDS: ginseng; stress; astrocytes; neurons; excitatory amino acids; transport

适度应激被认为能够增强神经系统功能,帮助机体提高对环境及刺激的适应性。但剧烈的或持久的应激可导致神经系统可塑性损伤,从而导致情绪和行为的异常,发展为应激障碍,严重者最终可导致抑郁症等疾病^[1]。随着社会的发展,生活节奏的变化,大量人群处于持续的慢性应激之中,对健康造成比较严重的影响。关于慢性应激导致的中枢神经障碍的病理机制尚不完全清楚,但研究发现脑内有几个重要脑区参与其中,包括大脑前额叶皮质、海马组织及杏仁核等^[2-4]。关于这些重要脑区的研究往往集中在神经元本身功能的改变上,但近年来研究发现胶质细胞作为脑内数量最多的细胞,参与了应激致病的过程。尤其是星形胶质细胞其生理功能广泛且重要,星形胶质细胞是哺乳动物脑内分布最广泛的一类细胞,在维持和调节神经元功能方面扮演着极其重要的角色,比如:释放 D-丝氨酸参与调节兴奋性突触传递、清理由于神经兴奋突触间隙中增加的钾离子和谷氨酸、释放各类神经营养因子以及参与构建血脑屏障等^[5-6]。

人参是中医临床常用的中药材,具有悠久的药用历史。近年来,随着人参现代药理学研究的开展,对于人参现代药理学知识有了深入全面的认识,其中就包括了其对神经系统的保护作用,研究发现人参具有抗抑郁和抗应激的药理作用,但具体的作用机理尚不清楚。基于以上内容,本研究确立了2个研究目的:①以兴奋性氨基酸中毒假说为切入点,观察慢性应激是否可以导致星形胶质细胞摄取谷氨酸的能力下降,导致神经元受损,引发小鼠应激障碍。②观察人参水煎液对小鼠应激障碍的药效作用,并评价是否基于改善星形胶质细胞 EAATs 表达的途径发挥作用。

本研究通过构建慢性应激小鼠模型观察星形胶质细胞的形态及功能改变,探明慢性应激与星形胶质细胞摄取谷氨酸功能之间关系,了解该机制与神经元损伤的相关性。同时,观察人参水煎液对抗慢性应激是否通过这一机制发挥作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验选用 ICR 雄性小鼠 130 只,饲养于恒温恒湿动物房内,动物自由进食和饮水,昼夜交替时间 12 h,适应饲养 5 d 后进行试验,动物许可证号:

SCXK(苏)2008-0010。

1.2 药剂与仪器

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 购于南京市先声药业,采用传统煎煮方法获得人参水煎液。蛋白提取试剂盒(碧云天,批号:P0033);蛋白定量试剂盒(Thermo Fisher,批号:23246);RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,批号:DP431);逆转录试剂盒(Thermo Fisher,批号:4368813);GFAP 抗体(abcam 兔多抗,批号:ab7260);EAAT1 抗体(abcam 兔多抗,批号:ab416);EAAT2 抗体(abcam 兔多抗,批号:ab41621);NF-L 抗体(proteintech 鼠单抗,批号:60189-1-lg);SYP 抗体(SANTA CRUZ 鼠单抗,批号:sc-17750);羊抗鼠二抗(碧云天,批号:A0216);羊抗兔二抗(碧云天,批号:A0208);行为学检测系统(上海吉量行为学系统);电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.3 动物分组与造模

①观察模型小鼠星形胶质细胞形态与功能的时程变化。将 100 只实验小鼠随机分为 10 组,对照组 5 组,模型组 5 组,分别对应 5 个时间节点(1、2、3、4、5 周),具体分组情况见表 1。通过腹腔注射皮质酮建立小鼠应激动物模型,造模剂量为 20 mg/kg,实验周期 5 周^[7],对照组小鼠腹腔注射相同体积比的生理盐水,每周对相应时间节点(每周的周末,即第 7、14、21、28、35 天)的实验动物进行体质量和行为学检测后处死,取材检测相关指标。②观察人参对模型小鼠星形胶质细胞形态与功能的药理作用。设立对照组、模型组和人参组,每组 10 只小鼠,对照组与模型组的处理方法同上,人参组在造模的同时给予人参水煎液灌胃,根据体表面积法换算,人参组给予相当于人参生药 3.6 g/kg 的剂量灌胃^[8],实验周期 5 周。

表 1 实验分组情况

分组	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周
对照组	10 只	10 只	10 只	10 只	10 只
模型组	10 只	10 只	10 只	10 只	10 只

1.4 检测指标

体质量测定,获得应激对小鼠营养代谢及躯体反应的影响。行为学监测主要包括强迫游泳实验和强迫悬尾实验^[9],测试实验动物的绝望行为同时反应实验小鼠应激后情绪的改变。麻醉后处死小鼠,

迅速取脑并分离海马组织,提取蛋白进行生化检测。神经生化检测探讨实验动物发生行为学及情绪改变的本质及病理基础。检测指标包括:神经元轻链微丝蛋白(NF-L),突触囊泡蛋白(SYP),胶质酸性纤维蛋白(GFAP),兴奋性氨基酸转运蛋白 1(EAAT1),兴奋性氨基酸转运蛋白 2(EAAT2)。

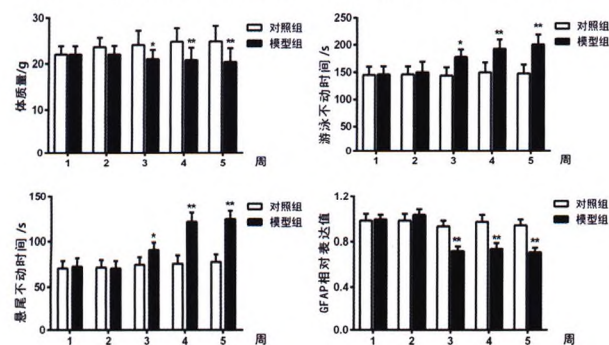
1.5 统计学方法

数据录入及分析应用 SPSS20.0 统计软件包完成,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组之间数据比较采用 t 检验,同时应用双因素方差分析获得造模和时程对实验小鼠的影响,并对神经元损伤指标与兴奋性氨基酸转运功能指标进行相关性分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组体质量变化及行为学检测

实验进行过程中模型组小鼠体质量呈逐渐下降趋势至第 3 周与对照组比较出现显著差异,此种差异持续至第 5 周实验结束。模型组实验小鼠在强迫游泳和强迫悬尾实验中,静止不动时间同样于第 3 周与对照组出现统计学差异,提示第 3 周末模型组动物出现体质量和行为学的显著改变,见图 1。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

图 1 实验小鼠体质量、行为学及星形胶质细胞生物标记蛋白的表达

2.2 海马星形胶质细胞 GFAP 表达结果

随着应激进程的发展,GFAP 作为星形胶质细胞的生物标记蛋白也发生着明显的变化,应激初期的两周数据显示 GFAP 反应性增多,应激发生后 3 周 GFAP 表达量开始下降,直至第 5 周均呈现地表达状态,见图 1。

2.3 海马神经元指标

NF-L、SYP 分别在神经元的骨架结构和突触功能中发挥重要作用,应激过程中两者分别于第 3 周表达降低,模型组小鼠与对照组小鼠相比呈现显著差异,反应神经元的损伤情况,见图 2。

2.4 海马星形胶质细胞兴奋性氨基酸转运蛋白表达结果

应激发生前 2 周,EAAT1 和 EAAT2 均出现表达增高的表现,随着应激进一步加重即时程的进一步延长,两者均出现表达降低的表现,从第 3 周起,2 种转运蛋白在模型组小鼠海马组织中表达均显著低于对照组,并持续至第 5 周实验结束。具体结果见图 2~3。

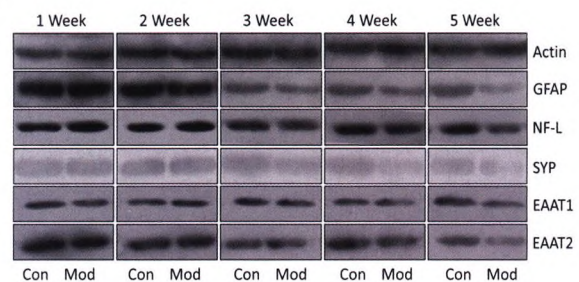
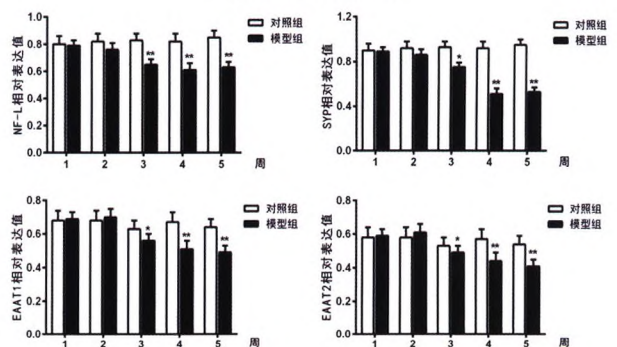


图 2 GFAP、NF-L、SYP、EAAT1 及 EAAT2

蛋白免疫印迹条带



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

图 3 神经元损伤指标与兴奋性氨基酸转运蛋白表达结果

2.5 星形胶质细胞兴奋性氨基酸转运蛋白下调与神经元损伤相关性分析

应激发生后 EAAT1 和 EAAT2 出现显著低表达,同时神经元结构蛋白 NF-L 和突触囊泡蛋白 SYP 呈现低表达,将两者的表达变化按时程过程排列,进行相关性分析发现兴奋性氨基酸转运体功能的异常与神经元损伤的两种蛋白表达成高水平的正相关,结果与前人研究一致^[10],具体结果见图 4。

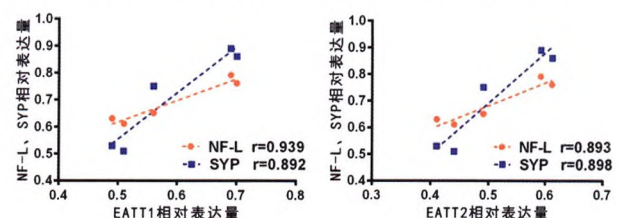


图 4 兴奋性氨基酸转运功能变化与神经元损伤指标相关性

2.6 人参水煎液对应激小鼠的行为学改善作用

人参水煎液在强迫游泳和强迫悬尾行为检测

中,与模型组小鼠比较,累计不动时间显著降低($P<0.01$),见图5。

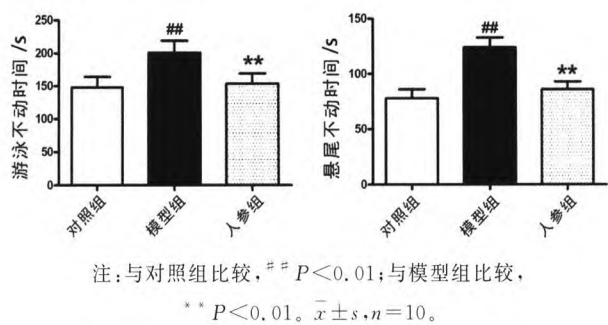


图5 人参水煎液对应激小鼠的行为学改变

2.7 人参水煎液对 NF-L、SYP 表达水平的影响

人参水煎液可以显著提高模型小鼠神经元骨架蛋白 NF-L 和突触囊泡蛋白 SYP 的表达水平($P<0.01$),体现了人参保护神经元功能,见图6。

2.8 人参水煎液对 GFAP、EAATs 表达水平的影响

星形胶质细胞标志蛋白 GFAP 及谷氨酸转运蛋白经人参水煎液干预后,均呈现上调表达,提示人参保护神经元的同时参与调节星形胶质细胞的结构和功能变化,见图6。

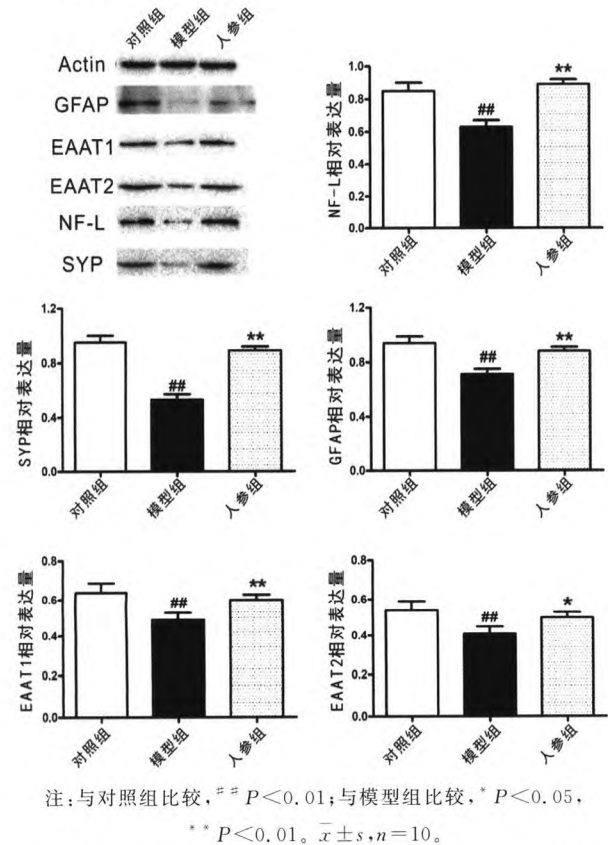


图6 人参对 NF-L、SYP、GFAP、EAATs 表达水平的影响

3 讨论

应激对健康的影响越来越受到医学工作者的重

视,主要原因是生活工作模式的改变应激源增多,人们应对长期应激或是短期强烈应激的机会增多,由此导致的健康问题逐渐凸显,而临床医学应对此类疾病的认识及应对方式严重缺乏,这使得进一步研究应激致病的病理生理机制并找到预防和治疗应激性疾病的方法和药物成为一项重要任务。

传统基础研究中建立应激动物模型多通过不可预见性应激方式完成,本研究根据赵玉男教授的研究结果,通过腹腔注射皮质酮模拟应激发生过程中下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)亢奋这一重要病理基础,实现应激动物模型的制备^[7]。本模型的优势在于便于操作,动物成模率高,一致性好。更为重要的是本模型不仅能引起类似于应激所致神经元损伤,从而诱发动物相关行为学改变,同时近期研究结果显示本模型适用于应激所致星形胶质细胞功能变化及损伤的研究,因此更适用于本研究。

应激发生后引起 HPA 轴功能亢进,在糖皮质激素的持续作用下中枢神经系统发生功能甚至是器质性损伤。前期对于应激致病机理的研究主要集中在神经元功能和结构的改变上,这一环节至关重要但位于较下游,神经元发生显著异常后往往疾病进入显著临床表现期,并且治疗效果往往不甚理想^[11-12]。基于这一原因,向疾病发生过程的上游探索或广泛关注中枢神经系统其他类型细胞在疾病中的作用是进一步完善应激致病发生机制的可行性方案。

星形胶质细胞作为中枢神经系统中数量最多的细胞,近年来被发现具有多种重要的生理功能,参与神经元生长发育,保护神经元修复其损伤,维持神经元周围环境的稳态,并辅助传递信息。其中,星形胶质细胞作为突触间隙兴奋性神经递质谷氨酸调节角色,与应激后兴奋性氨基酸毒性作用密切相关。星形胶质细胞表面有多重兴奋性氨基酸转运蛋白,如 EAAT1 和 EAAT2,生理情况下对维持兴奋性氨基酸浓度至关重要^[13]。本研究基于此展开,探讨星形胶质细胞在应激发生过程中是否发挥作用,EAATs 是否出现问题成为我们想要了解的主要问题。

研究结果显示,应激可导致小鼠体质量下降,同时出现绝望行为,在强迫悬尾和强迫游泳实验中模型组小鼠不动时间从第3周开始出现显著延长。行为学变化的基础为神经系统病变,所以检测神经元骨架蛋白(NF-L)及突触囊泡蛋白(SYP)发现均显著下调,此结果与前人应用模型进行研究结果一

致^[14-15]。星形胶质细胞生物标记蛋白 GFAP 则呈现先增高后降低的表现,至第 3 周末呈现显著低表达。同时,兴奋性氨基酸转运蛋白(EAATs)表达趋势与 GFAP 一致。综上结果可知,应激导致神经元损伤的同时星形胶质细胞发生着显著改变,并且低表达的时间与神经元损伤时间平行,说明星形胶质细胞参与了应激的病理过程,与前人及本团队前期研究结果相一致。EAATs 的低表达会导致兴奋性氨基酸水平增高对神经元造成损伤,两者是否在时程及表达上存在相关性,进一步的相关性分析发现 EAATs 的低表达与神经元损伤程度呈高度正相关。研究结果表明,星形胶质细胞参与了应激致病过程,并且兴奋性氨基酸转运功能的异常在其中发挥着重要作用。

近年来,人参所具备的神经保护作用被广泛报道,其中抗应激的作用的研究显示其具有较好的预防作用,但具体机制还未被完全阐释清楚^[16]。本研究结果显示:人参水煎液能够逆转应激所致的模型小鼠行为学改变,同时上调神经元结构功能损伤导致的关键蛋白的表达水平,与前人所报道的神经保护作用相一致。同时,检测星形胶质细胞及其兴奋性氨基酸转运功能指标显示人参水煎液可调节应激过程中星形胶质细胞的功能紊乱,提示人参发挥抗应激的药理作用可能通过星形胶质细胞途径发挥作用。

由于检测手段和实验技术的局限性,本研究存在客观不足。首先,不能够准确的证实神经元的损伤主要因素为兴奋性氨基酸毒性作用;其次,由于中枢神经系统工作的复杂性,不能够排除其他机制在其中的作用;最后,星形胶质细胞的功能多样且重要,星形胶质细胞功能的异常可导致多种变化,本研究仅讨论了兴奋性氨基酸的影响,以上所涉及的问题也是我们后续研究的方向和内容。

应激致病机理的探讨至今尚无定论,发现其中占主导作用的病理机制或分子,作为临床治疗预防应激性疾病的潜在药物靶点或调控位点至关重要。继续开展相关研究,理解病理生理机制的同时发现有效药物是后续工作的重要内容。本研究从星形胶质细胞角度出发为解释应激所致疾病的机制提供又一思路和方向。

参考文献:

[1] YU B, CHEN X, ELLIOTT AL, et al. Social capital, migra-

- tion stress, depression and sexual risk behaviors among rural-to-urban migrants in China: A moderated mediation modeling analysis[J]. *Anxiety Stress Coping*, 2019,32(4):362-375.
- [2] SHEN M, SONG Z, WANG JH. microRNA and mRNA profiles in the amygdala are associated with stress-induced depression and resilience in juvenile mice[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2019,236(7):2119-2142.
- [3] TASLIMI Z, KOMAKI A, SARIHI A, et al. Effect of acute and chronic restraint stress on electrical activity of prefrontal cortex neurons in the reinstatement of extinguished methamphetamine-induced conditioned place preference: An electrophysiological study[J]. *Brain Res Bull*, 2019,146:237-243.
- [4] ZALETEL I, FILIPOVIC D, PUSKAS N. Chronic stress, hippocampus and parvalbumin-positive interneurons: What do we know so far? [J]. *Rev Neurosci*, 2016,27(4):397-409.
- [5] CARTER SF, CHIOTIS K, NORDBERG A, et al. Longitudinal association between astrocyte function and glucose metabolism in autosomal dominant Alzheimer's disease[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019,46(2):348-356.
- [6] DAVILA D, THIBAUT K, FIACCO TA, et al. Recent molecular approaches to understanding astrocyte function *in vivo* [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013,7:272.
- [7] ZHAO Y, XIE W, DAI J, et al. The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice[J]. *Brain Res*, 2009,1261:82-90.
- [8] 王中立. 补气药预防慢性应激致海马神经元损伤研究[D]. 南京:南京中医药大学,2011.
- [9] POLESZAK E, SZOPA A, BOGATKO K, et al. Antidepressant-like activity of typical antidepressant drugs in the forced swim test and tail suspension test in mice is augmented by DMPX, an adenosine A2A receptor antagonist[J]. *Neurotox Res*, 2019,35(2):344-352.
- [10] HEIMFARTH L, LOUREIRO SO, DUTRA MF, et al. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride[J]. *Neurotoxicology*, 2013,34:175-188.
- [11] STARR LR, DIENES K, LI YI, et al. Chronic stress exposure, diurnal cortisol slope, and implications for mood and fatigue: Moderation by multilocus HPA-axis genetic variation [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 100:156-163.
- [12] STARR LR, HUANG M. HPA-axis multilocus genetic variation moderates associations between environmental stress and depressive symptoms among adolescents [J]. *Dev Psychopathol*, 2018,31(4):1339-1352.
- [13] FAHLKE C, KORTZAK D, MACHTENS JP. Molecular physiology of EAAT anion channels[J]. *Pflügers Arch*, 2016, 468(3):491-502.
- [14] ZHANG H, ZHAO Y, WANG Z. Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal astrocyte structural plasticity and induces hippocampal atrophy in mice[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 592:76-81.
- [15] WANG Z, DAI J, CHEN L, et al. Preventive action of *Panax ginseng* roots in hypercortisolism-induced impairment of hippocampal neurons in male C57BL/6N mice[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(8):1242-1245.
- [16] WANG Z, ZHU K, CHEN L, et al. Preventive effects of ginsenoside Rg1 on post-traumatic stress disorder (PTSD)-like behavior in male C57/B6 mice[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 605:24-28.

(编辑:董宇)