

石杉碱甲对电休克模型大鼠海马磷酸化细胞外调节蛋白激酶及活性调节的细胞骨架联合基因活性的影响

成敬 王高华 程自立 肖玲

【摘要】 目的 观察石杉碱甲对电休克模型大鼠海马磷酸化细胞外调节蛋白激酶(P-ERK)、活性调节的细胞骨架联合基因(ARC)活性的影响。方法 大鼠随机分为假电休克对照组和电休克组,再随机分为生理盐水对照组(CS组、ES组)和石杉碱甲组(CH组、EH组)。第1~17天行生理盐水或石杉碱甲灌胃;第8~17天给予假电痉挛刺激或电痉挛刺激;第18天行水迷宫定位航行实验;然后各组大鼠随机取6只处死取海马用Western blot法检测P-ERK蛋白、ARC活性。结果 CS组与CH组的潜伏期无显著性差异($P>0.05$)。ES组的潜伏期显著长于CS组($P<0.01$)。EH组潜伏期与CH组无显著性差异($P>0.05$),ES组潜伏期长于EH组($P<0.05$)。CS组与CH组的P-ERK1/2、ARC蛋白表达水平达水平无显著性差异($P>0.05$)。ES组的P-ERK1/2、ARC蛋白表达水平显著低于CS组($P<0.01$)。EH组P-ERK1/2、ARC蛋白表达水平与CH组无显著性差异($P>0.05$);ES组P-ERK1/2、ARC蛋白表达水平低于EH组,差异有显著性($P<0.05$)。结论 石杉碱甲能减轻电休克模型大鼠记忆损害,其机制可能与海马P-ERK、ARC的活性增加有关。

【关键词】 电休克; 石杉碱甲; 细胞外调节蛋白激酶; 活性调节的细胞骨架联合基因

Effects of Huperzine A on ECT-induced changes in P-ERK and ARC of rats CHENG Jing*, WANG Gao-hua, CHENG Zi-li, XIAO Ling. *Department of Psychiatry, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: CHENG Zi-li, Email: chengjingwh668@163.com

【Abstract】 Objective To investigate effects of Huperzine A on Electroshock therapy (ECT) induced changes in phosphorylated extracellular-signal related kinase (P-ERK) and activity-regulated cytoskeletal-associated gene (ARC). **Methods** Adult, male Sprague-Dawley rats were randomized to receive Huperzine A or normal saline (control). These treatments were administered during experiment day 1-17. During experiment day 8-17, true or sham ECT were administered. At the experiment day 18 the rats were trained and tested in Morris water maze. Then six rats of each group were randomly killed to take the hippocampus for detecting P-ERK and ARC expression 1 hour after training. **Results** There was no significant difference in latency between CS group and CH group ($P>0.05$). The latency of ES group was significantly longer than CS group ($P<0.01$). There was no significant difference in latency between EH group and CH group ($P>0.05$). The latency of ES group was significantly longer than EH group ($P<0.05$). There was no significant difference in P-ERK1/2 and ARC protein expression level between CS group and CH group ($P>0.05$). Both the P-ERK1/2 and the ARC protein expression of ES group were significantly lower than CS group ($P<0.01$). There was no significant difference in P-ERK1/2 and ARC protein expression level between EH group and CH group ($P>0.05$). Both the P-ERK1/2 and the ARC protein expression of ES group were significantly lower than EH group ($P<0.01$). **Conclusions** Huperzine A administered before the ECT may attenuate ECT-induced amnesia. Huperzine A can reduce the effect of ECT on the expression of P-ERK and ARC. P-ERK and ARC may play a role in the development of spatial memory impairment caused by ECT.

【Key words】 Electroshock; Huperzine A; Phosphorylated extracellular-signal related kinase; Activity-regulated cytoskeletal-associated gene

电休克治疗 (electroshock therapy, ECT), 是用短暂的电刺激作用于脑部, 引起中枢神经系统癫痫样放电治疗精神疾病的方法, 尤其是对重症抑郁具有肯定的疗效^[1]。然而, 电休克治疗常导致患者记忆障碍, 阻碍了电休克治疗在临床的广泛应用^[2]。石杉碱甲具有极高的选择性抑制脑内乙酰胆碱酯酶和增强脑内胆碱能神经元的功能, 还可通过抗氧化应激和抗细胞凋亡途径对神经元产生保护作用, 对多种记忆损害均有改善作用^[3-4]。但石杉碱甲对电休克所致记忆障碍的作用及机制的动物实验研究尚很少。为此, 我们拟通过建立大鼠电休克模型, 观察石杉碱甲对其记忆及海马磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular-signal related kinase, P-ERK)、活性调节的细胞骨架联合基因 (activity-regulated cytoskeletal-associated protein, ARC) 活性的影响。

材料和方法

1. 材料及仪器: 石杉碱甲标准品购自上海融禾公司 (批号: 050403)。ERK2 兔抗鼠多克隆抗体、P-ERK 兔抗人多克隆抗体购自 SANTA CRUZ 公司, ARC 兔抗人多克隆抗体购自 SANTA CRUZ 公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自华美生物公司。Morris 水迷宫和动物运动轨迹记录分析系统购自荷兰 Noldus 公司。电痉挛刺激仪购自陕西医疗器械公司, YA-7 型。

2. 实验分组及给药方法: 清洁级健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只, 3 月龄, 体重 180~250 g, 购自武汉大学医学院动物实验中心。大鼠适应性饲养 7 d 后开始正式实验。采用随机数字表法将大鼠随机分为假电休克对照组 (对照组, 简称 C 组) 和电休克组 (简称 E 组), 每组 24 只。C 组、E 组再随机分为生理盐水组和石杉碱甲组, 分别每天一次给予石杉碱甲灌胃 (分别记为 CH 组、EH 组), 每天一次给予等体积的生理盐水灌胃 (分别记为 CS、ES 组), 灌胃容积为 5 ml/kg, 每组 12 只。连续给药 17 d。

3. 电休克大鼠模型的制备和对照的设立: 给药第 8 天开始制作电休克大鼠模型。大鼠取俯卧位固定于操作台上, 70% 医用酒精消毒两耳旁皮肤后, 将与电痉挛刺激仪相连接的扣式电极置于两耳旁皮肤。电休克组通电, 给予电痉挛刺激, 直流方波脉冲, 50 mA, 时间 0.5 s, 成功诱导强直-痉挛大发作, 秒表记录发作时间。假电休克对照组电极不通电, 其余操作同电休克组。电痉挛刺激每日一次, 上午 9:00~10:00 进行, 共 10 次。

4. Morris 水迷宫定位航行实验: 各组大鼠于第 17 天的下午放入水迷宫中适应性自由游泳 2 次, 每

次 1 min。第 18 天进行正式水迷宫实验。将大鼠面向池壁随机从四个不同象限池壁中点入水。电脑开始计时, 摄像头记录大鼠的行为。大鼠从入水至寻找站台的时间定义为隐匿平台逃逸潜伏期 (简称潜伏期), 若大鼠在 60 s 内未能找到站台, 引导其找到站台, 其潜伏期记为 60 s。每轮训练 5 次, 共训练 2 轮, 每次之间大鼠休息 20 s, 每轮之间休息 2 min。

5. Western blot 检测 P-ERK、ARC 活性: 水迷宫实验结束后 1 h, 各组大鼠随机取 6 只断头处死, 取海马保存于 -80 °C 超低温冰箱中待测。海马组织加入组织裂解液匀浆, 12 000 × g 4 °C 离心 10 min, 取上清液 BCA 法测定蛋白质浓度。SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h, 加入 ARC 兔抗人多克隆抗体 ERK2 兔抗鼠多克隆抗体, P-ERK 兔抗人多克隆抗体或 ARC 兔抗人多克隆抗体 4 °C 反应过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温孵育 1 h, 然后加入 DAB 显色。用凝胶图像处理系统分析各样本灰度值。P-ERK 与 ERK2 蛋白表达水平灰度值的比为 P-ERK 的相对表达水平, 也即 P-ERK 的活性; ARC 蛋白与相应内参 (β -actin) 蛋白表达水平灰度值的比为 ARC 活性。

6. 统计学处理: 应用 SPSS 11.5 软件统计包对数据进行处理, 所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用方差分析比较大鼠水迷宫定位航行实验潜伏期及海马 P-ERK、ARC 活性的差异, 两组间比较用最小显著差法 (简称 LSD)。显著性检验水准设定为 < 0.05。

结果

1. 水迷宫定位航行实验结果: 各组间大鼠游泳速度无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明电休克及石杉碱甲对大鼠的运动能力均无影响。水迷宫定位航行实验 CS 组与 CH 组的潜伏期无显著性差异 ($P > 0.05$); ES 组的潜伏期显著长于 CS 组 ($P < 0.01$); EH 组潜伏期与 CH 组无显著性差异 ($P > 0.05$); ES 组潜伏期长于 EH 组, 差异有显著性 ($P < 0.05$) (表 1)。

2. Western blot 检测海马 P-ERK 活性: 各组大鼠海马 P-ERK 活性变化 (表 2, 图 1)。CS 组与 CH 组的 P-ERK 活性无显著性差异 ($P > 0.05$)。ES 组的 P-ERK 活性显著低于 CS 组 ($P < 0.01$)。EH 组 P-ERK 活性与 CH 组无显著性差异 ($P > 0.05$); ES 组 P-ERK 活性低于 EH 组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

3. Western blot 检测海马 ARC 活性: 各组大鼠海马 ARC 活性变化 (表 2, 图 2)。CS 组与 CH 组的 ARC 活性无显著性差异 ($P > 0.05$)。ES 组的 ARC 活

表1 各组大鼠定位航行实验游泳速度及潜伏期结果比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	游泳速度(m/s)	第一轮潜伏期(s)	第二轮潜伏期(s)
CS组	0.31±0.04	15.12±2.33	9.28±1.24
CH组	0.28±0.03	15.88±2.72	10.45±1.15
ES组	0.29±0.05	36.28±5.23 ^{ab}	30.24±4.17 ^{ab}
EH组	0.30±0.03	20.70±2.67	13.42±1.51
F值	0.699	14.432	15.894
P值	>0.05	<0.05	<0.05

注: 组间比较用最小显著差法, 与CS组比较, ^a $P<0.01$; 与EH组比较, ^b $P<0.05$

表2 各组大鼠海马P-ERK活性、ARC活性结果比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	P-ERK活性	ARC活性
CS组	0.74±0.11	1.23±0.24
CH组	0.62±0.07	0.92±0.15
ES组	0.23±0.08 ^{ab}	0.53±0.16 ^{ab}
EH组	0.59±0.07	1.03±0.20
F值	21.857	35.332
P值	<0.05	<0.05

注: 组间比较用最小显著差法, 与CS组比较, ^a $P<0.01$; 与EH组比较, ^b $P<0.05$

性显著低于CS组 ($P<0.01$)。EH组ARC活性与CH组无显著性差异 ($P>0.05$); ES组ARC活性低于EH组, 差异有显著性 ($P<0.05$)。

讨 论

细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK1/2) 是丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 超家族中的重要成员。P-ERK 为 ERK1/2 的磷酸化形式, 也是 ERK1/2 的活化形式。MAPK/ERK1/2 信号通路通过调节基因表达和蛋白合成等影响突触重塑、轴突生长、和神经元的兴奋性等, 与脑内长时程增强 (LTP) 的形成以及学习记忆功能有重要的联系^[5]。2007年 Satoh 等^[6]报道 ERK 基因敲除鼠表现出迷宫学习记忆障碍, 提示 ERK 与突触结构蛋白的相互作用共同参与突触和神经元的可塑性, 从而影响学习记忆功能。本研究结果发现学习记忆后 1 h, 生理盐水灌胃的电休克组大鼠, 相对于生理盐水灌胃的假电休克对照组大鼠, 海马 P-ERK 蛋白表达水平显著降低, 表明电休克降低大鼠海马 P-ERK 的活性可能是电休克导致记忆障碍的一种重要的分子机制。

我们同时还检测了 ERK1/2 调控的一种即刻早期基因 ARC 的蛋白表达水平的变化。ARC 是一种起效应作用的即刻早期基因, 其蛋白质产物参与活化突触

结构和功能的修饰^[7]。ARC 只在兴奋性神经元中表达, 在胶质细胞不表达。诱导可塑性的刺激活化兴奋性突触后, ARC 被快速诱导表达, 新近合成的 ARC mRNA 选择性地集聚于齿状回分子细胞层活化树突的细胞质和突触后致密物质内, 并在这些突触的局部位置快速地翻译为蛋白质^[8], 刺激停止后约 4~6 h ARC 逐渐回落到基线水平, ARC 的转录和翻译紧紧地耦合, 几乎是同时进行的^[9]。ARC 在突触可塑性及学习记忆中起着关键性的作用^[10]。可诱导脑内长时程增强 (LTP) 的电生理刺激诱导 ARC 快速大量的表达^[11], 而给予反义寡核苷酸减少 ARC mRNA 翻译及 ARC 蛋白的表达抑制 LTP 的形成和维持及记忆的巩固^[10]。本实验检测电休克对学习记忆后 1 h 海马 ARC 的诱导表达变化, 表明电休克组大鼠海马在学习记忆后其诱导水平亦较假电休克对照组显著下降。2005年 Larsen 等^[12]报道慢性的重复的电痉挛刺激后 CA1 区和顶叶皮层 ARC 基因在末次刺激后 24 h 的表达减少, 低于基线水平, 我们的研究结果与其一致。我们推测 ARC 的表达下降可能参与了电休克治疗的记忆障碍的发生。

石杉碱甲是从民间草药千层塔中分离得到的一种生物碱。石杉碱甲对大鼠海马、皮质等脑区的乙酰胆碱酯酶有明显抑制作用^[13], 还能显著提高大鼠血清和脑组织中超氧化物歧化酶活力和丙二醛的含量, 从而加快氧自由基的清除, 减少自由基损伤对多种记忆损害均有改善作用^[14]。梁学军等^[15]报道石杉碱甲联合电休克治疗对首发精神分裂症患者认知功能有改善作用。但关于石杉碱甲对电休克模型大鼠记忆影响的分子机制研究尚未见报道。本实验中 CS 组与 CH 组的潜伏期无显著性差异 ($P>0.05$), 表明石杉碱甲本身不影响学习记忆。EH 组潜伏期与 CH 组无显著性差异 ($P>0.05$), ES 组潜伏期长于 EH 组 ($P<0.05$), 表明给予石杉碱甲干预的 ECS 大鼠记忆成绩显著好于生理盐水干预的 ECS 大鼠, 提示本实验所用剂量的石杉碱甲能减轻电休克对大鼠学习记忆的损害, 对电休克治疗诱导的记忆障碍有保护作用。石杉碱甲灌胃的电休克组大鼠, 记忆成绩及 P-ERK 活性、ARC 活性水平均显著高于生理盐水灌胃的电休克组大鼠, 与假电休克组大鼠无显著性差异。表明石杉碱甲对电休克组大鼠的记忆有保护作用, P-ERK、ARC 的活性升高可能是石杉碱甲发挥记忆保护作用的分子机制。

本实验中 ARC 蛋白的表达以及 ERK1/2 的磷酸化水平的变化是类似的。因为 ARC 的诱导表达依赖于 ERK1/2 的活性, 我们的实验结果提示重复的 ECS 有可能通过降低 ERK1/2 的活性而降低 ARC 的诱导表达, 从而导致记忆障碍。而石杉碱甲通过升高 ERK1/2

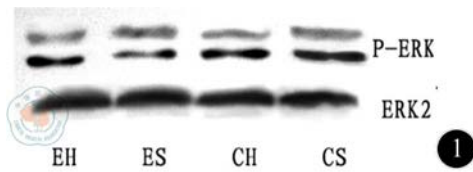


图1 大鼠海马P-ERK活性

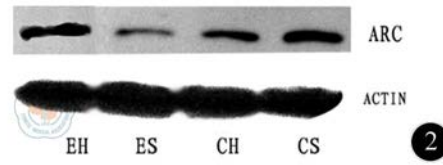


图2 大鼠海马ARC活性

的活性而增加 ARC 的诱导表达, 发挥记忆保护作用。当然, 这只是一个推测, 涉及记忆的分子环节众多, 关系复杂, 要验证该假设还需进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Medda P, Perugi G, Zanello S, et al. Response to ECT in bipolar I, bipolar II and unipolar depression. *J Affect Disord*, 2009, 118: 55-59.

[2] Viswanath B, Harihara SN, Nahar A, et al. Battery for ECT Related Cognitive Deficits (B4ECT-ReCoDe): development and validation. *Asian J Psychiatr*, 2013, 6: 243-248.

[3] Rispoli V, Ragusa S, Nisticò R, et al. Huperzine a restores cortico-hippocampal functional connectivity after bilateral AMPA lesion of the nucleus basalis of meynert. *J Alzheimers Dis*, 2013, 35: 833-846.

[4] 石瑞丽, 沈淑萍, 庞东卫, 等. 葛根素与石杉碱甲改善缺血-再灌注小鼠学习记忆. *中国医药导报*, 2009, 6: 25-27.

[5] Jiang YG, Fang HY, Pang W, et al. Depressed hippocampal MEK/ERK phosphorylation correlates with impaired cognitive and synaptic function in zinc-deficient rats. *Nutr Neurosci*, 2011, 14: 45-50.

[6] Satoh Y, Endo S, Ikeda T, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific function in learning and memory. *J Neurosci*, 2007, 27: 10765-10776.

[7] Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol*, 2008, 33: 18-41.

[8] Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, et al. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 1995, 14: 433-445.

[9] Rosi S, Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, et al. Neuroinflammation alters the hippocampal pattern of behaviorally induced Arc expression. *J Neurosci*, 2005, 25: 723-731.

[10] Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, et al. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci*, 1999, 2: 1120-1124.

[11] Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, et al. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci*, 2000, 20: 3993-4001.

[12] Larsen MH, Olesen M, Woldbye DP, et al. Regulation of activity-regulated cytoskeleton protein (Arc) mRNA after acute and chronic electroconvulsive stimulation in the rat. *Brain Research*, 2005, 1064: 161-165.

[13] Wang H, Tang XC. Anticholinesterase effects of huperzineA, E2020 and tacrine in rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1998, 19: 27-30.

[14] 任晓辉, 王伟. 胆碱酯酶抑制剂石杉碱甲的药理作用及临床应用研究进展. *中国药房*, 2005, 16: 1266.

[15] 梁学军, 甘景梨, 张伟, 等. 石杉碱甲联合 MECT 对首发精神分裂症患者认知功能的改善作用. *实用医药杂志*, 2009, 26: 16-18.

(收稿日期: 2013-08-05)
(本文编辑: 戚红丹)

成敬, 王高华, 程自立, 等. 石杉碱甲对电休克模型大鼠海马磷酸化细胞外调节蛋白激酶及活性调节的细胞骨架联合基因活性的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (16): 7463-7466.

