

精神依赖药物成瘾模型建立及小脑 Bax 基因的表达^{*}

谢明仁 俞发荣

(甘肃政法大学 甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室, 兰州 730070)

摘要:目的 研究精神依赖药物(海洛因)对成瘾大鼠小脑 Bax 基因表达的影响。方法 采用剂量递增法建立成瘾大鼠模型,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测小脑细胞 Bax 的基因的表达。结果 连续给大鼠注射海洛因 7 d 后,大鼠出现明显的戒断症状;小脑细胞 Bax、Caspase-3、Caspase-9 水平比对照组分别升高了 88.21%、94.21%、87.24%,与对照组比有显著性差异($P < 0.01$)。结论 精神依赖药物(海洛因)对脑组织细胞的损伤作用可能通过诱导小脑 Bax 基因表达,激活 caspase 实现。

关键词:精神依赖药物;海洛因;Bax;小脑;大鼠

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0006-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.002

精神依赖物质(海洛因)的滥用与造成机体所有系统器官的毒性损伤作用有关。从偶尔的喜好活动过渡到长期的滥用和成瘾,大多数成瘾者的复发,即使经过长时间的禁欲,几乎没有有效和确定的治疗机会^[1]。精神依赖药物成瘾不但危害成瘾者自身的身心健康,还会造成严重的社会问题^[2]。有关海洛因成瘾对大脑组织的损伤作用方面研究较多^[3],小脑与大脑、脑干和脊髓之间丰富的传入和传出联系,参与躯体平衡和肌肉张力(肌紧张)的调节,以及随意运动的协调。小脑损伤,机体的肌肉张力就会减退,随意运动的协调性出现紊乱。因此,为了探索小脑在精神依赖药物(海洛因)成瘾和戒断中的作用,建立精神依赖药物成瘾动物模型,为进一步研究精神依赖药物成瘾机制,为戒毒制定新的、有效的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:SPF 级 Wistar 大鼠,由甘肃中医药大学科研实验中心提供,实验动物生产许可证号[SCXK

(甘)2015—0001],实验在甘肃政法学院 SPF 级实验室进行,实验动物使用许可证号[SYXK(甘)2015—0006]。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》规定,按 3R 原则给予实验动物以人道关怀(伦理委员会审批号码:GZF—2018—003)。

海洛因:为白色粉末,纯度为 86.8%,由兰州市公安厅禁毒办提供,实验时用灭菌蒸馏水配成所需要的浓度。盐酸纳洛酮,北京四环医药科技股份有限公司生产,批号:1806152;大鼠凋亡因子 Bax 试剂盒、大鼠 Caspase-9 试剂盒、大鼠 Caspase-3 试剂盒,购于上海纪宁实业有限公司;MK3-酶标仪,上海仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物处理:取 SPF 级 Wistar 大鼠 20 只(雄性),体质量 185~190 g。全部动物在 SPF 级实验室 IVC 饲养盒饲养,自由饮食进水,明暗周期 12 h,单笼饲养。动物房温度 22~24℃,湿度 55%~65%,适应 7 d。动物随机分为 2 组,每组 10 只。对照组:肌肉注射生理盐水 10 mL/kg,每天 2 次;海洛因组:给予海洛因、纳洛酮的方法、剂量以及持续时

收稿日期:2018-12-14

^{*} 基金项目:甘肃省高校科技创新团队项目(No.2016C-09);兰州市人才创新创业项目(No.2016-RC-85);甘肃省证据科学特色学科项目;甘肃省自然科学基金项目(No.17JR5RA158);兰州市科技计划项目(No.2015-3-80)

作者简介:谢明仁(1977—),男,副教授,研究方向:实验动物研究与应用.E-mail:xmr@gsl.edu.cn

通信作者:俞发荣(1959—),男,博士,研究员,研究方向:病理学、药理学和实验动物学.E-mail:Tim9898@163.com

间均按文献^[4]操作。第 15 天腹腔注射盐酸纳洛酮(纳洛酮是吗啡样物质受体特异拮抗剂,能迅速翻转吗啡作用,采用该药的目的是观察是否出现戒断症状,判断成瘾模型建成与否),待观察完戒断症状后取样。

1.2.2 取样:实验第 15 天,动物经乙醚吸入无痛麻醉,打开胸腔,从左心室推注生理盐水 100 mL,冲去血液,用 4% 多聚甲醛-1.25% 戊二醛磷酸缓冲液 (pH7.4)灌注固定,剥取大鼠小脑皮层组织 5 mg,研磨成匀浆,3 000 r/min 离心 20 min,取上清用,以标准物的浓度为横坐标,吸光度 (A) 为纵坐标,在 540 nm 波长下,绘出标准曲线和标准曲线的直线回归方程。分别将大鼠小脑组织 A 值代入直线回归方程,计算出样品的浓度。

表 1 海洛因成瘾戒断症状($\bar{x}\pm s,n=10$)及评分标准

戒断症状	评分标准			对照组(评分)	海洛因组(评分)
	1 分	2 分	3 分		
扭体	1~3	4~6	≥ 7	0	$7.4\pm 1.2^{**}$
湿狗样抖	1~3	4~6	≥ 7	0	$113.2\pm 1.1^{**}$
跳跃	1~3	4~6	≥ 7	2.2 ± 0.6	$10.2\pm 1.6^{**}$
咬牙	1~3	4~6	≥ 7	0	$5.2\pm 1.4^{**}$
站立	1~3	4~6	≥ 7	3.1 ± 0.4	$21.6\pm 1.8^{**}$
清理皮毛	1~3	4~6	≥ 7	4.2 ± 0.4	$24.1\pm 3.7^{**}$
上睑下垂	1~4	5~8	≥ 9	0	$8.2\pm 1.4^{**}$

注:与对照组比: ** $P<0.01$
Note:compared with the control group: ** $P<0.01$

2.2 海洛因对大鼠小脑组织 Bax 水平的影响

Bax 标准曲线的直线回归方程为: $Y=6.3\times 10^{-3}x+1.4\times 10^{-2}$, $R^2=0.9979$ 。将大鼠小脑组织吸光度 (A) 代入方程,成瘾大鼠小脑组织 Bax 水平比对照组升高了 88.21%,图 1。

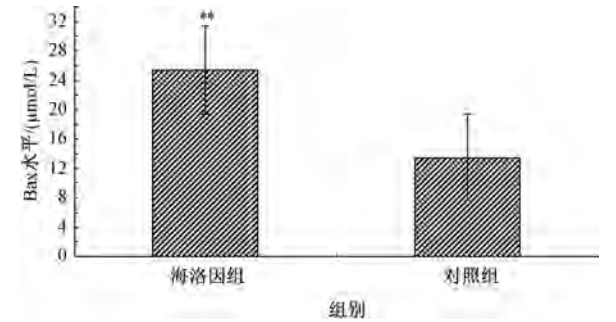


图 1 海洛因对大鼠小脑组织 Bax 水平的影响
注:与对照组比: ** $P<0.01$
Fig.1 Effect of heroin on Bax level in cerebellum tissue of rats
Note:compared with the control group ** $P<0.01$

1.3 统计方法

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。组间差异采用单因素方差分析,用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,海洛因对大鼠小脑组织 Bax 水平的影响程度用百分比表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成瘾大鼠戒断症状

按 Maldonad 法评分,给予盐酸纳洛酮 1 h 后,大鼠出现扭体、湿狗样抖、咬牙、跳跃、站立、上睑下垂、清理毛发等戒断症状,成瘾动物模型建立成功,表 1。

表 1 海洛因成瘾戒断症状($\bar{x}\pm s,n=10$)及评分标准

戒断症状	评分标准			对照组(评分)	海洛因组(评分)
	1 分	2 分	3 分		
扭体	1~3	4~6	≥ 7	0	$7.4\pm 1.2^{**}$
湿狗样抖	1~3	4~6	≥ 7	0	$113.2\pm 1.1^{**}$
跳跃	1~3	4~6	≥ 7	2.2 ± 0.6	$10.2\pm 1.6^{**}$
咬牙	1~3	4~6	≥ 7	0	$5.2\pm 1.4^{**}$
站立	1~3	4~6	≥ 7	3.1 ± 0.4	$21.6\pm 1.8^{**}$
清理皮毛	1~3	4~6	≥ 7	4.2 ± 0.4	$24.1\pm 3.7^{**}$
上睑下垂	1~4	5~8	≥ 9	0	$8.2\pm 1.4^{**}$

注:与对照组比: ** $P<0.01$
Note:compared with the control group: ** $P<0.01$

2.3 海洛因对大鼠小脑组织 Caspase-9 水平的影响

Caspase-9 标准曲线的直线回归方程为: $Y=1.4\times 10^{-3}x+4.43\times 10^{-2}$, $R^2=0.998$ 。将大鼠小脑组织吸光度 (A) 代入方程,成瘾大鼠小脑组织 Caspase-9 水平比对照组升高了 87.24%,图 2。

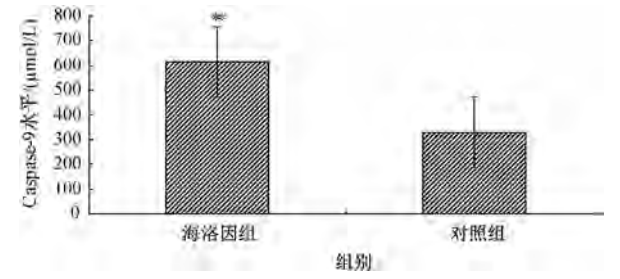


图 2 海洛因对大鼠小脑组织 Caspase-9 水平的影响
注:与对照组比: ** $P<0.01$
Fig.2 Effect of heroin on Caspase-9 level in cerebellum tissue of rats
Note:compared with the control group: ** $P<0.01$

2.4 海洛因对大鼠小脑组织 Caspase-3 水平的影响

Caspase-3 标准曲线的直线回归方程为: $Y = 5.0 \times 10^{-4}x + 5.2 \times 10^{-3}$, $R^2 = 0.999$ 。将大鼠小脑组织吸光度(A)代入方程,成瘾大鼠小脑组织 Caspase-3 水平比对照组升高了 94.21%,图 3。

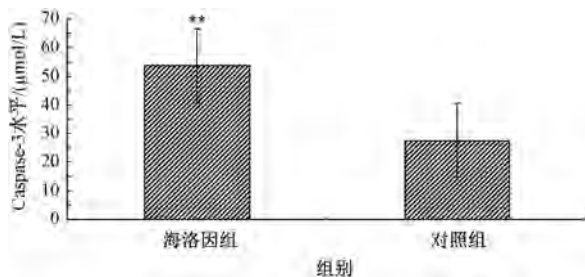


图 3 海洛因对大鼠小脑组织 Caspase-3 水平的影响

注:与对照组比: ** $P < 0.01$

Fig.3 Effect of heroin on Caspase-3 level in cerebellum tissue of rats

Note: compared with the control group: ** $P < 0.01$

3 讨论

海洛因成瘾者抑制控制功能受损是一种持久性的、不可逆的脑损伤^[5],海洛因成瘾致使大脑皮质下中枢灰质体积减少^[6]。功能性磁共振成像(fMRI)研究证明,长期吸食海洛因的成瘾者大脑突显性网络功能连接异常增强^[7],从而引起脑默认网络结构连接和功能连接不同程度破坏^[8]以及颌下腺神经内分泌功能异常^[9]。Bax 基因是一种促进细胞凋亡的基因。人类 Bax 基因定位于染色体 19q13.3~19q13.4,含 6 个外显子,其 C 端含有疏水氨基酸组成的跨膜结构域,Bax 蛋白为整合膜蛋白^[10]。细胞线粒体内外膜之间的通透性转换孔(PTP)具有调节线粒体通透性的作用。正常情况下,PTP 是关闭的。在凋亡诱导因素 Bax 作用下,线粒体跨膜电位降低,PTP 开放,导致线粒体膜通透性增大,使细胞凋亡的启动因子如:细胞色素 C,凋亡蛋白酶激活因子(Apaf)和凋亡诱导因子(AIF)等从线粒体内释放出来。细胞色素 C(Cytc)作为呼吸链中重要的电子传递体^[11],它从线粒体内膜上的释放阻断了电子向下游的传递,危及呼吸链的功能并导致超氧阴离子的加速产生,细胞色素 C 和 Apaf 相

互作用可激活 caspase-9,进而激活 caspase-3,导致细胞凋亡。给予海洛因后,免疫组化实验结果发现,大鼠小脑皮质细胞中 Bax 阳性细胞数明显增多^[4],酶联免疫吸附法(ELISA)检测发现,大鼠小脑皮质细胞中 Bax 表达水平显著升高,caspase-9 和 caspase-3 活性显著增强,与对照组比有显著性差异($P < 0.01$),与前期实验结果相一致。免疫组化法和 ELISA 法检测结果相互验证实验结果。实验结果提示,海洛因成瘾不但与大脑神经中枢有关,而且小脑皮质也参与海洛因成瘾和戒断过程。海洛因可能通过诱导小脑皮质 Bax 基因表达,激活 caspase-9 和 caspase-3,引起小脑皮质细胞凋亡,导致小脑皮质细胞的损伤。本文的实验结果为进一步研究精神依赖药物成瘾机制和戒毒治疗提供新的参考依据。

参考文献

- [1] Kovatsi L, Fragou D, Samanidou V, et al. Drugs of abuse: epigenetic mechanisms in toxicity and addiction [J]. Curr Med Chem, 2011, 18 (12): 1765-1774.
- [2] Yuan J, Liu X D, Han M. Neuroreceptor and its transporters imaging by PET and SPECT in heroin addiction [J]. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear, 2013, 1: 30-33, 41.
- [3] 俞发荣,连秀珍,张红梅,等.儿茶酚胺类激素在海洛因成瘾中的作用[J].中国应用生理学杂志, 2014, 30 (2): 124-126, 131.
- [4] 谢明仁,李作平,俞发荣,等.海洛因对小脑皮质 Bax 表达的影响[J].实验动物科学, 2013, 30 (5): 6-8.
- [5] 杨玲,张更生,赵鑫.海洛因依赖性抑制控制功能的损伤机制及其可逆性[J].心理科学进展, 2014, 22 (3): 439-447.
- [6] 朱佳,王亚蓉,李强,等.海洛因依赖性脑灰质体积的 VBM 研究[J].临床放射学杂志, 2012, 31 (2): 175-179.
- [7] 陈佳杰,刘洁荣,魏璇,等.海洛因成瘾者大脑突显性网络异常的独立成分分析[J].磁共振成像, 2017, 54 (2): 100-104.
- [8] 董健卫,陈艳美,杨水清,等.海洛因成瘾患者静息状态下脑默认网络功能及结构连接的变化[J].中山大学学报(医学科学版), 2015, 36 (6): 801-808, 796.
- [9] 胡赞,梁文妹,李一欣,等.海洛因依赖大鼠颌下腺 IL-1、TNF 表达的改变[J].实验动物科学, 2017, 34 (6): 1-5.
- [10] Oltvai Z N, Millman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerize in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74: 609-619.
- [11] Urszula S H, Lilianna T L. Effect of platinum anticancer drugs on the cytochrome c conformation [J]. Inorganica Chimica Acta, 2017, 457 (1): 130-135.

Expression of Bax Gene in Cerebellum of Rats and Psychodependence Drug Addiction Model Copied

XIE Mingren, YU Farong

(Key Laboratory of Evidence of Science and Technology Research and Application, Gansu Province, Gansu University of
Political Science and Law, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Objective To study the effects of psychotropic drug (heroin) on the expression of Bax gene in the cerebellar of addicted rats. **Method** An addictive rat model was used to establish with a dose-increasing method and the gene expression of Bax in the cerebellar cells was detected by ELISA. **Result** After injecting heroin for 7 days, the rats showed obvious withdrawal symptoms. The levels of Bax, Caspase-3, and Caspase-9 in cerebellar cells were increased 88.21%, 94.21%, and 87.24% respectively, which was significantly different compared with the control group ($P<0.01$). **Conclusion** The damage effect of psychoactive drugs (heroin) on brain tissue cells may be achieved by inducing the expression of cerebellar Bax gene and activating caspase.

Key words: psychotropic drugs; Heroin; Bax; Cerebellum; rats

(上接第 5 页)

High Fat and High Sugar Diet Induced the Fat Model of Bama Miniature Pigs

XIANG Lei^{1,2}, CHEN Hua², ZHAO Deming¹

(1. College of veterinary medicine, china agricultural university, Beijing 100093, China)

(2. Laboratory animal center of PLA general hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective The effects of high fat and high sugar diet (HFHSD) on fat distribution and blood biochemical parameters in Bama miniature pigs. **Method** Fourteen Bama minipigs were divided into two groups. Experimental group pigs fed with high fat and high sugar diet for 30 weeks. Six Bama miniature pigs in control group were fed with normal feed. After 30 weeks, body mass index, fat distribution and biochemical indexes of blood were measured. **Result** The body weight, body mass index (BMI) and total fat content especially visceral fat content increased significantly in experimental group. Blood biochemical indicators of insulin, total cholesterol, high and low density lipoprotein cholesterol, blood creatinine, uric acid and urea were increased significantly compared with control group. **Conclusion** High fat and high sugar diet can cause fat accumulation in Bama miniature pigs, especially visceral fat. Blood biochemistry is characterized by hyperlipidemia and impaired renal function.

Key words: Bama miniature pig; fat distribution; blood biochemistry; type 2 diabetes mellitus