

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.01.003

天香胶囊对晕动病模型大鼠前庭核 NMDAR1 信号通路的影响*

张凡 刘燕 高誉珊 于雪 王旭 李峰[△]李卫红[△] 胡艳红 张炜悦 孙天石 张楚焱 董一昕

(北京中医药大学中医学院 北京 100029)

摘要 目的:观察天香胶囊对晕动病模型大鼠前庭核 NMDAR1(N-甲基-D-天冬氨酸受体 1, N-methyl-D-aspartate acid receptor 1)、P-CaMKII(磷酸化钙调蛋白激酶 II-亚基, the phosphorylation of calmodulin protein kinase II alpha subunit)、P-CREB(磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白, the phosphorylation of cAMP response element binding protein)表达的影响,探讨天香胶囊调节晕动病模型大鼠前庭核兴奋性的内在分子机制。**方法:**将 36 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性药对照组(东莨菪碱)、天香胶囊低、中、高剂量组。灌胃预给药 3 天后,采用双轴旋转刺激法复制大鼠晕动病模型,通过 Western blotting 法检测各组大鼠前庭核 NMDAR1、P-CaMKII/CaMKII、P-CREB/CREB 的表达情况。**结果:**与正常组大鼠相比,模型组大鼠前庭核 NMDAR1、P-CaMKII、P-CREB 蛋白表达水平显著增加;与模型组相比,中、高剂量天香胶囊可显著下调晕动病模型大鼠前庭核组织 NMDAR1、P-CaMKII、P-CREB 蛋白表达。**结论:**天香胶囊可抑制晕动病模型大鼠前庭核 NMDAR1 信号通路的活化,这可能是其在治疗晕动病中降低前庭核兴奋性的内在分子机制之一。

关键词:天香胶囊;晕动病;NMDAR1;P-CaMKII;P-CREB

中图分类号:R-33;R338.2;R594.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)01-13-04

Effects of Tianxiang Capsule on the NMDAR1 Signaling Pathway in the Vestibule Nucleus of Rats with Motion Sickness*

ZHANG Fan, LIU Yan, GAO Yu-shan, YU Xue, WANG Xu, LI Feng[△],LI Wei-hong[△], HU Yan-hong, ZHANG Wei-yue, SUN Tian-shi, ZHANG Chu-jun, DONG Yi-xin

(TCM College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: To detect the effects of Tianxiang capsule on NMDAR1 (N-methyl-D-aspartate acid receptor 1), P-CaMKII (the phosphorylation of calmodulin protein kinase II alpha subunit) and P-CREB(the phosphorylation of cAMP response element binding protein) expression and investigate the molecular mechanism of Tianxiang capsule on regulating the excitability of vestibular nucleus in rats with motion sickness. **Methods:** 36 cases of male SD rats were randomly divided into six groups, including normal group, model group, scopolamine group, low-dose, mid-dose and high-dose Tianxiang capsule groups. The drugs were intragastrically administrated for 3 days, and then the motion sickness model was induced by biaxial rotation stimulus. The expression of NMDAR1, P-CaMKII /CaMKII and P-CREB/CREB in the vestibule nucleus of rats in each group was detected by Western Blotting. **Results:** Compared with the normal group, the expression of NMDAR1 and phosphorylation of CaMKII and CREB were significantly up-regulated in the model group. Compared with the model group, NMDAR1 signaling pathway was significantly inhibited in mid-dose and high-dose Tianxiang capsule groups. **Conclusions:** Tianxiang capsule can inhibit NMDAR1 signaling pathway in the vestibule nucleus of rats with motion sickness. This may be one of the pharmacological mechanisms of Tianxiang capsule for inhibiting the excitability of vestibular nucleus in the treatment of motion sickness.

Key words: Tianxiang capsule; Motion sickness; NMDAR1; P-CaMKII; P-CREB

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R338.2; R594.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)01-13-04

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81273885);北京中医药大学“航海中医药”协同创新项目(522/0100604299);北京中医药大学“重点学科”开放课题——“航海中医药学”(522/0100604054)

作者简介:张凡(1989-),女,硕士研究生,主要从事中医脑病基础研究和方剂的配伍效应研究,

电话:18701512374, E-mail: 18701512374@163.com

[△]通讯作者:李峰(1966-),男,医学博士,教授,博士研究生导师,主要从事航海中医药研究, E-mail: lifeng@bucm.edu.cn;

李卫红(1973-),女,医学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事中医药治疗脑病的基础研究, E-mail: liweihong.403@163.com

(收稿日期:2018-07-06 接受日期:2018-07-26)

晕动病以眩晕、恶心、呕吐等为主要临床表现,不仅是一种航海、航空与航天医学中的常见病症,更在一定程度上广泛地困扰着日常交通出行^[1,2]。近年来,大量研究表明前庭核兴奋性增强是晕动病发生的关键病理环节^[3,4],其中 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 (N-methyl-D-aspartate acid receptor 1, NMDAR1) 信号通路在介导前庭核兴奋性中起重要作用^[5]。本课题组前期研究已证明中药复方天香胶囊具有良好的抗晕动作用,可有效改善晕动病模型大鼠的行为学变化以及下调前庭核 c-fos 表达,但其对晕动病模型大鼠前庭核兴奋性调节的具体机制尚未阐明。因此,本实验在前期研究基础上,通过双轴旋转刺激法制备晕动病模型,观察天香胶囊对晕动病模型大鼠前庭核 NMDAR1 及其下游信号通路的影响,旨在从分子层次进一步探讨中药复方天香胶囊调节前庭核兴奋性发挥抗晕动病作用的内在机制,为深入阐释该复方发挥疗效的药效作用靶点提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠 36 只,雄性,体质量 180~220 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2016-0002。实验期间,12h 昼夜节律光照,室内温度为 22℃~25℃,相对湿度为 55%~70%,自由摄食与饮水。

1.2 主要试剂与药品

NMDAR1 单克隆抗体(美国 ABCAM 公司),CaMKII 单克隆抗体 (calmodulin protein kinase II alpha subunit, CaMKII, 美国 ABCAM 公司),P-CaMKII 多克隆抗体(P-CaMKII, the phosphorylation of calmodulin protein kinase II alpha subunit, 美国 ABCAM 公司),CREB 单克隆抗体 (cAMP response element binding protein, CREB, 美国 Protein Tech 公司),P-CREB 单克隆抗体 (the phosphorylation of cAMP response element binding protein, P-CREB, 美国 Cell Signaling 公司),山羊抗兔二抗(中杉金桥),天香胶囊浸膏干粉(购自北京创立科创医药技术开发有限公司)。

1.3 晕动病大鼠模型的制备

按照本课题组已建立的方法,通过角加速度刺激方法复制晕动病大鼠模型^[6]。具体造模方法为:围绕水平轴顺时针加速旋转,当速度达到最大后,立即进行减速,待停止后再以上述方式逆时针进行旋转,顺时针与逆时针旋转交替进行,此旋转刺激造模时间为 2 小时。

1.4 实验动物分组及处理

SD 大鼠适应性饲养 1 周后,根据随机原则将实验动物进行分组:正常对照组(6 只)、模型组(6 只)、阳性药对照组(6 只)、天香胶囊低、中、高剂量组(各 6 只)。各组大鼠每天固定时间灌胃给药,1 次/d,持续 3d,第三天给药处理后 1 小时,除正常对照组外,其他 5 组采用角加速度刺激方法进行晕动病造模。天香胶囊低、中、高剂量组给药剂量分别为 0.91 g/kg/d、1.82 g/kg/d、3.64 g/kg/d; 阳性药选用东莨菪碱,给药剂量为 1 mg/kg/d。

1.5 Western Blotting 检测

造模结束后,各组大鼠按照体重立即给予 3%戊巴比妥钠

(100 mg/kg)进行腹腔注射麻醉。根据解剖学标志取出前庭核,组织取材过程在冰上完成。各组加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂,冰上超声裂解,4℃ 离心(12000 r/min, 15 min),收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度。经 SDS-PAGE 电泳后,转膜(PVDF)70 min,5%脱脂奶粉封闭 1h,再分别加入一抗 NMDAR1 (1:1000)、CaMKII (1:30000)、P-CaMKII (1:500)、CREB(1:10000)、P-CREB(1:500),4℃ 静置过夜。一抗孵育完成后,用 TBST 洗膜 3 次(10 min/次),再加入稀释比例为 1:5000 的二抗,室温摇床孵育 1h。化学发光法显影,然后使用 ImageJ 软件分析目标条带的灰度值。

1.6 统计学处理

实验所得结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,组间差异比较采用 One way-ANOVA 方法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,使用 Graphpad Prism 软件制作柱状图。

2 结果

2.1 天香胶囊对晕动病模型大鼠前庭核 NMDAR1 蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠前庭核组织中 NMDAR1 蛋白表达明显升高($P < 0.01$),天香胶囊中、高剂量组与阳性药组大鼠前庭核 NMDAR1 的蛋白表达量与模型组相比均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),天香胶囊低剂量组 NMDAR1 蛋白表达水平较模型组有所减少,但差异无统计学意义($P > 0.05$),如图 1 所示。

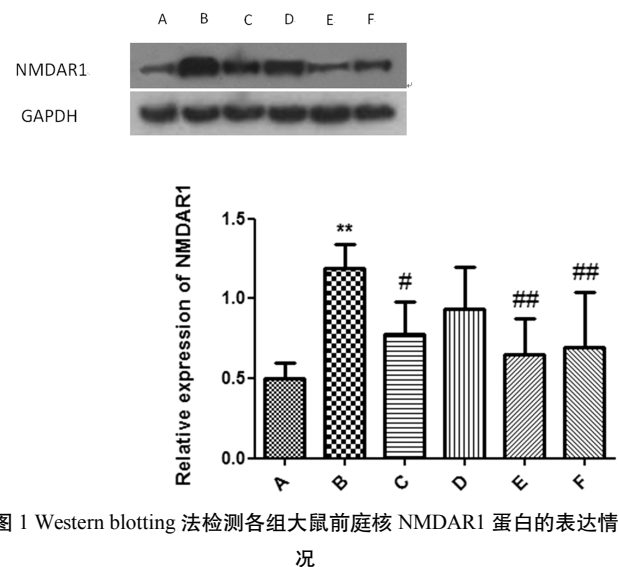


图 1 Western blotting 法检测各组大鼠前庭核 NMDAR1 蛋白的表达情况

注:A.正常组;B.模型组;C.阳性药组;D.天香胶囊低剂量组;E.天香胶囊中剂量组;F.天香胶囊高剂量组。

与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Fig.1 The protein expression of NMDAR1 in vestibular of each group detected by Western blot

Note: A: control group; B: model group; C: scopolamine group;

D: low-dose Tianxiang capsule group; E: mid-dose Tianxiang capsule group; F: high-dose Tianxiang capsule group

Compared with control group, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

2.2 天香胶囊对晕动病模型大鼠前庭核 CaMKII 蛋白磷酸化水平的影响

与正常组比较,模型组 P-CaMKII 表达明显增加, P-CaMKII /CaMKII 比值增高($P<0.01$),提示模型组大鼠前庭核 CaMKII 磷酸化水平显著升高;与模型组比较,天香胶囊中、高剂量组大鼠前庭核 CaMKII 磷酸化水平均显著降低 ($P<0.05$),天香胶囊低剂量组大鼠前庭核 CaMKII 磷酸化水平呈现下降趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$),如图 2 所示。

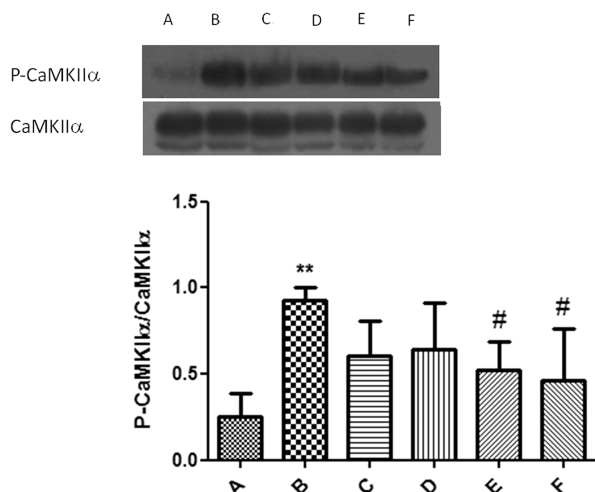


图 2 Western blotting 法检测各组大鼠前庭核 CaMKII 蛋白磷酸化水平注:A.正常组;B.模型组;C.阳性药组;D.天香胶囊低剂量组;E.天香胶囊中剂量组;F.天香胶囊高剂量组。

与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, # $P<0.01$

Fig.2 The protein expression of P-CaMKII in vestibular of each group detected by Western blot

Note: A: control group; B: model group; C: scopolamine group; D: low-dose Tianxiang capsule group; E: mid-dose Tianxiang capsule group; F: high-dose Tianxiang capsule group

Compared with control group, ** $P<0.01$; Compared with model group, # $P<0.05$, # $P<0.01$

2.3 天香胶囊对晕动病模型大鼠前庭核组织 CREB 蛋白磷酸化水平的影响

与正常组相比,模型组大鼠前庭核组织中磷酸化 CREB 与总 CREB 的比值显著性升高 ($P<0.01$);与模型组相比, P-CREB/CREB 比值在天香胶囊中、高剂量组大鼠前庭核组织中均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),天香胶囊低剂量组较之模型组相比,前庭核组织中 CREB 磷酸化水平有所减少,但差异无统计学意义($P>0.05$),如图 3 所示。

3 讨论

中医古籍中虽未见晕动病的确切文字记载,但根据该病的证候特征多将其纳入“眩晕”一证中进行研究^[7]。本课题组通过长期的临床实践发现本病病机虚实夹杂,多以脾肾亏虚、痰湿中阻为根本内因,当遇到颠簸、摇摆或旋转等异常运动刺激时,可使气机失调,痰浊上犯而触发晕动病。前期的临床实践以及动物实验证明^[6]中药复方天香胶囊对晕动病患者具有良好的预防与治疗作用,可显著降低晕动病模型大鼠晕反应指数评分

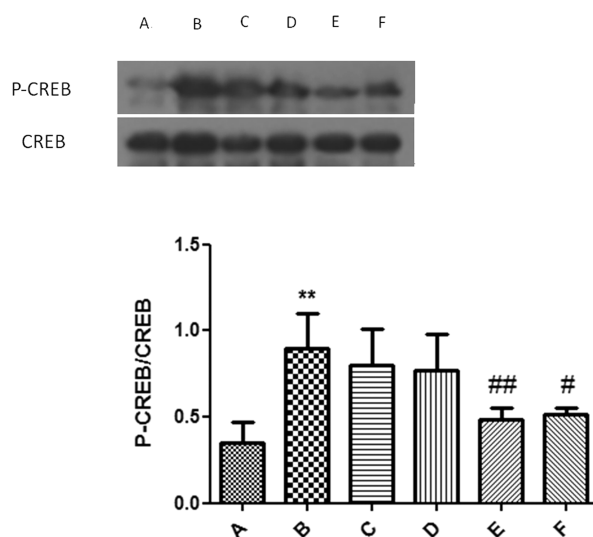


图 3 Western blotting 法检测各组大鼠前庭核 CREB 蛋白磷酸化水平注:A.正常组;B.模型组;C.阳性药组;D.天香胶囊低剂量组;E.天香胶囊中剂量组;F.天香胶囊高剂量组。

与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

Fig.3 The protein expression of P-CREB in vestibular of each group detected by Western blot

Note: A: control group; B: model group; C: scopolamine group; D: low-dose Tianxiang capsule group; E: mid-dose Tianxiang capsule group; F: high-dose Tianxiang capsule group

Compared with control group, ** $P<0.01$; Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

(排便、排尿、立毛与颤抖的症状评分)与高岭土摄入量(造模前后各三天高岭土摄入量总值),增强其自发活动(自发活动总路程与自发活动次数)。进一步的研究显示天香胶囊可明显下调晕动病模型大鼠前庭核组织 c-fos 蛋白表达水平^[6]。c-fos 蛋白为前庭核神经元激活或兴奋的标志,因此天香胶囊改善晕动症状与抑制前庭核兴奋性有关,但其下调前庭核兴奋性的具体分子机制尚未阐明。

大量研究表明^[8,9,10]前庭系统在晕动病发生中扮演着重要角色,其中谷氨酸作为兴奋性氨基酸通过激活 NMDA 受体信号通路而引发前庭核过度兴奋是晕动病病理形成中的核心环节。既往研究显示当机体暴露于车、船、飞机等不适宜的运动刺激环境中,外周前庭终器通过释放大量的神经递质将冲动传递至脑干前庭核,其中主要的兴奋性神经递质是谷氨酸^[11]。有研究发现^[12]旋转刺激时,谷氨酸(兴奋性氨基酸)是前庭核神经元中主要的神经递质,其下游激活的 NMDA 受体也广泛存在于前庭神经元中。同时,在中枢前庭核表达 c-fos 蛋白的神经元中亦存在 NMDA 受体各亚基的高表达。NMDA 受体属于离子型谷氨酸受体,主要由 NR1、NR2 和 NR3 三种亚单位构成,其中 NR1 是主要功能亚单位^[13]。晕动病发生时,随着外周前庭谷氨酸大量释放,刺激前庭核神经元 NMDAR1 过度兴奋,进而介导细胞内信号级联反应,引起胞外 Ca^{2+} 的大量内流,再通过钙/钙调蛋白依赖型激酶 II(Ca^{2+} /CaMKII)途径导致 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)的 Ser133 位点磷酸化,而磷酸化的 CREB 作为转录因子可进一步诱导 c-fos 基因表达增高^[14-16],这些研究提示在晕动病中该信号通路参与介导了前庭核的兴奋性增强。

而作为前庭系统信号传导的中继站--前庭核,可进一步通过多条神经通路将兴奋传导至小脑、皮质以及相应的效应部位,最终诱发一系列晕动症状的产生^[17-19]。在上述信号通路中,钙调蛋白激酶II是一种重要的蛋白激酶,在中枢神经系统内广泛分布,由4种基因分别编码 α 、 β 、 γ 和 δ 亚基,组成不同亚型^[20]。有研究显示^[9]在尾侧前庭核神经元中CaMKII的 α 亚基和 β 亚基均有表达,其中 α 亚基参与核内转录调控因子CREB的磷酸化过程。

本研究结果显示:与正常组比较,模型组大鼠前庭核NMDAR1表达水平以及下游信号分子CaMKII与CREB磷酸化水平显著增高,提示旋转刺激诱导的晕动病可激活NMDAR1信号通路以及其下游信号分子的活化,再次验证了NMDAR1信号通路参与了前庭核兴奋性增加的病理过程;与模型组比较,天香胶囊可以显著抑制NMDAR1表达水平以及下调其下游分子CaMKII与CREB磷酸化水平,提示天香胶囊可能通过抑制NMDAR1信号通路来下调中枢前庭核的过度兴奋状态,从而起到抗晕动病的药效作用。

以上研究表明中药复方天香胶囊可能通过抑制NMDAR1信号通路,下调前庭核的兴奋性。本研究从分子层面揭示了该药发挥抗晕动的内在机制,该实验结果为未来研发新型、安全、副作用小的抗晕动中药复方提供了新的探索。

参考文献(References)

- [1] Gilles Clément, Millard F. Reschke. Relationship between motion sickness susceptibility and vestibulo-ocular reflex gain and phase [J]. Journal of Vestibular Research, 2018: 1-10
- [2] Giovanni Bertolini, Meek Angela Durmaz, Kim Ferrari, et al. Determinants of motion sickness in tilting trains: coriolis/cross-coupling stimuli and tilt delay [J]. Frontiers in Neurology, 2017, 8 (195): 1-8
- [3] Wang ZB, Han P, Tong LC, et al. Low level of swiprosin-1/EFhd2 in vestibular nuclei of spontaneously hypersensitive motion sickness mice[J]. Scientific Report, 2017, 7(40986): 1-13
- [4] Zhang Li-li, Wang Jun-qin, Qi Rui-rui, et al. Motion sickness: current knowledge and recent advance [J]. CNS Neuroscience and Therapeutics, 2016, 22(1): 15-24
- [5] Wang Jun-qin, Li Hong-xia, Chen Xin-min, et al. Temporal change in NMDA receptor signaling and GABAA receptor expression in rat caudal vestibular nucleus during motion sickness habituation [J]. Brain Res, 2012, 1461: 30-40
- [6] 张凡,李卫红,李峰,等. 天香胶囊对晕动病模型大鼠行为学与前庭核c-fos蛋白表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(5): 807-811
Zhang Fan, Li Wei-hong, Li Feng, et al. Effects of Tianxiang Capsule on the behavior and the expression of c-fos in the vestibule nucleus of rats with motion sickness[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2018, 18(5): 807-811
- [7] 马凤君,王彤,卢岩. 针灸防治晕动病的研究概况[J].湖南中医杂志, 2014, 30(8): 186-189
- Ma Feng-jun, Wang Tong, Lu Yan. Review on Acupuncture for motion sickness [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 30(8): 186-189
- [8] Wang Jun-qin, Qi Rui-rui, Zhou Wei, et al. Differential gene expression profile in the rat caudal vestibular nucleus is associated with individual differences in motion sickness susceptibility[J]. PLOS ONE, 2015, 10(4): 1-23
- [9] James R. Lackner. Motion sickness: more than nausea and vomiting[J]. Exp Brain Res, 2014, 232(8): 2493-2510
- [10] Yi-ling Cai, Wen-ling Ma, Min Li. Glutamatergic vestibular neurons express Fos after vestibular stimulation and project to the NTS and the PBN in rats[J]. Neuroscience Letters, 2007, 417(2): 132-137
- [11] 吕达娜,林淑瑜,黄阳,等. 谷氨酸在晕动病发病机制中的作用及相关药物研究[J].中国临床药理学杂志, 2015, 31(14):1462-1464
Lv da-na, Lin shu-yu, Huang yang, et al. Influence of glutamate on the pathogenesis of motion sickness and relative drugs research[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2015, 31(14): 1462-1464
- [12] Chen LW, Lai CH, Law HY, et al. Quantitative study of the coexpression of Fos and N-methyl-D aspartate (NMDA) receptor subunits in otolith-related vestibular nuclear neurons of rats [J]. J Comp Neurol, 2003, 460(2): 292-301
- [13] Wang Hong-bo, Wang Xiao-long, Li Yan, et al. Chronic ethanol exposure induces SK-N-SH cell apoptosis by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor expression and intracellular calcium [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2018, 15(4): 3791-3800
- [14] Gary J. Iacobucci, Gabriela K. Popescu. Resident Calmodulin Primes NMDA Receptors for Ca^{2+} -Dependent Inactivation [J]. Biophysical Journal, 2017, 113(10): 2236-2248
- [15] Wang Jun-qin, Liu Ji-luo, Pan Leilei, et al. Storage of passive motion pattern in hippocampal CA1 region depends on CaMKII/CREB signaling pathway in a motion sickness rodent model [J]. Scientific Report, 2017, 7(43385): 1-12
- [16] Noguchi J, Matsuzaki M, Graham CR, et al. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca^{2+} signaling in dendrites [J]. Neuron, 2005, 46(4): 609-622
- [17] Longlong Tu, Zengbing Lu, Karolina Dieser, et al. Brain activation by H1 antihistamines challenges conventional view of their mechanism of action in motion sickness: a behavioral, c-Fos and physiological study in suncus murinus (house musk shrew) [J]. Frontiers in Physiology, 2017, 8(412): 1-19
- [18] Tian Da-wei, Mo Feng-feng, Cai Xing-jian, et al. Acupuncture relieves motion sickness via the $\text{IR}\beta$ -ERK1/2-dependent insulin receptor signalling pathway[J]. Acupunct Med, 2018, 36(3): 153-161
- [19] Giovanni Bertolini, Dominik Straumann. Moving in a moving world: a review on vestibular motion sickness [J]. Frontiers in Neurology, 2016, 7(14): 1-11
- [20] D. E. Johnson, A. Hudmon. Activation State-Dependent Substrate Gating in Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II [J]. Neural Plasticity, 2017: 1-13