

# 吗啡增强谷氨酸单钠神经毒性及其作用机制

林 凌 顾海明 张维宁 赵晓宁 张鹤云\*  
汤国枝\* 李敏意\* 张祖暄

(南京大学医学院, \*南京大学生化系, 南京 210093)

**摘要** 用皮层神经细胞体外培养、形态学观察、单个神经细胞内游离钙检测及乳酸脱氢酶(LDH)测定等方法,观察了啡对谷氨酸单钠(MSG)神经毒性增强作用以及纳络酮对啡作用的逆转,分析了其可能的作用机制。结果表明:啡能显著增强MSG的细胞毒作用,纳络酮可逆转这种增强作用,细胞内 $Ca^{2+}$ 超载可能是兴奋性神经毒素引起神经元死亡的共同病理学机制。

**关键词** 啡;谷氨酸单钠;细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ ;神经毒性作用

50年代末, Lucas首先发现谷氨酸单钠(monosodium glutamate, MSG)可引起视网膜内层神经元不可逆坏死<sup>[1]</sup>。后来研究证实,MSG不仅对视网膜有神经毒性,而且能使未成年动物下丘脑内侧基底部以及脑室周围结构等特定脑区神经元出现核固缩性病理学变化<sup>[2,3]</sup>,并影响动物的正常发育,破坏其成年后的学习记忆及繁殖能力<sup>[4]</sup>。近年来兴奋性氨基酸神经毒性的研究已成为神经科学的热点之一,目前采用离体培养神经元,将激动剂与拮抗剂相结合对MSG神经毒性作用进行系统研究尚未见报道。鉴于 $Ca^{2+}$ 是维持神经信息的重要信使,在兴奋性毒素的毒性中起关键作用,而乳酸脱氢酶(LDH)是一种细胞质膜标记酶,是观察MSG神经元损伤形态学的定量指标<sup>[5,6]</sup>。本文采用形态学观察与生化测定相结合,观察了MSG对离体神经元的毒性影响、啡对MSG的增强作用以及纳络酮对啡作用的逆转,分析了MSG兴奋性毒性作用的可能机制。

## 材 料 和 方 法

MEM培养液为Life Technologies公司产品,MSG系上海海普药厂生产,盐酸啡为沈阳第一制药厂生产,盐酸纳络酮为北京四环制药厂生产。还原辅酶I(NADH)系上海生物化学研究所产品,Fura-2/AM, poly-L-lysine为Sigma公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

**神经细胞培养** 参考Choi的方法<sup>[5]</sup>,取14~17天胎小鼠大脑皮层,D-Hank's液洗2~3次,剪碎后用0.125%胰酶37℃消化15min,1000 r·min<sup>-1</sup>离心,弃上清液,用Hank's液悬浮细胞,再离心,重复3次。用MEM培养液(含20%小牛血清)悬浮细胞,按0.5 ml/孔接种于涂有poly-L-lysine的24孔培养板(密度为640个细胞/mm<sup>2</sup>)内,37℃,5% CO<sub>2</sub>培养。48 h后加入10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>阿拉伯糖胞苷作用24 h,以抑制非神经细胞的过量增殖,以后每隔3 d换一次培养液。

本文于1994年12月30日收到。

本研究得到江苏省自然科学基金资助, No. 661。

**神经细胞存活率的测定** 神经细胞经药物处理后,用 1.5% 酚酚蓝室温下染色 10 min,以等渗的甲醛溶液固定,然后用生理盐水漂洗。倒置显微镜下计数至少 200 个细胞,着蓝色的细胞为死细胞。

**形态学观察及 LDH 的测定** 神经细胞培养 7 d 后,吸去培养液,去酚红 D-Hank' s 液洗 3 次。换含 1% 小牛血清 MEM 培养液,分别加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  纳络酮、 $10^{-7}$  和  $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  吗啡,37°C 培养过夜后加入  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MSG 作用 10 min。换无血清 MEM 培养液继续培养 24 h,倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照(图 1),并参考 Wroblewski<sup>[7]</sup>的方法,每孔取培养液 0.4 ml 测 LDH 活性。以每分钟 340 nm A 值减少 0.001 为 LDH 的 1 个活性单位。

**单个神经细胞内钙离子浓度测定** 细胞分离参考 Dildy 及 Leslie<sup>[8]</sup>的方法,取 1~2 日龄新生小鼠,剥离皮层,立即置于冰冷的 D-Hank' s 液中,仔细剥除脑膜和血管,用 D-Hank' s 液冲洗 3~4 次,剪碎,加入 0.125% 胰酶 37°C 消化 20 min 后,细胞悬液置于 MEM 培养液中,加入 Fura-2/AM(终浓度为  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),37°C 孵育 45 min。依次加药后用 AR-CM-MIC 阳离子测定系统(Spex 公司生产)检测单细胞双波长荧光强度( $\lambda_{em}=340,380, \lambda_{ex}=505 \text{ nm}$ ),并通过倒置显微镜同步观察神经元形态的动态变化过程。由下式计算细胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>[9]</sup>:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (F_D/F_S) \times [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)]$$

式中, R 是实验观察到的荧光比值 ( $F_{340}/F_{380}$ ),  $K_d$  是 Fura-2 与  $\text{Ca}^{2+}$  反应的解离常数,  $R_{\max}$  是胞内 Fura-2 全部为  $\text{Ca}^{2+}$  饱和时的荧光比值(采用  $\text{Ca}^{2+}$  离子载体将胞外  $\text{Ca}^{2+}$  载入细胞内获得),  $R_{\min}$  为 Fura-2 完全未结合  $\text{Ca}^{2+}$  时的荧光比值(通过向介质中加入过量 EDTA 将  $\text{Ca}^{2+}$  螯合而获得),  $F_D$  和  $F_S$  分别代表无  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  饱和状态下 380 nm 处的荧光强度。细胞的自发荧光在其没有负载 Fura-2 时进行测定,计算  $\text{Ca}^{2+}$  浓度之前减去细胞自发荧光和背景荧光。

## 结 果

### 「吗啡对体外培养 7 天的小鼠皮层细胞 MSG 神经毒性的影响

怀孕 14~17 d 的小鼠皮层神经细胞在体外培养 7 d,分别用吗啡( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理 100 min,MSG ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )作用 24 h,与正常对照(图 1A)相比,发现细胞对  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,MSG 和  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  吗啡不敏感,其形态几乎没有变化(图 1B,C)。但  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的吗啡预先作用细胞 100 min 后,加同样浓度的 MSG 再培养,24 h 后可以看见细胞边界模糊,出现明显损伤(图 1D),可见吗啡能增强 MSG 的毒性。如果用  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  纳络酮预处理细胞后,再加入相同浓度的吗啡和 MSG,发现细胞受损伤程度明显降低,提示纳络酮能逆转吗啡的增强 MSG 的毒性作用,保护神经细胞免受 MSG 的损伤(图 1E)。

### MSG 神经毒性的量效关系

皮层神经细胞体外培养 7 d(DIV=7)后,分别加入 0, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MSG 作用 10 min,继续培养 24 h 后,测定神经细胞的存活率。结果显示,MSG 的神经毒性有量效关系(图 2)。

### 吗啡对 MSG 引起神经元释放 LDH 的影响

神经元体外培养 7 d(DIV=7)后,分别加入各种试剂,在 MSG 作用 10 min 后检测培养液中 LDH 的含量。结果显示,  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MSG 作用 DIV 为 7 的神经元后,LDH 释放量与对照组相比变化不明显,但吗啡与 MSG 共同作用时,LDH 释放量增加了  $94.5 \pm 17.3\%$ 。当纳络酮与吗啡和 MSG 共同孵育时,LDH 释放量明显回落(表 1)。

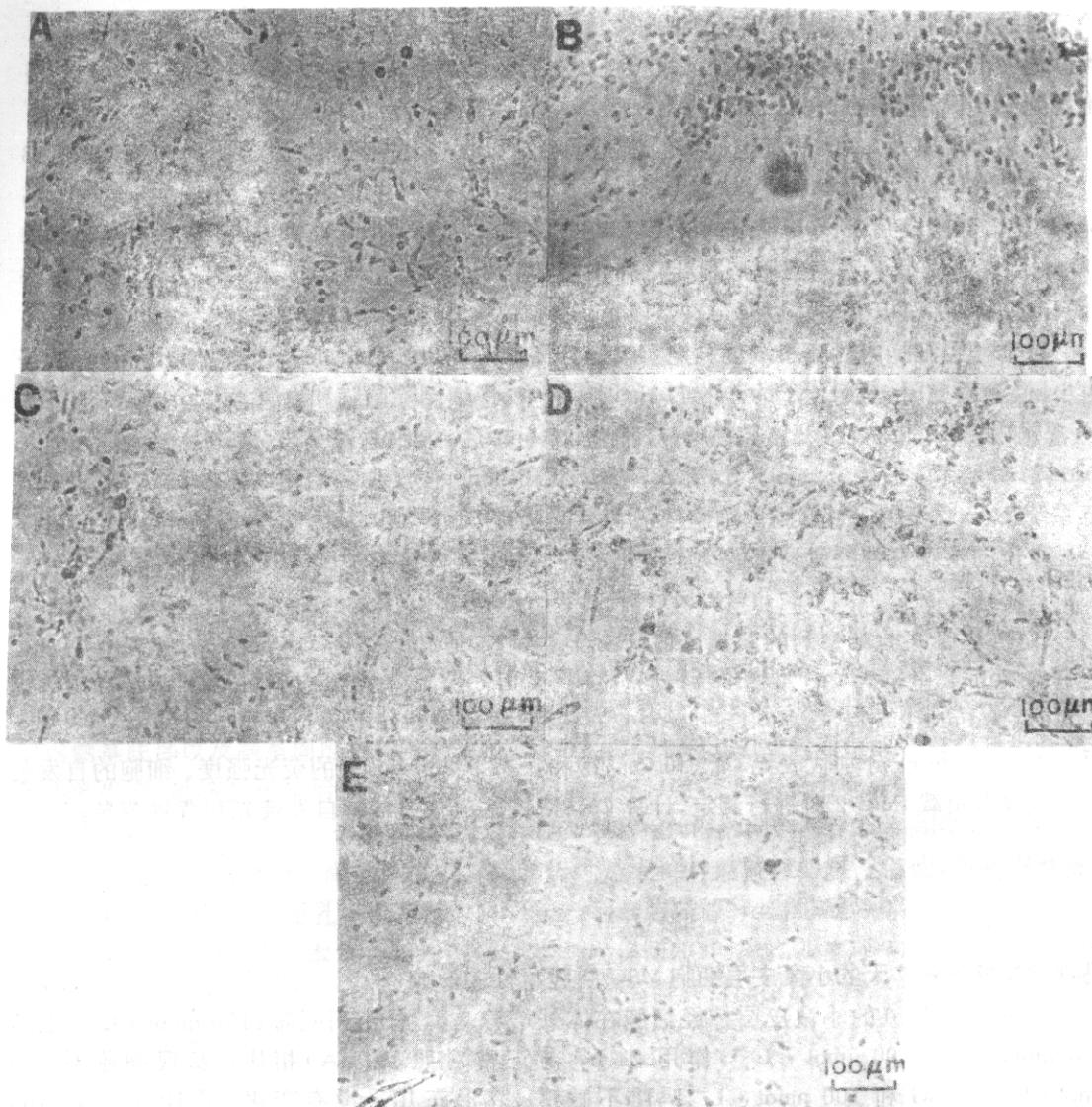


Fig 1 Effect of morphine on MSG-induced neurotoxicity of cultured cortical neurons from 14~17-d old mouse fetuses for 7 days *in vitro*. A. Control culture; B. Culture exposed to morphine ( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); C.  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MSG-treated cells for 24 h; D. Cells pretreated for 10 min with morphine ( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), followed by MSG ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) treatment for 24 h; E. Neurons treated for 10 min with both morphine ( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and naloxone ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), then with MSG ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 24 h.

Tab 1 Morphine enhances MSG neurotoxic injury assessed by LDH release

Exposure to MSG ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Morphine ( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Naloxone ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	<i>n</i>	LDH release (% of control)
-	-	-	5	$100.0 \pm 2.5$
+	-	-	5	$105.7 \pm 19.0$
+	+	-	5	$103.3 \pm 1.2$
+	+	-	5	$194.5 \pm 17.7^{**}$
+	+	+	5	$104.3 \pm 3.6^{\Delta\Delta}$

Values in the table are  $\bar{x} \pm s$ .  $^{**}P < 0.001$  vs MSG or morphine group.  $^{\Delta\Delta}P < 0.001$  vs morphine+MSG group.

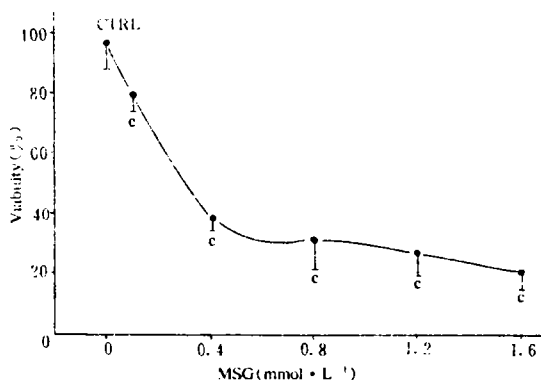


Fig 2 Concentration dependent effect of MSG neurotoxicity. Cultures were exposed for 10 min to MSG 0, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 mmol · L<sup>-1</sup> in D-Hank's solution then incubated in the defined serum-free media for 24 h. Over 200 cells were counted to determine the viability of the cell culture using the equation described under materials and methods. Values are means ± s (n=4). \*P<0.01 vs control.

### 单个神经细胞内游离 Ca<sup>2+</sup> 的变化

图 3 为 MSG 和吗啡处理后单个神经细胞内游离 Ca<sup>2+</sup> 和细胞形态的变化。实验表明, 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 的 MSG 可引起细胞内钙离子浓度 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高, 这是 MSG 损伤神经细胞的原因之一。10<sup>-7</sup> mol · L<sup>-1</sup> 的吗啡对细胞内 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 变化影响不大, 但它与 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> MSG 共同作用时, 使 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 急剧升高 (图 3), 与此同时可在倒置镜下观察到神经元胞体皱缩, 最后引起细胞死亡。

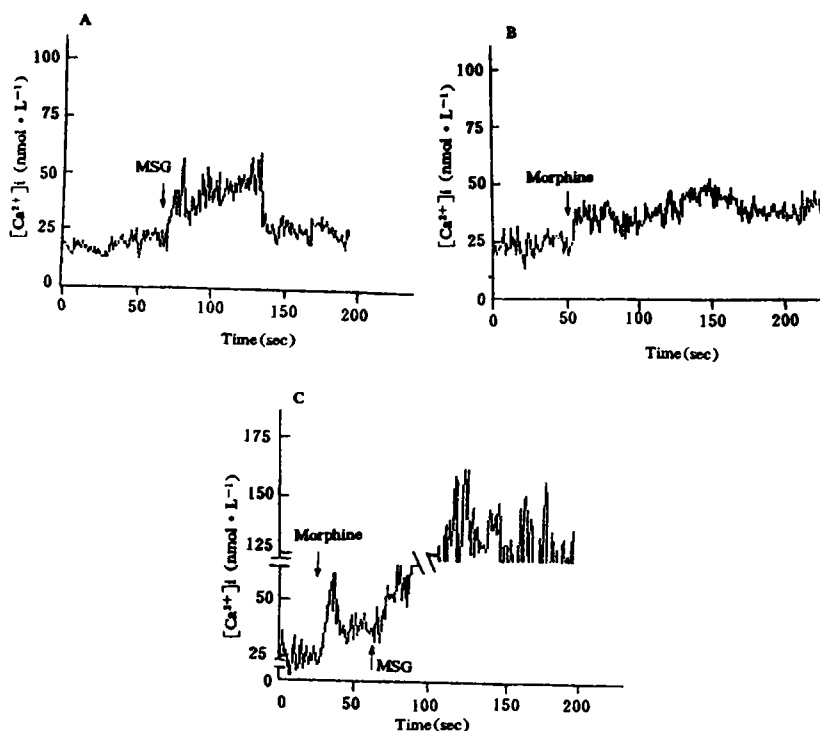


Fig 3 Intracellular Ca<sup>2+</sup> response to MSG 100 μmol · L<sup>-1</sup> (A), Morphine 100 nmol · L<sup>-1</sup> (B) and MSG 100 μmol · L<sup>-1</sup> after morphine 100 nmol · L<sup>-1</sup> (C).

## 讨 论

MSG 是哺乳动物脑内含量最高的氨基酸,是一种兴奋性神经递质,同时又是代谢中间产物。MSG 在生理 pH 时处于解离状态,极性很强,目前对外源性 MSG 能否透过成年哺乳动物的血脑屏障和胎盘屏障的问题尚存在争议<sup>[4]</sup>。据 Koh 等报道, DIV 小于 14 d 的中枢神经细胞对 MSG 的神经毒性作用不敏感<sup>[5]</sup>,本文选用 DIV 5~7 d 的皮层细胞进行实验,观察吗啡对 MSG 神经毒性的影响。形态学观察表明,单用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MSG 对皮层细胞无明显的损伤,但与吗啡共同作用下表现出明显的神经毒性作用,在倒置镜下可见大量细胞死亡。在纳络酮预处理后吗啡的这种增强作用被逆转, LDH 检测结果与形态学观察十分一致。本实验室过去的工作发现,吗啡可以增加谷氨酸受体数目,从而增强 MSG 兴奋性毒性<sup>[10]</sup>。本文结果证明吗啡还可通过阿片受体介导增强 MSG 的神经毒性。

另一方面,MSG 可以引起细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  大量内流,并在倒置镜下同步观察到细胞死亡,提示细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载可能是兴奋性神经毒素引起细胞死亡的共同病理学机理。而且吗啡大幅度提高  $\text{Ca}^{2+}$  内流,造成细胞内钙离子超载,导致细胞损伤。值得注意的是,吗啡单独作用也有引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  升高的趋势,这可能是吗啡通过阿片受体激活了磷酸肌醇途径,使得磷脂酰肌醇水解,生成二脂酰甘油和三磷酸肌醇,而引起细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高<sup>[11]</sup>,其详细机制还有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 Lucus DR, Newhouse. The toxic effects of sodium *L*-glutamate on the inner layers of retina. *AMA Arch Ophthalmol*, 1957, **58**: 195
- 2 Olney JW. Brain lesions, obsity and other distinguishes in mice treated with MSG. *Science*, 1969, **164**: 719
- 3 Mcdonald JW, John WM, Michael VJ. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Rec Rev*, 1990, **15**: 41
- 4 高静,吴娟,赵晓宁等. 谷氨酸单钠透过胎盘屏障对仔鼠特定脑区的结构和功能的影响. *生理学报*, 1994, **46**: 44
- 5 Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by LDH efflux assay. *J Neurosci Methods*, 1987, **20**: 83
- 6 Choi DW, Koh J, Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture; attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci*, 1988, **8**: 185
- 7 Wroblewski F, Laone JS. LDH activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1955, **90**: 210
- 8 Dildy JE and Leslie SW. Ethanol inhibits NMDA-induced increases in free intracelluar  $\text{Ca}^{2+}$  in dissociated brain cells. *Brain Res*, 1989, **499**: 383
- 9 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY *et al.* A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biochem*, 1985, **260**: 3440
- 10 Gao J, Wang L, Wu J *et al.* Enhancing effects of morphine on monosodium glutamate neurotoxicity in adult mice. In: Collery PH, Poirier LA, Little-field NA *et al.*, eds. *Metal Ions in Biology and Medicine*. Vol 2. Paris: John Libbey Eurotext, 1994: 433~438

- 11 Loh HH and Smith AP. Molecular characterization of opioid receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1990,30 : 123

## EFFECTS OF MORPHINE ON MONOSODIUM GLUTAMATE NEUROTOXICITY AND ITS MECHANISM

L Lin, HM Gu, WN Zhang, XN Zhao, HY Zhang\*, GZ Tang\*, MY Li\* and ZX Zhang

(School of Medicine, \* Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

**ABSTRACT** The enhancing effects of morphine on monosodium glutamate(MSG) neurotoxicity and its blocking by naloxone were studied through morphological observation, together with detection of concentrations of intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) by  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fura-2/AM and lactate dehydrogenase(LDH) efflux in the bathing medium in primary cultures from 14~17 d old mouse fetal cortex. It was found that 10 min pre-incubation of young cortical neurons (7 day *in vitro*) with morphine  $10^{-7}$  or  $10^{-6}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  substantially increased LDH release from  $105.7\% \pm 19.0\%$  (treated with MSG alone) to  $194.5\% \pm 17.7\%$  and  $214.0\% \pm 9.5\%$  respectively after exposure to MSG  $0.1$  mmol $\cdot$ L $^{-1}$ , but pre-incubation with morphine ( $10^{-7}$  or  $10^{-6}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$ ) plus naloxone ( $0.1$  mmol $\cdot$ L $^{-1}$ ) reversed the LDH release after treatment with the same concentration of MSG. Morphine ( $10^{-7}$  or  $10^{-6}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$ ) produced little elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . However, when combined with MSG ( $0.1$  mmol $\cdot$ L $^{-1}$ ) morphine elevated the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  level much more than MSG alone. These results suggest that morphine markedly enhances excitotoxic neuron damage, which can be reversed by naloxone. Overloading of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  may be a simultaneous pathological mechanism underlying the neuronal damage and death that occur in excitatory toxicity.

**Key words** Morphine; Monosodium glutamate; Intracellular free calcium; Neurotoxicity