

论著·实验研究

子宫内海洛因暴露对小鼠前额叶皮层 海马和伏核 p-ERK1 /2 表达的影响

王莹¹, 张蓬勃², 李侃¹

(1. 西安交通大学医学院生理与病理生理学系, 环境与疾病基因教育部重点实验室,
陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学第二附属医院麻醉科, 陕西 西安 710004)

[摘要] 目的 观察子宫内海洛因暴露对小鼠前额叶皮层(PFC)、海马(HP)和伏核(Acb)脑区磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)表达的影响,探讨 ERK MAPK 细胞信号转导通路是否参与了发育期海洛因暴露导致小鼠神经行为缺陷的分子机制。方法 于胚胎鼠 9~18 日龄时,每天给孕鼠皮下注射海洛因 10 mg/kg 一次,建立宫内海洛因暴露小鼠模型。按出生前处理将小鼠分为海洛因组(Her)和盐水组(Sal)。RT-PCR 和蛋白免疫印迹法检测两组小鼠前 PFC、HP 和 Acb 三个脑区组织 p-ERK1/2 的表达变化。结果 与 Sal 组相比,Her 组小鼠的体重无明显变化;p-ERK1/2 的 mRNA 和蛋白表达在三个脑区无明显改变。结论 发育期 10 mg/kg 海洛因暴露未损伤小鼠的体格发育,海洛因可能通过 ERK1/2 MAPK 信号通路以外的机制导致神经行为缺陷。

[中国当代儿科杂志,2009,11(4):306-309]

[关键词] 海洛因;ERK1/2 MAPK;前额叶皮层;海马;伏核;小鼠

[中图分类号] R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)04-0306-04

Effect of prenatal heroin exposure on p-ERK1 /2 expression in the prefrontal lobe cortex, hippocampus and nucleus accumbens in mice

WANG Ying, ZHANG Peng-Bo, LI Kan. Department of Physiology and Pathophysiology, Key Laboratory of Environment and Gene Related to Disease of Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710061, China (Zhang P-B, Email: zhpbo@163.com)

Abstract: Objective To study the expression of phosphorylated-ERK1/2 (p-ERK1/2) MAPK in the prefrontal lobe cortex (PFC), hippocampus (HP) and nucleus accumbens (Acb) in mice exposed to heroin in the uterus, and elucidate whether ERK MAPK signal transduction pathway participates in neurobehavioral teratogenicity induced by maternal heroin abuse. **Methods** Animal model was established by subcutaneous administration of diacetylmorphine (10 mg/kg · d) to pregnant BALB/c mice on embryonic days 9-18, and their offspring were assigned to heroin and normal saline groups according to the maternal treatment. p-ERK1/2 expression in the PFC, HP and Acb were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** The heroin group had body weights similar to the normal saline group after birth. There were no significant differences in the p-ERK1/2 expression in the PFC, HP and Acb between the two groups. **Conclusions** Prenatal exposure to 10 mg/kg heroin altered neither the body weight nor the general development in mice. The ERK1/2 MAPK signal pathway might not be involved in the neurobehavioral teratogenicity induced by prenatal heroin exposure.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (4):306-309]

Key words: Heroin; ERK1/2 MAPK; Prefrontal cortex; Hippocampus; Nucleus accumbens; Mice

据中国国家禁毒委员会报告,近年来女性毒品滥用者增多,约占全部吸毒者 20%~30%,且年龄集中在 22~27 岁之间,属于育龄期妇女^[1]。文献报道,海洛因可迅速通过胎盘屏障和胚胎血脑屏障,直接作用于发育中的神经细胞。宫内海洛因暴露不但可引起新生儿宫内窘迫和发育迟缓,还可导致子代

成年后长期的认知行为缺陷和社会行为障碍^[2,3],但其细胞、分子机制未完全阐明。

MAPK (mitogen-activated protein kinase) 信号系统作为真核细胞内各种信息传递的最后通路和共同通路,能够将细胞外的各种刺激信息转移到细胞核内,是神经细胞发生一系列可塑性变化的分子基础。

[收稿日期]2008-09-05;[修回日期]2008-10-14

[基金项目]国家自然科学基金(No. 30500411;30772081)。

[作者简介]王莹,女,博士研究生,讲师。主攻方向:脑发育的神经生物学。

[通讯作者]张蓬勃,男,副教授,西安交通大学医学院第二附属医院麻醉科,邮编:710004。

ERK1/2 MAPK 级联信号通路是最重要的信号转导途径之一,其参与了细胞有丝分裂、生长和分化、增殖和细胞恶性转化等多种生理病理学过程^[4];在神经元和胶质细胞的信号传递中,尤其在神经元突触可塑性、学习记忆和成瘾记忆方面发挥着极为重要的作用^[5,6],是近年来 ERK1/2 功能研究的热点之一。由此可见,ERK1/2 MAPK 是记忆和发育学研究一个不可忽视的角色,但截止目前,没有资料报道,海洛因损伤发育脑和认知行为的机制中是否有 ERK1/2 MAPK 通路的参与。

1 材料与方法

1.1 材料

标准品海洛因(heroin),学名二乙酰吗啡,纯度 98.5%,由中国药品生物制品检定所(国家麻醉品实验室)提供,批号 171206-200614。兔抗鼠 p-ERK1/2 MAPK 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司;山羊抗 β -actin 多克隆抗体购自武汉博士德公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔或山羊二抗购自博奥森生物公司;ECL 化学发光试剂盒、PVDF 膜及 Hyperfilm 胶片购自德国 Merck 公司;蛋白质提取及浓度测定试剂盒购于美国 Bio-Rad 公司。FS-600 超声波粉碎仪(上海生析超声仪器有限公司);离心机(德国 Eppendorf);电泳仪(德国 Whatman Biometra,);紫外成像扫描仪及分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立及分组、称重 选健康活泼 BALB/c 小鼠 60 只(2 月龄,体重 20~30 g),由第四军医大学实验动物中心提供,雌雄各半,自由饮食饮水,昼夜 12 h 交替光照,室温 25℃,湿度 60% 左右。每日 21:00 时雌雄合笼,次日晨查精栓或阴道涂片,以精栓或阴道涂片查到精子作为受精标志,记为 E0。体重相近的实验动物随机分为海洛因组(Her)组和生理盐水组(Sal)组。从 E0~E7 各组动物自由进食。E9~E18,Sal 组小鼠每日一次(21:00 时)大腿外侧皮下注射生理盐水 20 mL/kg,Her 组小鼠按文献报道的方法建立子代宫内海洛因暴露模型^[7],即孕鼠大腿外侧皮下每天注射海洛因 10 mg/kg,药物溶于生理盐水中,浓度为 0.5 mg/mL。子代分组同亲代孕鼠,第 7 日龄始每天称重。

1.2.2 RT-PCR 实验 仔鼠 30 d 时,0.16 mol/L 戊巴比妥钠腹腔麻醉,速断头、开颅、分离各脑区,即刻入液氮,冻存管分装,-80℃ 贮存。Trizol 法提取

组织细胞的总 RNA。各取 1 μ g RNA,逆转录合成 cDNA。应用 PCR 法进行扩增(94℃ 预变性 2 min,然后以 94℃ 45 s、60℃ 45 s、72℃ 1 min,循环 32 次,72℃ 延伸 9 min),以 β -actin 为内参。ERK1/2:上游:5'-ACCCTGGAAGCCATGAGA-3';下游:5'-TAAGGTCGCAGGTGGTGT-3';产物长度 256 bp, β -actin:上游:5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACAC-3'下游:5'-TCTGCGCAAGTTAGGTTTGTGTC-3',产物长度 825 bp。琼脂糖凝胶电泳后扫描 DNA 条带灰度,与 β -actin 的比值作为半定量指标。

1.2.3 蛋白印迹实验 小鼠脑组织取材同 PT-PCR 实验。蛋白抽提试剂盒提取线粒体、胞浆蛋白后,BCA 法进行蛋白质定量。各取 50 μ g 蛋白,加入 6 $\times$ 上样缓冲液,煮沸 5 min,进行 SDS-PAGE,电泳完毕,湿转至硝酸纤维素滤膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,加入 p-ERK1/2(1:800)兔单克隆抗体,4℃ 过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000),室温孵育 1 h,TBST 洗涤 4 次,每次 15 min,ECL 显影。以 β -actin 为内参照。采用 GDS-8000 型凝胶成像分析系统测量各阳性条带的光密度,将各组阳性条带与相应的 β -actin 条带光密度比值作为其蛋白的相对表达量进行半定量分析。

1.3 统计学分析

组织细胞的 mRNA 表达率和蛋白表达率均用% 表示。所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one way-ANOVA),结果以 $P<0.05$ 为有统计学意义,使用 SPSS 13.0 软件进行数据处理。

2 结果

2.1 海洛因暴露后子鼠的体重变化

Sal 组与 Her 组相比,动物的体重无明显变化($P>0.05$,图 1)。

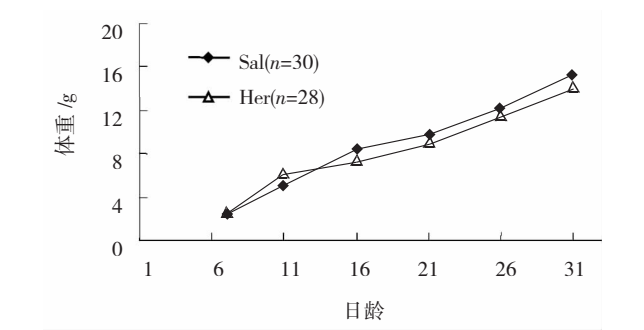


图1 海洛因暴露对生后小鼠体重的影响 两组比较差异无显著性, $P>0.05$ 。

2.2 海洛因暴露小鼠前额叶皮层、海马和伏核 ERK1/2 mRNA 表达的变化

RT-PCR 检测,分析各组间相应电泳条带的平均光密度值,以 β -actin 作内参基因,调整后进行半定量分析。与 Sal 组相比,Her 组动物的前额叶皮层(PFC),海马(HP)和伏核(Acb)三个脑区组织的 ERK1/2 mRNA 的表达无明显改变($P>0.05$,图 2)。

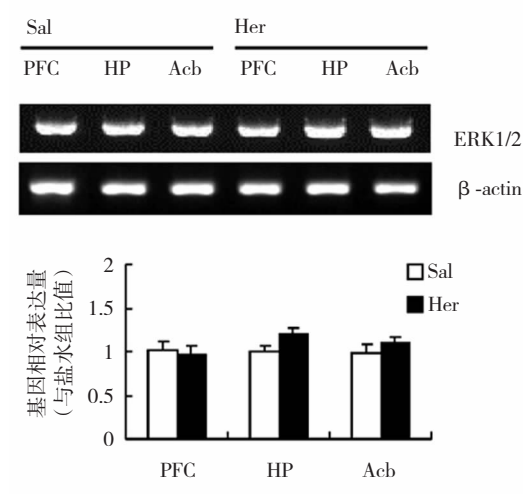


图 2 海洛因暴露对 PFC、HP 和 Acb p-ERK1/2 MAPK mRNA 表达的影响 ($n=20$) 两组间比较差异无显著性, $P>0.05$ 。

2.3 海洛因暴露小鼠 PFC、HP 和 Acb 脑区 p-ERK1/2 蛋白表达的变化

Western blot 检测,分析各组间相应蛋白带的平均光密度值,以 β -actin 作内参蛋白,调整后进行半定量分析。与 Sal 组相比,Her 组动物的 PFC,HP 和 Acb 三个脑区组织的 p-ERK1/2 MAPK 蛋白表达均无显著改变($P>0.05$,图 3)。

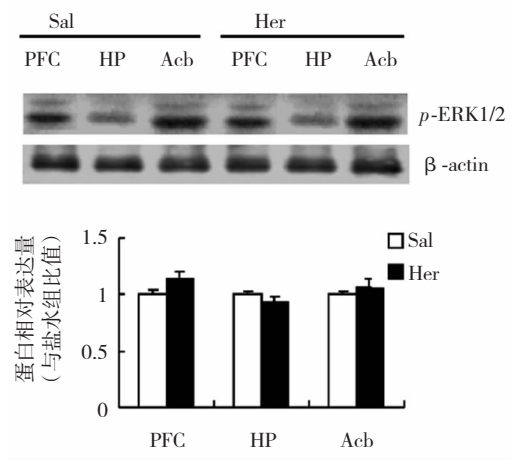


图 3 海洛因暴露对 PFC、HP 和 Acb p-ERK1/2 MAPK 蛋白表达的影响 ($n=20$) 两组间比较,差异无显著性, $P>0.05$ 。

3 讨论

药物成瘾研究有东西方地域性差异,西方多见可卡因滥用导致成瘾,而国内多见海洛因滥用导致成瘾。截止目前,海洛因对成熟个体作用的流行病学、影像学以及基于动物的研究资料较为丰富,在细胞学上也取得了一定的研究成果,但对海洛因发育毒性的研究目前仍很匮乏。有文献在 2003 年报道海洛因可导致子代空间学习记忆缺损,但截止目前仍处于研究结果的积累阶段,并没有出现明确、系统的学说,因此,对海洛因导致子代认知缺陷的研究仍有很大的挑战 and 空间。

本研究采用了文献[7]建立的海洛因暴露小鼠模型,妊娠第 9~18 天每日皮下注射 10 mg/kg 海洛因,对照组则注射生理盐水。此剂量的海洛因处理是母鼠可以维持妊娠,无死亡和无妊娠早期胚胎吸收、胎鼠生后可以存活的最大耐受剂量。妊娠 18 d 后结束用药是为避免分娩期间母鼠和子鼠的戒断反应,以及母鼠哺乳等母性行为缺陷而影响小鼠发育的因素。基于以上实验设计,本研究发现子鼠的体重在海洛因组和生理盐水组中无明显变化,提示其体格发育无明显异常,而文献报道的水迷宫任务缺陷可能主要由海马发育受损而造成^[7]。

中枢神经系统中,ERK1/2 在神经元胞核、胞浆和突起上均有表达,在学习记忆相关脑区的分布尤其丰富,如皮层和海马。在伏核的表达也较丰富。ERK1/2 的激活是海马、皮层 LTP 诱导和维持的必要条件,对 LTP 起正性调节作用^[5,6];ERK1/2 也是多种记忆行为所必需的信号元件^[8],如空间记忆、情景恐惧记忆、条件性味觉厌恶记忆和目标识别记忆等;另外,ERK1/2 的激活可以调节海马树突蛋白的合成、树突棘的结构与变化^[9,10],这些都与长时记忆有关;结合 Szapiro^[11] 的研究发现,ERK1/2 MAPK 和 cAMP 介导的信号通路是海马实现记忆提取过程所必需的,我们推测,子代海马功能障碍可能是由 ERK1/2 MAPK 以外的通路,如 cAMP 介导的通路所发生。

在成瘾记忆研究中,ERK1 敲除小鼠纹状体依赖的长期记忆明显加强,同时伏核记录到增强的长时程电位(LTP)^[12],注射 ERK 抑制剂 UO126 后,动物的短时记忆未受明显影响,但长时记忆的保持和学习功能被阻断^[13];中央杏仁核神经元 ERK MAPK 信号通路介导了大鼠可卡因的寻求与复吸行为,对戒断后渴求的形成起关键作用^[14],这些结果提示,

成瘾记忆相关脑区的 ERK 表达与学习记忆和成瘾行为的关系非常密切。本研究发现,ERK1/2 在前额叶皮层和伏核中无改变,提示这些与成瘾记忆相关的脑区可能不存在 ERK1/2 信号通路参与的病理学过程。

本研究中未见 ERK1/2 MAPK 基因和蛋白在子鼠学习记忆和成瘾相关脑区表达的变化,其可能原因如下:①ERK1/2 MAPK 通路可能未参与10 mg/kg 海洛因处理对发育脑和认知行为的损伤,该损伤可能是由 ERK1/2 MAPK 通路以外的作用途径所导致。②本研究所采用的海洛因处理方法,包括注射 10 mg/kg 剂量、注射方案、妊娠期注射时间、给药方式等,也可能不足以激活 ERK1/2 MAPK 通路。如果加大给药剂量,或以每日递增方式给药,或者延长给药天数等,ERK1/2 MAPK 通路可能会受到影响。以往研究证实,药物成瘾通常具有量效依赖性,给药剂量越大,作用时间越长,动物成瘾行为越容易形成,药物造成的损伤越为广泛和显著,为这种假说提供了支持。③ERK1/2 MAPK 通路参与海洛因对发育脑和认知行为的损伤可能受多种因素调控而呈动态平衡状态。据报道,海洛因对发育脑的作用非常复杂,单在海马,海洛因作用的靶蛋白就涉及多种类型神经递质受体(谷氨酸受体、乙酰胆碱受体和肾上腺素受体等)和激素信号传入所共享的信号级联反应蛋白^[15,16],所以,本研究中不同脑区 ERK1/2 MAPK 的表现可能不仅仅受海洛因的直接作用,还可能受其他诸多因素如激素等的间接影响,以及胞内其他信号通道分子之间的交互调制(cross-talk-ing)^[17,18],最终没有呈现显著性变化。

综上所述,本研究提示发育期海洛因暴露可能不通过 ERK1/2 MAPK 信号通路导致神经行为缺陷。进一步的研究工作要阐明其上下游蛋白、基因和其他激酶,如 Ras、Raf、MEK、CREB、微管相关蛋白-2(MAP2)、突触素等的变化。

[参 考 文 献]

[1] 杨凤瑞,高伟,顾迎莉. 2006 年中国禁毒报告[R]. 国家禁毒委员会报告,2007,2-5.

[2] Walhovd KB, Moe V, Slinning K, Due-Tønnessen P, Bjørnerud A, Dale AM, et al. Volumetric cerebral characteristics of children exposed to opiates and other substances in utero [J]. Neuroim-age, 2007, 36 (4): 1331-1344.

[3] Yanai J, Ben-Shaanan TL, Haimovitch H, Katz S, Kazma M. Mechanism-based approaches for the reversal of drug neurobehav-ioral teratogenicity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1074:659-671.

[4] Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade:a prototype of MAPK signaling [J]. Mol Biotechnol, 2005, 31(2):151-174.

[5] Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory[J]. Curr Opin Neurobiol, 2004, 14(3):311-317.

[6] Feld M, Dimant B, Delorenzi A, Coso O, Romano A. Phospho-rylation of extra-nuclear ERK/MAPK is required for long-term memory consolidation in the crab Chasmagnathus[J]. Behav Brain Res, 2005, 158(2):251-261.

[7] Katz S, Ben-Hur T, Ben-Shaanan TL, Yanai J. Reversal of heroin neurobehavioral teratogenicity by grafting of neural progenitors [J]. J Neurochem, 2008, 104(1):38-49.

[8] Giovannini MG. The role of the extracellular signal-regulated ki-nase pathway in memory encoding [J]. Rev Neurosci, 2006, 17 (6): 619-364.

[9] Nam YJ, Cheon HS, Choi YK, Kim SY, Shin EY, Kim EG, et al. Role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) docking sites on Staufen2 protein in dendritic mRNA transport [J]. Bio-chem Biophys Res Commun, 2008, 372(4):525-529.

[10] Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L. ERK1/2 activation is nec-essary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons [J]. Learn Mem, 2004, 11(2):172-178.

[11] Szapiro G, Vianna MR, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear[J]. Hippocampus, 2003, 13(1):53-58.

[12] Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. Role of MAPKs in development and differentiation; lessons from knockout mice[J]. Biochimie, 2006, 88(9):1091-1098.

[13] Lu L, Hope BT, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, Shaham Y. Central amygdala ERK signaling pathway is critical to incubation of cocaine craving [J]. Nat Neurosci, 2005, 8(2): 212-219.

[14] Cohen-Matsliah SI, Brosh I, Rosenblum K, Barkai E. A novel role for extracellular signal-regulated kinase in maintaining long-term memory-relevant excitability changes[J]. J Neurosci, 2007, 27(46):12584-12589.

[15] Shahak H, Slotkin TA, Yanai J. Alterations in PKCgamma in the mouse hippocampus after prenatal exposure to heroin: a link from cell signaling to behavioral outcome[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2003, 140(1):117-125.

[16] Slotkin TA, Seidler FJ, Yanai J. Heroin neuroteratogenicity: tar-geting adenylyl cyclase as an underlying biochemical mechanism [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2001, 132(1):69-79.

[17] Guilding C, McNair K, Stone TW, Morris BJ. Restored plasticity in a mouse model of neurofibromatosis type 1 via inhibition of hy-peractive ERK and CREB[J]. Eur J Neurosci, 2007, 25(1):99-105.

[18] Schmitt JM, Guire ES, Saneyoshi T, Soderling TR. Calmodulin-dependent kinase kinase/calmodulin kinase I activity gates extra-cellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation[J]. J Neurosci, 2005, 25 (5):1281-1290.

(本文编辑:吉耕中)