

神经肽 Y 在海洛因戒断、脱毒及复吸大鼠直肠组织的表达^{*}

洪 艳, 梁文妹^{**}, 韩 晶, 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、脱毒及复吸期间大鼠直肠内神经肽 Y (NPY) 的表达。**方法:** 正常雄性 SD 大鼠随机分为实验组、盐水对照组和正常对照组, 实验组又分戒断组、美沙酮脱毒组和复吸组, 采用免疫组织化学 SABC 法及图像分析方法观察各组大鼠直肠 NPY 的表达。**结果:** (1) 与正常对照组及盐水对照组比较, 戒断组及复吸组大鼠直肠内的 NPY 阳性细胞免疫染色加深; 图像分析 NPY 阳性细胞的细胞计数增多, 平均灰度值低于正常及盐水对照组 ($P < 0.05$); (2) 脱毒组与正常及盐水对照组比较, NPY 阳性细胞免疫染色、细胞计数及平均灰度值变化差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** 海洛因戒断及复吸期间, NPY 在直肠黏膜表达增强, 用美沙酮脱毒治疗后 NPY 的表达接近正常, 提示 NPY 可能参与海洛因戒断、脱毒和复吸期间机体的调节过程。

[关键词] 神经肽 Y; 海洛因; 大鼠; 直肠; 免疫组织化学

[中图分类号] R361.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)02-0135-04

The Expression of NPY in Rat Rectum during Abstinence, Detoxification and Relapse to Heroin

HONG Yan, LIANG Wenmei, HAN Jing, LI Yixin, XIE Li

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

[Abstract] **Objective:** To explore the expression changes of neuropeptide Y (NPY) in rat rectum during abstinence, detoxication and relapse to heroin. **Methods:** Normal male SD rats were randomly divided into normal control group (group NC), saline control group (group SC) and experiment groups including abstinence group (group HA), methadone detoxication group (group MD) and heroin relapse group (group HR). Rat rectum tissues of each group were taken and treated with immunohistochemical SABC method. Image analysis was performed. **Results:** Compared with those in groups NC and SC, the immunostaining was deeper, the cell counts were bigger, and the mean grey degrees were lighter obviously in NPY positive cells in groups HA and HR ($P < 0.05$). Compared with groups NC and SC, no statistical differences were found in immunostaining, cell counting and mean grey degree of NPY positive cells ($P > 0.05$) in group MD. **Conclusions:** The expression of NPY positive cells increases during abstinence and relapse of heroin in tunica mucosa recti of rats and turned normal after treatment with methadone. It suggests that NPY participate in adjusting process of organism during abstinence, detoxification and relapse of heroin.

[Key words] neuropeptide Y; heroin; rats; rectum; immunohistochemistry

近年来,外源性阿片类物质(吗啡、海洛因)滥用已成为日益严重的社会问题,文献报道我国药物

滥用的复吸率高达 95% 以上。因此,如何有效降低复吸率,是脱毒治疗急需解决的首要问题^[1,2]。

^{*}[基金项目] 贵州省社会发展科技攻关计划项目,黔科合 S 字(2007)1048。

^{**}通讯作者 E-mail: wenmeiliang@126.com

美沙酮维持治疗是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,已成为全球阿片类毒品依赖维持疗法中应用最为广泛的方式之一^[3]。近年来,阿片类药物滥用对胃肠道功能的影响已引起国内外学者的广泛关注^[4]。神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)由 36 个氨基酸组成,属胰多肽家族,主要分布于中枢神经系统及外周器官,具有广泛的生物学活性。研究发现, NPY 参与了多种疾病的病理生理过程^[5]。目前国内外有关海洛因脱毒、复吸时机体肠道神经内分泌改变的形态学研究尚少,尚未见到海洛因脱毒、复吸时直肠黏膜 NPY 定位及表达情况的系统报道。本实验通过建立大鼠海洛因戒断、复吸及美沙酮脱毒模型,应用免疫组织化学 SABC 法及图像分析,对 NPY 在直肠黏膜的定位和表达进行研究,为探讨海洛因戒断和复吸的机制提供形态学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠 35 只,体重 180 ~ 220 g,由贵阳医学院实验动物中心提供。按配对原则随机分为正常对照组(normal control group, NCG)5 只、盐水对照组(saline control group, SCG)15 只和实验组(experiment group, EG)15 只;实验组又分为海洛因戒断组(heroin withdrawal group, HWG)、美沙酮脱毒治疗组(methadone detoxication group, MDG)和海洛因复吸组(heroin relapse group, HRG),每组各 5 只,由贵阳医学院动物中心饲养员喂养。

1.1.2 药品及试剂 海洛因纯度为 61.48%,由贵州省公安厅提供。美沙酮(汉方制药厂提供),兔抗 NPY(1:1000,由 SIGMA 公司提供)。SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 海洛因戒断大鼠模型参照文献[6]制作:实验组按体重逐日注射海洛因药液,首日剂量为 3 mg/kg,1 日 2 次(上午 8 时,下午 3 时),每日递增剂量为 3 mg/kg,连续皮下注射海洛因 9 d,至第 9 天剂量为 27 mg/kg。第 10 天实验组取 5 只大鼠腹腔注射 0.8 mg 纳洛酮建立成瘾戒断模型,观察并记录戒断症状 30 min,出现扭体、湿狗样抖、跳跃、站立、齿颤、清理皮毛、上睑下垂等戒断症状,依照 Maldonad 等的戒断症状评分标准评

定,判定大鼠海洛因戒断模型成功建立,戒断组大鼠 1 h 内处死。美沙酮脱毒治疗组^[7]:将已成瘾大鼠注射美沙酮脱毒 6 d,每日剂量递减,依次为 5、4、3、2、1、0.5 (mg/kg),观察并记录;脱毒治疗第 7 天(实验第 17 天)使用纳洛酮催瘾并观察,脱毒组大鼠与正常组和盐水组比较,无明显戒断症状,将脱毒组大鼠处死。海洛因复吸大鼠模型:将 5 只美沙酮脱毒 6 d 后的大鼠再次注射海洛因,注射首日剂量 9 mg/kg,1 次/日(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(实验第 24 天)后将复吸组大鼠处死。盐水对照组按体重每日注射与实验组相当剂量的生理盐水,并与实验组同时处死;正常对照组不予任何处理,按时喂养,同期处死。

1.2.2 取材及标本制备 分别取正常对照组、盐水对照组和实验组(戒断、脱毒和复吸)大鼠直肠标本,多聚甲醛液固定,常规石蜡包埋,制成 4 μ m 厚的连续切片,每例每项观察指标均观察切片 3 张以上,切片间隔 56 μ m。

1.2.3 免疫组织化学 SABC 法 按免疫组织化学 SABC 法进行染色,分别显示 NPY 阳性细胞。主要步骤为:切片常规脱蜡至水,室温,10% 甲醇 - H₂O₂ 10 min,正常羊血清(1:50)室温下封闭 20 min,依次滴加兔 NPY 抗血清 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,羊抗兔 IgG(1:100)37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, SABC 复合物(1:100)37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, DAB-H₂O₂ 液显色,苏木精轻度复染细胞核,中性树胶封片。方法对照采用 PBS 缓冲液代替特异性抗血清。

1.2.4 图像分析 细胞计数:随机选取各组直肠切片各 5 张,在 40 倍物镜下,每张切片随机选取 5 个视野,分别计数每个视野内有核阳性 NPY 细胞数。平均灰度值测定:随机选取各组直肠切片各 5 张,在 40 倍物镜下,每张切片随机选取 5 个视野,用 BioMias 图像分析系统检测 NPY 阳性细胞的平均灰度值。

1.3 统计分析

应用 SPSS 11.5 软件包对实验数据进行方差分析,统计学处理。实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 差异具有显著性。

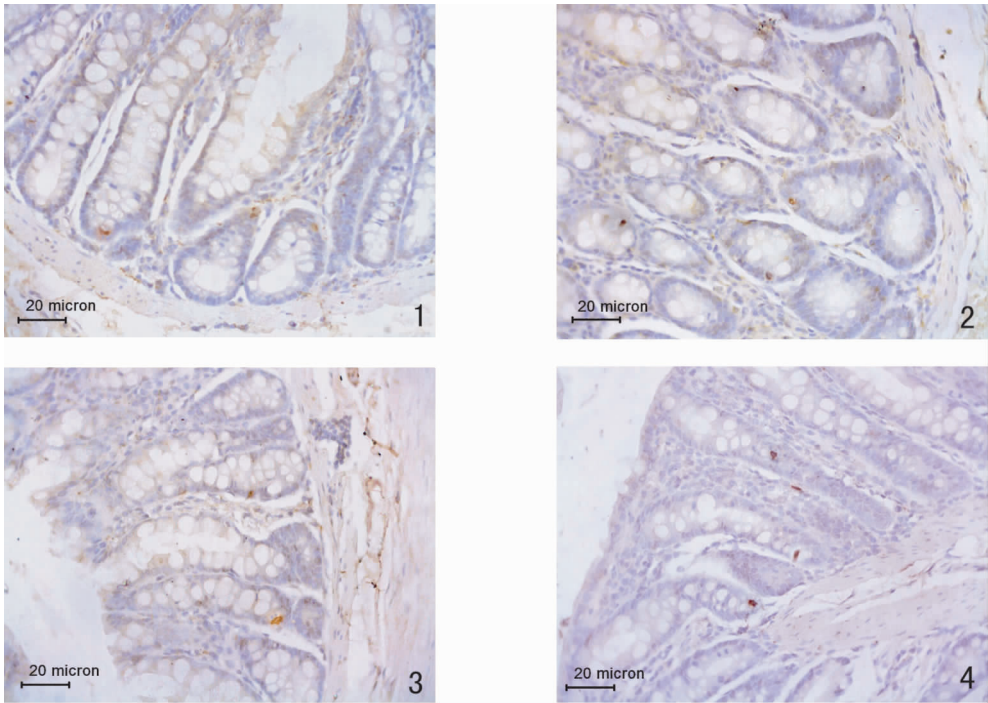
2 结果

2.1 免疫组织化学观察

光镜下,大鼠直肠 NPY 阳性细胞的免疫反应

产物呈棕黄色细颗粒状,定位于细胞质内,NPY 阳性细胞数量少,胞体多呈卵圆形或锥形,单个夹杂于黏膜上皮细胞之间,以肠腺底部多见。方法对照切片未见阳性细胞。美沙酮脱毒组与正常对照组

和盐水对照组比较,大鼠 NPY 阳性细胞的数量、形态、分布和免疫反应强度比较未见明显变化;海洛因戒断、复吸组 NPY 阳性细胞的形态及分布未见明显变化,但免疫染色加深,细胞数量增多,见图 1。



1. 盐水对照组(第 24 天),2. 海洛因戒断组(第 10 天),3. 美沙酮脱毒组(第 17 天),4. 海洛因复吸组(第 24 天)。

图 1 各组大鼠直肠黏膜 NPY 表达(SABC, ×400)

Fig. 1 NPY expression in tunica mucosa recti of rats of different groups

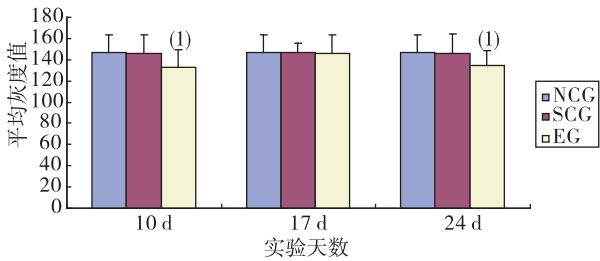
2.2 图像分析

各组大鼠直肠黏膜 NPY 阳性细胞计数及平均灰度值的比较见表 1 和图 2。如表 1 及图 2 所示,正常对照组、盐水对照组及美沙酮脱毒组直肠黏膜的 NPY 阳性细胞计数及平均灰度值的差异无统计学意义($P>0.05$),海洛因戒断、复吸组 NPY 阳性细胞计数及平均灰度值较正常对照组和盐水对照组均有显著性差异($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠直肠黏膜 NPY 阳性细胞计数/视野($\bar{x} \pm s$)

组别	实验天数		
	10 d	17 d	24 d
NCG	1. 13 ± 0. 68	1. 13 ± 0. 68	1. 13 ± 0. 68
SCG	1. 16 ± 0. 73 ⁽³⁾	1. 25 ± 1. 07 ⁽³⁾	1. 35 ± 0. 88 ⁽³⁾
EG	2. 58 ± 1. 26 ⁽¹⁾	1. 39 ± 0. 83 ⁽²⁾	2. 53 ± 1. 28 ⁽¹⁾

注: ⁽¹⁾与 NCG、SCG 和第 17 天 EG 比较, $P<0.05$; ⁽²⁾与 NCG、SCG 比较, $P>0.05$; ⁽³⁾与 NCG 比较, $P>0.05$ 。



⁽¹⁾与 NCG、SCG 和第 17 天 EG 比较, $P<0.05$

图 2 各组大鼠直肠黏膜 NPY 阳性细胞的平均灰度值

Fig. 2 Mean grey degree values of NPY positive cells in rat rectum of different groups

3 讨论

海洛因依赖后,由于外源性阿片类物质作用于阿片受体及其阿片肽系统,发挥类似于内源性阿片肽作用而抑制体内正常内源性阿片肽的形成与释放。如果骤然中断海洛因供给,机体阿片肽系统无法继续保持平衡,从中枢到外周各系统的正常运行

秩序被完全打乱,尤以去甲肾上腺素能系统和胆碱能系统的功能紊乱更为明显。海洛因成瘾者的戒断反应,实质上是机体内部适应与暂时不适应相互转化的表现,这一过程是建立在神经内分泌的变化、调节和失调基础上的^[1,2]。戒断症状的存在,是造成海洛因依赖者脱毒治疗后复吸的重要因素。在临床所见的戒断症状中,消化道功能紊乱者尤其普遍,如消化不良、食欲减退、腹胀、腹泻或便秘等^[4]。另有研究表明,吗啡戒断大鼠易出现肠系膜局部微循环障碍^[8]。

NPY 是含有 36 个氨基酸的单链多肽,广泛存在于中枢和外周神经系统,在消化道主要分布于黏膜下神经丛及黏膜内分泌细胞,可控制食物和水分的摄取,调节摄食和能量平衡^[5]。NPY 作为一种神经递质或调质发挥其生理调节作用,主要与去甲肾上腺素(NE)共存于交感神经末梢,与 NE 一起释放,两者作用相似,并呈显著的协同关系。资料显示,NPY 作为一种调节因子参与了众多胃肠道疾病(包括消化不良、炎症性肠病、胰腺炎等)的发病过程^[9]。一些学者研究乙醇依赖大鼠脑组织中 NPY 表达变化,提示 NPY 作为一种关键因素参与乙醇引起焦虑行为的调节过程^[10]。本研究结果显示纳络酮注射后大鼠直肠黏膜 NPY 表达增多,提示 NPY 可能参与海洛因戒断时消化功能紊乱的调节过程。

美沙酮系阿片受体激动剂,由于其特有的药理学作用而被广泛地应用于阿片类成瘾的治疗。具有与阿片受体亲和力大,维持时间长,成瘾潜力小等特点,口服美沙酮可控制戒断症状^[3]。本实验采用美沙酮剂量逐日递减法建立美沙酮脱毒动物模型,用免疫组织化学及图像分析法研究脱毒组大鼠直肠黏膜 NPY 含量变化,结果显示 NPY 含量较成瘾戒断组大鼠显著降低,但与正常对照组及盐水对照组比较无统计学意义。Maric T 等^[11]研究证实,NPY 能够增强脱瘾大鼠对海洛因的渴求,从而导致大鼠自我给药行为的发生;NPY 对药物滥用引起的条件性强化和奖赏效应也有调节作用。美沙酮脱毒组大鼠直肠黏膜 NPY 表达接近正常,提示 NPY 参与脱毒后消化道功能恢复的调节过程。

海洛因成瘾复吸率居高不下,已构成戒毒治疗失败的主要原因。关于复吸的基础及临床研究仍是当前国际神经科学中的热点和难点。最近研究显示 NPY 可能是药物依赖形成机制中的关键信号分

子^[12]。有学者对海洛因中毒性疾病患者血浆神经肽测定结果表明, β -内啡肽、NPY、NE 含量较对照组显著升高,经治疗后随着疾病的好转血浆含量逐渐下降,说明血浆神经肽与急性中毒性疾病与疾病的发生、严重程度呈正相关^[13]。本实验结果显示复吸组大鼠直肠粘膜表达 NPY 增高,提示这种脑肠肽与阿片肽之间存在复杂的作用机制,可能是机体对抗海洛因依赖引起肠道功能紊乱的调节作用之一。

4 参考文献

- [1] 许艳,徐满英. 阿片成瘾戒断机制及治疗的研究现状[J]. 哈尔滨医科大学学报,2005(2):198-201.
- [2] 周文华,张富强,刘惠芬,等. 海洛因复吸模型、机制和干预的研究进展[J]. 中国药物依赖性杂志,2006(3):206-209.
- [3] Tramullas M, Martínez-Cué C, Hurlé MA. Chronic methadone treatment and repeated withdrawal impair cognition and increase the expression of apoptosis-related proteins in mouse brain[J]. Psychopharmacology,2007(1):107-120.
- [4] Banach T, Zurowski D, Gil K, et al. Peripheral mechanisms of intestinal dysmotility in the morphine tolerant and dependent rats[J]. J Physiol Pharmacol,2006(1):73-82.
- [5] Bobińska K, Szemraj J, Pietras T, et al. Neuropeptide Y-structure, receptors, effect and its place in psychiatry[J]. Psychiatr Pol,2008(6):889-901.
- [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.
- [7] 韦献良,叶峻,郑毅. 海洛因成瘾复吸动物模型的建立[J]. 广西医学,2004(6):783-785.
- [8] 李娜,王亚龙,刘秀平. 654-2 对吗啡戒断大鼠肠系膜微循环的影响[J]. 中国微循环,2008(3):158-160.
- [9] Morales-Medina JC, Dumont Y, Quirion R. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress[J]. Brain Res, 2010(1314):194-205.
- [10] Thorsell A. Neuropeptide Y (NPY) in alcohol intake and dependence[J]. Peptides,2007(2):480-483.
- [11] Maric T, Tobin S, Quinn T, et al. Food deprivation-like effects of neuropeptide Y on heroin self-administration and reinstatement of heroin seeking in rats[J]. Behav Brain Res,2008(1):39-43.
- [12] Fujita W, Takahashi M, Tokuyama S. The mechanism of the development of drug dependence[J]. Nippon Rinsho,2010(8):1445-1450.
- [13] 蓝穗新,徐优芬,陈玉,等. 中毒性疾病血浆神经肽变化研究. 中国急救医学,2004(6):398-399.

(2011-01-14 收稿,2011-02-16 修回)