

5-HTR2C 重组质粒电转染至大鼠海马神经元 对细胞活性的影响^{*}

王杰琼^{1,2}, 高冬梅^{2,3}, 于艳红^{2,3}, 张媛媛^{1,2}, 张惠云^{1,2**}

(1. 山东中医药大学药学院 济南 250355; 2. 山东中医药大学中医药经典理论教育部重点实验室 济南 250355; 3. 山东中医药大学中医基础理论研究所 济南 250355)

摘要:目的:5-羟色胺 2C 受体在抑郁症的发病及治疗机制中发挥重要的作用,模拟 5-HTR2C 表达的异常升高,建立 5-HTR2C 高表达的细胞模型,为抑郁症治疗药物的开发提供平台。方法:采用课题组前期已构建 5-HTR2C 真核表达载体;按试剂盒方法提取 5-HTR2C 重组质粒;并取新生 24 h 内 Wistar 乳鼠海马,制备海马神经元,按试剂盒方法对质粒进行电转染,并于荧光显微镜下观察转染效果;将所培养细胞分为:非转染细胞(NTC)和转染细胞(TC),转染细胞分为:转染组(TC+5-HTR2C 质粒)、空质粒组(TC+空质粒)、激动剂组(TC+激动剂);为确定激动剂组细胞提取蛋白的时间,分别于加入激动剂后 0、5、10、20、40、60 min 提取蛋白,Western-blot 检测;待各组细胞处理后,采用 Western-blot 检测 5-HTR2C 以及 MEK/P-MEK 的表达,以验证 5-HTR2C 重组质粒转染后是否仍有活性。结果:海马神经元电转染后 48 h 后,神经元数量较多,电转染率及生存率最高;体外培养的海马神经元中加入激动剂 mCPP 后 5 min 至 60 min,MEK 磷酸化水平逐渐升高,在 20 min 时 MEK 磷酸化水平已较高;与 NTC 相比,TC+5-HTR2C 质粒和 TC+激动剂组中 P-MEK 的蛋白水平明显升高。结论:5-HTR2C 重组质粒导入海马神经元后 48 h 细胞生长良好,死亡率低,细胞饱满,电转染率较高,可于此时收集细胞。激动剂组可在 mCPP 与细胞共培养后 20-60 min 间收集细胞。通过比较 TC+5-HTR2C 质粒组及 TC+激动剂组,发现加入激动剂的细胞中 MEK 磷酸化水平较前者要强。因此,5-HTR2C 重组质粒转染至海马神经元中后仍具有生理活性,说明 5-HTR2C 重组质粒的转染比较成功。

关键词: 5-HTR2C 重组质粒 电转染 大鼠海马神经元 抑郁症

doi:10.11842/wst.2015.04.008 中图分类号:R285.5 文献标示码:A

抑郁症是心境障碍或情感性障碍的主要类型,从 1990 年到 2010 年,抑郁症疾病负担增加了 37.5%^[1]。据报道,5-羟色胺系统与抑郁症关系密切,阐明 5-羟色胺相关受体在抑郁症中的作用,有助于抗抑郁药物的开发与应用,提高抑郁症的治疗效果。在 5-羟色胺的受体中,5-羟色胺

2C 受体(5-hydroxytryptamine Type 2C Receptor, 5-HTR2C)在抑郁症的发病及治疗机制中发挥重要的作用。5-HTR2C 在脑内脉络丛高表达,见于前额皮层、海马、中脑腹侧、纹状体、伏隔核、杏仁核和下丘脑等脑区。大量研究已揭示该受体参与抑郁症的发病及治疗机制^[2]。该受体在抑郁症中的作用也是新近研究热点。

本课题组在前期的研究中发现抑郁症模型大

收稿日期 2015-01-09

修回日期 2015-03-09

* 科学技术部国家 973 计划项目(2011CB505102):从肝论治抑郁症(轻、中度)、经前期综合征(重度,PMDD)探讨肝主疏泄调畅情志的作用机制,负责人 张惠云。

** 通讯作者 张惠云,教授,博士生导师,主要研究方向:调肝方药中药药理及中医情志病证动物模型研究。

鼠海马中 5-HTR2C 表达异常升高。海马在学习、记忆、情绪反应及神经系统疾病的病理生理变化等方面有重要作用,富含各种神经递质及受体,情绪疾病的发病机理复杂,与心理、神经内分泌失调,单胺类神经递质失衡等因素有关^[3]。本研究构建 5-HTR2C 重组质粒,将该质粒电转染入体外培养的海马神经元中,模拟 5-HTR2C 表达的异常升高,建立 5-HTR2C 高表达的细胞模型,对于与 5-HTR2C 表达异常升高相关的精神类疾病的新药筛选具有重要意义,这将为相关药物研究提供坚实的平台。

1 材料

1.1 实验动物

24 h 内 wistar 新生鼠,由山东中医药大学动物中心提供,许可证号:SCXK(鲁)20050015。

1.2 实验材料

1.2.1 细胞培养试剂

Neurobasal (Gibco 公司,批号:12348017,500 mL); DMEM/F12 1:1 (Hyclone 公司,批号:SH30023.01B, 500 mL); B27 (Gibco 公司,批号:0050129SA, 10 mL); Fetal Bovine Serum (Sigma-JRH 公司,批号:12003C, 100 mL); L-Glutamine (Gibco 公司,批号:25030-081, 200 mmol·L⁻¹, 100 mL); Poly-D-lysine (Sigma 公司,批号:P6407, sterile lyophilized 135 kD, 5 mg)。

1.2.2 电转染试剂

Amata[®] Rat Neuron Nucleofector[®] Kit 电转染试剂盒(德国 Amata 公司,批号:VPG-1003)。

1.3 实验设备

Stratos 冷冻高速离心机(美国 Thomas 公司), HERA cell CO₂ 培养箱(美国 Thomas 公司, 150i/240i), NucleofectorTM 细胞核转染仪(德国 Amata 公司)。

2 实验方法

2.1 大鼠 5-HTR2C 全长基因的克隆及真核表达载体的构建

前期我们通过提取大鼠海马中 mRNA,采用 RT-PCR 对基因 5-HTR2C 进行克隆,测序后应用基因重组技术构建真核表达载体。经限制性酶切鉴定和测序分析证实,成功地完成 5-HTR2C 全长基因的克隆和真核表达载体的构建。具体方法及操作参见本课题组高鹏博士毕业论文^[4]。

2.2 提取 5-HTR2C 重组质粒并进行电转染

按质粒回收提取试剂盒说明书方法提取 5-HTR2C 重组质粒,并按 maxa[®] Rat Neuron Nucleofector[®] Kit 电转染试剂盒说明书方法进行电转染,方法如下:

取新生 24 h 内 Wistar 乳鼠,断头,分离海马,置入 D-hank's 液中漂洗 1-2 次。将海马组织机械剪碎成大小 1 mm³ 碎片,加入 0.25% 胰酶,37℃ 消化 10-20 min (放入水浴锅内),添加 1-2 mL 培养基 I (接种培养基:DMEM/F12:Fetal Bovine Serum=90:10),轻轻吹打直到看不到大的组织块;用 200 目滤网过滤混悬液;将 3 μg 质粒与 100 μL 细胞悬液合并;传送进入经过检验的电转杯中;选择合适的 Nucleofector[®] 程序 G-013 电转染,并缓慢转移样本到预平衡的培养基 I (约 8 mL),将细胞混悬液分装于预备好的 6 孔板中(2 mL/孔);电转后,细胞孵育在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中;4 h 后用新鲜培养基 II (Neurobasal:FBS:B27:L-Glutamine=95:5:2:1) 全量替换培养基 I,以便移除细胞碎片;24 h 后用新鲜培养基 II 半量替换;培养 48 h 后可以提取细胞蛋白进行相关基因表达检测。

2.3 验证 5-HTR2C 重组质粒转染后的活性

采用电转染的方法,将 5-HTR2C 重组质粒转染至原代培养神经元中是否具有活性,需进行验证,可通过 2 个步骤进行验证:一是检测转染前后 5-HTR2C 是否有表达;二是比较转染前后其下游通路中某个蛋白是否有表达,本实验选择 MEK/P-MEK 的表达为检测对象。方法如下:

将所培养细胞分为:非转染细胞(Non-transfected Cells, NTC)和转染细胞(Transfected Cells, TC)。转染后细胞分为:转染组(TC+5-HTR2C 质粒)、空质粒组(TC+空质粒)、激动剂组(TC+激动剂)。将各组细胞处理后,检测 5-HTR2C 的表达以及 MEK/P-MEK 的表达,以验证 5-HTR2C 重组质粒转染后是否仍有活性。

2.3.1 蛋白提取及 Western-blot 检测方法

将培养液倒掉,用预冷的 D-Hank's 液清洗 2 遍;按 1 mL 裂解液加入 10 μL PMSF,摇匀置于冰上;每个六孔板加入 180 μL 含 PMSF 的裂解液,于冰上裂解 30 min;之后,将细胞碎片和裂解液转移至离心管中,于 4℃ 下 1.5 mL 离心管 12 000 rpm 离心 5 min;取上清液移至 1.5 mL EPP 管中,分出 3 μL 上清液按

BCA 法检测蛋白浓度,其余按上清液:5×loading buffer=4:1 的比例加入 5×loading buffer,混匀后,100℃金属浴 10 min,之后置于冰上冷却。

取 30 μg 蛋白经 12 % SDS-PAGE 胶分离,4%SDS-PAGE 胶浓缩后,转移到 NC 膜,5 % TBST 脱脂牛奶封闭液中,室温孵育 1 h;加入一抗(各一抗与 5 % 脱脂奶粉的 TBST 溶液的比例分别为:5-HTR2C,1:1 000;MEK,1:800;P-MEK,1:800; β -actin,1:2 000)4℃过夜,TBS-Tween 洗膜后加 HRP 标记的二抗(各二抗与 5 % 脱脂奶粉的 TBST 溶液的比例分别为:5-HTR2C,1:1 500;MEK,1:1 000;P-MEK,1:1 000; β -actin,1:2 000)室温孵育 2 h;加入 ECL 发光液,经 ECL 检测系统检测。用 Gel-Pro analyzer 软件进行图像分析,目的条带的光密度与相应的 β -actin 条带的光密度比值,即目的蛋白的相对含量。

2.3.2 蛋白提取时间的确定

细胞培养至对数生长期后,加入激动剂 mCPP (10 mmol·L⁻¹),培养 3 个六孔板,每 2 个孔做 1 个时间点,分别为加入激动剂后 0、5、10、20、40、60 min,提取蛋白,Western-blot 检测 5-HTR2C 下游信号 MEK 及 P-MEK 的蛋白水平,确定加入激动剂后收集细胞的时间。

2.3.3 5-HTR2C 以及 MEK/P-MEK 蛋白检测

各组细胞处理后用 Western-blot 检测 5-HTR2C、MEK 及 P-MEK 的表达,以验证 5-HTR2C 重组质粒转染后是否仍有活性。

2.4 统计方法

用 GraphPad Prism 5 统计软件进行 *t* 检验,结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 5-HTR2C 质粒的转染

图 1 显示海马神经元电转染后 48 h 后,神经元数量较多,电转染率及生存率最高,72 h 后细胞大量死亡,且电转染率也急剧下降,仍然具备完整结构,分布均匀。

3.2 5-HTR2C 重组质粒转染后的活性

3.2.1 激动剂加入后提取蛋白的时间确定

细胞处理前,加入激动剂 mCPP (10 mmol·L⁻¹),在加入激动剂后 0、5、10、20、40、60 min 后提取蛋

白,Western-blot 检测 MEK 及 P-MEK 的蛋白水平,结果显示,体外培养的海马神经元中加入激动剂 mCPP 后,在 60 min 内 P-MEK 的表达逐渐升高,20–60 min P-MEK 的表达较好。

3.2.2 电转染后细胞活性检测

根据“3.2.1”的结果,转染后 5-HTR2C 重组质粒 + 激动剂组的细胞选择于加入 mCPP 后 ≥ 20 min 收集细胞提取蛋白,结果如下:

3.2.2.1 电转染 5-HTR2C 质粒后,5-HTR2C 的蛋白表达

结果显示,与正常组相比,5-HTR2C 转染组和 5-HTR2C 转染 + mCPP 组中 5-HTR2C 的表达明显

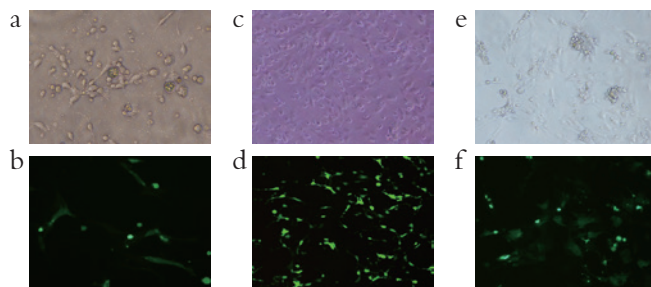


图 1 荧光显微镜明光 (200×) 下电转染后海马神经元形态
注 a、c、e 图分别为原代海马神经元电转后 24、48、72 h 荧光显微镜明光下拍摄 b、d、f 图分别为原代海马神经元电转后 24、48、72 h 荧光显微镜荧光下拍摄。

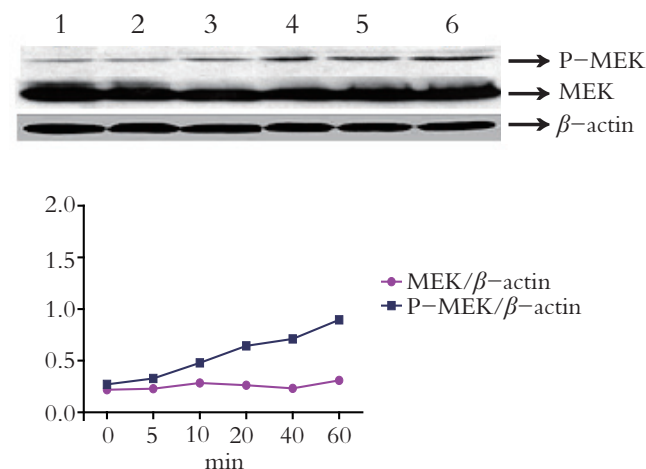


图 2 海马神经元中加入 5-HTR2C 激动剂 mCPP 后,MEK 和 P-MEK 蛋白表达

注:泳道 1–6 依次为加入激动剂后 0、5、10、20、40、60 min 提取样本的蛋白表达。

升高。

3.2.2.2 电转染 5-HTR2C 质粒后, MEK 的蛋白表达及其磷酸化水平

结果显示,与正常组相比,5-HTR2C 转染组和 5-HTR2C 转染 + 激动剂组中 P-MEK 的蛋白水平明显升高。

4 讨论

4.1 大鼠海马神经元质粒转染

本文采用将 5-HTR2C 重组质粒导入原代海马神经元的方法建立高表达神经元模型,那么,建立 5-HTR2C 重组质粒,并将该质粒导入神经元中是建立该模型的关键技术。

DNA 导入哺乳动物中枢神经系统神经元的方法很多,包括磷酸钙沉淀法、质脂体载体法、显微注射法、电穿孔法以及生物弹道法等。在原代培养神经元的基础上将 DNA 稳定的导入哺乳动物中枢神经系统并使其稳定表达是现在神经系统研究中面临的重要问题^[5]。神经元是有丝分裂后的成熟细胞,所以一旦被转染的神经元能够存活并表达转染

基因,这些神经元将在其存活的全程都能表达此基因^[6]。在常用的转染方法中显微注射法、电穿孔法以及生物弹道法受实验条件及操作者熟练程度的限制,病毒载体的转染效率虽然高达 90% 左右^[7],但是病毒转染可能干扰蛋白质的表达,具有潜在的毒性和危险性,并且造价昂贵、费时等缺点,限制了这些方法的广泛应用。电转仪电转法和脂质体载体

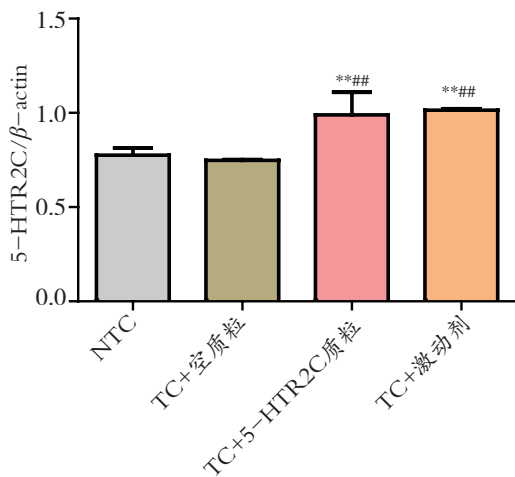
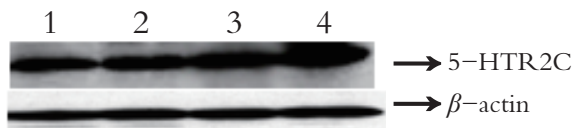


图3 大鼠体外海马神经元电转染 5-HTR2C 质粒后, 各组 5-HTR2C 蛋白表达

注:泳道 1-4 依次为 NTC、TC+ 空质粒、TC+5-HTR2C 质粒和 TC+ 激动剂组的蛋白样本;与正常组蛋白表达相比, ** $P<0.01$;与空质粒组蛋白表达相比, ### $P<0.01$ 。

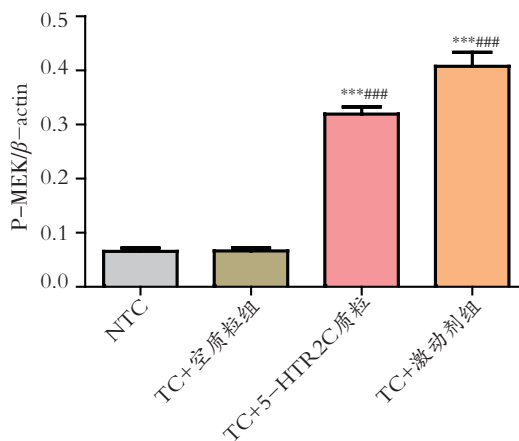
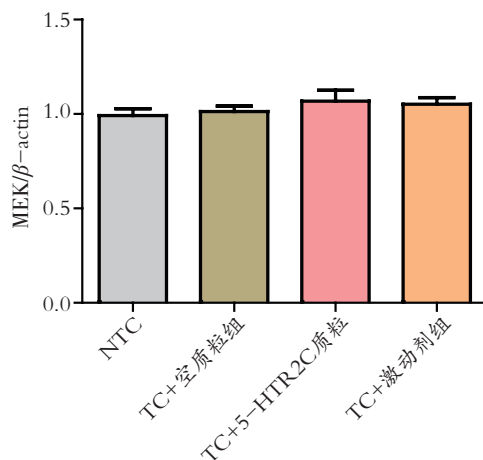
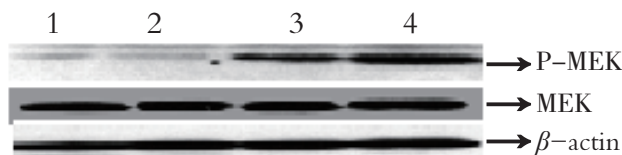


图4 大鼠体外海马神经元电转染 5-HTR2C 质粒后, 各组 MEK 及 P-MEK 的表达

注:泳道 1-4 依次为 NTC、TC+ 空质粒、TC+5-HTR2C 质粒和 TC+ 激动剂组的蛋白样本;与正常组蛋白表达相比, *** $P<0.001$;与空质粒组蛋白表达相比, ### $P<0.001$ 。

法具有操作简便、廉价、省时等优点,目前已被大部分实验室采用。

基于神经元是有丝分裂后的细胞,较难进行有效转染,且具有较低转染效率、细胞毒性等缺点。本研究利用一种由 Amasa 公司发明的电穿孔转染法。此法的独特之处在于作用机制为一种物理过程,适合一些化学转染方法效果很不理想的非吞噬细胞和非增殖细胞的基因转染^[8,9]:如外周血细胞、神经细胞和干细胞。同时,这种新方法不存在生物污染和免疫反应的危险。本实验的结果显示,5-HTR2C 重组质粒导入海马神经元后 48 h 细胞生长良好,死亡率低,细胞饱满,电转染率较高;72 h 后细胞大量死亡。之前,苗宏生等^[10]通过与脂质体转染对比,发现 Nucleofector TM 技术能够得大于 38.9% 的转染效率,高于前者 20 倍以上。因此,本研究的结果与同类研究结果基本一致。

4.2 5-HTR2C 质粒转染后的活性

5-HTR2C 属于 Gq 蛋白偶联受体,激活后可经 PLC 介导激活 PKC 通路。有学者研究发现 PKC α / β II 可以被酪氨酸激酶 Src 家族磷酸化,激活 Ras/ERK 相关信号通路^[11]。Ras 能够通过相应的效应域激活 Raf/MEK/ERK 通路活化的 ERK 在核内聚集后,可以使相应的转录因子磷酸化,表达某些产物^[12]。因此本研究选择 5-HTR2C 与抑郁症相关信号通路中 MEK 为检测指标,验证 5-HTR2C 电转染后是否仍具有生理活性。

通过检测该基因的磷酸化水平来确定质粒转染后的活性。如果在检测过程中仅发现转染后细胞中 MEK 磷酸化水平升高,并不能完全说明电转后该基

因仍有活性,因为电转染过程中的强大脉冲也有可能对基因带来刺激,因此本研究 5-HTR2C 激动剂来干预转染后细胞,以进一步观察 MEK 磷酸化水平。

mCPP 是一种非选择性 5-HTR2C 部分激动剂,最近利用克隆的人 5-HT 受体所做的研究发现,mCPP 对 5-HTR2C 的选择性只是 5-HT_{2A} 受体的 3 倍,而对 5-HT_{2B} 受体的选择性和 5-HTR2C 受体几乎相等。但 mCPP 对 5-HTR2C 的相对效应却比其它两种高得多。但是,现代对于选择性 5-HTR2C 激动剂的研究尚处于起步阶段,尚无成熟的药物。目前惠氏公司等对于 5-HTR2C 激动剂的研究以 mCPP 为模板,Harder 等在新药研发中也采用 5-HTR2C 激动剂 mCPP 为模板^[13]。因此,本研究选择 mCPP 为激动剂。

激动剂加入细胞共培养后在短时间内即能激活 5-HTR2C 及其信号通路,本研究通过对其激动时程的研究发现,从激动剂与细胞共培养后 5-60 min,MEK 磷酸化水平逐渐升高,在 20 min 时 MEK 磷酸化的水平已较高,因此,本研究选择 mCPP 与细胞共培养后 20-60 min 间收集细胞。在后续实验中,通过比较 5-HTR2C 转染后细胞及 5-HTR2C 转染后加入 mCPP 的细胞,发现加入激动剂的细胞中 MEK 磷酸化水平较前者要强。

因此,5-HTR2C 重组质粒转染如海马神经元中后仍具有生理活性,说明 5-HTR2C 重组质粒的转染比较成功,这为下一步研究提供了必要的支撑,可以认为 5-HTR2C 高表达细胞模型已初步建立,并为相关药物研究提供技术平台。

参考文献

- Whiteford H A, Degenhardt L, Rehm J, *et al.* Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2013, 382(9904):1575-1586.
- 付红勇,王星华,殷盛明.抑郁症分子机制中 5-羟色胺 2C 受体的作用. *生理科学进展*, 2014, 45(3):221-224.
- 曾可斌,胡长林,陈阳美.大鼠海马神经元培养与鉴定. *基础医学与临床*, 2004, 24(5):574-577.
- 高鹏. 5-HTR2C 在怒诱发的 PMS 肝气逆证模型大鼠脑区的分布、表达及调肝方药对其的影响. 山东中医药大学博士学位论文, 2011.
- Hurst R S. A novel positive allosteric modulator of the α 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci*, 2005, 25(17):4396-4405.
- Zhang W, Hu Y, Newman E A, *et al.* Serum-free culture of rat postnatal neurons derived from the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Neurosci Methods*, 2006, 150(1):1-7.
- Gage F H, Coates P W, Palmer T D. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(25):11879-11883.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, *et al.* Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*, 1982, 1(7):841-845.

- 9 Watanabe M, Shirayoshi Y, Koshimizu U, *et al.* Gene transfection of mouse primordial germ cells in vitro and analysis of their survival and growth control. *Exp Cell Res*, 1997, 230(1):76–83.
- 10 苗宏生,余路阳,林波,等.原代大鼠海马神经元的高效转染.细胞生物学杂志,2004,26(3):305–308.
- 11 许绍芬.神经生物学(第二版).上海:上海医科大学出版社,1999:185–200.
- 12 Hetman M, Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem*, 2004, 271(11):2050–2055.
- 13 Harder J A, Ridley R M. The 5-HT_{1A} antagonist WAY 100 635, alleviates cognitive impairments induced by dizocilpine (MK-801) in monkeys. *Neuropharmacology*, 2000, 39(4):547–552.

Influence on Cell Activity of 5-HTR2C Recombinant Plasmid Transfection Electricity on Rat Hippocampal Neurons

Wang Jieqiong^{1,2}, Gao Dongmei^{2,3}, Yu Yanhong^{2,3}, Zhang Yuanyuan^{1,2}, Zhang Huiyun^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Classical Theory, Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

3. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: The 5-HTR2C played an important role in the pathogenesis and treatment mechanism of depression. The cell model of 5-HTR2C high expression was established for the simulation of abnormally elevated 5-HTR2C expression. The model provided platform for development of medication treatment for depression. The 5-HTR2C recombinant plasmid was extracted according to the kit method from 5-HTR2C eukaryotic expression vector that was built in the early stage by the team. And hippocampus of a new Wistar suckling rat was taken within 24 h, in order to prepare hippocampal neurons. Transfection plasmids were made according to the kit method. The transfection effect was observed under the fluorescent microscope. The cultured cells can be divided into the no-transfected cells (NTC) and transfected cells (TC). And TC were divided into the transfection group (TC+5-HTR2C plasmid), the empty plasmid group (TC+empty plasmid), and the agonist group (TC+agonist). In order to detect the time for protein extraction after joining agonist, the protein was extracted at 0, 5, 10, 20, 40 and 60 min by Western blot for determination of cell extraction time in agonist group. Western blot test was used in the detection of 5-HTR2C and MEK/P-MEK expression in groups of cells for the verification of hippocampal neurons activity after 5-HTR2C recombinant plasmid transfection. The results showed that the number of hippocampal neurons was more, and the electric transfection rate and survival rate were highest after 48 h electricity transfection. The MEK phosphorylation level was gradually increased among *in vitro* cultured hippocampal neurons from 5 min to 60 min after adding agonist mCPP. MEK phosphorylation level was higher at 20 min. In addition, compared with the NTC group, P-MEK phosphorylation level was increased significantly in the TC+5-HTR2C plasmid and TC+agonist group. It was concluded that the cell growth was good in 48 h after 5-HTR2C recombinant plasmid into hippocampus neurons, with low cell mortality rate, full cell, and high electric transfection rate, which can be used in the collection of cells in this time. In the agonist group, cells can be collect from 20 to 60 min after the co-culture of mCPP and neurons. The comparison between the TC+5-HTR2C plasmid group and the TC+agonist group showed that MEK phosphorylation level was higher than the former in the TC+agonist group. Therefore, hippocampal neurons still had physiological activity after 5-HTR2C recombinant plasmid transfection. It showed that 5-HTR2C recombinant plasmid transfection was relatively successfully.

Keywords: 5-HTR2C recombinant plasmid, electric transfection, rat hippocampal neurons, depression

(责任编辑:曹新伟 张志华, 责任译审:王 晶)