

吗啡对大鼠背根节和脊髓抗氟化物 酸性磷酸酶活性的影响^①

曾园山^②

(中山医科大学组织学胚胎学教研室,广州,510089)

提 要 经过递增性注射吗啡的大鼠,已对吗啡产生了依赖性。在此基础上,应用酶组织化学方法和图像分析仪(MIAS),观察和测量了对吗啡依赖大鼠背根节小神经元胞体及其传入纤维终末内抗氟化物酸性磷酸酶(fluorideresistant acid phosphatase, FRAP)活性的变化。实验结果显示:实验组大鼠背根节小神经元胞体虽然有FRAP阳性反应染色,但是比对照组大鼠明显减弱。实验组大鼠腰(L)₃、L₄、L₅脊髓Ⅰ板层FRAP阳性反应区染色也明显减弱;两侧Ⅰ板层的阳性反应物的分布范围虽然对称,但其面积比对照组大鼠减少10%。本文结果表明:吗啡可能有抑制背根节神经元合成FRAP的作用,从而导致其胞体及其传入纤维终末的FRAP活性降低。

主题词 吗啡; 抗氟化物; 酸性磷酸酶; 背根节, 脊髓Ⅰ板层; 大鼠

中图分类号 R322.85; 338.3

许多研究证实^[1],大鼠脊髓Ⅰ板层有很强的抗氟化物酸性磷酸酶(FRAP)活性。该酶是由背根节小神经元胞体合成,然后被运送到位于Ⅰ板层的初级传入纤维终末内。因此,FRAP可作为显示此类终末较理想的组化标记物。有学者应用FRAP酶组化方法观察到^[2],备用根大鼠(切断脊髓一侧腰段背根,仅保留L₄背根作为备用根)背根节神经元发出的初级传入纤维在脊髓Ⅰ板层侧支出芽。另有研究表明^[3],对吗啡依赖大鼠的脊髓提取液可以提高体外培养背根节神经元的存活率。作者应用对吗啡依赖大鼠制作备用根模型^[4],通过观察FRAP活性的变化,发现手术侧脊髓Ⅰ板层的FRAP阳性反应物面积有明显的恢复性增大,因而提示吗啡有促进备用根大鼠初级传入纤维在脊髓Ⅰ板层侧支出芽的作用。但是吗啡对非备用根大鼠的FRAP活性有否影响,仍未见有文献报道。为此,本文在建立大鼠对吗啡依赖模型的基础上,借助光镜观察和图像分析其背根节和脊

髓的FRAP活性变化,探讨吗啡与含有FRAP的背根节神经元的机能关系,为研究吗啡的作用机制提供新的资料。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

20只SD雄性大鼠,体重约200克,分实验组和对照组各10只。饲养于正常光、暗周期和笼养环境。

1.2 对吗啡依赖动物模型的制备

实验组大鼠腹腔内注射1%盐酸吗啡(沈阳第一制药厂产品),每天2次。吗啡用量是^[3]:第1天10mg/kg、第2天20mg/kg、第3天40mg/kg、第4天60mg/kg、第5天80mg/kg、第6天100mg/kg、第7天用维持量(100mg/kg)。对照组大鼠在腹腔内仅注射生理盐水。两组动物均存活7天。为了解注射吗啡的大鼠(实验组)在第7天时是否已对吗啡产生依赖,于第7天第1次注射吗啡的12h后,与注射生理盐水大鼠(对照组),均

① 本研究由国家自然科学基金资助

② 作者,1955年出生,男,博士,副教授

在腹腔内注射阿片受体拮抗剂 0.1% 盐酸纳洛酮(Sigma 公司产品)5mg/kg^[5], 给药后 30min 内计数大鼠的搔体次数。

1.3 取材和切片制备

1% 戊巴比妥钠麻醉两组动物。经左心室主动脉插管, 先快速灌注生理盐水(每 100ml 含 1% 亚硝酸钠 0.2ml、肝素 200U) 约 180ml, 接着用 4% 多聚甲醛、0.5% 戊二醛和 4% 蔗糖的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2) 约 400ml 灌注固定。切取 L₄ 背根节及 L₃、L₄、L₅ 脊髓段, 浸于 15% 蔗糖磷酸缓冲液(0.1mol/L, 4℃) 过夜, 恒冷箱切片机切出厚为 20μm 的切片。连续纵切背根节和横切脊髓段。每脊髓段共取 12 张切片(每隔 4 张取 1 张)。所有切片经 FRAP 酶组化方法处理和显色^[2,4]。

1.4 观察和图像分析(MIAS-300)

光镜观察背根节和脊髓 FRAP 阳性反应染色的强弱, 测量每脊髓段 6 张切片两侧 I 板层 FRAP 阳性反应物的面积(像点数为单位)。数据输入 IBM 计算机进行统计学 *t* 检验。

2 结果

2.1 对吗啡依赖大鼠的行为观察

经过 7 天递增性注射吗啡的大鼠, 当停用吗啡 12h 后, 注射纳洛酮催瘾, 可观察到大鼠在用药 3min 后开始出现烦躁不安, 爬笼壁, 行走时全身颤抖, 流涎。在 30min 内出现 4±2 次搔体现象(表 1, 图 1)。注射生理盐水

的大鼠当给予纳洛酮后, 没有出现上述情况, 活动如常。

表 1 注射纳洛酮后 30min 内大鼠出现的搔体次数

动物编号	实验组	对照组
1	7	0
2	2	0
3	6	0
4	3	0
5	2	0
$\bar{x} \pm s$	4±2	0±0

2.2 背根节和脊髓 FRAP 阳性反应物的分布

对照组大鼠背根节内可见不同大小的神经元胞体, 其中有许多小神经元胞体出现较为均一的 FRAP 阳性反应染色, 这些神经元呈散在性分布, 而邻近的大神经元胞体为 FRAP 阴性反应(图 2)。实验组大鼠背根节小神经元胞体虽有 FRAP 阳性反应染色, 但比对照组大鼠明显减弱(图 3)。

对照组大鼠 L₃、L₄、L₅ 脊髓段平面的 FRAP 阳性反应物位于 I 板层内, 形成一条与 I 板层形状一致的染色区, 切片上呈横位的鱼钩状。钩柄朝内, 钩朝外, 尖向腹, 两侧对称(图 4)。两侧阳性反应物的面积没有显著性差异(表 2)。实验组大鼠上述脊髓段平面 FRAP 阳性反应区染色明显减弱(图 5), 两侧的阳性反应物面积虽然没有显著性差异, 但比对照组大鼠明显减弱(约为对照组的 90%)。

表 2 脊髓 I 板层 FRAP 阳性反应物面积(像点数, $\bar{x} \pm s$)

动物分组	脊髓段	切片数	左侧面积	右侧面积	P ¹⁾ 值
对照组	L ₃ 、L ₄ 、L ₅	90	2760±75 (100%)	2817±83 (100%)	>0.05
实验组	L ₃ 、L ₄ 、L ₅	90	2486±79 (90%)	2519±84 (89%)	>0.05
P ²⁾ 值			<0.02	<0.02	

注: 1) 同组两侧结果的比较; 2) 两组同侧结果的比较

3 讨 论

吗啡具有依赖性。当多次用药后突然停用吗啡,动物就会出现中枢极度兴奋和各种难以耐受的痛苦表情,这些异常的生理和心理干扰现象称为戒断症状^[5]。若用纳络酮,可使戒断症状出现更早、更剧烈。本实验也观察到注射吗啡大鼠在用纳洛酮后,即发生烦躁不安,爬笼壁,行走时全身颤抖,流涎等行为改变。同时还出现摇头现象,据认为这是吗啡戒断症状的一种特征性表现,可作为判断大鼠是否对吗啡产生依赖的指标之一^[5]。因此,本文经过递增性注射吗啡的大鼠已对吗啡产生依赖性。

作者曾用对吗啡依赖的大鼠制作备用根模型,即切断一侧腰段背根(L₁~L₃、L₅、L₆),保留L₄(备用根)^[4]。结果观察到,手术侧脊髓I板层的FRAP阳性反应物面积因切除了腰段的大部分背根而减少,但不久却得到明显的恢复性增大。这除了表明吗啡能够促进备用根含FRAP的初级传入纤维在脊髓I板层侧支出芽外,同时也提示吗啡可能有增强FRAP活性的作用。然而,本结果却表明,吗啡对非备用根大鼠背根节神经元胞体和脊髓I板层的FRAP活性有抑制作用,从而为前文^[4]排除了后一种可能性。

FRAP存在于感受和传递伤害性刺激的背根节神经元的胞体及其传入纤维终末内的事实,早已被证实^[1],但其作用至今仍不清楚。有学者观察到^[6,7],在慢性疼痛和炎症的刺激下,动物脊髓I板层FRAP的活性明显增强。另一些学者应用选择性兴奋无髓传入纤维(传递伤害性刺激的C纤维)的神经毒——辣椒素作用新生动物的外周神经,发现其可耗竭背根节小神经元胞体和脊髓I板层的FRAP,使其活性减弱^[8,9]。这些迹象表明,FRAP的活性与伤害性刺激的传递有联系。故最近有学者认为^[10],FRAP可能是传递伤害性信息的一种神经调质。吗啡能与感受伤害性刺激的背根节神经元的阿片受体结合,

对伤害性信息的传递有阻断作用^[11],因而起到镇痛作用。但此过程是否会影响FRAP的活性,目前还未见有文献报道。本文观察到,应用吗啡后,背根节神经元胞体以及它们的投射区脊髓I板层的FRAP活性是明显降低的,这表明吗啡有可能抑制了该神经元合成FRAP,结果导致其胞体及其传入纤维末的FRAP减少。这种现象是否与吗啡阻断伤害性信息的传递有关,还有待研究探讨。

(本文图见第80页)

参 考 文 献

- 1 Knyihar-Csillik E, Csillik G. FRAP: Histochemistry of the primary nociceptive neuron. *Pro Histochem Cytochem*, 1981,14(1): 1
- 2 McNeill DL, Hulsebosch CE. Intrasprouting of rat primary afferents after deafferentation. *Neurosci Lett*, 1987,81: 57
- 3 Hendry IA, Duggan AW, Hall JG. Morphine dependence in the rat: The appearance in the spinal cord of a dorsal root ganglion cell neurotrophic factor. *J Neurosci Res*, 1987,18(3): 439
- 4 曾园山,吴良芳. 吗啡对备用根大鼠脊髓I板层背根终末的影响——抗氟化物酸性磷酸酶组化定量研究. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1992,1(2): 203
- 5 金文桥,金国章,洪庚辛. 麻醉性镇痛剂的成瘾性试验. 见:徐叔云,卞如濂,陈修(主编). *药理实验方法学*,第2版. 北京:人民卫生出版社, 1991. 707~712
- 6 Kantner RM, Kibby ML. Changes in acid phosphatase activity in the substantia gelatinosa in response to pain. *Brain Res*, 1982,238(2): 451
- 7 Schoenen J, Van Hees J, Gybels J, et al. Histochemical changes of substance P, FRAP, serotonin and succinic dehydrogenase in the spinal cord of rats with adjuvant arthritis. *Life Sci*, 1985,36(13): 1247
- 8 Nagy JI, Hunt SP, Iversen LL, et al. Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing primary afferent

- neurons after neonatal capsaicin. *Neurosci*, 1981,6(4): 1923
- 9 Fitzgerald M. Capsaicin and sensory neurons — a review. *Pain*,1983,15(2): 109
- 10 赵志奇. 痛觉及其调制. 见:韩济生(主编). 神经科学纲要. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993. 535
- 11 Jessell TM, Iversen LL. Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature*,1977,268(5620): 549
- (1994-03-15 收稿 1994-07-21 修回)

EFFECTS OF MORPHINE ON FLUORIDE-RESISTANT ACID PHOSPHATASE (FRAP) ACTIVITY IN DORSAL ROOT GANGLION AND SPINAL CORD OF RAT

Zeng Yuanshan

(Department of Histology and Embryology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Rats were made dependent on morphine by repeated injection with increasing dosage of morphine. On the basis of morphine dependent rats, the changes of FRAP activity at the some of small sized neurons of dorsal root ganglion (DRG) and its terminal of primary afferent fibers were observed and measured by histochemistry technique and microcomputer image analyser system. The results showed as below: There was FRAP positive soma of DRG small sized neurons of morphine rats, which was significantly weaker than that of control rats. FRAP intensity of L₃, L₄, L₅ spinal lamina I was obviously weaker of morphine rats as well. FRAP positive area of spinal lamina I of both sides showed symmetry of morphine rats, which decreased to 90% as compared with control rats. It indicates that morphine may inhibit the synthesis of FRAP in neurons of DRG, so that FRAP activity decreases in the soma of DRG small sized neurons and in the terminal of primary afferent fibers of lamina I.

Subject headings morphine; fluoride-resistant; acid phosphatase; dorsal root ganglion, spinal lamina I; rats