

烟碱对大鼠海马脑片 β_1 -肾上腺素能受体的影响

王 勇, 朱小南, 余剑平, 陈汝筑

(中山大学中山医学院药理教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】研究烟碱对 β_1 -肾上腺素能受体的作用。【方法】将 400 μm 厚的海马脑片置于预先经体积分数 95% O_2 和 5% CO_2 饱和的 28 $^\circ\text{C}$ 人工脑脊液中孵育 120 min 后加入烟碱, 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 分别于烟碱作用后 30, 60, 90, 120 min, 用半定量逆转录-聚合酶链反应和免疫印迹法检测大鼠海马脑片中 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 表达和蛋白水平的变化。【结果】大鼠海马脑片经烟碱作用后, β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 表达明显增加, 在 60 min 时最为显著 ($P < 0.05$); 蛋白水平的变化与基因表达变化有较好的一致性, 但蛋白变化的高峰出现时间比 mRNA 晚, 且变化幅度更大。【结论】烟碱的急性刺激能使 β_1 -AR 肾上腺素能受体基因转录和蛋白表达上调, 其变化规律提示烟碱不仅调控 β_1 -肾上腺素能受体基因转录, 同时也对 β_1 -肾上腺素能受体转录后进行调控, 最终导致 β_1 -肾上腺素能受体蛋白水平升高。

关键词: 烟碱; 受体; 肾上腺素能 β_1 ; 海马

中图分类号: R961; 966

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2003)02-0136-04

Effect of Nicotine on β_1 -adrenergic Receptor Gene Expression and Protein Level in Rat Hippocampal Slice

WANG Yong, ZHU Xiao-nan, YU Jian-ping, CHENG Ru-zhu

(Department of Pharmacology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To investigate the effect of nicotine on β_1 -adrenergic receptor in hippocampal slice. 【Methods】Hippocampal slices (400 μm thick) were incubated in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) previously saturated with 95% O_2 and 5% CO_2 at 28 $^\circ\text{C}$ for 120 min, and then 10 $\mu\text{mol/L}$ of nicotine was added. 30, 60, 90, 120 mins after addition of nicotine, mRNA of β_1 -adrenergic receptor of these samples was studied with semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the protein level was studied with Western blot. 【Results】The mRNA gene expression and the protein level of β_1 -adrenergic receptor in hippocampal slices were increased during treatment with nicotine. The increasing peak of protein level was later but higher than that of mRNA level. 【Conclusion】Both expression of β_1 -adrenergic receptor gene transcription and post-transcriptional protein level in rat hippocampus are altered by nicotine.

Key words: nicotine; receptors, beta-1 adrenergic; hippocampus

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(2): 136 ~ 139, 174]

人们普遍认为烟碱类药物具有提高认知功能的作用。研究发现, 烟碱提高认知功能的分子机制可能是烟碱导致海马神经细胞内 Ca^{2+} 增加而诱导或易化长时程增强效应^[1,2], 这种现象可被 β -肾上腺素能受体阻断剂 propranolol 完全或部分阻断^[3], 说明

β -肾上腺素能受体参与了烟碱诱导的长时程增强。许多行为学研究也证实脑中 β_1 -肾上腺素能受体系统与学习记忆有关^[4,5], 但是烟碱如何影响中枢 β -肾上腺素能受体目前尚缺乏深入研究。为此, 本研究针对烟碱对 β_1 -肾上腺素能受体的基因表

收稿日期: 2002-09-10

基金项目: 卫生部科研基金资助项目 (98-1-086)

作者简介: 王 勇 (1966-), 男, 重庆人, 博士后, 副教授; 陈汝筑, 男, 教授。

达和蛋白水平的影响进行研究。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂

动物: 健康成年雄性 SD 大鼠 (120 ± 20) g, 由取得二级动物合格证的中山大学实验动物中心提供。抗 β_1 -肾上腺素能受体多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品; PVDF 膜与化学发光系统购于 New England Nucle Dupont, RNA 提取试剂 Tripure™、逆转录酶、Taq 酶、oligo d(T)₁₆ 及 dNTP 为 Roche 产品, 烟碱购于 Sigma 公司。

1.2 脑片的制备

参照 Giovannini^[6]并略加改动, 将大鼠用乙醚麻醉后在低温条件下迅速取出大脑, 轻柔地分离出完整海马, 在切片机上迅速将海马切成 400 μ m 厚的脑片, 置于预先经体积分数 95% O₂ 和 5% CO₂ 饱和的冰冷的人工脑脊液 (ACSF: 124 mmol/L NaCl, 3.4 mmol/L KCl, 1.7 mmol/L MgSO₄ · 7H₂O, 25 mmol/L NaHCO₃, 1.8 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L glucose; pH 7.4) 中, 然后移至 28 °C 的 ACSF 孵育 120 min, 加入烟碱, 使其终浓度为 10 μ mol/L。当烟碱分别作用至 30, 60, 90, 120 min 时, 收集待测脑片进行测定。

1.3 RT-PCR 检测 β_1 -肾上腺素能 mRNA 表达

参照 Tripure™ 提供的方法从脑片中提取 RNA, 经甲醛凝胶变性电泳和测定 A_{260/280} 比率后, 取合格的样本 RNA 用于合成 cDNA 第一链。逆转录反应体系总体积为 20 μ L, 其中含有: 逆转录缓冲液、2 μ g 总 RNA, 65 °C 温育 15 min 后, 加 RNA 酶抑制剂、Oligo d(T)₁₆、dNTP, 42 °C 反应 2 min 后加入 200 U 的逆转录酶, 继续温育 60 min, 最后 72 °C 加热 10 min 终止反应, 立即置于冰上冷却, 产物用作 PCR 扩增模板。

根据 GenBank 收录的大鼠 β_1 -肾上腺素能受体 cDNA 序列, 利用 GeneClub PCR 引物设计工具软件设计 PCR 引物, 上海生工合成。上游引物 5'-CAT CAC GCT GCC CTT TCG CTA -3', 下游引物 5'-CGG TTG GTG ACG AAA TCG C -3', 扩增目的产物片段为 188 bp。取 3.0 μ L 逆转录产物加入 50 μ L 的 PCR 反应体系中进行扩增。先 95 °C 加热 5 min, 然后按 94 °C (60 s), 55 °C (45 s), 72 °C (45 s) 进行 28 个循环扩增, 最后 72 °C 延伸 10

min。PCR 循环次数应在 PCR 反应的指数期。为便于定量分析, 设 GAPDH 为内参照, 其上游引物为 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG A-3', 下游引物为 5'-ATG AGC CCT TCC ACG ATG C-3' 扩增片段长度 303 bp。最终产物定量以 β_1 -肾上腺素能和 GAPDH 间的比值计算。

1.4 Western Blot 杂交分析

膜蛋白提取: 将脑片置于预冷的 PBS 匀浆液 (含 0.4 mmol/L PMSF, 1 mmol/L 1, 10-phenanthroline, 1 mmol/L iodoacetamide, 1 μ mol/L pepstatin A) 中匀浆, 1 000 g、4 °C 离心 10 min, 弃沉淀, 再 17 650 g、4 °C 离心 15 min, 弃上清液, 沉淀用适量匀浆液稀释后再进行超声破碎, 提取膜蛋白, -70 °C 保存备用。

SDS-PAGE 和免疫印迹: 参照 Podlowski^[7]并略加改动。采用 Bradford 法对样本进行蛋白定量后, 以 30 μ g 总蛋白上样电泳; 而后电转移至 PVDF 膜上。用含 50 g/L 脱脂奶粉和 10 g/L 牛血清白蛋白的 PBST 室温封闭 1 h, 再与抗 β_1 -肾上腺素能受体抗体在 4 °C 条件下反应过夜, 洗去残存的抗体, 将膜置于辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG 中反应 1 h, 洗涤干净后, 采用增强发光试剂显影, X 光片记录影像。用图像分析系统对图象进行定量分析, 含量以平均吸光度 $A \times$ 面积表示。

1.5 实验数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件中 2-Way ANOVA 对结果进行处理。

2 结果

2.1 RT-PCR

从样本中获取的 RNA, A_{260/280}, 范围为 1.8-2.0, 甲醛凝胶变性电泳观察无 DNA 污染和 RNA 降解。分别用 β_1 -肾上腺素能受体和 GAPDH 特异性引物进行 RT-PCR, 可获得预期长度的目的片段 (图 1), 测序结果与 GenBank 收录的大鼠 β_1 -肾上腺素能受体 cDNA 片段序列吻合。为确保 RT-PCR 产物与循环次数间的指数关系, 研究发现, 以 3.0 μ g 总 RNA 为模板合成第一链 cDNA, 取 3.0 μ L 逆转录产物进行扩增, 在 23~30 个循环间呈良好的指数关系, 故本研究的 PCR 循环设定为 28 次。

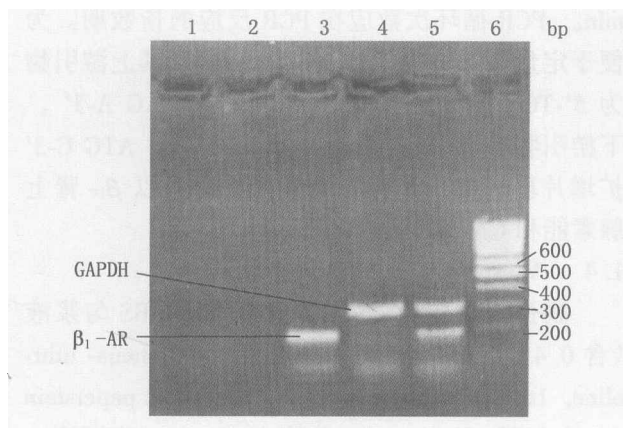


图 1 RT-PCR 产物凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

Lane 1: RNA samples was digested with RNase A; Lane 2: without reverse transcription before RT-PCR; Lane 3: β_1 -AR; Lane 4: GAPDH; Lane 5: bis β_1 -AR and GAPDH, Lane 6: molecular weight marker

2.2 烟碱对 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 转录的作用

以 GAPDH 为内参照与 β_1 -肾上腺素能受体在同一体系中进行扩增,半定量分析显示:烟碱使 β_1 -肾上腺素能受体基因转录水平提高,30 min 时虽无明显的统计学差异,但已表现出增高的趋势 $118.1\% \pm 11.3\%$,60 min 时明显高于正常对照并达到高峰,其表达量可增加至 $152.6\% \pm 20.5\%$ 。

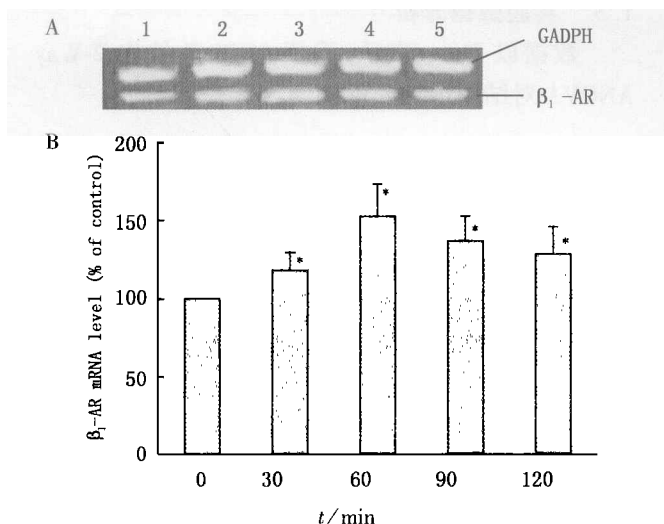


图 2 烟碱对海马脑片 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 转录的影响

Fig. 2 Effect of nicotine on transcription of β_1 -AR gene in rat hippocampal slice

A: Expression of β_1 -AR mRNA in hippocampal slice exposed to $10 \mu\text{mol/L}$ of nicotine by RT-PCR Lane 1-5: control, 30, 60, 90, 120 min. B: $n=6$, $*x \pm s$, $P < 0.05$ vs control

随着作用时间延长,烟碱对 mRNA 表达的增强作用逐渐减弱,120 min 时虽仍高于正常 $128.2 \pm 17.7\%$,但与 60 min 时比较已有较大幅度降低。

2.3 烟碱对 β_1 -肾上腺素能受体蛋白水平的影响

免疫印迹检测 β_1 -肾上腺素能受体蛋白,结果显示 64 ku 的特异信号产物(图 3A)。经烟碱处理 30、60、90、120 min 后,这些信号与正常对照比较有不同程度的变化。用图像分析系统对这些信号处理后发现,经 30 min 烟碱刺激后, β_1 -肾上腺素能受体蛋白水平明显高于正常对照,并随烟碱作用时间延长至 90 min 时达到高峰,为正常对照的 $181.5\% \pm 13.2\%$ (图 3B),120 min 时虽有一定程度下降 $167.5\% \pm 13.5\%$,但与 90 min 时的表达量并无统计意义差别,仍高于正常。

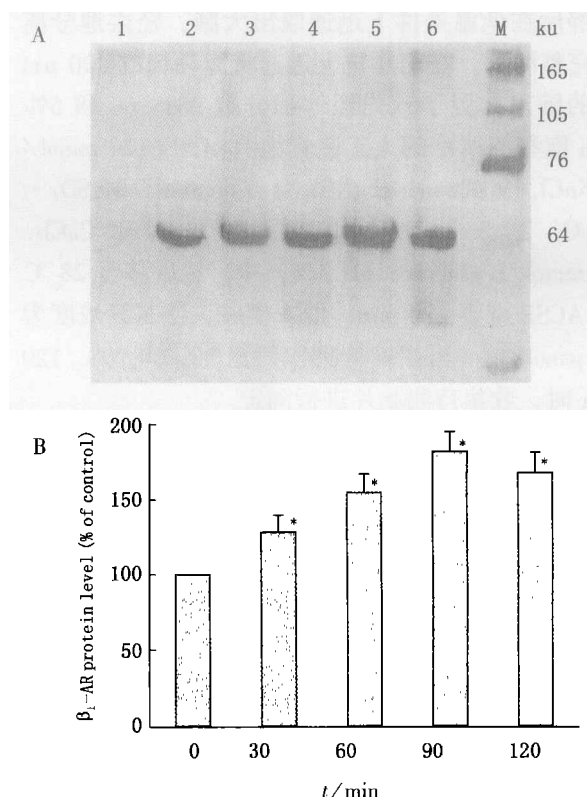


图 3 烟碱对海马脑片 β_1 -肾上腺素能受体蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of nicotine on expression of β_1 -AR protein in rat hippocampal slice

A: Autograph of western blot; Lane 1: negative control without β_1 -AR protein; Lane 2: control; Lane 3-6: 30, 60, 90, 120 min treatment with nicotine. Lane M: MW standards

B: $n=5$, $*: \bar{x} \pm s$, $P < 0.05$ vs control

3 讨论

烟碱受体激动剂增强学习记忆的功能无论在

理论研究还是在临床应用上都被证明,其机理涉及众多的神经递质,其中肾上腺素能系统起重要作用^[8,9]。有报道显示烟碱诱导的长时程增强可被 β -肾上腺素能受体拮抗剂部分阻断^[3],提示 β -肾上腺素能受体通过调控长时程增强参与烟碱改善认知功能。

β_1 和 β_2 肾上腺素能受体亚型在大鼠海马中均有表达,但由于 β_1 受体与神经细胞分布一致,而 β_2 受体亚型主要沿血管分布,一般认为脑中的 β_1 受体在认知功能中占主要地位,所以本研究利用 β_1 -肾上腺素能受体特异性引物和抗体分别观察了烟碱对 β_1 受体 mRNA 转录和蛋白表达的影响。

为确保半定量 RT-PCR 用于检测 β_1 受体 mRNA 表达的可行性,实验首先从 RNA $A_{260/280}$ 检测、甲醛变性凝胶电泳和 RNA 酶消化后的 RT-PCR 等多方面证实了用于该研究的样本 RNA 无 DNA 和蛋白质污染,质量可靠。进而通过 RT-PCR 循环次数与产物产量关系的分析,证实用半定量 RT-PCR 测定 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 表达的方法是敏感和相对准确的。本研究观察了烟碱对 β_1 受体 mRNA 表达的影响,并通过免疫印迹探讨 β_1 -肾上腺素能受体蛋白水平在烟碱作用下的变化情况。结果表明:急性的烟碱刺激能使 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 转录增强,蛋白水平增加。 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 表达在烟碱作用 60 min 时增强最明显,随着烟碱作用时间的延长,其增强作用有减弱的趋势,但 120 min 时没有恢复正常。受体蛋白总的变化规律与 mRNA 变化一致,从二者变化高峰出现的时间分析, mRNA 转录变化高峰出现在先,蛋白变化高峰发生在后,提示 β_1 -肾上腺素能受体蛋白变化可能与 mRNA 转录改变有关。但 β_1 -肾上腺素能受体蛋白在烟碱作用 30 min 时明显高于正常,而此时 mRNA 表达与正常比较尚未出现明显差异,提示烟碱使 β_1 -肾上腺素能受体蛋白升高总量中部分可不依赖 mRNA 转录。综合分析,我们认为烟碱不仅影响 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 转录,而且还可能参与了转录后的调控,甚至影响 β_1 -肾上腺素能受体蛋白的降解代谢,最终导致 β_1 -肾上腺素能受体蛋白水平升高。

烟碱影响海马脑片 β_1 -肾上腺素能受体基因转录和蛋白表达的生理功能尚缺乏深入研究。但我们知道, β_1 -肾上腺素能受体可通过 G 蛋白信号传导通路激活 PKA、MAPK 等参与长时程增强^[6,10]。

因此本研究中所显示的烟碱增强 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 转录和蛋白表达,可能与我们曾观察到的烟碱诱导长时程增强形成有关。

本研究显示:随着烟碱对海马脑片作用时间延长,烟碱对海马 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 转录和蛋白表达的增强作用逐渐减弱,并有进一步降低的趋势。其原因可能有:烟碱通过突触前机制释放神经递质,这些神经递质的急性作用刺激 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 转录和蛋白的合成,但随着递质作用时间延长,这种刺激作用逐渐减弱,甚至可呈现抑制作用^[11]。另一种可能是随烟碱作用时间增加,烟碱受体对烟碱刺激产生脱敏现象^[12],导致烟碱对 β_1 -肾上腺素能受体的增强作用减弱。烟碱刺激 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 表达的机制目前尚不清楚,究竟是烟碱作用于突触前膜烟碱受体诱导神经递质释放的结果还是烟碱直接作用于后烟碱受体,触发神经元内一系列信号通路,对 β_1 -肾上腺素能受体 mRNA 的转录、翻译等进行调控尚有待进一步研究证实。

总之,本研究从基因转录和蛋白表达方面直接证实了烟碱对 β_1 -肾上腺素能受体的上调作用,提示烟碱不仅影响 β_1 -肾上腺素能受体的 mRNA 转录,而且还可能参与了基因转录后的调控,甚至影响 β_1 -肾上腺素能受体蛋白的代谢,最终导致 β_1 -肾上腺素能受体蛋白水平的升高。

参考文献:

- [1] Fujii S, Ji Z X, Morita N. Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP[J]. Brain Research, 1999, 846(1): 137.
- [2] He J, Deng C Y, Chen R Z, et al. Long-term potentiation induced by nicotine in CA1 region of hippocampal slice is Ca^{2+} -dependent[J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(5): 429.
- [3] Hamid S, Dawe G S, Gray J A, et al. Nicotine induces long-lasting potentiation in the dentate gyrus of nicotine-primed rats[J]. Neuroscience Research, 1997, 29(1): 81.
- [4] McCaugh J L. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage[J]. Annu Rev Neurosci, 1989, 12: 255.
- [5] Zhang H T, Frith S A, Wilkins J, et al. Comparison of the effects of isoproterenol administered into the hippocampus, frontal cortex, or amygdala on behavior of rats maintained

(下转第 174 页 to page 174)

病的发生率及其严重程度。近年的临床实践及我们的资料证明, 人类白细胞抗原匹配同胞的 allo-PBSCT 后急性移植物抗宿主病的发生率和严重程度并不高于同类型的 allo-MBT。但慢性移植物抗宿主病确实比 allo-BMT 高^[4,5]。其原因目前尚无满意的解释, 小鼠模型显示移植物抗宿主病的发生与输注的 T 细胞有剂量效应关系, 但在临床上可能当输注的 T 细胞超过引发急性移植物抗宿主病的阈值 $1.0 \times 10^5 / (L \cdot kg)$ 后, 输注更多的 T 细胞并不会加重移植物抗宿主病^[6]。由于 allo-PBSCT 造血重建快, 感染的发生率及其严重程度减少, 因此由感染诱发的移植物抗宿主病相应减少。此外, G-CSF 的应用有利于动员 II 型 Dendritic 细胞, 促进 TH2 细胞的发育, 间接抑制移植物抗宿主病的发生^[7]。

本研究表明: allo-PBSCT 与 allo-BMT 两者疗效相当, allo-PBSCT 组移植相关病死率 20% 略低于 allo-BMT 的 24%, 2 年无病生存率 allo-PBSCT 组为 $64\% \pm 10\%$, 略高于 allo-BMT 组的 $59\% \pm 10\%$, 但经统计学处理差异无显著性。allo-PBSCT 使供者免受采骨髓的不安与不适感, 且造血功能恢复快, 感染发生率低, 抗生素的应用和血液制品使用少, 住院时间缩短等均显示了其优越性。今后只要加强慢性移植物抗宿主病方面的研究, 减少慢性移植物抗宿主病的发生率, allo-PBSCT 将可作为 allo-BMT 的替代疗法。

参考文献:

[1] Bennet J M, Catovsky D, Daniel M T, *et al.* Proposal for

(上接第 139 页 from page 139)

by differential reinforcement of low response rate[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2001, 159(1): 89.

[6] Giovannini M G, Blitzer R D, Wong T, *et al.* Mitogen-activated protein kinase regulates early phosphorylation and delayed expression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in long-term potentiation [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(18): 7053.

[7] Podlowski S, Hans P L, Rosemarie M, *et al.* Agonistic anti- β_1 -adrenergic receptor autoantibodies from cardiomyopathy patients reduce the β_1 -adrenergic receptor expression in neonatal rat cardiomyocytes. [J]. *Circulation*, 1998, 98(22): 2740.

[8] Winder D G, Martin K C, Muzzo IA, *et al.* ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by β -adrenergic receptors[J]. *Neuron*, 1999, 24(3): 715.

the classification of the acute leukemia. French-American-British(FAB) Co-operative Group[J]. *Br J Haematol*, 1982, 51(2): 189.

[2] Rowlings P A, Przepiora D, Klein J P *et al.* IBMTR severity index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade[J]. *Br J Hematol*, 1997, 97(4): 855.

[3] Schmitz N, Bacigaloupo A, Hasenclever D, *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation vs filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with early leukemia first result of a randomized multicentre of the European Group for blood and marrow transplantation [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1998, 21(20): 995.

[4] Russell J A, Brown C, Bown T, *et al.* Allogeneic blood cell transplantation for hematology malignancy: preliminary comparison of outcome with bone marrow transplantation[J]. *Bone Marrow Transplant*, 1996, 17(7): 703.

[5] Storek J, Gooley T, Siadak M, *et al.* Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated a high risk chronic graft-versus-host disease[J]. *Blood*, 1997, 90(12): 4705.

[6] Tsukamoto A S, Chen B P, Hoffoman R, *et al.* Phenotypic and functional analysis of hematopoietic stem cells in mouse and human. In: Leitt D, Mertelsman R ed: *Hematopoietic stem cells: Biology and therapeutic* [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1995. 85 ~ 88.

[7] 韩忠朝. 造血干细胞理论与移植技术 [M]. 郑州市: 河南科学技术出版社, 2000. 67 ~ 70.

(编辑 黄小延)

[9] Katsuki H, Izumi Y, Zorumski C F. Noradrenergic regulation of synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region [J]. *J Neurophysiol*, 1997, 77(6): 3013.

[10] Wang J, Chen Y B, Zhu X N, *et al.* Activation of p42/44 mitogen-activated kinase pathway in long-term potentiation by nicotine in hippocampal CA1 region in rat [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(8): 685.

[11] Hosoda K, Duman R S. Regulation of beta 1-adrenergic receptor mRNA and ligand binding by antidepressant treatments and norepinephrine depletion in rat frontal cortex [J]. *J Neurochem*, 1993, 60(4): 1335.

[12] Fu Y, Matta S G, Valentine J D, *et al.* Desensitization and resensitization of norepinephrine release in the rat hippocampus with repeated nicotine administration [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 241(2-3): 147.

(编辑 黄小延)