

钩藤碱对甲基苯丙胺依赖小鼠位置偏爱 和海马谷氨酸受体1表达的影响

李俊葵, 刘伟, 彭菊, 江明金, 刘怡, 郭友立, 莫志贤*

(南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的: 观察钩藤碱对甲基苯丙胺依赖小鼠位置偏爱和海马谷氨酸受体1(GluR1)蛋白表达的影响。方法: 随机将50只小鼠分为5组: 空白对照组, 甲基苯丙胺模型组($4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 氯胺酮($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 钩藤碱低剂量($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 钩藤碱高剂量($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 每组每天给予相应的药物, 连续4 d, 建立小鼠位置偏爱模型; 免疫组化法和Western blot法检测GluR1蛋白的表达。结果: 与正常对照组比较, 模型组小鼠在伴药箱中逗留的时间明显增多($P < 0.01$), 成功复制甲基苯丙胺依赖的小鼠位置偏爱模型, 与模型组比较, 氯胺酮组、钩藤碱低、高剂量组均可以明显减少小鼠在白箱逗留的时间($P < 0.01$)。免疫组化结果显示, 甲基苯丙胺模型组与正常对照组相比蛋白GluR1表达明显增强($P < 0.01$), 而与模型组比较, 氯胺酮组、钩藤碱低剂量和高剂量组蛋白GluR1表达减少($P < 0.01$); Western blot结果显示, 与正常对照组比较, 模型组GluR1蛋白表达量明显上调($P < 0.01$), 与模型组比较, 氯胺酮组、钩藤碱低剂量和高剂量组GluR1蛋白表达下调($P < 0.01$)。结论: GluR1蛋白在甲基苯丙胺依赖小鼠位置偏爱形成中发挥着重要作用。

[关键词] 钩藤碱; 甲基苯丙胺; 位置偏爱; 谷氨酸受体1; 海马

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0128-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180128

Effect of Rhynchophylline on Expression of Glutamate Receptor 1 in Methamphetamine-dependent Mice on Conditioned Place Preference

LI Jun-kui, LIU Wei, PENG Ju, JIANG Ming-jin, LIU Yi, GUO You-li, MO Zhi-xian*

(School of Chinese Medicine, South Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of rhynchophylline (Rhy) on glutamate receptor 1 (GluR1) subunit in hippocampus of methamphetamine-induced conditioned place preference (CPP) mice. **Method:** Mice were randomly divided into five groups randomly with 10 mice in each group: normal control group, methamphetamine model group, methamphetamine with Rhy ($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), methamphetamine with Rhy ($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), methamphetamine with ketamine ($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Each respective drug was administered daily for 4 days. Established place preference mice models were induced by methamphetamine, to observe the expression of GluR1 was observed by immunohistochemistry technique and Western blot. **Result:** Compared with normal control group, the time of mice with methamphetamine model group in non-preferred compartment increased significantly ($P < 0.01$), indicating that methamphetamine place preference model was successfully established. Compared with methamphetamine model group, ketamine ($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Rhy ($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Rhy ($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) reduced the time spent on white compartment of CPP mice significantly ($P < 0.01$). Immunohistochemistry showed that the expression of GluR1 in hippocampus was increased in the methamphetamine model group ($P < 0.01$),

[收稿日期] 20140416(030)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173581, 81229003)

[第一作者] 李俊葵, 硕士, 从事中药药理研究, Tel: 15521285729, E-mail: 645497701@qq.com

[通讯作者] *莫志贤, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事中药药理研究工作, Tel: 020-61648261, E-mail: cherrymo@fimmu.com

while in the ketamine group, low and high doseage Rhy were decreasing ($P < 0.01$); Western blot showed that the express of GluR1 protein was significantly increased in the model group ($P < 0.01$), while in the ketamine group, low and high doseage Rhy group were significantly decreasing ($P < 0.01$). **Conclusion:** GluR1 protein plays an important role in the formation of methamphetamine-induced place preference in mice.

[**Key words**] rhynchophylline; methamphetamine; conditioned place preference; glutamate receptor 1; hippocampal

钩藤作为传统中药之一,具有清热平肝、活血通经,熄风定惊的功效,主要用于治疗风热头痛、小儿惊厥、头晕目眩、高血压等。钩藤的有效成分主要是钩藤碱,并且现代药理实验表明其具有降血压、镇静的作用^[1-2]。有研究表明,钩藤碱能消除苯丙胺依赖位置偏爱,并且钩藤碱本身不能引起药物依赖^[3-4]。 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPA)受体(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR)在中枢神经系统(central nervous system, CNS)具有重要作用,介导大多数快速兴奋性突触传递,谷氨酸受体1(GluR1)是AMPA受体最重要的亚单位^[5]。

本课题研究旨在探讨钩藤碱对甲基苯丙胺依赖小鼠海马区中GluR1表达和对甲基苯丙胺依赖小鼠的位置依赖的影响。并且实验得出小鼠活动轨迹路线图,使用免疫组化和Western blot方法检测小鼠海马区蛋白表达,主要为探讨钩藤碱戒毒机制和对钩藤碱的进一步研究提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级昆明种小鼠,雌雄各半,体重18~22 g,由南方医科大学动物中心提供,许可证号SCXK(粤)2011-0015。

1.2 药品及试剂 钩藤碱(日本, Matsuura Kagaku 公司,批号 H112),用蒸馏水溶解后配制所需浓度。盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 KH20013)。甲基苯丙胺(国家麻醉品实验室提供,批号 1212-9802),用生理盐水溶解后配制所需浓度。所有药物配制后放置4℃冰箱保存。

Anti-GluR1(美国 Millipore 公司,批号 MAB397),PVDF膜(美国 Millipore 公司,批号 162-0177),Tris-缓冲液(批号 75825),Dual Mark(Bio-Rad,美国,批号 161-0374),ECL(GE Healthcare 公司)。Protein Assay Reagent A(Bio-Rad,美国,批号 500-0113)。Protein Assay Reagent B(BIO-RAD,美国,批号 500-0114),APS(Sigma,批号 A3678)。Extraction Reagent(Novagen,批号 71009-3)。Protein inhibitor(Calbiochem,批号 539134)。DAB显色试剂

盒(Zhongshan Biotechnology Co. Ltd)。

1.3 仪器 Leica RM-2135 组织病理切片机(德国 Leica 公司),BX51-P 偏光显微镜、DP70 显微数码相机(日本 Olympus 公司),电泳仪(美国 Bio-Rad)。

小鼠条件性位置偏爱箱的制作^[10],箱体由2个体积为15 cm × 15 cm × 15 cm 箱体组成,箱体中间有一块15 cm 高的抽动隔板,将隔板抽起后,小鼠可在2个箱体之间自由活动。箱体的一侧除玻璃板外内侧均漆成黑色,底面制成粗糙面,另一侧箱体除玻璃面外漆成白色,底板制成光滑面,整个实验箱具有视觉和触觉两种线索。

2 方法

2.1 甲基苯丙胺依赖小鼠模型的建立、分组和给药

在进行实验前对每只小鼠进行位置偏爱检测,剔除对箱体某一侧有明显偏爱的小鼠。测定前将箱体中间隔板取出,当小鼠处于两个箱体之间时开始计时,逐只观察15 min,以小鼠头部为准,记录小鼠在白箱中的停留时间。观察过程在隔音条件下进行。检测结果显示几乎所有小鼠偏爱黑箱。因此,将白箱作为伴药箱。

取符合实验条件的50只小鼠,按随机原则分为5个组:即①空白对照组,②甲基苯丙胺模型组,③氯胺酮($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,④钩藤碱低剂量($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,⑤钩藤碱高剂量($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,每组10只小鼠。②~⑤组每天上午(8:00)sc 甲基苯丙胺($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续4 d;③组从第2天起在注射甲基苯丙胺之前15 min,ip 氯胺酮($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续3 d;①组注射同体积生理盐水,其他处理同②组;④和⑤组每天上午(7:30,即注射甲基苯丙胺前30 min)ig 相应剂量的钩藤碱,连续3 d。各组下午(16:00,间隔8 h)均给予生理盐水(0.15 mL , sc)1次。

将箱体中间的隔板置于中间,第1天上午sc 生理盐水或甲基苯丙胺后立即将小鼠置于白箱,下午sc 生理盐水后立即将小鼠置于黑箱,均放置1 h,连续4 d。24 h后(第5天)进行位置偏爱检测,记录小鼠5 min内在白箱中停留的时间。

2.2 免疫组化法检测小鼠海马区 GluR1 的表达 位置偏爱检测完毕后,颈椎脱臼处死小鼠,迅速剥离脑膜,沿脑矢状面正中中线剪开,取出脑组织后,放入 4% 多聚甲醛中固定,过夜,脑组织进行常规脱水、包埋。在显微镜下分别选定含海马部位的切片,用载玻片捞取切片。

烤片 90 min 后,进行 GluR1 SP 法免疫组化染色,石蜡切片脱蜡至水;每张切片滴加 3% 的 H_2O_2 ,室温放置 10 min;将组织切片浸入组织抗原修复液(枸橼酸钠液 pH 6.0)中,置入微波内进行抗原热修复(温度 98 $^{\circ}C$) 2 min。胃蛋白酶 37 $^{\circ}C$ 30 min 抗原修复;自然冷却至室温,PBS 洗 3 次,每次 3 min,滴加山羊血清,室温作用 20 min;倾去血清,滴加 GluR1 一抗(1:100,abcam,USA),4 $^{\circ}C$ 过夜后,37 $^{\circ}C$ 孵育 2 h,滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(1:100)至切片上,置湿盒中常温孵育 60 min 取出,TBS 浸洗 5 min;PBS 洗 3 次,每次 3 min;DAB 显色液显色,显微镜下控制显色时间;苏木素复染,脱水,透明,封片,PBS 液代替一抗作为阴性对照。切片观察及结果判定:阳性表达为胞膜和(或)胞质内呈现棕黄色颗粒染色,颜色越深,表达越强,未出现棕黄颗粒为阴性。每组切片随机选却染色清晰者 10 张,于光镜下(40 \times)随机选取 3 个视野,并在高倍镜下(400 \times)观察阳性颗粒在细胞内的分布。细胞中出现棕褐色颗粒为阳性。采用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件,测定阳性细胞的积分吸光度(IA),取其平均值作为该组 GluR1 的相对含量。

2.3 检测海马组织 GluR1 蛋白含量 小鼠脑组织经液氮研磨,加入 400 μL 裂解液(含 PMSF),离心。裂解 30 min 后,即可将裂解液移至 1.5 mL 离心管中,然后在 4 $^{\circ}C$ 下 12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min,取上清分装于 0.5 mL 离心管中并置于 -20 $^{\circ}C$ 保存。

按照膜蛋白提取试剂盒说明书制备细胞膜蛋白。用 BCA 法测定蛋白浓度后,-20 $^{\circ}C$ 保存待测。蛋白标本加入 2 \times 上样缓冲液中,在 12% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离。每条泳道蛋白上样量为 30 μg ,每次电泳包括各组小鼠海马 5 个蛋白样本。电泳结束后,用半干法电转蛋白质至 PVDF 膜上。转移后的 PVDF 膜 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 GluR1(1:1 000),4 $^{\circ}C$ 过夜。用 0.1% TBS 洗膜,加入辣根氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:5 000)(Santa Cruz 公司),室温孵育 1 h,TBS 充分洗膜。按照 ECL 增强化学发光检测试剂盒说明书,设置曝光

时间使条带达最清晰状态。采用 Gel-Pro Analyze 软件分析条带灰度值。

2.4 统计学处理 以 SPSS 13.0 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,组内差异采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 行为学

3.1.1 钩藤碱对甲基苯丙胺诱导小鼠位置偏爱效应的影响 甲基苯丙胺模型组与正常对照组相比($P < 0.05$),有统计学意义,说明甲基苯丙胺位置偏爱模型建立成功。钩藤碱低剂量组、高剂量组和氯胺酮组与甲基苯丙胺模型组比较有统计学意义($P < 0.05$),表明钩藤碱不同剂量组和氯胺酮组能在一定程度上消除甲基苯丙胺诱导小鼠的条件性位置偏爱。见表 1。

表 1 钩藤碱对小鼠甲基苯丙胺依赖条件性位置偏爱效应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

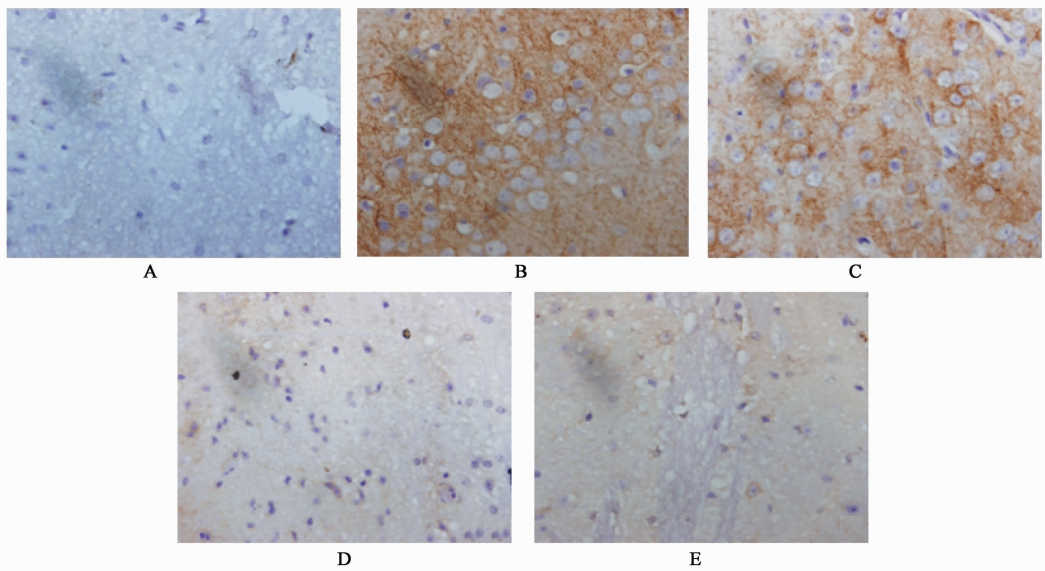
组别	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	在伴药箱中逗留的时间/s
正常对照	-	96 \pm 5
模型	-	154 \pm 4 ¹⁾
钩藤碱	40	97 \pm 5 ²⁾
	80	94 \pm 4 ²⁾
氯胺酮	15	96 \pm 3 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与甲基苯丙胺模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.1.2 小鼠给药后在 CPP 箱的活动轨迹 与正常对照组相比,甲基苯丙胺模型组小鼠在非偏爱箱的活动轨迹明显增多,与甲基苯丙胺模型组相比,氯胺酮组、钩藤碱低剂量组和钩藤碱高剂量组,在非偏爱箱活动轨迹均明显减少。

3.2 GluR1 免疫组化实验 与空白对照组比较,模型组小鼠经过 CPP 训练后海马区中 GluR1 阳性细胞数显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,钩藤碱低剂量组小鼠海马 GluR1 阳性细胞数有统计学意义($P < 0.01$);钩藤碱高剂量组及阳性药物组与之比较有显著统计学意义($P < 0.01$)。详细统计结果,见图 1、表 2。

3.3 对小鼠海马区 GluR1 相对表达量的影响 与空白组小鼠相比,模型组小鼠脑内的 GluR1 表达量升高有显著性差异($P < 0.01$);钩藤碱低、高剂量组和氯胺酮组小鼠脑内的 GluR1 表达与甲基苯丙胺模型组小鼠相比,脑内的 GluR1 显著降低($P < 0.01$)。见表 2,图 2。



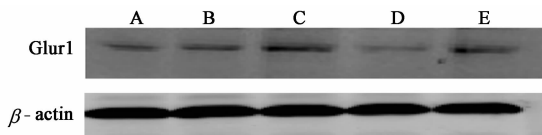
A. 正常对照组;B. 甲基苯丙胺模型组;C. 钩藤碱 4 mg·kg⁻¹组;D. 钩藤碱 80 mg·kg⁻¹组;E. 氯胺酮 15 mg·kg⁻¹组
图1 钩藤碱对小鼠海马区中 GluR1 蛋白表达的影响(SP染色, ×400)

表2 钩藤碱对小鼠海马区 GluR1 阳性细胞的积分吸光度、GluR1 蛋白的相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	GluR1/IA	GluR1 蛋白表达/A
正常对照	-	11 440 ± 2 507	20.62 ± 4.73
模型	-	330 524 ± 73 654 ¹⁾	78.89 ± 8.15 ¹⁾
钩藤碱	40	11 272 ± 2 014 ²⁾	34.55 ± 4.23 ²⁾
	80	11 114 ± 1 517 ²⁾	38.84 ± 10.26 ²⁾
氯胺酮	15	10 646 ± 869 ²⁾	26.22 ± 3.88 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ P < 0.01;与甲基苯丙胺模型组比较

²⁾ P < 0.01。



A. 氯胺酮组;B. 钩藤碱高剂量组;

C. 钩藤碱低剂量组;D. 正常对照组;E. 模型组

图2 钩藤碱对小鼠海马区 GluR1 蛋白表达的影响(Western blot)

4 讨论

条件性位置偏爱实验是检测药物精神依赖性的经典实验。通过比较动物在非偏爱侧停留时间的长短来观察药物精神依赖性的强弱^[6]。故本实验采用甲基苯丙胺诱导小鼠建立条件性位置偏爱模型。

甲基苯丙胺(MA)是非常容易成瘾的兴奋中枢神经的药物,它是苯丙胺类广泛滥用一种^[7],但甲基苯丙胺的作用更为持久、有效,并且对中枢神经系统更有害^[8]。同时甲基苯丙胺是一种容易产生药

物依赖性,滥用者极易复吸的物质。

AMPA受体是由4种分别由不同基因编码的亚基:GluR1,2,3,4组成;AMPA受体在学习记忆等方面均具有重要作用。GluR1是海马神经元AMPA受体的重要组成部分^[9]。

有研究表明,钩藤提取液能够抑制吗啡诱导的条件性位置偏爱效应的形成,具有一定的抗药物精神依赖作用^[10]。笔者之前研究显示,钩藤碱能消除苯丙胺诱导的(条件性)位置偏爱^[11]。

在本研究中,通过连续4d给药成功复制出甲基苯丙胺依赖小鼠CPP模型。小鼠经过氯胺酮3d治疗,由甲基苯丙胺诱导的位置偏爱效应基本消失。钩藤碱低剂量(40 mg·kg⁻¹)、高剂量(80 mg·kg⁻¹)组能在一定程度上消除甲基苯丙胺诱导的小鼠位置偏爱。免疫组化结果显示,甲基苯丙胺模型组小鼠海马区蛋白GluR1表达与正常对照组比较明显增强,表明甲基苯丙胺能增加小鼠海马区蛋白GluR1的表达;并且钩藤碱低剂量组、高剂量组与模型组比较明显减少,表明钩藤碱对小鼠海马蛋白GluR1的表达有抑制作用。表明小鼠海马区蛋白GluR1增加可能与其CPP的形成有一定联系。Western blot检测发现甲基苯丙胺模型组与正常对照组相比GluR1蛋白含量表达明显增高,而钩藤碱低剂量、高剂量组和氯胺酮组与甲基苯丙胺模型组相比表达明显降低;这与免疫组化检测结果一致,该结果说明钩藤碱和氯胺酮均能在一定程度上抑制GluR1的表达,也意味着钩藤碱抗甲基苯丙胺依赖与海马

GluR1 蛋白表达有关。

综上所述,钩藤碱能够消除小鼠位置偏爱效应,并且可能与小鼠海马部位 GluR1 蛋白表达的增加相关。由于中药戒毒机制非常复杂,所以钩藤碱抗药物依赖机制仍然需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 王章姐,孙维矿. 钩藤的化学成分及药理作用研究进展[J]. 现代企业教育, 2010, 12(24):197.

[2] Li P Y, Zeng X R, Cheng J, et al. Rhynchophylline-induced vasodilation in human mesenteric artery is mainly due to blockage of L-type calcium channels in vascular smooth muscle cells [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013, 386 (11):973.

[3] 周吉银,莫志贤. 钩藤碱对苯丙胺依赖大鼠伏核和杏仁核中 NR2B 蛋白表达的影响[J]. 中国药物依赖性杂志, 2007, 16(1):12.

[4] 林晓亮,汤伟,陈文倩,等. 钩藤碱对甲基苯丙胺条件性位置偏爱大鼠 AMPA 受体蛋白改变的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2010, 19(2):104.

[5] Allen N J, Bennett M L, Foo L C, et al. Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors [J]. Nature, 2012, 486 (7403):410.

[6] Carr G D, Fibiger H C, Phillips A G. Conditioned place

preference as a measure of drug reward [M]. In: Liebman J M, Cooper S J. The neuropharmacological basis of reward. New York: Oxford University Press, 1989:264.

[7] 邓慧琼,周旭辉,张登科,等. 条件性位置实验方法及非倾向性实验设计在药物依赖研究中的应用[J]. 中国药物依赖性杂志, 2006, 15(2):8.

[8] Cadet J L, Brannock C, Ladenheim B, et al. Enhanced upregulation of CRH mRNA expression in the nucleus accumbens of male rats after a second injection of methamphetamine given thirty days later [J]. PLoS ONE, 2014, 9(1):846.

[9] Mao L M, Diaz J A, Fibuch E E, et al. Regulation of phosphorylation of synaptic and extrasynaptic GluA1 AMPA receptors in the rat forebrain by amphetamine [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 715 (1/3):164.

[10] Lee H K, Takamiya K, Han J S. et al. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory [J]. Cell, 2003, 112(5):631.

[11] 王煜,王景霞,欧丽娜,等. 钩藤对吗啡诱导的大鼠条件性位置偏爱效应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):218.

[责任编辑 聂淑琴]

《中国医药导报》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的医药卫生期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、美国化学文摘(CA)收录期刊、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库收录期刊,所刊登的文章被万方数据、中国知网、中文科技期刊数据库全文收录。每期定价 20 元,全年 36 期优惠价 540 元。

本刊设专家论坛、综述、论著、实验研究、药理与毒理、临床研究、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、病例报告、医疗器械、中医中药、生物医药、药品检验、制剂与技术、药师与临床、不良反应监测、药物经济学、调查研究、护理研究、教育研究、科研管理、法规与标准、卫生研究、医疗管理、产业与市场、医药监管、工作探讨等栏目。是广大医药卫生科研、教育、医护、药事、经营管理等人员了解医药研究进展、发展动态,展示医药科研成果,学习先进经验,探讨工作难题,交流和提高业务学术水平的得力助手,也是发表医药学术论文的阵地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025

投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533

传真:010-59679056 投稿信箱:yydb@vip.163.com

网址:www.yiyadaobao.com.cn