

四逆散含药血清对大鼠皮层神经元 GABA_A 受体介导 Cl⁻ 电流的影响

刘晓萌, 李峰*, 马捷, 刘晶

(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 研究四逆散改善失眠作用的机制。方法: 四逆散浸膏按 21.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ 给 SD 大鼠连续灌胃 7 d, 腹主动脉取血, 分离血清, 按 10% 比例加进原代培养 SD 大鼠皮层神经元培养基, 37 °C 孵育 3 h, 应用全细胞膜片钳方法, 记录四逆散含药血清对原代培养大鼠皮层神经元 γ -氨基丁酸 A 型受体(GABA_A) 介导的氯离子(Cl⁻) 电流的影响。结果: 给予 0.3, 3, 30, 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ γ -氨基丁酸刺激, 经 10% 四逆散含药血清作用 3 h 的皮层神经元, γ -氨基丁酸浓度-效应曲线左移, 半效激活浓度降低 ($P=0.05$), 氯离子电流的最大峰值 ($P<0.05$)、快速衰减时间常数 ($\tau_2, P<0.05$) 和慢速衰减时间常数 ($\tau_1, P<0.05$) 明显增大。结论: 四逆散作用于皮层神经元的 γ -氨基丁酸 A 型受体, 调节其介导的氯离子电流, 可能是其改善失眠作用的机制之一。

[关键词] 四逆散; γ -氨基丁酸 A 型受体; 失眠; 膜片钳; 皮层

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0202-04

[doi] 10.11653/syjf2013150202

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130527.1138.003.html>

[网络出版时间] 2013-05-27 11:38

Effect of Sini San Containing Serum on GABA_A-Cl⁻ Current of Cortical Neurons in Rats

LIU Xiao-meng, LI Feng*, MA Jie, LIU Jing

(School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism underlying the insomnia-treating effect by Sini San. **Method:** SD rats were ig given 21.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ Sini San for 7 d. Serum from the abdominal aorta was collected and added into rats cortical neurons at the final concentration of 10%, cultured at 37 °C for 3 h. Whole-cell recording technique was used to observe the γ -aminobutyric acid A (GABA_A) receptor activated Cl⁻ flux (I_{GABA}) of rats cortical neurons cultured with the serum from Sini San-treated rats. **Result:** A series concentration of γ -aminobutyric acid (GABA) from 0.3-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was given, the cortical neurons treated with Sini San-containing serum for 3 h resulted in left shift of GABA concentration-response curve and half maximal effective concentration (EC₅₀) was decreased ($P=0.05$). Also the peak amplitude ($P<0.05$), τ_1 ($P<0.05$) and τ_2 ($P<0.05$) of I_{GABA} significantly increased. **Conclusion:** Sini San affects the I_{GABA} of cortical neurons and this may be contributed to the insomnia-treating effect of Sini San.

[Key words] Sini San; GABA_A receptor; insomnia; patch clamp; cortical

[收稿日期] 20130305(015)

[基金项目] 北京市自然科学基金项目(7112071)

[第一作者] 刘晓萌, 博士, 从事病证相关性的规律研究, Tel: 13811232365, E-mail: lxm_1019@sina.cn

[通讯作者] * 李峰, 博士, 教授, 从事病证相关性的规律研究, Tel: 010-64286154, E-mail: lifeng95@vip.sina.com

失眠是一种中枢神经兴奋/抑制功能失衡导致的临床疾病,γ-氨基丁酸/γ-aminobutyric acid (GABA)是中枢神经系统中重要的抑制性神经递质,通过与突触后膜 GABA_A受体特异性结合,介导氯离子内流,起到抑制神经元兴奋性的作用。因此,GABA_A受体一直是失眠治疗药物的重要研究靶点^[1]。

四逆散出自《伤寒论》,由柴胡、白芍、枳实、甘草4味药组成,是疏肝解郁,调和肝脾的祖方。研究发现,四逆散可以显著延长正常大鼠和失眠大鼠的总睡眠时间,主要表现为延长慢波睡眠第2期和快波睡眠^[2]。并且四逆散能延长阈剂量戊巴比妥钠所致小鼠的总睡眠时间,与戊巴比妥钠具有协同作用^[3]。但四逆散改善失眠作用在神经元上的具体作用机制和靶点尚不清楚。

本研究采用血清药理学和电生理学方法,观察四逆散含药血清对原代培养的大鼠皮层神经元 GABA_A受体介导氯离子电流/GABA_A receptors-activated Cl⁻ flux (I_{GABA})的影响。以初步探讨四逆散治疗失眠可能的中枢作用机制。

1 材料

1.1 动物 成年 SD 大鼠(雄性,SPF级,180~220 g)及新生 SD 大鼠,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:京 ICP 备 05076685 号。

1.2 药品与试剂 四逆散由柴胡、白芍、枳实、炙甘草组成,均购自北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司,产地及生产批号:柴胡(河北,201002083)、白芍(安徽,201003126)、枳实(江西,201073157)、炙甘草(内蒙,201132879)。

DMEM(批号 1237584),胎牛血清(批号 989267),Neurobasal(批号 1184644),B27(批号 1241140),胰蛋白酶(1237584,美国 Gibco 公司);L-谷氨酰胺(批号 RNBC2334),多聚赖氨酸(批号 SLBB3095V),GABA(批号 BCB3661V),Bicuculline(批号 BCBH2870V),HEPES(批号 SLBD0100V),EGTA(批号 129K54001V)美国 Sigma 公司;Na₂ATP(批号 7991K,美国 MP Biomedicals 公司)。

1.3 仪器与耗材 MultiClamp 700B 膜片钳放大器(美国 Axon 公司);Digidata 1322A 数模/模数转换器(美国 Axon 公司);P-97 微电极拉制仪(美国 Sutter 公司);Olympus IX71 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);微电极玻璃毛细管(美国 Sutter 公司);24 孔细胞培养板(丹麦 Nunc 公司)。

2 方法

2.1 四逆散浸膏制备 参考 2005 年版《中国药典》附录 I F 煎膏剂,四逆散由柴胡、白芍、枳实、炙甘草按 1:1:1:1 的比例混合,加入 6 倍于药材质量的蒸馏水,浸泡 2 h 后,文火煮沸 1 h,过滤药液,药渣同法再煎煮 1 次,合并 2 次药液,浓缩至生药质量浓度为 2.17 g·mL⁻¹,4 °C 保存备用。

2.2 含药血清制备^[4] 取 SD 大鼠 20 只,随机分为对照组和给药组,每组 10 只。给药组按 21.7 g·kg⁻¹·d⁻¹灌服四逆散浸膏(相当于人临床 10 倍剂量),对照组灌服相同剂量的蒸馏水,每日 1 次,连续 7 d。于末次给药后 2 h,25% 乌拉坦溶液按 8 mL·kg⁻¹腹腔注射麻醉,腹主动脉取血。室温静置 2 h,3 500 r·min⁻¹离心 15 min,分离血清。56 °C 水浴灭活 30 min,0.22 μm 滤膜过滤灭菌,-20 °C 保存备用。

2.3 新生大鼠皮层神经元细胞原代培养^[5] 取新生 SD 乳鼠,75% 的乙醇消毒,断头,剥离头皮、颅骨,取出全脑,放入倒有冰 0.01 mol·L⁻¹ PBS(含 10 mmol·L⁻¹葡萄糖)的平皿中,显微镜下剥离脑膜及血管,分离皮层组织,机械剪碎,加入 1.25 g·L⁻¹胰蛋白酶,37 °C 消化 20 min,DMEM 接种培养基(含 2 mmol·L⁻¹谷氨酰胺、25 mmol·L⁻¹葡萄糖、10% 胎牛血清、10% 马血清)终止消化,吹打混匀,200 目滤网过滤,细胞计数板计数,以 4 × 10⁵/mL,0.5 mL/孔,接种入预先用 0.1 g·L⁻¹多聚赖氨酸包被的加有盖玻片的 24 孔板上,37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,4 h 后全量换 Neurobasal 维持培养液(含 2% B 27、0.5 mmol·L⁻¹谷氨酰胺),之后每 3 d 半量更换培养基 1 次,培养第 8~9 天时,分别加入对照组血清和给药组血清,使血清终体积分数为 10%,继续培养 3 h 后进行全细胞膜片钳记录。

2.4 全细胞膜片钳记录^[6] 实验在室温下进行,将培养细胞的盖玻片移入持续灌流细胞外液的平皿中。细胞外液的成分是(mmol·L⁻¹):NaCl 140,CsCl 5,CaCl₂ 2,MgCl₂ 1,HEPES 5,Glucose 10,NaOH 调 pH 7.35。采用二步法拉制玻璃微电极,充灌电极内液后的电极电阻约 3~5 MΩ。电极内液的成分是(mmol·L⁻¹):CsCl 130,CaCl₂ 0.1,MgCl₂ 2,HEPES 10,EGTA 1.1,Na₂ATP 5,CsOH 调 pH 7.15。倒置显微镜下电极与细胞表面形成巨阻封接后,负压吸破细胞膜,补偿膜电容,不补偿串联电阻,形成全细胞状态。用“Y”形重力加药系统进行细胞旁快速给药,不同浓度 GABA 给药时间为 15 s,间隔 3~5 min,记录

完毕用细胞外液洗脱。MultiClamp 700B 膜片钳放大器设置为电压钳模式,钳制电压为 -70 mV ,低通 Bessel 滤波频率为 2 kHz ,采样频率为 10 kHz ,电信号采集由 Digidata 1322A 转换器和 pClamp10.0 软件来完成。

2.5 数据处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Clampfit 10.0, Igorpro 6.0, GraphPad 5.0, SPSS 17.0 软件进行数据处理、分析和作图。GABA 浓度-效应曲线由 Hill 方程拟合: $I/I_{\max} = 1/[1 + (C/EC_{50})^H]$, 式中 I 为 I_{GABA} , C 为 GABA 浓度, EC_{50} 为半效激活浓度, H 为 Hill 系数。 I_{GABA} 的衰减过程由双指数方程拟合: $I = A_2 \exp[-(t-k)/\tau_2] + A_1 \exp[-(t-k)/\tau_1] + C$, 式中 I 为 I_{GABA} , C 为 GABA 浓度, τ_1 为慢速衰减时间常数, τ_2 为快速衰减时间常数。两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 GABA 诱导皮层神经元 I_{GABA} 10% 对照血清组和 10% 四逆散含药血清组分别给予浓度为 $0.3, 3, 30, 300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GABA, 对照组同一皮层神经元上记录的 I_{GABA} 强度随着 GABA 浓度的增加而增大, 呈剂量依赖关系(图 1)。给药组同一皮层神经元上记录的 I_{GABA} 强度与 GABA 浓度也呈剂量依赖关系(图 2)。证明皮层神经元经 10% 血清孵育 3 h 后, GABA 可以正常诱导 I_{GABA} 。GABA_A 受体选择性拮抗剂 Bicuculline ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能阻断 GABA 的作用, 证明上述 I_{GABA} 由 GABA_A 受体介导。

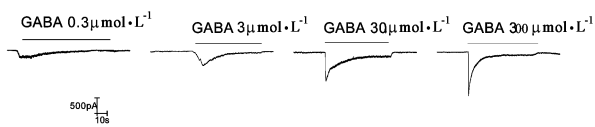


图 1 10% 对照组血清不同浓度 GABA 诱发的 I_{GABA}

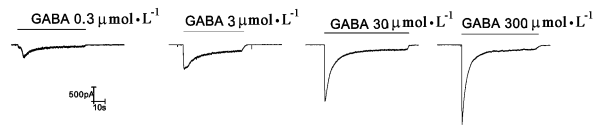
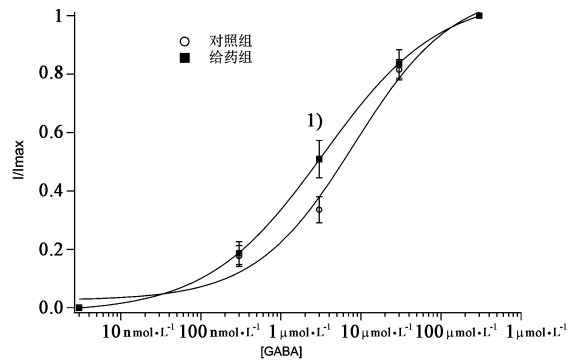


图 2 10% 四逆散含药血清组不同浓度 GABA 诱发的 I_{GABA}

3.2 四逆散对 GABA 浓度-效应曲线的影响 10% 对照血清组和 10% 四逆散含药血清组皮层神经元分别给予浓度为 $0.3, 3, 30, 300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GABA, 记录 I_{GABA} , 每个神经元记录的 I_{GABA} 均用 $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GABA 所引起的 I_{GABA} 进行标化, 采用 Hill 方程拟合浓度-效应曲线, 计算 EC_{50} 和 Hill 系数, 得出对照组 $EC_{50} = (5.72 \pm 1.00)\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Hill = 0.88 ± 0.10 ; 给药组 $EC_{50} = (3.48 \pm 0.79)\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Hill = 0.98 ± 0.16 (图 3)。与对照组相比, 给药组浓度-效应曲线左移, EC_{50} 有降低的趋势 ($P = 0.05$)。



与对照组比较¹⁾ $P < 0.05, n = 10$

图 3 四逆散对 GABA 浓度-效应曲线的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

在此基础上, 对不同浓度 GABA 诱发的 I_{GABA} 标化值进行组间比较, 发现 $3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GABA 诱发的 I_{GABA} 标化值, 给药组明显大于对照组 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 四逆散对不同浓度 GABA 诱导的 I_{GABA} 标化值的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(血清体积分数)	I_{GABA} $0.3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	I_{GABA} $3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	I_{GABA} $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	I_{GABA} $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
对照(10%)	0.17 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.82 ± 0.03	1.00 ± 0.00
给药(10%)	0.19 ± 0.04	$0.51 \pm 0.06^{1)}$	0.83 ± 0.05	1.00 ± 0.00

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 四逆散对 I_{GABA} 峰值的影响 用饱和浓度 ($300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 GABA 诱导大鼠皮层神经元的 I_{GABA} 峰值, 四逆散含药血清给药组 I_{GABA} 峰值明显增加, 对照组和给药组 I_{GABA} 峰值分别为 ($-1\ 502.25 \pm 165.71$) pA 和 ($-2\ 058.09 \pm 255.67$) pA ($P < 0.05$)。

3.4 四逆散对 I_{GABA} 衰减过程的影响 采用指数方程对 $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GABA 诱导的大鼠皮层神经元 I_{GABA} 的衰减过程进行拟合, 计算 τ_1 和 τ_2 , 给药组 τ_1 和 τ_2 均明显延长, 对照组和给药组 τ_1 分别为 ($10\ 067.91 \pm 1\ 899.29$), ($17\ 893.72 \pm 3\ 296.20$) ms, τ_2 分别为 ($1\ 741.91 \pm 396.44$), ($3\ 131.78 \pm$

440.42) ms(均 $P < 0.05$)。

4 讨论

GABA 是中枢神经系统重要的抑制性神经递质,调节近 1/3 的神经元突触传递活动,当 GABA 与 GABA_A 受体结合后,与其偶联的 Cl⁻ 通道开放形成抑制性突触后电位/inhibitory post-synaptic potential (IPSP)^[7],从而降低神经元产生动作电位的可能性。目前治疗失眠的一线药物苯二氮卓类受体激动剂/benzodiazepine receptor agonists (BZRAs) 的作用靶点正位于 GABA_A 受体的 α 亚基和 γ 亚基之间,通过增加 GABA 与 GABA_A 受体结合后 Cl⁻ 通道的开放频率,起到镇静催眠的药理作用^[8]。四逆散源于张仲景《伤寒论》,是疏肝解郁、调和肝脾的祖方。方中柴胡为君,疏肝解郁,透邪升阳;芍药为臣,敛阴泄热,补血养肝;枳实为佐,行气散结,调畅脾滞;甘草为使,健脾和中,调和诸药;四味相合,共奏疏肝理脾之功^[9]。临床上应用四逆散从肝论治失眠具有一定的疗效。

本研究采用全细胞膜片钳技术观察四逆散含药血清对 GABA_A 受体介导 Cl⁻ 电流的影响发现:四逆散组 EC₅₀ 浓度 ($3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) GABA 诱导的 I_{GABA} 标化值和饱和浓度 ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) GABA 诱导的 I_{GABA} 峰值明显增高,并且 I_{GABA} 的 τ_1 和 τ_2 明显延长。EC₅₀ 为受体达到 50% 最大效应所需配体的浓度, I_{GABA} 反映 GABA 与 GABA_A 受体结合的效能,用饱和浓度 I_{GABA} 进行标化以排除不同神经元间受体膜分布数目的差异, I_{GABA} 标化值越大反映 GABA 的效能越强^[10]。当 GABA 浓度达到一定程度后 I_{GABA} 趋于平衡,原因在于细胞膜上 GABA_A 受体的数目有限,该 I_{GABA} 即为峰值, I_{GABA} 峰值越大说明受体的膜分布密度越高^[11]。当 GABA_A 受体长时间暴露于 GABA 时, Cl⁻ 通道会发生自动关闭,称为受体失敏现象, Cl⁻ 电流的衰减过程反映 GABA_A 受体的失敏现象,用 τ 进行定量分析, τ 越大,说明 GABA_A 受体失敏越慢^[12]。由此推断,四逆散改善失眠的作用机制与其增加皮层神经元 GABA_A 受体的效能、衰减时间、

膜分布密度,共同增强神经元突触后抑制有关。但 GABA_A 受体由多种亚基组成,四逆散具体作用于何种亚基还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] EMEA/16274/2009. Guideline on medicinal products for the treatment of insomnia [S]. United Kingdom: European Medicines Agency, 2011.
- [2] 李越峰,李廷利. 四逆散对失眠大鼠睡眠时相影响的研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(3): 4.
- [3] 刘立. 四逆散对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠实验的影响[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2002.
- [4] 黄玉新. 四逆散水提物体外成分分析与血中移行成分认定[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2006.
- [5] Lutz GWH, Martin A S. Preparation of dissociated mouse cortical neuron cultures [J]. J Vis Exp, 2007, (10): 562.
- [6] 刘振伟. 实用膜片钳技术[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2006: 90.
- [7] Tija C J, Stephen J M, Rachel J. GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition [J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(5): 331.
- [8] Darry J M, Dunn S M, Davies M. Identification of a residue in the γ -aminobutyric acid type A receptoe α subunit that differentially affects diazepam-sensitive and -insensitive benzodiazepine site binding [J]. J Neurochem, 2004, 88(6): 1431.
- [9] 罗辉昌. 四逆散方证实质研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2005.
- [10] 贺师鹏,胡雅儿,夏宗勤. 受体研究技术[M]. 2版. 北京:北京大学医学出版社, 2011: 15.
- [11] Bernhard L, Thomas F, Casey L K. GABAAR trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses [J]. Neuron, 2011, 70(3): 385.
- [12] Angelo K, Neil L H. The activation mechanism of $\alpha_1\beta_2\gamma_2\text{S}$ and $\alpha_3\beta_3\gamma_2\text{S}$ GABAA receptors [J]. J Gen Physiol, 2010, 135(1): 59.

[责任编辑 聂淑琴]