

· 论著 ·

失眠模型大鼠脑干 γ -氨基丁酸转运体-1 表达的变化

邹艳群, 杨晓苏, 蔺芳莉, 杨德

中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘要:目的 检测失眠模型大鼠脑干组织中 γ -氨基丁酸转运体-1 (GAT-1) mRNA 及 GAT-1 蛋白的表达变化。方法 36 只 SD 大鼠随机分为失眠模型组、生理盐水对照组和地西洋干预组。腹腔注射对氯苯丙氨酸 (PCPA) 制作大鼠失眠模型。采用 RT-PCR 法和 Western blot 法分别检测大鼠脑干组织中 GAT-1 mRNA 和 GAT-1 蛋白的表达变化。结果 与对照组相比, 模型组和干预组 GAT-1 mRNA 及 GAT-1 蛋白的表达均降低 ($P < 0.01$), 干预组较模型组表达更低 ($P < 0.01$)。结论 脑干 GAT-1 表达下调可能与失眠后机体的保护性机制有关; 地西洋下调 GAT-1 可能是其发挥催眠作用的机制之一。关键词: 失眠; 对氯苯丙氨酸; γ -氨基丁酸转运体-1; 脑干; 地西洋

Expression of γ -aminobutyric acid transporter-1 in the brainstem of insomnia model rats

ZOU Yan-Qun, YANG Xiao-Su, LIN Fang-Ju, YANG De. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding Author: YANG Xiao-Su, E-mail: sjnk_xy@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To study the expression of gamma-aminobutyric acid transporter-1 (GAT-1) mRNA and protein in the brain stem of insomnia model rats. **Methods** Thirty-six SD rats were randomly divided into three groups: insomnia model, normal saline control and diazepam interference. A rat insomnia model was prepared by intraperitoneal injections of p -chlorophenylalanine (PCPA). The expression of GAT-1 mRNA and protein in the brainstem were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Compared with the control group, the expression of GAT-1 mRNA and protein in the model and interference groups was down-regulated ($P < 0.01$). The interference group showed significantly lower expression of GAT-1 than the model group ($P < 0.01$). **Conclusions** The down-regulation of the expression of GAT-1 may be involved in the body's protective mechanisms after insomnia. Diazepam can decrease GAT-1 expression, possibly thus providing its hypnotic function.

Key words: insomnia; p -chlorophenylalanine; γ -aminobutyric acid transporter-1; brainstem; diazepam

失眠 (insomnia) 是最常见的睡眠障碍 (sleep disorders, SD), 是多种躯体、精神和行为疾病所具有的常见临床表现。 γ -氨基丁酸 (gama-aminobutyric acid, GABA) 是哺乳动物中枢神经系统中最主要的抑制性神经递质。GABA 转运体 (gama-aminobutyric acid transporter, GAT) 是一种主要位于神经元及胶质膜上的糖蛋白, 能摄取突触间隙及细胞外液的 GABA, 终止 GABA 的抑制作用。地西洋是治疗失眠的经典药物, 通过促进 GABA 与 GABAA 受体的结合而发挥神经抑制功能。在失眠及其治疗的过程中, GAT-1 会发生怎样的同步变化, 目前尚不完全清楚。本研究

采用腹腔注射对氯苯丙氨酸 (p -chlorophenylalanine, PCPA) 制作大鼠失眠模型, 并同步设立生理盐水对照组和地西洋干预组, 检测大鼠脑干组织中 GAT-1 mRNA 及 GAT-1 蛋白的表达变化, 初步探讨其与失眠的关系, 以寻找临床治疗失眠的新靶点。

1 材料与方法

1.1 动物及其分组

清洁级成年健康雄性 Sprague Dawley 大鼠 36 只, 体重 180 ~ 220 g, 鼠龄 8 ~ 10 周, 由湖南农业大学实验动物中心提供, 随机分为失眠模型组 (简称模型组)、生理盐水对照组 (简称对照组) 和地西

基金项目: 湖南省科技厅项目 (2009JT3027)

收稿日期: 2013-01-07; 修回日期: 2013-02-16

通讯作者: 杨晓苏, E-mail: sjnk_xy@yahoo.com.cn。

洋干干预组(简称干预组),每组 12 只。所有大鼠均在 12/12 h 的照明/黑暗环境中同等饲养,温度 22 ~ 26℃,相对湿度 60 ~ 80%,普通饲料、分笼饲养。各组在未进行任何措施前,先适应性饲养 1 周。各组大鼠分别在入组时、第一次腹腔注射 PCPA 前当天、第一次灌胃前当天及处死取材前称体重。

1.2 模型制作

模型组大鼠每日上午 8:30 ~ 9:00 腹腔注射 PCPA(上海瀚鸿化工科技有限公司)300 mg/kg,用弱碱性生理盐水(pH:7 ~ 8)溶解,按 0.1 ml/kg 配制 成混悬液,制作实验性失眠模型的大鼠模型,连续 2 d;第 3 天起,上午 8:30 ~ 9:00 以蒸馏水按 0.1 ml/kg 灌胃 1 次,连续 5 d。对照组大鼠在相同时间点腹腔注射生理盐水 0.1 ml/kg,连续 2 d,第 3 天起灌胃同模型组,连续 5 d。干预组大鼠在腹腔注射 PCPA 建立失眠模型之后,第 3 天起以 0.092 mg 0.1ml/kg 地西洋水溶液(蒸馏水配置)灌胃,时间同模型组,连续 5 d。

1.3 GAT-1mRNA 和 GAT-1 蛋白的检测

各组受试动物于灌胃治疗后第 6 天快速断头处死,取大鼠脑干组织,超低温保存。用 RT-PCR 法和 WB 法分别检测大鼠脑干组织中 GAT-1 mRNA 和 GAT-1 蛋白的表达变化,操作按试剂盒说明进行。其中 GAT-1 mRNA 引物(上游 5'-TGGAACACT-GACCGCTGCTT-3',下游 5'-GAATCAGACAGCTTTCG-GAAGTTGG-3')由上海生工生物公司合成;RT-PCR 逆转录试剂盒购自美国 Fermentas MBI;GAT-1 抗体

为兔抗鼠多克隆抗体(美国 Millpore 公司);BCA 蛋白定量试剂购自北京鼎国生物技术公司;蛋白 Marker 购自碧云天公司。

1.4 统计学处理

测定数值采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,资料采用 ANOVA 方差分析,多组间均数比较采用 SNK-*q* 检验。

2 结果

2.1 大鼠行为学变化

对照组大鼠生活、睡眠习惯无明显变化。模型组和干预组大鼠于第一次腹腔注射 PCPA 混悬液 28 ~ 30 h 后,出现昼伏夜出的节律消失,白天也活动不停,总睡眠时间减少,饮水进食减少;随睡眠剥夺时间的延长,大鼠疲惫、精神不佳,皮毛蓬乱无光泽,对环境刺激的警觉性、反应性减弱,易激惹且攻击性增强,后脚趾多有破损出血。干预组大鼠在予以地西洋灌胃后,睡眠时间、饮水进食、精神状态等均逐渐恢复。

2.2 大鼠体重变化

入组时及第一次腹腔注射 PCPA 前当天,各组大鼠体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。地西洋灌胃前,模型组及干预组大鼠体重均较对照组减轻,差异有统计学意义($P < 0.01$);干预组与模型组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。处死大鼠取材前,模型组和干预组大鼠体重均较对照组减轻,差异有统计学意义($P < 0.01$);但干预组大鼠体重较模型组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠在不同时间点的体重及比较 (g)

组别	<i>n</i>	入组时	第一次腹腔注射 PCPA 前当天	第一次灌胃前当天	取材前
对照组	12	210.50 ± 6.30	241.92 ± 14.80	248.83 ± 14.91	271.92 ± 7.62
模型组	12	209.00 ± 4.79	241.25 ± 16.40	223.33 ± 16.67 **	236.50 ± 10.34 **
干预组	12	209.17 ± 6.82	240.50 ± 16.05	222.83 ± 17.41 **	245.83 ± 11.78 **△

注: ** 为模型组和干预组在同时间点与对照组比较, $q = 5.403、5.508、12.214、8.045, P = 0.002、0.002、0.000、0.000$;△为干预组在同时间点与模型组比较, $q = 4.166, P = 0.041$ 。

2.3 各组大鼠脑干组织 GAT-1 mRNA 及 GAT-1 蛋白的表达

模型组及干预组大鼠脑干组织 GAT-1 mRNA 及 GAT-1 蛋白的表达较对照组明显下调,差异有统计学意义($P < 0.01$);干预组又较模型组下调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1、图 2、表 2。

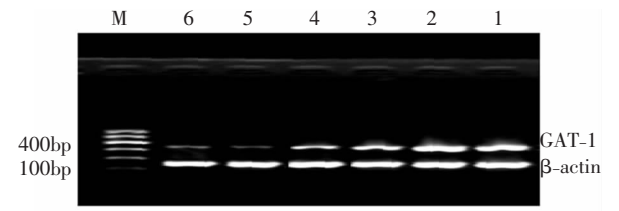


图 1 各组大鼠脑干组织 GAT-1 mRNA 表达的电泳图。M: marker; 1、2: 对照组; 3、4: 模型组; 5、6: 干预组。

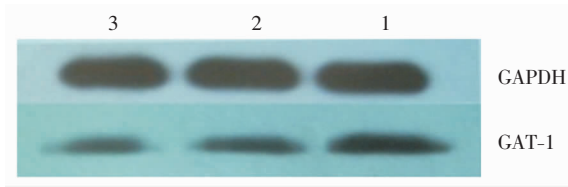


图2 各组大鼠脑干组织 GAT-1 蛋白表达的电泳图。
1:对照组;2:模型组;3:干预组。

表2 各组大鼠脑干组织 GAT-1 的表达及比较 (OD 值)

组别	n	GAT-1 mRNA	GAT-1 蛋白
对照组	12	0.8911 ± 0.0735	0.8013 ± 0.059
模型组	12	0.4068 ± 0.0399 **	0.5526 ± 0.058 **
干预组	12	0.0795 ± 0.0197 **△△	0.4326 ± 0.046 **△△

注: ** 为与对照组比较, $q = 26.522, 44.468, 11.174, 16.571, P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.000$; △△ 为与模型组比较, $q = 17.924, 5.397, P = 0.000, 0.009$ 。

3 讨论

抑制与兴奋的平衡在脑功能中至关重要,在复杂的神经网络中,二者缺一不可。所有的神经元细胞膜上都同时存在着兴奋性和抑制性受体,虽然兴奋是神经元之间信息传递的主要方式,但是抑制(尤其是中间神经元调节的抑制)在许多神经网络中的作用也非同小可。抑制过度或者兴奋不足可能导致昏迷、抑郁、低血压、镇静甚至睡眠;而兴奋过强或抑制缺乏则可导致震颤、焦虑、高血压、静坐不能以及失眠等一系列异常现象的发生。

GABA 是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质^[1],在调节神经元兴奋与抑制的平衡中起着极其重要的作用,该系统的任何一个环节出现故障都可导致 GABA 介导的抑制削弱和丧失,从而使平衡向兴奋的方向倾斜。GABA 的生理效应是通过 GABAA、GABAB 和 GABAC 三种亚型受体介导的,其中 GABAA 受体亚型是占主导地位的亚型,其上有地西洋结合位点。

GAT 是一种主要位于神经元及胶质膜上的糖蛋白,属 Na^+/Cl^- 依赖性转运蛋白^[2],其中 GAT-1 是最早被克隆出来的 GABA 转运体^[3],主要存在于神经元,属于高亲和力的 GABA 转运体^[4],在脑组织中的含量最多,约占脑组织中 GABA 转运体总数的 80%,它可以迅速从突触间隙移走 GABA,终止 GABA 的抑制作用。此外,GAT 在 GABA 的释放过程中也发挥着重要作用,其抑制剂 SKF89976A (20 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 和 NO-711 (10 $\mu\text{mol/L}$) 均可抑制 GABA 的释放^[5]。破坏 Na^+/Cl^- 及 GABA 梯度或通过细胞去极化,GABA 转运蛋白会发生反向转运,

即由转运体介导将细胞内的 GABA 转运到细胞外,导致 GABA 从胞内向突触间隙释放,加强 GABA 的抑制作用。即通过调节细胞外的 GABA 浓度而发挥其生理病理功能。GAT 表达的异常会导致 GABA 能神经信号传递的变化,在神经兴奋/抑制的平衡中扮演着重要的角色。有研究发现,睡眠状态下脑组织 GABA 含量较清醒时升高 15%^[6],原发性失眠患者脑内 GABA 下降^[7]。但关于睡眠剥夺后 GABA 的变化,各报道不一,也有研究发现大鼠连续睡眠剥夺后脑组织 GABA、GABA/GLU 的比值均显著增高^[8,9]。

参与睡眠调节的物质很多,与睡眠相关的解剖结构亦相当广泛,但觉醒与睡眠周期的调节主要与脑干的网状结构有关,如中缝背核(NRD)的 5-HT 能神经元^[10,11]和蓝斑核(LC)的 NE 能神经元^[12]等,故本实验取脑干组织为研究对象。

本实验发现,模型组和干预组大鼠腹腔注射 PCPA 后体重下降,并出现类似失眠的表现,即昼伏夜出的规律消失,白天活动增多等兴奋性表现,后逐渐出现精神状态不佳、活动减少、警觉性下降(但易激惹)等抑制性表现,说明模型建立成功。这与 Beaulieu 等^[13]研究报道的短时间睡眠剥夺后神经功能以代偿性变化为主,多表现为一定的兴奋效应,模型动物学习记忆能力增强,而长时间睡眠剥夺(>72 h)则表现为代偿失调后的变化,神经功能由早期的兴奋转为普遍性抑制状态相符。本实验同时发现模型组脑干组织中 GAT-1 mRNA 及 GAT-1 蛋白表达较对照组下降,结合行为学改变我们认为这一现象可能是因为长时间睡眠剥夺后,神经元处于持续兴奋状态,此时机体代偿性下调 GAT-1 mRNA 及其蛋白的表达,使中枢神经系统抑制性递质 GABA 重摄取和降解减少,使抑制效应占优势,使中枢神经系统功能处于相对抑制状态,以防止神经元因长时间持续兴奋状态而过度疲劳,从而拮抗兴奋性递质的神经毒性作用对神经元的损伤,发挥“保护性抑制”作用。

地西洋(安定)属苯二氮类衍生物,是临床上治疗失眠的经典药物。地西洋作为 GABA 受体正性调节剂,通过作用于中枢 GABAA 受体上的苯二氮卓结合位点而增强 GABA 的突触亲和力/有效性,即促进 GABA 与 GABAA 受体的结合,进而增加氯离子通道的开放频率,但对平均开放时间无影响,使氯离子内流,胞膜超极化,产生抑制性突触后电位(IPSP),加强 GABA 的抑制效应^[14,15]。有研

究发现,抗惊厥药物丙戊酸钠具有下调神经元和胶质细胞 GAT-1 蛋白表达的功能^[1]。亦有文献报道腹腔注射 PCPA 致失眠模型大鼠以安定治疗后脑内抑制性递质 GABA 及其受体 GABAA 的含量增加^[16-18]。在本实验干预组中,大鼠腹腔注射 PCPA 后 28~30 h 出现兴奋性症状,症状出现后第二天开始用地西洋进行灌胃干预,灌胃后各大鼠昼伏夜出的节律有所恢复,白天睡眠增多,总睡眠时间增多,精神状态好转,进食饮水也有所改善,体重有所增加,整体观察与模型组明显不同,表明地西洋改善了实验动物的失眠症状,同时发现 GAT-1 的表达较模型组下降,该结果与上述研究有一致性。因此,我们推测,采用短时间(28~30 h)的睡眠剥夺后,地西洋改善失眠可能是通过下调 GAT-1 的表达,从而增加突触间隙抑制性神经递质 GABA 的量而发挥其镇静、催眠作用。

参 考 文 献

- [1] 胡佳华,费俭,郭礼和. γ -氨基丁酸(GABA)转运蛋白的结构、功能和调控. 细胞生物学杂志, 2003, 25(3): 129-133.
- [2] Guastella J, Nelson N, Nelson H, et al. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science*, 1990, 249(4974): 1303-1306.
- [3] Nelson H, Mandiyan S, Nelson N. Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS Lett*, 1990, 269(1): 181-184.
- [4] Borden LA, Murali Dhar TG, Smith KE, et al. Tiagabine, SK&F 89976-A, CI-966, and NNC-711 are selective for the cloned GABA transporter GAT-1. *Eur J Pharmacol*, 1994, 269(2): 219-224.
- [5] Gaspary HL, Wang W, Richerson GB. Carrier-mediated GABA release activates GABA receptors on hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 1998, 80(1): 270-281.
- [6] Ali M, Jha SK, Kaur S, et al. Role of GABA-A receptor in the preoptic area in the regulation of sleep-wakefulness and rapid eye movement sleep. *Neurosci Res*, 1999, 33(3): 245-250.
- [7] Winkelman JW, Buxton OM, Jensen JE, et al. Reduced brain GABA in primary insomnia: preliminary data from 4T proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS). *Sleep*, 2008, 31(11): 1499-1506.
- [8] 王升旭,李求实. 睡眠剥夺对大鼠脑组织氨基酸类神经递质含量的影响. 第一军医大学学报, 2002, 22(10): 888-892.
- [9] 李振. GABA 能药物干预对 REM 睡眠剥夺大鼠认知功能影响的实验研究. 上海:第二军医大学博士学位论文, 2008.
- [10] 赵乐章,章功良,高隽,等. 中缝背核 5-羟色胺能神经元在睡眠调节中的作用研究. 中国应用生理学杂志, 2003, 19(2): 175-181.
- [11] 章功良,赵乐章,高隽,等. 中缝背核注射对氯苯丙氨酸观察睡眠的变化及 5-羟色胺神经元形态学的改变. 安徽医科大学学报, 2002, 37(3): 175-179.
- [12] Verret L, Fort P, Gervasoni D, et al. Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J Comp Neurol*, 2006, 495(5): 573-586.
- [13] Beaulieu I, Godbout R. Spatial learning on the morris water maze test after a short-term paradoxical sleep deprivation in the rat. *Brain Cogn*, 2000, 43(1-3): 27-31.
- [14] 克里斯托费尔·布鲁克纳,克里斯托夫·凯斯勒,科妮莉亚·赖默尔-埃维亚,等. 用于治疗眼部神经变性疾病 GABA-受体-调节剂. 发明专利, 02804901, 2004-10-02.
- [15] Landolt HP, Gillin JC. GABA (A1a) receptors-involvement in sleep regulation and potential of selective agonists in the treatment of insomnia. *CNS Drugs*, 2000, 13(3): 185-199.
- [16] 胡金凤,王朝辉,齐燕英,等. “针刺五脏俞穴调五脏神”针法对失眠大鼠脑内细胞因子调节作用及其机制的研究. 吉林中医药, 2008, 28(9): 688-689.
- [17] 邵丹,刘洋,胡金凤. 针刺五脏俞调五脏神针法对失眠大鼠脑内抑制性递质 GABA 及 GABAA 的含量影响. 长春中医药大学学报, 2008, 24(2): 145-146.
- [18] 白妍. 电针太阳、印堂穴对大鼠睡眠功能的神经-免疫调节及脑电活动影响的实验研究. 黑龙江中医药大学博士学位论文, 2004.