论著

文章编号:1000-5404(2011)04-0392-04

胃泌素和5-羟色胺在海洛因戒断、复吸大鼠胃窦的表达

夏白娟,梁文妹,洪 艳,韩 晶,胡 赟,李一欣,谢 莉 (550004 贵阳,贵阳医学院组织学与胚胎学教研室)

【摘要】 **目的** 探讨海洛因戒断、复吸对大鼠胃窦内胃泌素(gastrin,Gas)、5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine,5-HT)阳性细胞的影响。**方法** 成年雄性SD大鼠35只,按配对原则随机分为正常对照组($n=5$)、生理盐水对照组($n=15$)和实验组($n=15$),实验组大鼠又分为海洛因戒断组、美沙酮脱毒治疗组和海洛因复吸组,每组5只。采用免疫组织化学SABC法及图像分析法,观察Gas、5-HT在大鼠胃窦中表达的变化。**结果** ①在海洛因戒断、复吸期间,Gas、5-HT在胃窦表达增强,与正常对照组及生理盐水对照组比较,戒断及复吸组大鼠胃窦内的Gas、5-HT阳性细胞免疫染色加深,平均灰度值均低于正常及盐水对照组,且阳性细胞计数增多,差异有统计学意义($P<0.05$)。②脱毒治疗组与正常及生理盐水对照组比较,大鼠胃窦内的Gas、5-HT阳性细胞的免疫染色强度无明显变化,平均灰度值及细胞计数差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 在海洛因戒断、复吸期间,胃窦通过分泌Gas、5-HT增多的方式,参与了机体对抗海洛因的损伤;美沙酮脱毒治疗后胃窦分泌Gas、5-HT有所减少,可能与胃窦功能逐步趋于正常有关。

【关键词】 海洛因;戒断;复吸;胃泌素类;血清素;幽门窦

【中图法分类号】 R322.44;R329.25;R966 【文献标志码】 A

Expressions of gastrin and 5-HT in gastric antrum of rats going through heroin withdrawal then relapse

Xia Baijuan, Liang Wenmei, Hong Yan, Han Jing, Hu Yun, Li Yixin, Xie Li (Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province, 550004, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the expressions of gastrin (Gas) and 5-hydroxy tryptamine (5-HT) in the gastric antrum of rats who go through heroin withdrawal and then relapse. **Methods** A total of 35 adult male SD rats were randomly divided into 3 groups, normal control group ($n=5$), saline control group ($n=15$) and experiment group ($n=15$). Experiment group was subdivided into heroin withdrawal group ($n=5$), methadone detoxication group ($n=5$) and heroin relapse group ($n=5$). All animals from experimental group were given injections of 3 mg/kg heroin at the first day, twice per day, then with an increase of 3 mg/kg every day for another 8 d and then followed a boost injection of 0.8 mg naloxone to establish heroin withdrawal model. Then the left 10 rats of the experimental group received a continued decrease injection of methadone for 6 d (5, 4, 3, 2, 1 and 0.5 mg/kg) to establish methadone detoxication rats. The left 5 rats were injected with heroin again from 9 to 3 mg/kg for 7 d with the dose decreased every day by 1 mg/kg. All rats from experimental group were sacrificed after the establishment of corresponding models. Immunohistochemical SABC and image analysis were performed to detect the expressions of Gas and 5-HT. **Results** The expressions of Gas and 5-HT were increased during heroin withdrawal and relapse in rat antrum. Compared with normal control and saline control, heroin withdrawal and relapse group had more intense immunohistochemical staining, lower mean grey scale and more Gas and 5-HT positive cells ($P<0.05$). There was no significant difference in the mean grey scale and positive cells counts of Gas and 5-HT ($P>0.05$) in methadone detoxication group when compared with normal and saline control. **Conclusion** Gas and 5-HT show a trend of increased expression in rat antrum during withdrawal, and withdrawal and relapse, suggesting that they participate in the anti-heroin process. After methadone detoxication, the expressions of Gas and 5-HT were close to normal levels, which indicating the function of antrum turns to normal.

【基金项目】 贵州省社会发展科技攻关计划项目[黔科合S字(2007)1048]

【通信作者】 梁文妹,电话:(0851)6909118,E-mail:wenmeiliang@126.com

【Key words】 heroin; withdrawal; relapse; gastrins; serotonin; pyloric antrum

Supported by the Tackling Program of Science and Technique in Social Development of Guizhou Province (20071048); Corresponding author: Liang Wenmei, Tel: 86-851-6909118, E-mail: wenmeiliang@126.com

海洛因成瘾复吸率高,已构成戒毒治疗失败的主要原因,也是当今脱毒治疗亟待解决的首要问题[1]。海洛因对机体免疫[2]、消化系统[3]等多个脏器具有明显的损害。5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine,5-HT)可刺激胃肠平滑肌运动,调节胃黏膜水、电解质的分泌[4],并且还能调节 G 细胞分泌胃泌素(gastrin,Gas)[5]。Gas 不但能刺激胃肠运动和胃酸分泌,还是胃壁细胞的重要生长因子和免疫调节因子[6]。

本实验通过建立相关大鼠模型,对海洛因戒断、脱毒和复吸期间,5-HT、Gas 在大鼠胃窦的表达进行研究,旨在探讨这两种胃肠激素在海洛因戒断和复吸期间的可能作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制作

1.1.1 动物分组 成年雄性 SD 大鼠 35 只,体质量 180 ~ 220 g,由贵阳医学院实验动物中心提供。按配对原则随机分为正常对照组(normal control group,NCG)5 只、生理盐水对照组(saline control group,SCG)15 只和实验组(experiment group,EG)15 只,实验组又分为海洛因戒断组(heroin withdrawal group,HWG)、美沙酮脱毒治疗组(methadone detoxication group,MDG)和海洛因复吸组(heroin relapse group,HRG),每组 5 只。

生理盐水对照组按体质量每日注射与实验组相当剂量的生理盐水,并与同期各实验组同时处死,每次处死 5 只;正常对照组不予任何处理。

1.1.2 海洛因戒断大鼠模型的建立[7] 实验组按体质量逐日注射海洛因药液。首日剂量为 3 mg/kg,2 次/d(上午 8:00,下午 15:00),每日递增剂量为 3 mg/kg,连续皮下注射海洛因 9 d 成瘾。第 10 天实验组取 5 只大鼠腹腔注射 0.8 mg 纳洛酮催瘾,观察并记录戒断症状 30 min,依照文献[8]的戒断症状评分标准评定,判定大鼠海洛因戒断模型成功建立。戒断组大鼠 1 h 内处死。

1.1.3 美沙酮脱毒治疗[9] 将已成瘾大鼠注射美沙酮脱毒治疗,连续注射 6 d,每日剂量递减,依次为 5、4、3、2、1、0.5 mg/kg,观察并记录大鼠行为表现,脱毒治疗第 7 天,经注射纳洛酮催瘾并观察,大鼠无明显戒断症状,将美沙酮脱毒大鼠取 5 只处死。

1.1.4 海洛因复吸大鼠模型的建立[8] 将剩余 5 只美沙酮脱毒 6 d 后的大鼠再次注射海洛因,注射剂量 9 mg/kg 首日,1 次/d(上午 8 时),逐日递增剂量为 3 mg/kg,让大鼠再次染毒,制作复吸模型。复吸 7 d 后(根据文献[9]及预实验结果,剂量为 27 mg/kg)将复吸组大鼠处死。

1.2 免疫组织化学观察 Gas、5-HT 在大鼠胃窦中表达

分别取正常对照组、盐水对照组和实验组(戒断、脱毒和复吸)大鼠胃窦标本,4% 多聚甲醛液固定,常规石蜡包埋,制成 4 μm 厚的连续切片,每例每个观察指标均观察切片 3 张以上,切片间隔 56 μm。切片常规脱蜡至水,室温 10% 甲醇-H_2O_2 10 min,正常羊血清(1∶50)室温下封闭 20 min,分别滴加兔 Gas、5-HT 抗血清(Gas 工作浓度 1∶100;5-HT 工作浓度 1∶100,),4 ℃孵育过夜;羊抗兔 IgG(1∶100)37 ℃孵育 20 min,SABC 复合物(1∶100)37 ℃孵育 20 min,DAB-H_2O_2 液显色,苏木精复染细胞核,中性树胶封片。

方法对照:PBS 缓冲液代替特异性抗血清,余步骤同上。

1.3 图像及统计学分析

随机选取戒断、脱毒和复吸组和同期生理盐水对照组胃窦切片,各取 3 例,正常对照组 3 例。在 40 倍物镜下,每例切片随机选取 5 个视野,用 BioMias 图像分析系统检测 5-HT 和 Gas 阳性细胞的平均灰度值,并计数每个视野内有核 5-HT 和 Gas 阳性细胞数。应用 SPSS 11.5 软件包对所得数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠成瘾和戒断症状观察

随着注射时间的延长和海洛因注射剂量的增加,大鼠出现明显的成瘾症状,如步履蹒跚、双眼凸起、昏睡、全身僵直等。腹腔注射纳洛酮催瘾并观察戒断症状 30 min,可见大鼠有烦躁不安、扭体、湿狗样抖、上睑下垂并伴有严重的腹泻。

2.2 Gas 在海洛因戒断、脱毒与复吸大鼠胃窦的表达

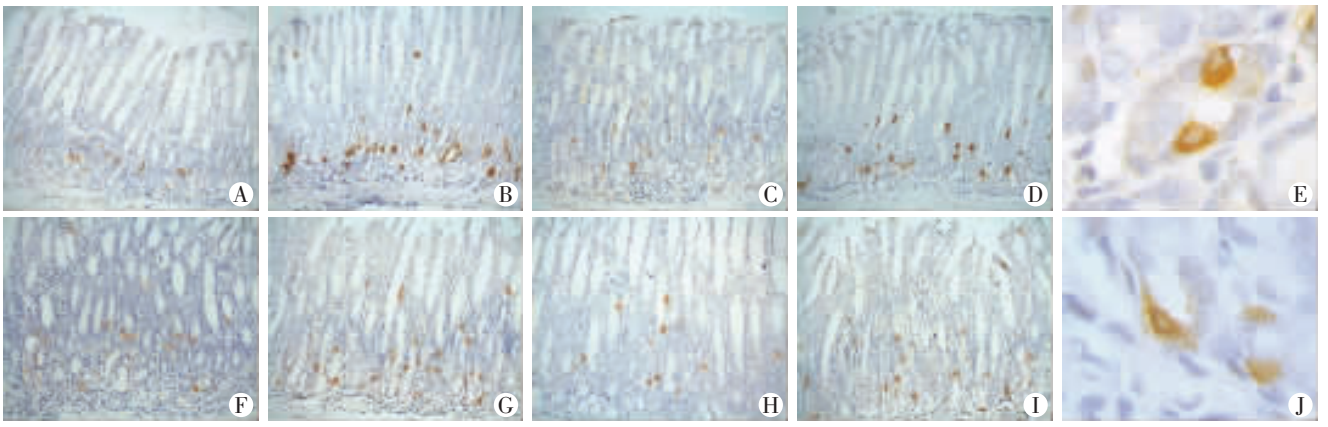
光镜下各组(图 1A ~ E)大鼠胃窦内均可见 Gas 阳性细胞,免疫反应产物呈棕色颗粒状,位于细胞质内。Gas 阳性细胞存在于幽门腺,分布于腺上皮细胞间。细胞胞体较大,呈锥体形或烧瓶状,基底部较宽,顶部细长,直达腺腔。

如图 2 所示,正常对照组、生理盐水对照组与美沙酮脱毒组 Gas 阳性细胞的平均灰度值的差异无统计学意义($P > 0.05$)。而戒断组和复吸组 Gas 阳性细胞的免疫染色加深,平均灰度值降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

通过观察有核 Gas 阳性细胞计数,正常对照组(5.31 ± 1.88)、生理盐水对照组(5.66 ± 1.78)与美沙酮脱毒治疗组(6.12 ± 2.37)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。而海洛因戒断组(19.51 ± 2.39)和海洛因复吸组(17.11 ± 1.68)Gas 阳性细胞数较正常对照组、生理盐水对照组与美沙酮脱毒治疗组增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 5-HT 在海洛因戒断、脱毒与复吸大鼠胃窦的表达

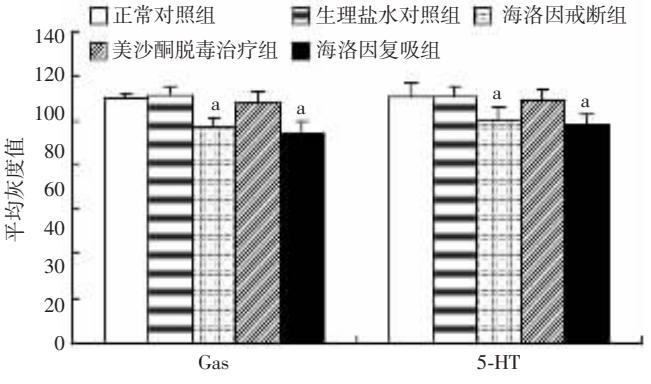
光镜下,各组大鼠胃窦的 5-HT 阳性细胞免疫反应产物呈棕黄色细颗粒状存在于细胞质内(图 1F ~ J)。方法对照切片未见阳性细胞。大鼠胃窦的 5-HT 阳性细胞主要分布于幽门腺底部,细胞形态多样,呈卵圆形、梭形、锥形或不规则形,有的细胞可见 1 ~ 2 个突起。



A:生理盐水对照组大鼠胃窦 Gas 阳性细胞(×400);B:海洛因戒断组大鼠胃窦 Gas 阳性细胞(×400);C:美沙酮脱毒治疗组大鼠胃窦 Gas 阳性细胞(×400);D:海洛因复吸组大鼠胃窦 Gas 阳性细胞(×400);E:大鼠胃窦 Gas 阳性细胞对照(×1 000);F:正常对照组大鼠胃窦 5-HT 阳性细胞(×400);G:海洛因戒断组大鼠胃窦 5-HT 阳性细胞(×400);H:美沙酮脱毒治疗组大鼠胃窦 5-HT 阳性细胞(×400);I:海洛因复吸组大鼠胃窦 5-HT 阳性细胞(×400);J:大鼠胃窦 5-HT 阳性细胞对照(×1 000)

图1 各组大鼠胃窦 Gas 和 5-HT 在海洛因戒断、复吸大鼠胃窦表达的变化 (SABC)

如图2所示,正常对照组、生理盐水对照组与美沙酮脱毒治疗组 5-HT 阳性细胞的平均灰度值的差异无统计学意义($P>0.05$)。而海洛因戒断组和海洛因复吸组 5-HT 阳性细胞的平均灰度值较其他3组显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。



a:与 $P<0.05$,与正常对照组和生理盐水对照组比较

图2 各组大鼠胃窦 Gas、5-HT 阳性细胞的平均灰度值

有核 5-HT 阳性细胞计数结果,正常对照组(8.32±1.56)、生理盐水对照组(8.42±1.25)与美沙酮脱毒治疗组(8.12±1.68)比较差异无统计学意义($P>0.05$)。而海洛因戒断组(21.6±1.72)和海洛因复吸组(20.03±2.12)5-HT 阳性细胞数明显增多,与2个对照组比较差异有显著性($P<0.05$)。

3 讨论

胃肠道是唯一在无中枢神经系统支配情况下,能自主、协调地完成复杂的蠕动、分泌、反射的器官。这归功于其内在神经支配-肠神经系统(enteric nervous system,ENS)。肠神经系统对胃肠道的调控作用需要其感受到肠腔内压力和化学刺激因素,这个过程由 EC 细胞介导,这些细胞感受肠腔内刺激后释放大量 5-HT,后者激活黏膜下初级传入神经纤维实现对胃肠道的调控功能[10]。此外,在胃肠道的组织中还存在大量阿片受体,它们对消化功能也起着重要调节作用,当长期大量摄取外源性阿片物质,可使整个阿片肽系统功能降低。戒断时,纳洛酮等竞争性的拮抗各类阿片受体,使受体效能降低,从而出现胃肠功能紊乱。Kulkarni 等[11]报道,吗啡戒断小鼠消化管蠕动增强。本实验亦观察到海洛因戒断大鼠出现严重的腹泻等戒断症状。本实验结果表明,海洛因戒断大鼠胃窦 5-HT、Gas 表达显著增强,提示机体通过分泌 5-HT 增多参与对消化道的功能调节,并通过影响 Gas 分泌增多参与海洛因戒断期间受损胃黏膜的愈合和修复[5]。

美沙酮为合成的长效阿片类药物。由于其特有的药理学作用而被广泛地用于阿片类成瘾的治疗[12]。韦世秀等[13]报道,海洛因成瘾大鼠纳洛酮戒断时脑中 5-HT 含量升高,使用美沙酮脱毒治疗后明显下降,表明经治疗后,5-HT 能神经元功能恢复。对海洛因依赖者血小板 5-HT 水平检测发现,经脱毒治疗后血小板 5-HT 水平较戒断反应前降低,较正常组无差异[14]。在较长期使用美沙酮脱毒治疗后,海洛因成瘾者的免疫功能也有所恢复[15]。本实验观察到,美沙酮脱毒大鼠胃窦 5-HT、Gas 阳性细胞表达与正常及盐水对照组无明显差异,提示经美沙酮脱毒治疗,大鼠消化管功能和机体免疫有可能逐渐恢复正常。

引起海洛因成瘾者复吸的相关机制和临床研究仍是当前国际神经科学的难题和热点[16-17]。叶峻等[18]报道,海洛因复吸大鼠脑中 5-HT 等神经递质含量随复吸次数增多而升高。作者前期研究发现,海洛因成瘾大鼠胃窦 5-HT,Gas 升高[19-20]。本实验将美沙酮脱毒大鼠再次注射海洛因成瘾以模拟复吸过程,结果观察复吸大鼠胃窦 5-HT、Gas 阳性细胞表达增强,推测

海洛因复吸对大鼠胃窦功能再次造成损害。

参考文献：

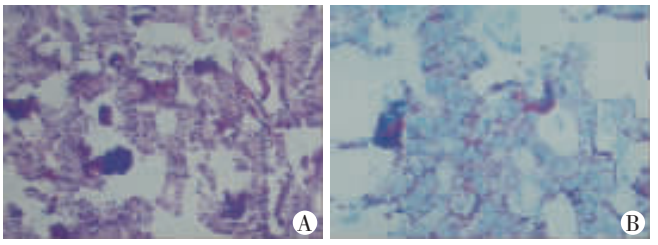
[1] Epstein D H, Preston K L, Stewart J, *et al*. Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure [J]. Psychopharmacology (Berl), 2006, 189(1): 1 - 16.
[2] Kay A, Taylor T E, Barthwell A G, *et al*. Substance use and women's health [J]. J Addict Dis, 2010, 29(2): 139 - 163.
[3] Dimitrijevic I, Kalezic N, Ristic J, *et al*. Digestive system damage caused by substance abuse [J]. Acta Chir Iugosl, 2008, 55(3): 133 - 138.
[4] Hansen M B, Witte A B. The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion [J]. Acta Physiol (Oxf), 2008, 193(4): 311 - 323.
[5] Ericsson P, Hakanson R, Norlen P. Gastrin response to candidate messengers in intact conscious rats monitored by antrum microdialysis [J]. Regul Pept, 2010, 163(1/3): 24 - 30.
[6] Chao C, Hellmich M R. Gastrin, inflammation, and carcinogenesis [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010, 17(1): 33 - 39.
[7] 潘贵书, 徐国强, 李淑芳, 等. 海洛因成瘾大鼠模型的建立 [J]. 贵阳医学院学报, 1997, 22(增刊): 46.
[8] Maldonado R, Negus S, Koob G F. Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta-and kappa-selective opioid antagonists [J]. Neuropharmacology, 1992, 31(12): 1231 - 1241.
[9] 叶峻, 蒙子卿, 韦世秀, 等. 海洛因成瘾复吸动物模型的建立 [J]. 广西医科大学学报, 2003, 20(6): 832 - 835.
[10] Pan H, Gershon M D. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine [J]. J Neurosci, 2000, 20(9): 3295 - 3309.
[11] Kulkarni S K, Kaushal A, Dhir A. Effect of withdrawal of diazepam or morphine treatment on gastric motility (charcoal meal test) in mice: possible role of different central and peripheral receptors [J]. Indian J Exp Biol, 2007, 45(7): 642 - 648.
[12] Stotts A L, Dodrill C L, Kosten T R. Opioid dependence treatment: options in pharmacotherapy [J]. Expert Opin Pharmacother, 2009, 10(11): 1727 - 1740.
[13] 韦世秀, 蒙子卿, 叶峻, 等. 不同阶段海洛因成瘾大鼠脑内单胺递质的变化 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(5): 396 - 398.
[14] 高志勤, 余海鹰, 刘桂永, 等. 海洛因依赖者戒断前后血小板 5-羟色胺变化的研究 [J]. 中国行为医学杂志, 2002, 11(4): 392 - 393.
[15] Neri S, Bruno C M, Pulvirenti D, *et al*. Randomized clinical trial to compare the effects of methadone and buprenorphine on the immune system in drug abusers [J]. Psychopharmacology (Berl), 2005, 179(3): 700 - 704.
[16] Ross S, Peselow E. The neurobiology of addictive disorders [J]. Clin Neuropharmacol, 2009, 32(5): 269 - 276.
[17] Bossert J M, Ghitza U E, Lu L, *et al*. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: an update and clinical implications [J]. Eur J Pharmacol, 2005, 526(1/3): 36 - 50.
[18] 叶峻, 韦献良, 韦世秀, 等. 海洛因成瘾复吸大鼠脑组织超微结构和部分神经递质的变化 [J]. 解剖学杂志, 2004, 27(6): 624 - 629.
[19] 夏白娟, 梁文妹. 海洛因依赖期间大鼠胃窦 5-羟色胺免疫反应细胞形态和功能变化 [J]. 贵阳医学院学报, 2007, 32(2): 131 - 134.
[20] 夏白娟, 梁文妹. 海洛因依赖对大鼠胃窦胃泌素、生长抑素阳性细胞的影响 [J]. 解剖学报, 2007, 38(5): 577 - 580.

(收稿 2010-10-10 修回 2010-11-22)
(编辑 邓强庭)

(上接 391 页)



图 1 胰岛细胞瘤患者腹部 CT 影像结果



A: CgA; B: Syn

图 2 胰岛细胞瘤患者切除组织肿瘤细胞免疫标记 CgA、Syn 染色结果 (S-P ×200)

他的激素因量小或无显著活性，不引起临床症状，需要免疫组化法才能证实。胰岛 B 细胞瘤典型症状为低血糖发作，发作时血糖低于 2.1 mmol/L，给予葡萄糖后缓解，即 Whipple 三联征。由于低血糖时大脑皮质受到不同程度抑制，患者可出现嗜睡、精神恍惚、头脑不清、反应迟钝和智力减退等。多次发作后可导致大脑皮层的进一步抑制和损伤，出现精神病表现，患者常以精神病就诊。有的患者可出现颞叶癫痫，发作时知觉丧失、牙关紧闭、四肢抽搐、直至大小便失禁等[1]。临床上并不是所有的患者都有典型的临床表现，容易误诊漏诊。胰岛素释放指数(发作时或空腹时周围静脉血中的胰岛素含量/同时测定的血糖值)大于 0.4，对该病有很大的诊断价值。B 超、增强 CT 扫描、MRI 及腹腔动脉造影等有助于诊断和定位。胰岛细胞瘤一经确诊应行手术切除，手术方式包括胰岛细胞瘤剜出术、胰腺体尾部切除术和腹腔镜胰岛细胞瘤切除术[2-5]。本例患者以餐后低血糖为主要表现，具有典型的 Whipple 三联征，胰岛素释放指数 >0.4，符合胰岛 B 细胞瘤的诊断标准。腹部增强 CT 显示胰尾部病灶。手术切除后血糖回升，低血糖症状消失。术后病理证实为胰岛细胞瘤，考虑生长抑素瘤。肿瘤细胞免疫标记 CgA、Syn 呈阳性表达，符合神经内分泌肿瘤。

参考文献：

[1] 吴孟超, 吴在德. 黄家驷外科学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1852 - 1855.
[2] 吴在德, 吴肇汉. 外科学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 586 - 587.
[3] 黎介寿, 吴孟超, 黄志强. 手术学全集(普通外科卷) [M]. 北京: 人民军医出版社, 2001: 1004 - 1009.
[4] Miron A, Calu V, Giulea C, *et al*. Laparoscopically treated pancreatic insulinoma. Case report [J]. J Med Life, 2010, 3(2): 186 - 190.
[5] Ueda J, Nakamura Y, Aimoto T, *et al*. Laparoscopic distal pancreatectomy preserving spleen and splenic vessels for pancreatic insulinoma [J]. J Nippon Med Sch, 2010, 77(3): 175 - 180.

(收稿 2010-11-20 修回 2010-12-08)
(编辑 张 维)