

卢梦,王鑫,王慧玲,等. 人参多糖对乙醇诱导的行为敏化小鼠行为学及前额叶皮层 ERK/c-fos 通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 21-28.

Lu M, Wang X, Wang HL, et al. Effect of ginseng polysaccharides on behavior and ERK/c-fos pathway in ethanol-induced behavioral sensitized mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(1): 21-28.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.01.005

人参多糖对乙醇诱导的行为敏化小鼠行为学及前额叶皮层 ERK/c-fos 通路的影响

卢梦,王鑫,王慧玲,魏琳,周东月,马林锋,卞男,李雪婷,
宋伍*,郭焱*

(长春中医药大学,长春 130117)

【摘要】 目的 研究人参多糖(ginseng polysaccharides, GSP)对乙醇诱导的行为敏化的影响及可能机制。方法 KM小鼠80只随机分为五组,空白组、模型组、GSP低剂量组(100 mg/kg)、GSP中剂量组(200 mg/kg)和GSP高剂量组(400 mg/kg)。除空白组外,其余各组可自由摄取水或乙醇,乙醇浓度随时间逐渐递增(3%~12%,每4天递增3%),经过4 d转化期后给予初始剂量3%乙醇激发,以此建立主动摄取乙醇的行为敏化模型。实验周期内每天测量各组乙醇消耗量和自主活动;转化期进行开场实验;表达期测定行为敏化的表达。酶联免疫吸附法(ELISA)检测前额叶皮层MDA含量及SOD和CAT活力。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测前额叶皮层ERK、p-ERK和c-fos蛋白表达。实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测前额叶皮层p-ERK、C-FOS的mRNA表达。结果 GSP三个剂量显著降低形成期内9%和12%乙醇引起的自主活动增加,并显著抑制初始剂量3%酒精激发(第25天)诱导的自主活动增加和乙醇摄入。GSP中、高剂量能够显著减少开场实验的爬格数和站立次数。GSP可显著抑制乙醇诱导的前额叶皮层MDA水平的增加,并提高SOD和CAT的活性。Western blot和Real-time PCR实验结果表明GSP能够下调前额叶皮层p-ERK和c-fos蛋白和mRNA的过度表达。结论 GSP对乙醇诱导的小鼠行为敏化和乙醇摄取有抑制作用,这种作用可能通过干预ERK/c-fos通路。

【关键词】 人参多糖;乙醇;行为敏化;前额叶皮层;ERK;KM小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)01-0021-08

Effect of ginseng polysaccharides on behavior and ERK/c-fos pathway in ethanol-induced behavioral sensitized mice

LU Meng, WANG Xin, WANG Huiling, WEI Lin, ZHOU Dongyue, MA Linfeng, BIAN Nan, LI Xueting,
SONG Wu*, GUO Yan*

(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ginseng polysaccharides (GSP) on ethanol-induced behavioral sensitization and its possible mechanism. **Methods** Eighty Kunming mice were randomly divided into five groups: blank, model, GSP low-dose (100 mg/kg), GSP middle-dose (200 mg/kg), and GSP high-dose (400 mg/kg). Except for the

【基金项目】 长春中医药大学2018年国家级“大学生创新创业训练计划”项目(201810199012);2019年度吉林省中医药科技项目(2019178);长春中医药大学2018高层次人才基金项目。

【作者简介】 卢梦(1994—),女,硕士研究生,研究方向:中药药理。E-mail: 2810130149@qq.com

【通信作者】 宋伍(1984—),男,副教授。E-mail: five841110@126.com

郭焱(1963—),女,教授,博士生导师。E-mail: ceguoyan@163.com *共同通信作者

blank group, all animals were provided water or ethanol freely. The concentration of ethanol was gradually increased from 3% to 12% by increasing ethanol 3% every four days. After a 4-day conversion period, the initial dose of 3% ethanol was provided to establish a behavioral sensitization model. Ethanol consumption and locomotor activities of each group were measured daily during the experimental period. During the transition period, an open field test (OFT) was carried out. Activation of behavioral sensitization was determined by locomotor test during the expression period. Western blot and real-time PCR were used to detect protein and mRNA expression, respectively, of ERK, p-ERK, and c-fos, in the prefrontal cortex. **Results** Three doses of GSP significantly reduced the hyperactivity caused by 9% and 12% ethanol during the transition period, and significantly inhibited the increase of locomotor activity and ethanol intake induced by 3% alcohol challenge (day 25). In addition, middle and high doses of GSP could significantly modulate the number of crawls and standing times in the OFT. GSP could significantly inhibit ethanol-induced increases in malondialdehyde levels in the prefrontal cortex, as well as increased superoxide dismutase and catalase activities. Western blot and real-time PCR result showed that GSP could downregulate protein and mRNA overexpression of p-ERK and c-fos in the prefrontal cortex. **Conclusions** GSP had an inhibitory effect on ethanol-induced behavioral sensitization and ethanol intake in mice, and this effect may be related to the ERK/c-fos pathway.

[Keywords] ginseng polysaccharides; ethanol; behavioral sensitization; prefrontal cortex; ERK; KM mouse

乙醇依赖是一种慢性脑疾病,表现为强迫性的乙醇渴求以及在戒酒期间出现消极情绪状态。乙醇依赖的发展受遗传因素和环境因素双重因素影响^[1]。长期摄入乙醇导致脑内神经递质及其受体发生适应性变化,包括 GABA 受体、谷氨酸受体、阿片类受体、5-HT₃ 受体以及多巴胺受体等^[2-10]。细胞外调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)与药物成瘾引起的神经适应性、奖赏效应和觅药行为密切相关^[11]。目前研究发现能够改善乙醇成瘾症状的药物主要包括作用于 GABA 受体、阿片受体、甘氨酸转运体、神经肽受体及磷酸二酯酶类的化合物^[12]。

行为敏化是指反复、间断给予成瘾性药物后,动物对成瘾性药物的行为效应增强。反复使用精神刺激物被认为会引发与奖赏效应相关神经回路中持续的神经适应性,这些神经适应作用调节了行为敏感性^[13]。因此,行为敏化的获得和表达可能反映了增加药物依赖风险的潜在机制,也是目前评价药物精神依赖的重要模型。

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)作为药物使用最早记录在 2000 多年前的《神农本草经》中。现代研究发现人参含有多种活性成分,包括人参皂苷、人参多糖、脂溶性成分、氨基酸、维生素、蛋白质、多肽、有机酸以及微量元素等^[14]。人参多糖(ginseng polysaccharides, GSP)具有抗氧化、免疫调节、抗肿瘤、抗高血糖、中枢神经保护作用^[15-17]。目前对人参的研究多集中在人参皂苷,但人参多糖的药理活性不容忽视,特别是在中枢神经的保护作用。尽管研究证实了人参多糖的神经保护作用,但对乙醇成瘾的研究未见报道。基于此,本研究通过融合双瓶饮酒模式和行

为敏化模型,评估人参多糖对乙醇诱导的行为敏化小鼠行为学变化及 ERK/c-fos 通路的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 6 周龄雄性 KM 小鼠(22±2)g,购于吉林省长春市亿斯实验动物技术有限责任公司[SYXK(吉)2018-0014],饲养于长春中医药大学实验中心[SCXK(吉)-2018-0007]。小鼠适应性饲养 5 d,期间自由饮水进食,饲养室温度为(23±2)℃,相对湿度(50±5)%,光照时间 12 h(光照)/12 h(黑暗)。本研究涉及实验动物的处理均符合长春中医药大学伦理委员会的相关规定(审批号:2018011),并在实验期间按照 3R 原则给予实验动物人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

人参多糖粉末由吉林省中医中药研究所提供,制备方法沿用实验室前期的方法^[18]。人参粉碎,采用水提醇沉法和 Sevag 除蛋白法得到人参多糖粗提物,粗提物用 2×10^{-3} mol/L NaCl 溶解,上到已用 2×10^{-3} mol/L NaCl 平衡的 DEAE-TOYOPAERL 柱上,用上述溶剂洗脱,再用 2×10^{-3} mol/L ~ 2.5×10^{-1} mol/L NaCl 梯度洗脱,得分子量为 5.5×10^3 ~ 2.5×10^4 的多糖部分。无水乙醇(北京化工厂,批号:20180518),多功能小鼠自主活动记录仪(山东省医学科学院设备站),OFT-100 开场实验箱(成都泰盟软件有限公司,箱底分成 5×5 的格子,将中央 1/4 的面积定义为中央区域),ERK 抗体(美国 Abcam 公司,货号:54230),p-ERK 抗体(美国 Abcam 公司,货号:192591),c-fos 抗体(美国 Abcam 公司,货号:190289),电泳槽(美国 Bio-Rad 公司,Sub Cell GT),

蛋白转印槽(美国 Bio-Rad 公司, mini-p4), 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司, PowerPac)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组、造模及给药

将 80 只小鼠随机分为五组: 空白组、模型组、GSP 低剂量(100 mg/kg)、GSP 中剂量(200 mg/kg)和 GSP 高剂量(400 mg/kg), 每只小鼠均单笼饲养。参照 Blednov, Bahi 等^[19-20]的方法并稍作修改建立行为敏化模型。适应期: 先让小鼠每天接受两个都盛蒸馏水的水瓶, 适应性喂养 5 d, 每天更换一次水瓶位置。形成期: 除空白组, 将其中一瓶水替换为 3% 的乙醇, 另一瓶仍用蒸馏水。3% 的乙醇喂养 4 d 后按 6%, 9%, 12% 的梯度每隔 4 d 递增乙醇浓度。每天更换乙醇和水的位置, 避免形成条件位置偏好, 并且每天测量乙醇和水的消耗量, 计算每天乙醇(g/kg)的消耗量。模型组和空白组每天灌胃给予生理盐水, 给药组每天灌胃给予人参多糖溶液, 并于给药后 30 min 记录各组小鼠的自主活动次数。实验流程见图 1。转换期: 第 21 天将两个水瓶都装入蒸馏水, 在第 21 天上午 8:00-12:00 检测各组小鼠开场实验, 继续正常饲养 4 d。激发期: 将模型组和给药组其中一瓶水更换为 3% 乙醇。模型组和空白组灌胃给与生理盐水, 给药组给予人参多糖溶液, 30 min 后测各组小鼠自主活动, 流程见图 1。

1.3.2 自主活动测试

将小鼠单独置于大鼠饲养笼中, 用多功能小鼠自主活动记录仪记录小鼠自主活动次数。在第 0~4 天, 记录小鼠在 12 h 内的自主活动次数; 而在第 5~25 天, 每天给与 GSP 干预, 在 30 min 后测试 12 h 内小鼠的自主活动次数。

1.3.3 开场实验

在第 21 天上午 8:00-12:00 进行开场实验。先将小鼠放在空旷地区自由探索 5 min, 之后将小鼠放在 OFT-100 开场实验箱的中心区域, 记录小鼠站立次数和爬格数(以至少三个爪子跨入同一格子内记为 1)。记录 5 min, 每次实验开始前用乙醇擦拭开场实验箱。

1.3.4 前额叶皮层氧化应激相关因子测定

ELISA 法检测前额叶皮层 MDA 含量及 SOD 和 CAT 活力。取前额叶皮层组织称重并加入 9 倍量生理盐水, 匀浆, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作。采用考马斯亮蓝法在 595 nm 处测定并计算样品中蛋白含量。

1.3.5 前额叶皮层 ERK、p-ERK 和 c-fos 蛋白表达

采用 Western blot 法检测蛋白表达。取前额叶皮层组织并加入蛋白裂解液, 匀浆, 取上清液待用。测定蛋白含量后, 取等量蛋白与含巯基乙醇的 4×凝胶加样缓冲液混合并煮沸 10 min。经 SDS-PAGE 电泳, 转膜(PVDF 膜), 含 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入一抗 ERK(1:500 稀释), p-ERK(1:500 稀释), c-fos(1:200 稀释), 4℃ 孵育过夜, 洗膜 3 次后加入二抗孵育 1 h, 加入 ECL 显影液显影。用 Quality-one 软件分析条带灰度值。

1.3.6 Real-time PCR 检测前额叶皮层中 ERK、c-fos 的 mRNA 表达

按照用 100:1 加入 TRIzol 裂解, 总 RNA 提取按照 RNeasy 试剂盒说明书操作。总 RNA 浓度用 ND-2000 微量紫外可见分光光度计检测 RNA 的含量, 当 $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$ 时, RNA 纯度符合要求。采用高容量逆转录试剂盒进行逆转录, 应用 Power SYBR Green Master Mix 进行 PCR 定量, 反应参数为 95℃ 3 min, 95℃ 10 s, 60℃ 45 s, 共 40 个循环。结果采

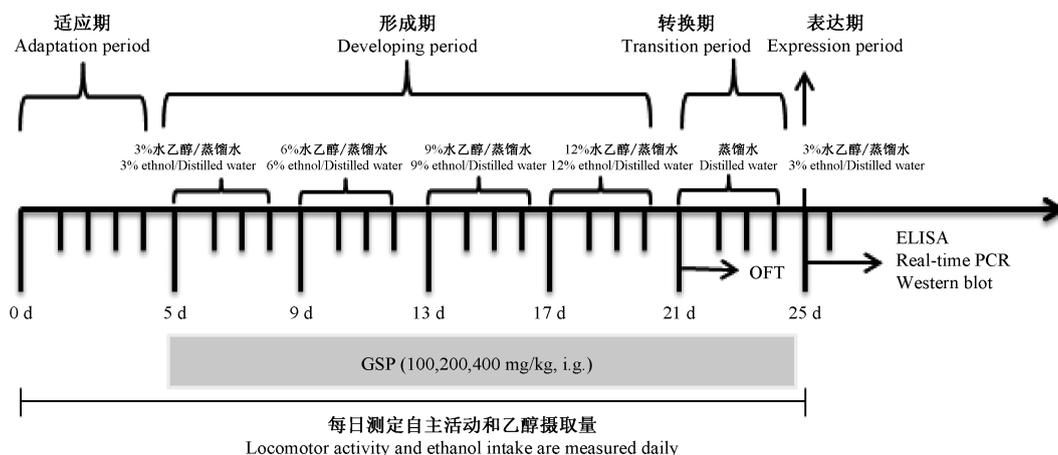


图 1 实验流程

Figure 1 Experimental procedures

用相对定量法进行分析^[21],用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示 mRNA 的相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物 Primer	序列(5'→3') Sequences
ERK	上游 Upstream primer: TCTCCCGCACAAAATAAGG
	下游 Downstream primer: TCGTCCAACCTCCATGTCAA
C-FOS	上游 Upstream primer: CTCCCGTGGTCACCTGTACT
	下游 Downstream primer: TTGCTTCTCTGACTGCTCA
β -actin	上游 Upstream primer: CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
	下游 Downstream primer: ATGGAGCCACCGATCCACA

1.4 统计学方法

实验计量资料均以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据统计分析。多组间比较运用单因素方差分析,方差齐采用 LSD 检验,方差不齐则用 Dunnett's 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GSP 对乙醇敏化小鼠自主活动的影响

如表 2 所示,模型组小鼠经过自由摄取逐渐递增剂量(3%,6%,9%,12%)的乙醇后,自主活动在 d13 后显著性增加。经过 4 d 不给予乙醇的转换期,再次 3%乙醇激发,模型组第 25 天自主活动次数增加至(5312.11 \pm 1581.31)次,较空白组显著升高($P < 0.05$),提示乙醇诱导的行为敏化模型建立;与模型组比较,GSP 三个剂量组在激发期的自主活动次

数明显降低($P < 0.05$),提示 GSP 抑制了乙醇引起的行为敏化表达。

2.2 GSP 对乙醇敏化小鼠乙醇摄取量的影响

如表 3 所示,模型组小鼠第 25 天摄取 3%乙醇(1.87 \pm 0.67) mL 显著高于空白组的(1.25 \pm 1.10) mL($P < 0.05$);与模型组相比,GSP 三个剂量组乙醇摄取量较模型组明显降低($P < 0.05$),表明 GSP 能够显著抑制成瘾小鼠的乙醇摄取。

2.3 GSP 对乙醇敏化小鼠转换期开场实验的影响

如表 4 所示,与空白组比较,模型组小鼠在开场实验的爬格数和站立次数及进入中央次数和中央停留时间均显著下降($P < 0.05$),提示在此模型实验动物在转换期出现焦虑样行为;与模型组比较,GSP 三个剂量组组开场实验的爬格数和站立次数显著增加,GSP 中、高剂量组进入中央次数及中央停留时间显著增加($P < 0.05$),表明 GSP 对乙醇敏化小鼠转换期出现的焦虑样行为具有抑制作用。

2.4 GSP 对前额叶皮层 MDA、SOD 及 CAT 的影响

如表 5 所示,与空白组比较,乙醇诱导的行为敏化小鼠前额叶中 MDA 含量显著升高($P < 0.05$),SOD 和 CAT 活性显著降低($P < 0.05$),提示行为敏化模型小鼠前额叶皮层氧化应激水平增高;与模型组比较,GSP 中、高剂量组显著降低前额叶皮层中 MDA 含量($P < 0.05$),SOD 和 CAT 活力显著升高($P < 0.05$),表明 GSP 可能增强了前额叶皮层的抗氧化能力。

表 2 GSP 对行为敏化小鼠自主活动的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of GSP on autonomic activity in behavior-sensitive mice

组别 Groups	只数 Number	0% (d1-d4)	3% (d5-d8)	6% (d9-d12)	9% (d13-d16)	12% (d17-d20)	3% (d25)
空白组 Blank group	15	3152.33 \pm 1162.38	3173.33 \pm 303.33	3198.25 \pm 845.04	3423.25 \pm 715.82	3312.45 \pm 1115.21	3792.22 \pm 1458.45
模型组 Model group	13	3125.17 \pm 814.20	3882.12 \pm 1583.56	3989.09 \pm 1371.03	4088.6 \pm 1203.93*	4917.32 \pm 1461.66*	5312.11 \pm 1581.31*
GSP 低剂量组 Low-dose GSP group	10	3438.00 \pm 1015.85	3105.04 \pm 1841.22	3278.75 \pm 1252.61	2999.75 \pm 921.19#	3157.80 \pm 1823.57#	2967.60 \pm 1381.73#
GSP 中剂量组 Medium-dose GSP group	10	3325.67 \pm 758.25	3828.8 \pm 1053.68	3837.75 \pm 1217.18	3509.43 \pm 1007.16#	3348.39 \pm 1219.08#	3432.40 \pm 1250.32#
GSP 高剂量组 High-dose GSP group	12	3038.67 \pm 257.08	3387.4 \pm 879.56	3317.36 \pm 967.19	3589.67 \pm 852.93#	3589.67 \pm 852.93#	3008.25 \pm 1219.70#

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与初始期比较,# $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$. Compared with the initial period, # $P < 0.05$.

表 3 GSP 对行为敏化小鼠乙醇摄取量的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effects of GSP on ethanol intake in behavior-sensitive mice

组别 Groups	只数 Number	3% (第 5~8 天) 3% (d5-d8)	6% (第 9~12 天) 6% (d9-d12)	9% (第 13~16 天) 9% (d13-d16)	12% (第 17~20 天) 12% (d17-d20)	3% (第 25 天) 3% (d25)
空白组 Blank group	15	-	-	-	-	1.25±1.10
模型组 Model group	13	1.30±0.54	2.71±0.43	3.68±0.13	3.94±0.45	1.87±0.67*
GSP 低剂量组 Low-dose GSP group	10	1.04±0.51	2.50±0.25	2.96±0.29#	3.37±0.88#	0.63±0.34#
GSP 中剂量组 Medium-dose GSP group	10	1.12±0.57	2.21±0.28#	2.82±0.32#	3.13±0.50#	1.13±0.43#
GSP 高剂量组 High-dose GSP group	12	0.99±0.07	1.91±0.24#	2.64±0.42#	2.69±0.41#	1.27±0.65#

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与初始期比较,# $P<0.05$ 。

Note. Compared with the blank group,* $P<0.05$. Compared with the initial period,# $P<0.05$.

表 4 GSP 对行为敏化小鼠 OFT 爬格数和站立次数及进入中央次数和中央停留时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Effects of GSP on OFT crawling and standing times, central entry times, and central residence time in behavior-sensitive mice

组别 Groups	只数 Number	站立次数 Stand number	爬格数 The number to climb	进入中央次数 Number of times into the center	中央停留时间(s) Central residence time(s)
空白组 Blank group	15	41.33±11.47	202.17±34.09	11.50±3.70	16.86±4.85
模型组 Model group	13	26.09±11.25*	154.18±18.19*	7.79±1.81*	10.00±5.10*
GSP 低剂量组 Low-dose GSP group	10	36.67±9.00#	179.33±21.75#	9.00±5.16	11.00±3.77
GSP 中剂量组 Medium-dose GSP group	10	44.57±22.56#	193.57±30.00#	14.50±4.14#	16.20±4.62#
GSP 高剂量组 High-dose GSP group	12	43.86±12.06#	194.71±11.94#	15.00±5.14#	20.00±6.63#

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

Note. Compared with the blank group,* $P<0.05$. Compared with the model group,# $P<0.05$.

表 5 GSP 对前额叶皮层 MDA、SOD 及 CAT 的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Effects of GSP on MDA, SOD, and CAT levels in the prefrontal cortex

组别 Groups	只数 Number	丙二醛 (nmol/mg) MDA	超氧化物歧化酶 (U/mg) SOD	过氧化氢酶 (U/mg) CAT
空白组 Blank group	6	0.33±0.26	853.56±30.24	3.10±1.57
模型组 Model group	6	0.76±0.57*	507.27±18.03*	0.99±0.60*
GSP 低剂量组 Low-dose GSP group	6	0.46±0.42	754.04±27.47	2.01±0.49
GSP 中剂量组 Medium-dose GSP group	6	0.35±0.27#	898.39±17.90#	2.55±0.42#
GSP 高剂量组 High-dose GSP group	6	0.38±0.14#	789.00±48.35#	2.62±0.76#

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

Note. Compared with the blank group,* $P<0.05$. Compared with the model group,# $P<0.05$.

2.5 GSP 对前额叶皮层 ERK、p-ERK 及 c-fos 蛋白表达的影响

如图 2 所示, Western blot 结果发现模型组 p-ERK/ERK 比值及 c-fos 蛋白表达显著高于空白组。与模型组比较, GSP 中、高剂量组 p-ERK/ERK ($P < 0.05$) 及 c-fos 表达量显著降低 ($P < 0.05$)。灰度分析统计见表 6。

2.6 GSP 对前额叶皮层组织中 ERK、C-FOS 的 mRNA 表达的影响

如表 7 所示, 实时定量 PCR 实验结果发现模型组 ERK 和 C-FOS mRNA 表达显著高于空白组 ($P < 0.05$)。与模型组比较, GSP 中、高剂量组 ERK 和 C-FOS mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

多数研究认为乙醇成瘾的机制是中脑边缘多

巴胺系统的奖赏作用, 即长期大量饮酒导致奖赏通路结构产生适应性改变^[22]。越来越多的证据表明 C-FOS/ERK 信号转导参与滥用乙醇成瘾和复饮^[11]。ERK 激活引起从细胞膜到下游靶标的细胞质和细胞核内的一系列级联反应, 产生直接反应或者造成渴求和复饮行为的持久适应性。Sanna 等^[23]研究发现长期连续给予乙醇后, 大鼠不同脑区 p-ERK 蛋白表达均下调; 而在乙醇戒断期, 多数脑区的 ERK 磷酸化水平升高, 说明 ERK 与乙醇诱导的神经可塑性改变有关。Bachtell 等^[24]在研究乙醇诱导 E-W 核 c-fos 表达的机制时, 乙醇可以显著上调 E-W 核上 c-fos 的表达。另有研究发现, 再次暴露于乙醇相关的环境, 激活了大鼠基底外侧和中央杏仁核中 c-fos 的表达, 基底外侧中 c-fos 的表达与 c-jun 和 ERK 的磷酸化水平升高有关^[25]。

表 6 GSP 对前额叶皮层 ERK、p-ERK 及 c-fos 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 6 Effects of GSP on expression of ERK, p-ERK and c-fos proteins in the prefrontal cortex

组别 Groups	只数 Number	p-ERK/ERK	c-fos/ β -actin
空白组 Blank group	4	21.30 \pm 7.21	43.51 \pm 15.10
模型组 Model group	4	57.79 \pm 17.93*	74.26 \pm 27.35*
GSP 低剂量组 Low-dose GSP group	3	50.17 \pm 22.82	79.21 \pm 22.91
GSP 中剂量组 Medium-dose GSP group	4	39.84 \pm 13.14 [#]	56.54 \pm 17.97 [#]
GSP 高剂量组 High-dose GSP group	4	23.16 \pm 11.07 [#]	59.03 \pm 14.18 [#]

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$.

表 7 GSP 对肝组织中 p-ERK、C-FOS 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effect of GSP on mRNA expression of p-ERK and C-FOS in liver tissue

组别 Groups	只数 Number	ERK/ β -actin	C-FOS/ β -actin
空白组 Blank group	8	1.00 \pm 0.39	1.00 \pm 0.71
模型组 Model group	7	2.99 \pm 1.40*	3.31 \pm 1.46*
GSP 低剂量组 Low-dose GSP group	7	2.42 \pm 1.06	3.09 \pm 1.87
GSP 中剂量组 Medium-dose GSP group	8	1.62 \pm 0.91 [#]	1.44 \pm 0.30 [#]
GSP 高剂量组 High-dose GSP group	8	1.50 \pm 0.52 [#]	1.06 \pm 0.20 [#]

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note. compared with the blank group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$.

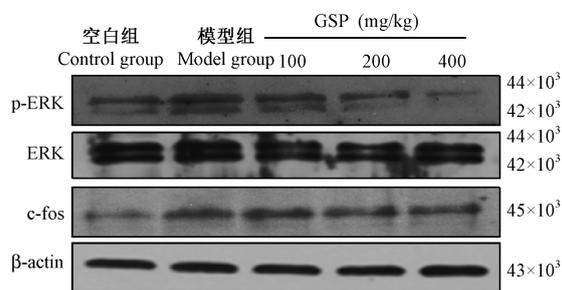


图 2 各组小鼠前额叶皮层 p-ERK、c-fos 蛋白表达条带图

Figure 2 Expression bands of p-ERK and c-fos proteins in the prefrontal cortex for each group of mice

人参的活性成分抗药物成瘾研究越来越受到研究者的关注,多数研究集中在人参总皂苷(ginseng total saponin, GTS)在药物成瘾方面的保护作用。如 Kim 等^[26]研究发现 GTS 能降低尼古丁引起的神经兴奋性,并抑制其诱导的伏隔核(NAc)和纹状体中 Fos 蛋白的表达。相似的是, Lee 等^[27]发现野山参水提物能通过下调 NAc 中 Fos 蛋白的表达和腹侧背盖区(VTA)中的酪氨酸羟化酶的表达抑制吗啡诱导的自主活动的增加。此外, GTS 可以显著降低可卡因诱导的 NAc 多巴胺释放增加,且对可卡因诱导的神经适应性改变有保护作用^[28]。基于近年来对人参多糖的神经保护作用研究的进一步深入,本研究应用两瓶自由选择饮酒模式建立行为敏化模型考察人参多糖对乙醇诱导的行为敏化小鼠行为学变化的影响和可能的机制。实验结果表明, GSP 连续给药对乙醇诱导的小鼠行为敏化和乙醇摄取有显著的抑制作用,并缓解了乙醇戒断期引起的焦虑相关行为。长期摄取乙醇可导致中枢氧化应激的增加,堆积的大量活性氧可经相关的信号转导过程激活 ERK 的磷酸化和 c-fos 表达上调,从而参与乙醇成瘾的神经适应性改变。本实验结果表明, GSP 可显著减少前额叶皮层脂质过氧化产物 MDA 的产生,并提高了抗氧化系统 SOD 和 CAT 的活性。与前期人参皂苷的研究结果相似,本研究也发现人参多糖能够下调了前额叶皮层 c-fos 和 ERK 蛋白和 mRNA 的表达。

目前,对多糖的吸收问题仍然存在争议。虽然有文献报道多糖可以被吸收,但是尚缺乏直接的实验证据^[29]。越来越多的研究发现中药中的多糖类成分具有调节肠道菌群,维持肠道菌群稳态的作用^[30]。Zhou 等^[31]研究发现,人参多糖有助于修复

肠道微生物的整体环境,促进人参皂苷的肠道生物转化。此外,有研究发现慢性酒精摄取能够引起人和啮齿动物肠道内抗炎细菌普氏栖粪杆菌和双歧杆菌的水平降低以及革兰氏阴性的变形菌门的细菌丰度增加^[32]。通过调节肠道菌群可能通过恢复肠道屏障功能、减少全身炎症对治疗酒精依赖和减少酒瘾复发产生有益作用。综上所述,我们推测人参多糖可能通过调节肠道菌群,发挥抗氧化活性抑制 p-ERK/c-fos 通路改善乙醇诱导的行为敏化和乙醇消耗。本研究结果为今后继续探究人参多糖的神经药理活性提供实验依据,并为乙醇成瘾提供新的治疗药物。

参考文献:

- [1] Wall TL, Luczak SE, Hiller-Sturmhöfel S. Biology, genetics, and environment: Underlying factors influencing alcohol metabolism (Review) [J]. *Alcohol Res-Curr Rev*, 2016, (1): 59-68.
- [2] Gass JT, Olive MF. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(1): 218-265.
- [3] Nestler EJ. Transcriptional mechanisms of addiction: role of Delta FosB [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008, 363(1507): 3245-3255.
- [4] Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, et al. Neuropharmacology of alcohol addiction [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(2): 299-315.
- [5] Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, et al. Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(1): 73-88.
- [6] Walker BM, Valdez GR, McLaughlin JP, et al. Targeting dynorphin/kappa opioid receptor systems to treat alcohol abuse and dependence [J]. *Alcohol*, 2012, 46(4): 359-370.
- [7] Holmes A, Spanagel R, Krystal JH. Glutamatergic targets for new alcohol medications [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013, 229(3): 539-554.
- [8] Suchankova P, Yan J, Schwandt ML, et al. The glucagon-like peptide-1 receptor as a potential treatment target in alcohol use disorder: evidence from human genetic association studies and a mouse model of alcohol dependence [J]. *Transl Psychiatry*, 2015, 5: e583.
- [9] Scofield MD, Heinsbroek JA, Gipson CD, et al. The nucleus accumbens: Mechanisms of addiction across drug classes reflect the importance of glutamate homeostasis [J]. *Pharmacol Rev*, 2016, 68(3): 816-871.
- [10] Hansson AC, Grunder G, Hirth N, et al. Dopamine and opioid systems adaptation in alcoholism revisited: Convergent evidence from positron emission tomography and postmortem studies [J].

- Neurosci Biobehav Rev, 2018.
- [11] Zamora-Martinez ER, Edwards S. Neuronal extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity as marker and mediator of alcohol and opioid dependence[J]. Front Integr Neurosci, 2014, 8: 24.
- [12] 魏守鹏, 梁建辉. 酒精依赖综合征治疗药物的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10): 1333-1337.
- [13] Camarini R, Pautassi RM. Behavioral sensitization to ethanol: Neural basis and factors that influence its acquisition and expression[J]. Brain Res Bull, 2016, 125: 53-78.
- [14] 于雪妮, 冯小刚, 张建民, 等. 人参化学成分与药理作用研究新进展[J]. 人参研究, 2019, 31(01): 47-51.
- [15] Wang J, Flaisher-Grinberg S, Li S, et al. Antidepressant-like effects of the active acidic polysaccharide portion of ginseng in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(1): 65-69.
- [16] 南敏伦, 赵昱玮, 吕娜, 等. 人参多糖的化学结构及其降血糖活性研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(47): 4506-4508.
- [17] 高笑一, 鲍建才, 管丽娜, 等. 人参多糖药理活性国内研究新进展[J]. 人参研究, 2018, 30(5): 41-44.
- [18] 傅平平, 王维忠, 高其品, 等. 人参根多糖化学性质及抗肿瘤活性的研究[J]. 白求恩医科大学学报, 1994, (5): 439-441.
- [19] Blednov YA, Da Costa AJ, Tarbox T, et al. Apremilast Alters Behavioral Responses to Ethanol in Mice; I. Reduced Consumption and Preference[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2018, 42(5): 926-938.
- [20] Bahi A, Nurulain SM, Ojha S. Ethanol intake and ethanol-conditioned place preference are reduced in mice treated with the bioflavonoid agent naringin[J]. Alcohol, 2014, 48(7): 677-685.
- [21] XU SF, JIN T, LU YF, et al. Effect of icariin on UDP-glucuronosyltransferases in mouse liver[J]. Planta Med, 2014, 80(5): 387-392.
- [22] Nelson AC, Williams SB, Pistorius SS, et al. Ventral Tegmental Area GABA Neurons Are Resistant to GABA (A) Receptor-Mediated Inhibition During Ethanol Withdrawal [J]. Front Neurosci-switz, 2018, 12.
- [23] Sanna PP, Simpson C, Lutjens R, et al. ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal[J]. BRAIN RES, 2002(1): 186-191.
- [24] Bachtell RK, Tsivkovskaia NO, Ryabinin AE. Alcohol-induced c-Fos expression in the Edinger-Westphal nucleus: pharmacological and signal transduction mechanisms[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 302(2): 516-524.
- [25] Radwanska K, Wrobel E, Korcosz A, et al. Alcohol relapse induced by discrete cues activates components of AP-1 transcription factor and ERK pathway in the rat basolateral and central amygdala [J]. Neuro-psychopharmacology, 2008, 33(8): 1835-1846.
- [26] Kim SE, Shim I, Chung JK, et al. Effect of ginseng saponins on enhanced dopaminergic transmission and locomotor hyperactivity induced by nicotine [J]. Neuropsychopharmacology, 2006, 31(8): 1714-1721.
- [27] Lee B. Wild Ginseng Attenuates Repeated Morphine-Induced Behavioral Sensitization in Rats [J]. J Microbiol Biotechn, 2011, 21(7): 757-765.
- [28] Lee B, Yang CH, Hahn DH, et al. Inhibitory Effects of Ginseng Total Saponins on Behavioral Sensitization and Dopamine Release Induced by Cocaine[J]. Biol Pharm Bull, 2008(3): 436-441.
- [29] 邓雅婷, 刘莉, 杨勇, 等. 多糖代谢动力学研究的进展[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(8): 573-576.
- [30] 贤集网. 中药通过调整肠道菌群缓解疾病的作用机制[EB/OL]. (2018-05-15) https://www.xianjichina.com/news/details_72407.html.
- [31] Zhou Shan-Shan, Xu Jun, Zhu He, et al. Gut microbiota-involved mechanisms in enhancing systemic exposure of ginsenosides by coexisting polysaccharides in ginseng decoction[J]. SCI REP-UK, 2016, 6.
- [32] 健客网. 酒精成瘾: 肠道菌群的另一个用武之地[EB/OL]. (2017-09-04) <https://www.jianke.com/gcpd/4676258.html>.

[收稿日期] 2019-07-12