

吗啡对小鼠海马结构突触素表达及突触结构的影响

陈良富, 柳洁, 李莉, 苏筱玲

(怀化医学高等专科学校组织学与胚胎学教研室, 怀化 418000)

[摘要] **目的:** 研究吗啡对海马结构突触素(SYN)表达的影响, 为吗啡慢性中毒、成瘾和戒断症状的发生与治疗提供病理学依据。**方法:** 将 20 只小鼠随机分成对照组和实验组, 每组 10 只。对照组每只小鼠每日皮下注射生理盐水 0.1 ml, 实验组每只小鼠每日皮下注射吗啡 0.1 ml(1 mg)。注射 30 d 后, 将两组小鼠断头处死, 开颅取出脑组织并制片。切片经免疫组织化学 SP 法处理, 光镜观察与照相, 图像分析系统分析, 最后行统计学处理。**结果:** 在对照组, 内嗅区、下托、齿状回的分子层和多形层及海马的始层和辐射层均显黄色, 有 SYN 阳性表达, 海马的腔隙分子层显淡黄色, 有 SYN 弱阳性表达, 锥体细胞和颗粒细胞的胞膜显黄色, 呈 SYN 阳性表达, 海马结构的平均灰度值为 132.84 ± 8.67 ; 下托和内嗅区内有阳性表达神经元, 其均值为 $(7.80 \pm 1.03)/\text{mm}^2$ 。在实验组, 下托和齿状回多形层显黄色, 有 SYN 阳性表达, 内嗅区及海马多形层、辐射层和腔隙分子层显深黄色, 有 SYN 强阳性表达, 锥体细胞和颗粒细胞的细胞膜显深黄色, 呈 SYN 强阳性表达, 海马结构的平均灰度值为 116.27 ± 5.70 ; 下托和内嗅区内有强阳性表达神经元, 其均值为 $(11.90 \pm 1.45)/\text{mm}^2$ 。实验组的 SYN 阳性神经元比对照组多, SYN 的表达比对照组强 ($P < 0.01$)。海马结构呈毛玻璃状, 细胞染色浅, 其中可见较多固缩的细胞核与空泡。**结论:** 吗啡能促进海马结构内神经元的 SYN 表达和凋亡, 影响突触的结构和功能。

[关键词] 吗啡; 突触素; 突触; 海马

[中图分类号] R 749.61

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2007)05-0484-04

Influence of morphine on synaptophysin expression and synapse structure in hippocampus of mice

CHEN Liang-fu, LIU Jie, LI Li, SU Xiao-ling (Department of Histology and Embryology, Huaihua Medical Institute, Huaihua 418000, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of morphine on the expression of synaptophysin (SYN) and synapse structure in mice hippocampus, so as to provide pathological evidence for studying the development and treatment of chronic morphine intoxication, addiction and abstinence symptoms of morphine. **Methods:** Twenty mice were evenly randomized into control group and experiment group. Mice in control group were injected with normal saline (0.1 ml daily) and those in experimental group were injected with morphine (0.1 ml, 1 mg daily). Thirty days later the mice in 2 groups were killed and their brain tissues were harvested and made into slices, stained with immunohistochemical techniques (SP) and photographed under the light microscope. The images were analyzed with the image analytical system and the data were statistically analyzed. **Results:** In the control group, positive staining of SYN was found in the entorhinal area, subiculum, stratum plexiforme, polymorphic layer of gyrus dentatus, stratum oriens, and stratum radiatum of hippocampus; weak positive staining of SYN was noticed in the stratum lacunosum-moleculare of hippocampus; positive staining of SYN was also found the membrane of pyramidal cells and granule cells, with the mean gray scale value of the hippocampal structure being 132.84 ± 8.67 . Positively stained neurons was also found in the entorhinal area and the subiculum, with a intensity of $(7.80 \pm 1.03)/\text{mm}^2$. In the experiment group, the subiculum and polymorphic layers of gyrus dentatus were positively stained for SYN; the entorhinal area, stratum oriens, stratum radiatum and stratum lacunosum-moleculare of hippocampus were strongly positive of SYN; the membrane of pyramidal cells and granule cells were also strongly positive of SYN, with the mean gray scale value of the hippocampal structure being 116.27 ± 5.70 . Strongly stained neurons were also found in the entorhinal area and the subiculum, with the intensity being $(11.90 \pm 1.45)/\text{mm}^2$. The number of SYN positive neurons and the intensity of SYN in the experimental group were higher than those in the control group ($P < 0.01$). The hippocampal structure looked like ground glass, with slight staining and many pyknotic nuclei and bubbles. **Conclusion:** Morphine can promote the SYN expression and apoptosis of neurons in the hippocampus, and therefore affect the structure and the function of the synapses in it.

[KEY WORDS] morphine; synaptophysin; synapses; hippocampus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5):484-487]

突触素(SYN, p38)在神经元胞体的粗面内质网(RER)合成, 广泛存在于突触前成分的突触小泡中, 是一种与突触结构和功能密切相关的膜蛋白。SYN

[基金项目] 湖南省教育厅科学基金资助项目(04C051)。Supported by Science Foundation of Education Department of Hunan Province(04C051)。

[作者简介] 陈良富, 教授。E-mail: liangfuchen@126.com

参与突触小泡的转运、导入和神经递质的释放,参与突触小泡的再循环和突触的发生。SYN不仅可以作为突触小泡膜的分子标记,而且也可以作为突触结构和功能的标志^[1-3]。SYN与神经系统的发育、学习、记忆、行为及多种神经系统疾病的发生有关^[4-6]。近年,许多学者对吗啡慢性中毒、成瘾及戒断症状与体征的发生进行了深入的研究,认为海马结构的形态和功能改变是引起上述病理变化的原因之一。有关吗啡慢性中毒、成瘾及戒断症状和体征的发生与海马结构SYN表达的关系,目前报道不多,是一个值得深入研究的课题^[7]。本研究通过免疫组化和图像分析技术,详细观察了啡注射前、后海马结构内SYN的表达,分析了SYN表达与海马结构神经通路中突触传递的关系,旨在为啡慢性中毒、成瘾及戒断症状的发生和治疗提供病理学依据。

1 材料和方法

1.1 实验试剂 一抗: Mouse Anti-Synaptophysin 购于博士德生物工程有限公司; SP系列试剂盒: 由美国 ZYMED 公司提供; DAB: 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。啡: 针剂, 10 mg/1 ml, 购于沈阳第一制药厂。

1.2 动物分组及处理 取成年健康云南雄性小鼠 20 只, 随机分成 2 组, 每组 10 只。第 1 组为对照组, 第 2 组为实验组。对照组每只小鼠每日皮下注射生理盐水 0.1 ml, 实验组每只小鼠每日皮下注射啡 0.1 ml (1 mg), 连续用药 30 d。

1.3 检测方法 用药 30 d 后将各组小鼠急性断头处死, 打开颅腔, 取出脑, 分别用 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片厚 8 μ m, 切片贴于经多聚赖氨酸处理的载玻片上。采用免疫组织化学 SP 法和图像分析法检测 SYN 的表达, 方法简述如下: 切片脱蜡至蒸馏水, 经 3% H_2O_2 处理和微波抗原修复后, 用正常山羊血清封闭切片, 滴加 1:200 稀释的一抗; 留下 4 张切片不加一抗, 作为阴性对照片, 37 $^{\circ}C$ 温箱中孵育 3 h, 其余步骤相同。PBS 冲洗 3 次, 滴加生物素化二抗工作液, 室温下孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 室温下孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 滴加 DAB 显色, 蒸馏水洗, 苏木精复染, 经两次无水乙醇脱水和二甲苯透明后, 中性树脂封片。用 Motic BA400/450 显微镜观察阴性对照片和海马结构并照相。镜下观, 对照片呈灰色或浅灰色, 为 SYN 阴性表达。以此为参照, 将淡黄色视为弱阳性表达, 黄色视为阳性表达, 深黄色视为强阳性表达。用 Motic Images advanced 3.2

图像分析系统对海马结构进行图像分析, 求出每只小鼠海马结构各部的图像灰度平均值, 选择下托锥体细胞层与内嗅区皮质 I、II、III 层的细胞密集区, 计数每平方毫米内的 SYN 阳性神经元。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件对两组样本灰度值和阳性细胞数行总体均数的假设性检验。

2 结果

2.1 对照组 SYN 的表达 内嗅区、下托、齿状回分子层和多形层及海马的室床、多形层、辐射层均显黄色, 有 SYN 阳性表达; 海马的腔隙分子层显淡黄色, 有 SYN 弱阳性表达 (图 1A)。下托锥体细胞层与内嗅区皮质 I、II、III 层, 可见散在分布的三角形或锥体形细胞, 细胞体积小, 有突起, 细胞膜染成黄色, 细胞核大, 染色较深, 核周胞质少, 亦染成黄色, 这些细胞为 SYN 阳性表达细胞 (图 1B)。高倍镜观, 海马锥体细胞层由 5~6 层排列密集的细胞构成, 细胞核大, 染色浅, 核仁明显, 细胞膜与细胞质染成黄色。CA1 区锥体细胞的细胞膜和细胞质染成黄色; CA2 区锥体细胞有许多平行排列的长突起伸入辐射层, 细胞膜染成淡黄色 (图 1C、1D)。齿状回颗粒层细胞的核大, 染色较浅, 核仁明显, 细胞膜染成淡黄色, 颗粒细胞的突起伸入分子层。

2.2 实验组 SYN 的表达 下托和齿状回多形层显黄色, 有 SYN 阳性表达; 内嗅区及海马室床、多形层、辐射层和腔隙分子层显深黄色, 有 SYN 强阳性表达 (图 1E)。高倍镜观, 海马结构呈毛玻璃状, 其中可见较多固缩的细胞核与空泡, 空泡内可见细丝绒状或细粒状的浅蓝色结构。海马锥体细胞层的细胞排列松散, 细胞核肿大, 染色浅, 核内染色质稀疏, 呈淡蓝色颗粒状。海马 CA1 区锥体细胞层由 3~4 层神经元构成, 细胞的排列较松散, 细胞膜染成深黄色; CA2 区锥体细胞的突起减少, 细胞膜染成黄色 (图 1F、1G)。齿状回颗粒细胞层的细胞核肿大, 呈圆形, 染色浅。下托和内嗅区 I、II、III 层内可见锥体形或圆形的细胞, 细胞大小不一, 散在分布, 有突起, 细胞核染色浅, 核周胞质多, 细胞膜和核周胞质染成棕黄色, 有 SYN 强阳性表达 (图 1H)。海马结构可见较多的空泡, 空泡之间的区域粗糙, 呈颗粒状外观 (图 1I)。

2.3 两组 SYN 阳性表达的比较 对照组海马结构的平均灰度值为 132.84 ± 8.67 , 下托和内嗅区皮质的 SYN 阳性神经元为 $(7.80 \pm 1.03)/mm^2$; 实验组海马结构的平均灰度值为 116.27 ± 5.70 , 下托和内

嗅区皮质的 SYN 强阳性神经元为 $(11.90 \pm 1.45) / \text{mm}^2$ 。经假设性检验,显示两组的总体均数不相等 ($P < 0.01$)。实验组的 SYN 阳性表达神经元比对

照组多,灰度值与免疫组化反应程度呈反变关系,实验组的平均灰度值小于对照组,故 SYN 的表达比对照组强,见表 1。

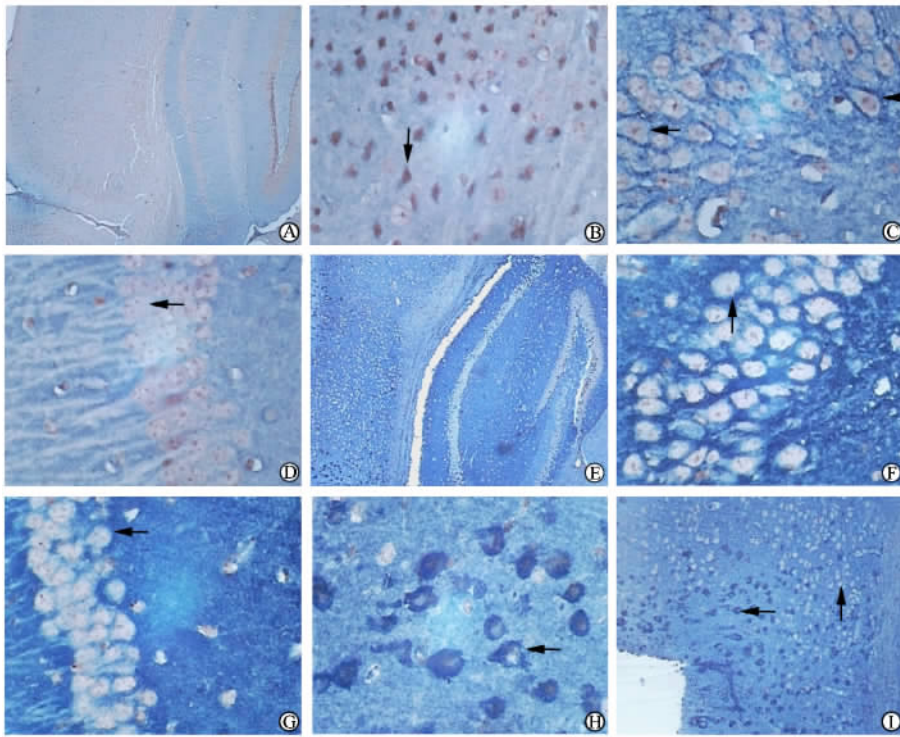


图 1 免疫组织化学染色显示海马结构突触素的表达

Fig 1 SYN expression in hippocampus (IHC)

A; SYN expression in normal hippocampal tissue ($\times 40$); B; Positively stained neurons in the subiculum and entorhinal area of the normal hippocampus (arrow, $\times 400$); C; Positively stained neurons in the normal hippocampal CA1 (arrows, $\times 400$); D; Positively stained neurons and the condensed prominentia in the normal hippocampal CA2 (arrow, $\times 400$); E; SYN expression in the hippocampal tissue after injecting morphine ($\times 40$); F; Strong expression of SYN in neurons decreased in the hippocampal CA1 after injecting morphine; their nuclei were swollen and understained (arrows, $\times 400$); G; Strong expression of SYN in neurons and their prominences decreased in the hippocampal CA2 after injecting morphine, and their arrangement were sparse (arrow, $\times 400$); H; Strong expression of SYH in neurons of the I, II, III lamella of the subiculum and entorhinal area cortex after injecting morphine (arrow, $\times 400$); I; Strong expression of SYH in neurons and the vacuoles of the subiculum and entorhinal area cortex after injecting morphine (arrows, $\times 100$)

表 1 海马结构的灰度值和 SYN 阳性神经元数目

Tab 1 Gray scale values and SYN positive neurons in hippocampus

($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	Gray scale value	SYN positive neurons (mm^{-2})
Control	132.84 ± 8.67	7.80 ± 1.03
Experiment	$116.27 \pm 5.70^{**}$	$11.90 \pm 1.45^{**}$

** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

海马结构内 SYN 的阳性表达部位和程度与个体的发生、海马结构中突触及神经元的数量、分布相

一致,药物及中枢神经系统内理化环境的改变,均可影响 SYN 的表达^[8-9]。正常情况下,神经元的细胞膜和化学性突触的突触前成分有 SYN 表达,SYN 的表达与神经元的分布及突触的种类和密度有关。神经元的数量多,突触的密度大,SYN 的表达强。海马结构含大量的神经元与多种类型的化学性突触,故有较强而广泛的 SYN 阳性表达,其表达的程度和范围与神经元和突触的分布相一致。本研究的结果证实了这一点。同时,本研究还发现实验组的 SYN 阳性表达神经元比对照组多,SYN 的表达比对照组强,海马结构可见较多的空泡,空泡之间的区域粗糙,呈颗粒状外观。提示吗啡能促进海马结构的神经元表达 SYN,并促进神经元凋亡。

吗啡能影响海马结构的 SYN 表达,但吗啡通过何种机制影响海马结构的 SYN 表达,又是通过何种途径影响海马结构的功能,这是一个十分复杂的问题。吗啡能诱导小胶质细胞表达脑源性神经营养因子(BDNF)^[10]。BDNF 经 neurotrophin receptor TrkB 基因诱导神经元表达 SYN 与微管相关蛋白,并通过磷脂酶(PLC γ)和丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)途径促进突触蛋白 I 和突触小泡钙结合蛋白的表达,进而促进谷氨酸(Glu)释放,BDNF 和 SYN 等还通过 MAPK 促进 γ -氨基丁酸(GABA)的释放。SYN、突触小泡钙结合蛋白、突触蛋白 I 和微管相关蛋白等,能维持突触的正常结构与功能,并能促进神经递质的合成、转运和释放^[11-12]。海马和齿状回是海马结构的中继站,海马锥体细胞和齿状回颗粒细胞均接受来自下托、内嗅区、隔核和斜角带核的谷氨酸能(glutamatergic)纤维支配,同时也接受来自局部中间神经元的 γ -氨基丁酸能(GABAergic)纤维支配。海马锥体细胞除了接受上述两类神经纤维的支配外,还接受来自齿状回颗粒细胞的 glutamatergic 纤维支配,海马锥体细胞发出 glutamatergic 纤维与额叶、嗅脑、下托、内嗅区、对侧海马、边缘系统、锥体外系、间脑和中脑中央灰质等结构形成广泛的突触联系。海马锥体细胞和齿状回颗粒细胞的细胞膜上有 Glu 和 GABA 两种受体,其活动受传入通路的 glutamatergic 和局部通路的 GABAergic 纤维影响。由此可见,吗啡能改变 glutamatergic 和 GABAergic 纤维的兴奋性,通过神经递质和受体改变海马结构的功能。

正常情况下,海马内 GABAergic 纤维的功能活跃,通过突触前膜释放的 GABA,兴奋突触后膜的 GABA 受体,锥体细胞和颗粒细胞的活动被抑制。注射吗啡后,下托和内嗅区皮质 I、II、III 层的锥体细胞及海马锥体细胞和齿状回颗粒细胞的 SYN 和 BDNF 表达上调,glutamatergic 纤维的兴奋性大于 GABAergic 纤维,海马锥体细胞兴奋。海马锥体细胞又通过传出通路,兴奋额叶皮质、视皮质、嗅皮质、边缘系统、锥体外系和中脑中央灰质等,引起幻听、幻视、嗅觉过敏、兴奋、妄想、肌张力增强或抽搐、醉汉步态、血压升高和呼吸加快等一系列的神经精神症状与体征,同时唤起对欣快的留恋与回忆,上述症状和体征的形成机制与瘾 的形成相似^[13]。海马锥体细胞的兴奋还可通过传出通路到达下托和内嗅区,反馈性增强其神经元的兴奋性,使得齿状回颗粒细胞和海马锥体细胞的兴奋性进一步增强,加重了上述症状与体征。随着注射吗啡时间的延长和剂量

的增加,下托、内嗅区和海马内的锥体细胞因凋亡而减少,glutamatergic 纤维及相应的突触减少,GABAergic 纤维的兴奋性大于 glutamatergic 纤维,海马锥体细胞被抑制,患者出现一系列锥体外系、边缘系统及神经精神抑制的症状与体征^[14]。

总之,吗啡能促进海马结构的神经元凋亡,并能促进其表达 SYN,改变 glutamatergic 纤维和 GABAergic 纤维及相应受体的兴奋性。上述结构与功能的改变,或许是导致吗啡成瘾、慢性中毒及戒断症状形成的原因之一。

[参考文献]

- [1] Spiwox-Becker I, Vollrath L, Seeliger M W, et al. Synaptic vesicle alterations in rod photoreceptors of synaptophysin-deficient mice [J]. *J Neurosci*, 2001, 107: 127-142.
- [2] Khvotchev M V, Sudhof T C. Stimulus-dependent dynamic homo- and heteromultimerization of synaptobrevin/VAMP and synaptophysin [J]. *Biochemistry*, 2004, 43: 15037-15043.
- [3] Horikawa H P, Kneussel M, El Far O, et al. Interaction of synaptophysin with the AP-1 adaptor protein gamma-adaptin [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 21: 454-462.
- [4] 潘三强, 宿宝贵, 韩 辉, 等. 大鼠海马 CA3 区在学习记忆时突触可塑性的变化[J]. *解剖学杂志*, 2001, 24: 336-339.
- [5] 张见影, 王 哲. 痴呆大鼠模型行为学、脑内胆碱乙酰转移酶及突触素的改变[J]. *中国老年学杂志*, 2004, 24: 658-659.
- [6] 侯中煜, 刘树伟, 林祥涛, 等. 帕金森病大鼠模型额叶皮质内突触素与神经丝蛋白的表达变化[J]. *解剖学报*, 2004, 35: 578-581.
- [7] 张瑞岭, 郝 伟, 李昌琪, 等. 慢性吗啡处理及戒断对大鼠不同脑区突触素 I mRNA 表达水平的影响[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2003, 12: 16-20.
- [8] Eastwood S L, Weickert C S, Webster M J, et al. Synaptophysin protein and mRNA expression in the human hippocampal formation from birth to old age [J]. *Hippocampus*, 2006, 16: 645-654.
- [9] Meng H, Walker N, Su Y, et al. Stargazin mutation impairs cerebellar synaptogenesis, synaptic maturation and synaptic protein distribution [J]. *Brain Res*, 2006, 1124: 197-207.
- [10] Takayama N, Ueda H. Morphine-induced chemotaxis and brain-derived neurotrophic factor expression in microglia [J]. *J Neurosci*, 2005, 25: 430-435.
- [11] Coffey E T, Akerman K E, Courtney M J. Brain derived neurotrophic factor induces a rapid upregulation of synaptophysin and tau proteins *via* the neurotrophin receptor TrkB in rat cerebellar granule cells [J]. *Neurosci Lett*, 1997, 227: 177-180.
- [12] Matsumoto T, Numakawa T, Yokomaku D, et al. Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of glutamate and GABA release: different dependency on signaling pathways and neuronal activity [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 31: 70-84.
- [13] Gutierrez R, Heinemann U. Co-existence of GABA and Glu in the hippocampal granule cells: implications for epilepsy [J]. *Curr Top Med Chem*, 2006, 6: 975-978.
- [14] Hu S, Sheng W S, Lokensgard J R, et al. Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons [J]. *Neuropharmacology*, 2002, 42: 829-836.

[收稿日期] 2006-12-21

[修回日期] 2007-03-15

[本文编辑] 孙 岩