维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0799-03

吗啡依赖及戒断大鼠相关脑区 Bcl-2 的表达研究

余会平,蒙华庆,胡 华,罗庆华,邓 伟,傅一笑

(重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心,重庆 40016)

【摘 要】目的:明确吗啡依赖及戒断两种状态时大鼠相关脑区 Bcl-2 的表达特征。方法:将 18 只 Sprague-Dawley 雄性大鼠随机分为吗啡依赖组、吗啡戒断组和空白对照组,每组 6 只。采用递增法皮下注射吗啡建立大鼠吗啡依赖模型,纳络酮注射戒断,应用免疫组化和地高辛标记寡核苷酸探针原位杂交技术检测三组大鼠不同脑区 Bcl-2 的表达水平。结果:连续给予吗啡 5 天及纳络酮戒断后,中脑腹侧被盖区、海马、蓝斑、前额叶皮质脑区 Bcl-2 及其 mRNA 较对照组显著降低($P<0.05$),而吗啡戒断组伏隔核脑区内 Bcl-2 及其 mRNA 的表达较依赖组显著增加($P<0.05$),结论:吗啡依赖及戒断大鼠 Bcl-2 蛋白及其 mRNA 的表达在不同脑区有选择性的改变,可能是吗啡依赖及戒断的分子机制之一。

【关键词】吗啡依赖;戒断综合征;Bcl-2

【中国图书分类法分类号】R749 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-16

Effect of morphine dependence and abstinence on the expression of B-cell Lymphomal-2 in Sprague-Dawley rats

YU Huiping, et al

(*Department of Psychiatry, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of Bcl-2 in rat brain during dependence and withdral state. *Methods*: The rats were rendered dependent by subcutaneous injections of increasing doses of morphine from 10 to 80 mg/kg for 5 consecutive days. The rats as controls were administered with same volume of normal saline. The expression of Bcl-2 mRNA was assayed with digacin-labelled Bcl-2 cDNA probe by in situ hybridization and the levels of Bcl-2 protein were measured by immunohistochemistry. *Results*: The evels of Bcl-2 and their mRNA in prefrontal cortex, locus coeruleus, hippocampus and ventral tegmental area significantly decreased as comparied with that in control rats after chronic administration of morphine and naloxone administration. However, Bcl-2 and their mRNA in nucleus accumbens of rats in withdral state were markedly higher than that in nucleus accumbens of morphine dependent rats. *Conclusion*: Chronic exposure to morphine appears to induce modification of the expression of Bcl-2 mRNA and their protein of rats in the rat brain, which contributes to the development of morphine dependence.

【Key words】 Morphine dependence; Substance withdrawal syndrome; Bcl-2

阿片类物质如海络因等是我国及东南亚最常见的毒品之一。目前认为,阿片类药物成瘾是一种反复发作的慢性脑病,有其特有的神经生物学基础[1]。近年来人们对细胞凋亡在疾病发生发展机制中的进一步认识发现,吗啡可促进单核/巨噬细胞系统的凋亡,促进肿瘤细胞和神经细胞的凋亡[2,3]。Bcl-2 基因是调控细胞凋亡的重要基因之一。国外学者报道,慢性吗啡处理后大鼠大脑皮层和脊髓 Bcl-2 表达下降[4,5],但与阿片类依赖密切相关的中脑腹侧被盖区、伏隔核、海马、蓝斑等脑区内 Bcl-2 蛋白及其 mRNA 的表达有何改变,至今未见报道,本文就此作一初探。

作者介绍:余会平(1978 -),女,硕士,
主要研究方向:药物依赖。

基金项目:重庆市卫生局医学科研项目资助(03-2-105)。

1 材料与方法

1.1 材 料

实验动物为 Sprague-Dawley 大鼠,共 18 只。均为雄性,体重 200~250g,购自第三军医大学实验动物中心。按随机数字法将其分为空白对照组、吗啡依赖组、盐酸纳洛酮处理戒

维普资讯 http://www.cqvip.com

断组,每组 6 只。

1.2 方 法

1.2.1 吗啡依赖大鼠模型的建立 参照 Maldonado.R 的方法[6]:采用剂量递增法对吗啡依赖组和戒断组大鼠予连续皮下注射吗啡,建立大鼠吗啡身体依赖模型。具体方案为,每天于 8am、5pm 各皮下注射 1 次吗啡,吗啡单次剂量按第 1 天 10mg/kg、15mg/kg;第 2 天 20mg/kg、25mg/kg;第 3 天 30mg/kg、40mg/kg;第 4 天 50mg/kg、50mg/kg;第 5 天 60mg/kg、80mg/kg 递增给药。身体依赖模型建立后,对戒断组大鼠皮下注射 2mg/kg 的盐酸纳络酮激发戒断症状。空白对照组大鼠按同等剂量给予生理盐水。

1.2.2 主要药品和试剂 盐酸吗啡由沈阳第一制药厂生产,盐酸纳络酮由北京四环制药厂生产,Bcl-2 免疫组化试剂盒及 Bcl-2 原位杂交试剂盒由武汉博士得公司提供。其余所有试剂均为分析纯。

1.2.3 标本取材和制备 各组动物模型成功建立后,将动物麻醉,仰卧固定于手术台上,剪开胸前壁暴露心脏,立即作左心室插管,先用生理盐水灌注,同时打开腹腔剪开肝脏,至肝脏变白,约灌注 20min,再用 4%多聚甲醛 /0.1%DEPC 灌流固定约 40min,最后剥离脑组织[7]。对脑组织进行冰冻切片,根据大鼠脑立体定位图谱[8],选取包含吗啡依赖相关脑区的冰冻切片置 -20℃冰箱保存备用。

1.2.4 Bcl-2 的免疫组织化学 SP 染色法[7] 选取含有中脑腹侧被盖区、伏隔核、蓝斑、前额叶皮质、海马等脑区的冰冻切片,置于 4℃冰箱平衡过夜,纯丙酮室温固定 20~30min,0.01MPBS 洗 2min × 3 次。0.3%H_2O_2/ 甲醇处理 30min,双蒸水洗 5min × 3min。滴加正常山羊血清,室温 10min,甩去多余液体,不洗。滴加抗 Bcl-2 的抗体,于 4℃冰箱过夜,0.01mol/L PBS 洗 2 × 3 次。滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ × 20min,0.01mol/L PBS 洗 2 × 3 次。滴加链霉亲和素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物 37℃20min,0.01mol/L PBS 洗 5min × 4 次。DAB 显色,镜下控制反应时间约 5~10min,适度后终止显色,蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染、脱水、透明、封片。光学显微镜观察 Bcl-2 蛋白阳性反应细胞的染色情况。每一批实验中设立阴性对照,阴性对照实验用替代实验,即用 PBS 代替一抗,其它免疫反应过程相同,结果阴性。

1.2.5 Bcl-2mRNA 的原位杂交[9] 选取相关脑区的冰冻切片,按博士德公司杂交试剂盒进行操作:将切片从 -20℃冰箱取出,用 0.01mol/L PBS/0.1% DEPC 漂洗 10min, 0.3% Triton-100 漂洗 10min,蒸馏水洗 3 次。新鲜配制 0.5%H_2O_2/ 甲醇室温处理 30min。双蒸水洗 5min × 3 次。暴露 mRNA 核酸片段:切片上滴加 3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶,37℃消化约 5min,0.5mol/L PBS 洗 5min × 3 次,蒸馏水洗 1 次。预杂交:将 20%甘油 20ml 加于杂交盒底部,按每张切片 20μl 加上 Bcl-2 预杂交液。恒温水箱 37℃1h,吸取多余液体。杂交:每张切片 20μl 滴加 Bcl-2。盖上专用杂交盖玻片,恒温水箱 42℃杂交过夜。杂交后洗涤:37℃ 水温的 2 × SSC 洗涤 5min × 2 次;55℃水温的 0.5 × SSC 洗涤 15 min × 1 次;55℃水温的 0.2 × SSC 洗涤 15 min × 1 次。滴加封闭液:37℃ 30 min,甩去多余液体,不洗。滴加生物素化鼠抗地高辛:37℃ 60 min,0.5MPBS 洗 5min × 4 次。滴加 SABC:37℃ 20 min,0.5 mol/L PBS 洗 5min × 4 次。滴加生物素化过氧化物酶:37℃ 20min,0.5 mol/L PBS 洗 5min × 4 次。DAB 显色:按照显色试剂盒:1ml 蒸馏水加显色剂 A,B,C 各 1 滴,混匀,加至标本上。镜下控制反应时间约 30min,蒸馏水充分洗涤,必要时苏木素轻度复染。充分水洗。酒精脱水,二甲苯透明,封片。显微镜观察:观察 Bcl-2mRNA 阳性反应细胞的染色情况。原位杂交对照实验:在杂交前将切片用 20μg/ml RNase 于 37℃处理 30min,其它步骤同上。杂交液中不加探针,其它同上。

1.2.6 结果处理 免疫组化和原位杂交切片的核团辨认参照《大鼠脑立体定位图谱》[9]。利用北航计算机图像分析系统对大鼠中脑腹侧被盖区、伏隔核、蓝斑、海马、前额叶皮质等部位的 Bcl-2 蛋白及其 mRNA 阳性染色细胞的平均光密度进行测量,以平均光密度值作为各脑区内 Bcl-2 表达的相对含量。

1.2.7 统计学处理 所有结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析进行统计检验。

2 结 果

2.1 吗啡依赖及戒断对大鼠脑内 Bcl-2 蛋白表达的影响

连续给予吗啡 5 天后,吗啡依赖和戒断两组大鼠的中脑腹侧被盖区、前额叶皮质、蓝斑、海马等脑区 Bcl-2 蛋白的表达较对照组显著低 ($P<0.05$),吗啡戒断组中脑腹侧被盖区、前额叶皮质、蓝斑中 Bcl-2 蛋白的表达较依赖组降低($P<0.05$),而吗啡戒断组伏隔核脑区中 Bcl-2 蛋白的表达却较依赖组显著增加,以上各组间均有显著性差异($P<0.05$),见表 1。

2.2 吗啡依赖及戒断对大鼠脑内 Bcl-2 mRNA 表达的影响

连续给予吗啡 5 天后,吗啡依赖和戒断两组大鼠的中脑腹侧被盖区、前额叶皮质、蓝斑、海马等脑区 Bcl-2 mRNA 的表达较对照组低($P<0.05$),吗啡戒断组中脑腹侧被盖区、前额叶皮质、蓝斑中 Bcl-2 mRNA 的表达较依赖组低($P<0.05$),而在伏隔核脑区,吗啡戒断组 Bcl-2 mRNA 的表达较吗啡依赖组和对照组均增加 ($P<0.05$)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 吗啡依赖及戒断大鼠脑内 Bcl-2 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	伏隔核	中脑腹侧被盖区	前额叶皮质	蓝斑	海马
对照组	0.11 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.01
吗啡依赖组	0.07 ± 0.03	0.12 ± 0.03*	0.10 ± 0.02*	0.11 ± 0.01*	0.04 ± 0.02*
吗啡戒断组	0.12 ± 0.01#	0.08 ± 0.02*#	0.05 ± 0.03*#	0.07 ± 0.02*#	0.03 ± 0.01*

注:与对照组比较,*P<0.05;与依赖组比较,#P<0.05

表 2 吗啡依赖及戒断大鼠脑内 Bcl-2mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	伏隔核	中脑腹侧被盖区	前额叶皮质	蓝斑	海马
对照组	0.07 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.19 ± 0.04
吗啡依赖组	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.03*	0.19 ± 0.05*	0.17 ± 0.01*	0.12 ± 0.03*
吗啡戒断组	0.15 ± 0.02*#	0.05 ± 0.02*#	0.11 ± 0.02*#	0.12 ± 0.02*#	0.13 ± 0.02*

注:与对照组比较,*P<0.05;与依赖组比较,#P<0.05

3 讨 论

Bcl-2 是一种与神经细胞凋亡关系最为密切的基因之一，其表达产物 Bcl-2 蛋白是一种结合于核膜、线粒体膜、内质网膜外表面的蛋白质,它通过改变膜对一些小分子、离子或蛋白质的通透性而参与细胞凋亡的调控[10]Singhal 等报道,吗啡可降低体外培养的 Jurkat 细胞和 T 淋巴细胞内的 bcl-2 基因表达，增加抑制 bcl-2 功能的 Bax 基因的表达[11]。国外学者在新近的研究中发现,慢性吗啡处理上调促凋亡因子 Fas 受体蛋白,下调抑凋亡因子 Bcl-2 蛋白而诱导 S-D 大鼠大脑皮层神经元发生凋亡[4,5]。由此可见,细胞凋亡可能参与了阿片类药物依赖和耐受的形成，阿片依赖促进多种细胞凋亡[12]。

但迄今为止,与吗啡依赖密切相关的中脑腹侧被盖区、伏隔核、海马、蓝斑等脑区在阿片类药物依赖时 Bcl-2 的表达情况如何尚不清楚。本文旨在研究吗啡依赖及戒断时,与吗啡依赖密切相关的中脑腹侧被盖区、海马、蓝斑、前额叶皮层脑区内 Bcl-2 mRNA 及其蛋白含量的变化情况,以明确阿片依赖促发神经细胞凋亡的分子机制。结果发现,吗啡依赖及戒断大鼠中脑腹侧被盖区、海马、蓝斑、前额叶皮层脑区内 Bcl-2 mRNA 及其蛋白的含量显著降低,提示吗啡依赖及戒断可能通过下调抑凋亡因子 Bcl-2 的表达,促进上述脑区神经元凋亡,从而参与吗啡依赖的形成。

另有研究发现,阿片类药物长期使用可导致中脑腹侧被盖区、伏隔核通路神经元独特的适应性变化:中脑腹侧被盖区内多巴胺神经元出现明显形态结构的适应性改变，三种神经纤维蛋白(NF200、NF160、NF68)的含量明显降低，多巴胺神经元个体萎缩,树突减少,胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的含量增加，而伏隔核脑区不出现这些形态结构的变化,表现为 D1 受体超敏,cAMP-PKA 系统活性上调,CREB 和 c-fos、c-jun 基因表达的改变等[13]。从而诱导神经元功能和形态结构的适应性变化,本文也出现与此相似的研究结果:吗啡戒断组大鼠伏隔核脑区内 Bcl-2 mRNA 及其蛋白含量较空白对照组和依赖组不是降低而是增加,提示伏隔核脑区在吗啡吗啡依赖和戒断中变化的机制与其它脑区变化的机制可能不同。

(作者现工作单位:乐山市人民医院神经内科)

参 考 文 献

[1] Leshner AI. Addiction is a brain disease,and it matters[J]. Science,1997;278:45-47.

[2] Pravin C,Evan G,Littlewood T,et al. A matter of life and cell death[J]. The Journal of Inmmunology,1998;160:1886

[3] Sueoka E,Sueoka N,Kai Y,et al.Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative,KT-90,mediated through apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation[J]. Biochemical and Biophisical Rearch Communication,1998;252(3):566-570.

[4] Jianren Mao,Backil Sung,Ru-Rong,et al. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance:evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism[J]. The Journal of Neuroscience,2002;22(17):

(下转第 811 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞标志物(Pan-endothelial marker, PEM),但表达量存在差异。在 TdMEC 中有 46 种基因表达高于正常组织来源内皮细胞,33 种低于正常内皮细胞。亦有许多基因在肿瘤周围正常内皮细胞、TdMEC 及 HUVEC 的表达是不同的,某些基因在 TdMEC 及肿瘤周围内皮细胞中高表达,但在 HUVEC 中无表达或较少表达。以上研究结果说明,培养的正常内皮细胞并不能完全代替 TdMEC 的整体情况。

PDGF 是胸腺嘧啶核苷的磷酸化酶,是内皮细胞特异的有丝分裂原,能刺激人的内皮细胞增殖、趋化。PDGF 家族成员由四种不同基因编码的多肽链(A、B、C、D 链)组成,即 PDGF-AA,PDGF-AB,PDGF-BB,PDGF-CC 和 PDGF-DD[9,10]。人卵巢癌细胞及其来源的内皮细胞均可表达 PDGF 及其受体[1]。

有研究报到 PDGF-BB 能诱导内皮细胞的增殖、迁移、管样结构的形成和细胞存活[11]。本实验发现,PDGF-BB 能促进体外培养的 OdMEC 生长,呈剂量依赖性,PDGF-BB 20ng/ml 作用最强。PDGF-AA/BB 与受体结合后激活受体,导致参与抗凋亡机制的多个信号通路的上调[12]。PDGF-BB 对 OdMEC 的增殖的促进作用弱于 HUVEC,可能是由于在卵巢癌组织中,OdMEC 还受到 PDGF 以外其它刺激因子的作用,如 IL-8[13]。在 PDGF-BB(20ng/ml)作用下,OdMEC 中 VEGF 蛋白和基因的表达增高,且升高幅度大于 HUVEC,从而说明与正常内皮细胞相比,OdMEC 对 PDGF-BB 刺激的反应性更强。这两种细胞对 PDGF 刺激的反应性存在显著差异,其中的原因尚不清楚,可能与两种内皮细胞表面 PDGF 受体的种类及功能的不同有关。本实验为研究卵巢癌血管生成机制和抗血管生成治疗提供了实验基础。

参 考 文 献

[1] Apte SM,Bucana CD,Killion JJ,et al. Expression of platelet-derived growth factor and activated receptor in clinical specimens of epithelial ovarian cancer and ovarian carcinoma cell lines[J]. Gynecologic Oncology,2004;93(1):78-86.

[2] Alessandri G,Chirivi R GS,Castellani P,et al. Isolation and characterization of human tumor-derived capillary endothelial cells: role of oncofetal fibronection[J]. Lab Invest,1998;78(1):127-128.

[3] 蒋雪峰,白家驷,卞修武,等. 血管内皮生长因子诱导的胶质瘤源性微血管内皮细胞体外三维成型特性[J]. 中华病理学杂志,2005;34(9):579-582.

[4] Bian XW,Jiang XF,Chen JH,et al. Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human glioma[J]. Int Immunopharmacol,2006;6(1):90-99.

[5] Rafii S. Circulating endothelial precursors:mystery,reality and promise[J]. J Clin Ivest,2000;105(1):17-79.

[6] Hobbs SK, Monsky WL,Yuan F,et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels:Role of tumor type and microenviroment [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998;95(8):4607-4612.

[7] Mutuberria R,Satijn S,Huijbers A,et al. Isolation of human antibodies to tumor-associated endothelial cell markers by in vitro human endothelial cell selection with phage display libraries[J]. Journal of Immunological Methods,2004;287(1-2):31-47.

[8] St Croix B,Rago C,Velculescu V,et al. Genes expressed in human tumor endothelium[J]. Science,2000;289(5482):1197-1202.

[9] Gilbertson DG, Duff ME,West JW,et al. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C),a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor[J]. J Biol Chem.,2001;276(29):27406 -27414.

[10] Bergsten E,Uutela M,Li X,et al. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF β-receptor[J]. Nat Cell Biol,2001;3(5):512-516.

[11] Sano H,Ueda Y,Takakura N,et al. Blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta pathway induces apoptosis of vascular endothelial cells and disrupts glomerular capillary formation in neonatal mice[J]. Am J Pathol,2002;161(1):135-143.

[12] Pietras K,Sjoblom T,Rubin K,et al. PDGF receptors as cancer drug targets[J]. Cancer Cell,2003;3(5):439-443.

[13] Kassim SK,El Salahy EM,Fayed ST,et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients[J]. Clin Biochem,2004;37(5):363-369.

(上接第 801 页)

7650-7661.

[5] Boronat M A,Garcia-Fuster M J,Garcia-Sevilla JA. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and downregulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain[J]. British Journal of Pharmacology,2001;134:1263-1270.

[6] Maldonado R,Dauge V,Callebert J,et al. Fournieplete inhibitors of enkep- halindegrading enzymes on morphine withdrawal syndrome[J]. Eur J pharmacol,1989;165:199-207.

[7] 贲长恩,李叔庚,主编.组织化学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001.858-900.

[8] 蔡文琴,王伯云.实用免疫细胞化学与原位分子杂交技术[M]. 成都:四川科学技术出版社,1994.46-196.

[9] 包新民,舒斯云主编.大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1991.23-85.

[10] Zamzami N,Brenner C,Marzo I,et al.Subcellular and submitochondrial ode of action of Bcl-2-like oncoproteins[J]. Oncogene,1998;16:2265.

[11] Singhal PC. Morphine promotes apptosisin Jurkat cells [J]. Leukoc Biol,1999;66(4):650.

[12] Zhang Y,Wu GC,He QZ,et al. Effect of morphine and electro-acupuncture(EA)on apoptosis of thymocytes[J]. Acupunct Electrother Res,2000;25(1):17-26.

[13] Torres G,Horowitz JM. Drugs of abuse and brain gene expression[J]. Psychosomatic Med,1999;61:630-650.