

海洛因戒断、复吸对大鼠肾上腺髓质细胞神经肽 Y 表达的影响^{*}

黄 智^{**}, 梁文妹^{***}, 李一欣, 谢 莉

(贵阳医学院 组织胚胎学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 探讨海洛因戒断、脱毒、复吸对大鼠肾上腺髓质细胞神经肽 Y (NPY) 表达的影响。方法: 成年雄性 SD 大鼠 63 只, 随机分为实验组、盐水对照组和正常对照组, 实验组又分为戒断组、脱毒组和复吸组, 采用免疫组织化学及图像分析法, 观察 3 组大鼠肾上腺髓质 NPY 的表达。结果: 光镜下, 肾上腺髓质 NPY 免疫反应 (IR) 细胞免疫反应产物呈棕黄色细颗粒状, 存在于胞质内; 与正常对照组及盐水对照组比较, 戒断组和复吸组肾上腺髓质 NPY-IR 细胞免疫染色加深, 图像分析平均灰度值低于正常对照组及盐水对照组 ($P < 0.05$); 脱毒组与正常对照组比较, NPY-IR 细胞染色强度、平均灰度值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 在海洛因戒断及复吸期间, NPY 在肾上腺髓质细胞表达增强, 提示肾上腺髓质细胞分泌的 NPY 增多; 脱毒治疗组大鼠 NPY 表达与正常组 NPY 差异无显著性, 提示脱毒治疗后肾上腺髓质细胞分泌的 NPY 减少可能与其功能逐步趋于正常有关。

[关键词] 神经肽 Y; 肾上腺髓质; 海洛因; 免疫组织化学; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R361.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)03-0245-04

The Effect of Abstinence and Relapse to Heroin on the Expression of Neuropeptide Y in Rat Adrenal Medulla Cells^{*}

HUANG Zhi^{**}, LIANG Wenmei^{***}, LI Yixin, XIE Li

(Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of abstinence, detoxication and relapse to heroin on the expression of neuropeptide Y (NPY) in rat adrenal medulla cells. **Methods:** Sixty-three adult male SD rats were randomly divided into normal control group (group NC), saline control group (group SC) and experiment groups including abstinence group (group A), detoxication group (group D) and relapse group (group R). The expression of NPY in rat adrenal medulla cells was detected with immunohistochemical method and image analysis method. **Results:** Under light microscope, the brownish yellow granules which were immunoreactive products existed in the cytoplasm of NPY immunoreactive (IR) cells. Compared with those in groups NC and SC, the immunostaining of NPY-IR cells was deeper, and the mean grey degrees were lower obviously in groups A and R ($P < 0.05$); No statistical differences were found in immunostaining strength and mean grey degree of NPY-IR cells between group D and normal control group ($P > 0.05$). **Conclusions:** During abstinence and relapse to heroin, the expression of NPY in rat adrenal medulla cells increases obviously, which suggests that adrenal medulla cells secrete NPY increasingly; No statistical difference was found in the expression of NPY between group D and normal control group, which suggests that the secretion of NPY in rat adrenal me-

^{*}[基金项目] 贵州省科技厅科技计划项目[黔科合 LG(2011)010 号]; 贵阳市科技计划筑科合同(2011201)大-2 号; 贵州省高层次人才基金(TZJF-2007-42 号)。

^{**} 贵阳医学院 2009 级硕士研究生。

^{***} 通讯作者 E-mail: wenmeiliang@126.com

dulla decreases after accepting detoxication treatment, which may relat to the recovery of NPY function.

[**Key words**] neuropeptide Y; adrenal medulla; heroin; immunohistochemistry; rats, Sprague-Dawley

肾上腺是神经-内分泌系统的重要组成部分。肾上腺髓质细胞能合成和分泌多种生物活性物质,参与机体的调节功能。神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 属胰多肽家族,研究证明是哺乳动物神经系统中分布最广、含量最高的神经肽,参与众多和重要的生理功能,包括神经内分泌整合^[1,2]。有报道 NPY 也存在于肾上腺髓质中,一般与去甲肾上腺素共存^[3]。NPY 可能具有双重角色,其作为神经递质,起源于神经末梢;作为激素,起源于肾上腺髓质。在应激以及紧张压力下,参与儿茶酚胺释放的调节^[4]。有报道海洛因成瘾者肾上腺皮质细胞超微结构有明显改变^[5],但迄今尚鲜见关于海洛因戒断、脱毒及复吸期间肾上腺髓质 NPY 免疫反应 (immunoreactive, IR) 细胞形态及功能改变的报道。本实验通过建立海洛因戒断、脱毒、复吸大鼠模型,应用免疫组织化学、图像分析方法探讨海洛因戒断、脱毒及复吸期间大鼠肾上腺髓质 NPY-IR 细胞免疫染色强度的改变,以期探讨海洛因成瘾的机制提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组

成年雄性 SD 大鼠 63 只,体重 180 ~ 220 g,由贵阳医学院实验动物中心提供。按随机原则分为实验组 (experiment group, EG)、盐水对照组 (saline control group, SCG)、正常对照组 (normal control group, NCG),各 21 只。实验组又分为海洛因戒断组 (heroin abstinence group, HAG)、美沙酮脱毒治疗组 (methadone detoxification group, MDG) 和海洛因复吸组 (heroin relapse group, HRG),每组 7 只,在贵阳医学院动物中心喂养。

1.2 建立动物模型

1.2.1 海洛因戒断大鼠模型^[6] 实验组大鼠按体重逐日注射海洛因药液 (纯度为 61.48%, 贵州省公安厅提供),首日剂量为 3 mg/kg, 2 次/d (上午 8 时,下午 3 时),每日递增剂量为 3 mg/kg,连续注射 9 d,至第 9 天剂量为 27 mg/kg。第 10 天将戒断组大鼠腹腔注射 0.8 mg 纳洛酮催瘾,观察并记录戒断症状 10 min。按照 Maldonado 等^[7]戒断症状

评分标准判定大鼠海洛因戒断模型建立成功,戒断后 1 h 内处死。

1.2.2 美沙酮脱毒治疗^[8] 将已成瘾大鼠腹腔注射美沙酮 (贵州汉方制药公司提供) 脱毒治疗,连续注射 6 d,每日剂量递减,依次为 5、4、3、2、1、0.5 mg/kg,并记录大鼠戒断症状;脱毒第 7 天,使用纳洛酮催瘾观察无明显戒断症状后,将美沙酮脱毒大鼠取 7 只处死。

1.2.3 海洛因复吸模型 将剩余 7 只美沙酮脱毒 6 d 后的大鼠再次注射海洛因,注射剂量首日 9 mg/kg, 1 次/d (上午 8 时),逐日递增剂量为 3 mg/kg,让大鼠再次染毒,制作复吸模型。复吸 7 d 后 (剂量为 27 mg/kg) 将复吸组大鼠处死。

1.2.4 对照组 盐水对照组:按体重每日注射与实验组相同剂量的生理盐水,并与实验组同时处死相同数量的大鼠;正常对照组:不予任何处理,按时喂养,分批取材。

1.3 取材及标本制备

处死大鼠用生理盐水灌洗,4% 多聚甲醛灌注固定;取肾上腺组织,4% 多聚甲醛再固定,常规石蜡包埋,制成 4 μm 连续切片,每例 3 张切片,切片间隔 56 μm 。

1.4 免疫组织化学 SABC 法

按照免疫组织化学 SABC 法进行免疫组织化学染色,显示 NPY-IR 细胞。主要步骤为:切片常规脱蜡入水,常温甲醇- H_2O_2 10 min,正常羊血清 (1:50) 室温下封闭 20 min,滴加兔 NPY 抗血清 (1:1 000, SIGMA 公司提供),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,羊抗兔 IgG (1:100) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, SABC 复合物 (1:100) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, DAB- H_2O_2 液显色,苏木精轻度复染细胞核,中性树胶封片。方法对照用 PBS 缓冲液替代特异性抗血清,余步骤同上。

1.5 图像及统计分析

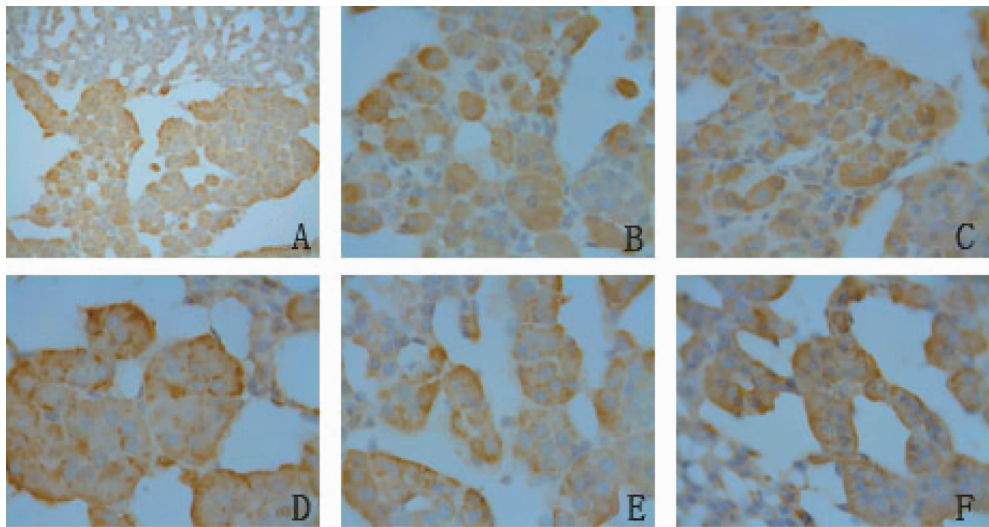
随机选取各模型组、盐水对照组和正常对照组肾上腺切片,各取 5 例。在 40 倍物镜下,每例切片随机选取 3 个视野,用 BioMias 图像分析系统检测 NPY-IR 细胞的平均灰度值。应用 SPSS11.5 软件包对实验数据进行方差分析,统计学处理。实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学观察

光镜下,大鼠肾上腺髓质细胞内 NPY 免疫阳性产物位于胞质内,呈棕黄色细颗粒状, NPY-IR 细胞数量多,胞体多呈卵圆形或不规则形(图 1A - F),方法对照切片未见阳性反应细胞。盐水对照

组与正常对照组比较,大鼠肾上腺髓质 NPY-IR 细胞形态、分布及免疫染色强度均未见明显变化(图 1A - C)。与正常对照组和盐水对照组比较,海洛因戒断、复吸组大鼠肾上腺髓质 NPY-IR 细胞形态、分布未见明显变化,但免疫染色加深;美沙酮脱毒组与正常对照组和盐水对照组比较, NPY-IR 细胞的形态、分布和免疫反应强度也未见明显变化(图 1D - F)。

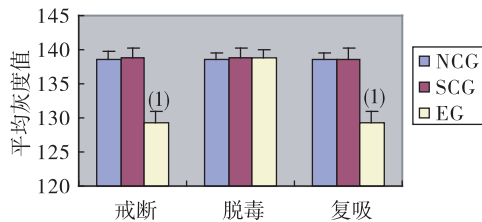


A. 正常组(×400), B. 正常组(×1 000), C. 盐水组(×1 000), D. 脱毒组(×1 000), E. 戒断组(×1 000), F. 复吸组(×1 000)。
图 1 各组大鼠肾上腺髓质 NPY-IR 细胞(SABC)

Fig. 1 NPY expression in rat adrenal medulla cells of each group

2.2 图像分析

各组大鼠肾上腺髓质 NPY-IR 细胞平均灰度值的比较,见图 2。正常对照组、盐水对照组及美沙酮脱毒组肾上腺髓质 NPY-IR 细胞平均灰度值的差异无统计学意义($P > 0.05$);海洛因戒断组、复吸组 NPY-IR 细胞平均灰度值较正常对照组和盐水对照组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。图像分析结果与同期形态学观察基本一致。



注: (1) 与 NCG 和 SCG 比较 $P < 0.05$

图 2 各组大鼠肾上腺髓质 NPY-IR 细胞的平均灰度值

Fig. 2 Mean grey degrees of NPY immunoreactive cells in rat adrenal medulla of each group

3 讨论

NPY 是由 36 个氨基酸残基组成的多肽,它既是一种中枢神经调质又是一种外周交感神经递质^[9],广泛存在于中枢神经系统及外周器官^[3]。在多种哺乳动物的肾上腺髓质的内分泌细胞中有 NPY 免疫活性物质。Cavadass 等^[4]报道体外培养的人肾上腺髓质嗜铬细胞释放 NPY 和儿茶酚胺(Catecholamine, CA), NPY 可刺激 CA 分泌。免疫电镜观察人肾上腺髓质有嗜铬细胞呈 NPY 免疫反应阳性, NPY 免疫反应物位于小颗粒囊泡和线粒体外膜。 NPY-IR 细胞常位于有孔毛细血管旁,与邻近的 NPY 阴性反应嗜铬细胞紧密接触^[10],提示 NPY-IR 细胞具有内分泌、旁分泌的特点。

海洛因戒断使机体处于应激状态,此时除垂体-肾上腺皮质轴参加外,交感神经-肾上腺髓质系统也兴奋^[11]。在应激状态下,机体发生一系列神经内分泌的改变,如儿茶酚胺(肾上腺素和去甲肾

上腺素)释放增加,内分泌轴的激活导致很多促激素如促肾上腺皮质激素释放因子水平升高,相继影响不同的靶器官,分泌其相应的特定的激素^[12], NPY、 β -EP 等神经肽的合成和分泌增加^[13],从而改变机体的内环境,提高对应激的适应。在本实验中,戒断组大鼠 NPY-IR 细胞表达增强,推测有可能在海洛因戒断时交感神经-肾上腺髓质系统激活, NPY 分泌增多,增多的 NPY 有可能通过直接或间接地方式,参与戒断的调节。

美沙酮维持治疗(MMT)是目前国内外最常用的针对海洛因等阿片类毒品依赖者采取的一种替代治疗方法,可与其它阿片类毒品(包括海洛因)产生交叉依赖性和耐受性,以减少对海洛因的渴求^[14],对阿片类药物依赖者具有良好的疗效^[15]。本实验美沙酮脱毒治疗组与正常及盐水对照组比较, NPY-IR 细胞染色强度及平均灰度值差异无显著性,表明 NPY 的含量逐渐恢复。

海洛因依赖者脱毒后普遍存在稽延性戒断症状,该症状在脱毒后可长达数年,是导致海洛因依赖者复吸的因素之一,在这一应对过程中,中枢神经系统,神经内分泌系统和免疫系统均参与其中^[16]。本研究显示复吸组肾上腺髓质表达 NPY 增高的改变,可能是海洛因再次作用于 NPY 应激系统再次激活所致,这与本课题组对海洛因戒断、复吸期间胃肠道 Gas-、5-HT-、SS-、SP-、NPY-、EGF-IR 细胞表达相应胃肠激素的研究结果相似^[17-20]。NPY 在海洛因戒断、脱毒、复吸期间肾上腺髓质细胞表达的改变,表明肾上腺髓质 NPY-IR 细胞参与了海洛因戒断、脱毒、复吸期间机体内分泌的调节过程。

4 参考文献

- [1] Nozdrachev AD, Masliukov PM. Neuropeptide Y and autonomic nervous system[J]. Zh Evol Biokhim Fiziol, 2011(2): 105-112.
- [2] 张汝敏, 沃金善. 高血压与神经肽 Y[J]. 中国实用医药, 2009(30): 222-224.
- [3] 韩济生. 神经科学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009. 1.
- [4] Cavadas C, Silva AP, Mosimann F, et al. NPY regulates catecholamine secretion from human adrenal chromaffin cells[J]. J Clin Endocrinol Metab. 2001(12): 5956-5963.
- [5] 李利华, 朱华, 赵永和, 等. 海洛因依赖者内分泌和生殖系统超微结构病理变化研究[J]. 中国药物依赖性杂志, 2002(4): 274-277.
- [6] 潘贵书, 徐国强, 李淑芳, 等. 海洛因成瘾大鼠模型的建立[J]. 贵阳医学院学报, 1997(增刊): 46-46.
- [7] Maldonado R, Negus S, Koob GF. Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta- and kappa-selective opioid antagonists[J]. Neuropharmacology, 1992(12): 1231-1241.
- [8] 韦献良, 叶峻, 郑毅. 海洛因成瘾复吸大鼠模型的建立[J]. 广西医学, 2004(6): 783-785.
- [9] Abe K, Kuo L, Zukowska Z. Neuropeptide Y is a mediator of chronic vascular and metabolic maladaptations to stress and hypernutrition [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2010(10): 1179-1184.
- [10] 殷树仪. 人肾上腺内肽能神经的超微结构[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1994(1): 46-49.
- [11] Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses[J]. Nat Rev Neurosci, 2009(6): 397-409.
- [12] Thorsell A. Brain neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in mediating stress and anxiety[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2010(10): 1163-1167.
- [13] Okur H, Küçükaydn M, Ozokutan BH, et al. Relationship between release of beta-endorphin, cortisol, and trauma severity in children with blunt torso and extremity trauma[J]. J Trauma, 2007(2): 320-324.
- [14] 王银华. 对海洛因成瘾者美沙酮维持治疗的浅析[J]. 中国新医学论坛, 2008(3): 60-61.
- [15] 张建芳, 王宝安, 杨宗儒, 等. 美沙酮维持综合干预治疗对阿片类依赖者心理健康的影响[J]. 中国药物依赖性杂志, 2010(1): 45-47.
- [16] Merza Z. Chronic use of opioids and the endocrine system[J]. Horm Metab Res, 2010(9): 621-626.
- [17] 夏白娟, 梁文妹, 洪艳, 等. 胃泌素和 5-羟色胺在海洛因戒断、复吸大鼠胃窦的表达[J]. 第三军医大学学报, 2011(4): 392-395.
- [18] 潘辉, 梁文妹. 海洛因戒断、复吸对大鼠十二指肠 5-羟色胺、胃泌素、生长抑素免疫反应细胞表达的影响[J]. 解剖学报, 2010(6): 880-884.
- [19] 李一欣, 梁文妹, 胡赞, 等. 海洛因戒断与复吸对大鼠结肠 5-羟色胺和 P 物质表达的影响[J]. 解剖学报, 2011(4): 527-531.
- [20] 洪艳, 梁文妹, 夏白娟, 等. 5-HT、SP 在海洛因戒断、脱毒、复吸大鼠直肠组织中的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2011(5): 477-482.

(2012-03-06 收稿, 2012-03-30 修回)

编辑: 潘 娅