

# 安神汤含药血清对皮质酮损伤的 PC12 细胞 PKC 活性的影响

吴冬梅\*

(河南省中医院, 河南 郑州 450002)

安神汤临床除治疗失眠症外, 还用于以情绪或神志障碍为主要表现的精神神经系统疾病, 有确切的抗焦虑作用。本研究拟在前期工作的基础上, 以高浓度皮质酮诱导 PC12 细胞凋亡模拟焦虑症神经细胞损伤状态, 以细胞凋亡的信号转导机制为背景, 以胞内钙信号转导为切入点, 观察安神汤含药血清对皮质酮干预的 PC12 细胞蛋白激酶 C(PKC) 活性的影响。

## 1 材料与方

**1.1 动物** Wistar 雄性健康大鼠, 体重(300±25)g, 购自郑州大学实验动物中心。

**1.2 细胞株** PC12 肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞株, 引自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

**1.3 实验用药** 安神汤(AS): 由酸枣仁、知母、茯苓、甘草组成, 煎煮制成水提物, 分装灭菌后冷藏备用。地西洋(DZP): 国药准字 H41021282, 河南省安阳市第一制药厂, 配成 0.01% 浓度, 使用前混匀。

**1.4 试剂与仪器** RPMI1640 培养基、马血清: Gibco 公司; 标准胎牛血清: 四季青; 皮质酮(CORT)、多聚赖氨酸: Sigma 公司; PKC 分析试剂盒: GIBCO BRL 产品;  $\gamma$ - $^{32}$ P: 亚辉生物医学工程公司。液闪计数器: 美国 PerkinElmer。

**1.5 含药血清制备** 雄性 Wistar 大鼠 60 只, 随机分为 3 组, 每组 20 只, 即正常对照组、DZP 组、AS 组。AS 组给予 10 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 灌胃, DZP 组给予 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 灌胃, 每日 1 次, 连续给药 5 d。正常对照组给予等容积生理盐水。于末次给药 2 h 后, 麻醉, 无菌条件下腹主动脉取血, 置无菌试管内。37 °C 水浴 1 h, 3 000 rpm, 离心 15 min, 分离血清, -20 °C 冰箱保存备用。临用时, 56 °C 恒温 30 min 灭活, 过滤除菌。

**1.6 PC12 细胞培养** 取 PC12 细胞培养液置于 15 mL 离心管中, 1 000 rpm, 离心 5 min, 弃上清, 将细胞液用含 5% 胎牛血清、10% 马血清的完全 1640 培养液悬浮, 分装于 25 mL 培养瓶中, 置于 37 °C、CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**1.7 PKC 活性测定** 调细胞浓度为 1×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup>, 将细胞接种于已置入无菌盖玻片的 24 孔培养板中, 随机分为 5 组, 按顺序依次为: 空白对照组(只加完全 1640 培养基)、终浓度 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> CORT 加无血清培养基组、0.2 mmol·L<sup>-1</sup> CORT 加 10% 正常动物血清组、0.2 mmol·L<sup>-1</sup> CORT 加 10% DZP 动物血清组、0.2 mmol·L<sup>-1</sup> CORT 加 10% AS 含药血清组。

置于 37 °C、CO<sub>2</sub> 培养箱中, 贴壁培养 24 h。取无菌试管, 每管加入 10 μL  $^{32}$ P-底物, 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris(pH7.5)、20 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、1 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、20 μmol·L<sup>-1</sup> ATP、50 μmol·L<sup>-1</sup> 乙酰化髓磷脂碱蛋白及待测样品 10 μL, 混匀, 30 °C 孵育 5 min。然后分别点在磷酸纤维素膜上, 置于 500 mL 磷酸溶液中酸洗 3~5 min, 再用 500 mL 双蒸水洗, 重复酸洗及水洗 1 次。最后将磷酸纤维素膜置入液闪管, 加入闪烁液上机检测。

**1.8 数据的统计处理** 各组数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示。单因素方差分析后, 进行多组间比较, 采用 S-N-K 检验。全部数据用 SPSS 13.0 for windows 软件统计处理。

## 2 结果

AS 含药血清对 CORT 损伤的 PC12 细胞 PKC 活性的影响 结果见表 1。与空白对照组相比, 各组细胞 PKC 活性均明显升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与 CORT 组相比, CORT+ 正常动物血清组、CORT+ DZP 含药血清组细胞 PKC 活性变化不显著( $P > 0.05$ ), CORT+ AS 含药血清组细胞 PKC 活性显著降低( $P < 0.05$ )。与 CORT+ 正常动物血清组比较, CORT+ DZP 含药血清组、CORT+ AS 含药血清组细胞 PKC 活性有所下降, 但差异不显著( $P > 0.05$ )。与 CORT+ DZP 含药血清组相比, CORT+ AS 含药血清组细胞 PKC 活性的降低无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 1 AS 含药血清对 CORT 损伤的 PC12 细胞 PKC 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	PKC(pmol·min <sup>-1</sup> ·μg <sup>-1</sup> )
空白对照组	0.734 ± 0.070 <sup>1)</sup>
CORT 组	3.097 ± 0.090 <sup>2)</sup>
CORT+ 血清组	2.288 ± 0.116 <sup>2)</sup>
CORT+ DZP 血清组	2.024 ± 0.084 <sup>2)</sup>
CORT+ AS 血清组	1.517 ± 0.096 <sup>1,3)</sup>

注: 与空白组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 CORT 组相比<sup>3)</sup>  $P < 0.05$

## 3 讨论

PKC 是细胞肌醇磷脂信号通路的关键环节, 作为信号转导的重要信号分子, 其在细胞凋亡中也起着重要作用。Ca<sup>2+</sup> 参与激活 PKC, 而 PKC 又促进了 Ca<sup>2+</sup> 泵磷酸化而引起 Ca<sup>2+</sup> 内流, 促使钙超载, 从而引起凋亡<sup>[1]</sup>。

本实验结果显示, CORT 组细胞 PKC 活性均明显升高, 提示在 CORT 诱导的 PC12 细胞凋亡过程中, 胞内钙超载激活 PLC, 产生大量 IP<sub>3</sub>, 促进内质网释放 Ca<sup>2+</sup>, 或促进胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流, 加重钙超载, 导致细胞进一步凋亡甚至坏死。Ca<sup>2+</sup> 和 DAG 共同作用, 大量 PKC 亦被激活, 活化的 PKC 可直接作用于核内拓扑异构酶 II, 使其磷酸化, 不能修复损伤的 DNA, 从而导致细胞凋亡。考虑到正常动物血清和含药血清虽经高温灭活, 但其中存留的一些高分子物质仍然可能影响实验结果, 所以 DZP 含药血清、AS 含药血清对 CORT 诱导的 PKC 活性的升高究竟有无明显影响, 尚需进一步分析探讨。

## [参考文献]

[1] 孙大业, 郭艳林, 马力耕, 等. 细胞信号转导[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 92.

[收稿日期] 2009-04-16

[通讯作者] \* 吴冬梅, Tel: 13613838119.