DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.004
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
190 2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)03-0190-03

甲啡肽、纳络酮对红藻氨酸、谷氨酸在大鼠海马兴奋作用的调制

高恩泉[1],廖维宏[2] (第三军医大学:[1]基础医学部生理学教研室,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042)

提 要:目的 研究甲啡肽、纳络酮对红藻氨酸、谷氨酸在大鼠海马兴奋作用的调制,探讨甲啡肽、纳络酮影响癫痫生的可能机制。方法 健康Wistar大鼠以1%戊巴比妥钠(3 ml/kg)腹腔注射麻醉后行气管插管并固定于立体定位仪上,清醒后用0.01% d-筒箭毒(1 mg/kg)腹腔注射制动。使用多管微电极微电泳给药并细胞外记录海马单位放电。结果 ①甲啡肽可兴奋大多数海马神经元,阿片受体拮抗剂纳络酮可拮抗甲啡肽的上述作用。而纳络酮单独电泳对海马神经元放电频率无影响。②红藻氨酸、谷氨酸可强烈兴奋海马神经元,甲啡肽及纳络酮可以影响这种兴奋作用。结论 甲啡肽可能通过调节红藻氨酸、谷氨酸在海马的兴奋作用来影响癫痫的发生。

关键词:海马单位放电;微电泳;甲啡肽;纳络酮;红藻氨酸;谷氨酸;癫痫
中图法分类号:R322.81;R971.9;R977.4 文献标识码:A

The modulation of met-enkephalin and naloxone on the excitatory effects of kainic acid and glutamic acid in hippocampus of rats

GAO En-quan, LIAO Wei-hong (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the modulation of met-enkephalin (ME) and naloxone (NLX) on the excitatory effects of kainic acid (KA) and glutamic acid (GLU) in hippocampus of rats and to explore the possible mechanism of the effects of ME in the KA epilepsy model. Methods A total of 45 healthy Wistar rats were anesthetized with 1% sodium pentobarbital (3 ml/kg intraperitoneal injection). After endotracheal intubation, the animal was mounted onto a SN-1stereotaxic apparatus (Narishige) and routine craniotomy was performed. Then the animal was immobilized by 0.01% curare (1 mg/kg) after it woke up. The peripheral pipettes of a multiple-pipette microelectrode were used for microelectrophoretic application of drugs; the central pipette was used for extracellular recording of the hippocampal unit discharges (HUDs). Results ①ME excited most of the HUDs; opioid receptor antagonist NLX could reverse the excitatory effects of met-enkephalin. NLX applied alone had no effects on the firing rate of HUDs. ②KA and GLU excited the HUDs intensively but ME and NLX could modulate their excitatory effects. Conclusion ME may promote the development of epilepsy by modulating the excitatory effects of KA and GLU in hippocampus.

Key words: hippocampal unit discharge; microelectrophoresis; met-enkephalin; naloxone; kainic acid; glutamic acid; epilepsy

阿片肽与癫痫的发生密切相关,许多行为学或药理学实验表明阿片肽促进癫痫的发生[1,2]。我们以往的研究也表明大鼠海马内微量注射甲啡肽(Met-enkephalin, ME)可易化红藻氨酸所致癫痫的发生,加重癫痫活动对脑组织的损伤,而阿片受体拮抗剂纳络酮(Naloxone, NLX)具有相反的作用[3]。以往由于缺乏相关的电生理研究,阿片肽影响癫痫发生的机制尚不明确。因此本实验拟在人工制动的清醒Wistar大鼠使用多管微电极微电泳给药,细胞外记录海马单位放电(Hippocampal unit discharge, HUD)的方法研究甲啡肽、纳络酮对红藻氨酸(Glutamic acid, GLU)、谷氨酸(Kainic acid, KA)在大鼠海马兴奋作用的调制,探讨甲啡肽、纳络酮影响癫痫发生的机制。

1 材料与方法

47只健康Wistar大鼠,体重200~300 g,雌雄不拘。以1%戊巴比妥钠(3 ml/kg)腹腔注射麻醉后行气管插管并固定于立体定位仪上。开颅暴露左侧海马对应的脑组织并剥去硬脑膜。

作者简介:高恩泉(1966-),男,河北省阜城县人,硕士,副教授,主要从事神经电生理学方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752254

收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

待动物清醒后用 0.01% d-筒箭毒(1 mg/kg)腹腔注射制动并行人工呼吸。参照 Pellegrino[4] 大鼠脑立体定位图谱, 海马探查范围为 P: 2.0~4.0, L: 2.0~4.0, H: 2.5~4.0。以尖端直径 7~10 μm 的七管玻璃微电极的中心管(直流阻抗 8~20 MΩ 记录 HUD, 信号经微电极放大器放大后用 VC-10 型记忆示波器观察, 并以 DAB-1100 型直方图仪对 HUD 做放电频率序列密度分析。药物用 BH-2 型电泳仪(Medical System Corp USA)经多管微电极的侧管泳入。实验步骤如下: ①观察电泳 ME(25 mmol/L in saline, pH 4.5, 60 nA, 15 s), NLX(50 mmol/L in saline, pH 4.5, 60 nA, 15 s)对 HUD 频率的影响。②分别观察电泳 KA(20 mmol/L in saline, pH 7.0, 3 nA, 10 s), GLU(200 mmol/L in saline, pH 8.0, 20 nA, 10 s)对 HUD 的作用。③用低浓度的 ME(15 mmol/L in saline, pH 4.5, 60 nA), NLX(25 mmol/L in saline, pH 4.5, 60 nA)分别与 KA, GLU 同步电泳, 观察它们之间的相互作用(注: 此低浓度的 ME, 对正常 HUD 频率无影响)。实验结束后用普鲁士蓝法对玻璃微电极尖端进行定位。

按下列标准对药物的作用进行判定: ①如某药能使 HUD 频率改变 20%以上, 且此效应至少能重复出现两次, 则认为该药对 HUD 频率有影响。②如果同时电泳 A 药和 B 药比单独电泳 A 药所引起的 HUD 频率变化多或少 30%, 则认为 B 药对 A 药的作用有影响。③如果拮抗剂能反转激动剂效应的 50%, 则认为其有拮抗作用。最后对各种反应类型的 HUD 进行相关组间的 χ^2 检验。ME(Methionine-enkephalin acetate salt), NLX(Naloxone hydrochlorid), KA (Kainc acid), GLU(L-Gluyamic acid)均为 Sigma 公司产品, 配制所需溶液后冰冻保存, 使用前室温融化。

2　结果

2.1　微电泳 ME, NLX 对 HUD 频率的影响

在 14 只大鼠共记录完整试验单位 60 个, 大部分 HUD (73.33%, 44/60)对 ME 有非常明显的兴奋反应, 其余 16 个 HUD (26.66%)对 ME 无明显反应。同步微电泳 NLX 在所有 44 个 HUD 拮抗 ME 的兴奋作用。单独微电泳 NLA 对 60 个 HUD 均无明显影响, 见图 1。

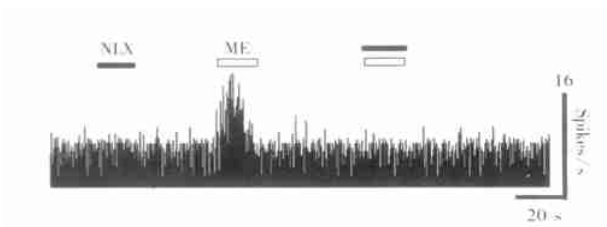


图 1　微电泳 **ME** 和 **NLX** 对一例正常海马单位放电频率的影响　短横杠分别代表微电泳 ME 和 NLX 的时间

Fig 1　Effects of ME and NLX (microelectrophoretic application) on the discharge frequency of one case of normal HUD　The bars in the figures represent the application duration of ME and NLX

2.2　微电泳 KA 对 HUD 的作用及 ME, NLX 对其作用的影响

在 16 只大鼠共记录完整试验单位 60 个, 全部对 KA 呈强烈的兴奋反应, 放电频率平均增加(1 463.17±319.36)%。在 39 个(65.00%)单位 ME 明显加强 KA 的兴奋作用, NLX 可拮抗 ME 的作用。ME 对其他 HUD 无明显影响。单独微电泳 NLX 主要在 36 个(60%)单位削弱 KA 的兴奋作用, 见图 2。

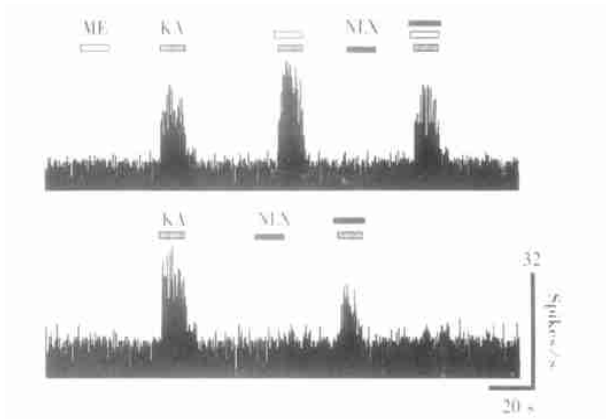


图 2　微电泳 **ME** 和 **NLX** 对 **KA** 在海马兴奋作用的影响　短横杠分别代表微电泳 KA、ME 和 NLX 的时间

Fig 2　Modulation of ME and NLX on the excitatory effects of KA in hippocampus　The bars in the figures represent the application duration of KA, ME and NLX respectively

2.3　微电泳 GLU 对 HUD 的作用及 ME, NLX 对其作用的影响

在 17 只大鼠记录完整试验单位 50 个, 它们对 GLU 均呈强烈的兴奋反应, 放电频率平均增加(297.07±113.99)%。微电泳 ME 在 44 个(88.00%)单位加强 GLU 的兴奋作用, NLX 能拮抗 ME 的上述作用。ME 对其他 HUD 无明显影响。单独微电泳 NLX 主要在 28 个(56%)单位削弱 GLU 的兴奋作用, 见图 3。

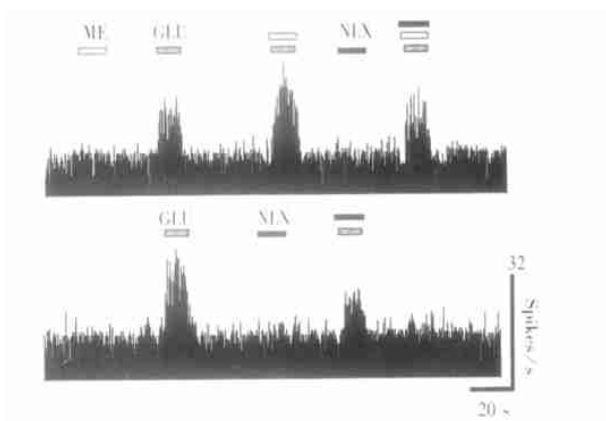


图 3　微电泳 **ME** 和 **NLX** 对 **GLU** 在海马兴奋作用的影响　短横杠分别代表微电泳 GLU、ME 和 NLX 的时间

Fig 3　Modulation of ME and NLX on the excitatory effects of GLU in hippocampus　The bars in the figures represent the application duration of GLU, ME and NLX respectively

3　讨论

3.1　ME、NLX 对正常大鼠 HUD 的影响

电泳 ME, 可通过对海马内中间抑制性神经元的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

抑制而兴奋大多数HPCs，这就是阿片肽兴奋HPCs的脱抑制(Disinhibition)假说[5]。本实验证明电泳ME可兴奋大部分HPCs(73.33%)，NLX可拮抗ME的这种作用。这可能是ME影响KA致痫能力的因素之一，即ME注入双侧海马后使HPCs呈一定程度的脱抑制状态，有利于KA所致兴奋电活动的同步和扩散，从而易化了癫痫的发生。单独电泳NLX对HPCs无明显影响，提示正常情况下海马的阿片肽系统对HPCs无紧张性作用。一般认为在应激状态下，内源性阿片肽系统才被激活[6]。

3.2 电泳KA对HPCs的作用及ME、NLX对其作用的影响

电泳KA对全部记录的60个单位有强烈的兴奋作用，表明海马内存在许多对KA高度敏感的神经元。特别是KA在海马内未记录到HUD的部位也可诱出单位放电，提示KA激活"静息神经元"是其致痫机制之一。海马内突触区域有丰富的KA受体[7]，而CA3区HPCs对KA有高度的敏感性。高浓度的KA可使HPCs过度去极化而失去产生动作电位的能力[8]，本实验亦观察到类似现象。

电泳ME在被试单位的多数(65.00%)能加强KA的兴奋作用。NLX可以拮抗ME的上述作用。说明ME的效应由特异的阿片受体介导。ME对KA兴奋效应的协同可能与其在海马的脱抑制功能有关。单独电泳NLX可在大多数海马单位(60%)削弱KA的兴奋作用，提示内源性阿片肽系统可能被KA激活并易化KA的兴奋作用。我们首先提出这一观点，有待进一步检验。据此推测，双侧海马内注射ME对KA致痫能力的加强及NLX对KA致痫能力的削弱，与ME、NLX在细胞水平对KA在海马中作用的调节有关。

3.3 电泳GLU对HPCs的作用及ME、NLX对其作用的影响

海马内泳入GLU对全部记录到的50个HPCs有较强的兴奋作用。ME泳入海马可在88%的单位加强GLU的兴奋作用，此效应皆可被NLX拮抗，说明ME的这种作用主要由μ受体介导。文献[9]证明，μ受体激活可以显露N-甲基天门冬氨酸(NMDA)受体，推测ME或许通过此种机制协同GLU的兴奋作用。单独电泳NLX可在56%的单位削弱GLU的兴奋作用，提示内源性阿片肽可被GLU激活并对GLU的兴奋作用形成正反馈。有研究表明，KA致痫过程中，GLU具有一定协同作用[10]，因此，ME、NLX对GLU在海马中作用的调节可能会影响KA的致痫作用。

参考文献：

[1] Yajima Y, Narita M, Takahashi-Nakano Y, *et al*. Effects of differential modulation of mu-, delta- and kappa-opioid systems on bicuculline-induced convulsions in the mouse[J]. Brain Res, 2000, 862(1-2): 120—126.

[2] Di Giannuario A, Pieretti S, Sagratella S, *et al*. Dexamethasone blocking effects on mu- and delta-opioid-induced seizures involves kappa-opioid activity in the rabbit[J]. Neuropsychobiology, 2001, 43(3): 213.

[3] 高恩泉，廖维宏. 甲啡肽、纳络酮对红藻氨酸诱发大鼠癫痫活动的影响[J]. 第三军医大学学报，1997, 19(5): 513—515.

[4] Pellegrino L J. A stereotaxic atlas of the rat brain[M]. New York: Plenum Press, 1997. 25—30.

[5] Zieglgansberger W, French E D, Siggins G R, *et al*. Opioid peptides may excite hippocampal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons [J]. Science, 1979, 205(4404): 415—417.

[6] Tortella F C, Long J B, Holaday J W. Endogenous opioid systems: physiological role in the self-limitation of seizures[J]. Brain Res, 1985, 332(1): 174—178.

[7] Berger M, Ben-Ari Y. Autoradiographic visualization of [^{3}H] kainic acid receptor subtypes in the rat hippocampus[J]. Neurosci Lett, 1983, 39(3): 237.

[8] Robinson J H, Deadwyler S A. Kainic acid produces depolarization of CA3 pyramidal cells in the *vitro* hippocampal slice[J]. Brain Res, 1981, 221(1): 117.

[9] Swearengen E, Chavkin C. Comparison of opioid and GABA receptor control of excitability and membrane conductance in hippocampal CA1 pyramidal cells in rat[J]. Neuropharmacology, 1989, 28(7): 689—697.

[10] Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy[J]. Neuroscience, 1985, 14(2): 375—403.

(编辑 郭建秀)

(上接189页)

者认为肌上皮瘤发病率低的原因是因为对肿瘤性肌上皮细胞认识不足，从而误诊为其它涎腺肿瘤。诊断标准的不统一，也造成了假阴性率的增高。多数肌上皮瘤根据细胞的特征及组织形态在光镜下即可作出诊断。但当肌上皮细胞的典型特征消失时，光镜水平的诊断就很困难，这时它的诊断就依赖于超微结构的观察。部分学者主张须在电镜观察到肌微丝、桥粒和基板才能确诊[2]。发生在大涎腺区及颈部的囊性肌上皮瘤易与舌下腺、颌下腺囊肿及鳃裂囊肿混淆，临床上应予注意。穿刺是有效的鉴别手段。作穿刺抽吸时，鳃裂囊肿可见有黄色或棕色的、清亮的、含或不含胆固醇的液体；舌下腺囊肿为粘稠而略带黄色、蛋清样唾液；颌下腺罕见囊肿[3]。B超可辅助诊断。肌上皮瘤有潜在生物学行为，呈临界瘤表现。在治疗上，强调不能单纯摘除肿瘤，而应行肿瘤及周围腺体的切除，即在正常范围内切除，防止复发[4]。

关键词：颌下；肌上皮瘤

中图法分类号：R738.7；R739.81 文献标识码：B

参考文献：

[1] 俞光岩. 涎腺疾病[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1994. 132—134.

[2] 汤晓飞，朱 虹. 涎腺肌上皮瘤光镜和电镜观察[J]. 现代口腔医学杂志，1995, 9(4): 199—200.

[3] 邱蔚六. 口腔颌面外科学[M]. 北京：人民卫生出版社，1995. 300.

[4] 伊 丽，唐友盛，王 英. 腮腺肌上皮瘤16例临床病理分析[J]. 青岛医学院学报，1997, 33(1): 78—79.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net