DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.022
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
1436 2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1436-03

吗啡、纳络酮对培养星形胶质细胞谷氨酸摄取功能的影响

熊加祥,黎海蒂,吴 旋 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨不同浓度吗啡及纳络酮对培养星形胶质细胞摄取谷氨酸功能的影响。方法 分离培养海马星形胶质细胞,传代提纯达98%以上(免疫组化检测GFAP进行鉴定),通过掺入H^3-谷氨酸进行培养,观察吗啡、纳络酮及吗啡加纳络酮对星形胶质细胞摄取谷氨酸的影响。结果 单独应用吗啡、纳络酮均可增强星形胶质细胞摄取谷氨酸的功能($P<0.01$),联合应用则对吗啡或纳络酮的谷氨酸摄取有抑制作用。结论 吗啡、纳络酮可调节星形胶质细胞的谷氨酸的摄取。

关键词:吗啡;纳络酮;星形胶质细胞;谷氨酸
中图法分类号:R338;R971.2 文献标识码:A

Effect of morphine and naloxone on the glutamate uptake of cultured astrocytes *in vitro*

XIONG Jia-xiang, LI Hai-di, WU Xuan (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of morphine and naloxone of different concentrations on the glutamate uptake of astrocytes. Methods The hippocampus astrocytes were cultured and purified to more than 98% yield (confirmed with GFAP immunohistochemistry). The glutamate uptake of astrocytes cultured in the mediums of different doses of morphine, naloxone and their combination were studied with ^{3}H-glutamate incoporation. Results Either morphine or naloxone alone increased the glutamate uptake by astrocyte ($P<0.01$), while their combination inhibited it. Conclusion Morphine and nalxone can regulate the glutamate uptake by astrocytes.

Key words: morphine; naloxone; astrocyte; glutamate

吗啡是一种外源性的阿片类镇痛药,长期应用后易发生耐受和成瘾。近年来,关于吗啡在中枢神经系统的作用机制研究,主要集中在受体及递质方面。谷氨酸作为神经中枢最重要也是研究最多的兴奋性神经递质,在吗啡耐受和成瘾方面也有较多报道。特别是关于谷氨酸的代谢及其作用的谷氨酸受体的研究报道指出,吗啡可调节神经系统谷氨酸浓度的改变,影响中枢神经系统的生理活动,阻断谷氨酸对谷氨酸受体的作用,可减缓吗啡耐受和成瘾[1]。星形胶质细胞在代谢谷氨酸方面有重要作用,本实验通过离体培养星形胶质细胞,观察吗啡和纳络酮对其作用后在摄取谷氨酸的变化,为吗啡在中枢神经系统的作用机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器设备

盐酸吗啡(沈阳第一制药厂),纳络酮(Sigma公司,美国),H^3-谷氨酸(中科院上海原子核研究所,放射性比活度为20 mCi/mmol,1 Ci=3.7×10^{10}Bq),GFAP抗体试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),DMEM(Gibbico),闪烁液(本校核医学教研室配制),超净台,培养箱,培养瓶(板),倒置显微镜,液闪仪等。

1.2 细胞分离培养

Wistar大鼠(本校实验动物中心提供)3 d龄,前后共计8只。在无菌条件下取大脑分离出双侧海马,采用胰酶消化法进行细胞分离。组织块剪碎后用0.125%的胰酶消化15~20 min,以10%新生牛血清终止消化,吹打、过滤、离心,以(3~5)×10^4/cm^3的细胞密度接种在75 cm^3的培养瓶内,在37℃、5% CO_2饱和湿度培养箱内培养。参照屈卫东[2]报道的方法,使传代培养纯化至星形胶质细胞达98%以上后,将细胞种植于24孔培养板内。

1.3 实验分组

实验分4组,C组(对照组),M组(单纯加入吗啡,终浓度为0.5、1.0、2.0 μmol/L),N组(单纯加入纳络酮,终浓度为0.5、1.0、2.0 μmol/L)),N+M组(加入吗啡及纳络酮,二者终浓度均为0.5、1.0、2.0 μmol/L)。每组均为8孔。

1.4 实验方法

1.4.1 用免疫组化检测GFAP 采用常规免疫组化的ABC法。

1.4.2 观测细胞形态及细胞数量 利用倒置显微镜观察细胞形态及计数板对细胞进行计数。

1.4.3 采用H^3-谷氨酸摄取法测定细胞的摄取功能 采用熊晖报道的方法[3],将提纯的星形胶质细胞(一般为第4~5代)接种在24孔培养板中,细胞密度为(3~5)×10^4/cm^3,每孔液体1 ml,第2日随机选8孔/组,分组加药,18 h后即第3日每孔加入H^3-谷氨酸1 μCi,37 ℃孵育10 min,将每孔的液体吸去,用PBS洗涤3遍,0.125%胰酶消化5 min,含10%新生牛血清的DMEM终止消化,刮取细胞,搜集液体,细胞计数并进行液闪测量。

1.5 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,利用SPSS统计软件包进行t检验,或用直方图进行比较。

2 结果

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:熊加祥(1972—),男,四川省峨眉山市人,硕士,助教,主要从事神经生理的研究。电话:(023)68752254
收稿日期:2001-06-13;修回日期:2001-10-07

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

2.1　细胞形态

星形胶质细胞用药后过夜, 细胞形态也无明显变化: 倒置显微镜下见星形胶质细胞贴壁良好, 呈片状生长, 细胞有较多突起, 培养液澄清, 也未见死细胞漂浮。

2.2　细胞数量

星形胶质细胞经处理后, 统计各组间细胞数, 观察不同浓度的吗啡及纳络酮对细胞生长的影响, 见表 1。结果发现, 0.5、1.0 μmol/L 的吗啡及纳络酮对细胞生长无影响($P>0.05$), 而 2 μmol/L 的吗啡明显抑制细胞生长($P<0.05$), 纳络酮对其有翻转作用。

表 1　星形胶质细胞在不同浓度的吗啡、纳络酮及联合应用培养的细胞数($\times 10^5$/ml, $\bar{x}\pm s$)

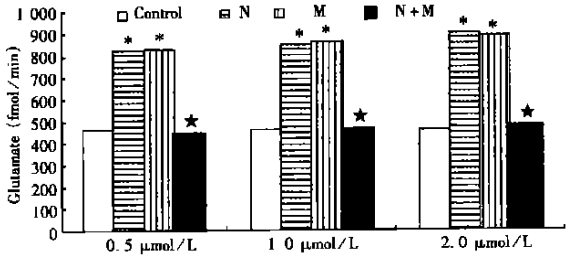
Tab 1　Counts of astrocytes in condition of morphine(M) or/ and naloxone(N) at different concentrations($\times 10^5$/ml, $\bar{x}\pm s$)

Concentration	n	N	M	N+M
Control	8	5.06±0.37	5.06±0.37	5.06±0.37
0.5 μmol/L	8	4.98±0.43	4.69±0.60	4.70±0.58
1.0 μmol/L	8	4.79±0.58	4.80±0.57	4.89±0.48
2.0 μmol/L	8	4.86±0.56	4.04±0.53*	4.88±0.49

*: $P<0.05$ *vs* control

2.3　不同浓度吗啡、纳络酮对星形胶质细胞摄取谷氨酸的影响

分别用 0.5、1.0、2.0 μmol/L 的吗啡、纳络酮作用于培养纯化的星形胶质细胞, 观察细胞对谷氨酸摄取的结果表明, 二者单独应用均增强其摄取功能($P<0.01$), 而组内各浓度未见明显差异($P>0.05$), 即在所用的低剂量条件下, 星形胶质细胞对谷氨酸摄取功能无剂量依赖关系, 吗啡、纳络酮单纯表现为增强星形胶质细胞摄取谷氨酸, 而吗啡、纳络酮在相同浓度联合应用后星形胶质细胞对谷氨酸摄取能力则恢复正常, 与对照组比较无明显差异($P>0.05$), 而与吗啡组、纳络酮组比较, 则相差显著($P<0.01$), 表明纳络酮与吗啡共同应用后可拮抗星形胶质细胞摄取谷氨酸, 见图 1。



*: $P<0.01$ *vs* control; ★: $P<0.01$ *vs* N and M

图 1　吗啡、纳洛酮影响星形胶质细胞摄取谷氨酸

Fig 1　Effect of morphine(M) or/ and naloxone(N) on the glutamate uptake by astrocytes

3　讨论

关于吗啡药理作用及耐受和成瘾研究, 国内外主要集中于神经递质系统、阿片受体系统及胞内信号转导系统。神经系统的正常活动有赖于神经元与胶质细胞的相互协调, 这一点已得到公认, 而这需要合适的信号介质在神经元与胶质细胞间传导, 对这些信号介质的研究是当今神经胶质领域的中心课题之一。在药物作用反应中, 星形胶质细胞是中枢神经系统唯一能耐受应激反应的细胞。其能量代谢和生物合成机制的稳定, 对中枢神经系统功能的正常发挥有重要作用。谷氨酸作为中枢神经系统内兴奋性神经递质之一, 参与中枢神经系统许多重要功能, 在胞外聚积可致兴奋毒作用。

研究报道, 星形胶质细胞具有摄取神经元外谷氨酸的功能, 通过胞内谷氨酰胺酶的作用, 转化为谷氨酸及抑制性神经递质 GABA 的前体-谷氨酰胺。Hauser KF[4] 报道, 吗啡对星形胶质细胞影响, 它经 μ-受体诱导 Ca^{2+} 的流动和胶质细胞的发育, 抑制 DNA 的合成和刺激细胞的肥大通过 Ca^{2+} 依赖机制。在本实验中发现一定浓度吗啡可抑制星形胶质细胞分裂生长, 而未影响其生存, 纳络酮对其有翻转作用, 也证实吗啡经 μ-受体抑制星形胶质细胞 DNA 的合成有关, 这是吗啡在中枢神经系统发挥作用途径之一。

近年来对兴奋性氨基酸受体在阿片类依赖的作用研究发现, 该类受体参与吗啡耐受与成瘾的发展。在吗啡耐受成瘾时兴奋性神经递质谷氨酸水平变化可引起神经兴奋。现有学者认为外源性阿片通过 μ 受体作用, 调节兴奋性氨基酸的释放, 从而影响多巴胺奖赏系统, 推测吗啡成瘾、身体依赖及强迫觅药物行为与该机制有关。Enrico 等[5] 研究外源性的低浓度吗啡作用于正常大鼠, 发现大脑纹状体灌流液的谷氨酸的浓度明显降低, 并且意外发现单独应用纳络酮后也同样降低灌流液的谷氨酸的浓度, 说明吗啡、纳络酮可能通过作用于 μ 受体, 一方面影响神经元释放谷氨酸, 另一方面则影响神经元、星形胶质细胞摄取谷氨酸。这一结论与我们所述结果相吻合, 即吗啡、纳络酮单独应用可增强星形胶质细胞摄取谷氨酸。另外, Tokuyama[6] 报道, 纳络酮处理吗啡依赖鼠后, 发现蓝斑核灌流液的谷氨酸浓度升高, 说明纳络酮能翻转吗啡升高谷氨酸作用。本实验结果证实纳络酮与吗啡共同应用能相互抑制培养星形胶质细胞摄取谷氨酸。关于内源性阿片类递质对星形胶质细胞的影响未见报道。至于纳络酮单独应用可增强星形胶质细胞摄取谷氨酸的作用机制, 不仅拮抗阿片受体发挥作用, 可能还有其他途径, 需进一步深入研究。

现研究报道已证实, 星形胶质细胞表面也有 μ-受体及兴奋性氨基酸受体表达。吗啡除作用于 μ 受体发挥作用外, 还能调节其表达。本文报道纳络酮与吗啡影响星形胶质细胞摄取谷氨酸, 推测星形胶质细胞的功能变化与吗啡在中枢神经系统作用及耐受成瘾有密切关系, 其作用机制可能是通过细胞表面的阿片受体发挥作用, 关于吗啡作用于星形胶质细胞后, 其表面的阿片受体及谷氨酸受体的表达还需进一步研究。通过吗啡对星形胶质细胞功能的影响, 调节谷氨酸浓度的研究, 为研究吗啡药理作用及其耐受成瘾、戒毒开辟另

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

一途径。本实验由于受吗啡针剂的影响，未进行高浓度的研究。

参考文献：

[1] Belozertseva I V, Danysz W, Bespalov A Y. Effects of short-acting NMDA receptor, dmiedebergs, Arch, Pharmacol, 2000 Jun, 361(6): 573－577.
[2] 屈卫东，彭晓东，吴德生，等. 星形胶质细胞、少突胶质细胞分离培养新方法研究[J]. 卫生研究，1999，28(5)：263－266.
[3] 熊 晖，梁卫兰，母得至，等. 体外培养星形胶质细胞缺氧/再给氧后谷氨酸摄取功能的变化[J]. 北京医科大学学报，1999，31(2)：137－140.
[4] Hauser K F, Stiene Martin A, Mattson M P, *et al*. Mu-Opioid receptor-induced Ca^{2+} mobilization and astroglial development: morphine inhibits DNA synthesis and stimulates cellular hypertrophy through a Ca^{2+}-dependent mechanism[J]. Brain-Res, 1996, 720(1－2): 191－203.
[5] Enrico P, Mara M A, Esposito G, *et al*. Effect of naloxone on morphine-induced changes in striatal dopamine metabolism and glutamate, ascorbic acid and uric release in freely moving rats[J]. Brain Res, 1998, 797(1): 94－102.
[6] Tokuyama S, Ho I K. Inhibitory effects of diltiazem, an L-type Ca^{2+} channel blocker, on naloxone－increased glutamate levels in the locus coeruleus of opioid-dependent rats[J]. Brain Res, 1996, 722(1－2): 212－216.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)12-1438-01

对 2 369 例有妊娠史及输血史患者额外抗体筛选的分析

Analysis of extra antibodies selection in 2 369 patients with the history of pregnancy and blood transfuion

肖瑞卿，吴 毅，林武存，隆晓秋 （第三军医大学附属西南医院输血科，重庆 400038）

输血前检测 ABO 以外的血型抗体，是临床安全输血的必要手段。我们从 1999 年 11 月份开始，对来我院就诊的有妊娠史输血史的血液科、肿瘤科及妇产科病人 2 369 例进行了 ABO 以外血型抗体筛选，并鉴定其抗体的特异性，现将结果报告如下。

1 材料与方法

选择妇产科、血液科、肿瘤科经常反复输血及有妊娠史的病人，男 238 例、女 2 131 例，共计 2 369 例。

材料：临床送来用双草酸抗凝的配血标本，用其血浆。谱细胞 3 个为 1 组和 Biovue 微珠柱状凝集系统，均由成都莱福公司提供，低离子溶液由我科血型参比室自制。

方法：将被检者血浆 40 μl、4% 的红细胞混悬液 10 μl、低离子溶液 1 滴，分别加入 Biovue 微珠柱状凝集系统，37 ℃孵育 10 min，用专用离心机离心 5 min，取出肉眼观察结果。

2 结果

通过对 2 369 例患者的额外抗体筛选，共检测出不规则抗体 12 例(0.51%)。其中有同种特异性血型抗体的 9 例，自身抗体 3 例，各科的详细分布、百分率及抗体性质详见表 1。

表 1 抗体检测科室分布与抗体性质

	科室分布			抗体性质				
	血液科	妇产科	肿瘤科	抗-D	抗-E	抗-c	抗 Mia	自身抗体
总例数	315	1 944	110					
抗体检测数	8(3*)	3	1	2	5	1	1	3*
百分率	2.35	0.15	0.90					

*：为自身抗体

3 讨论

人类由血型抗原引起的同种免疫可通过 3 个途径发生，妊娠、输血、特异免疫。最常见的是输入血型不合的血液，如：①Rh 血型 E 抗原阴性者，接受了 E 抗原阳性的血液。②在胎母血型不同的妊娠时，母亲在受胎儿抗原的刺激，往往会产生同种血型抗体，我们通过对 2 369 例妇产科、血液科、肿瘤科的患者做常规的额外抗体筛选，共检出不规则抗体 12 例，占总数的 0.51%。同种特异性血型抗体 9 例，Rh 血型抗体 8 例，占 88.89%，Rh 血型抗-E 抗体检测 5 例，高出其它抗体，与文献[1～2]报道有明显差异。Rh 血型产生同种抗体的机率最高，这就要求我们要重视额外抗体筛选工作。国家卫生部 2000 年 184 号文件《临床输血技术规范》中要求在交叉配血不合时对有输血史、妊娠史或短期内需要接受多次输血者，必须按规定做额外抗体筛选，为了保证输血安全，输血前，除鉴定 ABO 血型外，宜同时鉴定 Rh 血型，选择 Rh 血型相同的血液输用，以减少同种抗体的产生，保证临床虽血的安全。

关键词：额外抗体筛选；孕娠史；输血史
中图法分类号：R457.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 向 东，丁苏鄂，金 丽，等. 上海地区部分献血者中抗-D 发生频率及对输血的影响[J]. 中国输血杂志，1999，12(1)：35－36.
[2] 王红梅，胡兆平，廖艳秋，等. 夫妇 ABO 血型不合的孕妇产前免疫学检查分析[J]. 中国输血杂志，2000，13(1)：30.

（编辑 谢义霞）

作者简介：肖瑞卿(1951－)，女，山东省荣城市人，主任技师，主要从事血型血清学方面的工作，发表文章 40 余篇。电话：(023)68754198
收稿日期：2001-10-30；修回日期：2001-12-01

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