

胡佳佳, 杨转芳, 孙喜喆, 等. 海马 ICAM5 对小鼠饮酒行为的影响及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 1-10.
Hu JJ, Yang ZF, Sun XZ, et al. Effect and mechanism of ICAM5 on alcohol dependence behavior of mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 1-10.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.001

海马 ICAM5 对小鼠饮酒行为的影响及机制研究

胡佳佳, 杨转芳, 孙喜喆, 袁娟娟, 程 燕, 张 宇, 殷丽天*

(山西医科大学基础医学院生理学系, 细胞生理学教育部重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 目的 分析小鼠海马组织中 ICAM5 对小鼠饮酒偏好、运动能力等行为的影响, 并分析其可能的作用机制。方法 选取 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠, 随机将小鼠分为饮水组和饮酒组, 建立双瓶饮酒模型。检测 ICAM5 在小鼠内侧前额叶皮层、海马及杏仁核脑区的表达改变。构建 ICAM5 过表达腺相关病毒, 通过脑立体定位方法注射至海马脑区。通过免疫荧光技术和 Western blot 检测海马组织 ICAM5 的蛋白表达水平。通过旷场实验、条件位置偏爱实验和翻正反射实验, 观察小鼠对酒精的偏好性以及 ICAM5 对小鼠行为的影响。通过 Western blot 检测分析树突棘 F-actin/G-actin 比值, 高尔基染色方法检测树突棘形态。结果 在双瓶饮酒模型中, 与饮水组相比, 饮酒组小鼠海马脑区 ICAM5 的表达显著下降 ($P < 0.001$)。结果显示, 通过荧光显微镜观察到 ICAM5 在小鼠海马脑区特异性表达。在旷场实验中, AAV-ICAM5 组小鼠较对照组小鼠在旷场中心位置停留时间 ($P < 0.01$) 和运动距离明显增加 ($P < 0.001$)。在 CPP 实验中, 测试期 AAV-ICAM5 小鼠在伴药箱的停留时间较对照组小鼠明显降低 ($P < 0.001$)。在 LORR 实验中, 过表达 ICAM5 可以明显降低小鼠镇静潜伏期 ($P < 0.01$), 但同时显著缩短镇静作用的持续时间 ($P < 0.001$)。与 AAV-mCherry+Water 组相比, 饮酒后小鼠海马 F-actin/G-actin 比值显著升高 ($P < 0.01$), 而 ICAM5 过表达后这一比值显著降低 ($P < 0.001$)。与 AAV-mCherry+Water 组相比, 饮酒后小鼠海马 CA1 区树突棘密度增加 ($P < 0.001$), 但是 AAV-ICAM5+Alcohol 组树突棘密度显著降低 ($P < 0.01$)。结论 海马 ICAM5 可能通过调节细胞骨架蛋白的表达, 形成树突棘结构可塑性改变, 最终引起小鼠饮酒和运动行为的改变。

【关键词】 酒精依赖; ICAM5; 海马; 树突棘结构; CPP 模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0001-10

Effect and mechanism of ICAM5 on alcohol dependence behavior of mice

HU Jiajia, YANG Zhuanfang, SUN Xizhe, YUAN Juanjuan, CHENG Yan, ZHANG Yu, YIN Litian*

(Department of Physiology, School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Key Laboratory of Cell Physiology, Ministry of Education, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective We investigated the effects of ICAM5 in the hippocampus on the alcohol drinking preference of mice, and the potential mechanisms. **Methods** An alcohol two-bottle choice model was developed in 8-week-old male C57BL/6J mice, which were randomly divided to two groups: water group and alcohol group. The protein expression of ICAM5 in the hippocampus, amygdala, and medial prefrontal cortex was detected. An ICAM5-overexpressing adeno-associated virus was constructed and injected into the hippocampus by stereotaxic method. The expression level of ICAM5 protein in the hippocampus was detected by immunofluorescence and Western blot. We then detected the alcohol preference and locomotor activity of mice with a conditioned place preference (CPP) experiment, open field test, and loss-of-righting reflex test. Western blot analysis was used to identify the neuron F-actin/G-actin ratio. Using Golgi staining, the

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (81601167); 山西省基础研究计划面上项目 (20210302123304); 山西省研究生科研创新项目 (2023KY390)。

[作者简介] 胡佳佳 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经生理学。E-mail: 19723513100@163.com

[通信作者] 殷丽天 (1982—), 女, 教授, 研究方向: 神经生理学。E-mail: litianyin@sxmu.edu.cn

morphology of dendritic spines was identified. **Results** The expression of ICAM5 in the hippocampus of alcohol two-bottle choice model mice in the alcohol group was considerably lower than that of the water group ($P < 0.001$). The specific expression of ICAM5 in the hippocampus of mice was observed by fluorescence microscopy. In the open field experiment, the staying time and moving distance of the AAV-ICAM5 group were significantly increased compared with those of the control group ($P < 0.01$). In the CPP experiment, the residence time of AAV-ICAM5 mice in the alcohol-paired compartment was significantly lower than that of control mice ($P < 0.001$). In the loss-of-righting reflex experiment, overexpression of ICAM5 significantly reduced sedation latency ($P < 0.01$), but significantly shortened the duration of sedation ($P < 0.001$). Compared with AAV-mCherry+Water group, the ratio of F-actin/G-actin in the hippocampus was significantly increased after drinking ($P < 0.01$), but after ICAM5 overexpression, their F-actin/G-actin ratio was significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with AAV-mCherry+Water group, the density of dendritic spines in the hippocampal CA1 region was increased ($P < 0.001$), but the density of dendritic spines in the AAV-ICAM5+Alcohol group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** ICAM5 modulated the expression of cytoskeleton proteins to change the structural plasticity of dendritic spines, which contributed to alcohol-drinking and locomotor behavioral changes in mice.

【Keywords】 alcohol dependence; ICAM5; hippocampus; dendritic spinous structure; CPP model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

酒精可能是最常被使用的成瘾物质,酒精依赖(成瘾)是多种疾病的高危因素,引起如心血管疾病、多种消化道疾病、记忆力下降及神经系统的不可逆障碍等,还会引发心理疾病^[1]。酒精依赖体现为强迫性饮酒、对酒精的长期需求和戒断后渴求。目前,对于酒精依赖的神经作用机制仍不清楚,也尚无有效的治疗手段^[2]。

酒精的病理生理学机制是神经系统的适应性改变,这一复杂的过程与特定脑区突触结构和功能可塑性改变有关,海马是药物成瘾和复发中的关键脑区。结构可塑性在形态上表现为突触数量和密度的增减、突触类型的变化和树突棘形态的多样性变化等^[3]。树突棘内含高浓度的肌动蛋白,而肌动蛋白的变化会造成树突棘形态结构的改变^[4]。

细胞间粘附分子 5 (intercellular adhesion molecule 5, ICAM5) 属于免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 超家族,在脑组织兴奋性神经元的胞体、树突轴和树突丝/棘中表达^[5-6]。在神经系统中,ICAM5 参与免疫和神经发育功能,是细胞间隙调节突触形成的关键分子。ICAM5 是树突棘成熟的负性调控分子^[7],其表达量和功能活性与树突丝的形成和树突棘的成熟密切相关,调节树突棘的发育、突触可塑性、神经环路形成以及情感与学习记忆^[8]。但其在药物以及酒精依赖中的作用及相关作用机制仍不清楚。

1 材料和方法

1.1 实验动物

由于小鼠性别差异、便于控制和避免混淆等因

素,选用 SPF 级 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 ($n = 60$),体重 20~25 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],适应 1 周后进行手术或检测。所有小鼠饲养于山西医科大学生理学系 SPF 级动物房[SYXK(京)2019-0030],控制温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,昼夜循环 12 h/12 h(关灯:19:00),自由进食和饮水,动物设施和饲养符合动物保护原则。所有动物实验均按照中国太原山西医科大学伦理委员会的指导方针进行(2021-024),实验过程中遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

腺相关病毒(AAV-ICAM5)(上海和元生物技术股份有限公司);ICAM5 抗体(英国 Abcam 公司,货号:AB232785);HRP-山羊抗兔 IgG(上海爱必信生物科技有限公司,货号:abs20040ss);F-actin/G-actin *in vivo* assay kit(美国 Cytoskeleton 公司,货号: BK037);FD Rapid GolgiStain™ Kit(美国 FD Neuro Technologies 公司,货号:PK401);超敏 ECL 化学发光液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:17L12B71、17K01A46);无水乙醇、甲醇(天津市致远化学试剂有限公司,批号:20230901、20230801)。

PVDF 膜(德国 Merk millipore 公司);脑立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技股份有限公司);电泳仪、电泳槽、半干转印槽、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);旷场实验设备(成都泰盟软件有限公司);条件性位置偏爱箱系统(安徽正华生物仪器设备有限公司);冰冻切片机(德国 Leica 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 双瓶选择饮酒模型构建

将 12 只小鼠随机分为饮水组(water group)和饮酒组(alcohol group),每组 6 只。期间每只小鼠单笼喂养,先喂养 1 周使小鼠适应环境,在此期间,每只鼠笼上放置两个大小相同的饮水瓶,第 7 天时,将两个瓶子的剩余水量进行记录并计算出每只小鼠单瓶饮水量,排除存在饮水位置偏好小鼠。实验期间,饮酒组放置外观相同的饮水瓶和饮酒瓶各 1 个,饮酒瓶中的酒精浓度每 4 d 升高或更换 1 次,酒精浓度依次为 2.5%、5%、10%、20%,最终在饮水组随机抓取 3 只小鼠,饮酒组中选取 3 只饮酒量 24 h 内大于 10 g/kg 以及酒精偏好率>60%的小鼠用于后续实验。这是双瓶选择模型筛选的通用方式,计算小鼠酒精饮用量即在 24 h 内小鼠酒精饮用量/小鼠体重;酒精偏好率即小鼠饮用酒精溶液/总液体饮用量。

1.3.2 9%慢性酒精暴露模型

将 48 只小鼠随机分为 4 组,分别为 AAV-mCherry+Water 组、AAV-mCherry+Alcohol 组、AAV-ICAM5+Water 组和 AAV-ICAM5+Alcohol 组,每组 12 只。期间 AAV-mCherry+Water 组和 AAV-ICAM5+Water 组正常饮水,AAV-mCherry+Alcohol 组和 AAV-ICAM5+Alcohol 组每只鼠笼上放置外观相同的饮酒瓶,酒精浓度为 9%^[9],饮酒瓶每 4 d 更换 1 次,持续 30 d。

1.3.3 Western blot 检测

小鼠海马、内侧前额叶皮层和杏仁核组织在蛋白裂解液(RIPA Buffer)中匀浆,并且添加蛋白酶抑制剂混合物。样品采用超声波破碎机均质,4℃,14 000 r/min 离心 30 min。收集上清,采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白含量。然后将组织裂解液依次经 SDS-PAGE 处理、转 PVDF 膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗后,使用超敏 ECL 化学发光液制备印迹,用凝胶成像系统分析密度测定数据。

1.3.4 脑立体定位手术

随机将小鼠分为对照组(control group)和 AAV-ICAM5 组。腺相关病毒(pAAV)构建于 pAAV-hSyn-ICAM5-3×Flag-P2A-mCherry-tWPA 质粒中。小鼠麻醉后固定于立体定位装置。以 0.1 μL/min 的速度,将总体积为 0.8 μL 的 pAAV 以双侧方式注射到 AAV-ICAM5 组小鼠海马区(-1.98 mm 前后(AP),±1.5 mm 中外侧,-1.8 mm 背腹侧(DV))。

每次注射后,针留在原地 10 min。

1.3.5 冰冻切片

病毒注射 3 周后,用 4% 多聚甲醛溶液对小鼠进行心脏灌注,取脑,在蔗糖溶液中进行梯度脱水,将脱水后的脑组织用包埋剂固定在托盘上,放入 -22℃ 冰冻切片机中进行切片,贴在载玻片上,滴加抗荧光衰减剂,封片,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.6 旷场实验

将小鼠放置在一个正方体黑色塑料箱(50 cm×50 cm)中,使其自由探索 5 min。使用行为学实验系统记录并分析小鼠总运动距离、中心区停留的时间和运动距离、中心区停留时间所占比例和外周区域运动时间。

1.3.7 条件位置偏爱(conditioned place preference, CPP)实验

CPP 调节装置是一个长方形的箱子,由两个颜色和质地不同的独立的调节隔间(32 cm×25 cm×32 cm)组成,由一个可移动的门(8 cm×25 cm)隔开。两个隔间通过墙的颜色(黑与白)和地板的纹理(条纹与虚线)来区分。实验包括以下 3 个阶段:预适应期(第 1 天),抽出 CPP 中间箱中的隔板,小鼠在 A、B 两箱之间自由探索 15 min,根据停留时间将小鼠非偏爱侧作为伴药箱;训练期(第 2~5 天),4 轮训练;测试期(第 6 天)抽出隔板,记录小鼠在 A、B 箱停留的时间 15 min,比较各组 CPP 分数。CPP 分数的计算方法是用在伴药箱中花费的时间减去在非伴药箱中花费的时间。

1.3.8 翻正反射(lose the righting reflex, LORR)实验

给小鼠腹腔注射 25% 的酒精 3.5 g/kg,并立即放入空笼中。当小鼠出现共济失调并停止运动至少 30 s 时,至翻正反射消失,这一段时间称为失去翻正反射的潜伏期(latency to lose the righting reflex, L-LORR)。然后将小鼠腹部向上放置,观察小鼠翻转身(腹部向下的体位)的次数,在 1 min 内恢复正常体位 3 次,即被认定为从酒精作用中恢复,这段时间为恢复时间,可反应酒精镇静持续时间(duration of lose the righting reflex, D-LORR)。记录动物失去翻正反射所需的时间和从酒精作用中恢复的时间。

1.3.9 细胞骨架蛋白检测(F-actin/G-actin 比值)

采用丝状肌动蛋白/球状单体肌动蛋白(filamentous actin/globular actin, F-actin/G-actin)检

测试剂盒,将每只小鼠的脑组织匀浆置于 LAS2 缓冲液中。裂解液在 4 °C, 20 000 r/min 下离心 1 h, 生成含有 G-actin 的上清。沉淀物重悬于等量的 F-actin 解聚缓冲液(LAS2)中,在冰上孵育 1 h, 每 15 min 轻轻混匀 1 次,然后在 20 000 r/min 中 4 °C 离心 30 min,得到含有 F-actin 的上清液。之后用 Western blot 方法检测,使用凝胶成像系统分析密度测定数据。

1.3.10 高尔基染色实验

染色过程按照说明书进行。小鼠用 1% 戊巴比妥钠(i. p., 50 mg/kg)麻醉,然后迅速切除小鼠的大脑。将脑组织浸泡在 A、B 两种溶液等量混合制成的浸渍溶液中,室温避光保存 2 周。将组织转移到溶液 C 中,在黑暗中再储存 5 d。脑组织在异戊烷中浸泡后置于 -80 °C。将脑组织切成 100 μm 冷冻切片,用于显微镜观察。对于树突棘的分析,显微镜采集图像,使用 Image J(NIH)计算每 10 μm 树突

长度的棘数为脊柱密度。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行数据分析,实验数据均采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。双瓶选择模型实验采用双因素重复测量方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。CPP 检验的数据采用单因素方差分析,考虑时间或运动距离作为实验因素。CPP 评分采用学生 *t* 检验。Western blot 数据采用单因素方差分析。采用双尾 *t* 检验分析 F-actin/G-actin 蛋白水平。在组间比较用 Tukey's Post Hoc 检验进行。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠饮酒量及酒精偏好

小鼠随机分为饮水组、饮酒组,每组 6 只,如图 1 为双瓶选择实验的流程图。随着饮酒浓度的升高,饮酒组小鼠的饮酒量逐渐增加。

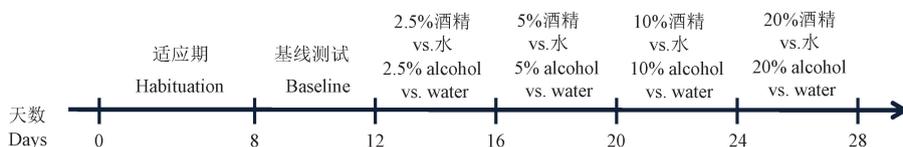


图 1 小鼠双瓶选择模型流程图

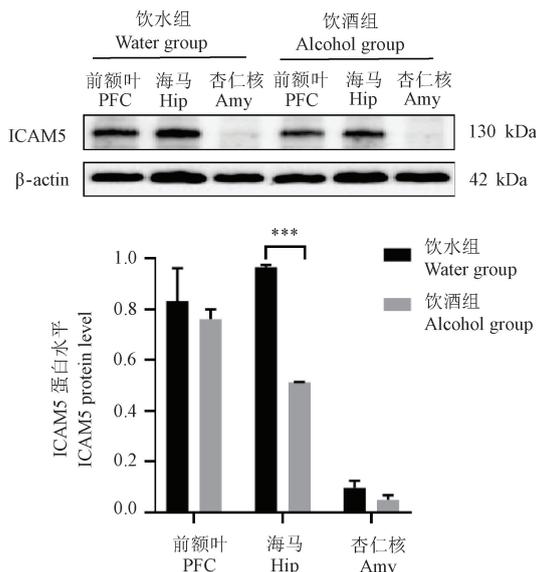
Figure 1 Flow chart of alcohol two-bottle choice mice model

2.2 小鼠不同脑区中 ICAM5 的蛋白表达情况

通过 Western blot 实验分析饮水组和饮酒组小鼠内侧前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)、海马(hippocampus, Hip)和杏仁核(amygdala, Amy)中 ICAM5 的蛋白表达情况。结果显示,与饮水组相比,饮酒组小鼠 ICAM5 在海马脑区的表达水平显著降低($P < 0.001$);在前额叶皮层,ICAM5 的表达量有下降趋势($P = 0.7744$);在杏仁核两组无统计学差异($P = 0.9220$)(图 2)。

2.3 海马注射 AAV-ICAM5 定位及表达情况

通过病毒注射,在小鼠海马中特异性过表达 ICAM5 蛋白。在小鼠海马中注射由 hSyn 启动子驱动的携带 ICAM5 的 AAV 构建体(图 3A、3B)。小鼠双侧海马立体定位注射 AAV 腺相关病毒 3 周以后,在荧光显微镜下观察到海马脑区有明显的红色荧光,并且周围其他脑区无红色荧光,表明 ICAM5 可以在海马脑区特异性表达 ICAM5。通过蛋白免疫印迹实验,进一步检测 ICAM5 蛋白水平的变化,与对照组相比,注射病毒后小鼠海马脑区 ICAM5 的表达水平显著升高($P < 0.01$)(图 3C、3D)。



注:与饮水组比较,*** $P < 0.001$ 。

图 2 ICAM5 在饮水组和饮酒组小鼠不同脑区的蛋白表达情况($\bar{x}\pm s, n = 3$)

Note. Compared with the water group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Expression of ICAM5 protein in different brain regions of mice in water group and alcohol group

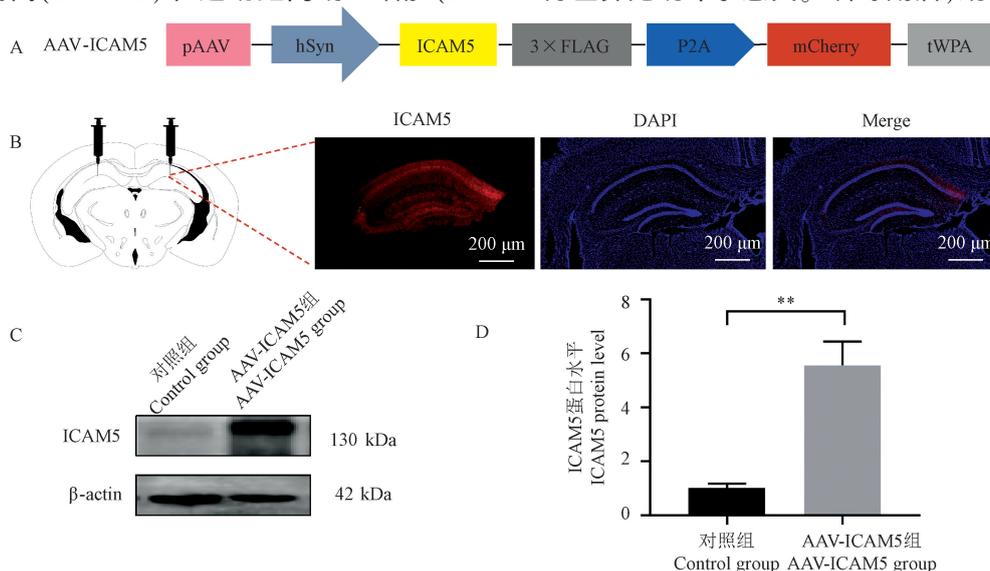
2.4 ICAM5 减弱小鼠焦虑样情绪

通过旷场轨迹热图可以明显看出,对照组小鼠在中位置的运动轨迹较四周稀疏,而 AAV-ICAM5 组小鼠在各区域运动轨迹几乎一致,热图颜色分布较均匀,表明 ICAM5 可以增加小鼠对新鲜环境的探索欲望。AAV-ICAM5 组小鼠较对照组在旷场中心位置停留时间($P < 0.01$)和运动距离明显增加($P <$

0.001),表明 ICAM5 可以减弱小鼠焦虑样情绪;两组的运动总距离没有差异,ICAM5 对小鼠的运动能力没有影响(图 4)。

2.5 ICAM5 可减少酒精诱导的 CPP 奖赏效应

根据预适应期测试结果,将过度偏好某一侧的小鼠剔除,对照组和 AAV-ICAM5 组小鼠的 CPP 评分差异无统计学意义。训练期后,观察到两组小鼠

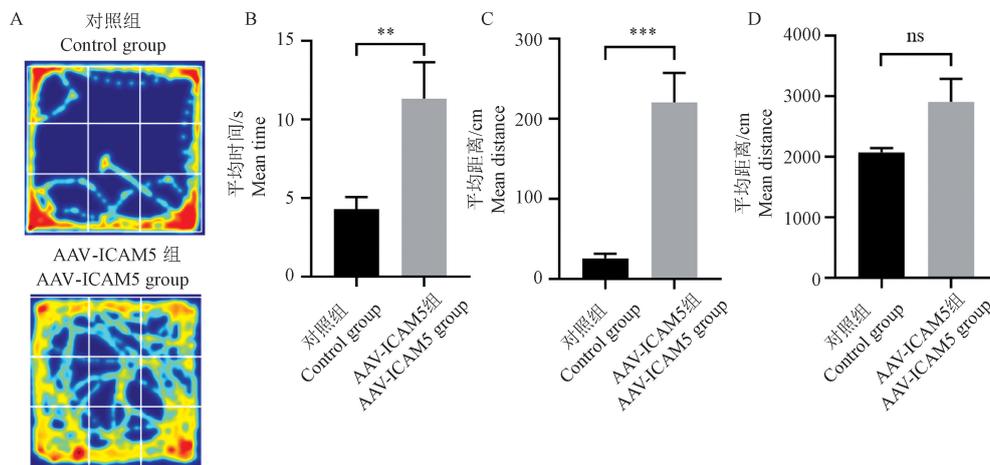


注:A:构建 AAV-ICAM5 质粒的结构图;B:小鼠脑立体定位注射病毒 3 周后小鼠海马荧光表达情况;C:蛋白表达图;D:定量结果。与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 小鼠海马脑区立体定位注射后 ICAM5 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, Structure map of AAV-ICAM5 plasmid was constructed. B, Fluorescence expression in hippocampus of mice after 3 weeks of stereotaxic injection of virus. C, Protein expression of ICAM5. D, Quantitative results. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Expression of ICAM5 protein in hippocampus of mice after stereotaxic injection



注:A:旷场实验轨迹图;B:中心停留时间;C:中心运动距离;D:运动总距离。与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 过表达 ICAM5 对小鼠自主探索行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. A, Track in open field test. B, Time in center. C, Distance in center. D, Total distance traveled. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Effect of overexpression of ICAM5 of locomotion activity in mice

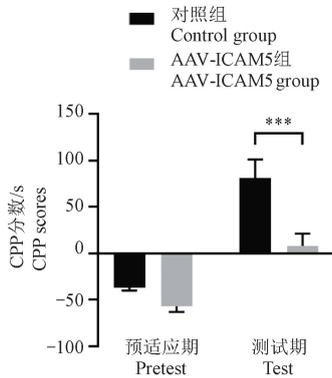
在伴药箱停留时间均显著增加,酒精诱导出对伴药箱的显著偏好,表明腹腔注射 2 g/kg 酒精可以引起明显的酒精奖赏效应,模型制备成功。在测试期观察到 AAV-ICAM5 组小鼠 CPP 评分较对照组小鼠明显降低 ($F_{1,44} = 13.41, P < 0.001$),提示 ICAM5 会干扰酒精奖赏效应与特定环境关联的形成(图 5)。

2.6 ICAM5 减弱酒精的镇静作用

采用 LORR 实验测试酒精对小鼠的镇静作用。结果显示,过表达 ICAM5 可以明显降低小鼠的镇静潜伏期(latency) ($P < 0.01$,图 6A),但同时也显著缩短了镇静作用的持续时间(duration) ($P < 0.001$,图 6B)。这些结果表明 ICAM5 可以减弱酒精引起的镇静作用。

2.7 ICAM5 对小鼠海马组织中肌动蛋白的影响

细胞骨架肌动蛋白是树突棘的重要组成部分,

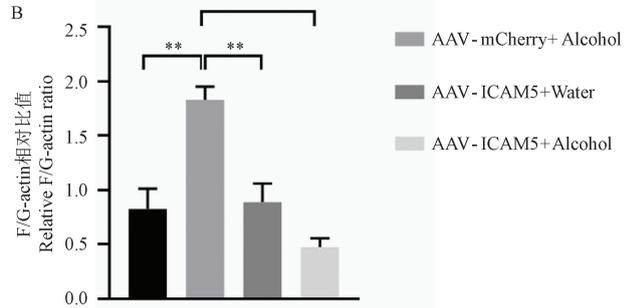
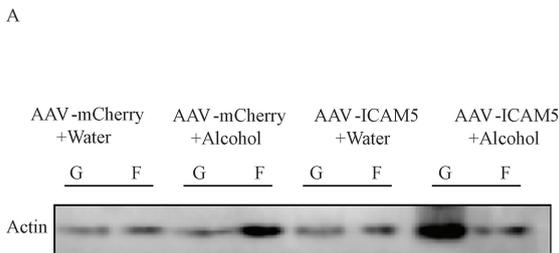


注:与对照组比较,*** $P < 0.001$ 。

图 5 过表达 ICAM5 对小鼠条件性位置偏爱的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Effect of overexpression of ICAM5 on conditioned place preference in mice



注:A:蛋白表达图;B:定量结果。与 AAV-mCherry+Alcohol 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 7 ICAM5 调节酒依赖小鼠海马中细胞骨架蛋白变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

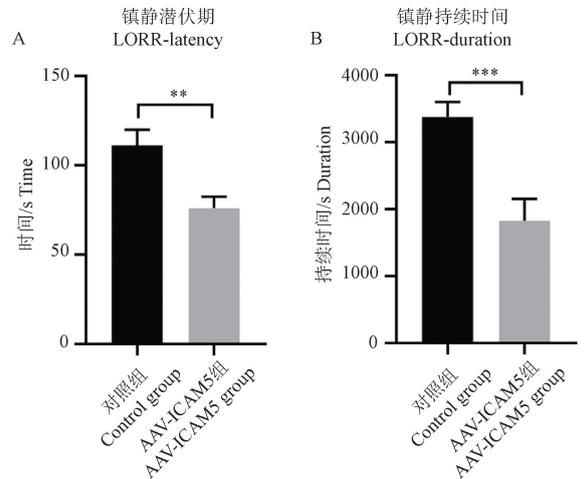
Note. A, Protein expression of Actin. B, Quantitative results. Compared with AAV-mCherry+Alcohol group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 7 ICAM5 regulates cytoskeletal protein changes in the hippocampus of alcohol-dependent mice

突触结构和功能的可塑性的改变源于肌动蛋白细胞骨架动力学驱动,其中 F-actin/G-actin 比值可以反应神经元树突棘的结构改变^[10-11]。在慢性饮酒模型后,利用 Western blot 技术检测 4 组小鼠海马组织中骨架蛋白 F-actin/G-actin 相对表达量。如图 7 所示,4 个组之间小鼠海马组织中 F-actin/G-actin 相对表达量存在显著差异 ($F_{3,8} = 15.65, P < 0.01$)。与 AAV-mCherry+Water 组相比,AAV-mCherry+Alcohol 组 F-actin/G-actin 比值显著升高 ($P < 0.01$);而在 ICAM5 过表达后,AAV-ICAM5+Alcohol 组小鼠 F-actin/G-actin 比值显著降低 ($P < 0.001$)。

2.8 ICAM5 可调节海马神经元可塑性变化

如图 8 检测小鼠海马 CA1 区树突棘密度结果显示,各组间有显著差异 ($F_{3,20} = 12.09, P < 0.001$)。AAV-mCherry+Alcohol 组树突棘密度 ($13.64 \pm$

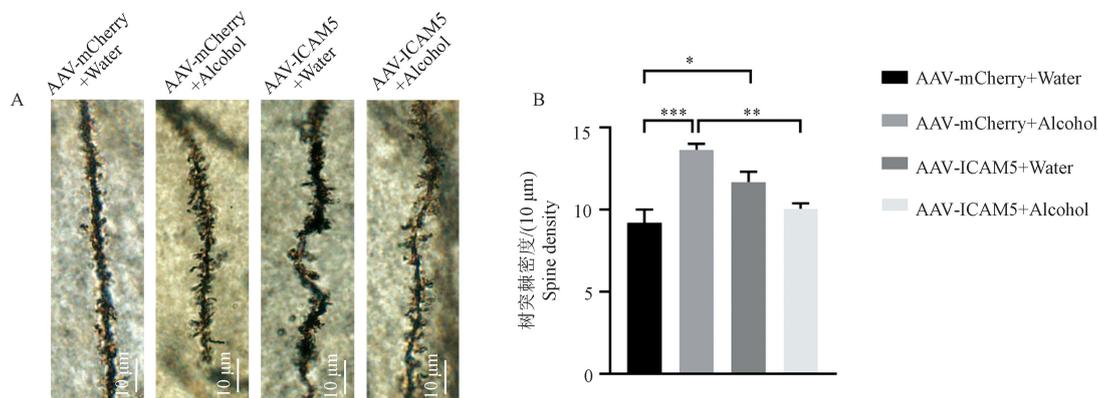


注:与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 6 ICAM5 对小鼠翻正反射的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 6 Effect of ICAM5 on LORR behavior in mice



注: A: 高尔基染色海马树突棘染色图; B: 定量结果。与 AAV-mCherry+Alcohol 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 8 ICAM5 对饮酒后海马树突棘密度的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A, Golgi staining Staining of hippocampal dendritic spines. B, Quantitative results. Compared with AAV-mCherry+Alcohol group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 8 ICAM5 affects hippocampal dendrite spine density after alcohol drinking

0.80)/10 μm 显著高于 AAV-mCherry + Water 组 (9.21 \pm 1.78)/10 μm ($P < 0.001$); 而在 ICAM5 过表达后, AAV-ICAM5+Alcohol 组小鼠树突棘密度显著降低 (10.05 \pm 0.75)/10 μm ($P < 0.01$)。

3 讨论

酒精在世界各地被广泛使用,并在社会中被许多人所接受。但是,酒精也是全球疾病负担的主要风险因素,并导致大量人群健康状况和生活方式下降^[12]。根据 2016 年世界卫生组织报告,全球因酒精有害使用致残和死亡人数分别占总死亡人数的 5.1% 和 5.3%,在 20~39 岁年龄段中,约 13.5% 的死亡原因为酒精所引起^[13]。酒精依赖或酒精成瘾是一种以反复过量饮酒为特征的复杂行为障碍,最终导致对饮酒失去控制,产生耐受性和依赖性^[14]。酒精成瘾导致大量精神疾病,如阿尔茨海默病、癫痫等,对神经中枢系统的影响不可忽视^[15]。尽管最近对酒精生物作用的了解有所进展,但对酒精的许多分子靶点和酒精对行为的影响背后的机制仍然知之甚少。酒精成瘾显著影响大脑的结构、功能和神经化学方面,特别是奖赏环路,如伏隔核、杏仁核、海马和内侧前额叶皮层等,这些区域在成瘾的发展和延续中起着重要作用。其中海马是大脑中成瘾记忆形成和巩固的关键区域,海马 CA1 区在记忆和空间认知方面起着关键作用,主要参与成长时程记忆,并与空间导航有关;CA3 区在模式分辨和记忆容量方面起重要作用;齿状回 (dentate gyrus, DG) 区主要涉及新陈代谢调节、抑制作用的实施,以

及对新神经元的产生和成熟的调节。酒精对海马 CA1 区树突棘形成及突触可塑性有显著影响,突触可塑性变化在功能上表现为突触传递的长时程增强和长时程抑制等,因此侧重海马 CA1 区使我们的研究显得更有意义。明确酒精在海马中活跃的特定机制可能有助于减少药物成瘾行为^[16]。

近年来的研究发现,除了神经环路、神经递质受体和离子通道的作用,细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 在调节突触形成中起着重要作用,他们可以稳定初始突触接触,招募突触结构蛋白,并触发细胞内信号传导至肌动蛋白细胞骨架,诱导突触形成^[17]。ICAM5 作为细胞黏附分子,在端脑兴奋性神经元表达,与脑组织发育有关,在许多神经系统疾病发挥作用。如在阿尔茨海默病患者的脑部,尤其是海马 ICAM5 明显减少^[18]。ICAM5 在海马脑区的减少与它参与介导神经元间相互作用有关,可能引起阿尔茨海默病患者的认知功能受损。脆性 X 染色体综合征患者树突棘异常和空间记忆、恐惧记忆在内的行为障碍与 ICAM5 mRNA 的翻译水平升高有关。因此,ICAM5 的调控可能在脆性 X 染色体综合征的神经元形态缺陷和认知障碍之间提供了功能联系^[19]。

本研究首先采用经典的慢性酒精暴露模型,双瓶选择模型观察海马中 ICAM5 在自发性饮酒行为中的表达情况^[20],实验期间酒精浓度梯度递增 (2.5%~20%),选取饮酒偏好 >60% 的小鼠。结果显示在饮酒组小鼠海马组织中 ICAM5 的表达显著降低,在内侧前额叶皮层有降低趋势,而在杏仁核

中没有差异。以上结果推测酒精可能通过海马中 ICAM5 改变导致小鼠饮酒量和饮酒偏好性改变。

为进一步明确 ICAM5 对小鼠饮酒及运动行为的影响及在酒精依赖过程中的作用,我们构建了包含神经元特异性启动子 hSyn 和红色荧光蛋白 mCherry 的 ICAM5 腺相关病毒载体,并通过脑立体定位方法在小鼠的海马神经元特异性表达 ICAM5。这种方法可以使得 ICAM5 较长期稳定的特异性在海马神经元高效表达,排除使用药物激动剂引起的非特异性因素^[21]。实验结果显示,ICAM5 可以在海马组织中稳定过表达。

随后,通过旷场实验观察 ICAM5 对小鼠运动行为的影响。发现 AAV-ICAM5 组小鼠在陌生环境中的探究行为以及自主行为增强。相较于对照组,ICAM5 高表达小鼠在旷场中心位置停留时间和运动距离明显增加,提示过表达 ICAM5 可以增强小鼠适应新环境的能力并减弱小鼠焦虑样情绪。

海马神经元对伏隔核的投射可以减少其细胞外多巴胺的释放水平,这是在奖赏系统中的重要回路^[22],通过 CPP 模型可以检测小鼠对药物的寻求偏好分析奖赏效应^[23-24]。实验结果显示,与预适应期结果相比,两组小鼠在训练期后在伴药箱停留时间均有增加,表明模型制备成功。而 AAV-ICAM5 组小鼠 CPP 评分相较于对照组显著降低,表明在海马中过表达 ICAM5 可以抑制酒精诱导的 CPP,降低小鼠酒精对小鼠的奖赏效应。提示海马中的 ICAM5 可以调节由酒精引起的条件奖赏效应^[25]。在啮齿动物的研究表明,药物奖赏的减少以及药物诱导多巴胺反应的减少,与更高的可卡因等成瘾药物主动摄取动机有关^[26]。人群结果显示,有家族病史的年轻人对精神兴奋剂的多巴胺反应降低和对酒精获得的低反应都预示着成瘾的高风险^[27-28]。

对酒精镇静作用的高耐受性是人类酒精成瘾的一个危险因素。然而,饮酒和镇静的神经元机制经常分离^[29]。因此,本研究使用 LORR 试验测试了酒精对 ICAM5 高表达小鼠的镇静作用。结果显示,表达 ICAM5 小鼠对大剂量酒精注射后的镇静潜伏期明显降低,并且显著缩短了镇静作用的持续时间。提示过表达 ICAM5 小鼠可能比对照组更快地吸收或代谢乙醇,同时 ICAM5 可以降低酒精的镇静作用,这可能反过来解释了对酒精消耗的抑制作用。有研究表明,多发性硬化症的动物模型 ICAM5 敲除小鼠在慢性期表现出更严重的自身免疫性脑

脊髓炎病程,表明 ICAM5 在进行性神经退行性变中具有神经保护功能^[30-31]。推测 ICAM5 会增加神经元兴奋性以降低酒精镇静的作用,而通过减少厌恶效应来促进酒精消耗。

肌动蛋白作为主要的细胞骨架蛋白在神经元形态发生和树突棘中发挥作用。肌动蛋白细胞骨架是一种动态的结构,能够以 ATP 水解依赖的方式自组装构建,包含 G-肌动蛋白(球形和单体形式)和 F-肌动蛋白(聚合状态)存在于细胞内。F-actin/G-actin 比值是分析肌动蛋白纤维和细胞骨架形态稳定程度的重要指标^[32]。结果显示,慢性酒精暴露后可以增加小鼠海马 F-actin/G-actin 比值,但在 ICAM5 过表达后,这一比值显著下降,表明 ICAM5 可能通过调节肌动蛋白动力学参与突触可塑性。肌动蛋白的动态变化是长时程增强(late long-term retention, L-LTP)和长期记忆(long-term memory, LTM)突触结构的必要基础,对记忆巩固起着至关重要的作用。因此,我们推测 ICAM5 可以抑制由酒精引起的 G-actin 向 F-actin 转化过程,最终调节树突棘结构。表明 ICAM5 对酒精引起的突触结构可塑性改变可能是通过改变神经元中的肌动蛋白组成的实现的^[33]。

ICAM5 以多种方式调节神经元发育,并在神经元的树突和胞体上高度表达^[34]。神经元突触可塑性的改变是酒精成瘾的重要机制之一,药物和酒精暴露会在神经元棘和树突水平上诱导形态可塑性改变。树突棘是构成脑兴奋性神经传递的主要突触后部位。棘的形态发育始于树突丝状伪足的形成,随后形成棘的前体^[35-36],最终以树突棘/突触形式成熟,并与突触的稳定和加强有关^[37]。本实验采用高尔基染色法测量海马 CA1 区树突棘密度,可以直接反映神经元的突触结构^[38]。实验结果显示,AAV-mCherry+Alcohol 组小鼠相较 AAV-mCherry+Water 组小鼠在海马中的树突棘密度增加,这之前报告中酒精暴露后小鼠海马树突棘密度增加一致^[39]。酒精作用后,会引起神经元树突棘形态和数量的改变,但已有研究结果并不一致。有文献报道,急性酒精给药后,大鼠中央杏仁核(central amygdaloid, CeA)和内侧杏仁核(medial amygdala, MeA)的树突棘增加;而在慢性酒精暴露终止后,大鼠的 CeA 和 MeA 中的树突棘则减少^[40-41]。此外,慢性酒精暴露终止也会减少海马和伏隔核(nucleus accumbens, NAc)的树突棘^[42-43]。另外也有数据显

示,人类酗酒者死后研究结果显示皮质锥体神经元的树突棘密度降低^[44]。因此,酒精作用后不同研究树突棘密度结果并不一致,酒精暴露可以使树突棘棘形、突触数量以及密度发生改变,这可能与多种因素有关,包括神经适应、受体调节、信号传导通路等。我们的结果显示,在 ICAM5 过表达后,AAV-ICAM5+ Alcohol 组小鼠树突棘密度会降低,提示 ICAM5 可能通过调节肌动蛋白动力学改变树突棘结构。

综上所述,研究发现在酒精双瓶选择模型中,小鼠在海马脑区 ICAM5 的表达量显著下降。在小鼠海马区特异性过表达 ICAM5 后,会干扰酒精的奖赏效应与特定环境关联的形成,并且可以减弱酒精的镇静作用。机制研究表明,ICAM5 可能通过调节 F-actin 的解聚和重构抑制与酒精作用有关的树突棘密度增加,这为酒精及药物成瘾提供了新的研究思路。ICAM5 对酒依赖调控的这一过程是复杂的,因此需要进一步探索 ICAM5 的作用靶点和作用方式,明确其在酒精成瘾过程中的关键作用。

参考文献:

[1] MATTHEWS D B, ROSSMANN G. Using animal models to identify clinical risk factors in the older population due to alcohol use and misuse [J]. *Alcohol*, 2023, 107: 38-43.

[2] JUAREZ B, MOREL C, KU S M, et al. Midbrain circuit regulation of individual alcohol drinking behaviors in mice [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2220.

[3] BEN HAMIDA S, MENDONÇA-NETTO S, AREFIN T M, et al. Increased alcohol seeking in mice lacking Gpr88 involves dysfunctional mesocorticolimbic networks [J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 84(3): 202-212.

[4] KASAI. Unraveling the mysteries of dendritic spine dynamics: Five key principles shaping memory and cognition [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2023, 99(8): 254-305.

[5] GAHMBERG C G, TIAN L, NING L, et al. ICAM-5—a novel two-faceted adhesion molecule in the mammalian brain [J]. *Immunol Lett*, 2008, 117(2): 131-135.

[6] MITSUI S, SAITO M, HAYASHI K, et al. A novel phenylalanine-based targeting signal directs telencephalin to neuronal dendrites [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(5): 1122-1131.

[7] BAGNI C, OOSTRA B A. Fragile X syndrome: From protein function to therapy [J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161A(11): 2809-2821.

[8] GAHMBERG C G, NING L, PAETAU S. ICAM-5: a neuronal dendritic adhesion molecule involved in immune and neuronal functions [J]. *Adv Neurobiol*, 2014, 8: 117-132.

[9] LI H, TAO Y, MA L, et al. β -Arrestin-2 inhibits preference for

alcohol in mice and suppresses Akt signaling in the dorsal striatum [J]. *Neurosci Bull*, 2013, 29(5): 531-540.

[10] 马丽娜, 王蓉. Drebrin 与认知功能障碍 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(6): 67-70, 78.

MA L N, WANG R. Relationship between drebrin and cognitive impairment [J]. *Chin J Comp Med*, 2013, 23(6): 67-70, 78.

[11] KURUBA B, STARKS N, JOSTEN M R, et al. Effects of tropomodulin 2 on dendritic spine reorganization and dynamics [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(8): 1237.

[12] FAROKHNIYA M, HARRIS J C, SPEED S N, et al. Lifetime use of alcohol and cannabis among U. S. adolescents across age: Exploring differential patterns by sex and race/ethnicity using the 2019 NSDUH data [J]. *Drug Alcohol Depend Rep*, 2023, 10: 100214.

[13] WITKIEWITZ K, HEATHER N, FALK D E, et al. World Health Organization risk drinking level reductions are associated with improved functioning and are sustained among patients with mild, moderate and severe alcohol dependence in clinical trials in the United States and United Kingdom [J]. *Addiction*, 2020, 115(9): 1668-1680.

[14] ROBBINS T W, EVERITT B J. Drug addiction: bad habits add up [J]. *Nature*, 1999, 398(6728): 567-570.

[15] SHIELD K D, PARRY C, REHM J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use [J]. *Alcohol Res*, 2013, 35(2): 155-173.

[16] MEWS P, EGERVARI G, NATIVIO R, et al. Alcohol metabolism contributes to brain histone acetylation [J]. *Nature*, 2019, 574(7780): 717-721.

[17] LIE E, YEO Y, LEE E J, et al. SALM4 negatively regulates NMDA receptor function and fear memory consolidation [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1138.

[18] MARTÍN-DE-SAAVEDRA M D, SANTOS M D, PENZES P. Intercellular signaling by ectodomain shedding at the synapse [J]. *Trends Neurosci*, 2022, 45(6): 483-498.

[19] PEI Y P, WANG Y Y, LIU D, et al. ICAM5 as a novel target for treating cognitive impairment in fragile X syndrome [J]. *J Neurosci*, 2020, 40(6): 1355-1365.

[20] 吕振, 龚志刚. 酒精使用障碍动物模型构建的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(3): 382-389.

LYU Z, GONG Z G. Advances in establishment of alcohol use disorder models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(3): 382-389.

[21] LI D, JING D, LIU Z, et al. Enhanced expression of secreted α -klotho in the hippocampus alters nesting behavior and memory formation in mice [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 133.

[22] LUJÁN M Á, COVEY D P, YOUNG-MORRISON R, et al. Mobilization of endocannabinoids by midbrain dopamine neurons is required for the encoding of reward prediction [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7545.

[23] MU L, LIU X, YU H, et al. cAMP-mediated upregulation of HCN channels in VTA dopamine neurons promotes cocaine reinforcement [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28(9): 3930-3942.

- [24] MARTINS J S, JOYNER K J, MCCARTHY D M, et al. Differential brain responses to alcohol-related and natural rewards are associated with alcohol use and problems: Evidence for reward dysregulation [J]. *Addict Biol*, 2022, 27(2): e13118.
- [25] YIN L T, FENG R R, XIE X Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression in the hippocampus reduces alcohol-induced conditioned-place preference by regulating synaptic plasticity in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2023, 442: 114330.
- [26] SONG R, ZHANG H Y, LI X, et al. Increased vulnerability to cocaine in mice lacking dopamine D3 receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(43): 17675–17680.
- [27] CASEY K F, BENKELFAT C, CHERKASOVA M V, et al. Reduced dopamine response to amphetamine in subjects at ultra-high risk for addiction [J]. *Biol Psychiatry*, 2014, 76(1): 23–30.
- [28] KING A, VENA A, HASIN D S, et al. Subjective responses to alcohol in the development and maintenance of alcohol use disorder [J]. *Am J Psychiatry*, 2021, 178(6): 560–571.
- [29] ZHENG F, PUPPEL A, HUBER S E, et al. Activin controls ethanol potentiation of inhibitory synaptic transmission through GABAA receptors and concomitant behavioral sedation [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2016, 41(8): 2024–2033.
- [30] BIRKNER K, LOOS J, GOLLAN R, et al. Neuronal ICAM-5 plays a neuroprotective role in progressive neurodegeneration [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 205.
- [31] FIGIEL I, KRUK P K, ZAREBA-KOZIOŁ M, et al. MMP-9 signaling pathways that engage rho GTPases in brain plasticity [J]. *Cells*, 2021, 10(1): 166.
- [32] WAGSTAFF J M, PLANELLES-HERRERO V J, SHAROV G, et al. Diverse cytomotive actins and tubulins share a polymerization switch mechanism conferring robust dynamics [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(13): eadf3021.
- [33] STEFANIUK M, BEROUN A, LEBITKO T, et al. Matrix metalloproteinase-9 and synaptic plasticity in the central amygdala in control of alcohol-seeking behavior [J]. *Biol Psychiatry*, 2017, 81(11): 907–917.
- [34] YOSHIHARA Y, OKA S, NEMOTO Y, et al. An ICAM-related neuronal glycoprotein, telencephalin, with brain segment-specific expression [J]. *Neuron*, 1994, 12(3): 541–553.
- [35] HOTULAINEN P, HOOGENRAAD C C. Actin in dendritic spines; connecting dynamics to function [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(4): 619–629.
- [36] KOROBOVA F, SVITKINA T. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(1): 165–176.
- [37] KRAMER D A, NARVAEZ-ORTIZ H Y, PATEL U, et al. The intrinsically disordered cytoplasmic tail of a dendrite branching receptor uses two distinct mechanisms to regulate the actin cytoskeleton [J]. *eLife*, 2023, 12: e88492.
- [38] CARPENTER-HYLAND E P, CHANDLER L J. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007, 86(2): 200–208.
- [39] YIN L T, XIE X Y, XUE L Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression regulates hippocampal synaptic plasticity and decreases alcohol consumption and preference in mice [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(8): 1902–1912.
- [40] PANDEY S C, ZHANG H, UGALE R, et al. Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(10): 2589–2600.
- [41] YOU C, ZHANG H, SAKHARKAR A J, et al. Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014, 17(2): 313–322.
- [42] ZHOU F C, ANTHONY B, DUNN K W, et al. Chronic alcohol drinking alters neuronal dendritic spines in the brain reward center nucleus accumbens [J]. *Brain Res*, 2007, 1134(1): 148–161.
- [43] RILEY J N, WALKER D W. Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice [J]. *Science*, 1978, 201(4356): 646–648.
- [44] FERRER I, FÁBREGUES I, RAIRIZ J, et al. Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism [J]. *Neurosci Lett*, 1986, 69(1): 115–119.

[收稿日期]2024-01-20