

278-280

三种阿片受体激动剂对突触传递的抑制作用

R 964

R 338.8

袁孝如 (南京医科大学生理教研室, 南京 210029, 中国)

Inhibitory effects of three opioid receptor agonists on synaptic transmission

YUAN Xiao-Ru

(Department of Physiology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

KEY WORDS opioid receptors; enkephalins; U-50488H; nucleus accumbens; electrophysiology; naloxone; sodium glutamate; tetrodotoxin

AIM: To compare the inhibitory effects of 3 opioid receptor agonists, (D-Ala², NMe-Phe⁴, Gly-ol)-enkephalin (DAGO), (D-Pen^{2,5})-enkephalin (D-PEN), and *trans*-(±)-3, 4-dichloro-*N*-methyl-*N*-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]-benzeneacetamide methanesulfonate (U-50488H) in different concentrations on synaptic transmission. **METHODS:** The excitatory postsynaptic potentials (EPSP) in slice preparation of nucleus accumbens of rats were recorded using electric stimulation of the olfactory tubercle area and intracellular micro-pipettes filled with potassium acetate (3 mol·L⁻¹). **RESULTS:** Superfusion of DAGO, D-PEN, and U-50488H (1 μmol·L⁻¹) reduced the amplitude of EPSP and the inhibitory effect on EPSP were reversed by superfusing naloxone (NaI, 1 μmol·L⁻¹), in which the DAGO-induced reduction of synaptic transmission was the most effective. The depolarizing responses to microiontophoretic injection of glutamate were reduced by superfusing DAGO in 19 neurons of slice preparation of nucleus accumbens. **CONCLUSION:** The inhibitory effects of DAGO, D-PEN, and U-50488H on EPSP were in a concentration-dependent manner, and the mechanism of opioid agonists (at least DAGO) reducing EPSP was related to a decrease of postsynaptic transmission mediated by glutamate.

关键词 阿片受体; 脑啡肽; U-50488H; 伏核; 电生理学; 纳洛酮; 谷氨酸钠; 河豚毒素

突触

Received 1993-06-21

Accepted 1995-06-28

目的: 比较不同浓度三种阿片受体激动剂对突触传递的抑制作用。 **方法:** 用细胞内记录和细胞外微电泳技术, 于大鼠伏核脑片制备上记录神经元的兴奋性突触后电位和谷氨酸钠所致细胞膜去极化。 **结果:** (D-Ala², NMe-Phe⁴, Gly-ol)-enkephalin (DAGO), (D-Pen^{2,5})-enkephalin (D-PEN), and *trans*-(±)-3, 4-dichloro-*N*-methyl-*N*-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]-benzeneacetamide methanesulfonate (U-50488H) (1 μmol·L⁻¹) 均降低突触传递, 尤以 DAGO 抑制作用最著。 **结论:** 三种阿片受体激动剂对突触传递的抑制作用均具有浓度依赖性, 其作用机制与谷氨酸介导的突触传递受抑制有关。

阿片受体激动剂的抑制作用在于降低去极化和超极化突触后电位而不影响神经元的膜电位和输入阻抗^[1-3], 然而, 不同种类和不同浓度阿片受体激动剂的作用有否差别? 作用机制何在? 本文对 δ 受体激动剂 (D-Pen^{2,5})-enkephalin (D-PEN), μ 受体激动剂 (D-Ala², NMe-Phe⁴, Gly-ol)-enkephalin (DAGO), kappa 受体激动剂 *trans*-(±)-3, 4-dichloro-*N*-methyl-*N*-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]-benzeneacetamide methanesulfonate (U-50488H) 对突触传递的抑制作用进行比较。

MATERIALS AND METHODS

实验用 ♂ Sprague-Dawley 大白鼠 128 只, 体重 110 ± 5 g, 在 3% halothane 吸入麻醉下快速断头取脑, 置于震动切片机的 ACSF 浴槽内制作 350-400 μm 冠状切片 6 只, 旋即平铺于用 ACSF 湿润的 3-mL 小室内温育 40 min (30-31 °C), 然后用含有 95% O₂ + 5% CO₂ 的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 恒速灌流 (3 mL·min⁻¹)。 ACSF 成份: NaCl 130; KCl 3.5; NaH₂PO₄ 1.25; MgSO₄·7H₂O 1.5; CaCl₂ 2.0; NaHCO₃ 24; 葡萄糖 10 mmol·L⁻¹。 细胞内记录微电极用醋酸钾 3 mol·L⁻¹ 充灌, 电极阻抗 120-150 MΩ, 置于前联合周围之伏核内 (冠状切面为前窗前 0.7-2.2 mm)。 俟每只神经元膜电位记录稳定后经预先置于嗅结节区的双极钨丝电极 (尖

端直径 0.1 mm, 极间距离 0.2 mm) 刺激向伏核投射的传入纤维, 调节刺激器的输出强度, 从阈下强度开始过阈强度后即以阈值倍数递增, 诱发伏核神经元的兴奋性突触后电位 (excitatory postsynaptic potential, EPSP) 直至触发锋电位。测量 EPSP 幅值并与对应的刺激强度作输入/输出曲线, 观察 D-PEN, DAGO 和 U-50 448H 对 EPSP 的影响及纳洛酮 (naloxone, Nal) 的翻转作用。三种阿片受体激动剂均采用四种浓度: 0.1, 0.3, 0.5, 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Nal 浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 阿片受体激动剂的作用观察 8 - 25 min, Nal 作用观察 30 - 40 min。为防止不同阿片受体激动剂的交叉作用, 每项观察均在不同脑片, 不同神经元上进行。在 19 只神经元上待阿片受体激动剂对 EPSP 的抑制作用被 Nal 翻转恢复后于所记录的同一只神经元旁插入五管微电泳电极 (中心管含 $\text{NaCl } 2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 各侧管均含谷氨酸钠 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 微电泳注入阴极电流 145 nA, 滞留电流为阳极电流 19 nA。每次电泳时间为 20 s, 间隔 4 min 以同样的电流自动重复注入。为避免触发锋电位, 微电泳谷氨酸钠的实验均在河豚毒素 (tetrodotoxin $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 存在下进行。本文所采用的阿片受体激动剂和 Nal 为 Sigma 产品。神经元的膜电位、输入阻抗、EPSP 等记录在多导生理仪上并经计算机采集和处理 (程序为 P-clamp)。计量资料为 $\bar{x} \pm s$, 并用 ANOVA 和 z 检验统计处理。

RESULTS

三种阿片受体激动剂对 EPSP 的抑制 共观察 128 只伏核神经元, 膜电位 $-79.9 \pm 0.7 \text{ mV}$ (-68 至 -94 mV), 锋电位为 $99.6 \pm 1.0 \text{ mV}$ (80 - 120 mV) 于 53 只神经元上观察到灌流 DAGO (18 只细胞)、D-PEN (16 只细胞) 和 U-50488H (19 只细胞) 均降低 EPSP 幅度, 其抑制作用能被 Nal 翻转 (Tab 1)。

将三种阿片受体激动剂 ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对阈值 EPSP 抑制作用进行比较可见: DAGO 抑制 EPSP

的作用最著。DAGO, D-PEN, U-50488H 降低 EPSP 幅度分别为 $90.0 \pm 0.3 \%$, $72.0 \pm 0.5 \%$, $70.0 \pm 0.7 \%$, 与对照值差异明显 ($P < 0.01$)。

在 56 只神经元上, 分别观察 DAGO (21 只神经元)、D-PEN (19 只神经元)、U-50488H (16 只神经元) 各在 0.1, 0.3, 0.5, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对阈值 EPSP 抑制作用: D-PEN 和 U-50488H 对 EPSP 的抑制作用呈明显的剂量依赖性, 而 DAGO 对 EPSP 的抑制作用虽随浓度增加而增强, 但是, 浓度为 0.1 和 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 EPSP 的抑制作用反而分别略强于 0.3 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fig 1)。

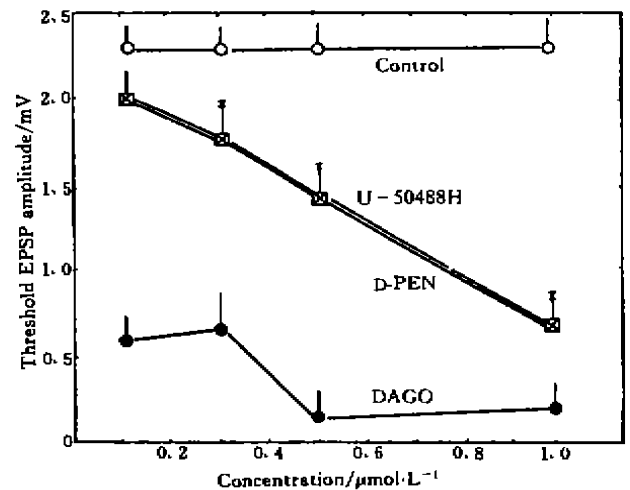


Fig 1. Inhibitory effect of DAGO, D-PEN, and U-50488H on threshold EPSP amplitude in 56 accumbens neurons.

DAGO 降低谷氨酸钠介导的细胞膜去极化 在 19 只伏核神经元上, DAGO 对 EPSP 抑制作用被 Nal 翻转并恢复至对照水平后, 于同一只神经元上再观察 DAGO 对微电泳注入谷氨酸钠诱发细胞膜去极化的影响: 灌流 DAGO 18 min 时细胞膜去极化幅度明显降低, 降低的幅度为对照值的

Tab 1. Opioid receptor agonists ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) reduced the amplitude of evoked EPSP in 53 accumbens neurons, with reversal of the effect by naloxone ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). $\bar{x} \pm s$. $^{\circ}P < 0.01$ vs control.

Stimulus intensity	Amplitude of excitatory postsynaptic potentials/mV						
	Control	DAGO	Nal	D-PEN	Nal	U-50488H	Nal
Threshold	2.0 ± 0.4	$0.2 \pm 0.1^{\circ}$	$1.9 \pm 0.2^{\circ}$	$0.6 \pm 0.1^{\circ}$	$1.7 \pm 0.2^{\circ}$	$0.6 \pm 0.2^{\circ}$	$1.9 \pm 0.2^{\circ}$
1/2 Max	10.2 ± 1.8	$2.0 \pm 0.9^{\circ}$	$9.8 \pm 0.7^{\circ}$	$3.6 \pm 0.3^{\circ}$	$9.1 \pm 0.7^{\circ}$	$3.8 \pm 0.3^{\circ}$	$11.0 \pm 0.8^{\circ}$
Max	20.5 ± 1.6	$4.0 \pm 0.3^{\circ}$	$19.1 \pm 1.3^{\circ}$	$5.0 \pm 0.3^{\circ}$	$18.5 \pm 1.5^{\circ}$	$5.6 \pm 0.3^{\circ}$	$20.1 \pm 1.6^{\circ}$
Neurons	53	18		16		19	

51.5 ± 4.5 % ($P < 0.01$); 灌流液内加入 NaI 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 18 - 40 min 时, 其幅度可恢复到对照值的 81.3 ± 3.0 %。但有 3 只神经元的谷氨酸钠诱发的细胞膜去极化不能被灌流 DAGO 所降低 (Fig 2)。

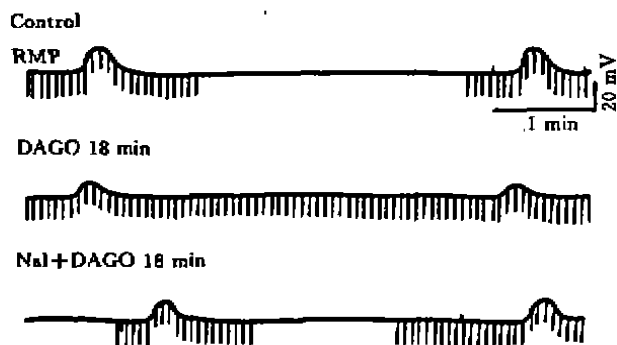


Fig 2. DAGO reduced depolarizing responses evoked by injecting glutamate in a nucleus accumbens neuron, with reversal of effect by naloxone (rest membrane potential, RMP = -83 mV, the upward and downward deflections on base line indicate membrane depolarization and input resistance, respectively).

DISCUSSION

本研究采用伏核脑片作为研究材料系因为近年来不少作者认为: 伏核与成瘾药物(例如海洛因、酒精等)的奖赏机制(reward mechanisms)和人类滥用药物有关^[4,5]。伏核含有丰富的阿片肽和不同类型的阿片受体^[6]。三种阿片受体激动剂均降低 EPSP, 其中 μ 阿片受体激动剂 DAGO 对神经元的抑制作用最强, 甚至在另二次实验中(本文未显示)作者将 DAGO 的浓度降低至 30 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 也观察到它对 EPSP 的抑制作用, 表明 μ 阿片受体最为敏感而 δ 和 κ 受体的作用无明显差别。

在不同浓度下, D-PEN 和 U-50488H 对 EPSP 的抑制作用呈浓度依赖性的剂量-效应关系, 而 DAGO 对 EPSP 的抑制作用虽有一定的剂量-效应关系, 但并不规律, 其原因, 可能是 μ 受体对

DAGO 的作用较为敏感, μ 阿片受体存在亚型和不同结合位点^[7] 或本研究所试验的细胞样本数不足? 有待进一步研究。实验中, 有 3 只神经元的谷氨酸介导的细胞膜去极化不能被灌流 DAGO 所降低, 是因为在中枢神经系统内兴奋性氨基酸除谷氨酸外还有门冬氨酸, 是否阿片受体激动剂也影响门冬氨酸介导的突触传递^[8]? 本研究中, 作者仅观察了 DAGO 对谷氨酸介导的突触传递的影响, 尚没有足够的细胞去试验 D-PEN 和 U-50488H 的作用, 由于作者曾观察到它们对伏核神经元膜特性的影响及抑制作用方式相同^[3], 因此, 推测其降低 EPSP 之机制与 DAGO 相似。

总之, 本研究中所涉及的三种阿片受体激动剂均降低谷氨酸介导的突触传递, 其对 EPSP 的抑制作用呈现一定的剂量-效应关系。

ACKNOWLEDGMENT 丁小平技师提供技术帮助。

REFERENCES

- 1 Hakan RL, Henriksen SJ. Systemic opiate administration has heterogeneous effects on activity recorded from nucleus accumbens neurons *in vivo*. *Neurosci Lett* 1987; **83**: 307 - 12.
- 2 McCarthy PS, Walker RJ, Woodruff GN. Depressant actions of enkephalins on neurones in the nucleus accumbens. *J Physiol (Lond)* 1977; **267**: 40P - 41P.
- 3 Yuan XR, Madamba S, Siggins GR. Opioid peptides reduce synaptic transmission in the nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 1992; **134**: 223 - 8.
- 4 Roob GF, Bloom FE. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 1988; **242**: 715 - 23.
- 5 Vaccarino FJ, Bloom FE, Koob GF. Blockade of nucleus accumbens opiate receptors attenuates the intravenous heroin reward in rat. *Psychopharmacology* 1985; **86**: 37 - 42.
- 6 Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci* 1988; **11**: 308 - 14.
- 7 Zukin RS, Zukin SR. Multiple opiate receptor: emerging concepts. *Life Sci* 1981; **29**: 2681 - 90.
- 8 Rusion KI, Randic M. Modulation of NMDA-induced currents by μ -opioid receptor agonist DAGO in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. *Neurosci Lett* 1991; **124**: 208 - 12.