

• 基础实验研究论著 •

海洛因成瘾对大鼠海马 CA3 区 NR1、NR2A 亚基表达的影响

肖 邦^{1,2}, 潘贵书^{1△}

(1. 遵义医学院生理学教研室, 贵州遵义 563003; 2. 川北医学院生理学教研室, 四川南充 637000)

摘要:目的 观察海洛因依赖大鼠海马 CA3 区 NMDA 受体 NR1、NR2A 亚基的表达。方法 将 40 只 SD 大鼠随机分成海洛因依赖组、海洛因+MK801 组、海洛因戒断组及对照组, 用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术半定量检测海马 NMDA 受体 NR1、NR2A 亚基 mRNA 的表达。结果 与对照组比较, 海洛因依赖组、海洛因戒断组和海洛因+MK801 组的 NR1 表达明显升高($P<0.05$), 且海洛因依赖组 NR1 的表达明显高于海洛因戒断组和海洛因+MK801 组, 海洛因戒断组与海洛因+MK801 组的 NR1 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较, 海洛因+MK801 组 NR2A 的表达降低($P<0.05$), 海洛因戒断组 NR2A 表达升高($P<0.05$), 依赖组 NR2A 的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 海洛因依赖可使大鼠海马 CA3 区 NR1 的表达明显上调。海洛因戒断的大鼠海马 CA3 区 NR2A 表达上调, 使用 MK801 干预的大鼠海马 CA3 区 NR2A 表达下调。

关键词:海洛因成瘾; 海马; NMDA 受体; 大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)17-2275-02

The effects of expression of NR1, NR2A subunit in heroin addicted rats of hippocampus CA3 area

Xiao Bang^{1,2}, Pan Guishu^{1△}

(1. Department of Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China;

2. Department of Physiology, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To observe the effects of expression of NMDA receptor NR1, NR2A subunit in heroin dependent rats of hippocampus CA3 area. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into four groups: Heroin Addiction Group, Heroin+MK801 Group, Heroin Abstinence Group and Control Group. The expression of NMDA receptor NR1 subunit mRNA were semi-quantitatively determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with Control Group, the NR1 expression in the other three groups significantly increased ($P<0.05$). NR1 expression in Heroin Addiction Group was higher than Heroin+MK801 Group and Heroin Abstinence Group ($P<0.05$). There was no statistically significant difference between Heroin+MK801 Group and Heroin Abstinence Group ($P>0.05$). Compared with Control Group, Heroin+MK801 Group's NR2A expression reduced ($P<0.05$), Heroin Abstinence Group's NR2A expression increased ($P<0.05$), no significantly difference was observed in Heroin Addiction Group ($P>0.05$). **Conclusion** Heroin addiction causes NR1 expression increase in hippocampus CA3 area of rats. The CA3 area NR2A expression ascended in Heroin Abstinence Group but reduced in the Heroin rats administrated with MK801.

Key words: heroin addiction; hippocampus; NMDA receptor; rats

海马是学习记忆的重要脑区, 海马内正常的学习记忆与成记忆之间的关系是目前研究的重点。目前普遍认为, 药物成瘾形成的基础是神经可塑性的改变, 原来作为记忆形成重要基础的谷氨酸能神经元突触后膜的长时程增强(LTP)和长时程抑制(LTD), 已被发现参与了复吸和行为敏化等与药物成瘾相关的行为可塑性改变, 而 NMDA 受体是谷氨酸受体的一种亚型, 参与形成突触传递的长时程增强过程^[1], 因此 NMDA 受体在药物成瘾的研究中受到越来越多的重视。为研究海洛因成瘾大鼠海马 NMDA 受体表达的影响, 本试验采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术半定量检测海马 CA3 区 NMDA 受体 NR1、NR2A 亚基 mRNA 的表达。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 SD 大鼠 40 只, 雄性, 体质量 220~260 g, 由第三军医大学大坪医院动物中心提供[许可证号: SCXK-(军)2007017], 为清洁级动物, 分笼饲养, 自由饮水、进食。按随机分组的原则将上述 SD 大鼠分为海洛因成瘾组(10 只)、海洛因戒断组(10 只)、海洛因+MK801 组(10 只)和对照组(10 只)。

1.2 仪器与试剂 总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、引物 NR1、引物 NR2A、 β -actin、TE 缓冲液由北京天根生化科技有限公司提供; 海洛因由贵州省公安厅提供; 盐酸纳洛酮注射

液购自 Sigma 公司; MK801 购自 ALEXIS 公司; PCR 扩增仪、荧光定量 PCR 仪购自美国伯乐公司; 紫外分光光度计购自日本 Hitachi 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型建立 海洛因成瘾组、海洛因+MK801 组及海洛因戒断组大鼠按文献[2-4]的方法, 逐日等量递增海洛因的剂量。以每天的体质量计算剂量, 首日剂量为 3 mg/kg, 一日两次(上午 9:00 和下午 5:00)连续皮下注射 9 d(第 9 天每次剂量达到 27 mg/kg); 海洛因戒断组于第 10 天用 5 mg/kg 纳洛酮诱发戒断症状, 大鼠确定成瘾后, 不再给药。海洛因成瘾组与海洛因+MK801 组大鼠在第 9 天用药后继续以维持剂量(27 mg/kg)注射海洛因 9 d 即可进行实验。海洛因+MK801 组在每次海洛因给药前 15~30 min 给予 MK801(0.1 mg/kg), 直到实验停止。对照组按海洛因成瘾组的给药方式注射等容积的生理盐水。

1.3.2 海马 CA3 区脑组织 RNA 提取 取大鼠海马 CA3 区脑组织, 在冰上进行操作, 将组织磨碎后加入裂解液 RZ 用匀浆仪进行匀浆处理。将匀浆样品在常温下放置 5 min 后, 加入 200 μ L 氯仿, 剧烈震荡数秒, 室温放置 3 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 样品分三层, 取中间水相。将得到的溶液和

沉淀一起转入吸附管中,按试剂盒说明依次加入相应试剂。离心后提取总样品 RNA。

1.3.3 RNA 逆转录和荧光定量 PCR 检测 检测 RNA 纯度后按试剂盒说明进行操作。设计的引物序列如下。NR1,正向:5'-ACC ATG CAC CTG CTG ACA TT-3';反向:5'-CTT CAG CAC CTC GGA CAG CA-3';NR2A,正向:5'-TCC ACC TTC TCC GGC TAC AG-3';反向:5'-GTC GGT GCT GCA CTG TCT TG-3'。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件包进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

各组海马 CA3 区 NMDA 受体亚型 NR1、NR2A mRNA 的表达情况见表 1。与对照组比较,海洛因成瘾组、海洛因戒断组和海洛因+MK801 组的 NR1 表达较高,差异有统计学意义($P < 0.05$);海洛因成瘾组海马 CA3 区 NR1 的表达高于海洛因戒断组和海洛因+MK801 组($P < 0.05$)。与对照组比较,海洛因+MK801 组 NR2A 的表达降低($P < 0.05$),海洛因戒断组 NR2A 表达升高($P < 0.05$)。NR1、NR2A 扩增的标准曲线见附图 1、2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 1 各组大鼠海马 NR1、NR2A 亚基 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

实验动物	<i>n</i>	NR1	NR2A
对照组	10	10.05±1.27	0.81±0.07
海洛因成瘾组	10	36.75±1.02 ^a	0.71±0.12
海洛因戒断组	10	18.18±1.25 ^{ab}	1.67±0.24 ^{ab}
海洛因+MK801 组	10	18.02±0.93 ^{ab}	0.17±0.09 ^{abc}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与海洛因成瘾组比较;^c: $P < 0.05$,与海洛因戒断组比较。

3 讨 论

NMDA 受体是一种电压与配体的双重门控通道,在静息电位下该通道与 Mg^{2+} 结合而使通道阻滞,这种阻滞是一种电压依赖性的。通道的激活主要依赖于突触后膜去极化及突触前膜递质的释放。当突触后膜去极化后, Mg^{2+} 会与通道分离,而递质与受体结合导致通道开放,但这种开放特异性不强,除了 Na^{+} 与 K^{+} 的跨膜流动外, Ca^{2+} 可以大量进入胞内,作为第二信使激活了钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca/CaMK II)、CAMP 依赖性蛋白激酶等,启动下游一系列的生化反应,进而形成 LTP。这些生理特性使得 NMDA 受体具备重要的整合能力,在神经系统的发育以及学习记忆和药物成瘾等复杂的生理反应中起到了非常关键的作用^[5]。

目前已从鼠脑克隆鉴定出 5 种 NMDAR 亚基:NR1、NR2A、NR2B、NR2C 及 NR2D。海马中 NMDA 受体亚单位主要有 NR1、NR2A、NR2B,本次实验研究的是 NR1、NR2A 亚单位。NR1 亚单位可单独在细胞中表达有功能的同聚受体,但对激动的反应很小,其基因表达的混乱将引起受体复合物功能活性的丧失。NR2A 亚基不能单独形成有功能的通道,只有和 NR1 组合才能表现出活性。NMDA 受体是由 NR1 和至少一种 NR2 的亚基构成的异寡聚体,其中 NR1 是组成 NMDA 受体离子通道的基本结构单位,是该受体的功能单位,而 NR2 是修饰或调节单位,NR2 具有调节受体通道动力学作用^[6-10]。

NR1 亚基作为 NMDA 受体的功能性亚基与学习记忆的功能密不可分。多种因素引起的学习记忆等神经行为的改变和 NR1 亚基有关。NR2A 亚基在脑内分布广泛,以海马、皮层

和小脑的分布最多。NR2A 基因敲除可明显降低海马 CA3 区突触的 EPSPs,降低海马 CA1 区 NMDA 受体电流和 LTP,损害空间学习能力。同时 NR2A 基因突变的小鼠还表现为在新环境中自发运动增强和潜在学习能力降低。

关于海马的研究目前主要是集中在 CA1 区,解剖与生理的研究结果均表明:从穿通纤维到 CA3 区椎体细胞存在着一条直接通路,而且是一条重要的海马信息加工通路,参与了海马许多功能的调节。但其在药物成瘾方面的研究报道较少,有必要做进一步研究。

本实验中用到的 MK801 是一种 NMDA 受体拮抗剂。在海洛因成瘾组,NR1 的表达明显升高,有可能介导了 NMDA 受体的兴奋性毒性作用,过度激动 NMDA 受体造成了学习记忆功能的损伤。海洛因戒断组和海洛因+MK801 组的 NR1 表达相对于海洛因依赖组下降了很多,这有可能是因为过度激动的 NMDA 受体处于恢复之中,学习记忆的能力亦处于恢复之中,也间接说明海马 CA3 区有 NR1 亚基存在,并且在此区域的分布密度可能比较大,参与到药物成瘾的复杂的生理反应中,具体的机制还有待进一步研究。与对照组比较,海洛因戒断组 NR2A 表达明显升高,海洛因依赖组 NR2A 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 NR2A 可能主要介导的是戒断症状。海洛因+MK801 组的 NR2A 表达下降明显可能是 MK801 选择性抑制的结果。海马 CA3 区有 NR2A 的表达,NR2A 可能在学习记忆的恢复阶段起一定作用并介导了药物成瘾的负性情绪反应,具体的机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Murphy GG, Glanzman DL. Mediation of classical conditioning in Aplysia California by long-term potentiation of sensorimotor synapses[J]. Science, 1997, 278(5337): 467-471.

[2] 何国珍. 海洛因成瘾大鼠模型的方法建立[J]. 四川解剖学杂志, 2005, 13(2): 4-6.

[3] 张开镐. 药物依赖性的动物试验方法(一)[J]. 中国药物依赖性杂志, 1999, 8(1): 23-26.

[4] Maldonado R, Negus S, Koob GF. Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta- and kappa-selective opioid antagonists[J]. Neuropharmacology, 1992, 31(12): 1231-1241.

[5] Elliott K, Minami N, Kolesnikov YA, et al. The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids[J]. Pain, 1994, 56(1): 69-75.

[6] Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, et al. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons[J]. Nature, 2001, 411(6837): 583-587.

[7] Harrison JM, Allen RG, Pellegrino MJ, et al. Chronic morphine treatment alters endogenous opioid control of hippocampal mossy fiber synaptic transmission[J]. J Neurophysiol, 87(5): 2464-2670.

[8] Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, et al. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity[J]. Neuropharmacology, 2004, 47 Suppl 1: 61-79.

[9] Perez-Otano I, Schulteis CT. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors[J]. J Neurosci, 2001, 21(4): 1228-1237.

[10] Aarts MM, Tymianski M. Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(6): 877-886.