

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)09-0818-03

# 三七总皂甙对吗啡戒断大鼠海马磷酸化 CREB 蛋白表达及 CREB/DNA 结合活性的影响

闫玉仙<sup>1</sup> 呼文亮<sup>2</sup> 丛斌<sup>1</sup> 牛增强<sup>1</sup> 李淑瑾<sup>1</sup> 余磊<sup>1</sup> 马春玲<sup>1</sup> 张国忠<sup>1</sup> 左敏<sup>1</sup>( <sup>1</sup> 河北医科大学法医系法医学教研室, 河北 石家庄 050017; <sup>2</sup> 武警医学院训练部, 天津 300162 )

## Effects of Panax Notoginseng on phosphorylated CREB protein expression and CREB/DNA binding activity in hippocampus of morphine withdrawal rats

YAN Yu-Xian<sup>1</sup>, HU Wen-Liang<sup>2</sup>, CONG Bin<sup>1</sup>, NIU Zeng-Qiang<sup>1</sup>, LI Shu-Jin<sup>1</sup>, YU Lei<sup>1</sup>, MA Chun-Ling<sup>1</sup>, ZHANG Guo-Zhong<sup>1</sup>, ZUO Min<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Forensic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China, <sup>2</sup>Department of Training, Medical College of People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the effects of Panax Notoginseng (PNS) on the expressions of CREB, phosphorylated CREB (pCREB) and CREB/DNA binding activity in hippocampus of the morphine dependent rats and the naloxone-precipitated withdrawal syndrome rats, and to explore the mechanism by which PNS inhibits the morphine withdrawal symptom in rats. **METHODS:** The models of morphine physical dependent rats and withdrawal syndrome were established by subcutaneous injection of morphine in gradually increasing doses and abdominal cavity injection of naloxone respectively. The rats were treated with PNS by intragastric administration at various doses simultaneously when administrated with morphine. The effects of morphine on the expressions of CREB, pCREB, CREB/DNA binding activity in hippocampus were detected by Western blot and electrophoresis mobility shift assay (EMSA). **RESULTS:** ① The CREB protein expression in hippocampus was not significantly statistically different in morphine physical dependent group (MOR), naloxone precipitated withdrawal group (NAL) and PNS groups compared with control group ( $P > 0.05$ ); ② The pCREB protein expression and CREB/DNA binding activity in hippocampus were not significantly increased in MOR compared

with control group and were significantly increased in NAL compared with MOR and control groups; ③ PNS could dose-dependently downregulate the increased expression of pCREB and CREB/DNA binding activity in hippocampus induced by naloxone-precipitated withdrawal. **CONCLUSION:** PNS could inhibit the expression of pCREB and CREB/DNA binding activity in hippocampus in a dose-dependent manner.

**【Keywords】** Panax Notoginseng; morphine dependence; naloxone; substance withdrawal syndrome; pCREB

**【摘要】**目的: 研究三七总皂甙(PNS)对吗啡依赖及纳络酮催戒断大鼠海马组织 CREB、pCREB 蛋白表达及 CREB/DNA 结合活性的影响, 探讨 PNS 抑制吗啡戒断症状的作用机制。方法: 应用剂量递增皮下注射盐酸吗啡建立吗啡躯体依赖模型, 采用腹腔注射纳络酮建立催戒断模型, 大鼠在给予吗啡的同时, 采用 4 种不同剂量 PNS 进行灌胃。采用 Western blot 和电泳迁移率改变分析法(EMSA)分别观察 PNS 对吗啡依赖及戒断大鼠海马组织总 CREB、pCREB 蛋白表达及 CREB/DNA 结合活性的影响。结果: ①不同剂量 PNS 组、吗啡成瘾(MOR)组及纳络酮催戒断(NAL)组大鼠海马组织总 CREB 蛋白表达与对照组相比无显著性差异( $P > 0.05$ ); ②MOR 组 pCREB 蛋白表达及 CREB/DNA 结合活性数值略高于对照组( $P > 0.05$ ), NAL 组 pCREB 蛋白表达及 CREB/DNA 结合活性数值明显高于对照组和 MOR 组( $P < 0.01$ ); ③PNS 可以剂量依赖性的抑制纳络酮催戒断所引起的 pCREB 蛋白表达增高和 CREB/DNA 结合活性的增强。结论: PNS 可以剂量依赖的抑制吗啡成瘾及纳络酮催戒断诱导的大鼠海马组织 CREB 磷酸化和 CREB/DNA 结合活性的增强。

**【关键词】**三七总皂甙; 吗啡依赖; 纳络酮; 物质戒断综合症; 磷酸化 CREB

【中图分类号】R747.205

【文献标识码】A

## 0 引言

三七(Panax notoginseng (Burk) F1 H1 Chen)为五加科植物, 现已从不同部位分离得到数十种单体皂甙成份, 其中三七总皂甙(Panax Notoginseng, PNS)是三七的主要生物活性成份, 具有活血化淤、抗氧化、抑制细胞内 Ca 超载、改善学习记忆、调节神经系统、增加免疫功能等功效, 是一种非特异性钙拮抗剂。关于

收稿日期 2005-12-20; 接受日期 2006-02-20

基金项目 河北省中医药管理局重点资助课题(05053)

通讯作者 丛斌. Tel (0311) 86266406 Email bincong@263.net

作者简介: 闫玉仙, 高级实验师, 博士生(导师丛斌). Tel:

13833196973 Email yyx19683@126.com

PNS对吗啡成瘾大鼠戒断综合症的研究国内外至今尚未见报道。我们研究了PNS对吗啡依赖及戒断大鼠核转录因子CREB磷酸化以及DNA结合活性的影响,探讨PNS在戒毒方面的应用及机理。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性SD大鼠42只,体质量200~220g,华中科技大学同济医学院实验动物学部提供,合格证号19-020,盐酸吗啡(morphine hydrochloride, MOR),沈阳第一制药厂生产,批号:辽宁药准字(1996)第002747号。盐酸纳络酮、氨基甲酸乙酯、亮肽素(leupeptin)(美国Sigma公司),CREB及pCREB抗体(美国Santa Cruz公司),PNS(天津天士力联合制药股份有限公司提供),EMSA试剂盒(美国Promega)[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP(北京福瑞生物公司),Multiphor II多功能电泳系统。凝胶成像分析仪(美国UVP公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型的制作及分组 模型鼠随机分为对照组(Control)、吗啡依赖组(MOR)、纳络酮催促戒断组(NAL)和PNS50, PNS100, PNS200, PNS400组(PNS50, 100, 200, 400 mg/kg 治疗组),每组6只。MOR组、NAL组和PNS组参照文献记载以剂量递增法连续5d背部皮下给予(sc)吗啡的方法建立吗啡依赖大鼠模型。首日吗啡20 mg/kg,分2次(sc)(8:00, 18:00)。以后每日增加20 mg/kg,第5日吗啡每次用量达50 mg/kg。第6日上午8:00末次注射吗啡50 mg/kg。NAL组和PNS组在末次注射吗啡2h后皮下注射纳络酮5 mg/kg。PNS50, PNS100, PNS200, PNS400组在给予吗啡的同时分别按50, 100, 200, 400 mg/kg剂量进行灌胃。对照组在相同时间注射生理盐水。

1.2.2 Western blot 检测 CREB 及 pCREB 蛋白表达 每组大鼠取6只,麻醉后在冰台上取出大脑,冰浴下分离海马,依照文献<sup>[1]</sup>加入预冷提取缓冲液进行匀浆。4℃离心(12 000 g, 5 min),取上清,置-70℃低温冰箱中保存,供测定总 CREB 和 pCREB 水平。用考马斯亮兰 G250 试剂盒测定每一组样品蛋白浓度。

各组取蛋白200  $\mu$ g,电泳分离后电转移至硝酸纤维素(NC)膜。将膜置于50 g/L脱脂奶粉封闭1h,分别加兔抗大鼠非磷酸化的 CREB-1 和羊抗大鼠 pCREB 抗体,4℃孵育过夜,TBS洗膜后,分别加入HRP标记的IgG二抗,37℃孵育1h,TBS洗膜后采用化学发光法检测结果,以 $\beta$ -actin作为内参对照。上

述实验重复3次。用Scion-Image软件对结果进行半定量分析,用AU(Darea·Ddensity)代表条带的面积 $\times$ 光密度值,以CREB/ $\beta$ -actin和pCREB/ $\beta$ -actin的AU比值代表的CREB和pCREB相对含量。

1.2.3 EMSA 检测 CREB/DNA 结合活性 方法同上分离海马,提取组织核蛋白,测定CREB/DNA结合活性。用考马斯亮兰G250试剂盒测定每一组样品蛋白浓度。含有CREB特异性识别位点的双链脱氧寡核苷酸为:5'-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGC-TAG-3'和5'-CTAGCTCTCTGACGTCAGGCAATCTCT-3',用T4多核苷酸激酶进行末端标记 $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP,乙醇沉淀法纯化标记的寡核苷酸。取50  $\mu$ g核蛋白与同位素标记的DNA探针(3.5 pmol, 10  $\mu$ Ci)在室温下进行结合反应30 min,反应成份包括:1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.05  $\mu$ g poly(dI-dC)和40 g/L甘油,总体积为9  $\mu$ L。60 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶置真空干燥仪上真空干燥,-70℃放射自显影48 h。上述实验重复3次。结果用凝胶图像分析管理系统对电泳谱带进行半定量分析,取其面积与光密度值的乘积代表CREB的相对活性。

统计学处理:用Scion-Image软件和凝胶成像分析仪分别对Western和EMSA结果进行半定量分析。用AU(Darea·Ddensity)代表条带的面积乘光密度值,表示目的蛋白的相对含量。多组实验结果采用SPSS统计软件进行统计学分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数的比较行单因素方差分析(ANOVA),用最小显著差异法(least significant difference, LSD)作两两比较, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结果

2.1 PNS对吗啡戒断大鼠海马组织总CREB的影响 实验结果表明:大鼠在慢性给予吗啡处理、纳络酮催促戒断及给予不同剂量PNS后海马组织总CREB的表达在各组之间有所不同,但与对照组相比均无显著性差异( $P > 0.05$ ,表1,图1A)。

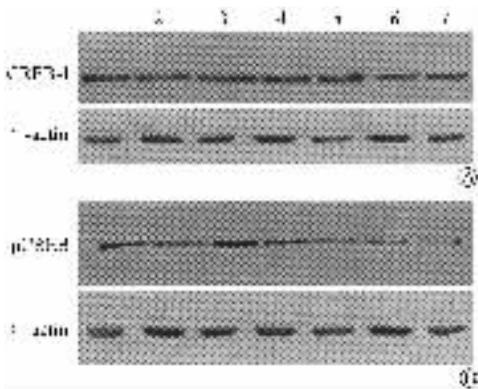
2.2 PNS对吗啡戒断大鼠海马组织磷酸化CREB蛋白表达的影响 慢性MOR组海马组织pCREB蛋白表达较对照组略有升高,但无统计学差异( $P > 0.05$ )。NAL组海马组织pCREB蛋白表达显著高于对照组和MOR组( $P < 0.01$ ),在给予吗啡的同时每kg体质量分别给予50, 100, 200, 400 mg PNS之后可以显著降低海马组织的pCREB蛋白表达,并呈剂量依赖性,以400 mg/kg剂量组磷酸化水平降低最为显

著( $P < 0.01$ , 图 1B 表 1)。

表 1 PNS 对吗啡戒断大鼠海马 CREB、pCREB 表达以及 CREB/DNA 结合活性的影响 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	CREB	pCREB	CREB/DNA 结合活性
对照	509.52 ± 77.55	221.29 ± 6.99	187.29 ± 6.44
MOR	554.11 ± 64.89	259.18 ± 28.51	201.93 ± 11.8
NAL	600.81 ± 46.05	301.99 ± 26.23 <sup>b</sup>	355.51 ± 5.11 <sup>bf</sup>
PNS 50	515.35 ± 81.55	167.22 ± 21.00 <sup>adf</sup>	
PNS100	575.45 ± 71.27	70.35 ± 9.96 <sup>bdf</sup>	293.01 ± 4.99 <sup>bdf</sup>
PNS200	503.33 ± 29.46	62.99 ± 4.57 <sup>bdf</sup>	179.55 ± 6.18 <sup>df</sup>
PNS400	534.48 ± 30.91	54.78 ± 1.07 <sup>bdf</sup>	112.83 ± 4.54 <sup>bdf</sup>

\* $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs MOR; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs NAL。对照: 盐水处理组; MOR: 单独给予吗啡处理组; NAL: 纳洛酮催促戒断组; PNS50: PNS50 mg/kg 治疗组; PNS100: PNS100 mg/kg 治疗组; PNS200: PNS200 mg/kg 治疗组; PNS400: PNS400 mg/kg 治疗组; CREB: cAMP 反应元件结合蛋白; pCREB: 磷酸化 CREB。



1 盐水处理组 2 单独吗啡处理组 3 纳洛酮催促戒断组 4 PNS 50 mg/kg 治疗组 5 PNS 100 mg/kg 治疗组 6 PNS 200 mg/kg 治疗组 7: PNS 400 mg/kg 治疗组。

图 1 Western blot 检测 PNS 对吗啡戒断大鼠海马组织总 CREB(A) 和 pCREB(B) 的影响

2.3 PNS 对吗啡戒断大鼠海马组织 CREB/DNA 结合活性的影响 实验结果显示 吗啡依赖大鼠海马组织 CREB/DNA 结合活性与对照组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ )。纳洛酮催促戒断则使大鼠海马 CREB/DNA 结合活性显著高于对照组和 MOR 组 ( $P < 0.01$ , 表 1)。

### 3 讨论

慢性吗啡引起神经元可塑性和适应性改变的基础是转录因子调节某些靶蛋白表达 机体稳态重建的结果<sup>[2]</sup>。转录因子 CREB 是脑内介导多个信号通路调节基因转录的主要核因子,其在脑组织内含量丰富 尤以神经元内居多<sup>[3]</sup>。CREB 是首先发现的与药

物成瘾密切相关的转录因子,其表达和功能是目前医学界研究的热点之一<sup>[4]</sup>。

慢性吗啡诱导的依赖、纳洛酮诱导的戒断动物的中枢神经系统内以及某些细胞株的 CREB 磷酸化程度明显升高以及 CREB/CRE 结合活性增强,且其变化具有区域特异性,是衡量神经细胞活动程度的重要生化指标<sup>[5-6]</sup>。而海马作为边缘结构则广泛地参与了学习与记忆过程,是参与成瘾记忆形成和强化的重要脑区<sup>[7-8]</sup>。因此本实验选取海马作为实验脑区。结果证实,慢性给予吗啡、纳洛酮催促戒断及不同剂量 PNS 各组 CREB 蛋白表达水平在海马组织有所不同,但与对照组相比均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。吗啡依赖大鼠海马组织中 CREB 磷酸化水平及 CREB/DNA 结合活性有增高趋势,但无统计学意义,而纳洛酮催促戒断大鼠海马组织中 CREB 磷酸化水平及 CREB/DNA 结合活性则明显的高于对照组和吗啡依赖组大鼠。

我们研究从蛋白水平和转录水平研究了 PNS 对吗啡依赖大鼠纳洛酮催促戒断诱导的脑内转录因子 CREB 的影响,探讨了三七总皂甙缓解吗啡戒断症状的部分分子机制,研究结果为 PNS 的临床应用提供了必要理论依据。

### 【参考文献】

- [1] 董明,熊纛,徐侃彦. 记忆增强肽促进大鼠海马内 CREB 磷酸化[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(6): 575-580.
- [2] Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(2): 119-128.
- [3] Noda Y, Nabeshima T. Learning/memory and drug dependence[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2002, 119(4): 213-217.
- [4] Carrie L Walters, Julie A Blendy. Different requirements for cAMP response element binding protein in positive and negative reinforcing properties of drugs of Abuse[J]. Neuroscience, 2001, 21(23): 9438-9444.
- [5] Ahmed BY, Yamaguchi F, Tsumura T, et al. Expression and subcellular localization of multifunctional calmodulin-dependent protein kinases-I, -II and -IV are altered in rat hippocampal CA1 neurons after induction of long-term potentiation[J]. Neurosci Lett, 2000, 290(2): 149-153.
- [6] 张国忠, 马春玲, 苏彦君, 等. 外源 CRE 顺式元件对慢性吗啡作用 SK-N-SH 细胞 CREB 蛋白表达及 DNA 结合活性的影响[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(6): 492-496.
- [7] Sarah B, Joseba P, Virginia A, et al. CREB (cAMP response element binding protein) in the locus coeruleus: Biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence[J]. Neurosci, 1997, 17(20): 7890-7901.
- [8] Gao C, Chen LW, Tao YM, et al. Effects of ohmefentanyl stereoisomers on phosphorylation cAMP-response element binding protein in cultured rat hippocampal neurons[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(12): 1253-1259.