

大黄酚对小鼠脑皮层 c-fos 和 c-jun mRNA 表达的影响及与学习记忆的关系

薛占霞¹, 高永山², 沈丽霞^{1*}

1. 河北北方学院药理学系药理教研室, 河北 张家口 075000

2. 河北北方学院附属第一医院心脏外科, 河北 张家口 075000

摘要: 目的 探讨大黄酚对小鼠脑 c-fos 和 c-jun mRNA 表达的影响及与学习记忆的关系。方法 昆明种小鼠, 随机分 4 组: 对照组和大黄酚低、中、高 (0.1、1.0、10.0 mg/kg) 剂量组 (每组 $n=20$), 避暗实验和 Morris 水迷宫实验观察小鼠空间学习记忆的变化; RT-PCR 检测 c-fos 和 c-jun mRNA 表达。原代培养小鼠皮层星形胶质细胞, 不同剂量大黄酚 (0.1、1.0、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理细胞 1、2、3 周; 大黄酚 (1.0、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和谷氨酸 (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 加或不加非竞争性 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA) 受体抑制剂 MK-801 (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$), RT-PCR 检测 c-fos 和 c-jun mRNA 表达。结果 中、高剂量大黄酚可提高小鼠空间学习记忆能力, 同时上调 c-fos 和 c-jun mRNA 表达; MK-801 完全抑制大黄酚及谷氨酸诱导星形胶质细胞 c-fos 和 c-jun mRNA 表达上调作用。结论 大黄酚可能通过激活谷氨酸受体上调 c-fos 和 c-jun 基因表达, 并提高小鼠空间学习记忆能力。

关键词: 大黄酚; 星形胶质细胞; 学习记忆; c-fos; c-jun

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)04-0375-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.04.006

Effects of chrysophanol on mRNA expression of c-fos and c-jun in pallium of mice and its relationship with learning and memory

XUE Zhan-xia¹, GAO Yong-shan², SHEN Li-xia¹

1. Department of Pharmacology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

2. The first affiliated hospital cardiac surgery, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: Objective To study the effects of chrysophanol (Chry) on the mRNA expression of c-fos and c-jun in brain of mice and the relationship with learning and memory. **Methods** Eighty mice were randomly divided into control group and Chry group ($n=20$, 0.1, 1.0, and 10.0 mg/kg). Passive avoidance test and Morris water maze test were used to examine the abilities of learning and memory in mice. RT-PCR was used to detect mRNA expression of c-fos and c-jun. Primary cultured mouse astrocytes were treated by different concentration of Chry (0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1, 2, 3 weeks, or cells were treated by Chry (1.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and glutamate (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) and non-NMDA antagonists MK801(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) for 2 weeks. **Results** Chry (1.0 and 10.0 mg/kg) can significantly improve the learning and memory of mice. And Chry (1.0 and 10.0 mg/kg) *in vivo* or (1.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) *in vitro* can upregulate the mRNA expression of c-fos and c-jun. However, low concentration of Chry had no effect. MK-801 completely inhibited Chry and glutamate-induced mRNA upregulation of c-fos and c-jun. **Conclusion** Chry may increase gene expression of c-fos and c-jun by activating glutamate receptor and improve spatial learning and memory in mice.

Key words: chrysophanol; astrocytes; learning and memory; c-fos; c-jun

学习记忆是人类及动物重要的高级脑活动, 研究表明, 学习记忆过程与脑内 c-fos 和 c-jun 基因表达关系非常密切。c-fos 及 c-jun 基因属于即刻早期癌基因^[1], 在脑内广泛表达, 以皮层、海马较多,

多种学习训练模型均可诱导脑内 c-fos 基因表达上调^[2-3], 如回避训练、光辨别训练等。长时程增强及药物也可影响 c-fos 基因的表达。相关研究提示 c-fos 基因表达受中枢神经系统神经递质或调质的调控。

收稿日期: 2015-05-21

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2012405016); 河北省教育厅优秀青年基金资助项目 (Y2012002); 河北北方学院创新人才项目 (CXRC1325); 河北北方学院校级重大项目 (ZD201310)

作者简介: 薛占霞 (1982—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为神经药理, Tel: 18931311063, E-mail: xuezhaxia412@163.com

*通信作者: 沈丽霞 (1970—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药生化作用机制, Tel: 13932328109, E-mail: shenlixia@cn.com

网络出版时间: 2015-07-15 13:59:24 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1409.R.20150715.1359.006.html>

谷氨酸作为中枢神经系统兴奋性神经递质可诱导 c-fos 基因表达上调。而非竞争性 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA) 受体抑制剂 MK801 可使 c-fos 基因表达明显减少, 并且研究提示 NMDA 受体激活先于 c-fos 基因的表达^[4]。

大黄酚 (Chrysophanol) 具有改善学习记忆障碍, 提高阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 小鼠学习记忆和认知功能。研究表明大黄酚产生上述药理作用与其抗氧化作用有关^[5]。但从分子和基因水平探讨大黄酚提高小鼠学习记忆功能的机制还未见报道。本研究从体内、外阐述大黄酚对小鼠大脑皮层 c-fos、c-jun 表达的影响及与学习记忆的关系。

1 材料与方法

1.1 动物

昆明种健康小鼠, 体质量 25~30 g, 由中国医学科学院实验动物中心提供, 许可证编号: SCXK 京 2004-0001。所有实验动物在动物室适应性饲养, 自由饮食、进水, 分笼饲养, 室温 (20~25 °C)。

1.2 药品与试剂

大黄酚购自中国食品药品检定研究院 (批号 110796-201017), 制备大黄酚单体溶液 [*N*, *N*-二甲基甲酰胺 (DMF)-聚山梨酯 80-生理盐水 (1:1:8)]。DMEM 培养液、BSA、dBcAMP 均购买于美国 Sigma 公司; 马血清和 Trizol 购于美国 Invitrogen 公司; TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver. 3.0 购自宝生物工程 (中国) 有限公司 (中国大连); 特异性引物序列合成于上海生工生物工程有限公司。

1.3 仪器

DWS-2 Morris 水迷宫、SBA-2 程控避暗箱 (中国医学科学院药物研究所); 紫外-可见分光光度计 (LabTech 公司)。

1.4 动物分组与给药

80 只小鼠随机分为 4 组, 每组 20 只, 分别为正常对照组; 大黄酚高、中、低剂量 (10.0、1.0、0.1 mg/kg) 组。正常对照组 ip 0.1 mL/10 kg 溶剂, 即 *N*, *N*-二甲基甲酰胺-聚山梨酯 80-生理盐水 (1:1:8); 大黄酚高、中、低剂量组 ip 给予不同剂量大黄酚。连续给药 14 d。

1.5 行为学实验

1.5.1 避暗实验 用药停止后第 2 天进行避暗实验训练 (每组取 7 只小鼠)。8:30 开始训练, 每只小鼠训练 3 min。小鼠进入暗室受电击逃往明室, 记

录 3 min 内小鼠进入暗室的次数 (错误次数), 及首次进入暗室的时间 (避暗潜伏期)。当日 14:00, 次日 8:30 和第 3 天 8:30 以同样的方法进行实验, 每次实验测试 3 次。9 次结果均值用 *t* 检验进行分析。小鼠学习记忆成绩用两个参数反映: 错误次数和避暗潜伏期。

1.5.2 Morris 水迷宫实验 用药停止后第 2 天进行水迷宫实验训练 (每组取 7 只小鼠)。实验共进行 5 d, 第 1 天小鼠自由游泳 120 s。从第 2 天开始, 每天分上、下午两段, 每段训练 4 次, 每次间隔 30 min。小鼠从不同的入水点面向池壁进入池中, 观察小鼠寻找并爬到平台的情况。每次小鼠到达平台后让其休息 30 s, 如果小鼠 120 s 内未能找到平台, 则将其放置到平台上休息 30 s。第 5 天最后 1 次训练, 记录 120 s 内小鼠寻找并爬上平台所需时间 (潜伏期), 及路线图 (游泳总路程), 未能找到平台的小鼠, 潜伏期记为 120 s。小鼠空间学习记忆成绩用两个参数表示: 平均逃避潜伏期和游泳总距离^[6]。

1.6 取样及处理

用药停止后 6 h 快速断颈处死小鼠 (每组取 6 只小鼠), 迅速取其大脑皮层组织, 放入 EP 管; 大脑用生理盐水冲洗干净, -80 °C 保存备用, 用于 c-fos 和 c-jun 表达检测。

1.7 星形胶质细胞培养

小鼠大脑皮层星形胶质细胞原代培养参考 Hertz^[7]方法。选择新生不超过 1 d 小鼠, 断头, 取出大脑置于 10% 马血清培养基 (DMEM 8.3 g/L, Glucose 1 g/L, Glutamine 0.292 g/L, Sodium Pyruvate 0.11 g/L, NaHCO₃ 3.7 g/L, Phenol Red 0.015 g/L) 中。在显微镜下剥离脑膜, 用手术刀片将大脑切碎 (<0.4 mm)。漩涡震荡分离组织 1 min。再经 100 μm 和 70 μm 尼龙网过滤组织。用含 10% 马血清培养液稀释过滤后的细胞, 再将含细胞的培养液分装到 60 mm 培养皿中。37 °C、5% CO₂、95% O₂ 培养。待每皿细胞铺满整个培养皿时 (>95%), 加入 dBcAMP (0.25 mmol/L)。

1.8 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

mRNA 提取: 将细胞用冰的 1×PBS 洗涤 2 次, 每 60 mm 培养皿中加入 200 μL Trizol 试剂。室温下孵育 5 min (完全溶解)。在混合物中加入 1/5 Trizol 提取液剂量的氯仿。剧烈震荡, 12 000×g、4 °C 离心 15 min。将上清液转移至新的离心管中, 加入 1/2 Trizol 提取液剂量的异丙醇, 混匀。在 -80 °C 孵育 1

h. 12 000×g、4℃离心 10 min。弃去上清液，用 75% 乙醇洗 2 次。干燥，加入 50 μL DEPC-H₂O 溶解。

使用紫外分光光度进行 RNA 定量：用 DEPC-H₂O 将样品稀释 80~160 倍，在 260 nm 和 280 nm 条件下测量吸光度(A)值并计算 RNA 总质量浓度。

RNA 质量浓度 (μg/mL) = A₂₆₀ × 稀释倍数 × 40/1 000

逆转录及 cDNA 扩增：根据试剂盒说明书加入各反应试剂。

RT-PCR 中所使用的 c-fos、c-jun 和 TBP 引物如下：c-fos (forward: GCTGACAGATACTCCAAGCGG, reverse: AGGAAGACGTGTAAGTAGTGCAG, 542 bp)^[8]; c-jun (forward: AGCCTACCAACGTGAGTGCT, reverse: AGAACGGTCCGTCACCTTAC, 228 bp)^[9]; TBP (forward: CCACGGACAACCTGCGTTGAT, reverse: GGCTCATAGCTACTGAACTG, 236 bp)^[10]。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 *t* 检验。多组资料用 one-way ANOVA 方法进行方差分析，LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 避暗实验

各实验组小鼠试验前后体质量变化无显著性差异。大黄酚对小鼠学习记忆功能的提高见表 1，大黄酚低、中、高剂量组 (0.1、1.0、10.0 mg/kg) 可提高小鼠学习记忆能力。中、高剂量组可使小鼠避暗潜伏期明显延长，错误次数明显减少，与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)；低剂量组可轻度提高小鼠学习记忆能力，但与对照组相比差异无统计学意义。

表 1 大黄酚对小鼠避暗潜伏期和 3 min 错误次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 1 Effects of Chry on error count in 3 min and latency of mice ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	错误次数/次	避暗潜伏期/s
对照	—	0.19±0.06	167.23±57.04
大黄酚	0.1	0.17±0.05	172.57±59.44
	1.0	0.08±0.02**	208.33±76.82**
	10.0	0.07±0.02**	221.17±78.15**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

2.2 Morris 水迷宫实验

大黄酚对小鼠空间学习记忆功能的改善见表 2，大黄酚可提高小鼠空间学习记忆能力，中、高剂量组可使小鼠平均逃避潜伏期和游泳总路径显著缩

短，与对照组相比差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)；低剂量组可轻度改善小鼠空间学习记忆能力，但与对照组相比差异无显著性。

表 2 大黄酚对小鼠平均逃避潜伏期和游泳总路径的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 2 Effects of Chry on swimming distance and average escape latency of mice ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	游泳总路径/cm	逃避潜伏期/s
对照	—	534.27±135.24	41.76±12.04
大黄酚	0.1	566.00±186.24	43.84±14.47
	1.0	765.86±354.35**	54.12±18.34**
	10.0	783.00±363.56**	57.27±19.07**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

2.3 大黄酚上调 c-fos、c-jun mRNA 表达

原代培养小鼠星形胶质细胞，不同质量浓度大黄酚 (0.1、1.0、10.0 μg/mL) 处理细胞 1、2、3 周。RT-PCR 检测 c-fos、c-jun mRNA 表达。中、高浓度大黄酚上调 c-fos、c-jun mRNA 表达，在 2 周处表达增加，并长时维持此水平 ($P < 0.05$) (图 1)。不

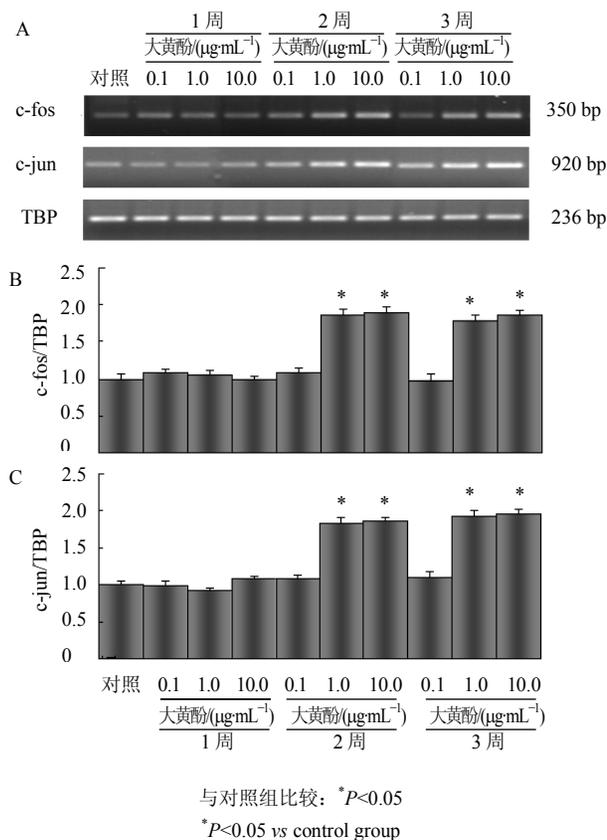
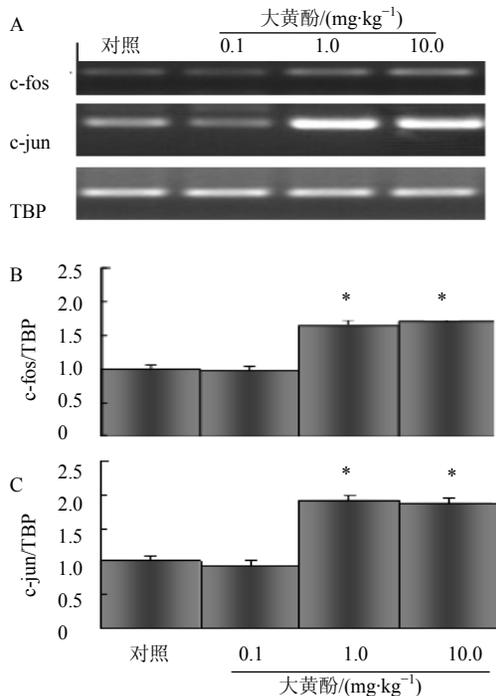


图 1 大黄酚 (0.1、1.0、10.0 μg/mL) 处理 1、2、3 周小鼠星形胶质细胞中 c-fos 和 c-jun mRNA 的表达

Fig. 1 mRNA Expression of c-fos and c-jun in primary cultured astrocytes treated with Chry (0.1, 1.0, and 10.0 μg/mL) for 1, 2, and 3 weeks

同浓度大黄酚处理细胞 1 周不引起 c-fos、c-jun mRNA 表达改变, 且低浓度大黄酚无上调作用。ip 给予不同质量浓度大黄酚 (0.1、1.0、10.0 mg/kg) 14 d, 取小鼠皮层组织, 中、高浓度大黄酚上调 c-fos、c-jun mRNA 表达, 但低浓度大黄酚无上调作用 (图 2), ip 给予大黄酚 1 周, c-fos、c-jun mRNA 表达无变化。与体内实验结果相似。



与对照组比较: *P<0.05
*P<0.05 vs control group

图 2 大黄酚 (0.1、1.0、10.0 mg/kg) 处理 14 d 小鼠脑皮层组织中 c-fos 和 c-jun mRNA 的表达

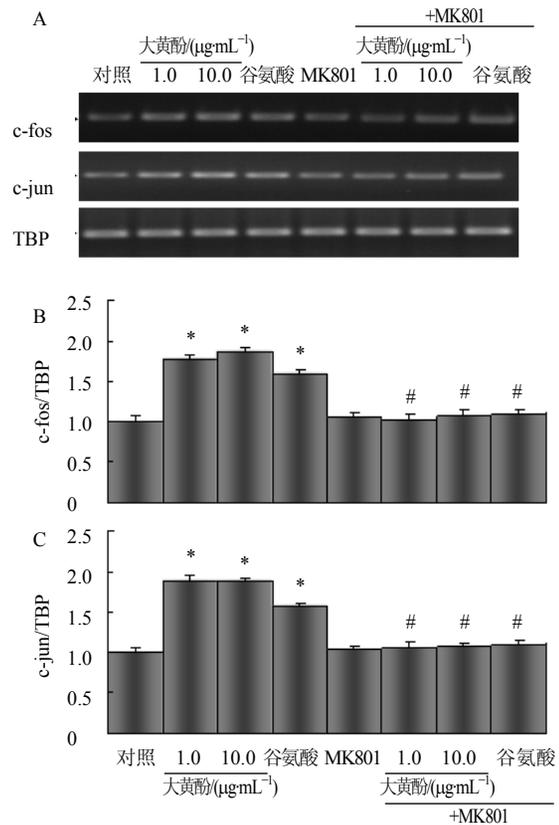
Fig. 2 mRNA Expression of c-fos and c-jun in brain tissue of mice treated with Chry (0.1, 1.0, and 10.0 mg/kg) for 14 d

2.4 非竞争性 NMDA 受体抑制剂 MK-801 抑制大黄酚诱导 c-fos、c-jun mRNA 表达上调

为了进一步研究大黄酚上调 c-fos 和 c-jun mRNA 的机制, 分别用中、高质量浓度大黄酚 (1.0、10 μg/mL)、谷氨酸 (50 μmol/L) 和 MK-801 (1 μmol/L) 处理细胞 2 周。大黄酚和谷氨酸均上调 c-fos 和 c-jun mRNA 表达, MK-801 抑制上述反应 (图 3)。

3 讨论

学习记忆是人类和动物重要的大脑高级活动, 研究表明, 学习记忆过程与脑内 c-fos 和 c-jun 基因表达密切相关。c-fos 属于 fos 蛋白家族。fos 蛋白家族是一组转录因子, 包括 c-fos、fosB、fra-1、fra-2



与对照组比较: *P<0.05; 与同组加入 MK801 前比较: #P<0.05
*P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs same group before MK801

图 3 非竞争性 NMDA 受体抑制剂 MK801 抑制大黄酚诱导 c-fos、c-jun mRNA 表达上调

Fig. 3 Inhibition of noncompetitive NMDA receptor inhibitor MK801 on upregulation of c-fos and c-jun expression induced by Chry

和 delta-fosB (为 fosB 的剪接变体)。fos 家族成员可以和 jun 家族成员形成一组蛋白激活因子 1 (activating protein-1, AP-1) 蛋白二聚体, 后者可以结合于目的基因启动子和增强子的 TPA 敏感部位^[11]。所有的 AP-1 蛋白均有一个亮锌部位以便二聚体形成和 DNA 结合。很多因素可以影响 fos 和 jun 蛋白表达, 例如不同的学习训练类型、第二信使 (蛋白激酶 A、蛋白激酶 C、钙离子等) 及某些药物 (谷氨酸、乙酰胆碱、人参皂苷等)。受调控后的 fos 和 jun 蛋白又可以进一步影响蛋白稳定性、蛋白结合活力、一些转录因子的间接激活潜力等^[3]。

谷氨酸作为中枢神经系统兴奋性递质与学习记忆有着十分密切的关系。研究表明 NMDA 受体激动剂可上调脑 c-fos 基因表达, 并且 NMDA 受体激活先于 c-fos、c-jun 等早期基因的表达。

大黄酚作为大黄有效成分之一,大量实验研究已明确其改善学习记忆的药理作用,但从分子水平探讨其改善学习记忆的机制尚未见报道。本课题采用连续 ip 大黄酚 14 d,模型小鼠学习记忆能力及空间探索能力均出现不同程度的提高,同时 c-fos 和 c-jun mRNA 表达上调。体内实验结果显示大黄酚于 2 周处诱导 c-fos 和 c-jun mRNA 表达上调,且长时维持此水平。低浓度谷氨酸同样可以上调 c-fos 和 c-jun mRNA 表达,而非竞争性 NMDA 受体抑制剂 MK801 可抑制上述作用,提示大黄酚可能通过激活谷氨酸受体来诱导 c-fos 和 c-jun 基因表达。但大黄酚提高小鼠学习记忆能力是否还具有其他方面的机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Morgan J I, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1991, 14: 421-451.
- [2] Ohiwa N, Saito T, Chang H, et al. Differential responsiveness of c-Fos expression in the rat medulla oblongata to different treadmill running speeds [J]. *Neurosci Res*, 2006, 54(2): 124-132.
- [3] 张玉秋,梅俊.学习记忆对脑内 c-fos 基因表达的影响 [J]. *生命科学*, 2000, 12(5): 228-231.
- [4] Chandramohan Y, Droste S K, Reul J M. Novelty stress induces phospho-acetylation of histone H3 in rat dentate gyrus granule neurons through coincident signalling via the N-methyl-D-aspartate receptor and the glucocorticoid receptor: relevance for c-fos induction [J]. *J Neurochem*, 2007, 101(3): 815-828.
- [5] 李淑娟,李春更,侯勇,等.大黄酚抗衰老作用研究进展[J]. *河北北方学院学报*, 2009, 26(1): 69-70.
- [6] 潘陈为,潘珍珍,金玲湘,等.血氨升高对大鼠空间学习记忆能力的影响 [J]. *温州医学院学报*, 2009, 39(5): 462-463.
- [7] Hertz L, Peng L, Lai J C. Functional studies in cultured astrocytes [J]. *Methods*, 1998; 16(3): 293-310.
- [8] Elkeles A, Juven-Gershon T, Israeli D, et al. The c-fos proto-oncogene is a target for transactivation by the p53 tumor suppressor [J]. *Mol Cell Biol*, 1999; 19(4): 2594-2600.
- [9] Asim M, Chaturvedi R, Hoge S, et al. Helicobacter pylori induces ERK-dependent formation of a phospho-c-fos • c-jun activator protein-1 complex that causes apoptosis in macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(26): 20343-20357.
- [10] El Marjou M, Montalescot V, Buzyn A, et al. Modifications in phospholipase D activity and isoform expression occur upon maturation and differentiation *in vivo* and *in vitro* in human myeloid cells [J]. *Leukemia*, 2000, 14(12): 2118-2127.
- [11] 孙开宏. c-fos 基因在学习记忆及运动中表达的研究进展 [J]. *中国康复理论与实践*, 2008, 14(6): 542-544.