论著

文章编号:1000-5404(2005)24-2414-04

吗啡依赖和戒断大鼠脊髓内NA能神经元变化的研究

贺桂琼[1],孙善全[1],余会平[2],余维华[1],汪克建[1],梁益建[1] (重庆医科大学:[1]解剖学教研室,[2]附属第一医院精神科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨慢性吗啡处理及戒断后大鼠脊髓内NA能神经元的形态变化。**方法** 24只雄性SD大鼠随机分为吗啡依赖组、吗啡戒断组和生理盐水对照组,每组8只。依赖组大鼠以腹腔注射吗啡方法建立吗啡依赖模型。戒断组大鼠在依赖模型建立后于腹腔注射纳洛酮5 mg/kg诱导戒断症状,对照组大鼠注射等量生理盐水。注射24 h后取脑和脊髓作冰冻切片。利用免疫组化方法检测各组大鼠脊髓及LC内NA能神经元的变化。**结果** 正常组LC内DBH阳性细胞数为(98±17),吗啡依赖组和戒断组LC内DBH阳性细胞数分别为(212±20)和(229±27),明显高于正常组($P<0.01$),但平均灰度值无明显差异。慢性吗啡处理后脊髓前角DBH阳性神经元数量增多,染色加深,后角和侧角新增加大量阳性神经元,吗啡依赖组和戒断组DBH阳性神经元增加具有极显著意义($P<0.01$)。**结论** 慢性吗啡处理和戒断引起LC和脊髓内NA能神经元增多,提示NA与吗啡依赖和戒断的形成有关,其可能是吗啡依赖及戒断的分子机制之一。

关键词:吗啡依赖;吗啡戒断;去甲肾上腺素能神经元;免疫组化

中图法分类号:R322.81;R749.610.2;R996 **文献标识码**:A

Changes of noradrenergic neurons in the spinal cord of morphine-dependence and morphine-withdrawal rat

HE Gui-qiong[1], SUN Shan-quan[1], YU Hui-ping[2], YU Wei-hua[1], WANG Ke-jian[1], LIANG Yi-jian[1] ([1]Department of Anatomy, [2]Department of Psychiatry, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution, shape and number of noradrenergic neurons in the spinal cord of morphine-dependence and morphine-withdrawal rats. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into three groups ($n=8$ in each group). The rats in morphine-dependence group and morphine-withdrawal group were injected intraperitoneally with morphine for 6 d till morphine dependent model was established, while the rats in control group were injected with saline. The rats in morphine-withdrawal group were injected with 5 mg/kg naloxone to induce withdrawal syndromes. In 24 h after the last injection, the brain and spinal cord were removed and cut coronally into pieces. The changes of noradrenergic neurons were measured by immunohistochemical staining. **Results** The number of DBH-positive neurons in LC of control group was (98±17), while (212±20) and (229±27) respectively in morphine-dependence and morphine-withdrawal groups. More dark-stained noradrenergic neurons were found in anterior horn, while more appeared in posterior and lateral horn of spinal cord, as compared with control group. **Conclusion** The significant increase of noradrenergic neurons in LC and spinal cord following chronic morphine treatment and withdrawal indicates that NA was related to morphine-dependence and morphine-withdrawal syndrome, which may be involved in the molecular mechanism underlying morphine tolerance, dependence and withdrawal.

Key words: morphine dependence; abstinence; noradrenergic neuron; immunohistochemical staining

哺乳动物脊髓内广泛存在着去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)能神经纤维及终末。这些NA能神经纤维及终末的神经元胞体主要位于蓝斑核(locus coeruleus, LC)、蓝斑下核、KF核等。脊髓内下行的NA纤维及终末分布于整个脊髓节段的灰质,其末梢释放NA与相应的受体结合,参与痛觉、心血管功能和自主功能以及运动功能的调控等。有研究表明,中枢NA

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270437)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270437)

作者简介:贺桂琼(1972-),女,四川省成都市人,博士研究生,讲师,主要从事神经生物学方面的研究。电话:(023)68485763, E-mail: swguiqiong@yahoo.com.cn

通讯作者:孙善全,电话:(023)68485763, E-mail: sunsq2151@sohu.com

收稿日期:2005-02-25;**修回日期**:2005-05-01

能神经系统在绝大多数精神疾病（如情绪紊乱、慢性疼痛和阿片依赖等）的神经生物学特性方面也发挥重要的作用[1,2]。放射性自显影实验表明 LC 不仅含有大量的阿片受体，同时也是 NA 能神经元最多的神经核团[3]。LC 内 NA 能神经元活性的强弱在吗啡依赖和戒断形成过程中起关键作用[4-6]。纵观国内外大量关于吗啡依赖和戒断及 NA 有关的研究，大多数学者从电生理、生化和行为学实验来研究中枢 NA 能神经系统与吗啡依赖及戒断的关系，而对于吗啡依赖和戒断时脊髓内 NA 能神经元的形态变化却鲜有报道。本研究拟在建立吗啡依赖和戒断模型的基础上，运用形态学的方法研究在药物诱导的应激状态下大鼠脊髓内 NA 能神经元的变化。

1　材料与方法

1.1　主要材料

盐酸吗啡（morphine hydrochloride）：沈阳第一制药厂生产，批号：011201。盐酸纳络酮（naloxone hydrochloride）：由北京四环制药厂生产，批号：991206。兔抗 DBH 抗体由日本滋贺医科大学神经生物研究所馈赠；免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物公司；二氨基联苯胺（DAB）购自 Sigma 公司。

1.2　吗啡依赖模型的建立

1.2.1　实验动物及分组　雄性 Sprague-Dawley（SD）大鼠 24 只，体质量 200 ~ 250 g，由第三军医科大学实验动物中心提供。实验前均在安静的室温条件下适应性喂养 1 周，自由进食，饮水，自然昼夜节律光照。随机分为 3 组：吗啡依赖组、吗啡戒断组、正常对照组，每组 8 只。

1.2.2　吗啡依赖模型的建立方法　吗啡依赖模型参照文献[7]的方法建立。吗啡戒断组在吗啡依赖形成后（第 6 天，8 am）给予纳络酮 5 mg/kg，腹腔注射导致戒断症状的出现[8]。对照组给予与吗啡等体积的生理盐水及同体积的纳络酮，依赖组于同期给予与纳洛酮同体积的生理盐水。

1.2.3　戒断症状评分标准[9]　①跳跃、湿狗样抖动、扭体、摇头、打哈欠、扫尾、激惹（以尖叫为准），0 分 = 无；1 分 = 1 ~ 5 次；2 分 = 6 ~ 10 次；3 分 > 10 次。②齿颤、咀嚼（次与次之间至少间隔 30 s）：0 分 = 无；1 分 = 1 ~ 10 次；2 分 = 11 ~ 20 次；3 分 > 20 次。③流涎、流泪、毛直立、眼睑下垂、腹泻：0 分 = 无；1 分 = 轻度；2 分 = 中度；3 分 = 中度。

1.3　免疫组化染色

1.3.1　取材及制作光镜标本　2% 戊巴比妥钠（60 ~ 70 mg/kg）经腹腔麻醉大鼠，开胸暴露心脏，经左心室插管至升主动脉，剪开右心耳，用蠕动泵行左心室-升主动脉灌注动物：先用 0.01 mol/L PBS 液（pH 7.4，37 ℃）300 ml 快速冲洗血液，接着用含 4% 多聚甲醛、0.2% 苦味酸的 0.2 mol/L PB 液（pH 7.4，4℃）300 ml 作预固定。术毕，取出完整脑和脊髓，置固定液（含 4% 多聚甲醛、0.2% 苦味酸、0.25% 戊二醛）中固定 24 ~ 48 h（4 ℃），入 15% 蔗糖中脱水 24 ~ 48 h（4 ℃），待组织块脱水毕行冰冻切片。取 L_4 ~ T_9、$T_{8\text{-}1}$、$C_{8\text{-}1}$、作连续冠状切片，片厚 20 μm，每隔 40 μm 取 1 张切片，将不同节段的切片分别放入 PBST 液中。

1.3.2　免疫组化漂染（SABC-Ni 法）　将不同节段标本分别进行漂染。切片经 PBST 洗 3 次，1∶100 H_2O_2-甲醇 30 min，正常羊血清封闭 1 h（37 ℃）。兔抗 DBH（1∶3 000）24 ~ 48 h（4 ℃），1∶100 生物素酰化的Ⅱ抗 2 h，1∶50 链霉素-生物素-抗生物素-辣根过氧化酶复合物（SABC）1 h（室温），最后用 DAB-Ni 法呈色 3 ~ 5 min，0.05 mol/L Tris-HCl 终止反应。裱片、脱水、透明、封片，光镜下观察。组化过程中除正常血清外，均需 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗 10 min，3 次。

1.4　图像处理和统计学分析

随机选择 16 张包含脑干和脊髓前角、后角和侧角的切片，用全自动图像分析软件分别记录脑干和脊髓前角、后角和侧角的阳性神经元数目；同时进行灰度测定，分别选定脑干、脊髓前角、后角和侧角，去除背景后，记录相对灰度作为统计值。

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 统计软件行组间 t 检验。

2　结果

2.1　慢性吗啡处理对蓝斑核内 DBH 阳性神经元的影响

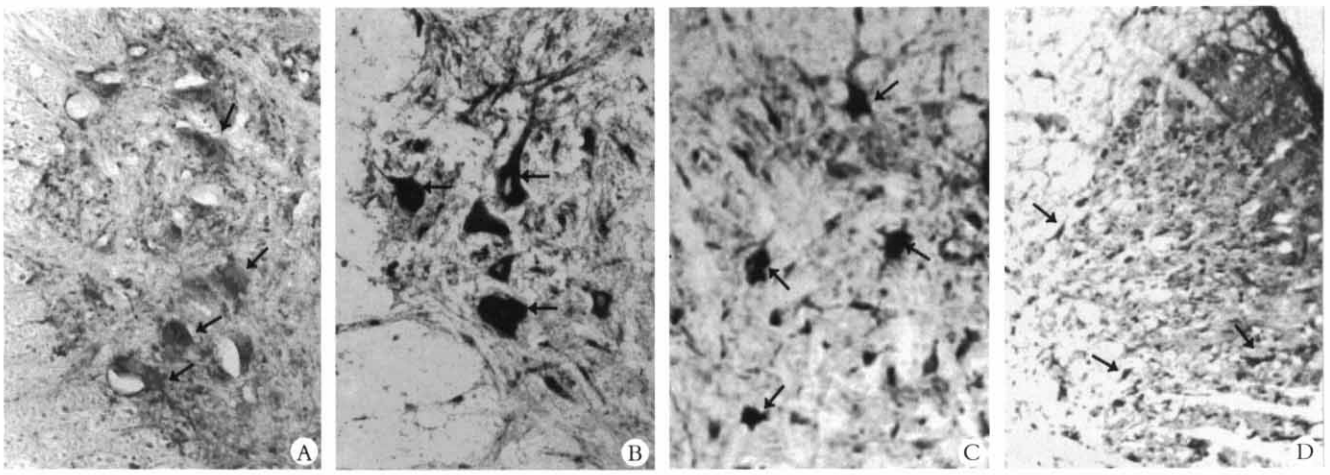
蓝斑核（locus coeruleus，LC）位于三叉神经中脑核内侧、第四脑室底与侧壁交界处室底灰质的腹外侧区。LC 分 4 个亚群：中央群、腹侧群、尾侧群和吻侧群，整个核团从面神经核平面一直延伸至中脑下丘平面尾侧。慢性吗啡处理后，正常对照组 LC 内 DBH 阳性神经元排列紧密，细胞间轮廓欠清，胞体呈圆形、卵圆形、多角形或不规则形，直径约 8 ~ 19 μm，为多极神经元，胞核居中，染色浅，大量突起伸向该核团的腹外侧，阳性神经元数量为（98 ± 17），平均灰度为（65 ± 16），吗啡依赖组和戒断组内 LC 内 DBH 阳性神经元的形态与正常组相似，数量为（212 ± 20），平均灰度为（61 ± 13），与正常组相比，阳性细胞数增加具有极显著意义（$P < 0.01$）；吗啡戒断组 LC 内 DBH 阳性神经元的形态和数量与依赖组相似，数量为（229 ± 27），平均灰度为（64 ± 15）。与正常组相比，慢性吗啡处理组 LC 内的 DBH 阳性神经元增加具有极显著意义（$P < 0.01$）。各组间相灰度值的变化无统计学意义（$P > 0.05$）。

2.2　慢性吗啡处理对脊髓内 DBH 阳性神经元的影响

2.2.1　正常对照组脊髓内的 DBH 阳性神经元　免疫组化结果显示，DBH 阳性纤维及终末广泛分布于整个脊髓节段的灰质，但主要集中在几个特殊区域：①后角浅层；②前角；③胸髓侧角；④中央管周围灰质；⑤脊髓各节段的前角内出现少量散在的阳性神经元，胞体大，呈卵圆形或三角形，直径 25 ~ 32 μm，淡染，轮廓欠清，这些阳性神经元主要位于前角底部或前角内侧核所在部位（图 1A）。

2.2.2　吗啡依赖组和戒断组脊髓内的 DBH 阳性神经元　慢性吗啡处理后，依赖组和戒断组脊髓灰质各层均出现染色深、形态各异的 DBH 阳性神经元，其中以灰质后角增加最显著。灰质后角：后角各层（如边缘层、胶状质层等）均有阳性神经元分布，神经元大小不等，以小神经元为主，直径 3 ~ 12 μm，呈卵圆形或三角形，为双极或多极神经元，染色深；侧角：在 T_1 ~ L_3 节段，两侧的中间带外侧柱均有散在的阳性神经元分布，

这些神经元胞体大小不等，直径 8 ~ 25 μm，呈圆形、卵圆形或不规则形，为双极或多极神经元；前角：出现少量 DBH 阳性神经元，胞体大，圆形或三角形，主要位于前角底部 22 ~ 37 μm（图 1B、C、D）。与正常组相比，慢性吗啡处理后脊髓内 DBH 阳性神经元增多及染色加深具有极显著意义。各组脊髓前角、后角、侧角内 DBH 阳性神经元数量及平均灰度值见表 1。



A: DBH-positive fibers and neurons in the anterior horn of spinal cord, and cell bodies are less dark-stained in control group; B: Dark-stained DBH-positive fibers and neurons are located in the anterior horn of spinal cord with large cell bodies in chronic morphine treatment group; C: Dark-stained DBH-positive fibers and neurons are located in the lateral horn of spinal cord with different shape and size of cell bodies in chronic morphine treatment group; D: Dark-stained DBH-positive fibers and neurons are located in the superficial layer of posterior horn of spinal cord with small cell bodies in chronic morphine treatment group

图 1 慢性吗啡处理后脊髓前角、侧角、后角内 DBH 阳性神经元胞体（↘）（DAB-Ni ×200）

Fig 1 DBH-positive neurons (↘) in the spinal cord of rat during chronic morphine treatment (DAB-Ni ×200)

表 1 大鼠脊髓灰质后角、侧角、前角内 DBH 阳性神经元数量及平均灰度（反映染色深浅）的变化

Tab 1 The number and average gray value of DBH-positive neurons in anterior, lateral and posterior horns of spinal cord of rats

Group	Sections	Posterior horn		Lateral horn		Anterior horn	
		Number	Average gray value	Number	Average gray value	Number	Average gray value
Control	16	0 ±0	0 ±0	0 ±0	0 ±0	7 ±3	178 ±15
Morphine-dependent	16	42 ±5 **	66 ±4 **	29 ±5 **	69 ±8 **	13 ±4 *	67 ±8 **
Morphine-withdrawal	16	45 ±7 **	65 ±5 **	31 ±4 **	65 ±6 **	12 ±5 *	69 ±7 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control group

3 讨论

吗啡是一种麻醉性镇痛药，在临床上长期应用，可致欣快感而依赖成瘾。随着吗啡及其化学合成衍生物海洛因的滥用，吗啡成瘾已成为全球关心的医学和社会问题。目前，对吗啡依赖和戒断的机制还没有完全认识，根治吗啡成瘾，仍是一大难题。近年来在对吗啡成瘾机制的研究中发现，吗啡耐受和依赖及吗啡戒断综合征的形成主要与多种神经递质系统有关，其中 NA 能神经递质系统在吗啡依赖和戒断的形成中起关键作用[4-6]。

哺乳动物中枢神经系统内广泛存在 NA 能神经系统的分布。研究表明 NA 能神经末梢释放的神经递质 NA，与其受体 α、β 结合后，参与痛觉、自主功能、运动功能的调近代，具有增强吗啡镇痛及针刺镇痛的作用等。中枢 NA 能神经元的胞体主要位于脑干 LC、蓝斑下核、KF 核等。LC 作为脑内最大的 NA 能神经核，是主要的阿片类依赖调控中枢之一，其下行投射纤维主要分布于脊髓，为中枢内下行抑制系统的主要组成部分，参与后角疼痛的抑制。大量电生理及生化实验结果显示，外源性吗啡可使脊髓和脑内 NA 释放增加，但是否会引起相应区域 NA 能神经元形态的改变尚少见报道。本研究在建立吗啡依赖和戒断模型的基础上，应用 NA 能神经元的标志酶——多巴胺 β 羟化酶（dopamine-β-hydroxylase, DBH）抗体作免疫组化结合图像分析等形态学的方法来研究慢性吗啡处理后脊髓和 LC 内 NA 阳性神经元的变化，以探讨吗啡依赖及戒断的分子机制。

本实验观察到，慢性吗啡处理可明显增加 LC 内 DBH 阳性神经元数目，表明吗啡同其他精神刺激物一

样可促进 DBH 的表达,提示 NA 可能参与吗啡依赖和戒断的形成。我们在实验中发现,尽管慢性吗啡处理可增加 DBH 阳性神经元数量,但对其相对灰度却无明显影响。这一结果提示,慢性吗啡处理可能促使 LC 内在正常情况下并不表达 DBH 的神经元,而在吗啡的作用下开始表达,导致 DBH 阳性神经元增加。

本研究首次观察到在慢性吗啡处理后的脊髓内 DBH 阳性神经元数量增多、分布更广、染色更深。上述变化在后角最为明显。正常情况下仅脊髓前角可见少量染色浅的 DBH 阳性神经元胞体。本实验观察到,慢性吗啡处理后,脊髓前角内阳性神经元增多,染色加深(图 1B);侧角和后角内新增加大量形态各异、染色较深的 DBH 阳性神经元胞体(图 1C、D)。对这一现象的解释是:①在药物诱导等应激状态下,脊髓内固有的 NA 能神经元囊泡内 DBH mRNA 表达增强,DBH 合成加速,NA 合成增多,而 NA 增加可进一步增强机体对抗伤害性刺激的能力;②慢性吗啡处理后脊髓内不同功能区出现大量形态各异的 DBH 阳性神经元,这是机体适应性反应的结果,同时也是神经系统可塑性的表现。

脊髓后角是痛觉的初级中枢,后角胶状质层是痛觉调制的关键部位,后角存在许多与痛觉调制有关的神经递质,如 Glu、SP、NA、GABA、5-HT、脑啡肽,以及与递质相应的受体。当持续给予吗啡时,机体在药物诱导的应激状态下,常常会产生吗啡镇痛耐受,持续暴露于吗啡的神经元会发生形态及化学性质的改变,这种改变的分子生物学机制已引起国内外学者的广泛注意。吗啡成瘾是一种慢性复发性脑病,以神经生理功能紊乱及病态行为为特征[10]。有理论认为,此种神经生理功能紊乱反映了慢性药物使用所导致的神经递质、信号传导功能及神经细胞基因表达方面的适应性改变[11]。长期反复使用依赖性物质可引起某些特定神经元的分子及细胞水平的适应性改变,产生长时程的生物学效应,表现为持续数天至数年的耐受、敏感化、依赖等,其可能的生物学基础为受体适应性改变、cAMP 信号传导通路上调、cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)上调、立早基因(如 c-fos)上调、谷氨酸能系统活性增高、NA 能系统活性增高及 5-HT 能系统活性降低、突触重塑等[12]。有证据表明长期慢性使用吗啡等可上调神经细胞 cAMP 等信号传导通路,激活多种蛋白激酶,使其相应底物蛋白磷酸化,从而间接地刺激特定基因的转录[11]。据文献[9]报道 LC 损毁可减少吗啡戒断后的体征;而本实验结果显示慢性吗啡处理和戒断引起 LC 和脊髓内 NA 能神经元增多,提示在总体水平上,NA 表达上调。

综上所述,NA 表达上调与吗啡依赖和戒断症状的形成密切相关;持续给予吗啡仅引起 LC 内 NA 能神经元数量的增加,但并不影响单个神经元 NA 含量的改变;而在脊髓节段,慢性吗啡处理可引起前角内 NA 能神经元数量增加,染色加深,后角和侧角新增加大量 DBH 浓染的阳性神经元,这可能是由于在吗啡诱导的应激状态下,脊髓内非 NA 能神经元发生了化学性质的转变,一些非 NA 能神经元转化为 NA 能神经元。据推测,这种变化可能是机体在应激状态下的一种适应性反应,是神经系统可塑性的表现。但究竟是哪些神经元的化学性质发生转化,以及其转化的分子机制尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Ho I K, Feng Y Z, Tokuyama S, *et al*. Glutamate in opioid dependence[J]. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi, 1997, 17(4): 175 - 180.

[2] Hoshi K, Yamamoto A, Ishizuki S, *et al*. Excitatory amino acid release in the locus coeruleus during naloxone-precipitated morphine withdrawal in adjuvant arthritic rats[J]. Inflamm Res, 2000, 49(1): 36 - 41.

[3] Tempel A, Zukin R S. Neuroanatomical patterns of the μ, δ, and κ opioid receptors of rat brain as determined by quantitative *in vitro* autoradiography[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(12): 4308 - 4312.

[4] Aghajanian G K. Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine[J]. Nature, 1978, 276(5684): 186 - 188.

[5] Crawley J N, Hattox S E, Maas J W, *et al*. 3-methoxy-4-hydroxyphenethyleneglycol increase in plasma after stimulation of the nucleus locus coeruleus[J]. Brain Res, 1978, 141(2): 380 - 384.

[6] Zhu H, Rockhold R W, Ho I K. The role of glutamate in physical dependence on opioids[J]. Jpn J Pharmacol, 1998, 76(1): 1 - 14.

[7] Maldonado. R, Dauge V, Callebert J, *et al*. Comparison of selective and complete inhibitors of enkephalin-degrading enzymes on morphine withdrawal syndrome[J]. Eur J pharmacol, 1989, 165(2-3): 199 - 207.

[8] 王丹心, 柳用绍, 秦伯益. 二氢埃托啡对吗啡依赖大鼠和猴的实验治疗[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1992, 6(1): 36 - 40.

[9] Maldonado R, Koob G F. Destruction of the locus coeruleus decreases physical signs of opiate withdrawal[J]. Brain Res, 1993, 605(1): 128 - 138.

[10] Leshner A I. Addiction is a brain disease, and it matters[J]. Science, 1997, 278(5335): 45 - 47.

[11] Nestler E J. Molecular mechanisms of drug addiction[J]. J Neurosci, 1992, 12(7): 2439 - 2450.

[12] Nestler E J, Aghajanian G K. Molecular and cellular basis of addiction[J]. Science, 1997, 278(5335): 58 - 63.

(编辑　龙　亮)