

## NR2B 与钩藤碱抑制甲基苯丙胺依赖斑马鱼 CPP 的关系研究

朱晨<sup>1</sup>, 刘伟<sup>1</sup>, 罗超华<sup>1</sup>, 陈志杰<sup>1</sup>, 周玉婷<sup>1</sup>, 霍楚莹<sup>1</sup>, 李璟<sup>2</sup>, 莫志贤<sup>1\*</sup><sup>1</sup>南方医科大学中医药学院; <sup>2</sup>南方医科大学中心实验室, 广州 510515

**摘要:** 研究 N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基 (NR2B) 与钩藤碱抑制甲基苯丙胺依赖斑马鱼条件性位置偏爱 (condition place preference, CPP) 作用的关系。斑马鱼分为 5 组: 空白组、模型组 (甲基苯丙胺 40 mg/kg)、钩藤碱低剂量组 (40 mg/kg)、钩藤碱高剂量组 (80 mg/kg)、氯胺酮组 (150 mg/kg)。腹腔注射甲基苯丙胺后, 进行斑马鱼条件性位置偏爱训练, 建立斑马鱼甲基苯丙胺 CPP 依赖模型, 分析各组斑马鱼在 CPP 箱中的活动, 以及各组斑马鱼脑内 NR2B 的表达情况。腹腔注射甲基苯丙胺 40 mg/kg 后, 甲基苯丙胺依赖斑马鱼 CPP 模型成功建立。与空白组相比, 模型组斑马鱼在伴药箱中的时间明显增加; 与模型组相比, 钩藤碱高剂量组斑马鱼在伴药箱中的时间明显减少。与空白组相比, 模型组斑马鱼脑内 NR2B 阳性细胞数明显增加; 给予钩藤碱干预后, 斑马鱼脑内 NR2B 阳性细胞数明显减少。与空白组比较, 模型组斑马鱼脑内 NR2B 蛋白表达明显增强, 而给予钩藤碱干预后, NR2B 蛋白表达减弱。钩藤碱可抑制甲基苯丙胺诱导的斑马鱼 CPP 效应, 其机制与抑制 NR2B 的表达有关。

**关键词:** 钩藤碱; 甲基苯丙胺; 条件性位置偏爱; N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基; 斑马鱼

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)3-0512-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.3.023

## Rhynchophylline reverses methamphetamine-induced CPP by regulating the expression of NR2B in zebrafish

ZHU Chen<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, LUO Chao-hua<sup>1</sup>,  
CHEN Zhi-jie<sup>1</sup>, ZHOU Yu-ying<sup>1</sup>, HUO Chu-ying<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, MO Zhi-xian<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University;

<sup>2</sup>Central Laboratory, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** To investigate the effect of rhynchophylline on the expression of NMDA receptor 2B subunit (NR2B) in methamphetamine-induced condition place preference (CPP) in zebrafish. Zebrafish were randomly divided into control group, model group (methamphetamine 40 mg/kg), ketamine (150 mg/kg), rhynchophylline (40 mg/kg) group and rhynchophylline (80 mg/kg) group. After intraperitoneal injection of methamphetamine, zebrafish CPP training was carried out, and the methamphetamine CPP-dependent zebrafish model was established. The activity of zebrafish in CPP compartment and the expression of NR2B in zebrafish brain were analyzed. Compared with control group, the residence time of model group in drug pair compartment was significantly increased. Compared with model group, the residence time of rhynchophylline (80 mg/kg) group in drug pair compartment was significantly decreased. The result of immunohistochemistry showed that methamphetamine (40 mg/kg) increased the number of NR2B positive cells in zebrafish brain. However, treatment with ketamine (150 mg/kg), rhynchophylline (40, 80 mg/kg) reduced the number of NR2B positive cells in zebrafish brain. Western blot indicated the expression of NR2B of model group increased significantly. The zebrafish in ketamine (150 mg/kg) and rhynchophylline (80 mg/kg) group had less NR2B expression. NR2B plays a key role in the methamphetamine-induced CPP in zebrafish. Rhynchophylline reverses methamphetamine-induced CPP by regulating the expression of NR2B in zebrafish.

**Key words:** rhynchophylline; methamphetamine; condition place preference; NR2B; zebrafish.

收稿日期: 2018-06-11 接受日期: 2019-03-13

基金项目: 国家自然科学基金 (81673628, 81573706); 广州市科技计划 (201707010287)

\* 通信作者 Tel: 86-20-61648261; E-mail: cherry@fimmu.com

钩藤为茜草科常绿木质藤本钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks.、大叶钩藤 *Uncaria macrophylla* Wall.、毛钩藤 *Uncaria hirsute* Havil.、华钩藤

*Uacaria sinensis* (Oliv.) Havil. 或无柄果钩藤 *Uacaria sessilifructus* Roxb. 的干燥带钩茎枝。味甘性微寒、味甘苦、入心包经,具有清热平肝,息风定惊的作用。钩藤碱为钩藤主要成分活性,具有降血压、镇静、抗惊厥、抗癫痫、抗炎等药理作用<sup>[1]</sup>。本团队前期研究表明,钩藤碱(60 mg/kg)可以抑制苯丙胺引起的大鼠产生条件性位置偏爱(condition place preference, CPP)并且调节其脑内氨基酸类神经递质的含量<sup>[2]</sup>;钩藤碱(80 mg/kg)具有抑制甲基苯丙胺(Methamphetamine, METH)诱导的小鼠 CPP 的作用<sup>[3]</sup>。

NMDA 受体主要由两类亚基组成:NMDA 受体 1(NR1)和 NMDA 受体 2(NR2)。NR2 受体由四个亚单位组成(NR2A-D)。NR2B 主要存在于脑部,是决定 NR2 生理性功能的重要亚基<sup>[4]</sup>。NMDA 受体主要参与了学习与记忆的过程,脑内 NR2B-NMDARs 激活后,M2 环处阳离子通道开放,细胞膜外钙离子内流,使细胞膜内钙离子浓度升高,最终引起基因转录,蛋白表达和突触后膜功能改变,从而建立长时程增强,有助于促进学习、记忆和认知功能的形成<sup>[5]</sup>。静脉给予孕期大鼠氯胺酮后发现,其子代鼠海马区内 NR2B 蛋白表达下降,且子代鼠的学习、空间记忆能力损伤<sup>[6]</sup>。

斑马鱼是一种常用的模式生物,与人类基因高度同源。斑马鱼神经系统简单但能够支配复杂的活动,可用于进行运动、学习、记忆等行为学评价。此外,斑马鱼表现出的学习、睡觉、药物成瘾和神经保护表型均与人类相似<sup>[7]</sup>。目前国内外常用于药物成瘾研究的实验动物主要是大、小鼠,但单纯的啮齿类动物模型对药物依赖研究存在明显的局限性,特别对当前层出不穷的各种新型毒品,单一物种的动物模型不能全面准确地复制出不同毒品品系的特征和成瘾症状,而苯丙胺类和氯胺酮类物质,以精神依赖为主要表现,传统的动物模型无法观察到这些新型毒品成瘾的所有特征和表现。与啮齿类动物相比,斑马鱼成鱼器官与系统的简单性和复杂性之间具有良好的平衡特点,能更准确地反映药物对动物行为的影响。斑马鱼体积小,重量轻,用药量少,能明显减少实验用成瘾性物质,节约药物资源;斑马鱼繁殖能力强,周期短,能明显缩短实验周期。因此,斑马鱼药物依赖模型的建立和应用将为毒瘾医学领域的研究增加新的模式生物资源。目前国外对阿片类和可卡因这些传统毒品的斑马鱼模型的研究报道较多,但对新型毒品的斑马鱼模型报道较少。本文

采用课题组前期建立的甲基苯丙胺诱导的斑马鱼 CPP 模型,探索钩藤碱对 METH 诱导的斑马鱼 CPP 的作用,应用蛋白免疫印迹和免疫组化法检测 NR2B 的表达,进一步阐明钩藤碱对 METH 依赖斑马鱼 CPP 的分子作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品与试剂

盐酸甲基苯丙胺,购自国家麻醉品实验室,批号:1212-9802;钩藤碱(纯度:≥98%),购自日本 MATSUURA YKUGYO 公司;盐酸氯胺酮注射液(规格:2 mL:0.1 g),购自江苏恒瑞医药股份有限公司;三卡因甲磺酸盐(MS222),购自 Sigma 公司;抗 NR2B 抗体(AB1557P),购自 Millipore 公司;鱼用生理盐水,自配,NaCl 浓度为 100 mmol/L。

#### 1.1.2 仪器

Noldus EthoVision XT 8.5 软件(荷兰 Noldus 公司);ChemImager 550 凝胶成像仪(美国 Alpha Innotech 公司)。

#### 1.1.3 实验动物

斑马鱼(野生型,AB 系,10~12 个月),雌雄各半,由南方医科大学斑马鱼实验中心提供。养鱼系统为北京爱生公司净水系统(T=28.5~29.5℃);生理盐水浓度为 0.03%~0.04%;pH 值为 7.2~7.6;光照条件为 14 h 光照(8:30 am~10:30 pm),10 h 黑夜(10:30 pm~8:30 am)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 CPP 箱的制作

CPP 箱长 16 cm,宽 9 cm,高 9 cm。CPP 箱分为两个等体积的箱体组成,一箱涂成黑色,一箱为透明,两箱体间由一个透明的活动挡板隔开。

### 1.2.2 斑马鱼基线测定

实验前将斑马鱼放入 CPP 箱中适应性喂养 2 天。第三天记录 15 min 内斑马鱼在黑白箱中的停留时间(以斑马鱼头部为准)。实验结果显示,在自然状态下,>90%的斑马鱼偏爱黑箱,因此将黑箱选为偏爱箱,白箱选为伴药箱。斑马鱼筛选要求以其在黑箱中的活动时间≥8 min 为合格<sup>[8]</sup>。

### 1.2.3 CPP 模型复制与给药

选符合基线测定的斑马鱼 50 条,随机分为 5 组:空白组,模型组(40 mg/kg),钩藤碱低剂量组(40 mg/kg),钩藤碱高剂量组(80 mg/kg),氯胺酮组(150 mg/kg)。实验前记录 15 min 内斑马鱼在伴

药箱中的停留时间及运动路线。d1、d3、d5 上午 8:00 腹腔注射甲基苯丙胺(40 mg/kg),放入伴药箱中训练 40 min(空白组则给予同体积的生理盐水);d2、d4、d6 同一时间腹腔注射生理盐水后放入偏爱箱中训练 40 min。d2~d6 晚上 8:00 腹腔注射相应的药物,对照组和模型组则注射生理盐水。末次给药 24 h 后,记录斑马鱼在伴药箱中的停留时间及运动路线。

#### 1.2.4 免疫组化法检测斑马鱼脑区 NR2B 的表达

斑马鱼行为学测定结束后,将斑马鱼冷冻处死,迅速取下斑马鱼头部,于 4% 多聚甲醛固定 24 h。斑马鱼头部进行常规脱水,包埋。切片机进行切片,厚度约为 5 μm,用防脱载玻片捞起,进行常规脱蜡与水化。按常规免疫组化法进行 NR2B 免疫组化染色,一抗为 NR2B(1:100),二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:200),阴性对照则用 PBS 液代替一抗。结果判定阳性表达为胞膜和(或)胞质内呈现棕黄色颗粒染色,若无棕黄色颗粒则为阴性。

#### 1.2.5 Western blotting 法检测斑马鱼脑区 NR2B 的表达

斑马鱼行为学测定结束后,显微镜下取斑马鱼脑组织。加入 RIPA 裂解液和 PMSF(50:1),进行超声匀浆提取组织蛋白,用 BCA 法检测蛋白浓度,参考之前的文献进行 Western blot 实验。一抗为 NR2B(1:1000),以 β-actin 为内标;二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:1000)。用 ChemiImager 550 凝胶成像仪采集图像,并用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析每个条带的积分光密度(IOD)值。

#### 1.2.6 统计学处理

数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,数

据以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行分析,结果以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 斑马鱼训练前后在伴药箱的活动变化

用 Noldus EthoVision XT 8.5 软件,分析训练前后斑马鱼在伴药箱中的停留时间和运动轨迹,比较训练前后各组斑马鱼在伴药箱中活动时间的差值(斑马鱼训练后在伴药箱中的活动时间-斑马鱼训练前在伴药箱中的活动时间)。由图 1 可见,与空白组相比,注射 METH 40 mg/kg 后,模型组斑马鱼在伴药箱中停留时间明显增加( $P < 0.01$ );与模型组相比,钩藤碱高剂量组(80 mg/kg)斑马鱼在伴药箱中的停留时间明显减少( $P < 0.01$ )。各组斑马鱼造模前后在 CPP 箱的运动路线图见图 2。

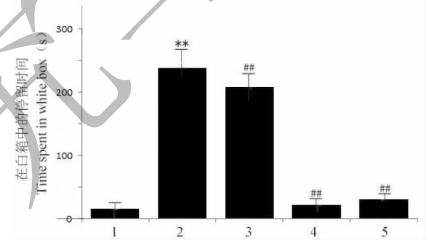


图 1 在白箱中的停留时间 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Time spent in white box ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注:1:空白组;2:模型组;3:钩藤碱低剂量组;4:钩藤碱高剂量组;5:氯胺酮组。与空白组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ##  $P < 0.01$ 。

Note:1:Control group;2:Model group;3:Rhynchophylline low-dose (40 mg/kg) group;4:Rhynchophylline high-dose (80 mg/kg) group;5:Ketamine group. Compared with control group, \*\*  $P < 0.01$ ; compared with model group, ##  $P < 0.01$ .

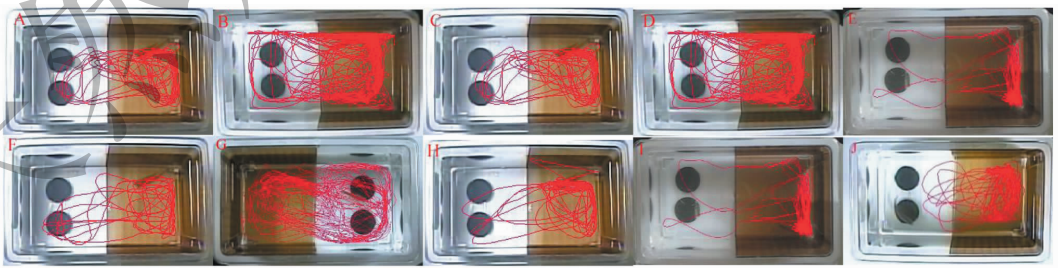


图 2 斑马鱼在 CPP 箱中的线路图

Fig. 2 Road maps of zebrafish in CPP compartment

注:A:空白组(造模前);B:模型组(造模前);C:钩藤碱低剂量组(造模前);D:钩藤碱高剂量组(造模前);E:氯胺酮组(造模前);F:空白组(造模后);G:模型组(造模后);H:钩藤碱低剂量组(造模后);I:钩藤碱高剂量组(造模后);J:氯胺酮组(造模后)。

Note:A:Control group before modeling;B:Model group before modeling;C:Rhynchophylline low-dose (40 mg/kg) group before modeling;D:Rhynchophylline high-dose (80 mg/kg) group before modeling;E:Ketamine group before modeling;F:Control group after modeling;

G:Model group after modeling;H:Rhynchophylline low-dose (40 mg/kg) group after modeling;I:

Rhynchophylline high-dose (80 mg/kg) group after modeling;J:Ketamine group after modeling.

## 2.2 NR2B 蛋白免疫组化结果

采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件,测定阳性细胞的 IOD 值,取其平均值作为该组各项指标的相对含量。如图 3 所示,与空白组相比,经过 CPP

训练后,模型组斑马鱼脑区中 NR2B 阳性细胞数明显增加( $P < 0.01$ );与模型组相比,给予钩藤碱干预后,斑马鱼脑区 NR2B 阳性细胞数明显下降, ( $P < 0.01$ )。

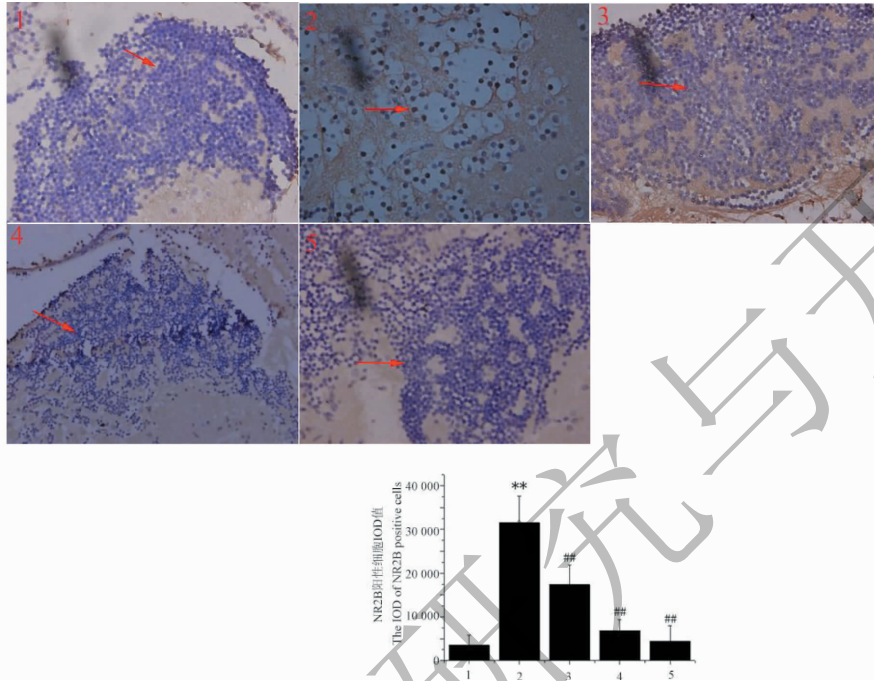


图 3 各组斑马鱼中脑区 NR2B 阳性细胞的积分光密度 IOD ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 The IOD of NR2B positive cells in area of midbrain of zebrafish in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:1:空白组;2:模型组;3:钩藤碱(40 mg/kg)组;4:钩藤碱(80 mg/kg)组;5:氯胺酮组。

与空白组比较, \*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, ##  $P < 0.01$ 。

Note: 1: Control group; 2: Model group; 3: Rhynchophylline low-dose (40 mg/kg) group; 4: Rhynchophylline high-dose (80 mg/kg) group; 5: Ketamine group. Compared with control group, \*  $P < 0.01$ ; compared with model group, ##  $P < 0.01$ .

## 2.3 NR2B 蛋白的 Western blot 分析结果

如图 4 所示,斑马鱼脑内的 NR2B 表达 IOD 值存在统计学差异。与空白组相比,模型组斑马鱼脑

内的 NR2B 表达增加( $P < 0.01$ );与模型组相比,钩藤碱高剂量组(80 mg/kg)斑马鱼脑内的 NR2B 表达明显减少( $P < 0.01$ )。

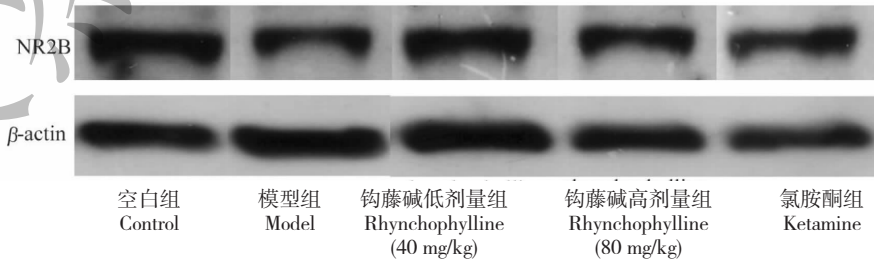


图 4 斑马鱼脑内 NR2B 蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 The protein expression of NR2B in zebrafish brain ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:1:空白组;2:模型组;3:钩藤碱低剂量组;4:钩藤碱高剂量组;5:氯胺酮组。与空白组比较, \*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, ##  $P < 0.01$ 。

Note: 1: Control group; 2: Model group; 3: Rhynchophylline low-dose (40 mg/kg) group; 4: Rhynchophylline high-dose (80 mg/kg) group; 5: Ketamine group. Compared with control group, \*  $P < 0.01$ ; compared with model group, ##  $P < 0.01$ .

### 3 结果

METH 俗称“冰毒”，是一种被严重滥用的新型毒品，具有成瘾性极强，复吸率极高等特点，长期以来一直是一个困扰医学和公众健康的棘手问题。CPP 实验人为的将药物与动物先天非偏爱侧关联，对比动物训练前后在非偏爱侧的停留时间来判断其依赖程度，是公认的用于研究药物依赖、精神依赖的模型<sup>[9]</sup>。

本次实验结果显示，与空白组相比，腹腔注射 METH(40 mg/kg) 后，斑马鱼在伴药箱中的停留时间明显增加，表明斑马鱼 METH 依赖 CPP 模型构建成功；而在给予钩藤碱(80 mg/kg) 治疗后，斑马鱼在伴药箱中的停留时间明显减少，表明钩藤碱可以抑制 METH 引导的 CPP 行为。

NMDA 受体是中枢神经系统中主要的兴奋性氨基酸受体之一。NR2B 是其发挥生理作用的重要亚基，具有增强学习和记忆能力的作用，在药物依赖发生发展过程中起着重要作用<sup>[10]</sup>。大鼠连续 4 天腹腔注射 METH(10 mg/kg)，大鼠脑内 NR2B 表达显著上调<sup>[11,12]</sup>；减少大鼠脑内 NR2B 亚基，可阻止吗啡引导大鼠产生奖赏行为<sup>[13]</sup>；吗啡诱导大鼠形成条件性位置偏爱之后，艾芬地尔(NR2B 拮抗剂)可以剂量依赖性地拮抗吗啡诱导的 CPP<sup>[14]</sup>。

本实验研究发现，与空白组比较，给予 METH 40 mg/kg 后，METH 依赖斑马鱼脑内 NR2B 阳性细胞数及 NR2B 蛋白的表达明显增加；给予钩藤碱(80 mg/kg) 干预后，斑马鱼脑内 NR2B 阳性细胞数和 NR2B 蛋白表达明显减少，表明 NR2B 与钩藤碱抑制 METH 引起的 CPP 效应有关，是动物行为学改变的神经生物学机制之一。

钩藤碱是中药钩藤的主要活性成分，本团队前期研究发现，钩藤碱可以抑制 METH 诱导小鼠和斑马鱼产生 CPP 效应，并且抑制其脑内 TH 蛋白的表达<sup>[8]</sup>。钩藤碱能抑制苯丙胺依赖大鼠产生 CPP 效应，并减少其脑内伏核和杏仁核中 NR2B 蛋白及 NR2BmRNA 的表达<sup>[15,16]</sup>。钩藤碱可抑制 METH 引起的大鼠伏隔核内 GluR2/3 亚基蛋白表达上调，以及下丘脑内 GluR2/3 亚基蛋白表达下调<sup>[17]</sup>。钩藤碱(60 mg/kg) 可抑制 METH 依赖大鼠海马 CA1 区和纹状体中 p-CREB、c-Fos 阳性细胞数明显增加的趋势，使 p-CREB 及 c-Fos 阳性细胞数恢复正常<sup>[18]</sup>。

本研究表明，钩藤碱(80 mg/kg) 具有抑制

METH 依赖斑马鱼 CPP 的作用，这种作用可能与降低斑马鱼脑内 NR2B 蛋白的表达有关。由于药物成瘾的发生与发展极其复杂，关于钩藤碱调控 NR2B 的机制仍需进一步深入研究。

### 参考文献

- 1 Gao XY, Ding R, Wang DP, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Uncaria tomentosa*[J]. *J Tianjin Med Uni*(天津医科大学学报), 2017, 4:380-382.
- 2 Zhou JY, Mo ZX. Effect of rhynchophylline on amino acid neurotransmitter content in brain of amphetamine-dependent rats[J]. *Chin J Drug Depend*(中国药物依赖性杂志), 2007, 2:95-98.
- 3 Li JK, Liu W, Peng J, et al. Effect of rhynchophylline on expression of glutamate receptor 1 in methamphetamine-dependent mice on conditioned place preference[J]. *Chin J Exp Med Formul*(中国实验方剂学杂志), 2014, 18:128-132.
- 4 Yu HF, Wu G, Cui SB. Effects of chronic alcoholism and withdrawal on the expression of NMDA receptor subunit NR2B in hippocampus of rats[J]. *Chin J Nevr Ment Dis*(中国神经精神疾病杂志). 2007, 6:365-367.
- 5 Chen XH, Ren Q. Advances in the relationship between NMDA receptor NR2B subunit and learning and memory[J]. *J Clin Anesthesiol*(临床麻醉学杂志). 2015, 8:817-819.
- 6 Zhao T, Li Y, Wei W, et al. Ketamine administered to pregnant rats in the second trimester causes long-lasting behavioral disorders in offspring[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 68:145-155.
- 7 Panula P, Sallinen V, Sundvik M, et al. Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases[J]. *Zebrafish*, 2006, 3:235-247.
- 8 Jiang M, Chen Y, Li C, et al. Inhibiting effects of rhynchophylline on zebrafish methamphetamine dependence are associated with amelioration of neurotransmitters content and down-regulation of TH and NR2B expression[J]. *Prog Neuro-Psychoph*, 2016, 68:31-43.
- 9 Deng HQ, Zhou XH, Zhang DK, et al. The application of conditional location experiment method and non-biased experiment design in drug dependence research[J]. *Chin J Drug Depend*(中国药物依赖性杂志), 2006, 15(2):8-11.
- 10 Sun YZ, Liu TX, Wei Z, et al. Effect of electroacupuncture on expression of NR2B in prefrontal cortex in morphine-withdrawal rats[J]. *WJAM*, 2014, 3:43-48.