

◇ 基础研究 ◇

中国临床药理学与治疗学
中国药理学会主办
CN 34-1206/R, ISSN 1009-2501
http://www.cjcp.com
2017 Dec;22(12):1377-1381

RGS4 和 D2 受体信号通路相关分子在甲基苯丙胺 依赖 CPP 大鼠纹状体的表达变化

蒙国懿¹, 何繁漪¹, 隋念含¹, 赵林波¹, 洪仕君², 邢豫明³, 赵永娜¹

¹昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, ²法医学院, 昆明 650500, 云南;

³云南省公安厅禁毒处毒品技术公安部重点实验室, 昆明 650228, 云南

摘要 目的:研究甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)依赖条件性位置偏爱(conditioned place preference, CPP)实验大鼠纹状体 G 蛋白信号调节因子 4(regulator of G-protein signal 4, RGS4)和多巴胺 D2 受体(dopamine receptor D2)信号通路相关分子的表达变化。**方法:**建立 METH 依赖 CPP 大鼠 1 周组、2 周组,应用蛋白质印迹(Western blot)测定各组大鼠纹状体 RGS4 和 D2、抑制性 G 蛋白 α 亚基(inhibitory G protein α -subunit, G α i)、丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)蛋白表达的变化;应用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定各组大鼠纹状体环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)含量的变化。**结果:**与生理盐水对照组相比, METH 依赖 1 周组、2 周组大鼠在伴药箱的平均停留时间明显延长($P < 0.05$)。与生理盐水对照组相比, RGS4 蛋白在 METH 依赖 1 周、2 周组的表达均明显下降($P < 0.01$), 且与 METH 依赖 1 周组相比, 2 周组的下降更为明显($P < 0.05$);与生理盐水对照组相比, D2、G α i、MAPK 蛋白以及 cAMP 在 METH 依赖 1 周、2 周组的表达均明显升高($P < 0.01$), 且与 METH 依赖 1 周组相比, 2 周组的升高更为

明显($P < 0.05$)。**结论:**在 METH 依赖的 CPP 大鼠纹状体中, RGS4 和 D2 受体信号传导通路相关分子发生了改变, RGS4 可能参与了 METH 依赖的 CPP 大鼠纹状体 D2 受体信号传导通路的调节。

关键词 甲基苯丙胺;条件性位置偏爱;G 蛋白信号调节因子 4;多巴胺 D2 受体;抑制性 G 蛋白 α 亚基;丝裂原激活的蛋白激酶;环磷酸腺苷

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-2501(2017)12-1377-05

甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)属于苯丙胺类兴奋剂,俗称“冰毒”,是一种具有精神活性的新型毒品^[1], METH 滥用可能导致人体出现兴奋、焦虑、幻觉、认知功能和精神活动障碍,甚至死亡^[2], 其对身心健康和社会稳定造成了极大的危害。

纹状体参与了药物成瘾的学习和记忆过程^[3]。脑内多巴胺受体可以分为 D1-D5 共五种亚型, D1 和 D2 受体基因在脑内表达广泛, 尤其是在纹状体中表达量较高。其中 D2 受体通过与 G α i 偶联调节 AC-cAMP-PKA 信号通路, 进而参与药物成瘾的形成^[4]。丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路是广泛存在于各种细胞中的一条信号转导途径, 即丝裂原活化的蛋白激酶家族, 包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun n-termi-

2017-07-19 收稿 2017-08-23 修回

云南省应用基础研究计划联合专项基金资助项目(2012FB023)

蒙国懿,男,硕士,研究方向:神经药理学。

Tel:15288121930 E-mail:mgylifa7@163.com

赵永娜,通信作者,女,教授,硕士生导师,研究方向:神经药理学。

Tel:15887838797 E-mail:mszhaoyan@163.com

nal kinase, JNK)、P38 丝裂原激活的蛋白激酶 (P38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 三个成员,对于细胞周期的运行和基因表达具有重要调控作用。MAPK 通路可被多巴胺受体激活,而且不同类型的多巴胺受体激活不同的 MAPK 亚型^[5]。D2 受体主要激活 ERK,且这一作用依赖 AC-cAMP-PKA 及 Ras^[6-7]。G 蛋白信号调节因子(regulator of G-protein signaling, RGS)属于一类新发现的蛋白家族,其中 RGS4 为 RGSs 家族的成员之一,是 G 蛋白信号传导的负性调节因子,对脑内的 G α i 具有较强的调节作用^[8]。目前, METH 依赖的大鼠纹状体 RGS4 和 D2 受体信号的分子变化尚不清楚。

1 材料与方法

1.1 动物 健康雄性 Strague-Dawley 大鼠 90 只, 体重(220 ± 20) g, 由昆明医科大学实验动物学部提供, 动物合格证号: SCXK(滇) K2015-002。

1.2 药品及主要试剂 甲基苯丙胺药片由合作单位云南省公安厅禁毒处毒品分析与禁毒技术公安部重点实验室合法提供; 水合氯醛, 购自天津市科密欧化学试剂有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 购自北京天根生化公司; 预染蛋白 marker 0671, 购自 Fermentas 公司; ECL 化学发光检测试剂, 购自 Thermo 公司; 一抗: 鼠抗 D2 单克隆抗体, 购自美国 abgent 公司; 兔抗 G α i 单克隆抗体, 购自 abcam 公司; 兔抗 MAPK 单克隆抗体, 购自美国 Cell Signaling 公司; 兔抗 RGS4 多克隆抗体, 购自美国 abgent 公司; 兔抗 β -actin 单克隆抗体, 购自美国 SAB 公司; 二抗: HRP 标记的羊抗兔二抗, 购自美国 Cell Signaling 公司; HRP 标记的羊抗鼠二抗, 购自美国 Cell Signaling 公司; 大鼠 cAMP 酶联免疫分析试剂盒, 购自上海江莱生物公司。

1.3 METH 依赖 CPP 模型的建立和分组 将 90 只大鼠随机分为三组: 生理盐水对照组(30 只)、甲基苯丙胺依赖 1 周组(30 只)、2 周组(30 只)。条件性位置偏爱(conditioned place preference, CPP)实验: (1) 预实验: 首先在未给药时, 将实验大鼠置于鼠博士动物行为分析系统实验箱内, 移去中间的隔板使大鼠可以在黑箱与白箱及通道内自由活动, 适应 3 d, 1 次/d, 每次 15 min。3 d 开始记录每只

大鼠在白盒和黑盒的平均停留时间, 确定大鼠的天然偏爱倾向。3 d 适应结束后, 将每只动物的非偏爱侧箱设为伴药箱后进行下一步实验。(2) 条件化训练: 应用 METH 训练大鼠, 通过训练使其对伴药箱产生条件反射。在此期间经腹腔注射 METH 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 2 次/d(8:00、20:00), 注射 METH 后即放入伴药箱内, 用隔板封闭通道, 观察 30 min。连续注射 METH 并训练大鼠 10 d。除生理盐水对照组给予相同剂量的生理盐水注射 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 2 次/d(8:00、20:00) 外, 其它的与 METH 依赖 CPP 组相同。(3) 训练后测试: 11 d 进行 CPP 实验测定, 测试前将隔板打开, 使大鼠能够在两个盒子内自由活动, 观察 15 min, 分别记录各组大鼠在两侧箱体停留的时间。测试时, 尽量保持 CPP 箱内光线、气味一致以及环境安静。

确认动物建立了明显的 METH 依赖后, 2 个 METH 依赖组的动物再持续腹腔注射 METH 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 2 次/d(8:00、20:00), 注射甲基苯丙胺后即放入伴药箱内, 用隔板封闭通道, 观察 30 min, 持续注射时间分别为 1 周和 2 周, 建立 2 个不同依赖时间段的依赖大鼠模型。并且分别在注射 1 周、2 周完成后的 2 d 进行 CPP 实验, 记录实验结果。

1.4 Western blot 技术检测 METH 依赖 CPP 大鼠纹状体 RGS4、D2、G α i、MAPK 蛋白表达的变化 将各组大鼠用 10% 水合氯醛麻醉, 断头处死, 开颅取脑, 取出纹状体, 参照 Paxinos 和 Watson^[9] 大鼠脑解剖图, 分离纹状体, 加入蛋白裂解液, 匀浆, 计算上样量, 取匀浆好的样品, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 洗膜, 5% 牛奶封闭 2 h 后, 加入适量一抗稀释液, 一抗用 1% 的 PBST 稀释, 稀释浓度: D2 为 1:1 000, RGS4 为 1:1 000, MAPK 为 1:1 000, G α i 为 1:10 000, β -actin 为 1:2 000, 4 ℃ 过夜进行孵育。1% PBST 洗液进行洗涤, 加入二抗稀释液, Goat anti-rabbit IgG-HRP 稀释比例为 1:3 000, Goat anti-mouse IgG-HRP 稀释比例为 1:20 000, 室温下孵育 2 h; 1% PBST 洗液进行洗涤; 化学发光、显影、定影; 凝胶图像分析。

1.5 ELISA 方法检测甲基苯丙胺依赖 CPP 大鼠纹状体 cAMP 含量的变化 各组大鼠依赖模型建立成功后, 用 10% 的水合氯醛麻醉后处死大鼠, 取出大脑分离纹状体, 加入 PBS, pH 7.4 匀浆

制样。按大鼠 cAMP 酶联免疫分析试剂盒的说明书进行大鼠纹状体 cAMP 含量变化的检测。

1.6 统计分析 实验数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。多组多重比较使用 One-way ANOVA 单因素方差分析,方差齐时使用 LSD 统计方法, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义;如果方差不齐时用 Dunnett's T3 法检验, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 METH 依赖 CPP 实验结果 METH 依赖 1 周组、2 周组大鼠在伴药箱的停留时间均明显长于生理盐水对照组 ($P < 0.05$),提示甲基苯丙胺依赖 1 周、2 周组大鼠产生了条件性位置偏爱 (Tab. 1)。

Tab. 1 Comparison of the average time of rats in the methamphetamine-paired chamber between two groups ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Group	Average time (s)
Saline control group	343 $\pm$ 42
1 week of METH dependence group	556 $\pm$ 141 ^b
2 week of METH dependence group	644 $\pm$ 180 ^b

Compared with Saline control group, ^b $P < 0.05$.

2.2 METH 依赖 CPP 大鼠纹状体 RGS4、D2、G α i、MAPK 蛋白表达的变化 与生理盐水对照组相比,METH 依赖 1 周组、2 周组 RGS4 蛋白表达均明显下调 ($P < 0.01$);且与 METH 依赖 1 周组相比,2 周组的下调更为明显 ($P < 0.05$)。METH 依赖 CPP 大鼠纹状体中 D2、G α i、MAPK 蛋白的表达,与生理盐水对照组相比,METH 依赖 1 周组、2 周组 D2、G α i、MAPK 蛋白表达均明显上调 ($P < 0.01$),且与 METH 依赖 1 周组相比,2 周组的上调更为明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见 Fig. 1。

2.3 METH 依赖 CPP 大鼠纹状体 cAMP 含量的变化 与生理盐水对照组比较,METH 依赖 1 周组、2 周组的浓度均明显上调,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),且与 METH 依赖 1 周组相比,2 周组的上调更为明显,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见 Tab. 2。

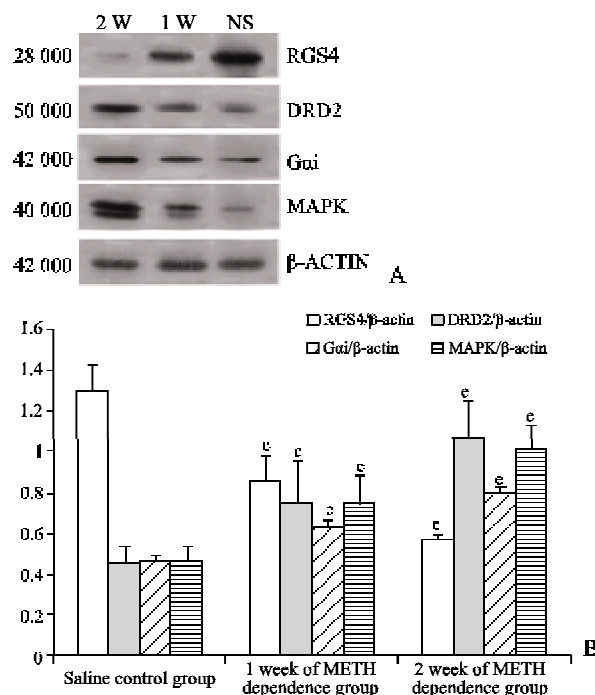


Fig. 1 Expression of RGS4, D2, G α i and MAPK protein in the striatum of CPP methamphetamine dependent rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Compared with Saline control group, ^c $P < 0.01$; compared with 1 week of METH dependence group, ^e $P < 0.05$.

Tab. 2 Changes of the cAMP expression in the striatum of CPP methamphetamine dependent rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	cAMP concentration (nmol/L)
Saline control group	37.54 $\pm$ 2.45
1 week of METH dependence group	42.30 $\pm$ 1.72 ^e
2 week of METH dependence group	47.76 $\pm$ 1.85 ^{ef}

Compared with Saline control group, ^e $P < 0.01$; compared with 1 week of METH dependence group, ^f $P < 0.01$.

3 讨论

本实验发现,经过 10 d 的腹腔甲基苯丙胺 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 给药后,METH 依赖 1 周、2 周组大鼠在伴药箱的停留时间显著长于生理盐水对照组,且 2 周组比 1 周组的表现更为明显,提示 METH 依赖 CPP 大鼠模型建立成功。

本实验通过检测 METH 依赖 CPP 大鼠纹状体中 RGS4、D2、G α i、MAPK、cAMP 的表达,与生理盐水对照组相比,1 周组、2 周组 RGS4 蛋白表达均明显下调;且与 METH 依赖 1 周组相比,2 周组

的下调更为明显;与生理盐水对照组相比,1周组、2周组 D2、G α i、MAPK 蛋白以及 cAMP 的表达均明显上调;且与 METH 依赖 1 周组相比,2 周组的上调更为明显。提示 RGS4、D2、G α i、MAPK、cAMP 在 METH 依赖 CPP 中产生了变化。

RGS4 是 G α i 的 GTP 酶激活蛋白,抑制 G 蛋白偶联受体信号的传导^[10]。RGS4 表达下调,可能对 D2 受体信号通路(D2-G α i-cAMP)的抑制作用减弱,使 D2 受体信号通路(D2-G α i-cAMP)相应分子表达上调。本研究提示甲基苯丙胺依赖形成后 RGS4 表达下调,可能是通过影响 D2 受体信号传导,进而引起 CREB 和即刻早基因表达的改变,从而参与甲基苯丙胺依赖的形成。而 D2 受体在成瘾药物的强化、奖赏、活动增强、行为敏化等方面都有重要的作用,有研究者在研究扣带回立体定向毁损对 METH 大鼠脑内颞叶皮质多巴胺 D2 受体表达时发现,D2 受体表达显著上升^[11]。有研究表明^[12]:产生依赖性最根本的分子基础是 cAMP 信号通路的上调。慢性吗啡、鸦片刺激导致的 cAMP 通路上调,该上调作用包括 AC 及 cAMP 表达量升高。Schroeder 等^[13]通过建立可卡因的行为敏化模型,发现伏隔核 G α i 蛋白含量的上调。MAPK 通路可由多巴胺受体激活,而且不同类型的多巴胺受体激活不同的 MAPK 亚型。急性可卡因刺激可以激活小鼠纹状体 ERK 激酶,ERK 抑制剂可阻断可卡因对小鼠的奖赏效应^[14];而慢性可卡因刺激可导致中脑腹侧被盖区 ERK 激酶活性持续增强^[15]。Lerner 等^[16]研究指出 RGS4 是内源性大麻素与 D2 受体信号通路的关键点,为多巴胺受体的负性调节蛋白,是其过表达可能成为治疗帕金森的有效途径。Min 等^[17]的研究进一步指出 RGS4 是通过其 N 末端对 D2 受体信号通路进行强抑制作用,为治疗精神类疾病的有效调控靶点。本实验结果显示 METH 依赖 CPP 大鼠纹状体中 RGS4 的表达与 D2 受体信号通路(D2-G α i-cAMP)相关分子表达相反,这与 Lerner、Min 等^[16-17]的研究结果相似,提示 RGS4 可能与 METH 依赖 CPP 大鼠纹状体 D2 受体信号通路的调节有关。

参考文献

[1] UNODC. World Drug Report 2012[M]. United Na-

tions publication, Sales No. E.12.XI.1, 2012

- [2] Grant KM, Levan TD, Wells SM, et al. Methamphetamine-Associated Psychosis [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2012, 7(1):113-139.
- [3] Maryam R, Effat R, Nasrin H, et al. Effect of electrical stimulation of nucleus accumbens with low, median and high currents intensities on conditioned place preference induced by morphine in rats[J]. Adv Biomed Res, 2014, 3:14.
- [4] Wise RA. Addiction becomes a brain disease [J]. Neuron, 2000, 26(1):27.
- [5] Chan AS, Yeung WW, Wong YH. Integration of G protein signals by extracellular signal-regulated protein kinases in SK-N-MC neuroepithelioma cells [J]. J Neurochem, 2005, 94(5):1457-1470.
- [6] Mizoguchi H, Yamada K, Mizuno M, et al. Regulations of methamphetamine reward by extracellular signal-regulated kinase 1/2/ets-like gene-1 signaling pathway via the activation of dopamine receptors [J]. Mol Pharmacol, 2004, 65(5):1293-1301.
- [7] Owens WA, Williams JM, Saunders C, et al. Rescue of dopamine transporter function in hypoinsulinemic rats by a D2 receptor-ERK-dependent mechanism [J]. J Neurosci, 2012, 32(8):2637-2647.
- [8] Mirmics K, Middleton FA, Stanwood GD, et al. Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia [J]. Mol Psychiatry, 2001, 6(3):293-301.
- [9] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates fourth edition [J]. Rat Brain Stereotaxic Coordinates, 2009, 3(2):6.
- [10] Kim G, Jung S, Son H, et al. The GABAB receptor associates with regulators of G-protein signaling 4 protein in the mouse prefrontal cortex and hypothalamus [J]. Bmb Reports, 2014, 47(6):324-329.
- [11] 刘建新,王小亚,王晓峰,等.扣带回毁损对甲基苯丙胺大鼠颞叶皮质多巴胺 D2 受体的影响 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2006, 33(3):211-213.
- [12] 洪仕君,李俊麟,李利华,等.吗啡依赖鼠成瘾相关脑区腺苷酸环化酶的变化 [J]. 法医学杂志, 2006, 22(4):254-257.
- [13] Schroeder JA, Hummel M, Unterwald EM. Disruption of G i/o, protein signaling in the nucleus accumbens results in a D1 dopamine receptor-mediated hyperactivity [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2004, 79(1):93-99.
- [14] Valjent E, Corvol J, Pages C, et al. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for co-

- caine-rewarding properties[J]. J Neurosci, 2000, 20 (23):8701-8709.
- [15] Velazquez EE, Valdomero A, Maldonado NM, et al. Perinatal protein deprivation facilitates accumbal ERK phosphorylation in cocaine-sensitized adult rats [J]. Behav Brain Res, 2013, 241(1):222-227.
- [16] Lerner TN, Kreitzer AC. RGS4 is required for dopaminergic control of striatal LTD and susceptibility to parkinsonian motor deficits[J]. Neuron, 2012, 73(2):347-359.
- [17] Min C, Cheong SY, Cheong SJ, et al. RGS4 exerts inhibitory activities on the signaling of dopamine D2 receptor and D3 receptor through the N-terminal region [J]. Pharmacol Res, 2012, 65(2):213-220.

Expression of RGS4 and D2 receptor signaling pathway in striatum of methamphetamine-dependent CPP rats

MENG Guoyi¹, HE Fanyu¹, SUI Nianhan¹, ZHAO Linbo¹, HONG Shijun², XING Yuming³, ZHAO Yongna¹

¹School of Pharmaceutical Sciences and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Product, Kunming Medical University, ²School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan, China; ³Key Laboratory of Narcotics Technology and Ministry of Police of Yunnan Provincial Police Department, Kunming 650228, Yunnan, China

ABSTRACT **AIM:** To study the expression of signal transduction molecules in the striatum G protein protein 4 (RGS4) and dopamine D2 receptor (D2) in conditioned place preference (CPP) rats treated with methamphetamine (meth). **METHODS:** METH dependence CPP model was established (1 week and 2 weeks of METH dependence groups), The protein expression of RGS4 and D2, inhibitory G protein alpha-subunit (G α i), mitogen-activated protein kinase (MAPK) in striatum were determined by Western blotting (WB). The changes of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) content in striatum of rats were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS:** Compared with saline control group, the average time of rats in the methamphetamine-paired chamber for two groups was increased ($P < 0.05$). Compared with saline control group, RGS4 protein expressions in

the two METH dependent groups were reduced ($P < 0.01$); compared with 1 week of METH dependence group, that of 2 weeks group was reduced significantly ($P < 0.05$). D2, G α i, MAPK protein and cAMP expressions in the two METH dependent groups were increased ($P < 0.01$); compared with 1 week of METH dependence group, those of 2 weeks were increased significantly ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** RGS4 and D2 receptor signaling pathways in striatum have changed in METH dependent rats, RGS4 may be involved in the regulation of METH-dependent D2 receptor signaling pathway in METH dependent rats.

KEYWORDS methamphetamine; CPP; RGS4; D2; G α i; MAPK; cAMP

本文编辑:李娟