

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00112

· 研究简报 ·

心脑佳配方对慢性酒精处理大鼠海马谷氨酸含量及 NR2B 表达的影响

李爽¹, 徐春阳², 万佳³, 贾娟¹, 万光瑞^{4*}

1. 新乡医学院生理学教研室, 新乡 453003
2. 新乡医学院免疫学教研室, 新乡 453003
3. 郑州大学第一附属医院肾内科, 郑州 450001
4. 新乡医学院现代教育技术中心, 新乡 453003

[关键词] 心脑佳配方; 酒精中毒; N-甲基-D-天冬氨酸受体; 谷氨酸

[中图分类号] R 595.6 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2012)01-0112-03

Effect of *Xinnaojia* Recipe on glutamate content and NR2B expression in hippocampus of rats with chronic alcoholism

LI Shuang¹, XU Chun-yang², WAN Jia³, JIA Juan¹, WAN Guang-rui^{4*}

1. Department of Physiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China
2. Department of Immunology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China
3. Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China
4. Modern Education Technology Center, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

[Key words] *Xinnaojia* Recipe; alcoholism; N-methyl-D-aspartate receptors; glutamic acid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 112-114]

酒精中毒是危害人类健康的杀手之一,与酒精中毒和酒精滥用相关的健康、心理和社会问题已成为当前重大的公共卫生问题之一^[1]。心脑佳配方是新乡医学院万光瑞教授自主研发的一种快速、高效、多途径抗急性慢性酒精中毒的食药两用中药。我们前期进行的动物实验证明心脑佳配方具有明显增加乙醇脱氢酶(ADH)和乙醛脱氢酶(ALDH)活性等作用(未公开发表资料),临床少量志愿者在大量饮酒前或饮酒后试服该药后,均未感到胃部不适,且睡眠好,睡醒后头部感觉舒适、轻松(未公开发表资料),这可能是其中天麻和抗氧化成分发挥的作用。为此,本实验通过观察心脑佳配方对慢性酒精处理模型大鼠学习记忆的影响和海马区谷氨酸(Glu)含量及N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体2B亚基(NR2B)表达的变化,探讨心脑佳配方对酒精中毒的保护作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物及分组 清洁级雄性 Sprague Dawley 大鼠,体质量(140±20)g,由郑州大学动物中心提供,许可证号:SCXK(豫)2005-0001。随机分为5组($n=12$):正常组(A组)、酒精中毒模型组(B组)、酒精+低剂量心脑佳配方组(C组)、酒精+中剂量心脑佳配方组(D组)、酒精+高剂量心脑佳配方组(E组)。

1.2 药品及试剂 心脑佳配方为自制;兔抗鼠 NR2B 多克

隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;Cy3 标记羊抗兔 IgG、DAPI、抗荧光淬灭封片液购自碧云天生物技术研究;谷氨酸标准液购自上海康达氨基酸厂。

1.3 慢性酒精中毒模型的建立 B、C、D、E组以酒精水溶液作为大鼠唯一饮水来源,以6%酒精浓度开始,逐日递增1%~15%后一直维持该浓度并持续8周,任意进食。A组自由饮水,任意进食。

1.4 给药 第9周开始,C、D、E组大鼠继续饮用酒精水溶液的同时,每天上午9点分别以总黄酮含量为260、520、780 mg/ml的心脑佳配方生理盐水溶液(2 ml/kg)灌胃,A组、B组用等体积生理盐水灌胃,连续灌胃10 d。

1.5 学习记忆能力检测 学习记忆的行为检测在灌胃结束后第2天进行。以Y-迷宫作为学习记忆能力的检测模型。在仪器箱底施以电击,电击参数为0.4 mA。3条臂每一条顶端都有信号灯,实验时,信号灯开启表示该臂为安全区,即该臂底部不通电;另两条臂通电,训练动物学会分辨信号而主动逃避电击。灯光出现的方位按照随机次序变换。

将大鼠置于迷宫中,把3条臂的指示灯均打开,让其适应环境,3 min后再将灯熄灭。随机打开其中一条臂的指示灯,不亮的两条臂自动延迟5 s后则通电电击大鼠,直至逃避到安全区为止,然后灯亮持续15 s后熄灭,完成1次测试。大鼠在

[收稿日期] 2011-02-12 [接受日期] 2011-11-11

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究项目(2009A310004)。Supported by Natural Science Research Program of The Education Department of Henan Province(2009A310004)。

[作者简介] 李爽,硕士,讲师。E-mail: xcy1426@126.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 0373-3029104, E-mail: wgr@xxmu.edu.cn

10 s 内一次直接逃至安全区为正确反应,否则为错误反应。以 10 次电刺激后有 9 次做出正确反应为学会,用大鼠学会所需训练的次数来表示其空间分辨反应的学习记忆成绩。训练次数越少,说明大鼠学习能力越强。所有学习记忆测试均于晚间安静、暗光下进行,对电刺激反应迟钝的大鼠予以剔除。

1.6 高效液相色谱分析谷氨酸水平^[2] 大鼠麻醉后断头,剥离海马组织并称质量,加入 1 ml 甲醇-水离心液,低温匀浆,取部分匀浆液 4℃、10 000×g 离心 15 min,取上清,滤膜过滤后-80℃保存待测。样品经 OPA(O-phthalaldehyde)衍生后,用高效液相色谱仪(美国 VARIAN Prostar)进行检测,控制系统为 ProStar/Dynamax System(包含 ProStar 210 泵,ProStar 363 型可编程荧光检测器,800 模数转换器,ProStar 500 型柱温箱)。流动相 A:0.1 mol/L 醋酸钾,流动相 B:甲醇,进行二元梯度洗脱,梯度洗脱程序(T,B%):(0,0%),(1,5%),(10,20%),(17,40%),(20,60%),(22,55%),(40,55%),(45,100%),T 表示时间,B%表示 B 流动相所占的比例。流动相经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,超声脱气。流速 1.0 ml/min、激发波长 250 nm,发射波长 410 nm,以谷氨酸峰面积定量。

1.7 免疫荧光法检测大鼠海马区 NR2B 蛋白表达 取海马区脑组织在恒温冷冻切片机内切成 20 μm 厚切片,贴于防脱载玻片上;微波修复 15 min,山羊血清封闭 20 min;加入兔抗鼠 NR2B 多克隆抗体(1:100),4℃过夜;加入 Cy3 标记羊抗兔 IgG(1:500),室温放置 2 h;DAPI 核复染 3 min;抗荧光淬灭封片液封片;倒置荧光显微镜观察并拍照。

1.8 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 软件包进行统计学分析,用方差分析进行多组间检验,有差异者再进行两两比较,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 心脑佳配方对慢性酒精处理大鼠学习记忆能力的影响 Y-迷宫行为检测结果显示,慢性酒精处理大鼠学习记忆能力较正常大鼠明显下降($P < 0.01$),而不同剂量心脑佳配方对慢性酒精处理大鼠学习记忆能力均有保护作用,与模型组相比,随着剂量的增加,大鼠学习记忆能力恢复明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 1。

2.2 心脑佳配方对慢性酒精处理大鼠海马区谷氨酸含量的影响 高效液相色谱分析结果显示,慢性酒精处理可使大鼠海马区谷氨酸含量明显减少($P < 0.05$),各剂量心脑佳配方对酒精中毒所引起的大鼠海马区谷氨酸含量减少没有影响(表 1,图 1)。

2.3 心脑佳配方对慢性酒精处理大鼠海马区 NR2B 蛋白表达的影响 由图 2 可见,NR2B 蛋白在海马区神经元细胞表达,阳性细胞胞质呈红色。慢性酒精处理组与正常对照组比较,镜下见大量的荧光着色细胞,分布密集,且荧光强度增加。不同剂量心脑佳配方均使阳性细胞数量减少,与模型组相比,随着剂量增加,阳性细胞数量减少更加明显。

3 讨论

心脑佳配方由十二味可食中药的主要功效成分构成,具有护肝、护胃、护脑三方面的作用。配方中药的功效成分中,黄酮含量较高易于检测,另外,黄酮成分在本配方中发挥着

极为重要的作用,因此本研究采用总黄酮作为该解酒保健食品检测的功效指标。本实验结果表明,慢性酒精处理模型组大鼠学习记忆成绩较正常组明显下降($P < 0.01$),各用药组与模型组相比,学习记忆成绩明显上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明心脑佳配方对于慢性酒精处理的神经损伤具有保护作用。为了探讨心脑佳配方的神经保护作用机制,我们分别检测了大鼠海马区谷氨酸含量和 NR2B 蛋白表达。

表 1 心脑佳配方对慢性酒精处理大鼠学习记忆能力和海马区谷氨酸含量的影响

分组	训练次数(次)	谷氨酸含量 $\rho_B / (\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$
对照组	37.38 ± 11.61	3.49 ± 0.70
模型组	104.88 ± 12.98**	0.24 ± 0.06*
心脑佳配方低剂量组	93.25 ± 7.63 Δ	0.29 ± 0.07*
心脑佳配方中剂量组	76.00 ± 7.39 $\Delta\Delta$	0.27 ± 0.07*
心脑佳配方高剂量组	46.00 ± 5.78 $\Delta\Delta\Delta$	0.28 ± 0.06*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 与模型组比较

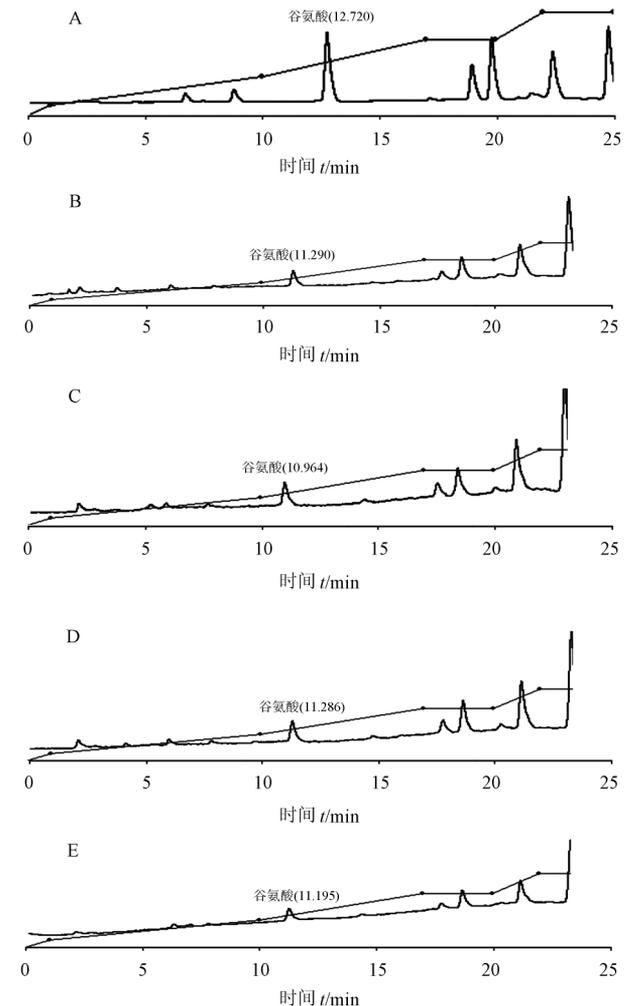


图 1 各组大鼠海马组织谷氨酸含量的
高效液相色谱分析图

A: 对照组; B: 模型组; C: 心脑佳配方低剂量组; D: 心脑佳配方中剂量组; E: 心脑佳配方高剂量组

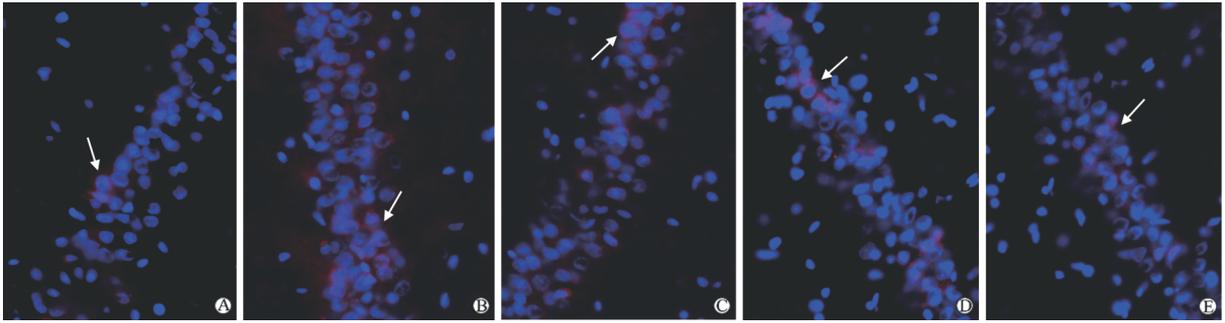


图2 各组大鼠海马组织 NR2B 蛋白表达

A: 对照组; B: 模型组; C: 心脑佳配方低剂量组; D: 心脑佳配方中剂量组; E: 心脑佳配方高剂量组. 箭头所示为典型阳性细胞. Original magnification: $\times 400$

在哺乳动物脑内,海马是神经元可塑性的重要区域,与学习记忆的形成密切相关^[3]。而脑组织中 NMDA 受体在海马组织有丰富表达,是突触可塑性及长时程增强(long-term potentiation,LTP)的主要调控者,构成了学习记忆的神经基础^[4]。已有研究证明海马区 LTP 的形成由谷氨酸和 NMDA 受体所介导^[5]。NR2B 在神经可塑性方面起着更为重要的作用^[6]。研究也表明,酒精能够通过作用于 NR2B 受体,造成神经细胞损伤和学习记忆改变^[7]。

本实验结果表明,慢性酒精处理大鼠海马区谷氨酸含量较正常组降低($P < 0.01$),而 NR2B 蛋白表达升高。这与既往研究结果^[8-9]一致。加入心脑佳配方后,慢性酒精处理大鼠海马区 NR2B 蛋白表达明显下降,但是海马区谷氨酸含量差异无统计学意义($P > 0.05$),说明心脑佳配方可以下调酒精中毒引起的海马区 NR2B 蛋白表达,但其作用途径与谷氨酸无关。

心脑佳配方的主要成分为葛根和天麻,实验表明,葛根素能明显降低细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ ^[10],而天麻成分香荚兰醛和对羟基苯甲醚可抑制谷氨酸引起的人 IMR-32 成神经细胞瘤细胞内 Ca^{2+} 的升高和细胞凋亡^[11],天麻素也可抑制谷氨酸引起的 PC12 细胞内 Ca^{2+} 升高^[12]。而经 NR2B 受体造成神经细胞损伤的机制主要为:(1)NMDA 受体过度激活,配体门控型离子通道开放, Ca^{2+} 、 Na^+ 大量内流而 K^+ 外流,细胞内水钠滞留,导致急性神经细胞肿胀、坏死;(2)NMDA 受体过度激活使细胞内 Ca^{2+} 浓度持续增高,导致 Ca^{2+} 超载,激活一系列与细胞毒性有关的酶,使神经元逐步坏死^[13]。这提示 Ca^{2+} 通道可能是心脑佳配方抗兴奋毒性的作用靶点。

本实验结果表明,心脑佳配方对酒精中毒引起的脑损伤具有保护作用,并且这种保护作用可能是通过对 NR2B 蛋白表达的调节而实现,然而这种保护作用的分子机制和途径仍不明确。我们推测,心脑佳配方能够通过下调 NR2B 受体、抑制 Ca^{2+} 内流,从而保护慢性酒精处理大鼠的神经细胞损伤,改善学习记忆,此过程的具体机制,值得进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] De Rick A, Vanheule S, Verhaeghe P. Alcohol addiction and the

attachment system; an empirical study of attachment style, alexithymia, and psychiatric disorders in alcoholic inpatients [J]. *Subst Use Misuse*, 2009, 44: 99-114.

[2] 俞军龄,陈再兴,毛小元,孟秀君,郭凤,刘睿,等. HPLC 法测定 tremor 大鼠脑组织中谷氨酸和 GABA 含量[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25: 1530-1533.

[3] Burke C J, Tobler P N, Baddeley M, Schultz W. Neural mechanisms of observational learning [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 14431-14436.

[4] Stoneham E T, Sanders E M, Sanyal M, Dumas T C. Rules of engagement: factors that regulate activity-dependent synaptic plasticity during neural network development [J]. *Biol Bull*, 2010, 219: 81-99.

[5] Li R, Huang F S, Abbas A K, Wigström H. Role of NMDA receptor subtypes in different forms of NMDA-dependent synaptic plasticity [J]. *BMC Neurosci*, 2007, 8: 55.

[6] Mallon A P, Auberson Y P, Stone T W. Selective subunit antagonists suggest an inhibitory relationship between NR2B and NR2A-subunit containing N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal slices [J]. *Exp Brain Res*, 2005, 162: 374-383.

[7] Kash T L, Matthews R T, Winder D G. Alcohol inhibits NR2B-containing NMDA receptors in the ventral bed nucleus of the stria terminalis [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33: 1379-1390.

[8] Umhau J C, Momenan R, Schwandt M L, Singley E, Lifshitz M, Doty L, et al. Effect of acamprosate on magnetic resonance spectroscopy measures of central glutamate in detoxified alcohol-dependent individuals: a randomized controlled experimental medicine study [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2010, 67: 1069-1077.

[9] Wang J, Carnicella S, Phamluong K, Jeanblanc J, Ronesi J A, Chaudhri N, et al. Ethanol induces long-term facilitation of NR2B-NMDA receptor activity in the dorsal striatum: implications for alcohol drinking behavior [J]. *J Neurosci*, 2007, 27: 3593-3602.

[10] 吴艳,万华印. 葛根素对培养脑细胞缺氧/再给氧损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22: 1130-1133.

[11] Lee Y S, Ha J H, Yong C S, Lee D U, Huh K, Kang Y S, et al. Inhibitory effects of constituents of *Gastrodia elata* Bl. on glutamate-induced apoptosis in IMR-32 human neuroblastoma cells [J]. *Arch Pharm Res*, 1999, 22: 404-409.

[12] 李运曼,陈芳萍,刘国卿. 天麻素抗谷氨酸和氧自由基诱导的 PC12 细胞损伤的研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34: 456-460.

[13] Hudmon A, Lebel E, Roy H, Sik A, Schulman H, Waxham M N, et al. A mechanism for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association [J]. *J Neurosci*, 2005, 25: 6971-6983.