DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.01.010

温胆汤含药血清调控神经元突触可塑性改善精神分裂症认知障碍的机制研究

朱金华,杨威,李琳琳,陈静,张米兰,刘冰怡,仁青永措,周军,万红娇
(江西中医药大学,江西 南昌 330004)

摘要:目的 以谷氨酸作用的 HT22 细胞为精神分裂症细胞模型,通过检测突触可塑性相关蛋白突触后致密蛋白 95(postsynaptic density protein-95,PSD-95)、生长相关蛋白 43(growth associated protein-43,GAP-43)、JNK 相互作用蛋白 3(c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-3,JIP-3)、连接蛋白 43(connexin-43,Cx-43)的变化,并从神经元突触可塑性角度探讨温胆汤改善精神分裂症认知障碍的分子机制。方法 将大鼠随机分成 4 组:温胆汤 40、30、20 g/kg 组和氯氮平 0.02 g/kg 组。各用药组灌胃相应的分组剂量药物,1 次/d,7 d 后取血,制备含药血清。采用 CCK8 实验确定谷氨酸对 HT22 细胞的作用浓度和时间点;以 10 mmol/L 谷氨酸作用 24 h 的 HT22 细胞为细胞模型,流式细胞术检测温胆汤含药血清对 HT22 细胞凋亡率的影响;RT-qPCR 检测 HT22 细胞中 *Psd95*、*Gap43*、*Jip3* 和 *Cx43* mRNA 表达;WB 检测 HT22 细胞中 PSD-95、GAP-43、JIP-3、Cx-43 蛋白表达。结果 根据不同浓度谷氨酸对 HT22 细胞增殖率影响的结果,确定 10 mmol/L 谷氨酸作用 HT22 细胞 24 h 为细胞实验条件。与正常对照组比较,谷氨酸模型组 HT22 细胞凋亡率显著上升;其 PSD-95、GAP-43、JIP-3、Cx-43 mRNA 和蛋白表达也明显下调($P<0.01$)。与谷氨酸模型组比较,谷氨酸+温胆汤 40、30、20 g/kg 含药血清组 HT22 细胞凋亡率明显下降;并显著上调 PSD-95、GAP-43、JIP-3、Cx-43 mRNA 和蛋白的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 温胆汤可能是通过降低神经元细胞凋亡,上调其 PSD-95、GAP-43、JIP-3、Cx-43 表达水平,进而调控突触可塑性,以期达到有效改善精神分裂症认知缺陷的目的。

关键词:温胆汤含药血清;精神分裂症;HT22 细胞;突触可塑性
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)01-0055-06

Mechanism of Wendan Decoction(温胆汤)-Containing Serum Regulating Neuronal Synaptic Plasticity to Improve Cognitive Impairment in Schizophrenia

ZHU Jinhua,YANG Wei,LI Linlin,CHEN Jing,ZHANG Milan,LIU Bingyi,REN QING Yongcuo,ZHOU Jun,WAN Hongjiao
(Jiangxi University of Chinese Medicine,Nanchang 330004,Jiangxi,China)

Abstract:*Objective* To explore the molecular mechanism of Wendan Decoction(温胆汤) improving cognitive impairment in schizophrenia from the perspective of neuronal synaptic plasticity by using glutamate-induced HT22 cells as a cellular model of schizophrenia and detecting synaptic plasticity related proteins,postsynaptic density protein-95(PSD-95),growth associated protein-43(GAP-43),c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-3(JIP-3) and connexin-43(Cx-43). *Method* The SD rats were randomly divided into four groups:Wendan Decoction 40 g/kg,30 g/kg and 20 g/kg groups and clozapine 0.02 g/kg group. Each drug group was given the corresponding dose of drug by gavage,once a day. After seven days,the rats were be killed to collect blood and prepare the drug-containing serum. CCK8 assay was used to determine the concentration and time point of glutamate action on astrocytes. HT22 cells at 10 mmol/L glutamate for 24 h were used as a cell model to detect the effect of Wendan Decoction-containing serum on the apoptosis rate of HT22 cells by flow cytometry. RT-qPCR was used to detect the expressions of *Psd95*,*Gap43*,*Jip3* and *Cx43* mRNA in HT22 cells. The expressions of PSD-95,GAP-43,JIP-3 and Cx-43 proteins in HT22 cells were detected by Western blot. *Results* According to the results of the effect of different concentrations of glutamate on the proliferation rate of HT22 cells,10 mmol/L glutamate HT22 cells for 24 h were determined as the cell experimental conditions. Compared with that of the normal control group,the apoptosis rate of HT22 cells in the glutamate model group increased significantly. The mRNA and protein expressions of PSD-95,GAP-43,JIP-3 and Cx-43 were also significantly down-regulated($P<0.01$). Compared with that of the glutamate model group,the apoptosis rate of HT22 cells in Wendan Decoction-containing serum groups were significantly decreased and the expressions of PSD-95,GAP-43,JIP-3,Cx-43 mRNA and protein significantly up-regulated($P<0.05$ or $P<0.01$). *Conclusion* Wendan Decoction may be to reduce apoptosis

基金项目:国家自然科学基金项目(82160839);江西省自然科学基金项目(20192BAB205113);江西省研究生创新专项资金项目(YC2023-B222);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ190642)
作者简介:朱金华(1977-),男,江西临川人,正高级实验师,硕士研究生导师,博士在读,研究方向:中医药与精神分裂症。
通讯作者:万红娇(1964-),女,江西南昌人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药与神经保护。E-mail:ann.wan@163.com。

in neurons and up - regulate the expressions of PSD - 95, GAP - 43, JIP - 3 and Cx - 43, and then regulate synaptic plasticity, in order to effectively improve cognitive deficits in schizophrenia.

Keywords: Wendan Decoction(温胆汤) - containing serum; schizophrenia; HT22 cells; synaptic plasticity

精神分裂症是最严重的精神疾病之一,其症状主要可以分为阴性症状 、阳性症状和认知功能障碍三大类,世界上多达1%的人口受其影响,也是主要的致残因素之一[1-3]。该病的病因至今尚未明确,复发率和病死率高,在病因学和治疗上仍是一个巨大的挑战。认知功能障碍作为精神分裂症的核心症状之一,具有发生于精神分裂症其他症状之前、持续时间长、存在于绝大多数精神分裂症患者中的特征,并且认知已被确定为改善精神病患者功能结果的一个重要治疗目标[4]。大量文献表明,精神分裂症认知功能障碍与突触可塑性之间存在着紧密的联系[5-7]。突触可塑性反映了神经元突触连接强度的可调节能力,是学习和记忆的重要神经机制[8]。突触相关蛋白是突触可塑性的重要分子基础,其调控突触结构和功能的稳定,影响神经的生长与修复,维持神经系统正常的生理功能,与精神障碍疾病的关系十分密切[9]。

中医神志病中的"癫证""狂证"与精神分裂症相类似。从中医角度分析癫狂的病因病机是由于多种因素引起机体阴阳与脏腑功能失调,出现气、火、痰、瘀等病理产物,最终引起神机逆乱。其中"痰"是至关重要的致病因素,痰浊内生或与其他病理产物相互作用,蒙蔽心神与清窍,出现各种精神错乱的症状[10-11]。历代医家向来重视痰邪对癫狂的影响,治疗以治痰为主。温胆汤是经典的治痰名方,其功效清胆和胃,理气化痰,临床上通过对温胆汤进行化裁或联合其他抗精神病药物治疗精神分裂症,且取得了明显的治疗效果[12-14]。本课题组前期研究发现,温胆汤能够明显缓解精神分裂症模型大鼠刻板行为、增强学习记忆能力以及上调海马组织中突触相关蛋白突触可塑性相关蛋白突触后致密蛋白 95(postsynaptic density protein - 95, PSD - 95)、生长相关蛋白 43(growth associated protein - 43, GAP - 43)、JNK 相互作用蛋白 3(c - Jun NH2 - terminal kinase - interacting protein - 3, JIP - 3)、连接蛋白 43(connexin - 43, Cx - 43)的表达等,但具体的分子机制还需进一步研究[15]。因此,本研究在此基础上以谷氨酸作用于海马神经元细胞,通过流式细胞法、蛋白免疫印迹法等,在细胞水平上观察温胆汤含药血清对细胞凋亡的影响,检测突触相关蛋白 PSD - 95、GAP - 43、JIP - 3、Cx - 43 的表达,进一步探讨温胆汤是否通过调控突触可塑性来改善精神分裂症的认知功能障碍,并为临床运用温胆汤防治精神分裂症提供更多的实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株

HT22 细胞(CL - 0595, Procell)。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠 40 只,雄性,体质量(250 ± 20)g,动物许可证号:SCXK(湘)2019 - 0004,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。本研究动物实验已获江西中医药大学实验动物伦理委员会审查(No. JZLLSC20230638)。大鼠饲养于屏障环境中,温度 25 ℃,湿度 50%,12 h 昼夜节律,饮水和饲料充足,动物实验设施许可证编号:SYXK(赣)2022 - 0002。

1.3 试验药物

温胆汤原方:半夏 6 g,茯苓 4.5 g,竹茹 6 g,枳实 6 g,陈皮 9 g,炙甘草 3 g,生姜 3 片,红枣 2 粒,每剂含生药 38 g,购买于江西中医药大学附属医院中药房。全方药材由江西中医药大学中药资源与民族药研究中心曹岚副教授鉴定合格。全方药物加水浸泡,一煎、二煎后,过滤取汁,使用旋转蒸发仪浓缩药物,制成浓度为 2 g 生药/mL 的温胆汤汤剂,于 4 ℃冰箱保存备用。

1.4 试剂

谷氨酸(批号:G8415, Merck 公司),DMEM 高糖培养基、CCK - 8 法细胞增殖检测试剂盒(批号:KGM12800S、KGA317,江苏凯基生物技术股份有限公司),FBS(批号:E600001 - 0500, BBI Life Sciences),Annexin V - FITC/PI Apoptosis Kit(AP101,联科生物),RNAiso Plus、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ (Tli RNaseH Plus)(批号:9109、RR047A、RR820A, Takara 公司),PSD - 95、GAP - 43、Cx - 43、GAPDH 一抗(批号:#3409、#8945、#3512、#3409, CST 公司),JIP - 3 一抗(批号:sc - 46663, SANTA CRUZ 公司)。

1.5 仪器

BPN - 80CW CO_2 培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),MF53 倒置荧光显微镜(广州市明美光电有限公司), 2060R NovoCyte™流式细胞仪[艾森生物(杭州)有限公司],PowerPacTW 通用 Bio - Rad 型电泳仪、小型垂直电泳槽(Bio - Rad 公司),NP80 紫外分光光度仪(Nano Photometer 公司),ND2000 核酸蛋白测定仪(Thermo 公司),CFX Connect™实时荧光 PCR 仪、Chemi DocTM XRS + 超高灵敏度化学发光成像系统[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]。

1.6 方法

1.6.1 含药血清制备 将 40 只 SPF 级 SD 大鼠适应性喂养 5 d 后,每组 10 只随机分为 4 组:温胆汤 40 g/kg 组、温胆汤 30 g/kg 组、温胆汤 20 g/kg 组、氯氮平 0.02 g/kg 组。氯氮平 0.02 g/kg 组灌胃氯氮平原药 0.02 g/kg,温胆汤 40、30、20 g/kg 组分别灌胃温胆汤生药 40、30、20 g/kg,1 次/d。7 d 后末次给药 2 h 麻醉大鼠,腹主动脉采血,离心取血清,灭活,过 0.22 μm 滤膜除菌, - 80 ℃备用。

1.6.2 细胞复苏与传代 冻存细胞从液氮中取出,放 37 ℃水浴快速融化,移至装有 10 mL 培养基的离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加 1 mL 新鲜培养基重悬细胞,转移至装有 DMEM 完全培养基的培养瓶或培养皿中,37 ℃、5 % CO_2 培养。当细胞培养到 80% ~90% 密度时需传代,先吸去原有培养基,用 1 × PBS 洗 2 遍,加入适量 0.25% 胰酶消化,待细胞变圆后加入培养基终止消化,并收集细胞悬液于离心管,1000 r/min 离心 5 min,弃尽上清,加入培养基吹匀,将细胞悬液按照 1∶2 的比例加入准备好的培养瓶或培养皿中,置于细胞培养箱中培养。

1.6.3 CCK8 实验检测不同浓度谷氨酸对 HT22 细胞增殖率的影响 将 HT22 细胞 100 μL 接种于 96 孔板中,细胞数为 1×10^4 个细胞/孔,37 ℃、5% CO_2 培养 24 h。细胞状态良好,分组加入 10 μL 不同浓度的谷氨酸(终浓度为:0、1、2、5、10、20 mmol/L)作用 24 h 和 48 h,每组设 6 复孔,每孔再加入 10 μLCCK8 试剂,培养箱中孵育 1 ~4 h 后,放振动器上轻轻混匀

1 min,使用酶标仪在 450 nm 处检测每孔的吸光值。实验重复 5 次。数据分析:细胞存活率(%) = [(As - Ab)/(Ac - Ab)] × 100、抑制率(%) = [(Ac - As)/(Ac - Ab)] × 100;As = 实验孔吸光值(含有细胞,培养基,CCK8 试剂和谷氨酸的孔的吸光值)、Ab = 空白孔吸光值(含有培养基和 CCK8 试剂的孔的吸光值)、Ac = 实验孔吸光值(含有细胞、培养基和 CCK8 试剂的孔的吸光值)。

1.6.4 细胞分组及药物干预 实验分组为 6 组,分设正常对照组、谷氨酸模型组、氯氮平 0.02 g/kg 含药血清组、温胆汤 40 g/kg 含药血清组、温胆汤 30 g/kg 含药血清组、温胆汤 20 g/kg 含药血清组。将对数期生长的 HT22 细胞均匀地接种于培养皿中,每皿细胞 1×10^6 个,放置培养箱培养,待细胞完全贴壁后进行加药处理,除正常对照组外,按照实验分组加入 10 mmol/L 的谷氨酸和对应的含药血清(各给药组加入相应大鼠含药血清,含药血清量为总培养体系的 10%)处理 24 h 后,收集细胞做后续实验。

1.6.5 流式细胞术检测 HT22 细胞凋亡率 实验分组和细胞铺板、培养同 1.6.4 项,实验操作严格按照 Annexin V - FITC/PI Apoptosis Kit 说明书要求。收集 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞,加 PBS 1500 r/min 离心 3 min,洗两次。取预冷的 1 × Binding Buffer 重悬细胞。各管加入 5 μL Annexin V - FITC 和 10 μL PI,轻微混匀后,室温避光孵育 10 min,再向每管中加入预冷的 1 × Binding Buffer,混匀后上流式仪检测。

1.6.6 RT - qPCR 检测 HT22 细胞 *Psd95*、*Gap43*、*Jip3*、*Cx43* mRNA 的表达水平 实验分组和细胞铺板、培养同 1.6.4 项。收集各组细胞抽提 RNA,提取后使用微量紫外分光光度仪测定 RNA 浓度及纯度,通过琼脂糖凝胶电泳来确定 RNA 质量情况。使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)反转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板,在荧光定量 PCR 仪上设定程序进行扩增检测。两步法 PCR 扩增标准程序:预变性 95 ℃ 5 min 循环数 1,变性 95 ℃ 10 s、退火\延伸 60 ℃ 30 s 循环数 40。根据相对定量的 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法,以 *β actin* 为内参,计算出各组 *Psd95*、*Gap43*、*Jip3* 和 *Cx43* 的相对表达量。所有引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成。详见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	引物长度/(nt)	产物长度/(bp)	退火温度/(℃)
Psd95 F	TCCGGGAGGTGACCCATTC	19	83	60.9
Psd95 R	TTTCCGGCGCATGACGTAG	19		
Gap43 F	AAGGCAGGGGAAGATACCAC	20	87	59.1
Gap43 R	TTGTTCAATCTTTTGGTCCTCAT	23		
Jip3 F	GCGTCCCACCTCTCTGAATG	20	129	60.5
Jip3 R	CTGGAGCTGGACTGTAGCTG	20		
Cx43 F	CTGAGTGCGGTCTACACCTG	20	127	60.1
Cx43 R	GAGCGAGAGACACCAAGGAC	20		
β actin F	AGCCATGTACGTAGCCATCC	20	227	59.6
β actin R	TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG	20		

1.6.7 WB 检测 HT22 细胞 PSD - 95、GAP - 43、JIP - 3、Cx - 43 蛋白的表达水平 实验分组和细胞铺板、培养同 1.6.4 项。弃掉培养皿中液体,加入细胞裂解液,于冰上裂解 30 min,在 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,BCA 测定蛋白浓度。蛋白变性、制胶、上样、电泳、转膜,脱脂牛奶封闭 1 h,一抗(1∶1000)4 ℃过夜,洗膜 5 次,二抗(1∶2000)室温 2 h,洗膜 5 次,加 ECL 曝光液曝光拍照。用“Quantity one”软件分析各抗体条带灰度值。

1.6.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计分析,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,多组间比较采用单因素方差分析(One - way ANOVA),组间两两比较用 LSD 检验;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度谷氨酸对 HT22 细胞增殖率的影响

利用 CCK8 法在 24 h、48 h 时间点下检测 HT22 细胞增殖情况。如表 2 所示,2 个时间点细胞增殖能力随着谷氨酸浓度的增加而减少,综合各时间点细胞的状态情况,综合选择 10 mmol/mL 谷氨酸浓度作用 24 h 进行后续实验。

表 2 不同浓度谷氨酸对 HT22 细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s$)

浓度/(mmol/L)	*n*	24 h	48 h
0	5	100.0 ± 2.2	100.0 ± 4.1
1	5	99.2 ± 4.7	79.4 ± 2.2**
2	5	95.0 ± 4.4*	72.2 ± 4.3**
5	5	83.5 ± 2.8**	59.8 ± 5.5**
10	5	69.5 ± 2.5**	54.6 ± 3.4**
20	5	55.1 ± 2.9**	46.1 ± 3.0**

注:* 与 0 mmol/L 谷氨酸浓度比较,$P < 0.05$;** 与 0 mmol/L 谷氨酸浓度比较,$P < 0.01$。

2.2 温胆汤含药血清对谷氨酸作用下 HT22 细胞凋亡的影响

经流式细胞仪检测,与正常对照组比较,谷氨酸模型组 HT22 细胞凋亡率显著上升($P < 0.01$);与谷氨酸模型组比较,温胆汤 40、30、20 g/kg 含药血清组与氯氮平 0.02 g/kg 含药血清组 HT22 细胞凋亡率明显下降($P < 0.01$);与正常对照组比较,温胆汤 40、30、20 g/kg 含药血清组与氯氮平 0.02 g/kg 含药血清组 HT22 细胞凋亡率也明显下降($P < 0.05$)。见表 3、插页 X 图 1。

表 3 温胆汤含药血清对谷氨酸作用下 HT22 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	*n*	剂量/(g/kg)	细胞凋亡率/(%)
正常对照组	3		4.01 ± 0.16**
谷氨酸模型组	3		13.74 ± 3.48
氯氮平 0.02 g/kg 含药血清组	3	0.02	0.92 ± 0.06**
温胆汤 40 g/kg 含药血清组	3	40	0.94 ± 0.31**
温胆汤 30 g/kg 含药血清组	3	30	0.88 ± 0.08**
温胆汤 20 g/kg 含药血清组	3	20	0.77 ± 0.17**

注:** 与谷氨酸组模型组比较,$P < 0.01$。

2.3 温胆汤含药血清对谷氨酸作用下 HT22 细胞 *Psd95*、*Gap43*、*Jip3*、*Cx43* mRNA 表达的影响

经 RT - qPCR 检测,与正常对照组比较,谷氨酸模型组 HT22 细胞 *Psd95*、*Gap43*、*Jip3*、*Cx43* mRNA 的表达显著下调($P < 0.01$);与谷氨酸模型组比较,温胆汤 40、30、20 g/kg 含药血清组与氯氮平 0.02 g/kg 含药血清组均能明显上调 HT22 细胞 *Psd95*、*Gap43*、*Jip3*、*Cx43* mRNA 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 4。

2.4 温胆汤含药血清对谷氨酸作用下 HT22 细胞 PSD - 95、GAP - 43、JIP - 3、Cx - 43 蛋白表达的影响

与正常对照组比较,谷氨酸模型组 HT22 细胞 PSD - 95、GAP - 43、JIP - 3、Cx - 43 蛋白表达显著下调($P < 0.01$);与谷氨酸模型组比较,温胆汤 40、30、20 g/kg 含药血清组与氯氮平 0.02 g/kg 含药血清组 HT22 细胞 PSD - 95、GAP - 43、JIP - 3、

表 4 温胆汤含药血清对谷氨酸作用下海马神经元细胞 *Psd95*、*Gap43*、*Jip3*、*Cx43* mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

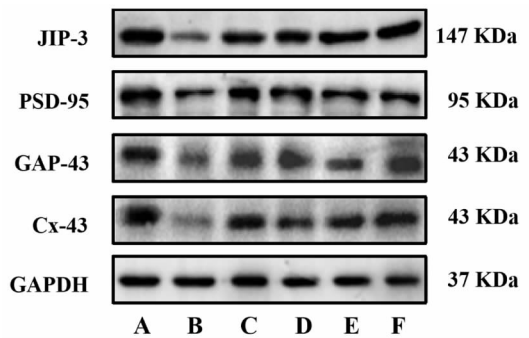
组别	n	剂量/(g/kg)	$Psd95/2^{-\Delta\Delta Ct}$	$Gap43/2^{-\Delta\Delta Ct}$	$Jip3/2^{-\Delta\Delta Ct}$	$Cx43/2^{-\Delta\Delta Ct}$
正常对照组	3		1.000 ± 0.000 **	1.000 ± 0.000 **	1.000 ± 0.000 **	1.000 ± 0.000 **
谷氨酸模型组	3		0.443 ± 0.085	0.473 ± 0.025	0.420 ± 0.040	0.537 ± 0.076
氯氮平 0.02 g/kg 含药血清组	3	0.02	0.570 ± 0.066 *	0.730 ± 0.040 **	0.767 ± 0.025 **	0.683 ± 0.085 *
温胆汤 40 g/kg 含药血清组	3	40	0.633 ± 0.091 **	0.887 ± 0.012 **	0.813 ± 0.045 **	0.750 ± 0.050 **
温胆汤 30 g/kg 含药血清组	3	30	0.667 ± 0.057 **	0.623 ± 0.050 **	0.780 ± 0.082 **	0.763 ± 0.076 **
温胆汤 20 g/kg 含药血清组	3	20	0.593 ± 0.080 *	0.570 ± 0.010 **	0.537 ± 0.087 *	0.660 ± 0.080 *

注：* 与谷氨酸组模型组比较，$P < 0.05$；* * 与谷氨酸组模型组比较，$P < 0.01$。

表 5 温胆汤含药血清对谷氨酸作用下 HT22 细胞 PSD－95、GAP－43、JIP－3、Cx－43 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	PSD－95/GAPDH	GAP－43/GAPDH	JIP－3/GAPDH	Cx－43/GAPDH
正常对照组	3		1.31 ± 0.17 **	0.98 ± 0.15 **	1.46 ± 0.26 **	1.13 ± 0.22 **
谷氨酸模型组	3		0.64 ± 0.06	0.37 ± 0.04	0.47 ± 0.13	0.43 ± 0.09
氯氮平 0.02 g/kg 含药血清组	3	0.02	1.26 ± 0.15 **	0.71 ± 0.08 **	0.98 ± 0.35 **	0.97 ± 0.20 **
温胆汤 40 g/kg 含药血清组	3	40	1.06 ± 0.05 **	0.75 ± 0.05 **	1.05 ± 0.31 **	0.81 ± 0.07 *
温胆汤 30 g/kg 含药血清组	3	30	0.87 ± 0.06 *	0.65 ± 0.07 **	1.21 ± 0.11 **	0.90 ± 0.30 *
温胆汤 20 g/kg 含药血清组	3	20	0.95 ± 0.07 **	0.72 ± 0.21 **	1.42 ± 0.06 **	0.97 ± 0.27 **

注：* 与谷氨酸组模型组比较，$P < 0.05$；* * 与谷氨酸组模型组比较，$P < 0.01$。



注：A. 正常对照组；B. 谷氨酸模型组；C. 氯氮平 0.02 g/kg 含药血清组；D. 温胆汤 40 g/kg 含药血清组；E. 温胆汤 30 g/kg 含药血清组；F. 温胆汤 20 g/kg 含药血清组。

图 2 温胆汤含药血清对谷氨酸作用下 HT22 细胞 PSD－95、GAP－43、JIP－3、Cx－43 蛋白表达的影响

Cx－43 蛋白的表达均明显上调($P < 0.05$ 或$P < 0.01$)。见表 5、图 2。

3 讨论

精神分裂症是一类严重危害生命健康和造成沉重社会负担的精神障碍疾病，患者会出现思维、情感、记忆、行为等方面的异常，严重者甚至会自残或者自杀。谷氨酸假说是目前研究精神分裂症的热门领域，诸多研究也证实了谷氨酸功能的失调在精神分裂症病理生理中的作用[16－18]。谷氨酸是广泛分布于中枢神经系统的一种兴奋性神经递质，当谷氨酸释放过量会引起谷氨酸受体过度活化、钙稳态失衡等，继而产生兴奋毒性的效应，最终导致神经元的死亡以及功能的障碍[19－20]。鉴于谷氨酸的兴奋毒性作用，实验研究中常用谷氨酸来建立细胞损伤模型。其次，海马体是在学习与记忆巩固等功能中发挥关键作用的重要脑区，在海马体的神经回路中也发现了许多突触可塑性的实证[21－22]。广泛的尸检和神经影像学研究表明海马体是精神分裂症病理生理学中的关键部位。有学者研究发现精神分裂症患者海马体积减小以及神经元细胞显著减少[23]。因此，作为海马体基本结构和功能单位的海马神经元细胞是具有代表性和可行性的。本研究以谷氨酸作用于海马神经元细胞，经流式细胞仪检测发现海马神经元细胞凋亡率明显升高，与上述文献报道一致。而经温胆汤含药血清干预后发现凋亡率显著下降，说明温胆汤可能对维持神经元细胞的存活、保护神经等方面有一定的作用。

PSD－95 是一种广泛分布于突触后致密区的支架蛋白，其通过不同结构域与多种受体、相关蛋白、黏附分子结合，在参与调控突触信号的传导、维持突触后膜结构的稳定性以及影响突触的数量和发育等过程扮演着重要的角色，通常作为突触后可塑性的标志性蛋白[24]。研究发现，在精神分裂症患者的海马和前额叶皮层中参与突触可塑性的关键蛋白 PSD－95 的表达明显降低[25－26]。GAP－43 在轴突末端和突触前膜高度表达，与轴突延伸、再生以及突触连接与形成等过程密切相关，是研究神经系统生长发育、损伤修复和突触可塑性的神经元特异性蛋白[27－28]。此外，作为神经元中蛋白激酶 C(protein kinase C，PKC)的主要底物，其磷酸化状态可以影响突触传递效率，最终影响突触的功能可塑性[29]。FUNG S J 等[30]发现精神分裂症患者存在突触末端可塑性的降低且检测到突触可塑标志物 GAP－43 的表达低于正常人。JIP－3 是 JNK 相互作用蛋白(JNK－interacting proteins，JIPs)的家族成员之一，在体内多种组织中均有表达，但在脑组织中高度表达，对轴突发育产生重要的影响[31]。JIP－3 作为支架蛋白能够介导多种货物蛋白的轴突转运，并且聚集于轴突末梢影响着轴突的生长[32]。孙涛[33]通过体内外实验证实 JIP－3 能够促进海马神经元的轴突生长。此外，有研究发现敲除 JIP－3 基因的小鼠在出生后死亡并伴随着大脑发育的缺陷[34]。Cx－43 是缝隙连接中的重要组成部分，能够调控缝隙连接中通道的开放，参与邻近细胞间的信号传递[35]。研究表明，Cx－43 可以调控突触数目和促进损伤突触的修复，在神经系统中发挥着保护神经及调控突触可塑性等重要作用[36]。本文结果显示，在 10 mmol/L 谷氨酸作用下，海马神经元细胞 PSD－95、GAP－43、JIP－3、Cx－43mRNA 和蛋白表达均明显下调；但经温胆汤含药血清干预后，海马神经元细胞 PSD－95、GAP－43、JIP－3、Cx－43 的 mRNA 和蛋白表达明显升高。说明温胆汤可能通过上调 PSD－95、GAP－43、JIP－3、Cx－43 的表达来调控突触可塑性。

综上所述，温胆汤可能是通过降低神经元细胞凋亡，上调其 PSD－95、GAP－43、JIP－3、Cx－43 表达水平，进而调控突

触可塑性,以期达到有效改善精神分裂症认知缺陷的目的。这可能是温胆汤改善精神分裂症患者认知功能的机制之一。本研究只是从突触可塑性这一切入点,后续研究将从更多方面探讨温胆汤防治精神分裂症的作用机制。

参考文献

[1] MARDER S R,CANNON T D. Schizophrenia [J]. N Engl J Med, 2019,381(18): 1753 - 1761.
[2] SCHMITT A, FALKAI P, PAPIOL S. Neurodevelopmental disturbances in schizophrenia: evidence from genetic and environmental factors[J]. J Neural Transm, 2023, 130(3): 195 - 205.
[3] UNO Y, COYLE J T. Glutamate hypothesis in schizophrenia[J]. Psychiatry Clin Neurosci, 2019, 73(5): 204 - 215.
[4] MCCLEERY A, NUECHTERLEIN K H. Cognitive impairment in psychotic illness: prevalence, profile of impairment, developmental course, and treatment considerations? [J]. Dialogues Clin Neurosci, 2019, 21(3): 239 - 248.
[5] WU X L, YAN Q J, ZHU F. Abnormal synaptic plasticity and impaired cognition in schizophrenia[J]. World J Psychiatry, 2022, 12(4): 541 - 557.
[6] SANDERSON T M, COTEL M C, O'NEILL M J, et al. Alterations in hippocampal excitability, synaptic transmission and synaptic plasticity in a neurodevelopmental model of schizophrenia[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(3): 1349 - 1358.
[7] FISHER M, LOEWY R, HARDY K, et al. Cognitive interventions targeting brain plasticity in the prodromal and early phases of schizophrenia[J]. Annu Rev Clin Psychol, 2013, 9: 435 - 463.
[8] MAGEE J C, GRIENBERGER C. Synaptic plasticity forms and functions[J]. Annu Rev Neurosci, 2020, 43: 95 - 117.
[9] 王珏, 吴俞莹, 张新化. 海马突触可塑性与神经系统相关疾病关系的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(5): 557 - 560.
[10] 姜德友, 宁式颖. 癫狂病源流考[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(12): 2544 - 2547.
[11] 梁素萍, 张启明. 癫狂的中医病因病机研究概况[J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(5): 160 - 162.
[12] 黄俊东, 于林, 朱志敏. 加味温胆汤治疗痰湿内阻型慢性精神分裂症的临床效果[J]. 世界中医药, 2018, 13(7): 1677 - 1680.
[13] 徐义勇, 田真真, 易惺钱, 等. 温胆汤联合抗精神病药物治疗精神分裂症疗效与安全性的 Meta 分析[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(10): 2536 - 2540.
[14] 张明瑞,秦巧英,陈国华,等. 温胆汤联合氨磺必利治疗难治性精神分裂症的对照研究 [J]. 世界中西医结合杂志,2018,13(10): 1431 - 1434.
[15] 朱金华,李琳琳,周军,等. 温胆汤对精神分裂症模型大鼠行为学及其海马组织 PSD - 95、GAP - 43、JIP - 3、Cx - 43 表达的影响 [J]. 中药药理与临床,2022,38(5): 11 - 16.
[16] MERRITT K, MCGUIRE P K, EGERTON A, et al. Association of age, antipsychotic medication, and symptom severity in schizophrenia with proton magnetic resonance spectroscopy brain glutamate level: a mega - analysis of individual participant - level data[J]. JAMA Psychiatry, 2021, 78(6): 667 - 681.
[17] ROWLAND L M, KONTSON K, WEST J, et al. *In vivo* measurements of glutamate, GABA, and NAAG in schizophrenia [J]. Schizophr Bull, 2013, 39(5): 1096 - 1104.
[18] SMESNY S, GUSSEW A, BIESEL N J, et al. Glutamatergic dysfunction linked to energy and membrane lipid metabolism in frontal and anterior cingulate cortices of never treated first - episode schizophrenia patients [J]. Schizophr Res, 2015, 168(1 - 2): 322 - 329.
[19] 李春艳, 赵洪庆, 杨蕙, 等. 谷氨酸兴奋毒性及其调节剂的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(5): 645 - 649.
[20] LAU A, TYMIANSKI M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration[J]. Pflugers Arch, 2010, 460(2): 525 - 542.
[21] BETTIO LEB, RAJENDRAN L, GIL - MOHAPEL J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2017, 79: 66 - 86.
[22] BARTSCH T, WULFF P. The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability [J]. Neuroscience, 2015, 309: 1 - 16.
[23] ROESKE M J, KONRADI C, HECKERS S, et al. Hippocampal volume and hippocampal neuron density, number and size in schizophrenia: a systematic review and meta - analysis of postmortem studies[J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(7): 3524 - 3535.
[24] LEVY A M, GOMEZ - PUERTAS P, TÜMER Z. Neurodevelopmental disorders associated with PSD - 95 and its interaction partners[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4390.
[25] TORO C, DEAKIN J F. NMDA receptor subunit NRI and postsynaptic protein PSD - 95 in hippocampus and orbitofrontal cortex in schizophrenia and mood disorder [J]. Schizophr Res, 2005, 80(2 - 3): 323 - 330.
[26] MATAS E, JOHN FRANCIS WILLIAM D, TORO C T. Abnormal expression of post - synaptic proteins in prefrontal cortex of patients with schizophrenia[J]. Neurosci Lett, 2021, 745: 135629.
[27] 杨美丽. 突触可塑性与学习记忆关系的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2022, 38(17): 2946 - 2949, 2954.
[28] 栾永昕, 张剑涛, 付双林. 神经系统相关蛋白的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(16): 2129 - 2132.
[29] HOLAHAN M R. A shift from a pivotal to supporting role for the growth - associated protein (GAP - 43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 266.
[30] FUNG S J, SIVAGNANASUNDARAM S, WEICKERT C S. Lack of change in markers of presynaptic terminal abundance alongside subtle reductions in markers of presynaptic terminal plasticity in prefrontal cortex of schizophrenia patients[J]. Biol Psychiatry, 2011, 69(1): 71 - 79.
[31] 段珊. JIP3 蛋白结构及生理功能研究[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(6): 385 - 388.
[32] VERHEY K J, MEYER D, DEEHAN R, et al. Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules[J]. J Cell Biol, 2001, 152(5): 959 - 970.
[33] 孙涛. JIP3 和 JIP1 分别调节神经元轴突生长和 TrkB 顺轴突转运的研究 [D]. 济南:山东大学,2013.
[34] KELKAR N, DELMOTTE M H, WESTON C R, et al. Morphogenesis of the telencephalic commissure requires scaffold protein JNK - interacting protein 3 (JIP3)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(17): 9843 - 9848.
[35] 王思茹, 石玉秀. 突触相关蛋白与精神障碍性疾病[J]. 解剖科学进展, 2017, 23(2): 208 - 211.
[36] YANG K L, ZHOU Y, ZHOU L Q, et al. Synaptic plasticity after focal cerebral ischemia was attenuated by Gap26 but enhanced by GAP - 134[J]. Front Neurol, 2020, 11: 888.

温胆汤含药血清调控神经元突触可塑性改善精神分裂症认知障碍的机制研究

(正文见 55 – 59 页)

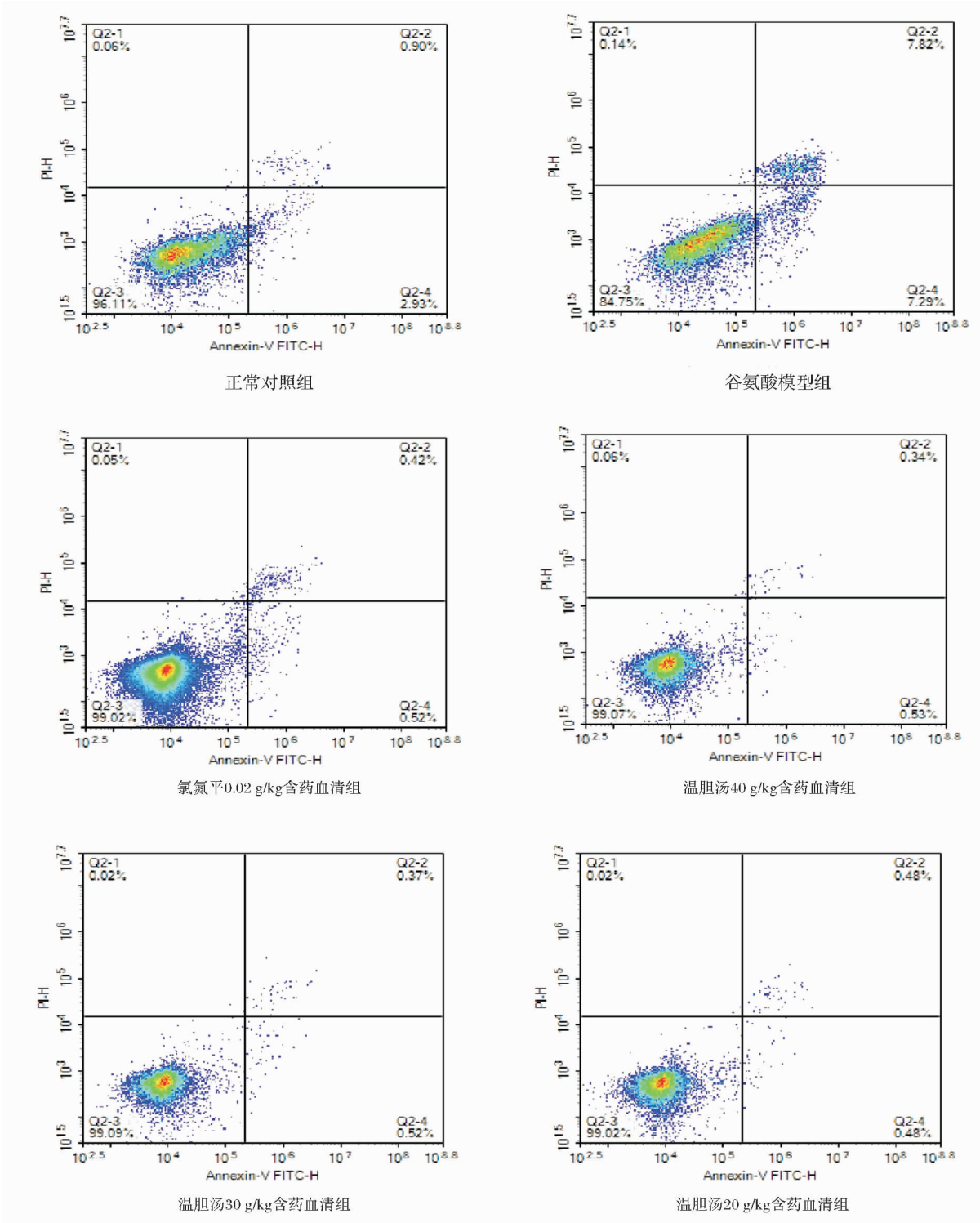


图 1 温胆汤含药血清对谷氨酸作用下 HT22 细胞凋亡的影响