DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.015
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
274 2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)03-0274-03

孤啡肽对大鼠急性吗啡耐受形成的影响

王 建[1],黎海蒂[1],徐海伟[1*],方勇飞[2],龚发云[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生理学教研室,[2]附属西南医院中西医结合科,重庆,400038)

提 要:目的 探讨孤啡肽在急性吗啡耐受形成中的作用。方法 本实验采用热甩尾观察和反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)等方法,对大鼠急性吗啡耐受形成中痛行为,海马孤啡肽(OFQ)mRNA表达进行检测,并通过侧脑室注射孤啡肽受体反义寡聚核苷酸,以抑制OFQ作用,来观察其对急性吗啡耐受形成的影响。结果 伴随急性吗啡耐受的形成,海马中OFQ mRNA呈现升高趋势。预先以孤啡肽受体反义寡聚核苷酸处理,AMT形成受抑制。结论 OFQ的升高是大鼠AMT形成的重要原因之一。

关键词:吗啡;急性耐受;海马;孤啡肽
中图法分类号:R341.43;R749.61;R971.2 文献标识码:A

Effects of orphanin FQ on the development of acute morphine tolerance in rats

WANG Jian, LI Hai-di, XU Hai-wei, FANG Yong-fei, GONG Fa-yun (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of orphanin FQ(OFQ) on the development of acute morphine tolerance(AMT). Methods Wistar rats were given 5 consecutive subcutaneous injections of morphine hydrochloric acid (6mg/kg) to establish AMT rat model. The pain threshold (PT) was determined by hot water-induced tail flick test and the expression of OFQ mRNA was measured by RT-PCR. Results PT was significantly increased 1 h after 5 consecutive s.c MOR in rats, which were treated by i.c.v OFQ receptor antisense oligo deoxynucleotides (ODNs) in advance. The expression of OFQ mRNA was increased 1 h after 5 consecutive injections. Conclusion The increase of OFQ may be an important reason in the development of AMT.

Key words: acute morphine tolerance; hippocampus; RT-PCR; OFQ

伴随阿片类药物应用产生的阿片耐受与依赖不仅是一个医学问题,更是一个日趋严重的社会问题。为获得新型镇痛药物及克服阿片成瘾性,人们对阿片耐受与依赖机制进行了大量研究。现认为阿片耐受的产生有两个基本原因:一是在大量或长期外源性阿片类作用后,内阿片系统的功能性下调。这种功能性下调主要包括内源性阿片肽的合成分泌下降、受体功能性下调、受体与G蛋白的偶联改变及胞内cAMP信息通路的上调等方面。二是体内一些抗阿片系统反应的增强,主要指一些阿片调节肽的功能性上调[1]。这些阿片调节肽主要包括:CCK、NPFF、Tyr-W-MIF-1和OFQ等。其中孤啡肽(Orphanin FQ, OFQ)是1995年才被发现的一类特殊的内源性阿片肽,具有抗经典阿片肽作用,它作为慢性吗啡耐受形成的重要原因已被确认,但它在急性耐受中的地位尚不明确[2]。边缘系统中的海马是脑内重要痛觉调制部位,长期以来,解剖学和电生理的研究已证实伤害性的体感或内脏刺激的信息都可到达海马,它通过阿片肽与非阿片肽调制痛觉[3],与内阿片系统有着密切联系,在吗啡耐受形成中起着作用。

本实验运用热甩尾法和RT-PCR等方法观察了大鼠急性吗啡耐受(Acute morphine tolerance, AMT)形成中,大鼠痛行为、海马β-EP含量和OFQmRNA表达变化,并通过侧脑室注射孤啡肽受体反义寡聚核苷酸,以抑制OFQ作用,来观察其对AMT形成的影响,对OFQ在AMT形成中的作用进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性Wistar大鼠740只,体重(180±30)g,随机分为5组,每组8只。①正常对照组:皮下注射生理盐水0.5 ml/kg;②单次吗啡组:盐酸吗啡6 mg/kg皮下注射;③多次吗啡组:盐酸吗啡6 mg/kg,每2 h一次,共注射5次;④OFQ受体反义寡核苷酸组(OFQ-R antisense组):于第1、3、5天侧脑室注射一次寡核苷酸20 μg,体积为10 μl,第6天进行实验。OFQ受体反义寡核苷酸片段序列为5′-ATGGAGCAGGAAAGAGG-3′,与大鼠OFQ受体mRNA的翻译起始区的第9-25碱基互补;⑤错配寡核苷酸组(Missense组):注射方法同前组,错配寡核苷酸序列为5′-ATC-GAGGAGGAGAGAGA-3′,不与OFQ受体mRNA结合[4]。

1.2 试剂和药品

盐酸吗啡(沈阳第一制药厂),重楼皂甙(重庆中药研究所),OFQ受体反义核酸(上海生工生物工程公司Sangon),RT-PCR试剂盒(Boehringer Mannbeim Germany),GADPH和OFQ引物(Sangon)。

OFQ: Sense: 5′-AAC CTG AAG CTG TGC ATC CT-3′
Antisense: 5′-CCT TTT CTG CAG CTG CTT CT-3′
Amplicon Length: 285 bp
GAPDH: Sense: 5′-ACG GCA AAT TCA ACG GCA CAG TCA-3′
Antisense: 5′-TGG GGG CAT CGG CAG AAG G-3′

基金项目:全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M094)
作者简介:王 建(1971-),男,重庆市人,硕士,助教,主要从事吗啡耐受机制的研究。电话(023):68752254
收稿日期:2001-07-20;修回日期:2001-10-23

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

Amplicon Length: 231 bp

1.3　急性耐受模型的制备

参照汤健等[5]报道方法, 以盐酸吗啡 6 mg/kg 对大鼠进行皮下注射, 连续 5 轮, 每轮间隔 2 h。

1.4　热甩尾法和侧脑室埋管

将大鼠置于特制固定器内 30 min, 安静后将鼠尾从尖端起约 5cm 长浸入热水浴(50±1)℃, 记数从尾巴浸入起到完全离开水面的时间。每只大鼠测定 3 次, 每次间隔 10 min, 以平均值作为基础痛阈。实验中测得值记为反应痛阈, 以 15 s 作为终止时间以防止组织损伤。计算出痛阈变化百分率: (反应痛阈－基础痛阈)/基础痛阈×100%。超过 200%按 200%计。

大鼠以戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 固定于立体定位仪上, 按 Bures 图谱于侧脑室(A 1.5, L1.5 H3.0)埋置不锈钢导管(外径 0.6 mm)一个, 用牙托粉固定, 动物肌注青霉素钠(30 000 U/只), 术后 3~7 d 实验。

1.5　反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)

实验毕, 大鼠断头活杀, 开颅取脑, 于冰台上分离出海马, 以 Tripure 液提取组织总 RNA, 氯仿-酚法分离 RNA。取 OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间, 且 RNA 完整电泳无明显 RNA 降解和 DNA 污染的样本进行逆转录酶反应, 随后进行多聚酶链反应。

1.6　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 经计算机样本 t 检验程序(PDA-2)进行统计学处理。

2　结果

2.1　OFQ 受体反义寡核苷酸(OFQ－Ranti)预处理对连续吗啡注射后痛阈反应的影响

以热甩尾法在给药后 1h 测量痛阈, 随着吗啡给药次数增加, 痛阈升高率逐渐下降, 第 5 次给药与第 1 次相比, 差异显著($P<0.01$)。而 OFQ-R anti 组与 Missense 组相比, 下降幅度变小, 第 5 次给药后, 前者痛阈明显要高($P<0.01$), 见图 1

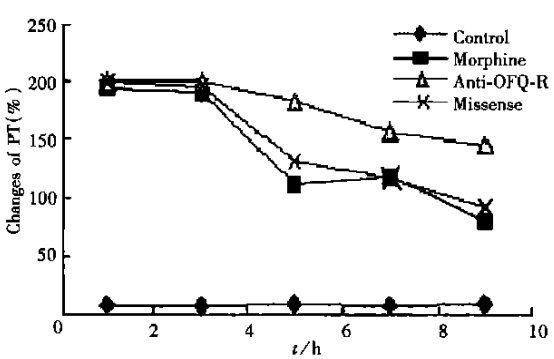


图 1　OFQ 受体反义寡核苷酸预处理对连续吗啡注射后大鼠痛阈反应的影响

Fig 1　Effects of OFQ-Receptor antisense ODNs pretreatment on the pain threshold in the rats with consecutive injection of morphine

2.2　连续注射吗啡对海马 OFQmRNA 表达的影响

应用 RT-PCR 方法, 对海马 OFQ mRNA 表达变化进行观察。为便于比较分析, 将各组结果一目的基因相对表达量(Rv)均换以百分率 Pv 表示, 设正常对照组为 100%, 其余各组 Pv 值为其 RV 值相当于正常对照 RV 值的百分率(Pvx= Rvx/Rvcontrol×100%, 下同)。单次吗啡组中, 海马 OFQ mRNA 表达与正常对照组相差不显著。AMT 组中海马 OFQ mRNA 表达明显增加, 与正常对照组相差非常显著($P<0.01$), 见表 1

表 1　大鼠急性吗啡镇痛耐受形成中, 海马 OFQ mRNA 表达的变化($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

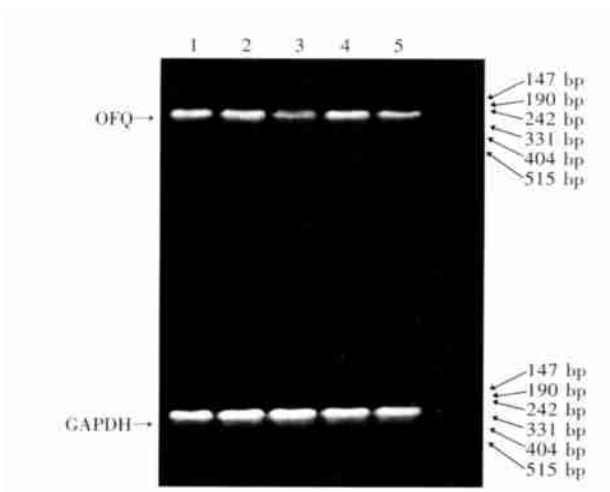
Tab 1　Changes of hippocampus OFQ mRNA expression in the development of AMT in rats($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

	Control	Signal morphine	AMT	Antisense	Missense
mRNA expression of OFQ(%)	100.0±0.0	105.1±9.2	167.8±13.3*	208.4±18.7☆	180.5±15.1

*: $P<0.01$ *vs* control; ☆: $P<0.05$ *vs* missense

2.3　OFQ 受体反义寡核苷酸(OFQ-Ranti)预处理对连续吗啡注射大鼠 β-EP 含量和 OFQmRNA 表达的影响

在预先 icv OFQ 受体反义寡核苷酸处理后, 测定其海马中 β-EP 含量为 18.81±4.11 pg/mg 蛋白, 与 icv 错配对照组(β-EP: 21.07±3.64 pg/mg 蛋白)相差不显著。OFQ-Ranti 组海马 OFQ mRNA 表达 Pv 值为 203.4%±18.7%, 而错配对照组 OFQ mRNA 表达 Pv 值为 180.5%±15.1%, 前者略高($P<0.05$), 见表 1, 图 2。



1: Solvent; 2: Antise; 3: Missen; 4: AMT; 5: Con

图 2　不同试验组大鼠海马内 OFQ mRNA 表达的变化

Fig 2　Changes of hippocampus OFQ mRNA expression in different experimental groups

3　讨论

吗啡耐受根据发生所需时间可分为急性耐受和慢性耐受。本实验采用汤健等人建立的模型, 其痛阈变化率与文献[5]报道相符, 证明此模型成功导致大鼠急性吗啡镇痛耐受的产生。

伴随外源性阿片类药物的使用, 内阿片肽系统将发生适应性功能下调, 体内抗阿片系统反应将被激活。OFQ 作为一类抗阿片肽在阿片耐受中倍受瞩目。OFQ

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

可抑制分别由选择性μ、δ和κ受体激动剂诱导的脊髓以上水平的镇痛作用。慢性吗啡应用可提高大鼠脑脊液、PAG、杏仁核 OFQ 免疫反应阳性样物质的含量[6]。与其它抗阿片肽(如 NPFF 和 Tyr-MEF-1)相似,阿片类药物慢性应用将增加 OFQ 的生成、释放和效力,而 OFQ 又可从一种系统水平抑制阿片药物的作用,从而产生耐受。运用基因敲除技术敲掉小鼠前孤啡肽原基因,则其耐受的形成受抑[7]。ICV OFQ 抗体可翻转 50%慢性电针镇痛耐受和几乎 100%急性电针镇痛耐受,也可翻转 50%慢性吗啡耐受的形成,但 OFQ 在急性吗啡耐受中的作用未见报道[8]。在本实验中,AMT 形成后,海马 OFQ mRNA 表达较正常明显升高,表明 AMT 同样可导致 OFQ 的表达增加。实验还应用 ICVOFQ 受体反义寡核苷酸的方法,进一步观察 OFQ 对耐受形成的影响。采用隔天注射 1 次即 5 d 内注射 3 次的给药方式,这是因为阿片受体蛋白的更新率约为 3 ~5 d[9],5 d 内注射 3 次可充分阻断阿片受体的表达[10]。结果显示,以 OFQ 受体反义寡核苷酸组预处理后,在多次吗啡作用后痛阈仍有较强升高,表示 AMT 形成受抑。表明 OFQ 受体介导的 OFQ 效应,参与机体在多次吗啡作用后诱发的对抗吗啡镇痛的作用,是 AMT 形成机制之一。此组海马β-EP 含量较对照组变化不明显,说明 OFQ 可能不直接影响β-EP。海马 OFQ mRNA 表达略有升高,这可能是 OFQ 作用被抑制后的代偿性合成增加。在本实验中,单次吗啡并未引起 OFQ mRNA 表达明显增高,这表明在单次吗啡条件下,尚不足以导致 OFQ 明显变化。

综上所述,可见在大鼠多次吗啡急性应用后,OFQ 生成增加,并通过 OFQ 受体产生抗阿片作用,这可能是 AMT 形成原因之一。

参考文献:

[1] Laura M, ABBA J, James E. Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and Antiopiates[J]. Reptides, 1998, 19(9): 1 603—1 630.
[2] Pei G, Kieffer B L, Lefkowitz R J. Agonist-dependent phosphorylation of the mouse δ-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor ki-nases but not protein kinase C[J]. Mol Pharmacol, 1995, (48): 173—177.
[3] 方 圆. 促肾上腺皮质激素的中枢抗阿生镇痛效应及其作用机制分析[M]. 生理科学进展, 1995, 26(2): 137—140.
[4] 田今华, 许 伟, 方 圆 等. 孤啡肽在大鼠脑内对抗吗啡镇痛[J]. 生理学报, 1997, 49(3): 333—338.
[5] 汤 健, 梁熙南, 张万琴 等. 大鼠针刺耐受与吗啡耐受[J], 北京医学, 1979, 1(1): 34—37.
[6] Reisine T, Bell G L. Molecular biology of opioid receptors[J]. Trends Neurosci, 1993, 16(12): 506—510.
[7] Ueda H, Yamaguchi T, Tokuyama S. Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene[J]. Neurosci Lett, 1997, 237(2-3): 136—138.
[8] Pei G; Kieffer B L; Lefkowitz R J. Agonist-dependent phosphorylation of the mouse δ-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C[J]. Mol Pharmacol, 1995, (48): 173—177.
[9] Standifer K M, Chien C C, Wahlestedt C. Selective loss of opioid analgesia and binding by antisenes oligodeoxynucleotides to a δ-opioid receptor[J]. Neuron, 1994, 12(4): 805—810.
[10] Adams J U, Chen X H, DeRie J K. Intracerebroventricular treatment with an antisense oligodeoxynucleotide to k-opioid receptor inhibited k-agonist-induced analgesia in rats[J]. Brain Res, 1994, 667(1): 129—132.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2002)03-0276-0

胆囊急性扭转 1 例报道

One case report of acute gallbladder torsion

岳 晖[1], 杨彤翰[2] ([1]解放军第 12 中心医院外一科, 新疆喀什 844200; [2]第三军医大学附属新桥医院肝胆外科, 重庆 400037)

患者,女,71 岁,因突发右侧腹疼痛 1 d 入院。疼痛呈持续性并有阵发性加剧,逐渐扩散至全腹部,伴恶心、呕吐。院外曾诊断为"急性阑尾炎",经对症抗炎治疗无缓解。既往无胆系、消化系统疾病。体检:体温 38 ℃,脉搏 90 次/min,呼吸 24 次/min,血压 17/10 kPa,急性痛面容,倦曲体位,全身皮肤及巩膜未见黄染,腹部凹陷,腹式呼吸受限,右侧腹部压痛,轻度肌紧张及反跳痛,以右中腹为甚,未触及包块,肝区叩击痛阳性,肠鸣音减弱。白细胞 13.6×10^9/L,中性粒细胞 96%,淋巴细胞 4%,急诊行剖腹探查术,见胆囊呈悬垂状,明显肿大,约 13 cm×8 cm,张力高,呈黑褐色,胆囊颈部与胆囊床之间有 1.5 cm 的膜状粘连带,胆囊管、胆囊动脉顺时针扭转 360°。诊断:胆囊急性扭转,坏死性胆囊炎。遂行胆囊切除术。术后病理检查:胆囊壁出血、坏死伴急性炎症。术后切口一期愈合,痊愈出院。

讨论

胆囊扭转临床上较为罕见。结合国内外文献分析,本病多

(下转 279 页)

作者简介:岳 晖(1971—),男,山东省济南市人,主治医师,发表论文 5 篇。
电话:13709983558

收稿日期:2001-08-27;修回日期:2001-11-03

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