

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.30.001

文章编号: 1005-8982 (2018) 30-0001-06

基础研究 · 论著

嘌呤 P2X7 受体介导对氯苯丙氨酸致大鼠 前额皮质蛋白激酶的变化 *

王慧¹, 曹敏玲¹, 左文彪¹, 史琴²

(贵阳中医学院 1. 功能实验室, 2. 生理教研室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的** 探讨脑内 5-羟色胺 (5-HT) 含量下降后大鼠前额皮质受体后信号 P38 MAPK、PKC 和 CaMK II 蛋白和基因表达的变化及 P2X7 受体在其中的作用。**方法** 大鼠分为正常组、对照组、对氯苯丙氨酸 (PCPA) 组、P2X7 受体拮抗剂及激动剂干预组。腹腔注射 PCPA 使脑内 5-HT 合成下降, 脑室注射 P2X7 受体拮抗剂和激动剂, 采用免疫组织化学、Western blot 和实时荧光定量 PCR 检测前额皮质 P38 MAPK、PKC 和 CaMK II 蛋白和 mRNA 的表达。**结果** 与对照组比较, PCPA 组的 P38 MAPK 蛋白和 mRNA 表达增加, 而 PKC 和 CaMK II 的蛋白和 mRNA 表达水平下降。与 PCPA 组比较, P2X7 受体拮抗剂能使 P38 MAPK 蛋白和基因 mRNA 表达下降, PKC 和 CaMK II 的蛋白表达水平升高及 mRNA 表达水平上升; 而 P2X7 受体激动剂引起 P38 MAPK 蛋白和 mRNA 表达水平升高, PKC 和 CaMK II 的蛋白表达下降和基因 mRNA 表达水平下降。**结论** P2X7 受体介导了脑内 5-HT 下降所致的前额皮质受体后信号 P38 MAPK、PKC 和 CaMK II 蛋白和基因表达的变化。

关键词: 5-羟色胺; 对氯苯丙氨酸; P2X7 受体; 蛋白激酶

中图分类号: R34

文献标识码: A

Purinergic P2X7 receptor modulates PCPA-induced protein kinase activity in prefrontal cortex of rats*

Hui Wang¹, Min-ling Cao¹, Wen-biao Zuo¹, Qin Shi²

(1. Basic medical Science Laboratory, 2. Department of Physiology, Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of P38 MAPK, PKC and CaMK II expression and involvement of P2X7 receptors in the prefrontal cortex of rats after cerebral 5-HT depletion. **Methods** Rats were randomly divided into normal group, sham-operated group (control group), PCPA group, P2X7 receptor antagonist group and P2X7 receptor agonist group. 5-HT depletion was induced by intraperitoneal injection of PCPA. Immunohistochemistry, western blot and real-time fluorescence quantitative PCR were performed to analyze the protein and mRNA expression of P38 MAPK, PKC and CaMK II in the prefrontal cortex. **Results** Expression of P38 MAPK in the PCPA group increased while PKC and CaMK expression decreased significantly compared with those in control group. Treatment of P2X7 receptor antagonist induced decrease of P38 MAPK expression and increase of PKC and CaMK II expression dramatically when compared with the PCPA group. As supposed, P2X7 receptor agonist worked the opposite way compared with P2X7 receptor antagonist. **Conclusions** P2X7 receptors play an important role in modulating P38 MAPK, PKC and CaMK II expression in the prefrontal cortex in rat model

收稿日期: 2018-03-17

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81360590)

of cerebral 5-HT depletion.

Keywords: 5-HT; PCPA; P2X7 receptor; protein kinase

脑内 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 对睡眠和觉醒功能具有重要的调节作用, 但 5-HT 浓度改变后通过何种途径引起大脑皮质兴奋性变化尚未明确。研究表明, 三磷酸腺苷 (ATP) 及其嘌呤 P2X 受体在睡眠活动的稳态调控中起到重要的作用^[1-3], 细胞内 ATP 逐渐升高与非快速动眼睡眠 delta 波活动相一致^[4]; P2X 受体激动剂增加 NREM 睡眠而 P2X 受体拮抗剂则抑制大鼠 NREM 睡眠; P2X7 受体的蛋白表达水平能随着睡眠周期的改变而改变^[5]。前期研究发现对氯苯丙氨酸 (parachlorophenylalanine, PCPA) 所致的脑内 5-HT 浓度下降能引起大鼠前额皮质 ATP 含量下降, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ ATP 酶的活性下降^[6], 本研究进一步探讨中枢 5-HT 与 P2X 受体及受体后信号蛋白激酶的作用关系, 探讨促眠药物可能的作用环节和靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 雄性大鼠 36 只。体重 200 ~ 220 g (湖北省实验动物研究中心, 合格证号 42000600010950), 置于安静、温度保持恒定 (22 ± 2) °C、避免强光的环境中饲养 7 d。

1.1.2 试剂与药物 PCPA、OxATP (非选择性 P2X 受体拮抗剂)、A438079 (高选择性 P2X7 受体拮抗剂) 和 BzATP (P2X7 受体激动剂) (购自美国 Sigma 公司), CaMKII 和 PKC (美国 Abcam 公司)、P38 MAPK (CST)、二步法免疫组织化学 (简称免疫组化) 试剂盒 (北京中杉金桥公司), DAB 显色剂 (北京索莱宝科技有限公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), cDNA 合成试剂盒 (Gene Copoeia), 荧光定量试剂盒 (大连宝生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠分组及处理 大鼠随机分为 6 组 (每组 6 只): 正常组、对照组、PCPA 组 [$300 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], 腹腔注射, 连续 3 d; OxATP、BzATP 及 A438079 干预组, 除正常组外, 动物用 10% 水合氯醛 ($0.3 \text{ ml}/100 \text{ g}$) 腹腔注射麻醉, 固定于立体定位仪上, 根据 Paxinos and Watson 立体定位图谱定位脑室位置 (前囟后 0.8 mm, 中线外 1.5 mm, 颅骨表面下 4.5 mm), 在颅骨上钻

一小孔, 将单管微量给药系统导管插入左侧脑室位置, 用牙托粉和牙托水固定, 腹腔注射青霉素抗感染 3 d, 手术 7 d 后用于实验。OxATP (4 nmol , $5 \mu\text{l}$), BzATP (4 nmol , $5 \mu\text{l}$) 及 A438079 ($10 \mu\text{mol}$, $5 \mu\text{l}$) 均为脑室给药, 每天 1 次, 连续 3 d。末次给药 2 h 后取大脑皮质前额叶组织, 分为左右 2 个部分, 分别保存于 -80°C 冰箱及存放于 10% 多聚甲醛中备用。

1.2.2 免疫组织化学染色及分析 将前额皮质用石蜡包埋。免疫组化采用非生物素二步法, 按试剂盒说明书操作。每只大鼠选取 3 张 400 倍照片, 使用 IPP 6.0 软件对免疫组化照片进行光密度分析, 检测 PKC、CaMK II 和 P38 MAPK 阳性细胞的平均光密度值 (MD)。

1.2.3 Western blot 检测 PKC、CaMK II 和 P38 MAPK 蛋白表达 将 100 g 组织块置于匀浆器中加入 1 ml 蛋白裂解液, 在冰上进行匀浆, 裂解 30 min 后, 将裂解液移至 1.5 ml 离心管中, 4°C 下 $12\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min, 取上清置于 -20°C 冰箱冷冻保存。对样品进行蛋白浓度检测, 根据标准蛋白浓度和相应的吸光值计算直线回归方程, 利用回归方程计算出样品蛋白浓度。将提取的蛋白上清与 5 倍蛋白上样缓冲液混合, 放入沸水 10 min 变性。配制电泳胶和浓缩胶, 上样 (上样量为 $40 \mu\text{g}$)、电泳分离 (浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V)。使用 PVDF 膜进行转膜, 转膜条件: GAPDH 及 P38 MAPK: 200 mA, 90 min; CaMK II: 200 mA, 120 min; PKC: 250 mA, 120 min。进行免疫印迹显色, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液浸泡 PVDF 膜, 室温摇床封闭 2 h, 再用封闭液稀释相应的一抗 (GAPDH、P38 MAPK 和 PKC 稀释比为 1 : 1 000, CaMK II 稀释比为 1 : 2 000), 使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中, 4°C 孵育过夜, TBST 漂洗膜 5 次, 将 PVDF 膜浸泡于已用封闭液稀释的二抗孵育液中, 37°C 摇床孵育 2 h。TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5 次, ECL 显影, 用 Band Scan 分析胶片灰度值。将目标蛋白的灰度值与内参蛋白 (GAPDH) 比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 PKC、CaMK II 和 P38 MAPK mRNA 表达 ①取 -80°C 冰箱中保存的新鲜冷冻的组织 100 mg, Trizol 法提取 RNA, 紫外分光光

度计测定 A260/A280 比值, 比值在 1.8 ~ 2.0 之间满足实验要求。将总 RNA 放于 -80℃ 冰箱内保存以备用。②逆转录: 将 RNA 加入逆转录反应体系 (按试剂盒说明书操作), 逆转录为 cDNA。引物为北京擎科生物公司合成。引物序列见表 1。③半定量 RT-PCR 检测反应体系为: 内参正向引物 (10 μmol/L) 0.5 μl, 内参反向引物 (10 μmol/L) 0.5 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μl, ExTaq 0.25 μl, 10 × ExTaq E buffer 2.5 μl, cDNA 1 μl, ddH₂O 加至 25 μl。反应条件为: 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 25 s。PCR 产物电泳分析, 琼脂糖凝胶电泳显示扩增的目的基因片段大小与设计的目的基因片段大小一致 (见图 1)。④ qRT-PCR 检测反应体系为 cDNA (10 倍稀释) 4 μl, 正向引物 (100 μmol/L) 0.4 μl, 反向引物 (100 μmol/L)

0.4 μl, SYBR Green/Flourescein qPCR Master Mix (2 ×) 10 μl, 纯水 5.2 μl。反应条件: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30 s; 60℃ 退火与延伸 30 s; 40 个循环。获得 P38 MAPK mRNA、PKC mRNA、CaMK II mRNA 及 GAPDH 的 Ct 值, 以目的基因相对于基础值的表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 反映各检测指标的表达水平。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 在方差分析有显著的基础上, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠大脑皮质 P38 MAPK、PKC 和 CaMK II 蛋白和 mRNA 的表达

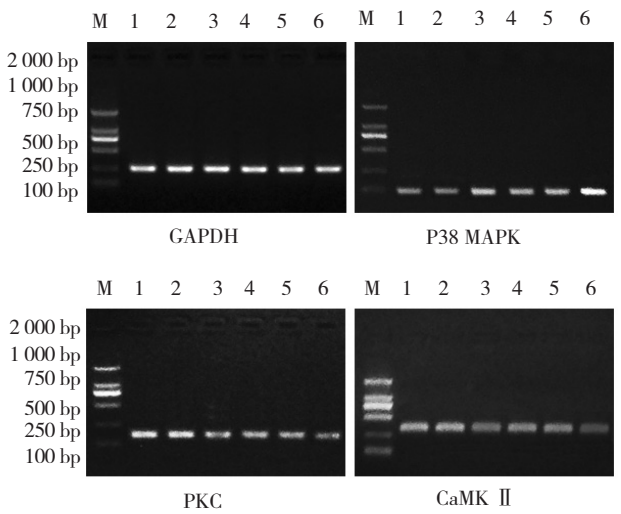
与对照组 [P38 MAPK (0.190 ± 0.016), PKC (0.472 ± 0.054), CaMK II (0.396 ± 0.061)] 比较, PCPA 组 P38 MAPK 蛋白表达增加 (0.370 ± 0.054) (*t* = 7.838, *P* = 0.000), 而 PKC (0.258 ± 0.025) (*t* = -8.881, *P* = 0.000) 和 CaMK II (0.210 ± 0.054) (*t* = -5.562, *P* = 0.000) 的蛋白表达水平下降 (见图 2~5)。PCPA 组的 P38 MAPK mRNA 表达增加, 而 PKC 和 CaMK mRNA 表达水平下降 (均 *P* = 0.000)。见表 2。

2.2 P2X7 受体在 PCPA 引起的受体后蛋白激酶蛋白表达变化中的作用

与 PCPA 组 [P38 MAPK (0.370 ± 0.054), PKC (0.258 ± 0.025), CaMK II (0.210 ± 0.054)] 比较, PCPA+OxATP 组及 PCPA+A438079 组 P38 MAPK 蛋白表达水平下降 [(0.284 ± 0.038) (0.276 ± 0.035) (*t* = 3.185 和 3.591, *P* = 0.009 和 0.004)], 但 BzATP 组 P38 MAPK 蛋白表达水平升高 (0.452 ± 0.046) (*t* = -2.854, *P* = 0.017)。与 PCPA 组比较, PCPA+OxATP 组及 PCPA+A438079 组 PKC 蛋白表达水平 [(0.344 ± 0.034) (0.376 ± 0.026) (*t* = -4.963 和 -8.209, 均 *P* = 0.000)] 和 CaMK II 蛋白表达水平上升 [(0.308 ± 0.052) (0.293 ± 0.048) (*t* = -2.620 和 -2.281, *P* = 0.009 和 0.018)], 而 PCPA+BzATP 组 PKC (0.167 ± 0.019) (*t* = 7.098, *P* = 0.000) 和 CaMK II (0.112 ± 0.024) (*t* = 4.454, *P* = 0.002) 蛋白表达水平下降。见图 2~5。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	长度 /bp
GAPDH	正向: 5'-ACAGCAACAGGCTGGTGGAC-3'	252
	反向: 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'	
P38 MAPK	正向: 5'-CACTGCTGCTTCCTCACTCCA-3'	99
	反向: 5'-AGGGTTCAGGTGCTCTGTTTCG-3'	
PKC	正向: 5'-TCCCTGATCCCAAAAGTGAG-3'	229
	反向: 5'-AACTTGAACCAAGCCATCCAC-3'	
CaMK II	正向: 5'-ACACCAAGAAGCTCTCAGCCA-3'	304
	反向: 5'-TTCGAAGCCAGCAACAGATTTC-3'	



M: Marker; 1: 正常组; 2: 对照组; 3: PCPA 组; 4: PCPA+OxATP 组; 5: PCPA+A438079 组; 6: PCPA+BzATP 组

图 1 各组大鼠前额皮质组织 P38 MAPK、PKC 和 CaMK II 电泳图

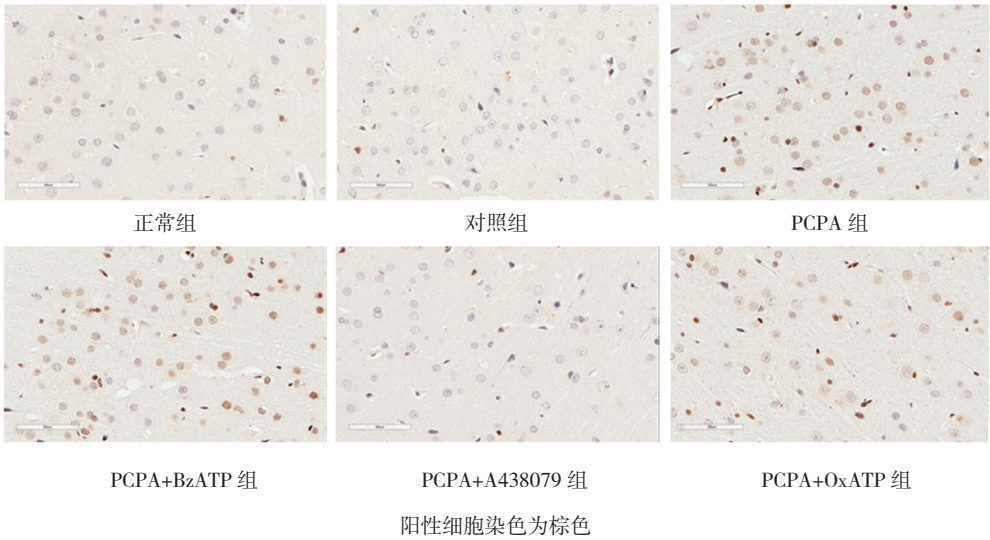


图 2 各组大鼠大脑皮质 P38MAPK 蛋白的表达 (免疫组化, ×400)

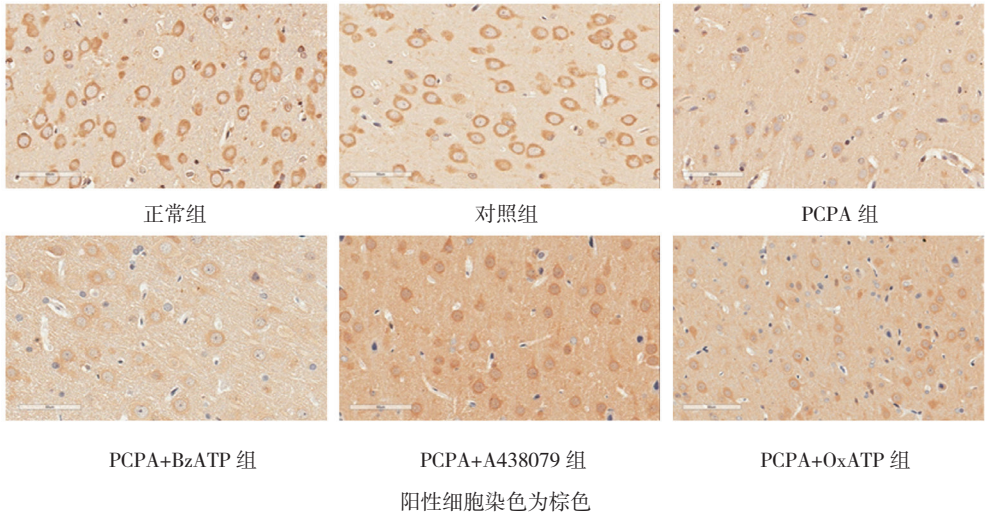


图 3 各组大鼠大脑皮质 PKC 蛋白的表达 (免疫组化, ×400)

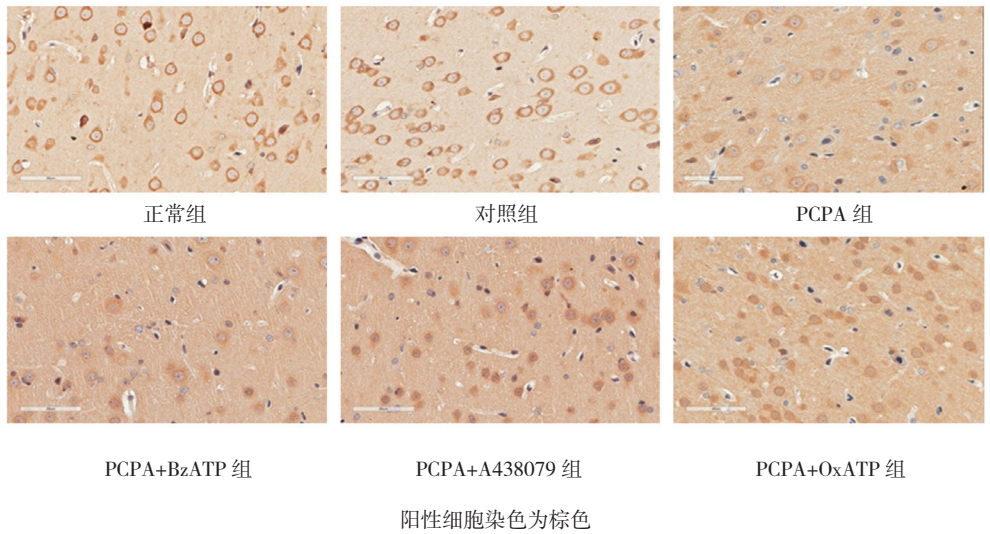
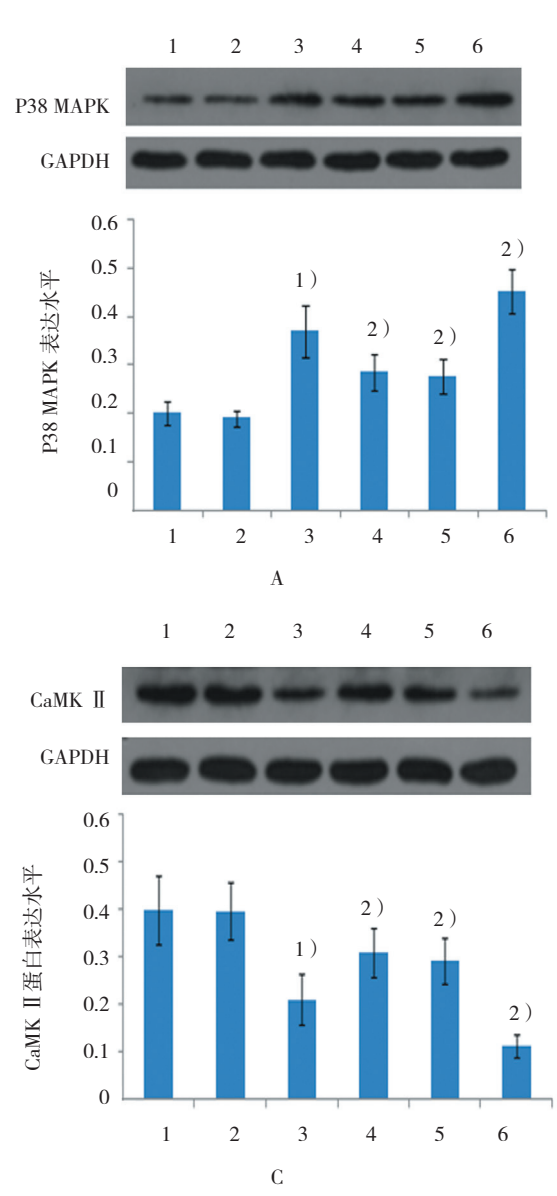


图 4 各组大鼠大脑皮质 CaMK II 蛋白的表达 (免疫组化, ×400)

2.3 P2X7 受体在 PCPA 引起的受体后蛋白激酶 mRNA 表达改变中的作用

PCPA+OxATP 组和 A438079 组 P38 MAPK mRNA 表达水平下降, BzATP 组 P38 MAPK mRNA 表达水平上

升。OxATP 及 A438079 能引起 PKC 和 CaMK II mRNA 表达水平上升, 但 BzATP 引起 PKC 及 CaMK II mRNA 表达水平下降。见表 2。



1: 正常组; 2: 对照组; 3: PCPA 组; 4: PCPA+OxATP 组; 5: PCPA+A438079 组; 6: PCPA+BzATPA 组。1) 与对照组比较, $P < 0.01$; 2) 与 PCPA 组比较, $P < 0.05$

图 5 各组大鼠皮质 P38 MAPK、PKC 及 CaMK II 蛋白的相对表达量

3 讨论

睡眠障碍在临床上十分常见, 已经成为影响人们健康生活和工作的重要社会问题。众所周知, 5-HT 是调节睡眠和觉醒重要的神经递质, 但 5-HT 是如何

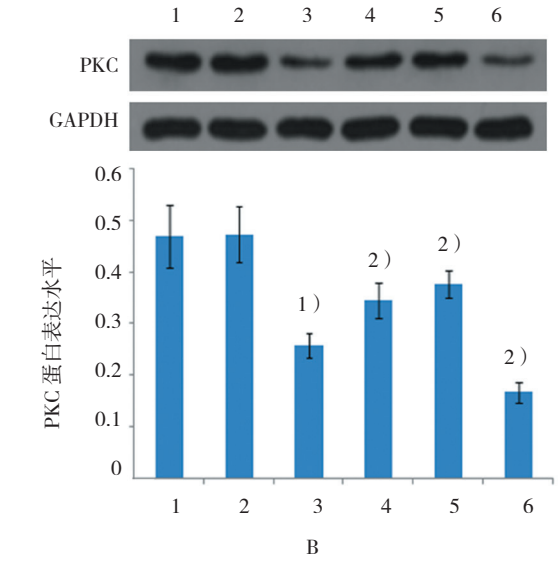


表 2 各组大鼠大脑皮质 P38 MAPK、PKC 及 CaMK II mRNA 相对表达量 ($n=6$)

组别	P38 MAPK	PKC	CaMK II
正常组	1.123 ± 0.137	1.019 ± 0.128	1.016 ± 0.149
对照组	1.170 ± 0.138	0.993 ± 0.115	0.965 ± 0.105
PCPA 组	2.037 ± 0.461 ¹⁾	0.537 ± 0.061 ¹⁾	0.557 ± 0.097 ¹⁾
PCPA+OxATP 组	1.672 ± 0.239 ²⁾	0.745 ± 0.093 ²⁾	0.662 ± 0.062 ²⁾
PCPA+A438079 组	1.719 ± 0.209 ²⁾	0.710 ± 0.119 ²⁾	0.707 ± 0.129 ²⁾
PCPA+BzATPA 组	2.450 ± 0.355 ²⁾	0.437 ± 0.051 ²⁾	0.364 ± 0.078 ²⁾
F 值	62.033	109.503	100.473
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 PCPA 组比较, $P < 0.05$

与脑内其他调节系统相互作用从而调节睡眠活动目前还不清楚。本实验前期研究发现, 脑内 5-HT 含量下降可导致神经胶质细胞激活, 大脑皮质 ATP 含量下降, 本研究发现, 脑内 5-HT 含量下降能导致前额皮质细胞内蛋白激酶 P38 MAPK 蛋白及基因 mRNA 表达增加, PKC 和 CaMK II 蛋白及基因 mRNA 表达水平下降; 进一步使用 P2X7 受体的激动剂和拮抗剂发现 P2X7 受体参与 5-HT 含量下降而导致的该细胞内信号蛋白激酶活动变化。

嘌呤 P2X 受体是一类以 ATP 为配体的离子门控通道, 目前已知 P2X 受体分为 8 种亚型, 即 P2X、P2Y、P2T、P2S、P2N、P2U、P2Z 和 P2D, 各种亚型的 P2 受体可以通过激活不同的细胞内信号转导通路而执行特定的生理功能。研究发现, P2X7 受体与睡眠和觉醒有密切的关系, P2X7 受体蛋白水平能随着睡眠周期的改变而改变^[5]。在中枢神经系统内, P2X7R 受体广泛分布于神经元和神经胶质细胞上^[7], P2X7 受体兴奋能引起 Ca^{2+} 的内流, 激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和钙调蛋白 (CaM), 改变 P38 MAPK、PKC 及 CaMK 等激酶的活性, 引起一系列的细胞内反应^[8-9]。研究表明, 细胞外液的 ATP 可作用于神经胶质细胞上的 P2X7R 引起睡眠的调节物质细胞因子如白细胞介素 1 ($\text{IL}-1\beta$)、 $\text{IL}-6$ 、肿瘤坏死因子 α ($\text{TNF}-\alpha$) 的释放, 该物质作用于邻近的神经元, 改变突触后神经元的敏感性^[10-13]。

PCPA 选择性抑制色氨酸羟化酶活性而抑制 5-HT 合成, 导致脑内 5-HT 含量下降, 实验证实, 腹腔注射 PCPA 能导致大鼠大脑皮质 5-HT 浓度下降约 80%^[14]。新近的研究发现, 5-HT₃ 受体和 P2X₂ 受体在同一神经元上共表达, 5-HT₃ 受体远端轴突和树突靶向信息传递依赖 P2X₂ 受体的表达, 且这种 5-HT 受体还能与其他 P2X 受体家族成员发生相互作用^[15]。本实验室前期实验也发现大鼠大脑皮质神经胶质细胞上 5-HT 受体和 P2X₇ 受体共表达。5-HT 含量下降后, 可能通过 5-HT 受体和 P2X 受体的相互作用, 影响 P2X₇ 受体的活性及细胞内信号蛋白激酶的活动, 改变细胞的功能状态, 影响睡眠调节物质如细胞因子的分泌, 最终影响大脑皮质的兴奋性活动。

综上所述, 脑内 5-HT 下降后, 可通过 P2X 受体介导细胞内蛋白激酶 P38 MAPK、PKC 及 CaMK II 蛋白及基因 mRNA 的表达变化, 本研究有利于进一步明确促眠药物的作用环节和作用的靶点, 对新药的研发具有重要的意义。

参 考 文 献:

- [1] BLUTSTEIN T, HAYDON P G. The importance of astrocyte-derived purines in the modulation of sleep[J]. *Glia*, 2013, 61(2): 129-139.
- [2] NIKONOVA E V, NAIDOO N, ZHANG L, et al. Changes in components of energy regulation in mouse cortex with increases in wakefulness[J]. *Sleep*, 2010, 33(7): 889-900.
- [3] CLINTON J M, DAVIS C J, ZIELINSKI M R, et al. Biochemical regulation of sleep and sleep biomarkers[J]. *J Clin Sleep Med*, 2011, 7(5 Suppl): 38-42.
- [4] DWORAK M, MCCARLEY R W, KIM T, et al. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(26): 9007-9016.
- [5] KRUEGER J M, TAISHI P, DE A, et al. ATP and the purine type 2X7 receptor affect sleep[J]. *J Appl Physiol*, 2010, 109(5): 1318-1327.
- [6] 史琴, 王慧, 武静, 等. PCPA 失眠后大鼠不同时间大脑皮质钠-钾 ATP 酶和钙-镁 ATP 酶活性变化及酸枣仁汤的干预作用[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(5): 1050-1052.
- [7] SPERLÁGH B, ILLES P. P2X₇ receptor: an emerging target in central nervous system diseases[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2014, 35(10): 537-547.
- [8] 谢金燕, 梁尚栋. P2 嘌呤受体和细胞信号转导[J]. *生物物理学报*, 2011, 27(9): 749-756.
- [9] GLASER T, RESENDE R R, ULRICH H. Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation[J]. *Cell Commun Signal*, 2013, 11(1): 12.
- [10] FERRARI D, PIZZIRANI C, ADINOLFI E, et al. The P2X₇ receptor: a key player in IL-1 processing and release[J]. *J Immunol*, 2006, 176(7): 3877-3883.
- [11] SOLLE M, LABSI J, PERRAGAU D G, et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(1): 125-132.
- [12] LU W, ALBALAWI F, BECKEL J M, et al. The P2X₇ receptor links mechanical strain to cytokine IL-6 upregulation and release in neurons and astrocytes[J]. *J Neurochem*, 2017, 141(3): 436-448.
- [13] KRUEGER J M, RECTOR D M, ROY S, et al. Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(12): 910-919.
- [14] NIMGAONKAR V L, GOODWIN G M, DAVIES C L, et al. Down-regulation of beta-adrenoceptors in rat cortex by repeated administration of desipramine, electroconvulsive shock and clenbuterol requires 5-HT neurones but not 5-HT[J]. *Neuropharmacology*, 1985, 24(4): 279-283.
- [15] EMERIT M B, BARANOWSKI C, DIAZ J, et al. A new mechanism of receptor targeting by interaction between two classes of ligand-gated ion channels[J]. *J Eurosci*, 2016, 36(5): 1456-1470.

(王荣兵 编辑)