

大量饮酒及乙醇戒断后对大鼠脑内维生素C水平的影 响

田华 刘富 杨宏艳 宋娟 苑家鑫 张奇 柏青杨 崔红霞

361023 厦门医学院基础医学部(田华、刘富); 161006 齐齐哈尔医学院药学院(田华、杨宏艳、宋娟、苑家鑫、张奇、崔红霞), 基础医学院(刘富), 病理学院(柏青杨)

通信作者: 田华, Email: tianhua0912@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.06.002

【摘要】目的 研究大量饮酒4 d及乙醇戒断后大鼠脑脊液中及各重要脑区内维生素C(VC)水平及钠依赖性VC转运体2(SVCT2)蛋白水平的变化。**方法** 30只健康Wistar大鼠随机分为5组, 对照组(A组)、大量饮酒4 d(B组)、大量饮酒4 d后戒断1 d(C组)、大量饮酒4 d后戒断2 d(D组)、大量饮酒4 d后戒断7 d(E组), 每组6只。B、C、D、E组大鼠大量灌胃给予乙醇4 d, 乙醇浓度为25% W/V, 每8小时灌胃1次, 连续4 d; A组给予等体积蒸馏水。采用Y迷宫实验评价大鼠的空间工作记忆能力; 以高效液相-电化学法(HPLC-ECD)检测大鼠脑脊液及前额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质、海马脑区内细胞内VC含量, 免疫印迹法检测大鼠各脑区内SVCT2蛋白水平的变化。**结果** (1)Y迷宫实验: C、D组大鼠自发交替反应率分别为 $(24.64 \pm 15.11)\%$ 和 $(41.48 \pm 13.01)\%$, 均显著低于A组 $[(75.47 \pm 8.61)\%]$; E组大鼠的自发交替反应率恢复接近正常 $[(61.64 \pm 11.51)\%]$, 与A组差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2)脑脊液内VC含量: B组大鼠脑脊液内VC含量为 $(204.54 \pm 25.51) \mu\text{mol/L}$, 显著高于A组 $[(145.57 \pm 18.98) \mu\text{mol/L}]$, 而C、D组大鼠脑脊液内VC水平 $[(90.24 \pm 15.45)$ 、 $(86.93 \pm 14.53) \mu\text{mol/L}]$ 明显低于A、B组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$); E组大鼠脑脊液中VC含量 $[(135.80 \pm 17.16) \mu\text{mol/L}]$ 与A组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。(3)各脑区内VC水平: B组前额叶皮质、顶叶皮质、海马脑区脑组织匀浆(细胞内)VC水平变化趋势相同 $[(1.18 \pm 0.13)$ 、 (1.14 ± 0.12) 、 $(1.20 \pm 0.20) \mu\text{mol/g}]$, 均显著低于A组 $[(1.64 \pm 0.11)$ 、 (1.62 ± 0.13) 、 $(2.06 \pm 0.27) \mu\text{mol/g}]$; C组在乙醇戒断后, 前额叶皮质、顶叶皮质、海马脑区细胞内VC水平 $[(1.20 \pm 0.29)$ 、 (1.05 ± 0.06) 、 $(1.21 \pm 0.15) \mu\text{mol/g}]$ 有所恢复, 但仍明显低于A组(均 $P < 0.01$); C组大鼠颞叶皮质细胞内VC水平 $[(1.37 \pm 0.04) \mu\text{mol/g}]$ 显著高于顶叶皮质($P < 0.05$); D组各脑区细胞内VC水平均有回升趋势, 前额叶皮质细胞内VC水平显著高于顶叶皮质 $[(1.63 \pm 0.24) \mu\text{mol/g}]$ 比 $(1.26 \pm 0.16) \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$; E组前额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质、海马区细胞内VC水平 $[(1.72 \pm 0.19)$ 、 (1.43 ± 0.22) 、 (1.67 ± 0.19) 、 $(1.86 \pm 0.22) \mu\text{mol/g}]$ 均较B组显著升高(均 $P < 0.01$), 逐渐恢复至正常水平, 海马区VC水平显著高于顶叶皮质($P < 0.05$)。(4)Western blot结果显示, 与A组比较, B、C、D组大鼠前额叶皮质、顶叶皮质及C、D、E组大鼠海马区的SVCT2蛋白均显著升高(均 $P < 0.05$)。**结论** 大量饮酒4 d可致大鼠脑损伤, 乙醇干预后大鼠脑脊液中及各脑区脑组织匀浆中VC水平呈现负相关的变化过程, 此过程中SVCT2蛋白表达上调, 这将有助于脑脊液内的VC被转运至各脑区神经元内发挥抗氧化作用。

【关键词】 维生素C; 维生素C转运体2; 饮酒; 大脑皮层; 海马

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(H2017079); 国家自然科学基金青年项目(81803757)

Effects of binge drinking ethanol and ethanol withdrawal on vitamin C levels in rat brain Tian Hua, Liu Fu, Yang Hongyan, Song Juan, Yuan Jiaxin, Zhang Qi, Bai Qingyang, Cui Hongxia
Department of Basic Medicine, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China (Tian H, Liu F); Department of pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China (Tian H, Yang HY, Song J, Yuan JX, Zhang Q, Cui HX); School of Basic Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China (Liu F); Department of Pathology, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China (Bai QY)
Corresponding author: Tian Hua, Email: tianhua0912@163.com

【Abstract】 Objective To study the changes of vitamin C (VC) levels and sodium vitamin C transporter 2 (SVCT2) protein levels in cerebrospinal fluid (CSF) and important brain regions of rats after 4 days of binge drinking and ethanol withdrawal. **Methods** A total of 30 healthy wistar rats were randomly divided into 5 groups: control group (Group A), binge drinking for 4 days (Group B), withdrawal 1 day after 4-day binge drinking (Group C), withdrawal 2 days after 4-day binge drinking (Group D), withdrawal 7 days after 4-day binge drinking (group E). There were 6 rats in each group. Rats in group B, C, D and E were given ethanol by gavage for 4 days at a concentration of 25% W/V and gavage once every 8 hours for 4 days. Group A was given equal-volume distilled water. Y maze experiment was used to evaluate the spatial working memory of rats. The concentration of intracellular VC in cerebrospinal fluid, prefrontal cortex, parietal cortex, temporal cortex and hippocampus of rats in each group was detected by HPLC combined with electrochemical detector (HPLC-ECD), and the protein level of SVCT2 in each brain area of rats was detected by Western blotting. **Results** In the Y maze experiment, the rate of spontaneous response alternations of rats in group C and D was $(24.64 \pm 11.51)\%$ and $(41.48 \pm 13.01)\%$, respectively, which were significantly lower than that in group A $(75.47 \pm 8.61)\%$. The rate of spontaneous response alternations of rats in group E $(61.64 \pm 15.11)\%$ was close to normal, and there is no statistically significant difference between group E and group A ($P < 0.05$). The content of VC in CSF of rats in group B was $(204.54 \pm 25.51) \mu\text{mol/L}$, which was significantly higher than that in group A $(145.57 \pm 18.98) \mu\text{mol/L}$. The CSF VC levels in group C and group D were $(90.24 \pm 15.45) \mu\text{mol/L}$ and $(86.93 \pm 14.53) \mu\text{mol/L}$, respectively, lower than those in group A and group B, and the differences were statistically significant ($P < 0.001$). The CSF VC level of group E was $(135.80 \pm 17.16) \mu\text{mol/L}$. There was no significant difference in the content of VC in CSF between group A and group E ($P < 0.05$). The VC levels in brain tissue homogenates (intracellular) in prefrontal cortex, parietal cortex and hippocampus showed the same trend in group B, which were $(1.18 \pm 0.13) \mu\text{mol/g}$, $(1.14 \pm 0.12) \mu\text{mol/g}$, $(1.20 \pm 0.20) \mu\text{mol/g}$, respectively, and were all significantly lower than those in group A [$(1.64 \pm 0.11) \mu\text{mol/g}$, $(1.62 \pm 0.13) \mu\text{mol/g}$, $(2.06 \pm 0.27) \mu\text{mol/g}$]. The VC levels in brain tissue homogenates (intracellular) in prefrontal cortex, parietal cortex and hippocampus of group C after ethanol withdrawal [$(1.20 \pm 0.29) \mu\text{mol/g}$, $(1.05 \pm 0.06) \mu\text{mol/g}$, $(1.21 \pm 0.15) \mu\text{mol/g}$, respectively] recovered to some extent, but still significantly lower than those of group A ($P < 0.01$). In group C, the level of VC in temporal cortex [$(1.37 \pm 0.04) \mu\text{mol/g}$] was significantly higher than that in parietal cortex ($P < 0.05$). In group D, the level of VC in all brain regions increased, and the level of VC in prefrontal cortex was significantly higher than that in parietal cortex [$(1.63 \pm 0.24) \mu\text{mol/g}$ vs $(1.26 \pm 0.16) \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$]. The levels of VC in prefrontal cortex, parietal cortex, temporal cortex and hippocampus in group E were $(1.72 \pm 0.19) \mu\text{mol/g}$, $(1.43 \pm 0.22) \mu\text{mol/g}$, $(1.67 \pm 0.19) \mu\text{mol/g}$ and $(1.86 \pm 0.22) \mu\text{mol/g}$, respectively, significantly higher than those in group B (all $P < 0.01$), and gradually returned to normal level. The level of VC in hippocampus was significantly higher than that in parietal cortex ($P < 0.05$). Western blot results showed that compared with group A, the protein of SVCT2 in prefrontal cortex, parietal cortex of group B, group C and group D, and in hippocampus of group C, group D and group E was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Binge drinking for 4 days can cause brain damage in rats. The VC level in CSF and brain tissue homogenates of each brain region present a negative correlation dynamic change process after ethanol treatment. During ethanol treatment process, the expression of SVCT2 protein is up-regulated, which will help the VC in the CSF to be transported to the neurons in each brain region to play an antioxidant role.

【Key words】 Vitamin C; Vitamin C transporter 2; Alcohol drinking; Cerebral cortex; Hippocampus

Fund programs: Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (H2017079); The Youth Program of National Natural Science Foundation of China (81803757)

酗酒和酒精中毒对中枢神经系统的影响成了国际关注的焦点之一。大鼠大量饮酒4 d模型模拟了酗酒者短期大量饮酒造成的中枢神经系统损伤,是常用的乙醇导致神经退行性病变的模型之一,被称为亚慢性乙醇脑损伤模型^[1]。前期研究显示,大鼠大量饮酒4 d后,大鼠前额皮质出现大量坏死神经元、氧化应激产物4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)水平显著升高,提示短期大量摄入乙醇导致的亚慢性乙醇脑损伤机制与氧化应激密切相关^[1-2]。

维生素C(Vitamin C, VC),又名抗坏血酸(ascorbic

acid, AA),是脑内重要的抗氧化剂,其转运体钠依赖性VC转运体2(sodium-dependent Vitamin C transporter 2, SVCT2)是VC进入神经元的重要途径^[3]。文献报道,急性腹腔注射乙醇可促进小鼠伏隔核及纹状体脑区VC的释放,脑区透析液中VC含量的增加与羟自由基水平呈现负相关^[4]。而短期大量饮酒对脑内VC水平及其转运体SVCT2的影响尚不明确。本实验主要检测大量饮酒4 d及戒断后大鼠脑脊液中、各重要脑区(前额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质及海马区)细胞内VC水平及SVCT2表达的变化情况。

材料与方法

1. 材料: (1) 动物: 健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 200 ~ 250 g, 购于辽宁长生生物科技有限公司。动物许可证号: SCXK(辽)2015-001。(2) 药品与试剂: 无水乙醇、甲醇、偏磷酸购于天津市天力试剂有限公司; VC 标准品购于美国 sigma 公司; 乙二胺四乙酸二钠、四丁基溴化铵、氯化钠购于天津市博迪化工有限公司; SVCT2 抗体、 β -actin 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L) 及辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L) 购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA) 总蛋白质裂解液、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA) 蛋白测定试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司; 电化学发光(electro-chemi-luminescence, ECL) 试剂购于北京康为世纪生物科技有限公司。(3) 仪器: 大鼠 Y 迷宫(臂长为 45 cm, 高为 25 cm, 底部宽为 15 cm, 三臂交汇处为等边三角形), 自制; 高效液相色谱仪(日本津岛公司), ODSC18 色谱柱(迪马科技公司), 超声破碎机(宁波新芝生物科技公司), 低温超速微量离心机(Thermo scientific 公司), PowerPac HC Power Supply 高电流电泳仪电源、Mini-PROTEAN Tetra cell 小型垂直电泳槽购自 Bio-Rad 公司等。

动物伦理: 实验动物伦理问题已经齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会讨论批准, 伦理编号: (齐) 伦审 [2018] 40 号。

2. 亚慢性乙醇脑损伤模型建立^[1-2, 5]: 取正常健

康雄性 Wistar 大鼠 30 只, 昼夜日光节律, 自由摄食水, 适应 3 d 后, 根据随机单位组设计分组法分为 5 组, 对照组(A 组)、大量给予乙醇 4 d(B 组)、大量饮酒 4 d 后戒断 1 d(C 组)、大量饮酒 4 d 后戒断 2 d(D 组)、大量饮酒 4 d 后戒断 7 d(E 组), 每组 6 只。B ~ E 组大鼠灌胃给予乙醇(25% W/V, 5 g/kg), 每 8 小时灌胃 1 次, 每天 3 次, 连续 4 d。A 组给予等体积纯净水, 见表 1。各组大鼠在相应干预后进行行为学检测后, 麻醉取材。

3. Y 迷宫实验评估大鼠空间工作记忆能力^[6]: 在 Y 迷宫底部铺一层新鲜垫料(厚约 1 cm), 并在每只大鼠检测结束后及时更换。大鼠随机背对迷宫被放到迷宫中央的三角形区域, 开始计时, 让大鼠在 Y 迷宫中自由探索 3 min, 记录每只大鼠的进臂总次数和进臂顺序并进行计算。自发交替反应数为大鼠依次连续进入 Y 迷宫全部 3 个臂 1 次的次数, 自发交替反应率(%)=(实际自发交替反应数/可能的最大自发交替反应数) × 100%, 可能的最大自发交替反应数=进臂总次数-2。

4. 大鼠脑脊液的收集^[7]: 大鼠腹腔注射 10% 氨基甲酸乙酯后, 脑立体定位仪固定, 在枕骨大孔处剪开; 皮肤, 钝性分离肌肉, 暴露枕骨大孔。将 1 ml 注射器针尖稍弯曲轻轻刺穿脑膜, 收集到无色至淡黄色的脑脊液约 0.1 ml。取一定体积脑脊液, 加入等体积 8% 偏磷酸, 静置 5 min, 4 °C 以 12 000 r/min ($r=8.4$ cm) 离心 1 min, 取上清后流动相 10 倍稀释, 立即检测 VC 含量。

5. 大鼠脑组织匀浆液的收集^[8]: 收集完脑脊液

表 1 实验动物分组及实验处理流程

实验时间	实验分组				
	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
第 1 天	-	-	-	-	乙醇
第 2 天	-	-	-	-	乙醇
第 3 天	-	-	-	-	乙醇
第 4 天	-	-	-	-	乙醇
第 5 天	-	-	-	-	-
第 6 天	-	-	-	乙醇	-
第 7 天	-	-	乙醇	乙醇	-
第 8 天	蒸馏水	乙醇	乙醇	乙醇	-
第 9 天	蒸馏水	乙醇	乙醇	乙醇	-
第 10 天	蒸馏水	乙醇	乙醇	-	-
第 11 天	蒸馏水	乙醇	-	-	-
第 12 天	1. 行为学检测 2. 收集脑脊液 3. 取脑组织	1. 收集脑脊液 2. 取脑组织	1. 行为学检测 2. 收集脑脊液 3. 取脑组织	1. 行为学检测 2. 收集脑脊液 3. 取脑组织	1. 行为学检测 2. 收集脑脊液 3. 取脑组织

注: 给药方式为灌胃; 乙醇为 25% W/V, 5 g/kg, 每 8 小时灌胃 1 次, 每天 3 次; “-” 为无处理, 实验全过程大鼠自由饮食饮水

后断头取脑,分离各皮质/海马脑区,称取一定重量的脑组织,加入9倍体积的8%偏磷酸超声破碎,冰上静置5 min,4℃下以12 000 r/min离心15 min,取上清后流动相10倍稀释,立即测定VC含量。

6. VC的含量测定^[8]:精密吸取样品20 μl,直接注入HPLC-ED系统对VC含量进行检测。VC含量计算采用外标法。检测条件如下:色谱柱ODS C18,150 mm×4.6 mm,5 μm;流动相中含有155.6 mmol/L氯化钠、0.54 mmol/L乙二胺四乙酸二钠、1.5 mmol/L四丁基溴化铵,水为溶剂。流速为1.0 ml/min,柱温:25℃,检测波长:245 nm,电化学检测器工作电压:+0.70V。

7. 免疫印迹法检测大鼠大脑皮质、海马脑区内SVCT2蛋白水平:称量一定重量的大鼠皮质/海马区组织,加入适当体积的RIPA裂解液,匀浆,4℃下以12 000 r/min转速离心15 min,离心后取上清液,用BCA试剂盒测定蛋白浓度,随后加入5×上样缓冲液,沸水中变性,随后进行电泳、转膜、封闭液封闭并加兔抗SVCT2抗体(1:500)、小鼠抗β-actin(1:500),4℃孵育过夜;次日洗膜,用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:5 000),羊抗小鼠IgG(1:5 000)室温孵育1 h,再次洗膜后ECL化学发光显影、定影,阅片,利用Image-J软件分析目的条带灰度值,以β-actin为内参,计算目的蛋白SVCT2与内参蛋白灰度值比值,得到目的蛋白相对表达水平。

8. 统计学方法:采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同组间计量资料比较采用单因素方差分析后,采用Tukey's HSD test分析方法比较各两组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 大量饮酒4 d及乙醇戒断后大鼠空间学习记忆能力的影响:在大量饮酒致大鼠脑损伤模型中,大量饮酒1~4 d,大鼠因大量摄入乙醇而处于醉酒状态,故B组大鼠不能进行行为学检测。在Y迷宫实验中,各组大鼠进臂总次数差异无统计学意义($P > 0.05$);而C、D组大鼠的自发交替反应率均显著低于A组(均 $P < 0.01$),E组大鼠的自发交替反应率恢复接近正常,显著高于C组,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表2。

2. 大量饮酒及戒断后大鼠脑脊液及大脑皮质、海马脑区内VC水平的变化:(1)VC的标准曲线:见图1。在本实验条件下,VC标准品在5.0~100 ng之间与峰面积线性关系良好, $y=359\ 046x+3\ 825.5$,相

表2 大量饮酒对大鼠空间学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$)

动物分组	动物数(只)	进臂总次数(次/3 min)	自发交替反应率(%)
A组	6	15.50 ± 2.51	75.47 ± 8.61
C组	6	12.88 ± 3.44	24.64 ± 15.11 ^a
D组	6	13.63 ± 3.34	41.48 ± 13.01 ^a
E组	6	15.25 ± 3.41	61.64 ± 11.51 ^b
F值		1.26	26.43
P值		> 0.05	< 0.01

注:A组为对照组,给予等体积纯净水;B组大鼠大量给予乙醇4 d,经灌胃给予乙醇(25% W/V,5 g/kg),每8小时灌胃1次,每天3次,连续4 d;C组大鼠大量饮酒4 d后戒断1 d;D组大鼠大量饮酒4 d后戒断2 d;E组大鼠大量饮酒4 d后戒断7 d;与A组比较,^a $P < 0.01$;与C组比较,^b $P < 0.01$

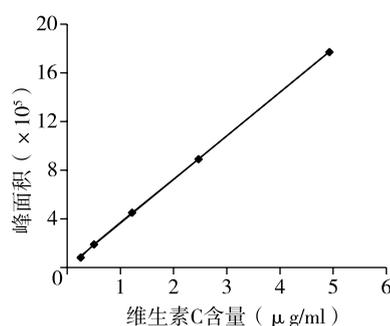


图1 维生素C含量与色谱峰面积的线性关系

关系数 $r=0.999\ 9$,可用于定量分析脑脊液及各脑区匀浆液中VC的含量。(2)大量饮酒4 d及戒断后大鼠脑脊液中VC水平的变化:见表3。B组大鼠脑脊液内VC含量显著高于A组($P < 0.001$),而C、D大鼠脑脊液内VC水平迅速下降,显著低于A组及B组大鼠脑脊液内VC水平(均 $P < 0.001$),E组大鼠脑脊液中VC水平与A组相近($P > 0.05$),但仍显著低于B组($P < 0.001$)。 (3)大量乙醇4 d及戒断后大鼠大脑前额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质及海马脑区内VC水平的变化:见表4。A组大鼠前额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质脑组织匀浆中VC基础水平非常相近,海马区VC基础水平显著高于大脑皮质($P < 0.01$)。B组大鼠前额叶皮质、顶叶皮质、海马脑区细胞内VC水平变化趋势相同,较A组相应脑区内VC水平均显著下降(均 $P < 0.01$),而颞叶皮质脑区细胞内VC水平较A组有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);C组在乙醇戒断后,前额叶皮质、顶叶皮质、海马脑区细胞内VC水平有所恢复,但仍明显低于A组(均 $P < 0.01$),C组大鼠颞叶皮质细胞内VC水平显著高于顶叶皮质($P < 0.05$);D组各脑区细胞内VC水平均有回升趋势,前额叶皮质细胞内VC水平显著高于顶叶皮质($P < 0.05$);E组各脑区

表3 大量饮酒4 d及戒断后大鼠脑脊液中维生素C水平($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	维生素C水平
A组	6	145.57 ± 18.98
B组	6	204.54 ± 25.51 ^a
C组	6	90.24 ± 15.45 ^{ab}
D组	6	86.93 ± 14.53 ^{ab}
E组	6	135.80 ± 17.16 ^b
F值		39.45
P值		<0.001

注: A组为对照组, 给予等体积纯净水; B组大鼠大量给予乙醇4 d, 经灌胃给予乙醇(25% W/V, 5 g/kg), 每8小时灌胃1次, 每天3次, 连续4 d; C组大鼠大量饮酒4 d后戒断1 d; D组大鼠大量饮酒4 d后戒断2 d; E组大鼠大量饮酒4 d后戒断7 d; 与A组比较, ^a $P < 0.001$; 与B组比较, ^b $P < 0.001$

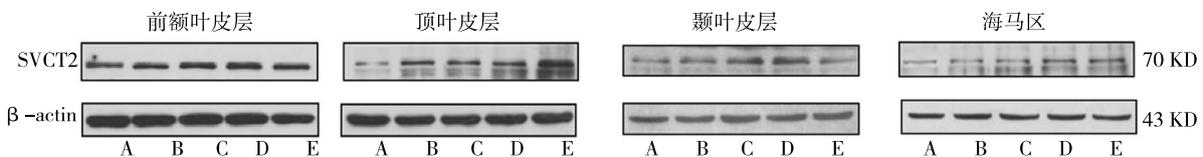
细胞内VC水平均较B组显著升高(均 $P < 0.01$), 逐渐恢复至正常水平, 海马区VC水平显著高于顶叶皮质($P < 0.05$)。

3. 大量饮酒及戒断后大鼠大脑各脑区内SVCT2蛋白水平的变化: 见图2, 表5。与A组比较, B组大鼠前额叶皮质、顶叶皮质及颞叶皮质的SVCT2蛋白均显著升高(均 $P < 0.05$), 而海马区SVCT2蛋白表达水平有升高趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 与B组比较, C、D、E组大鼠各皮质的SVCT2蛋白水平变化不显著, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表4 大量饮酒4 d及戒断后各组大鼠各脑区内维生素C水平($\mu\text{mol/g}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	前额叶皮质	顶叶皮质	颞叶皮质	海马区	F值	P值
A组	6	1.64 ± 0.11 ^a	1.62 ± 0.13 ^a	1.47 ± 0.12 ^a	2.06 ± 0.27	13.44	< 0.01
B组	6	1.18 ± 0.13 ^b	1.14 ± 0.12 ^b	1.23 ± 0.04	1.20 ± 0.20 ^b	0.533	> 0.05
C组	6	1.20 ± 0.29 ^b	1.05 ± 0.06	1.37 ± 0.04 ^d	1.21 ± 0.15 ^b	3.810	< 0.05
D组	6	1.63 ± 0.24 ^c	1.26 ± 0.16 ^{bc}	1.47 ± 0.26	1.43 ± 0.10 ^b	3.494	< 0.05
E组	6	1.72 ± 0.19 ^c	1.43 ± 0.22 ^c	1.67 ± 0.19 ^c	1.86 ± 0.22 ^{cd}	4.603	< 0.05
F值		9.83	15.54	6.23	23.87		
P值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01		

注: A组为对照组, 给予等体积纯净水; B组大鼠大量给予乙醇4 d, 经灌胃给予乙醇(25% W/V, 5 g/kg), 每8小时灌胃1次, 每天3次, 连续4 d; C组大鼠大量饮酒4 d后戒断1 d; D组大鼠大量饮酒4 d后戒断2 d; E组大鼠大量饮酒4 d后戒断7 d; 与海马区比较, ^a $P < 0.01$; 与A组比较, ^b $P < 0.01$; 与B组比较, ^c $P < 0.01$; 与顶叶皮质比较, ^d $P < 0.05$; 与前额叶皮质比较, ^e $P < 0.05$



注: A组为对照组, 给予等体积纯净水; B组大鼠大量给予乙醇4 d, 经灌胃给予乙醇(25% W/V, 5 g/kg), 每8小时灌胃1次, 每天3次, 连续4 d; C组大鼠大量饮酒4 d后戒断1 d; D组大鼠大量饮酒4 d后戒断2 d; E组大鼠大量饮酒4 d后戒断7 d; SVCT2 钠依赖性维生素C转运体2

图2 大量饮酒4 d及戒断后各组大鼠大脑皮质、海马脑区内SVCT2蛋白免疫印迹检测结果

讨 论

乙醇可诱导氧化应激, 在发育早期暴露于乙醇会导致神经细胞死亡, 从而导致多种神经系统疾病^[9-10]。前期研究结果已证实, 短期大量给予乙醇可导致大鼠前额叶皮质出现大量坏死神经元, 氧化应激水平显著升高, 造成大鼠出现不同程度的脑损伤^[2, 6]。Y迷宫主要应用于动物的辨别性学习、工作记忆的测试, 进入各臂的次数及正确次数可反映出实验动物的空间记忆能力。本实验Y迷宫结果显示, 大量给予乙醇4 d组及乙醇戒断后1、2 d组大鼠的自发交替反应正确率均显著低于对照组大鼠, 说明大量给予乙醇4 d可致大鼠脑损伤, 表现为空间记忆能力的下降, 提示大量给予乙醇4 d诱导脑损伤模型建立成功。

在哺乳动物组织中, 中枢神经系统的神经元内的VC含量最高, 以毫摩尔浓度存储在脑细胞中, 参与神经元的多种生理功能, 而脑组织匀浆中维VC含量主要反映细胞内VC的水平^[3]。文献报道, VC可通过抑制氧自由基活性氧生成、核因子κB活化及神经炎症反应等方面对抗乙醇诱导的神经退行性病变^[11-12], 同时VC还可以改善急性乙醇摄入颅脑损伤后继发性脑损伤大鼠的神经功能^[13]。课题组前期结果显示, 大鼠大量摄取乙醇可导致前额叶皮质内VC含量显著降低^[1], 但对正常大鼠不同脑区

表5 大量饮酒4 d及戒断后各组大鼠脑组织中SVCT2蛋白相对表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	前额叶皮质	顶叶皮质	颞叶皮质	海马区
A组	3	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.19
B组	3	1.95 ± 0.27 ^a	2.82 ± 0.20 ^b	1.81 ± 0.33 ^a	1.56 ± 0.15
C组	3	1.90 ± 0.36 ^a	3.25 ± 0.71 ^b	1.69 ± 0.13	1.95 ± 0.11 ^b
D组	3	1.89 ± 0.37 ^a	2.97 ± 0.05 ^b	1.99 ± 0.15 ^b	2.21 ± 0.24 ^b
E组	3	1.77 ± 0.17	3.50 ± 0.81 ^b	1.34 ± 0.41	2.13 ± 0.37 ^b
F值		5.74	15.43	6.99	14.01
P值		<0.05	<0.01	<0.05	<0.01

注:A组为对照组,给予等体积纯净水;B组大鼠大量给予乙醇4 d,经灌胃给予乙醇(25% W/V, 5 g/kg),每8小时灌胃1次,每天3次,连续4 d;C组大鼠大量饮酒4 d后戒断1 d;D组大鼠大量饮酒4 d后戒断2 d;E组大鼠大量饮酒4 d后戒断7 d;SVCT2 钠依赖性VC转运体2,与A组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

及大量饮酒后大鼠其他脑区内VC水平的影响尚不明确。本研究结果显示,正常大鼠前额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质脑组织匀浆中VC基础水平非常相近,海马区VC基础水平显著高于大脑皮质,这可能与海马区神经元密度较高,以大椎体细胞为主有关;大鼠大量饮酒4 d时,大脑皮质(前额叶皮质、顶叶皮质、颞叶皮质)及海马区细胞内VC水平显著降低,提示乙醇诱导脑损伤过程中,细胞内抗氧化物VC可能被大量消耗或被释放至细胞间隙发挥对抗乙醇诱导的氧化应激的作用^[14];乙醇戒断1 d时细胞内VC水平仍进一步下降,这可能与乙醇末次给药后24 h内,乙醇代谢为乙醛后进一步消耗细胞内的VC有关,而在乙醇戒断2 d时细胞内VC水平有所回升,至戒断7 d时,各脑区细胞内的VC含量恢复近至正常水平,这可能与大鼠具有强大的自我修复能力,改善脑内氧化应激状态有关^[15]。实验过程中,大量饮酒4 d时各脑区间细胞内VC水平无显著性差异,而乙醇戒断后1、2、7 d脑区间细胞内VC水平恢复过程却出现差异,这可能与各脑区在乙醇致脑损伤后防御能力以及内源性自我修复能力不同有关^[16]。

与大脑皮质及海马区不同,大量饮酒4 d时大鼠脑脊液中的VC水平显著增加,这可能与脉络丛内皮细胞从外周摄取的VC增加^[17],也可能是由于乙醇可诱导星型胶质细胞释放的内源性VC增加^[18]。然而,乙醇戒断1 d时,大鼠脑脊液中VC水平迅速下降,而大脑皮质及海马区脑组织匀浆中的VC水平开始回升,在戒断7 d时,脑脊液内及大脑皮质、海马区内的VC含量恢复近至正常水平,这可能由于乙醇戒断后脑脊液中的VC被大量消耗,更有可能被迅速转运至细胞内。因此,本研究检测了各组大鼠重要脑区(皮质及海马区)内的SVCT2蛋白表

达水平,结果显示,大量饮酒4 d时及戒断后1、2、7 d时,大鼠各皮质及海马脑区的SVCT2蛋白表达均上调,这将有利于将脑脊液中的VC转运至细胞内。SVCT2蛋白主要在神经元高表达,是神经元细胞外VC被转运进入细胞内的主要途径,本课题组前期研究已经利用SVCT2 siRNA使原代培养的大鼠皮质神经元下调SVCT2基因,证实SVCT2表达下调可导致神经元细胞内VC水平显著下降^[2],SVCT2在神经元对抗氧化应激损伤过程中发挥重要作用^[2],故本实验并未再次检测SVCT2表达下调对细胞内VC水平的影响。

综上,大量饮酒4 d及乙醇戒断后大鼠脑脊液中VC水平与各重要脑区细胞内VC水平呈现负相关,各脑区SVCT2表达上调,这有助于转运VC进入神经元从而发挥神经保护作用,这可能是机体的自我防御机制之一,研发可调控SVCT2的靶向药物,有可能成为防治大量饮酒致脑损伤的有效药物,这也是我们今后的研究方向之一。大鼠大量饮酒后机体的自我防御机制十分复杂,进一步寻找机体对抗乙醇的自我防御因子对于提高机体的防御能力至关重要,这将为临床上防治大量饮酒致脑损伤的治疗提供新的防治思路。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计为田华;研究实施、资料收集、数据处理为田华、刘富、张奇、杨宏艳、宋娟、崔红霞;文献调研与整理为刘富、苑家鑫,论文撰写、修订为田华、刘富、杨宏艳,田华、崔红霞审校

参 考 文 献

- [1] Yang JY, Xue X, Tian H, et al. Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 144(3): 321-337. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.07.002.
- [2] Tian H, Ye XX, Hou XJ, et al. SVCT2, a potential therapeutic

- target, protects against oxidative stress during ethanol-induced neurotoxicity via JNK/p38 MAPKs, NF- κ B and miRNA125a-5p[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 96: 362-373. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.039.
- [3] May JM. Vitamin C transport and its role in the central nervous system[J]. *Subcell Biochem*, 2012, 56: 85-103. DOI: 10.1007/978-94-007-2199-9_6.
- [4] Huang M, Liu W, Li Q, et al. Endogenous released ascorbic acid suppresses ethanol induced hydroxyl radical production in rat striatum[J]. *Brain Res*, 2002, 944(1/2): 90-96. DOI: 10.1016/S0006-8993(02)02722-1.
- [5] Obernier JA, Bouldin TW, Crews FT. Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002, 26(4): 547-557. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02573.x.
- [6] 郭海明, 朱梦媛, 申会涛, 等. 葛根素通过抗氧化应激对亚慢性乙醇脑损伤大鼠的神经保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(14): 1612-1615. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.14.008.
- Guo HM, Zhu MY, Shen HT, et al. Protective effect of puerarin on the sub-chronic ethanol induced brain injury through resisting oxidative stress in rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2018, 34(14): 1612-1615.
- [7] Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, et al. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system[J]. *J Neurosci Methods*, 2009, 178(1): 116-119. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.12.001.
- [8] Pachla LA, Kissinger PT. Analysis of ascorbic acid by liquid chromatography with amperometric detection[J]. *Methods Enzymol*, 1979, 62: 15-24. DOI: 10.1016/0076-6879(79)62183-3.
- [9] Wang YC, Wang X, Li H, et al. Binge ethanol exposure induces endoplasmic reticulum stress in the brain of adult mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 356: 172-181. DOI: 10.1016/j.taap.2018.08.006.
- [10] Matthew GL, Phillip M, Nicole H, et al. Binge drinking in male adolescent rats and its relationship to persistent behavioral impairments and elevated proinflammatory/proapoptotic proteins in the cerebellum[J]. *Psychopharmacology*, 2020, 237(5): 1305-1315. DOI: 10.1007/s00213-020-05458-3.
- [11] Peng Y, Kwok KH, Yang PH, et al. Ascorbic acid inhibits ROS production, NF-kappa B activation and prevents ethanol-induced growth retardation and microencephaly[J]. *Neuropharmacology*, 2005, 48(3): 426-434. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.10.018.
- [12] Naseer MI, Ullah N, Ullah I, et al. Vitamin C protects against ethanol and PTZ-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat hippocampal neurons[J]. *Synapse*, 2011, 65(7): 562-571. DOI: 10.1002/syn.20875.
- [13] 伍宵, 高飞, 董金千, 等. 维生素 C 在急性大剂量乙醇摄入后颅脑损伤中作用的研究[J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2020, 6(2): 105-109. DOI: 10.3877/ema.j.issn.2095-9141.2020.02.009.
- Wu X, Gao F, Dong JQ, et al. Effect of vitamin C for the pre-injury high ethanol intake in rats following traumatic brain injury[J]. *Chin J Neurotrauma Surg (Electronic Edition)*, 2020, 6(2): 105-109.
- [14] Ashfaq A, Shahid AS, Haroon B, et al. Neuroprotection by vitamin C against ethanol-induced neuroinflammation associated neurodegeneration in developing rat brain[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2016, 15(3): 360-370. DOI: 10.2174/1871527315666151110130139.
- [15] Kshitij SJ, Benjamin B. Prefrontal cortex development and emergence of self-regulatory competence: the two cardinal features of adolescence disrupted in context of alcohol abuse[J]. *Eur J Neurosci*, 2019, 50(3): 2274-2281. DOI: 10.1111/ejn.14316.
- [16] 孙九艳, 李昕, 刘光伟, 等. 大鼠不同脑区线粒体中 α -突触核蛋白含量与各种氧化和抗氧化指标的关系[J]. *首都医科大学学报*, 2011, 32(3): 361-364. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.2011.03.010.
- Sun JY, Li X, Liu GW, et al. Relationship between mitochondrial α -synuclein contents and oxidative stress levels in the rat brain[J]. *Journal of Capital Medical University*, 2011, 32(3): 361-364.
- [17] Ulloa V, Garcia-Robles M, Martinez E, et al. Human choroid plexus pillona cells efficiently transport glucose and vitamin C[J]. *J Neurochem*, 2013, 127(3): 403-414. DOI: 10.1111/jnc.12295.
- [18] Hou Y, Wu CF, Yang JY, et al. Ethanol similarly induces ascorbic acid release in the prefrontal cortex and striatum of freely moving mice[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2006, 126(8): 671-675. DOI: 10.1248/yakushi.126.671.

(收稿日期: 2020-10-18)

(本文编辑: 赵金鑫)