



论文

L-茶氨酸通过乙酰胆碱受体多巴胺奖赏通路抑制尼古丁依赖

底晓静^{①†}, 颜景奇^{①†}, 赵燕^②, 常彦忠^③, 赵保路^{①*}^① 中国科学院生物物理研究所, 脑与认知国家重点实验室, 北京 100101;^② 哈尔滨工业大学食品科学技术系, 威海 264209;^③ 河北师范大学分子神经研究所, 石家庄 050016

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: zhaobl@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2012-08-07; 接受日期: 2012-10-04

国家自然科学基金(批准号: 30870587)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB500700)资助项目

摘要 本文研究了 L-茶氨酸对尼古丁依赖的抑制作用及其机理. 采用小鼠条件性位置偏爱实验(CPP)评价发现, L-茶氨酸能够明显抑制尼古丁诱导的小鼠偏爱行为和 SH-SY5Y 细胞的兴奋状态, 而且与尼古丁抑制剂二氢- β -刺桐(DH β E)类似. HPLC 电化学检测、蛋白质印迹法和免疫荧光染色发现, L-茶氨酸处理能够明显抑制尼古丁引起的小鼠中脑多巴胺水平和酪氨酸羟化酶(TH)的升高, 还能够减少与奖赏通路相关脑区的 3 种尼古丁乙酰胆碱受体(nAChRs)亚基 α_4 , β_2 和 α_7 及 *c-Fos* 表达的增加, 从而可能使对尼古丁刺激产生效应的细胞数目减少. 另外, L-茶氨酸处理抑制了尼古丁引起的小鼠相关脑区的 *c-Fos* 表达的增加. siRNA 转染发现, 敲除 *c-Fos* 基因能够抑制 SH-SY5Y 细胞兴奋状态但不影响 TH 的表达. 本实验表明, L-茶氨酸可能通过尼古丁引起的乙酰胆碱受体多巴胺奖赏回路抑制尼古丁成瘾, 该结果为祛除吸烟成瘾和戒烟策略提供了科学依据.

关键词L-茶氨酸
尼古丁依赖
尼古丁乙酰胆碱受体
(nAChRs)
多巴胺
条件性位置偏爱实验
(CPP)

吸烟成瘾及其产生的副作用对人类的生命和生活质量构成了重大威胁, 与很多严重疾病, 如心脏病、肿瘤和急性呼吸道疾病密切相关, 超过了很多疾病的集合, 吸烟对健康的危害已成为人类面临的重大公共卫生问题^[1-3]. 据估计, 全球有 12.5 亿烟民, 每年约 500 万人死于与吸烟有关的疾病, 从而产生极大的医疗费用和社会负担^[4-6]. 虽然对烟草依赖有多种治疗方法, 但由于克服尼古丁依赖非常困难, 而且

多数方法都有不同程度的副作用或使用不便^[7], 使得戒烟仍然非常困难.

烟草成瘾的主要原因是尼古丁依赖, 是由于个体反复使用尼古丁所引发的一类慢性易复发的精神活性物质滥用综合征. 与其他成瘾药物相同, 尼古丁依赖与中脑边缘系统的多巴胺奖赏回路密切相关. 这一系统主要由腹侧被盖区(VTA)、伏隔核(NAc)、杏仁核和蓝斑等组成, 其中表达高水平的尼古丁乙

英文版见: Di X J, Yan J Q, Zhao Y, et al. L-theanine inhibits nicotine-induced dependence via regulation of the nicotine acetylcholine receptor-dopamine reward pathway. *Sci China Life Sci*, 2012, 55, in press

酰胆碱受体(nAChRs). 包括尼古丁在内的多数成瘾药物可增强此系统中的多巴胺能神经活性. 条件性位置偏爱模型是研究成瘾药物常用的经典模型, 用以评价包括尼古丁在内的成瘾药物的奖赏效应和强化效应^[8,9].

尼古丁与脑中乙酰胆碱受体相互作用使受体数量增加引起吸烟成瘾等效应. 不仅动物实验表明尼古丁处理可以使 $\alpha_4\beta_2$ nAChRs 明显增加^[10,11], 而且烟民脑中 $\alpha_4\beta_2$ nAChRs 也明显上调^[12]. 有报道表明, $\alpha_4\beta_2$ nAChRs, α_7 nAChRs 与转录因子 c-Fos 与尼古丁成瘾也有关系^[13,14]. 这说明, 如果在有关脑区抑制了 nAChRs 的表达和功能, 则有可能抑制尼古丁成瘾.

L-茶氨酸是天然茶成分中的一种氨基酸, 可以使精神放松并具有神经保护作用. 有报道称, L-茶氨酸对咖啡因引起的兴奋有拮抗作用^[15]. 本实验室前期研究了尼古丁引起的强化作用及新研制的茶质滤嘴和其中的一些成分对吸烟成瘾的抑制作用, 发现茶质滤嘴对吸烟成瘾有明显的抑制作用, L-茶氨酸对动物尼古丁成瘾有明显祛除作用^[16]. 为此, 本实验利用小鼠条件性位置偏爱实验(conditioned place preference, CPP)和神经细胞 SH-SY5Y 作为实验模型, 深入研究了 L-茶氨酸对尼古丁引起的行为变化和生物化学过程的影响及其机理.

1 材料与方法

1.1 试剂

改进的 Dulbecco Eagle's(DMEM)高糖培养基购自 GIBCO(Grand Island, NY, USA); 胎牛血清(FBS)购自 Hyclone(logan, UT, USA); 2-NBDG 购自 Invitrogen Co.(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 胰酶, 青霉素, 链霉素, EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), β -羟基刺桐定溴酸盐(DH β E)等购自 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA); L-茶氨酸由杭州禾田生物技术有限公司馈赠, 纯度为 98.11%(HPLC 分析); 尼古丁由郑州烟草研究院提供; 乙酰胆碱受体 AChR α_4 (sc-74519), AChR β_2 (sc-11372), AChR α_7 (sc-11372), TH(sc-25269), c-FOS(sc-52)和 β -Actin(sc-1616-R)抗体购自 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA); Vectastain ABC 和 DAB 试剂盒购自 VECTOR Corporation(Burlingame, USA). 其余化学

试剂均为国产分析纯.

1.2 实验动物和处理

6~8 周雌性 C57BL/6J 小鼠购自中国医学科学院实验动物中心, 饲养于无特定病原体级 SPF(specific pathogen free)环境中, 自由取食. 尼古丁、L-茶氨酸、尼古丁受体抑制剂 DH β E 溶于生理盐水, 采用皮下注射方式给药; 小鼠按以下方式分组, 每组 10 只. 对照组: 小鼠皮下注射生理盐水; 尼古丁组: 皮下注射尼古丁(0.5 mg/kg/天); Th-L, L-茶氨酸低剂量组: 小鼠皮下注射 L-茶氨酸(250 mg/kg/天); Th-H, L-茶氨酸高剂量组: 小鼠皮下注射 L-茶氨酸(500 mg/kg/天); Th-L(N), 尼古丁和 L-茶氨酸低剂量组: 小鼠皮下注射 L-茶氨酸(250 mg/kg/天)15 min 后皮下注射尼古丁(0.5 mg/kg/天); Th-H(N), 尼古丁和 L-茶氨酸高剂量组: 小鼠皮下注射 L-茶氨酸(500 mg/kg/天)15 min 后皮下注射尼古丁(0.5 mg/kg/天); DH β E(N), 尼古丁和抑制剂组: 小鼠皮下注射抑制剂(2.0 mg/kg/天)15 min 后皮下注射尼古丁(0.5 mg/kg/天)^[17]. 动物每日注射尼古丁(0.5 mg/kg/天)或生理盐水连续不同时间.

1.3 条件性位置偏爱实验

条件性位置偏爱实验是一种被经常用于评定包括尼古丁在内的依赖性药物奖赏效应的行为学指标^[18,19]. 小鼠位置偏爱仪购自中国医学科学院. 装置呈长方形盒状, 由 2 个可以上下自由滑动的门将盒分为 3 部分. 将实验动物放入装置后由计算机记录动物行为. 实验流程分为前测组、训练组和测试组 3 部分. 实验第 1 和 2 天进行前测, 依据结果分组, 保证每组无明显偏爱. 实验第 3~9 天进行训练, 小鼠给药后放入伴药箱部分, 给对照药后放入对照箱, 30 min 后取出小鼠. 每天 2 次, 间隔 5 h. 实验第 10 天进行测试, 小鼠自由穿梭, 计时 900 s, 记录小鼠停留于每箱中的时间. 在前测和测试期动物均不给药.

1.4 细胞培养和 2-NBDG 法检测葡萄糖吸收

SH-SY5Y 细胞生长培养基为 DMEM 高糖培养基, 含 10%胎牛血清(FBS), 100 IU/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素. 细胞培养于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中. 细胞用 DH β E(50 mol/L)或 L-茶氨酸(100 mol/L)处理 30 min, 用和不用尼古丁(10 mol/L)处理 24 h, 然后用 KRB 缓冲液冲洗 3 次, 再用脱氧葡萄糖荧光显像剂

2-[N{7-硝基苯-2-乙二酸-1,重氮盐-4-基}氨基](2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]), 2-NBDG (Invitrogen, CA, USA)培养 20 min, 用 KRB 缓冲液冲洗 3 次. 用荧光显微镜(Olympus, kx14e)检测.

1.5 电化学-HPLC 方法检测多巴胺含量

实验小鼠给药 30 min 后脱臼处死, 断头取脑并于冰上分离出两侧纹状体, 称重后加入 1 mL 0.2 mol/L 高氯酸匀浆. 匀浆液在 20000×g, 4℃条件下离心 15 min, 取上清. 纹状体多巴胺含量及其代谢物 3,4-二羟基苯乙酸(dihydroxyphenylacetic acid)(DOPAC)和高香草酸(homovanillic acid)(HVA), 使用 HPLC ESA-5600A 电化学系统(ESA, 美国)进行检测^[20,21].

1.6 酪氨酸羟化酶(TH)免疫组化检测

脑组织切片(14 μm)TH 免疫荧光按文献[22,23]方法进行, 组织切片用 PBS 清洗 3 次后, 免疫组化按 ABC 试剂盒说明操作(Vector Laboratories), 通过培养鼠单克隆抗 TH 抗体(1:200)和生物素标记的兔抗鼠 IgG(1:100; Vector Laboratories)免疫标记 TH 阳性神经元; 随后按 DAB 显色试剂说明进行显色反应, 于显微镜(Leica DM2500)下观察黑质致密部的 TH 阳性细胞并拍照.

1.7 蛋白印迹

腹侧被盖区(VTA)、前额皮层(PFC)和包含伏隔核区(NAc)脑组织加入蛋白裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-Cl, 150 mmol/L NaCl, 0.02 mol/L NaN₃, 100 μg/mL PMSF, 1 μg/mL Aprotinin, 1% Triton X-100), 0℃冰浴匀浆 30 min 后, 于 4℃ 12000×g 离心 25 min, 收集上清, 按照标准蛋白印迹方法进行实验. 检测尼古丁乙酰胆碱受体亚基 nAChRα₄, nAChRβ₂, nAChRα₇, TH 和 c-FOS 蛋白水平的表达. 条带灰度值用 NIH Image 软件进行分析.

1.8 细胞免疫荧光方法

SH-SY5Y 细胞处理到时间后, 以甲醇/丙酮(1:1)固定和 1%Triton X-100 渗透, 然后再用 1%小牛血清封闭 0.5 h, 通过与 TH(SC-25269), c-FOS(sc-52)和荧

光标记的羊抗鼠 IgG 抗体样品孵化进行染色. 最后在激光共聚焦显微镜下观察并拍照(LSCMFV500).

1.9 siRNA 转染

siRNAs 由 GenePharma 公司设计合成, *c-Fos* 的序列为 5'-GGUGGAACAGUUAUCUCCATT-3'(正义)和 5'-UGGAGAUAAACUGUCCACCTT-3'(反义). 由公司提供的反义的不针对大鼠、小鼠或人基因的 siRNA 作为负对照(Nc), 序列为 5'-UUCUCCG-AACGUGUCACGUTT-3'(正义)5'-ACGUGACACGU-UCGGAGAATT-3'(反义). 将大约 1×10⁵ SH-SY5Y 细胞/35 mm 放在培养皿中, 直到细胞长到 80%覆盖率后, siRNAs 用脂质体 2000(Invitrogen Inc., USA)按说明书进行转染.

1.10 统计分析

数据结果以 $\bar{x} \pm SE$ 表示, 用 ORIGIN 软件、多因素方差分析(ANOVA)和 *t* 检验^[24]对数据进行分析, *P*<0.05 定义为有显著统计差异.

2 结果

2.1 L-茶氨酸调节尼古丁诱导的小鼠强化效应

实验中采用小鼠条件性位置偏爱实验评价了尼古丁的强化效应. 结果发现, 用尼古丁(0.5 mg/kg/天, 皮下注射)处理 14 天, 小鼠在伴药箱中的停留时间明显延长, 表明引起了条件性位置偏爱的形成(图 1A). 用 L-茶氨酸(250 或 500 mg/kg)或 DHβE 预处理 2 周的小鼠, 两种剂量的 L-茶氨酸和 DHβE 都能明显抑制尼古丁引起的条件性位置偏爱的形成(图 1B). 然后, 又检测了尼古丁引起小鼠条件性位置偏爱形成后 L-茶氨酸的作用效果. 结果发现, 尼古丁(0.5 mg/kg/天)处理 2 周后, 小鼠在伴药箱中的停留时间明显变长, 即尼古丁处理引起了小鼠的条件性位置偏爱(图 1C). 随后对明显形成条件性位置偏爱的小鼠单独注射 L-茶氨酸(不用尼古丁)或用 L-茶氨酸和尼古丁受体抑制剂预处理并继续注射尼古丁. 结果显示, 两种给药形式都明显减少了尼古丁引起的小鼠在伴药箱中停留时间的延长(图 1C). 这些数据示, L-茶氨酸无论是尼古丁成瘾前还是成瘾后都能抑制尼古丁引起的奖赏效应和强化效应.

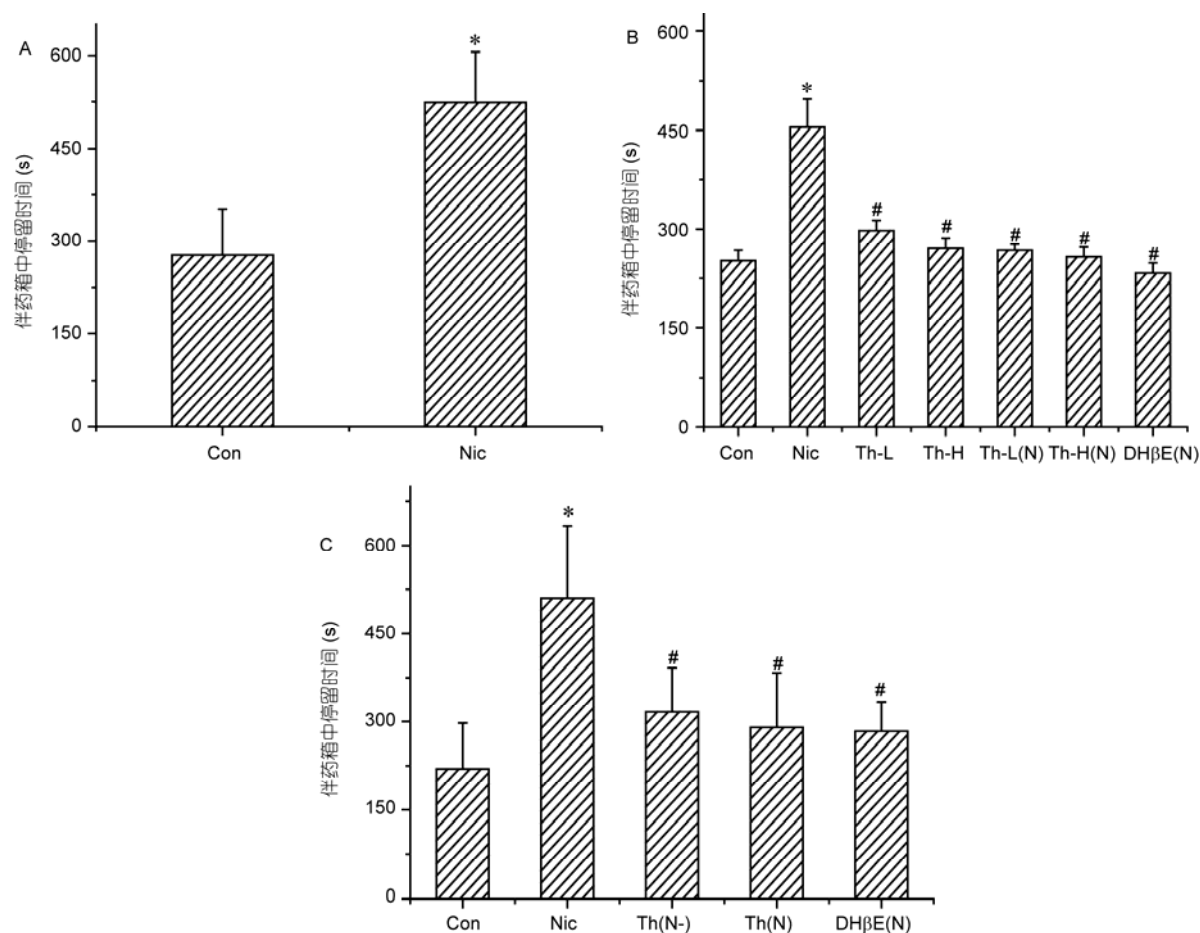


图1 L-茶氨酸对尼古丁引起的条件性位置偏爱的影响

A: 尼古丁诱导小鼠成瘾, Con: 对照组; Nic: 尼古丁组. 尼古丁组小鼠注射尼古丁(0.5 mg/kg/天)14 天, 对照组小鼠注射同等剂量生理盐水. 第 17 天利用 CPP 方法检测; B: L-茶氨酸预处理对尼古丁诱导小鼠成瘾的抑制作用, Con: 对照组; Nic: 尼古丁组(0.5 mg/kg/天); Th-L: L-茶氨酸低剂量组(0.25 mg/kg/天); Th-H: L-茶氨酸高剂量组(0.5 mg/kg/天); Th-L(N): L-茶氨酸低剂量预处理组(0.25 mg/kg/天); Th-H(N): L-茶氨酸高剂量预处理组(0.5 mg/kg/天); DHβE(N): 乙酰胆碱受体抑制剂预处理组(2 mg/kg). 尼古丁组小鼠注射尼古丁(0.5 mg/kg/天)14 天, 对照组小鼠注射同等剂量生理盐水. L-茶氨酸组或 L-茶氨酸预处理组小鼠不注射或注射尼古丁(0.5 mg/kg/天)前 15 min 注射低剂量或高剂量 L-茶氨酸 14 天, DHβE 组小鼠注射尼古丁(0.5 mg/kg/天)前 15 min 注射 DHβE 14 天, 第 17 天利用 CPP 方法检测; C: L-茶氨酸后处理对尼古丁诱导小鼠成瘾的抑制作用, Con: 对照组; Nic: 尼古丁组(0.5 mg/kg/天), 尼古丁组小鼠注射尼古丁(0.5 mg/kg/天)14 天, 对照组小鼠注射同等剂量生理盐水. 第 17 天利用 CPP 方法检测; 第 18 天, L-茶氨酸处理组小鼠不注射或注射尼古丁(0.5 mg/kg/天)前 15 min 注射 L-茶氨酸或 DHβE, 第 31 天利用 CPP 方法检测. Th(N-): 不继续注射尼古丁 L-茶氨酸(0.5 mg/kg/天)处理组; Th(N): L-茶氨酸(0.5 mg/kg/天)处理继续注射尼古丁组; DHβE(N): 尼古丁乙酰胆碱受体抑制剂(2 mg/kg)处理继续注射尼古丁组. 结果以伴药箱中平均停留时间表示, $n=10$. 多因素方差分析, *: $P<0.05$, 与对照组相比; #: $P<0.05$, 与尼古丁组相比

2.2 L-茶氨酸抑制尼古丁引起的 SH-SY5Y 细胞兴奋状态

尼古丁可以诱导神经细胞兴奋^[11]. 尼古丁诱导多巴胺神经兴奋可能是尼古丁成瘾的机理之一^[25]. 葡萄糖是细胞能量代谢的关键分子, 葡萄糖吸收是细胞兴奋状态的重要标志. 所以, 利用 2-NBDG 荧光标记研究了 L-茶氨酸对尼古丁处理 SH-SY5Y 细胞

的葡萄糖摄取改变的影响, 来衡量神经细胞的兴奋状态. 尼古丁处理 SH-SY5Y 细胞后, 细胞中 2-NBDG 的荧光信号明显比对照细胞强(图 2), 说明尼古丁处理后, 细胞的葡萄糖摄取增加, 表示细胞处于兴奋状态. L-茶氨酸或尼古丁乙酰胆碱受体抑制剂预处理后, 细胞内的荧光信号与尼古丁组比较明显减弱(图 2), 说明 L-茶氨酸抑制了尼古丁引起的细胞兴奋状态.

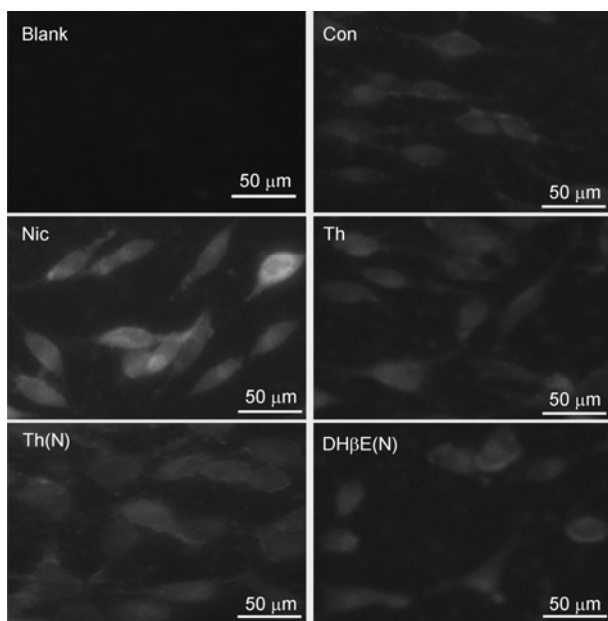


图 2 L-茶氨酸对尼古丁处理 SH-SY5Y 细胞葡萄糖摄取增加(神经细胞兴奋状态)的影响

Blank: 含 PBS 缓冲溶液不用 2-NBDG 荧光标记的细胞; Con: 含 PBS 缓冲溶液和 2-NBDG 荧光标记的细胞; Nic: 尼古丁处理含 PBS 缓冲溶液和 2-NBDG 荧光标记的细胞; Th: L-茶氨酸处理含 PBS 缓冲溶液和 2-NBDG 荧光标记的细胞; Th(N): 尼古丁和 L-茶氨酸处理含 PBS 缓冲溶液和 2-NBDG 荧光标记的细胞; DHβE(N): 尼古丁和 DHβE 处理含 PBS 缓冲溶液和 2-NBDG 荧光标记的细胞

2.3 L-茶氨酸抑制尼古丁引起的酪氨酸羟化酶表达和多巴胺释放增加

脑内多巴胺释放的增加是衡量尼古丁诱导奖赏效应非常重要的指标^[20,21]。本实验检测了药物处理后小鼠中脑内多巴胺水平的变化。结果表明, 尼古丁处理 2 周后, 中脑内的多巴胺水平明显上调, 而尼古丁乙酰胆碱受体抑制剂和 L-茶氨酸(500 mg/kg/天)预处理后, 与尼古丁单独处理组相比都明显抑制了小鼠中脑多巴胺含量的增加(图 3)。

酪氨酸羟化酶是负责多巴胺合成的关键酶, 其水平的高低反映了多巴胺合成的多少。免疫组化染色结果表明, 尼古丁处理 2 周后明显增加了小鼠脑中 TH 阳性神经元的数目, 而茶氨酸预处理后, 与尼古丁单独处理组相比, 明显减少了 TH 染色阳性神经元的增加(图 4A)。同时, 蛋白印迹结果表明, 尼古丁处理后, TH 在 VTA 区的表达明显增加, 低剂量和高剂量的 L-茶氨酸预处理则明显抑制了尼古丁引起的 TH

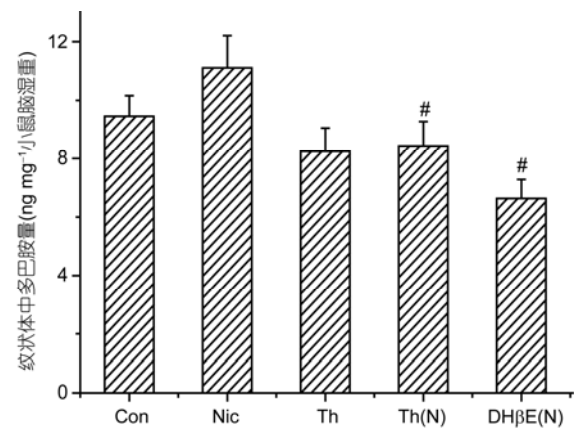


图 3 L-茶氨酸对尼古丁引起小鼠中脑多巴胺含量的影响

多巴胺用 HPLC 电化学方法测量, 结果以每 mg 小鼠脑湿重中多巴胺含量表示。Con: 对照组; Nic: 尼古丁组(0.5 mg/kg/天); Th(N): L-茶氨酸预处理组(500 mg/kg); DHβE(N): 尼古丁乙酰胆碱受体抑制剂预处理组(2 mg/kg); $n=3$ 。数据进行多因素方差分析, #: $P<0.05$, 与尼古丁组相比

表达的增加, 并且呈现剂量依赖效应; 而 L-茶氨酸单独处理组与对照组相比, 在 VTA 区 TH 的表达没有明显变化(图 4B)。这些结果说明, L-茶氨酸只是在尼古丁刺激时抑制了尼古丁对 TH 表达的上调和 DA 释放的增加。

2.4 L-茶氨酸抑制尼古丁引起的 3 种尼古丁乙酰胆碱受体亚基(α_4 , β_2 和 α_7 nAChRs)蛋白表达在脑奖赏回路相关区域的上调

为了阐明 L-茶氨酸影响尼古丁引起的强化效应和细胞兴奋的机理, 分离了小鼠与多巴胺奖赏回路相关脑区的脑组织: 腹侧被盖区、前额皮层和包含伏隔核, 用蛋白印迹法检测了不同药物处理后这 3 个脑区的 3 种尼古丁乙酰胆碱受体亚基 α_4 , β_2 和 α_7 蛋白表达的变化。结果表明, 尼古丁处理 2 周后, 这 3 个脑区中 3 种类型的尼古丁乙酰胆碱受体的表达都明显增加(图 5)。L-茶氨酸低剂量(250 mg/kg/天)和高剂量(500 mg/kg/天)预处理后都明显抑制了尼古丁引起的 3 个脑区中 α_4 和 β_2 亚基的表达上调; 在 VTA 区和 PFC 的脑组织中, 两种剂量的 L-茶氨酸预处理明显抑制了尼古丁引起的 α_7 亚基的表达上调; 而在 NAc 区, L-茶氨酸预处理对 α_7 亚基没有影响。L-茶氨酸单独处理时只在小鼠的 NAc 区引起了 α_4 亚基的表达降低, 而在其他脑区中, 都没有降低 3 种亚基的表

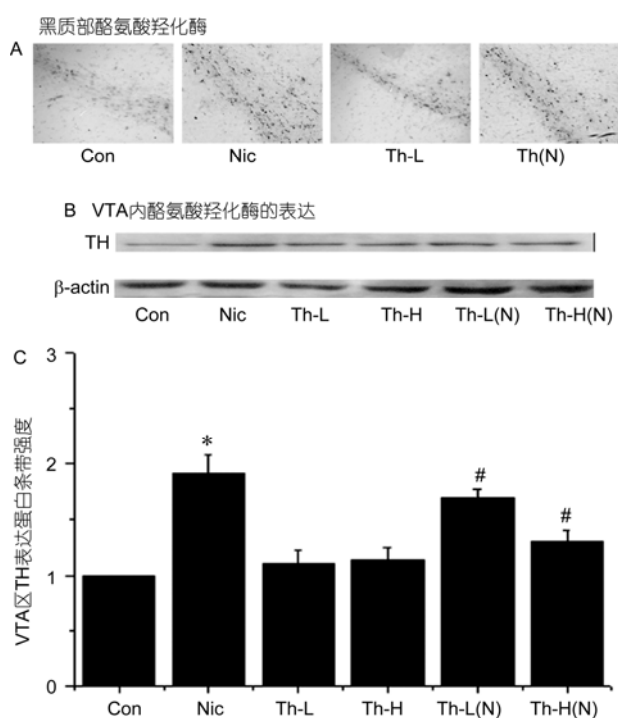


图4 L-茶氨酸对尼古丁引起小鼠中脑酪氨酸羟化酶表达的影响

A: 小鼠脑黑质部酪氨酸羟化酶的免疫组化染色; B: L-茶氨酸对尼古丁诱导小鼠脑腹侧被盖区酪氨酸羟化酶蛋白质表达影响的印迹分析; C: L-茶氨酸对尼古丁诱导小鼠脑腹侧被盖区酪氨酸羟化酶蛋白质表达影响 3 次独立实验的定量分析. Con: 生理盐水处理; Nic: 尼古丁处理; Th-L: 低剂量 L-茶氨酸处理(250 mg/kg); Th-H: 高剂量 L-茶氨酸处理(500 mg/kg); Th-L(N): 尼古丁和低剂量 L-茶氨酸处理(250 mg/kg); Th-H(N): 尼古丁和高剂量 L-茶氨酸处理(500 mg/kg). 结果为 $\bar{x} \pm SE$, $n=3$. 多因素方差分析, *: $P<0.05$, 与对照组相比; #: $P<0.05$, 与尼古丁组相比

达, 说明 L-茶氨酸只是在尼古丁刺激时抑制了乙酰胆碱受体 3 种亚基表达的上调.

2.5 L-茶氨酸抑制了尼古丁引起的 *c-Fos* 表达上调

成瘾物质滥用可能诱导神经特异适应并导致生理和心理依赖^[25,26]. 由于 *c-Fos* 可能与尼古丁诱导的长期神经适应性改变密切相关^[26], 所以以小鼠和 SH-SY5Y 细胞为模型检测了尼古丁是否会诱导 *c-FOS* 蛋白表达上调以及 L-茶氨酸是否会对尼古丁的这一效应产生作用. 实验结果发现, 尼古丁明显上调了小鼠与奖赏回路有关脑区 VTA, PFC 和 NAc 脑组织 *c-Fos* 的表达, L-茶氨酸预处理后明显抑制了 *c-Fos* 在这些脑区表达上调(图 6). TH 和 *c-FOS* 免疫

荧光双标记的结果也表明, 在 SH-SY5Y 细胞中, 尼古丁引起 TH 表达增加的同时, *c-Fos* 表达也增多, 而 L-茶氨酸预处理后, 明显抑制了尼古丁引起的 *c-Fos* 和 TH 表达的增加(图 7).

2.6 敲除 *c-FOS* 抑制尼古丁引起 SH-SY5Y 细胞兴奋状态但对 TH 上调没有影响

为了研究 *c-FOS* 在尼古丁诱导细胞兴奋状态的重要性, 利用 siRNA 技术把 SH-SY5Y 的 *c-Fos* 敲除, 然后用 2-NBDG 技术测量了葡萄糖摄取情况. 如图 8A 和 B 所示, *c-Fos* 敲除后, *c-Fos* 表达减少到 47%. 与对照组相比, 尼古丁诱导后葡萄糖摄取量明显降低, 而 TH 表达没有明显变化(图 8C). 这表明 *c-Fos* 敲除后抑制了尼古丁诱导的细胞兴奋状态, 但对 TH 表达的影响不大(图 8A 和 B).

3 讨论

本研究发现, L-茶氨酸对尼古丁引起的条件性位置偏爱行为和尼古丁诱导的神经细胞兴奋状态有明显抑制作用, 而且与尼古丁受体抑制剂 DHβE 的效果类似(图 1 和 2). 先前也有报道, L-茶氨酸对咖啡因诱导的兴奋有类似抑制作用^[16].

TH 表达上调和多巴胺释放的增加是尼古丁依赖的重要指标^[27,28]. 在本实验体系中, 尼古丁处理后, 小鼠中脑 TH 的表达明显增加, L-茶氨酸预处理则明显抑制尼古丁引起的 TH 表达增加, 而 L-茶氨酸单独处理与对照组相比, TH 的表达没有变化(图 4). 这些结果表明, 只有在尼古丁刺激下, L-茶氨酸对小鼠脑中 TH 的表达和多巴胺的释放才有抑制作用.

大量数据表明, α_4 , β_2 和 α_7 型尼古丁乙酰胆碱受体数量的增加和功能的激活与尼古丁依赖密切相关^[10-12], 而抑制尼古丁乙酰胆碱受体的功能和与其相关的途径可以减少尼古丁引起的动物觅药行为^[29,30]. 因此, 尼古丁乙酰胆碱受体就成为治疗尼古丁成瘾的重要靶点. 本实验数据表明, 尼古丁处理 2 周后, 小鼠脑中 3 种类型的尼古丁乙酰胆碱受体的表达都明显增加, 而 L-茶氨酸明显抑制了尼古丁引起的 3 个与多巴胺奖赏回路相关脑区, 包括腹侧被盖区、前额皮层和包含伏隔核在内的脑组织中 α_4 , β_2 和 α_7 亚基的表达上调(图 5). 先前研究还表明, 长期尼古丁处理会引起乙酰胆碱受体脱敏^[31-34]. 尼古丁乙

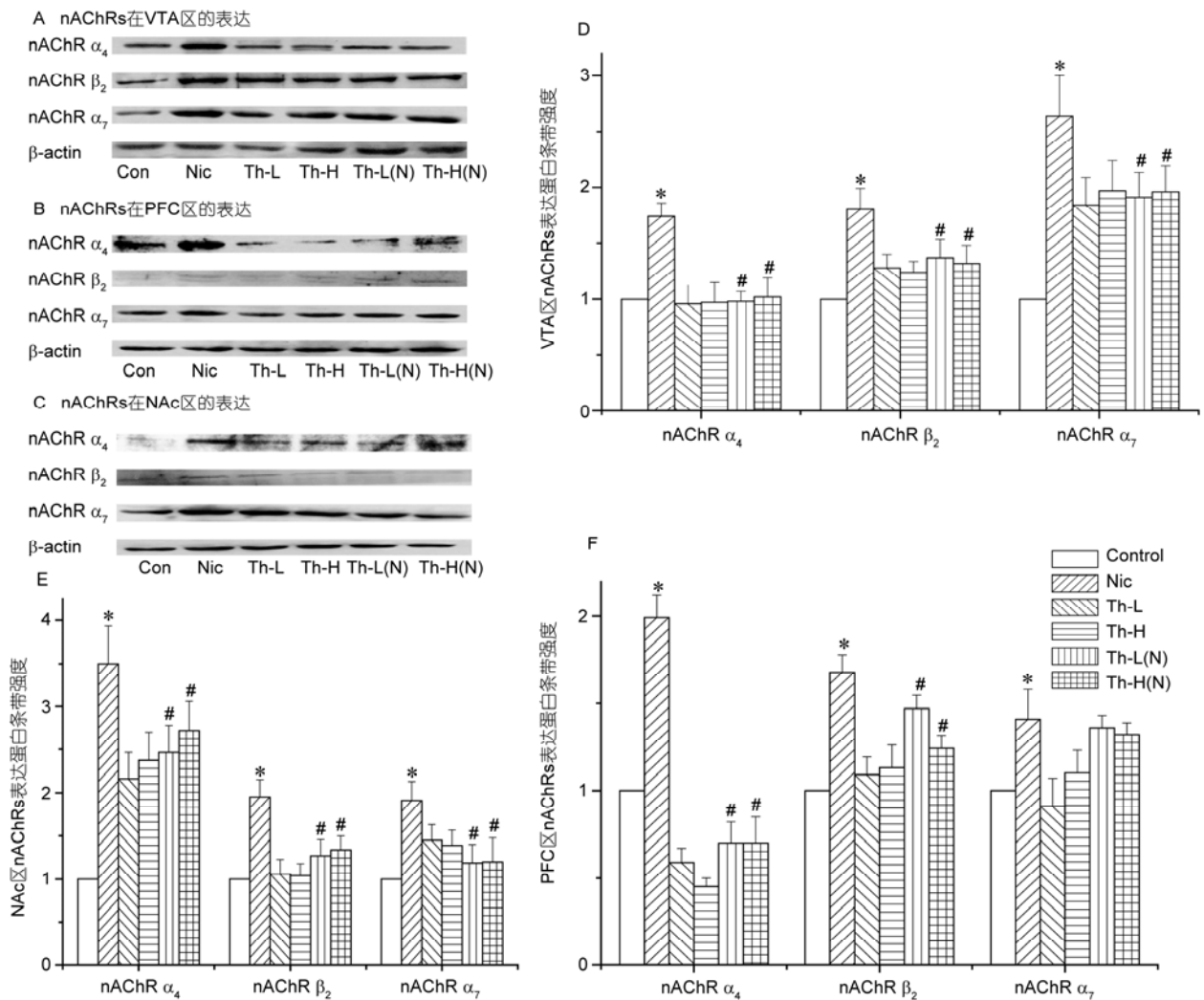


图5 L-茶氨酸和尼古丁对小鼠脑相关区域尼古丁 nAChRs 3种亚基表达的影响

A: 腹侧被盖区; B: 前额皮层区; C: 伏隔核区. A~C: 蛋白印迹分析; D~F: 统计分析结果. 尼古丁组小鼠注射尼古丁(0.5 mg/kg/天), 对照组小鼠注射同等剂量生理盐水. L-茶氨酸组或L-茶氨酸预处理组小鼠不注射或注射尼古丁(0.5 mg/kg/天)前 15 min 注射低剂量或高剂量 L-茶氨酸. 结果为 $\bar{x} \pm SE$, $n=3$. 多因素方差分析, *: $P<0.05$, 与对照组相比; #: $P<0.05$, 与尼古丁组相比

乙酰胆碱受体的这一特异过程可以使尼古丁乙酰胆碱受体表达上调, 同时增加尼古丁受体对尼古丁的耐受性, 这可能是本实验体系中尼古丁处理引起受体表达上调的重要原因. 与本实验预期不同, L-茶氨酸单独处理时只在小鼠的 NAc 区引起了 α_4 受体亚基的表达降低, 而在其他脑区, 都没有降低 3 种受体亚基的表达(图 5). 说明 L-茶氨酸只是在尼古丁刺激时抑制了 3 种亚基的表达上调, 而在机体或细胞处于正常生理状态时, L-茶氨酸本身并不抑制受体的表达. 本实验现有数据说明, L-茶氨酸可能是通过抑制尼古丁

乙酰胆碱受体 nAChRs 亚基 α_4 , β_2 和 α_7 及其相关通路影响尼古丁引起的强化效应和细胞兴奋状态. 但是, 就目前的研究结果还不能完全解释 L-茶氨酸是如何影响尼古丁乙酰胆碱受体表达的. 例如, L-茶氨酸与尼古丁在脑中是通过竞争结合还是非竞争方式抑制尼古丁依赖的等问题都有待进一步研究.

c-Fos 是原癌基因 *fos* 转录因子家族中的一员, 可能与尼古丁诱导的神经特异适应有关^[14,26]. 用尼古丁急性处理小鼠, *c-Fos* 在奖赏回路相关脑区的表达明显增加^[35,36], 同时发现, 直接向小鼠脑 VTA 区

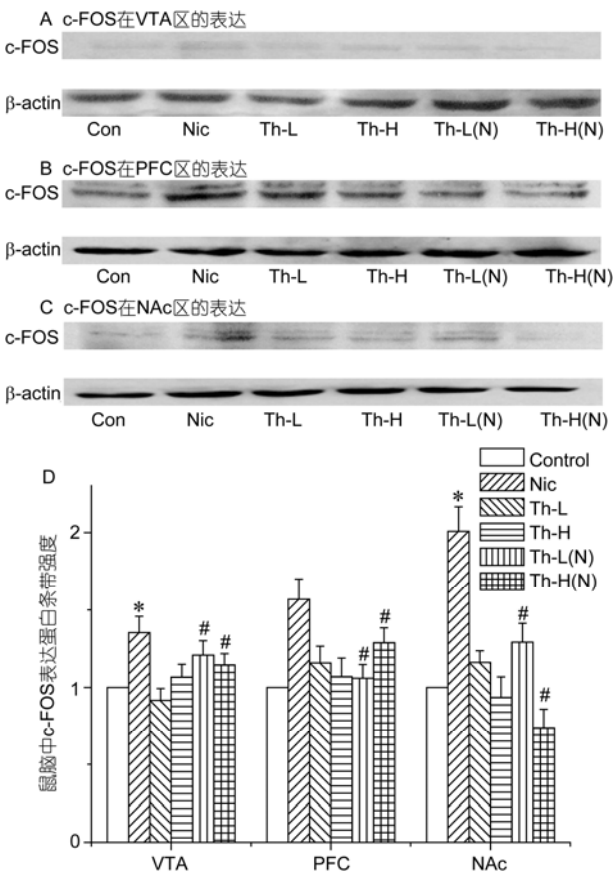


图6 L-茶氨酸对小鼠脑相关区域中 c-FOS 表达的影响

小鼠相关脑区中 c-FOS 表达用蛋白印迹分析. A: 腹侧被盖区; B: 前额皮层区; C: 伏隔核区; D: c-FOS 蛋白质表达 3 次独立实验的统计分析结果. Con: 生理盐水处理; Nic: 尼古丁处理; Th-L: 低剂量 L-茶氨酸处理(250 mg/kg); Th-H: 高剂量 L-茶氨酸处理(500 mg/kg); Th-L(N): 尼古丁和低剂量 L-茶氨酸处理(250 mg/kg); Th-H(N): 尼古丁和高剂量 L-茶氨酸处理(500 mg/kg). 结果为 $\bar{x} \pm SE$, $n=3$. 多因素方差分析, *: $P<0.05$, 与对照组相比; #: $P<0.05$, 与尼古丁组相比

注射尼古丁后, NAc 内的 *c-Fos* 表达明显上调^[26]. 实验检测了尼古丁和 L-茶氨酸对 *c-Fos* 表达的影响, 尼古丁引起 *c-Fos* 在 3 个奖赏回路相关脑区表达明显增加, 而 L-茶氨酸预处理后, 抑制了尼古丁引起的这种效应(图 6). 免疫荧光双标记结果也表明, 在 SH-SY5Y 细胞中, 尼古丁引起 TH 表达增加的同时, *c-Fos* 表达也增多, 而 L-茶氨酸预处理后, 明显抑制了尼古丁引起的这种效应(图 7). 这说明, L-茶氨酸可能通过影响 *c-Fos* 影响了尼古丁引起动物强化效应和细胞的兴奋状态. 同时发现, 敲除 *c-Fos* 抑制了

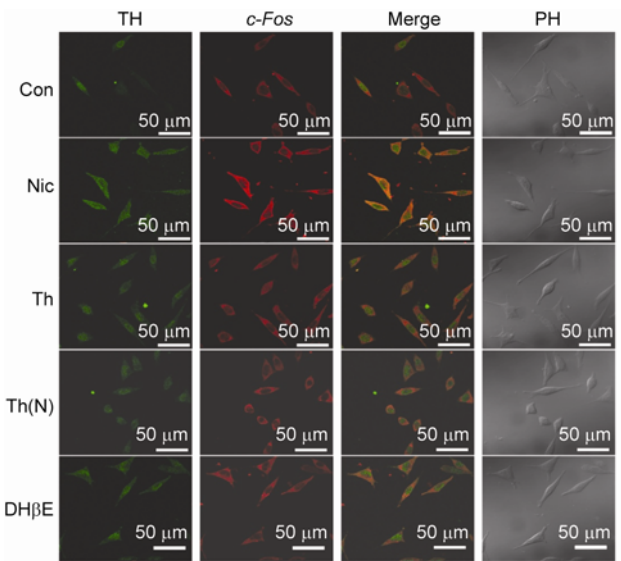


图7 双荧光染色技术测量 L-茶氨酸对尼古丁引起 SH-SY5Y 细胞酪氨酸羟化酶和 *c-Fos* 增加的影响

TH: 酪氨酸羟化酶免疫染色(绿色); *c-Fos*: *c-Fos* 免疫染色(红色); Merge: TH 和 *c-Fos* 免疫双染色(黄色); PH: 细胞光学显微镜照片. Con: 对照组; Nic: 尼古丁组(0.5 mg/kg/天); Th(N): L-茶氨酸预处理组(500 mg/kg); DH β E(N): 尼古丁乙酰胆碱受体抑制剂预处理组(2 mg/kg)

尼古丁诱导的细胞兴奋状态, 但是没有抑制细胞 TH 表达(图 8), 说明 *c-Fos* 对尼古丁引起的细胞兴奋状态和神经元特异适应的影响可能是不受 TH 表达调控的.

长期摄取尼古丁还可以增加中枢神经系统中 3H 尼古丁的结合位点, 从而增加对尼古丁产生效应的细胞数目^[37,38]. 本实验发现, L-茶氨酸可以抑制尼古丁引起的小鼠奖赏行为和细胞的兴奋状态. 这些数据表明, L-茶氨酸抑制尼古丁依赖是一个复杂机理. L-茶氨酸作用的首要靶点可能是抑制尼古丁乙酰胆碱受体 α_4 , β_2 和 α_7 nAChRs 亚基在相关脑区的上调和数量的变化, 再影响尼古丁产生效应的细胞数目, 从而减少了多巴胺合成和释放以及转录因子 *c-Fos* 的表达, 进一步抑制了尼古丁诱导的奖赏效应和强化效应以及神经适应性的改变, 从而最终影响了细胞的兴奋状态和动物的行为(图 9).

与其他毒品一样, 烟草商利用吸烟成瘾, 使烟民无法离开烟草, 以损害他们健康为前提, 赚取钱财, 并造成环境污染. 只有少吸烟和不吸烟才能真正减

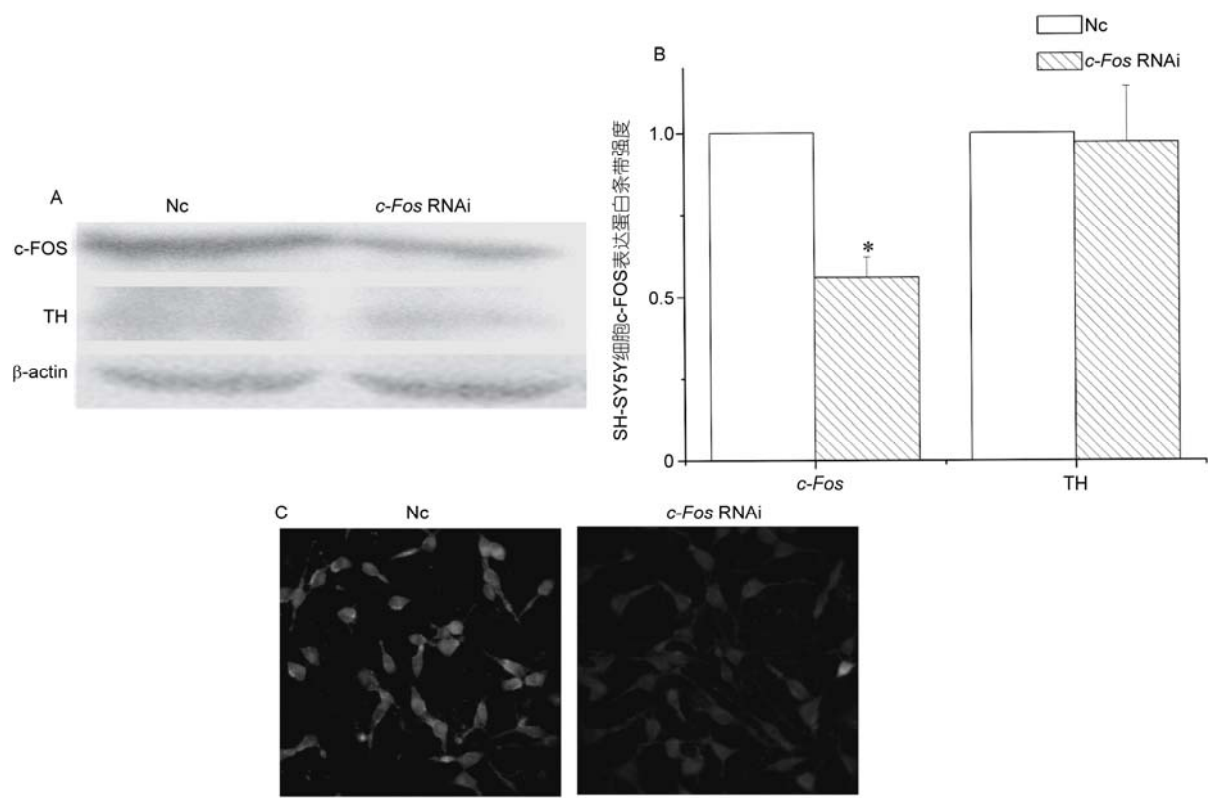


图 8 *c-Fos* 敲除对 SH-SY5Y 细胞葡萄糖摄取的影响

A: *c-Fos* 敲除后 *c-Fos* 和 TH 表达水平; B: *c-Fos* 和 TH 表达水平的定量分析结果; C: *c-Fos* 敲除后尼古丁诱导 SH-SY5Y 细胞的葡萄糖摄取. Nc: siRNA 对照; *c-Fos* RNAi: siRNA-*c-Fos*; 结果为 $\bar{x} \pm SE, n=3$. 多因素方差分析, *: $P<0.05$

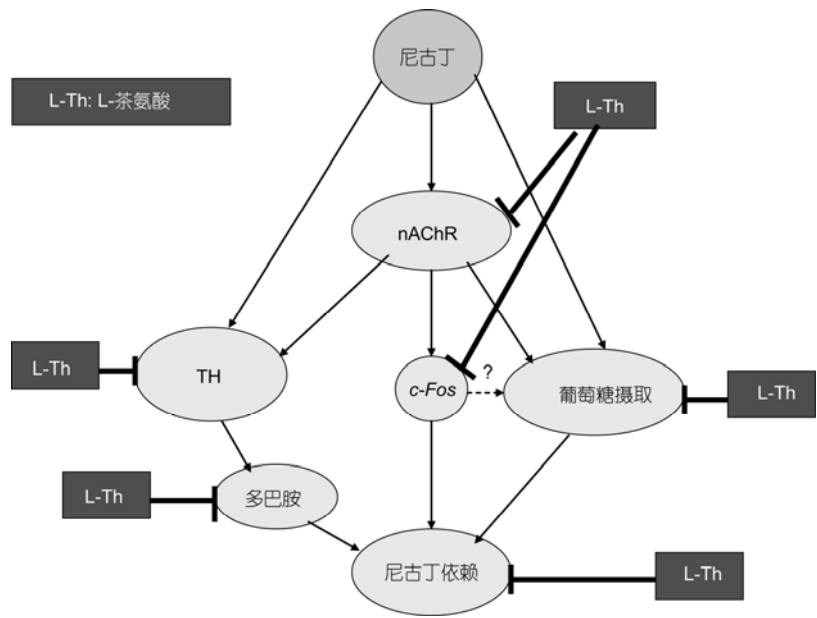


图 9 L-茶氨酸通过 nAChRs 多巴胺奖赏通路抑制尼古丁依赖示意图

少和消除吸烟危害。只有抑制吸烟成瘾和祛除烟瘾才能减少和消除吸烟的危害。而其关键是抑制尼古丁依赖和祛除尼古丁依赖,因为吸烟成瘾是尼古丁依赖引起的。无论任何技术和方法,如果不能减少甚至增加吸烟,都不可能真正减少吸烟危害,甚至增加其危害^[39-43]。茶氨酸能够在体内调节尼古丁引起的受体的增加,祛除尼古丁依赖,从而很可能提供一种从根本上祛除烟瘾的技术,使烟民远离吸烟危害。

研究表明,尼古丁对预防和治疗老年痴呆症和

帕金森综合征有一定作用^[44-49],但是尼古丁成瘾是其成为治疗药物的一个障碍。研究发现,L-茶氨酸对预防和治疗老年痴呆症也有一定作用^[50],可能是L-茶氨酸与尼古丁协同发生作用。L-茶氨酸抑制尼古丁成瘾机理的研究使尼古丁成为治疗老年痴呆症和帕金森综合征药物看到了希望。

本研究表明,L-茶氨酸可通过乙酰胆碱受体多巴胺奖赏回路抑制尼古丁依赖,该研究结果也为祛除吸烟成瘾和戒烟策略提供了科学依据。

参考文献

- 1 Gu D F, Kelly T N, Wu X, et al. Mortality attributable to smoking in China. *N Engl J Med*, 2009, 360: 150-159
- 2 McLellan A T, Lewis D C, O'Brien C P, et al. Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *JAMA*, 2000, 284: 1689-1695
- 3 Mizoue T, Tokui N, Nishisaka K. Prospective study on the relation of cigarette smoking with cancer of the liver and stomach in an endemic region. *Intern J Epidemiol*, 2000, 29: 232-237
- 4 Oncken C, Gonzales D, Nides M, et al. Efficacy and safety of the novel selective nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, varenicline, for smoking cessation. *Arch Intern Med*, 2006, 166: 1571-1577
- 5 Ray R, Schnoll R A, Lerman C. Nicotine dependence: biology, behavior, and treatment. *Annu Rev Med*, 2009, 60: 247-260
- 6 Rigotti A N. Treatment on tobacco use and dependence. *N Engl J Med*, 2002, 346: 506-512
- 7 Moxham J. Nicotine addiction. *BMJ*, 2000, 322: 391-392
- 8 Picciotto M R, Zoli M, Rimondini R. Acetylcholine receptors containing the $\beta 2$ subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 1998, 393: 173-177
- 9 Tapper A R, McKinney S L, Nashmi R. Nicotine activation of $\alpha 4^*$ receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science*, 2004, 306: 1029-1032
- 10 Bencherif M, Fowler K, Lukas R J. Mechanisms of up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 275: 987-999
- 11 Peng X, Gerzanich V, Anand R. Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol Pharmacol*, 1994, 46: 523-530
- 12 Breese C R, Marks M J, Logel J. Effect of smoking history on [3 H]nicotine binding in human postmortem brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 282: 7-13
- 13 Besson M, Granon S, Mameli-Engvall M. Long-term effects of chronic nicotine exposure on brain nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 8155-8160
- 14 Nestler E J. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, 2004, 47: 24-32
- 15 Eschenauer G, Sweet B V. Pharmacology and therapeutic uses of theanine. *Am J Health-Syst Ph*, 2006, 63: 26-30
- 16 颜景奇, 底晓静, 刘彩霞, 等. 茶质滤嘴的祛烟瘾减害作用研究. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40: 375-384
- 17 Nguyen H N, Rasmussen B A, Perry D C. Subtypeselective up-regulation by chronic nicotine of high-affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307: 1090-1097
- 18 Huang E Y, Liu T C, Tao P L. Co-administration of dextromethorphan with morphine attenuates morphine rewarding effect and related dopamine releases at the nucleus accumbens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2003, 368: 386-392
- 19 Laviolette S R, Nader K, Kooy D V. Motivational state determines the functional role of the mesolimbic dopamine system in the mediation of opiate reward processes. *Behav Brain Res*, 2002, 129: 17-29
- 20 Jiang H, Luan Z, Wang J, et al. Neuroprotective effects of iron chelator Desferal on dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats with iron-overload. *Neurochem Int*, 2006, 49: 605-609

- 21 Shachar B D, Youdim M B. Selectivity of melanized nigra-striatal dopamine neurons to degeneration in Parkinson's disease may depend on iron±melanin interaction. *J Neural Transm Suppl*, 1990, 29: 251–255
- 22 Bezard E, Dovero S, Bioulac B, et al. Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice. *Neurosci Lett*, 1997, 234: 43–45
- 23 Gross C E, Ravenscroft P, Dovero S, et al. Pattern of levodopa-induced striatal changes is different in normal and MPTP-lesioned mice. *J Neurochem*, 2003, 84: 1246–1251
- 24 Miller R G. *Simultaneous Statistical Inference*. New York: Springer, 1981. 230
- 25 Mansvelder H D, Keath J R, McGehee D S. Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*, 2002, 33: 905–919
- 26 Panagis G, Nisell M, Nomikos G G. Nicotine injections into the Ventral tegmental area increase locomotion and Fos-like immunoreactivity in the nucleus ac-Cumbens of the rat. *Brain Res*, 1996, 730: 133–142
- 27 Rahman S, Zhang J, Corrigall W A. Effects of acute and chronic nicotine on somatodendritic dopamine release of the rat ventral tegmental area: *in vivo* microdialysis. *Neurosci Lett*, 2003, 348: 61–64
- 28 Ferrafi R, Le Novere N, Picciotto M R. Acute and long—term changes in the mesolimbic dopamine pathway after systemic or local single nicotine injections. *Eur J Neurosci*, 2002, 15: 1810–1818
- 29 Corrigall W A, Coen K M, Adamson K L. Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. *Brain Res*, 1994, 653: 278–284
- 30 Markou A, Paterson N E. The nicotinic antagonist methyllycaconitine has differential effects on nicotine self-administration and nicotine withdrawal in the rat. *Nicotine Tob Res*, 2001, 3: 361–373
- 31 Lapchak P A, Araujo D M, Quirion R. Effect of chronic nicotine treatment on nicotinic autoreceptor function and N-[³H]methylcarbamylcholine binding sites in the rat brain. *J Neurochem*, 1989, 52: 483–491
- 32 Lapin E P, Maker H S, Ser-shen H. Action of nicotine on accumbens dopamine and attenuation with repeated administration. *Eur J Pharmacol*, 1989, 160: 53–59
- 33 Marks M J, Burch J B, Collins A C. Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 1983, 226: 817–825
- 34 Sharp B M, Beyer H S, Levine A S. Attenuation of the plasma prolactin response to restraint stress after acute and chronic administration of nicotine to rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987, 241: 438–442
- 35 Shram M J, Funk D, Li Z. Acute nicotine enhances c-FOS mRNA expression differen-Tially in reward-related substrates of adolescent and adult rat brain. *Neuro Sci*, 2007, 418: 286–291
- 36 Salminen O, Seppa T, Gaddnas H. The effects of acute nicotine on the metabolism of dopamine and the expression of Fos protein in striatal and limbic brain areas of rats during Chronic nicotine infusion and its withdrawal. *J Neuro Sci*, 1999, 19: 8145–8151
- 37 Marks M J, Grady S R, Yang J M. Desensitization of nicotine-stimulated ⁸⁶Rb+ efflux from mouse brain synaptosomes. *J Neurochem*, 1994, 63: 2125–2135
- 38 Schwartz R D. Nicotinic cholinergic receptor binding sites in the brain: regulation *in vivo*. *Science*, 1983, 220: 214–216
- 39 Benwell M E M, Balfour D J K. The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br J Pharmacol*, 1992, 105: 849–856
- 40 Balbani A P S, Montovani J C. Methods for smoking cessation and treatment of nicotine dependence. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 2005, 71: 820–826
- 41 Ray R, Schnoll R A, Lerman C. Nicotine dependence: biology, behavior, and treatment. *Annu Rev Med*, 2009, 60: 247–260
- 42 Rigotti A N. Treatment on tobacco use and dependence. *N Engl J Med*, 2002, 346: 506–512
- 43 Peng R L, Wang S L. Nicotine sublingual tablet for smoking cessation in 115 cases: a double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Rehabil Tissue Engin Res*, 2007, 11: 10443–10446
- 44 Liu Q, Tao Y, Zhao B L. ESR study on scavenging effect of nicotine on free radicals. *Appl Mag Reson*, 2003, 24: 105–112
- 45 Liu Q, Zhao B L. Nicotine attenuates β-amyloid peptide induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Brit J Pharmacol*, 2004, 1141: 746–754
- 46 Xie Y X, Bezard E, Zhao B L. Unraveling the receptor- independent neuroprotective mechanism in mitochondria. *J Biol Chem*, 2005, 280: 84–92

- 47 Zhang J, Liu Q, Liu N Q, et al. Nicotine reduces β -amyloidosis by regulating metal homeostasis. *FASEB J*, 2006, 20: 1212–1214
- 48 Liu Q, Zhang J, Qin C, et al. Dissecting the signalling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse alzheimer disease model. *FASEB J*, 2007, 21: 61–73
- 49 赵保路. 尼古丁预防帕金森氏综合征和老年痴呆症的分子机理研究. *生物物理学报*, 2007, 23: 81–92
- 50 Di X J, Yan Y, Zha J, et al. L-theanine protect the APP (Swedish mutation) transgenic SH-SY5Y cell against glutamate-induced excitotoxicity via inhibition of the NMDA receptor pathway. *Neuroscie*, 2010, 168: 778–786