DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.018
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0155-03

论著

吗啡对大鼠培养海马神经元钙离子作用机制的研究

谢 燕[1],余争平[1],朱光绪[1],方 强[1],江海洪[2] (第三军医大学:[1]预防医学系劳动卫生学教研室;[2]科技部;重庆 400038)

提 要:目的 研究吗啡对海马神经元游离钙离子浓度([Ca^{2+}]i)影响的机制,探索吗啡成瘾的神经生物学机制及对吗啡成瘾可能的治疗途径。方法 运用新型荧光探针Fluo-4,利用激光共聚焦显微镜研究吗啡对大鼠培养海马神经元[Ca^{2+}]i作用机制。结果 10 μmol/L吗啡急性刺激引起海马神经元[Ca^{2+}]i升高,μ阿片受体选择性拮抗剂CTOP(1 μmol/L)不能阻断吗啡引起的细胞内[Ca^{2+}]i增加,而δ2阿片受体选择性拮抗剂Naltrindole(1 μmol/L)阻断了吗啡引起的细胞内[Ca^{2+}]i反应;特异性的内质网钙泵抑制剂Thapsigargin(TG,1 μmol/L)预处理海马神经元阻断吗啡引起的细胞内[Ca^{2+}]i增加,L-钙通道阻断剂Verapamil(20 μmol/L)预处理海马神经元不能完全抑制吗啡引起的细胞内[Ca^{2+}]i增加;100 μmol/L吗啡长时程(24 h)作用于海马神经元,细胞内[Ca^{2+}]i升高,加入10 μmol/L纳络酮急性戒断后,不能阻断细胞内[Ca^{2+}]i升高,反而引起[Ca^{2+}]i异常升高。结论 吗啡急性刺激引起的海马神经元内钙增加主要来源于δ2阿片受体介导的IP_3敏感的钙库释放。

关键词:吗啡;海马神经元;钙离子;阿片受体;激光扫描共聚焦显微镜
中图法分类号:R322.81;R446.8;R996 文献标识码:A

Mechanisms of morphine-evoked changes of intracellular calcium in primary cultured hippocampal neuronal cells

XIE Yan, YU Zheng-ping, ZHU Guang-xu, FANG Qiang, JIANG Hai-hong (Department of Labour Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract **Objective** To investigate the acute and chronic effects of morphine on the intracellular free calcium concentration [Ca^{2+}]i in primary cultured hippocampal neuronal cells and explore the neurobiological mechanism of morphine addiction and treatment. **Methods** Changes of [Ca^{2+}]i induced by morphine in primary cultured hippocampal neuronal cells were detected with confocal laser scanning microscopy by using Ca^{2+}-sensitive dye fluo-4 as a new calcium fluorescent probe. **Results** Actually 10 μmol/L morphine induced the increase of [Ca^{2+}]i in hippocampal neuronal cells. Morphine induced increase of [Ca^{2+}]i were blocked by δ opioid receptor antagonist (1 μmol/L), but not by μ opioid receptor antagonist CTOP(1 μmol/L). Pretreatment on the cells with 1 μmol/L thapsigarin almost blocked the morphine-evoked response; by contrast, pretreatment on the cells with 20 μmol/L verapamil increased [Ca^{2+}]i. After the cells being exposed to 100 μmol/L morphine for 24 h, [Ca^{2+}]i were increased, which could be further intensified with 10 μmol/L naloxone addition. **Conclusions** Morphine induced release of Ca^{2+} is mainly from inositol 1, 4, 5-trisphosphate(IP_3) sensitive stores in rat cultured hippocampal neurons through the activation of δ_2 subtype opioid receptor.

Key words morphine; hippocampal neurons; calcium; opioid receptor; laser scanning confocal microscope

吗啡长期使用易导致镇痛耐受、心理\身体依赖、戒断综合征和自身给药行为,吗啡依赖和耐受的机制很复杂,目前尚未完全清楚。文献[1~3]表明钙离子拮抗剂能够降低吗啡依赖和耐受的程度,海马在吗啡依赖和耐受形成中起重要作用。采用原代培养海马神经元研究吗啡对海马神经元[Ca^{2+}]i作用的动态变化,可更直接准确获得吗啡对海马神经元[Ca^{2+}]i作用证据,探索吗啡成瘾的神经生物学机制及对吗啡成瘾可能的治疗途径,本研究利用激光扫描共聚焦显微镜(Laser scanning confocal microscope, LSCM)技术动态观察吗啡急性和长时程作用对培养海马神经元[Ca^{2+}]i的影响,并对其机制进行研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基,胎牛血清购自美国Hyclone公司;Fluo-4/AM,A23187,Pluronic F-127购自美国Molecular probes公司;多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine),阿糖胞苷,Naltrindole,CTOP(D-Pen-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH2)购自美国Sigma公司;EGTA为国产分析纯。盐酸吗啡为国产试剂。

1.2 仪器

激光共聚焦扫描显微镜(德国Leica TCS-NT型)。

1.3 新生大鼠海马神经元的培养

取当日出生的Wistar大鼠,断头处死,分离海马,剪碎,以0.125%胰蛋白酶消化,分离为单细胞,以0.5×10^6个/ml的细胞数接种于铺有多聚赖氨酸的无菌塑料培养皿上,置含有95%空气:5%CO_2、37 ℃恒温湿化的孵育箱内孵育。接种24 h后改用培养液,培养至第5天加入阿糖胞苷,抑制胶质细胞生长,培养6~10 d后神经细胞之间突触联成网状,即可用于实验。

1.4 实验分组

实验分为:①吗啡急性作用组:10 μmol/L吗啡刺激海马神经元;②吗啡慢性作用组:100 μmol/L吗啡作用海马神经元24 h;③纳络酮戒断组:吗啡慢性作用海马神经元后,加入10 μmol/L纳络酮;④阿片受体拮抗剂预处理组:在吗啡作用前分别加入1 μmol/L Naltrindole,1 μmol/L CTOP预处理海马神经元30 min;⑤钙通道阻断剂预处理组:在吗啡作用前分别加入20 μmol/L Verapamil,1 μmol/L Thapsigargin预处理海马神经元

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800039)
作者简介:谢 燕(1968-),女,四川省西昌市人,博士,讲师,主要从事学习记忆分子机制方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752289
收稿日期:2001-03-01;修回日期:2001-06-05

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

30 min 或 1 h。每组 6 皿细胞。

1.5 海马神经元[Ca^{2+}]i 测定[4]

负载：将单层培养的大鼠海马神经元用 Hanks 液漂洗 2～3 次，洗去细胞表面的杂质，放入含有 2 μmol/L Fluo-4/AM 和 2 ml Pluronic F-127(200 g/L)的 1 ml Hanks 液中，37 ℃负载 45 min，用不含荧光探针的 Hanks 液洗涤 2～3 次，充分洗去没有进入细胞内的荧光探针，上机检测。激光共聚焦扫描显微镜检测：荧光探针 Fluo-4/AM 的激发波长 494 nm，发射波长 516 nm，扫描间隔时间为 12 s，按下公式计算 Ca^{2+} 浓度：[Ca^{2+}]i = Kd(F-Fmin)/(Fmax-F)，F：检测到的荧光强度，Fmax：加入 5 mmol/L $CaCl_2$ 缓冲液和 Ca^{2+} 载体 A23187 后细胞内饱和时的荧光强度，Fmin：加入 10 mmol/L EGTA 使荧光淬灭后的荧光强度，Fluo-4 的 Kd 值为 345 nmol/L。

1.6 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Microsoft Excel 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 吗啡急性和长时程作用引起培养海马神经元内钙升高

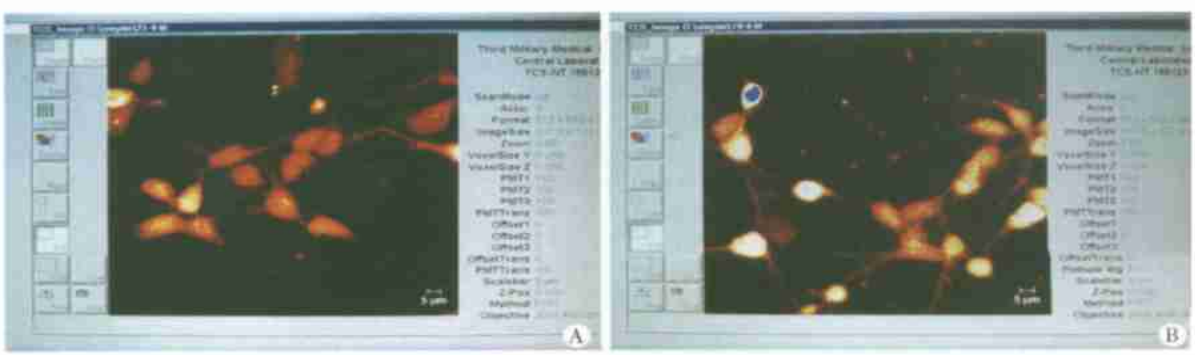
从表 1 可知，100 μmol/L 吗啡作用海马神经元 24 h，海马神经元荧光强度增强，[Ca^{2+}]i 浓度升高，见图 1；加入 10 μmol/L 纳络酮急性戒断 15 min，海马神经元[Ca^{2+}]i 异常增高。在培养的海马神经元中加入 10 μmol/L 吗啡刺激，发现数 10 s 内海马神经元荧光强度逐渐增强，并产生[Ca^{2+}]i 峰(Calcium transient)，细胞内[Ca^{2+}]i 最大值比基础值增加 8 倍，图 2 为吗啡刺激单个海马神经元典型的钙离子动态变化图。在吗啡刺激前分别加入 μ 阿片受体选择性拮抗剂 CTOP(1 μmol/L)和 δ2 阿片受体选择性拮抗剂 Naltrindole(1 μmol/L)，CTOP 不能阻断吗啡引起的细胞内[Ca^{2+}]i 增加，Naltrindole 阻断吗啡引起[Ca^{2+}]i 增加，见表 1。

表 1 吗啡急性和长时程作用对海马神经元[Ca^{2+}]i 的影响(n=6，$\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Acute and chronic effects of morphine on [Ca^{2+}] i in primary cultured hippocampal neuronal cells(n=6，$\bar{x} \pm s$)

	Fluorescence value	[Ca2+] i (nmol/L)
Control	75.33±13.21	123.65±20.99
Actue morphine (10 μmol/L)	165.25±29.08 **	951.77±90.78 **
CTOP+Actue morphine	147.75±31.73 **	622.78±70.56 **
Naltrindole+Actue morphine	68.55±9.09	100.41±12.56
Chronic morphine (100 μmol/L)	140.25±33.40 **	526.64±85.66 **
Chronic morphine+Naloxone	176.75±22.56 ##	1 342.40±159.68 ##

**：P< 0.01 *vs* control；##：P< 0.01 *vs* chronic morphine



A：Untreated (Control)；B：The cells exposed to 100 μmol/L morphine for 24 h

图 1 培养海马神经元[Ca^{2+}]i 的荧光强度

Fig 1 Fluorescence value of [Ca^{2+}] i in rats cultured hippocampal neuronal cells

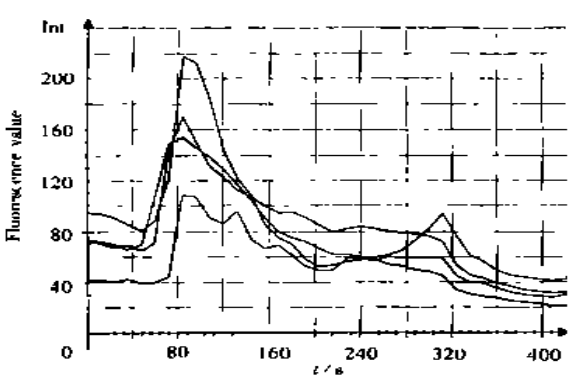


图 2 吗啡急性作用引起海马神经元[Ca^{2+}]i 增加

Fig 2 Acute effect of morphine on [Ca^{2+}] i in rats cultured hippocampal neuronal cells

2.2 Verapamil 预处理海马神经元对吗啡诱导[Ca^{2+}]i 增加的影响

用 Verapamil(20 μmol/L)预处理海马神经元 30 min，阻断 L-钙通道，不能阻断吗啡(10 μmol/L)的升[Ca^{2+}]i 作用，海马神经元荧光强度由 82.75±25.88 升高到 146.75±19.68(n=6，P<0.01)，细胞[Ca^{2+}]i 由(149.80±26.89) nmol/L 升高到(608.75±60.42) nmol/L(n=6，P<0.01)。但缩短吗啡引起细胞[Ca^{2+}]i 升高持续的时间。单个海马神经元典型的钙离子动态变化见图 3。

2.3 Thapsigargin 预处理海马神经元对吗啡诱导[Ca^{2+}]i 增加的影响

当用特异性的内质网钙泵抑制剂 Thapsigargin (TG，1 μmol/L)预处理神经元 1 h，吗啡(10 μmol/L)升高海马神经元细胞内[Ca^{2+}]i 的作用被抑制，海马神经元[Ca^{2+}]i 维持在基础值(94.45±9.37) nmol/L(n=6，P>0.05)。单个海马神经元典型的钙离子动态变化见图 4。

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

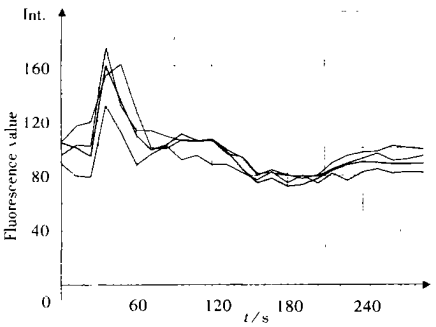


图 3　Verapamil 预处理海马神经元对吗啡诱导[Ca^{2+}] i 增加的影响

Fig 3　Effects of verapamil (20 μmol/L) pretreatment of morphine induced increase in [Ca^{2+}] i in rats cultured hippocampal neuronal cells

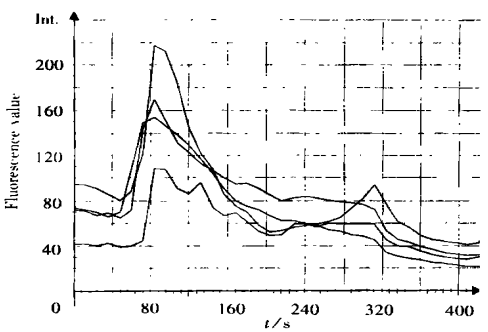


图 4　Thapsigargin 预处理海马神经元对吗啡诱导[Ca^{2+}] i 增加的影响

Fig 4　Effects of thapsigargin (1 μmol/L) pretreatment on morphine induced increase in [Ca^{2+}] i in rats cultured hippocampal neuronal cells

3　讨论

Ca^{2+} 在中枢神经系统功能中起着重要作用, 参与神经信号的传递和神经递质的释放。吗啡对神经细胞株[Ca^{2+}] i 影响已有文献报道, 吗啡能够改变神经母细胞瘤和神经胶质瘤 NG108-15、SH-SY5Y 等细胞内[Ca^{2+}] i 动态平衡[5,6]。阿片类药物可以增加培养的Ⅰ型星状胶质细胞[Ca^{2+}] i。学习记忆在吗啡成瘾中起重要作用, 海马是学习记忆形成的重要部位, 海马在吗啡成瘾中很重要。Lu[2] 和 Fan 等[3] 发现抑制大鼠海马内 CaMKⅡ活性可以减轻吗啡诱导的依赖和耐受。我们已证实原代培养的海马神经元存在 μ、κ、δ阿片受体(另文), 用原代培养的海马神经元研究吗啡对海马[Ca^{2+}] i 作用机制非常有意义。采用第 4 代荧光探针 Fluo-4 与激光共聚焦扫描技术结合, 能够更好地监测 Ca^{2+} 空间分布和细胞内 Ca^{2+} 浓度的连续变化。但迄今为止, 用 LSCM 技术动态检测吗啡对原代培养海马神经元[Ca^{2+}] i 变化及其机制的研究尚未见报道。本研究结果发现吗啡急性刺激引起海马神经元[Ca^{2+}] i 升高, μ 阿片受体选择性拮抗剂 CTOP(1 μmol/L)不能阻断吗啡的升钙, 而 δ 阿片受体选择性拮抗剂 Naltrindole(1 μmol/L)完全阻断了吗啡的升钙作用, 提示吗啡对海马神经元[Ca^{2+}] i 的作用可能通过 δ 阿片受体介导。Bilecki 等[7] 的研究发现在 NG108-15 神经细胞株上吗啡是通过激活 δ 阿片受体引起 cAMP 反应元件结合蛋白磷酸化, Ca^{2+} /钙调蛋白参与此过程。也有文献表明吗啡引起 Ca^{2+} 的增加是 μ 受体介导的[8]。L-型 Ca^{2+} 通道阻断剂 Verapamil 不能阻断吗啡的升钙作用, 提示 L-型 Ca^{2+} 通道在吗啡急性刺激诱导细胞内钙增加中不起重要作用。Yang 等[5] 用膜片钳在 NG108-15 神经细胞株上发现吗啡对 L-型 Ca^{2+} 通道作用不明显; 进一步研究发现用特异的内质网钙泵抑制剂 TG 预处理海马神经元, 以耗竭细胞内钙库可抑制吗啡诱导的细胞内增加, 表明吗啡引起细胞内钙增加主要来源于 1, 4, 5 三磷酸肌醇(Inositol 1, 4, 5-trisphosphate, IP_3)敏感的钙库释放。Spencer 等[6] 在稳定表达 μ、δ、κ 受体的 3 种神经细胞株上, 用相应受体的选择性激动剂处理这 3 种细胞, 均引起 Ca^{2+} 的增加, 进一步研究发现[Ca^{2+}] i 的增加是细胞内钙库释放增多所致。吗啡长时程作用于海马神经元, 海马神经元[Ca^{2+}] i 升高, 加入纳络酮急性戒断后, 不但不能阻断[Ca^{2+}] i 升高, 反而引起[Ca^{2+}] i 异常升高, 表现出受体脱敏。由于神经细胞内[Ca^{2+}] i 与神经递质的释放有密切关系, 所以, 吗啡依赖或者戒断时, 神经细胞内[Ca^{2+}] i 的剧烈变化, 引起神经突触传递变化, 出现戒断症状。因此, 对神经细胞内[Ca^{2+}] i 检测, 除对阿片类药物的作用机制有研究意义外, 还可了解吗啡依赖治疗药物的疗效, 并为研究利用 Ca^{2+} 阻断剂治疗吗啡依赖及戒断症状提供可能途径。

参考文献:

[1] Lee S C, Yoburn B C. The effect of nimodipine on opioid antagonist-induced upregulation and supersensitivity[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 66(2): 347－351.

[2] Lu L, Zeng S, Liu D, *et al*. Inhibition of the amygdala and hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ attenuates the dependence and relapse to morphine differently in rats[J]. Neurosci Lett, 2000, 291(3): 191－195.

[3] Fan G H, Wang L Z, Qiu H C, *et al*. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence[J]. Mol Pharmacol, 1999, 56(1): 39－45.

[4] 邢　虹, 何其华, 于桂芬, 等. 中毒剂量谷氨酸引起大脑皮质神经细胞的钙振荡及其机制探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15(4): 294－296.

[5] Yang J C, Shan J, Ng K F, *et al*. Morphine and methadone have different effects on calcium channel currents in neuroblastoma cells[J]. Brain Res, 2000, 870(1－2): 199－203.

[6] Spencer R J, Jin W, Thayer S A, *et al*. Mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores in transfected neuro2a cells by activation of multiple opioid subtypes[J]. Biochem Pharmacol, 1997, 54(7): 809－818.

[7] Bilecki W, Hollt V, Przewlocki R. Acute delta-opioid receptor activation induces CREB phosphorylation in NG108-15 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 390(1－2): 1－6.

[8] Wang D, Tolbert L M, Carlson K W, *et al*. Nuclear Ca^{2+}/calmodulin translocation activated by mu-opioid (OP3) receptor[J]. J Neurochem, 2000, 74(4): 1 418－1 425.

(编辑　陈聪连)

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