

吗啡成瘾时脑内 Fas、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的改变

刘立伟¹, 王新华², 傅舒昆¹, 吴青华³, 傅 强^{4*}

1. 同济大学附属第十人民医院麻醉科, 上海 200072
2. 同济大学附属东方医院麻醉科, 上海 200120
3. 解放军第 150 医院麻醉科, 洛阳 471031
4. 解放军总医院麻醉科, 北京 100853

[摘要] **目的** 观察吗啡成瘾时脑细胞中凋亡相关蛋白 Fas、Caspase-3 和 Bcl-2 表达的改变。**方法** 将 48 只体质量为 190~210 g 的成年 SD 大鼠随机分为 3 组: 吗啡依赖组、吗啡戒断组和对照组, 每组 16 只。依据药物递增原则, 依赖组和戒断组大鼠腹腔内给予吗啡 13 d, 建立吗啡成瘾模型。戒断组大鼠在成瘾后腹腔内注射纳洛酮 5 mg/kg, 诱导戒断 30 min。对照组大鼠在相同的治疗时间腹腔内注射生理盐水。应用免疫组织化学、蛋白印迹分析方法检测大鼠海马区 Fas、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 吗啡依赖组和戒断组大鼠海马区 Fas 和 Caspase-3 的表达增加 ($P < 0.01$), 而 Bcl-2 的表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** 长期应用吗啡可通过 Fas、Caspase-3 表达的增加和 Bcl-2 表达的降低诱发脑细胞异常凋亡, 这可能是阿片类药物引起神经损害的机制之一。

[关键词] 吗啡依赖; 海马; 细胞凋亡; Fas; Bcl-2; Caspase-3

[中图分类号] R 749.61 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)10-1086-04

Changes of Fas, Bcl-2 and Caspase-3 protein in rat brain during morphine addiction

LIU Li-wei¹, WANG Xin-hua², FU Shu-kun¹, WU Qing-hua³, FU Qiang^{4*}

1. Department of Anesthesiology, The Tenth People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China
2. Department of Anesthesiology, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China
3. Department of Anesthesiology, No. 150 Hospital of PLA, Luoyang 471031, Henan, China
4. Department of Anesthesiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of apoptosis-related proteins Fas, Caspase-3 and Bcl-2 expression in rat brain during morphine addiction. **Methods** A total of 48 adult male Sprague-Dawley rats, weighing 190-210 g, were randomly divided into 3 groups ($n=16$): chronic morphine-dependent group, chronic morphine-abstinent group and control group. The rats in dependent group and abstinent group were chronically treated with morphine for 13 days to establish morphine dependent model. In the abstinent group, the withdrawal syndromes were induced with intraperitoneal injection of naloxone 5 mg/kg for 30 min. The control group was injected with normal saline. Immunohistochemistry and Western blotting analysis were used to examine the expression of Fas, Bcl-2 and Caspase-3 proteins. **Results** Compared with the control group, the other two groups had significantly increased expression of Fas and Caspase-3 ($P < 0.01$) and significantly decreased expression of Bcl-2 ($P < 0.01$) in the hippocampal synapse. **Conclusion** It is demonstrated that long term use of morphine can promote abnormal neuronal apoptosis in rat brain by enhancing the expression of pro-apoptotic Fas, Caspase-3 and decreasing the expression of anti-apoptotic Bcl-2, which might be one of the mechanisms for opiate-induced neuronal damage.

[Key words] morphine dependence; hippocampus; apoptosis; Fas; Bcl-2; Caspase-3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10):1086-1089]

阿片类药物作为较强的镇痛剂, 应用于疼痛治疗已有近百年历史, 但长期反复应用可引起患者成瘾, 出现躯体依赖和精神依赖。吗啡对脑部神经元的多种慢性效应表明, 长期应用阿片类药物可

能诱发神经元结构发生改变^[1-2]。有关吗啡成瘾时脑细胞凋亡及其发生机制的在体研究, 国内报道较少, 国外也以离体实验研究为主, 近年 Hassanzadeh 等^[3-4]对大鼠脊髓和大脑皮质区进行了这方面的在

[收稿日期] 2012-05-24 **[接受日期]** 2012-07-10

[作者简介] 刘立伟, 硕士生. E-mail: liweiliu120@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 010-66937462, E-mail: Dr_fuqiang@hotmail.com

体研究。本研究通过免疫组织化学方法和蛋白质印迹方法,评估吗啡成瘾大鼠脑细胞中凋亡相关蛋白 Fas、Caspase-3 和 Bcl-2 的表达变化,进而探讨阿片类药物细胞凋亡的发生机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象及分组 48 只成年雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(第二军医大学实验动物中心提供),体质量 190~210 g,随机分为 3 组:吗啡依赖组、吗啡戒断组和对照组,每组 16 只。

1.2 吗啡成瘾及戒断模型的建立 吗啡依赖组和吗啡戒断组大鼠按照逐日递增原则,每日分 3 次腹腔内注射吗啡(批号:990902,沈阳第一制药厂)建立吗啡成瘾模型。给药时间分别为 8:00、12:00、20:00,从第 1 天用量 5 mg/kg 起,前 6 d 每日递增 15 mg/kg,于第 7 天起每日递增 30 mg/kg,直到第 13 天的 290 mg/kg^[5]。对照组按照同样方法腹腔内注射等量生理盐水。吗啡戒断组在大鼠吗啡成瘾后腹腔内注射纳洛酮(批号:010705,北京四环制药厂) 5 mg/kg,诱导戒断 30 min。观察并记录纳洛酮诱导后 20 min 内大鼠的可数症状,包括站立(1~5 次为 1 分,6~10 次为 2 分,≥11 次为 3 分),湿狗样抖、伸展、齿颤、跳跃、舔阴(1~3 次为 1 分,4~6 次为 2 分,≥7 次为 3 分)等,并进行戒断症状评分。凡有接触惊叫的大鼠均加 2 分。

1.3 标本取材 每组随机取 8 只大鼠,处死后剥离头、颈部肌肉和筋膜,暴露出枕骨大孔,沿枕骨大孔向上矢状剪开颅骨,小心剔除硬脑膜,剥离出全脑,参照 Bhargava 等^[6]的方法分离海马区脑组织,置液氮中冻存用于蛋白质印迹检测。其余大鼠原位灌注、固定后,剥离的脑组织块进行脱水、透明处理,包埋于石蜡中用于组织学观察和免疫组织化学检测。在不同冠状层面将埋有脑组织的蜡块切成 4 μm 的薄片,贴于载玻片上。

1.4 组织学观察 石蜡切片脱蜡后苏木精-伊红(H-E)染色,光镜下观察。

1.5 免疫组织化学检测 Fas、Bcl-2、Caspase-3 表达 采用丹麦 Dako 公司的检测试剂盒对 Fas、Bcl-2、Caspase-3 的表达进行免疫组织化学检测。石蜡切片脱蜡至水, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min; 3% H₂O₂ 室温孵育 20 min,以消除内源性过氧化酶的活性, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min; 98℃ 下抗原修复 2 次,每次 10 min,自然冷却, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min; 1:10 正常山羊血清封闭,室温孵育 30 min; 分别滴加适当稀释的 Fas(1:60)、Bcl-2(1:80)、

Caspase-3(1:30)一抗,室温孵育 8 h, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min; 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min; DAB 显色,自来水充分冲洗,苏木精复染;常规树脂封片。以 PBS 替代一抗作为空白对照,正常血清替代一抗作为替代对照,已知阳性切片作为阳性对照。在每只大鼠的海马区随机取 2 张切片,每张切片随机取 3 个高倍镜视野,计算海马区阳性细胞百分率。

1.6 蛋白质印迹法检测 Fas、Bcl-2、Caspase-3 的表达 从液氮中取出海马区脑组织,置于玻璃匀浆器中,按 1:10 加入缓冲液,高速匀浆(10 s×6 次), 4℃ 下 800×g 离心 10 min,取上清液,Lowry 法蛋白定量后分装,置 -80℃ 冰箱保存。取 40 μg 总蛋白上样,用 10% SDS-PAGE 分离后,以湿转法电转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜浸入 5% 的脱脂奶粉封闭液, 4℃ 过夜。加入 1:200 兔抗 Fas、Bcl-2 多克隆抗体(Dako 公司,丹麦), Buffer A 洗膜 10 min×3 次; 加入羊抗兔 IgG(北京中山公司),孵育洗膜后,加入 1:300 辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(北京中山公司),再次洗膜 3 次。最后将膜放入 DAB 溶液中显色、漂洗,拍照。Gel Doc 2000 凝胶成像系统(BioRad 公司,美国)分析 PVDF 膜上的目的蛋白条带。

1.7 统计学处理 应用 SAS 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 吗啡成瘾大鼠出现戒断反应 吗啡依赖组的戒断评分(4.24±0.40)与对照组(3.99±0.42)比较差异无统计学意义;而与吗啡戒断组(20.63±3.65)比较,则差异存在统计学意义($P < 0.01$)。此结果表明吗啡成瘾模型建立成功。

2.2 吗啡成瘾大鼠脑细胞凋亡 组织学观察表明,吗啡依赖组和戒断组大鼠脑组织中出现凋亡细胞,表现为细胞变小,核浓缩,与周围细胞脱离接触(图 1)。

2.3 吗啡成瘾大鼠海马区脑细胞内 Fas、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达改变 免疫组化染色以细胞质内出现浓染的棕黄色颗粒为阳性细胞(图 2),结果发现,与对照组比较,吗啡依赖组和吗啡戒断组大鼠脑细胞内 Fas 及 Caspase-3 的表达均增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), Bcl-2 的表达降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);而上述指标在吗啡依赖组和吗啡戒断组之间差异均无统计学意义(表 1)。免疫印迹结果同样表明,吗啡依赖时 Fas、Caspase-3 蛋白表达增加,而 Bcl-2 蛋白表达减少(图 3)。

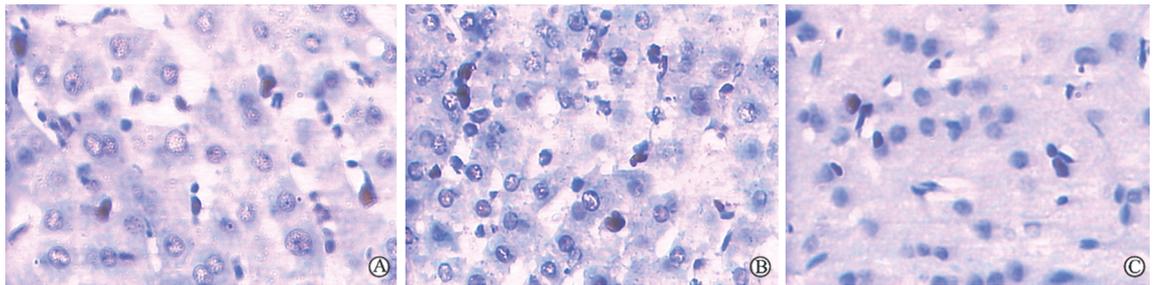


图 1 吗啡成瘾时海马区脑凋亡细胞的 H-E 染色结果

Fig 1 H-E staining of apoptotic cells in the hippocampus during morphine addiction

A: Control group; B: Chronic morphine-dependent group; C: Chronic morphine-abstinent group. Original magnification: $\times 800$

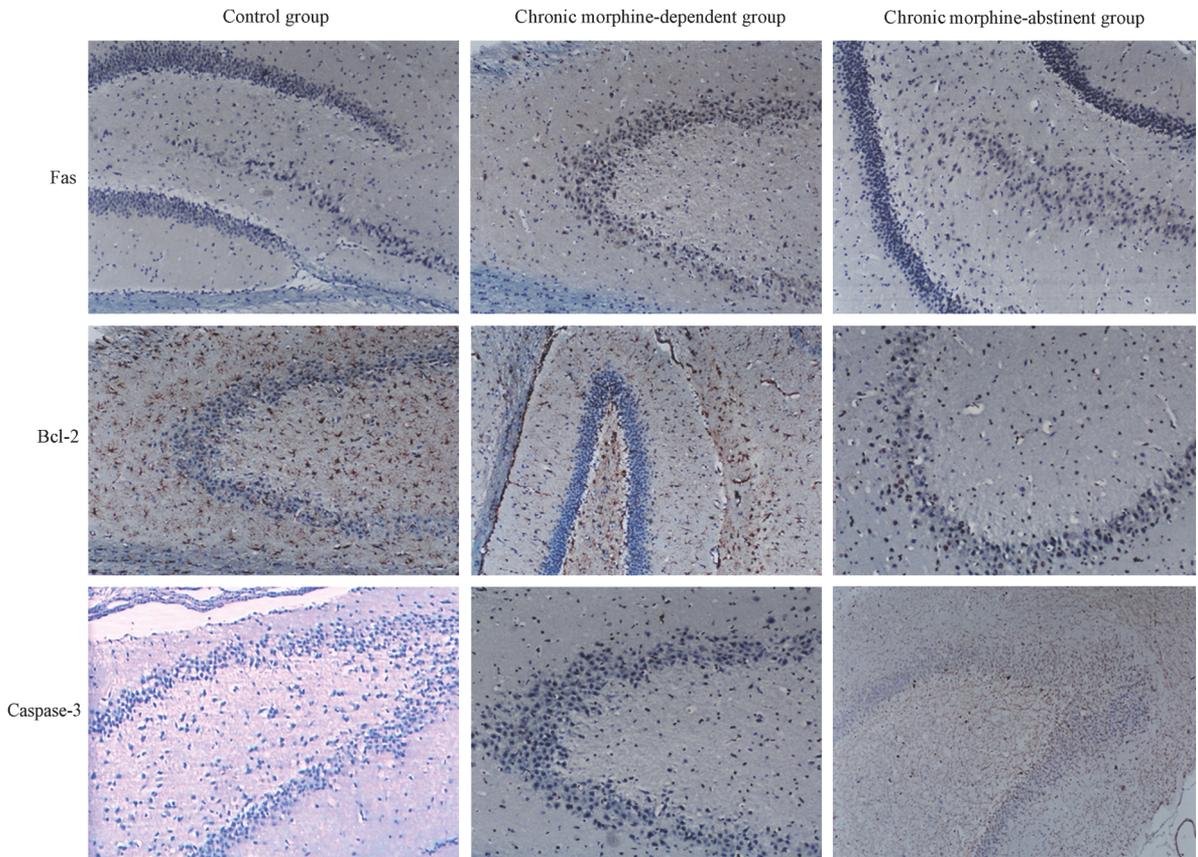


图 2 吗啡成瘾时大鼠海马区脑细胞内 Fas、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的改变

Fig 2 Changes of Fas, Bcl-2 and Caspase-3 in hippocampal cells during morphine addiction

Immunohistochemical staining. Original magnification: $\times 200$

表 1 吗啡成瘾时大鼠海马区 Fas、Bcl-2 和 Caspase-3 阳性细胞百分率

Tab 1 Percentage of mouse hippocampal cells positive of Fas, Bcl-2 and Caspase-3 during morphine addiction

$n=8, \bar{x} \pm s, \%$			
Group	Fas	Bcl-2	Caspase-3
Chronic morphine-dependent	$11.39 \pm 2.42^{**}$	$7.95 \pm 2.81^{**}$	$20.24 \pm 2.37^{**}$
Chronic morphine-abstinent	$11.09 \pm 2.57^*$	$8.10 \pm 2.42^*$	$22.13 \pm 2.46^*$
Control	7.07 ± 2.24	10.96 ± 2.18	8.21 ± 2.33

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

诱导凋亡的信号虽多种多样,但凋亡的死亡通路却相当保守。线粒体依赖途径和死亡受体途径为细胞凋亡的两条主要信号通路。在线粒体依赖途径中,Bcl-2 通过阻止细胞色素 C 的释放及特定蛋白酶(即 caspase,一种蛋白水解酶,在核碎裂和细胞凋亡的调节过程中起着关键作用)的激活抑制细胞凋亡。死亡受体 Fas 通过与其特异性配体 FasL 结合,可转导由特定的死亡配体引起的凋亡信号。两条途径最

终均激活 Caspase-3, 从而再活化 Caspase 激活的脱氧核糖核酸酶(CAD), 引起染色体 DNA 断裂, 最终导致细胞凋亡。

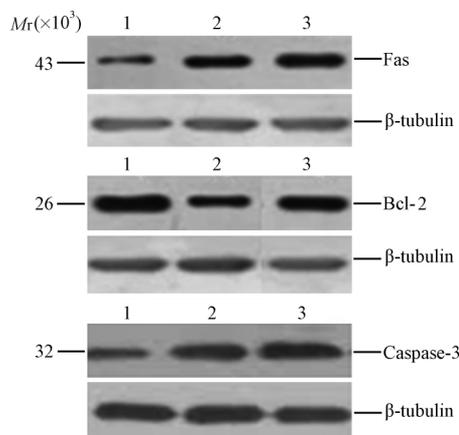


图 3 蛋白质印迹分析检测大鼠海马组织 Fas、Bcl-2 和 Caspase-3 表达

Fig 3 Western blotting analysis of Fas,

Bcl-2 and Caspase-3 protein in rat hippocampus

1: Control group; 2: Chronic morphine-dependent group; 3: Chronic morphine-abstinent group

Singhal 等^[7]进行的离体研究表明, 吗啡和 μ -阿片受体特异性激动剂 DAMGO [(D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol-脑啡肽 enkephalin)] 通过抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达的降低和促凋亡基因 *Bax* 表达的增加, 诱导 T 淋巴细胞和(或) Jurkat 细胞凋亡。吗啡还可通过激活阿片受体增加淋巴细胞及小鼠脾脏、肺、心脏中促凋亡受体 *Fas* mRNA 的表达^[8]。在应激小鼠(内源性阿片肽水平增加)的脾淋巴细胞中, *Fas* mRNA 的表达明显增加。但这一效应可被纳屈酮或纳洛酮阻断, 说明 *Fas* 介导的淋巴细胞凋亡依赖于内源性阿片肽^[9]。这一结果显示, 在应激小鼠中可能存在一种内源性阿片肽介导 *Fas* 表达的紧张性调节。本研究对吗啡依赖大鼠海马区 *Fas*、*Bcl-2* 和 *Caspase-3* 蛋白的表达进行了在体研究, 结果表明, 在吗啡成瘾的大鼠海马区, 参与细胞凋亡调节的 3 个主要蛋白含量发生了改变, 与对照组比较, 吗啡依赖组和戒断组促进凋亡的 *Fas*、*Caspase-3* 表达增加, 抑制凋亡的 *Bcl-2* 表达减少, 说明长期应用吗啡可通过凋亡途径引起大鼠脑细胞凋亡数目异常增

加, 这与以上离体细胞的研究结果相一致。

综上所述, 吗啡通过 *Fas*、*Bcl-2* 和 *Caspase-3* 含量的改变介导并促进脑部细胞凋亡。本研究为进一步探讨为长期应用阿片类药物所引起的神经损害机制和病理生理基础研究提供了依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Nestler E J. Under siege: the brain on opiates[J]. *Neuron*, 1996, 16: 897-900.
- [2] Ferrer-Alcón M, Garcia-Sevilla J A, Jaquet P E, La Harpe R, Riederer B M, Walzer C, et al. Regulation of nonphosphorylated and phosphorylated forms of neurofilament proteins in the prefrontal cortex of human opioid addicts[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61: 338-349.
- [3] Hassanzadeh K, Habibi-asl B, Farajnia S, Roshangar L. Mincycline prevents morphine-induced apoptosis in rat cerebral cortex and lumbar spinal cord: a possible mechanism for attenuating morphine tolerance[J]. *Neurotox Res*, 2011, 19: 649-659.
- [4] Hassanzadeh K, Roshangar L, Habibi-asl B, Farajnia S, Izadpanah E, Nemati M, et al. Riluzole prevents morphine-induced apoptosis in rat cerebral cortex[J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63: 697-707.
- [5] 纪家涛, 王新华, 由振东, 韩同钦. 吗啡依赖大鼠模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 1997, 18: 81-82.
Ji J T, Wang X H, You Z D, Han T Q. To establish a morphine dependent rat model[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 1997, 18: 81-82.
- [6] Bhargava H N, Gulati A. Modification of brain and spinal cord dopamine D1 receptors labeled with [³H]SCH 23390 after morphine withdrawal from tolerant and physically dependent rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, 252: 901-907.
- [7] Singhal P C, Kapasi A A, Reddy K, Franki N, Gibbons N, Ding G. Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells[J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 66: 650-658.
- [8] Yin D, Mufson R A, Wang R, Shi Y. Fas-mediated cell death promoted by opioids[J]. *Nature*, 1999, 397: 218.
- [9] Yin D, Tuthill D, Mufson R A, Shi Y. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression[J]. *J Exp Med*, 2000, 191: 1423-1428.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩