

基于 NR2B 基因探讨疏肝与补肾法对吗啡精神依赖
的调节作用及机制 *

宋月晗 李 峰[△] 刘 燕 刘晓兰 刘 洋 焦 莹 赵雪松

(北京中医药大学 北京 100029)

摘要 目的 探讨补肾法与舒肝法对大鼠吗啡精神依赖的调节作用及机制。方法 :使用盐酸吗啡建立大鼠精神依赖模型(conditioned place preference, CPP) ,采用 Obersiver 5.0 行为学软件分析大鼠的 CPP 效应 ,并利用 Real time PCR 方法测定伏核和前额叶皮质内 NR2B 亚基的 mRNA 含量。结果 :与对照组相比 ,模型组大鼠在白侧累积停留时间极显著长于对照组($P<0.01$) ,同时伏核与前额叶皮质中 NR2B 的 mRNA 水平也显著升高($P<0.01$ 和 $P<0.05$) ;与模型组相比 ,补肾组和舒肝组大鼠在白侧的累积停留时间显著下调($P<0.05$) ,疏肝组 NR2B 的 mRNA 也显著下降($P<0.05$) ,而补肾组变化不显著。结论 :①补肾法与舒肝法对吗啡引起的精神依赖均有调节作用。②舒肝法的作用机制可能在于通过影响伏核和前额叶皮质中 NR2B 亚基的 mRNA 表达进一步调节精神依赖的相关神经通路。③补肾法的作用机制与 NR2B 亚基的 mRNA 表达关系不密切 ,其调节的具体机制尚有待研究。

关键词 :中医诊断学 精神依赖 补肾法 舒肝法 NR2B

中图分类号 :Q95-3 R242 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)13-2451-04

Discussion of Liver-Soothing and Kidney-Nourishing Therapy for
Psychological Dependence and Its Mechanism Based on NR2B*

SONG Yue-han , LI Feng[△] , LIU Yan , LIU Xiao-lan , LIU Yang , JIAO Ying , ZHAO Xue-song

(Beijing University of Chinese Medicine Beijing 100029)

ABSTRACT Objective: To analyze the effect and mechanism of liver-smoothing therapy and kidney-nourishing therapy to morphine-induced conditioned place preference. **Methods:** Morphine was injected to set up the conditioned place preference model in rats, Obersiver 5.0 Behavioral Software was used to analyze the time of staying in morphine-paired compartment and real time PCR was used to detect the mRNA of NR2B. **Result:** The morphine model group, compared to the control group, the time of staying in morphine-paired compartment were significantly up regulated ($P<0.01$), and the mRNA of NR2B in nucleus accumbens and prefrontal cortex were up regulated as well ($P<0.01$ and $P<0.05$). Compared to the morphine group, in the liver-smoothing therapy group, both the time of staying in morphine-paired compartment and mRNA were significantly reduced ($P<0.05$), but in the kidney-nourishing therapy, only the time of staying in morphine-paired compartment were significantly reduced ($P<0.01$). **Conclusion:** ①The morphine-induced conditioned place preference can be regulated by both liver-smoothing therapy and kidney-nourishing therapy. ②The regulating mechanism of liver-smoothing therapy to morphine-induced conditioned place preference may be related to the level of mRNA of NR2B in nucleus accumbens and prefrontal cortex. ③The regulating mechanism of kidney-nourishing therapy to morphine-induced conditioned place preference should not be related to the level of mRNA of NR2B in nucleus accumbens and prefrontal cortex.

Key words: Diagnostics of traditional Chinese Medicine; Psychological dependence; CPP; Liver-smoothing therapy; kidney-nourishing therapy; NR2B

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R242 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)13-2451-04

前言

阿片类物质成瘾是一种慢性复发性脑疾病 ,其特征为失去控制能力、强迫性连续用药 ,称为精神依赖 ,研究中常用条件性位置偏爱试验(conditioned place preference, CPP)作为模拟人类精神依赖的动物模型^[1,2]。研究表明 ,伏核和前额叶皮质是参

与精神依赖形成的核心脑区 ,二者之间的谷氨酸能通路一直本领域的研究重点^[3-8]。N- 甲基 -D- 天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)是研究最为深入的兴奋性谷氨酸受体 ,NMDAR 亚单位主要包括 NR1 和 NR2 两大类 ,NR2 包括 NR2A、NR2B、NR2C 与 NR2D 四种 ,研究表明 ,NR2B 在吗啡条件位置偏爱的中发挥着重要作用^[9-12]。课题组结合中医界对

* 基金项目 教育部高等学校博士点专项科研基金(教师类)(20070026001)

作者简介 宋月晗 ,女 ,博士 ,讲师 ,主要研究方向 :证候的病理生理基础研究

[△]通讯作者 李峰 ,男 ,博士生导师 ,教授 ,电话 :010-64286153 ,E-mail: lifeng95@vip.sina.com

(收稿日期 :2011-03-21 接受日期 :2011-04-18)

精神依赖的相关认识,通过古今文献梳理认为,精神依赖与肝、肾二脏关系密切,因此本研究复制条件位置偏爱模型,分别选择舒肝中药与补肾中药,运用行为学及 real time PCR 等方法,将 NR2B 作为研究靶点,探讨补肾法、舒肝法对吗啡精神依赖的调节作用及调节机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

实验用健康 Sprague-Dawley (SD) 同系雄性大鼠 (200±20g)67 只,购自北京维通利华实验动物中心,八周龄左右,级别为 SPF,许可证号 SCXK-京 2007-0001。饲养于动物房,室内温度保持为 22±2℃,相对湿度保持为 30-40%,喂养常规饲料,自由进食饮水。大鼠随机分为四组,对照组 17 只、模型组 17 只、补肾组 17 只和舒肝组 16 只。对照组只注射生理盐水;模型组注射吗啡建立条件位置偏爱模型,补肾造模的同时灌服补肾中药,疏肝组造模的同时灌服疏肝中药,具体造模及灌药方法见 1.4。

1.2 实验用药

补肾方以制附片、熟地、山萸肉、五味子为主药组成,疏肝方以柴胡、元胡、枳壳、赤芍、白芍为主药组成,上述药物选自在治疗戒断综合症中临床疗效显著的中药方剂“虎门合剂”^[14]。各方均为北京同仁堂药店特级中药饮片,由北京创立科创医药技术开发有限公司严格制成浓缩膏,按人体用药量换算成大鼠等效剂量作为大鼠的用药量。实验用盐酸吗啡注射液购自沈阳第一制药厂(批号:050907),规格为 1ml:10 mg。

1.3 主要实验设备

CPP 行为学装置,包括行为学研究装置和 CPP 箱。行为学研究装置购自荷兰 NODULE 公司,包括计算机、摄像头、行为学分析软 Obersiver 5.0, CPP 箱自制,体积为 60cm×30cm×30cm (长×宽×高)木箱,箱内中段有一块 30cm 高可抽取隔板,将实验箱隔成两个完全相同大小的小方箱,将隔板抽起后,大鼠可在两个箱体之间自由活动。一个小方箱内壁为黑色,底面较光滑,另一个为白色,底面粗糙,因此,整个实验箱具有视觉和触觉两种线索。

1.4 大鼠 CPP 模型的建立及评定

CPP 实验分为预测试、训练、测试 3 个阶段,在整个实验过程中保证箱内光线、色调、气味等环境条件的一致。条件性位置偏爱(CPP)实验分为 3 个阶段:预试阶段、训练阶段、测试阶段。预试阶段:第 1 天,将偏爱箱中间的隔板打开,把大鼠放在偏爱箱的中间地带,让其在偏爱箱中自由跑动 15min,记录大鼠在每个箱体中停留的累计时间,根据非倾向性实验设计原理选择非偏爱箱为伴药箱,在本实验条件下,大鼠对黑箱表现出天然偏爱,因此选择白箱为伴药箱,根据记录的累计时间,其中对照组、补肾组各有 1 只被剔除(在白箱中的停留时间分别为 780s 和 650s),其余大鼠在白箱中的停留时间均在 300s 以下,全部符合要求。训练阶段:测试后的第 2 至第 11 天,用隔板封闭黑白箱通道,模型组、补肾组与舒肝组大鼠每天上午 8 点开始,皮下注射(sc)盐酸吗啡后放入白箱,注射剂量分别为 10mg·kg⁻¹,下午 2 点开始 sc 等剂量生理盐水后放入黑箱,对照组大鼠每天上午 sc 生理盐水后放入白箱,下午 sc 生理盐水后放入黑箱。补肾组和舒肝组每天于注射吗啡前一小时分别灌服相应的中药,对照组和模型组灌服相应的生理盐水。大鼠每次的训练时间为 50min,而且每天的训练时间固定。测试阶段:在训练完成后的第 1 天进行测试,测试时将隔板打开,把大鼠放在偏爱箱的中间地带,让其在偏爱箱中自由跑动,启动计算机程序,开启录像装置,对大鼠黑、白箱自由运动记录 15min,然后采用 Obersiver 5.0 行为学软件对大鼠在白箱内的停留时间进行分析。

1.5 Real time PCR 流程

大鼠完成行为学测试后,每组随机取出 5 只大鼠,首先用 2%的戊巴比妥钠腹腔注射将大鼠深度麻醉,然后迅速断头,在超净台内冰上取脑,分别剥离出左右两侧的伏核和前额叶皮质,放入 1.5ml 灭菌的离心管中,放入用液氮冰冻 40min,迅速转移到 -70℃的低温冰箱中,待 real time PCR 检测。从 -70℃中取出组织置于冰上,提取样品的 RNA,进行 RNA 质量检测,进行变性琼脂糖凝胶电泳测定,于凝胶紫外分析仪观察到 28S 和 18S 核糖体 RNA 的带非常亮而浓,继而进行引物的合成和设计(见表 1),将提取的 RNA 进行 cDNA 合成,绘制标准曲线,配置的 PCR 反应溶液在 real time PCR 仪上进行 PCR 反应。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Sequence for real-time PCR

	双向引物序列 Aligning primer	退火温度(℃) Annealing temperature(℃)	产物长度(bp) Product length(bp)
β-actin	F:5'CCTCTATGCCAACACAGTGC3'	59	211
	R:5'GTACTCCTGCTTGCTGATCC3'		
NR2B	F:5'TTCTGCCTTCTTAGAGCCATT3'	59	224
	R:5'TCTGCACAGGTACGGAGTTG3'		

1.6 数据统计

定量数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验。运用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,以 P<0.05 为差异显著, P<0.01 为差异非常显著。

2 结果

2.1 条件位置偏爱行为测试

条件位置偏爱行为测试结果显示:在白侧累积停留时间,训练前测试结果各组大鼠无显著差异,训练后模型组极显著长于对照组, P<0.01,大鼠表现出显著的条件位置偏爱性,表明吗啡精神依赖模型建立成功,补肾组、舒肝组与模型组相比则显著下降, P<0.05,表明补肾法和舒肝法对吗啡精神依赖均有

调节作用。

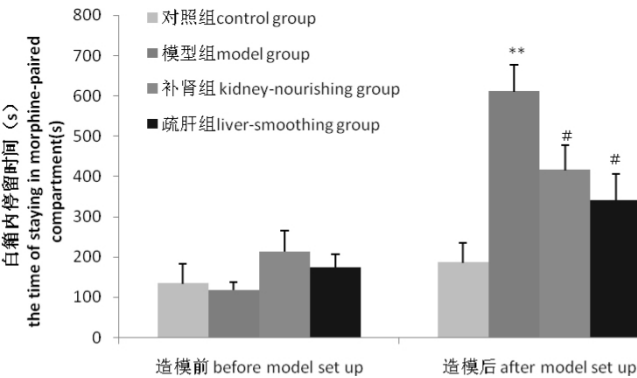


图1 舒肝法、补肾法对条件位置偏爱行为的调节作用
Fig. 1 The regulation of kidney-nourishing and liver-smoothing therapy to CPP

注 : **表示与对照组相比 $P<0.01$ #表示与模型组相比 $P<0.05$
Note : ** $P<0.01$ model group compared with control group # $P<0.05$ kidney-nourishing or liver-smoothing group compared with model group

2.2 伏核和前额叶皮质内 NR2B 的基因表达

NR2B 的基因表达 伏核中 ,模型组与对照组相比极显著升高 $P<0.01$,补肾组与模型组相比无显著差异 ,疏肝组与模型组相比显著下降 $P<0.05$,前额叶皮质中 ,模型组与对照组相比也显著升高 $P<0.05$,补肾组与模型组相比无显著差异 ,疏肝组与模型组相比显著下降 $P<0.05$,如图 2 所示 :

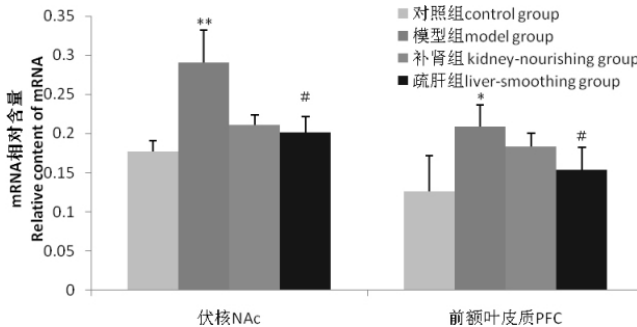


图2 伏核与前额叶皮质中 NR2B 的 mRNA 表达
Fig. 2 The mRNA of NR2B in NAc and PFC

注 : **表示与对照组相比 $P<0.01$, *表示与对照组比较 $P<0.05$ #表示与模型组相比 $P<0.05$
Note : ** $P<0.01$ model group compared with control group , * $P<0.05$ model group compared with control group # $P<0.05$ kidney-nourishing or liver-smoothing group compared with model group

3 讨论

CPP 是模拟人类阿片类物质精神依赖的常用动物模型^[1,2] ,本研究参考相关文献使用吗啡复制该模型 ,数据显示 ,大鼠在白箱中的停留时间极显著高于对照组 ,如图 1 所示 ,表明复制模型成功 ,在此基础上 ,本研究进一步运用补肾法和舒肝法进行干预 ,结果表明两种方法对模型组都有明显的调节作用 ,支持了本研究前期形成的理论假说“阿片类物质精神依赖与肝肾功能失调密切相关” ,在本领域学者对阿片类物质成瘾与中医

肾阳虚密切相关的判断的基础上^[15-18] ,进一步发展了肝与本病的关系。

在行为学研究的基础上 ,本研究进一步探讨了舒肝法与补肾法对阿片类物质精神依赖调节的可能机制 ,研究认为阿片类物质精神依赖的核心病机在于相关脑区的长时程变化(LTP)^[3-4] ,伏核接受来自于前额叶皮质、海马以及杏仁核等的谷氨酸能锥体神经元投射 ,与激励动机、奖赏效应等有关 ,被认为是阿片类物质精神依赖形成的最终通路 ,前额叶皮质是情绪记忆 ,认知执行功能的关键脑区 ,通过与伏核间密切的纤维联系在精神依赖中发挥着重要作用^[5-8]。NR2B 亚基是引起长时程效应的最为重要的分子之一 ,本研究选择伏核与前额叶皮质 ,进一步探讨了舒肝法和补肾法对该模型中 NR2B 基因的调节作用。Real time PCR 研究结果显示 ,在吗啡条件位置偏爱模型组中 ,伏核与前额叶皮质中 NR2B 的 mRNA 表达量增加 ,相关研究认为 NR2B 的上调可以使脑内发生长时程效应增强 ,成为引起精神依赖的关键因素^[9-13] ,另外 ,因多巴胺能和谷氨酸能神经末梢的位置紧邻并支配同一突触后神经元 ,NR2B 表达的增高还会增加多巴胺能神经元的活性^[19] ,成为引起精神依赖形成的又一因素。对舒肝法和补肾法对本模型中 NR2B 亚基 mRNA 的调节作用显示 ,相对于模型组 ,舒肝法可使伏核和前额叶皮质内 NR2B 亚基显著下调 ,而补肾法则改善作用不明显 ,因此推断舒肝法可能通过影响 NR2B 亚基调节伏核与前额叶皮质内相关神经通路的变化来改善吗啡引起的精神依赖效应 ,而补肾法可对吗啡引起的精神依赖有调节作用 ,但与 NR2B 亚基 mRNA 改变关系不明显 ,可能是通过其它通路发生变化 ,有待进一步的研究。

4 结论

补肾法与舒肝法对吗啡引起的精神依赖均有调节作用 ,对于二者调节作用的机制 ,本研究认为 ,舒肝法可通过影响伏核和前额叶皮质中 NR2B 亚基的 mRNA 表达来进一步调节精神依赖相关神经通路 ,而补肾法的作用机制与 NR2B 亚基的 mRNA 表达关系不密切 ,其具体机制有待进一步研究。

参考文献(References)

[1] Popik P, Danysz W. Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, memantine [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 280(2): 854-865

[2] Papp M, Gruca P, Willner, et al. Selective blockade of drug-induced place preference conditioning by ACPC, a functional NDMA-receptor antagonist [J]. Neuropsychopharmacology, 2002, 27(5): 727-743

[3] Robinson TE, Kolb B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse [J]. Neuropharmacology, 2004, 47(1): 33-46

[4] Robinson TE, Gorny G, Savage VR, et al. Widespread but regionally specific effects of experimenter-versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats [J]. Synapse, 2002, 46(4): 271-279

[5] Robinson TE, Kolb B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse [J]. Neuropharmacology, 2004, 47(1): 33-46

[6] Mu P, Moyer JT, Ishikawa M, et al. Exposure to cocaine dynamically regulates the intrinsic membrane excitability of nucleus accumbens neurons [J]. J Neurosci, 2010, 30(10): 3689-3699

- [7] Alcantara AA, Lim HY, Floyd CE, et al. Cocaine-and morphine-induced synaptic plasticity in the nucleus accumbens [J]. Synapse, 2011, 65(4): 309-320
- [8] Chaudhri N, Sahuque LL, Schairer WW, et al. Separable roles of the nucleus accumbens core and shell in context- and cue-induced alcohol-seeking [J]. Neuropsychopharmacology, 2010, 35(3): 7837-7891
- [9] Khan AM, Curr á s MC, Dao J, et al. Lateral hypothalamic NMDA receptor subunits NR2A and/or NR2B mediate eating: immunochemical/behavioral evidence [J]. Am J Physiol, 1999, 276(3): 880-891
- [10] Ma YY, Guo CY, Yu P, et al. The role of NR2B containing NMDA receptor in place preference conditioned with morphine and natural reinforces in rats [J]. Exp Neurol, 2006, 200(2): 343-355
- [11] Narita M, Aoki T, Suzuki T. Molecular evidence for the involvement of NR2B subunit containing N-methyl-D-aspartate receptors in the development of morphine-induced place preference [J]. Neuroscience, 2000, 101(3): 601-606
- [12] Ma YY, Chu NN, Guo CY, et al. NR2B-containing NMDA receptor is required for morphine-but not stress-induced reinstatement [J]. Exp Neurol, 2007, 03(2): 309-319
- [13] Zhou JY, Mo ZX, Zhou SW. Rhynchophylline down-regulates NR2B expression in cortex and hippocampal CA1 area of amphetamine-induced conditioned place preference rat [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(4): 557-565
- [14] 杨维益, 王晓忠, 李峰. 中药戒毒的临床和理论研究 [J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(4): 47-48
Yang Weiyi, Wang Xiaozhong, Li Feng. Clinical and theoretical research of Chinese medicine to drug abuse [J]. Journal of Beijing University of TCM, 1996, 19(4): 47-48
- [15] 刘菊妍, 周仲瑛. 肾虚阳损与阿片类药物依赖戒断症状的关系 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 1999, 18(1): 19-20
Liu Jiuyan, Zhou Zhong Ying. The relation of Kidney yang deficiency and opioid withdrawal symptoms [J]. Chinese Journal of Drug Abuse Prevention and Treatment, 1999, 18(1): 19-20
- [16] 赵宁侠, 郭瑞林, 任秦有, 等. 吸食阿片类毒品对下丘脑-垂体-靶腺轴功能影响及与中医肾虚相关关系研究 [J]. 浙江中医学院学报, 2002, 26(3): 23-24
Zhao Ningxia, Guo Ruilin, Ren Qinyou, et al. Research on influence of the Drug Addicts' Hypo-pituitary-gonad and Hypo-pituitary-thyroid Axis from Traditional Chinese Medicine [J]. Journal of Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, 2002, 26(3): 23-24
- [17] 宋月晗, 李峰, 刘燕, 等. 阿片类药物戒断者康复期证候分布特征 [C]. 中华中医药学会中医诊断学分会第十次学术研讨会论文集. 中国陕西: 中华中医药学会, 2009: 14-18
Song Yuehan, Li Feng, Liu Yan, et al. Syndromes in rehabilitation of opium withdrawal [C]. Proceedings in tenth conference of Diagnosis branch of Chinese Association of Chinese Medicine. Shanxi, China: China association of Chinese Medicine, 2009: 14-18
- [18] 李树春, 朱志慧, 崔箭, 等. 海洛因依赖稽延性戒断综合征的证候特点 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 682-683
Li Shuchun, Zhu Zhihui, Cui Jian. Characteristics of Symptoms in Protracted Abstinence Symptom of Opium-addicts [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(3): 682-683
- [19] Beninger RJ, Miller R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1998, 22(2): 335-345

(上接第 2463 页)

- [6] Cunningham FC, Gant NF, Leveno KJ, et al. Williams Obstetrics (21st ed) [M]. New York: McGraw-Hill Com. Inc, 2001: 569-570
- [7] 张超, 曾浩霞, 王山米, 等. 早发型重度子痫前期待治疗妊娠结局的多因素分析 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2008, 9(6): 415-419
Zhang-chao, Zeng Hao-xia, Wang Shan-mi, et al. Multivariate analysis on the pregnancy outcomes after expectant management of early-onset severe pre-eclampsia [J]. Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology, 2008, 9(6): 415-419
- [8] 王慕逖. 儿科学 (第 5 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 108.
Wang Mu-di. Pediatrics (Version 5) [M]. BeiJing: People's Medical Publishing House, 2001: 108
- [9] 杨孜, 王伽略, 黄萍, 等. 重度子痫前期终末器官受累不平行性及其围产结局探讨 [J]. 中华围产医学杂志, 2006, 9(1): 10
Yang-zi, Wang Jia-lue, Huang-ping, et al. Study on unparalleled damage of end organs in severe preeclampsia and perinatal outcomes [J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2006, 9(1): 10
- [10] 曹泽毅, 主编. 妇科常见肿瘤诊治指南 (第 2 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 47-52
Cao Ze-yi. The guide of diagnosis and treatment in comm on gynecological tumors (Version 2) [M]. BeiJing: People's Medical Publishing House, 2007: 47-52
- [11] Abeler VM, Kjørstad KE. Endometrial adenocarcinoma in Norway. A study of a total population [J]. Cancer, 1991, 67: 3093-3103
- [12] 凌奇. 早发型重度子痫前期母婴预后临床分析 [J]. 中国医药指南, 2010, 8(35): 272-274
Ling-qi. The clinical analysis of maternal and infant outcomes in the early onset severe preeclampsia [J]. Guide of China Medicine, 2010, 8(35): 272-274
- [13] 李玲, 王冬梅. 早发型重度子痫前期发病及临床特点 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17(5): 166-167
Li-ling, Wang Dong-mei. The incidence of early onset severe preeclampsia and the clinical features [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2009, 17(5): 166-167
- [14] Heikila A, Tuomisto T, Hakkinen SK, et al. Tumor suppressor angrowth regulatory gene are overexpressed in severe early-onset preeclampsia an array study on case-specific human preeclampsia placental tissue [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2005, 84(7): 679-689
- [15] Kadyrov M, Kingdom JC. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction [J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194(2): 557-563
- [16] Zhong XY, Gebhardt S, et al. Parallel assessment of circulatory fetal DNA and corticotropin-releasing hormone RNA in early- and late-onset preeclampsia [J]. Clin Chem, 2005, 51: 1730-1733
- [17] Gupta AK, Gebhardt S, Hillermann R, et al. Analysis of plasminogen activator levels in early and late onset preeclampsia [J]. Arch Gynecol Obstet, 2006, 273: 239-242
- [18] Itoh Y, Suzuki Y, et al. Increased in serum concentrations of inhibin in early onset preeclampsia with intrauterine growth restriction [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2006, 32(1): 80-85