

谷氨酸、NMDA 和吗啡对培养大鼠星形胶质细胞内钙振荡的影响 *

张 静 张 赟 张 宁 刘志强[△] 任 维

(陕西师范大学生命科学学院和教师专业能力发展中心 陕西 西安 710062)

摘要 目的:研究谷氨酸、NMDA、吗啡对原代培养的大鼠星形胶质细胞的胞内钙信号的影响及受体作用机制。方法:利用 Leica AF6000 活细胞工作站,检测谷氨酸、NMDA、吗啡分别灌流前后 Fura-2/AM 加载的星形胶质细胞内钙信号的动态变化,进一步观察分别阻断代谢性谷氨酸受体 5(mGluR5)、NMDA 受体(NMDA receptor, NMDAR)和阿片 μ 受体对诱导的胞内钙振荡的影响。结果:谷氨酸、NMDA、吗啡均可明显升高胞内游离钙的浓度($[Ca^{2+}]_i$),而将其相应受体拮抗后,星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的现象可以被显著抑制。结论:离体培养的星形胶质细胞膜上存在 mGluR5、NMDAR 和阿片 μ 受体,这些受体的激活可以升高星形胶质细胞的 $[Ca^{2+}]_i$,且这些受体依赖的 $[Ca^{2+}]_i$ 的调控机制可能是星形胶质细胞与神经元交互作用的重要途径之一。

关键词 星形胶质细胞 谷氨酸 NMDA 吗啡 胞内游离钙的浓度

中图分类号:Q421 Q813 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)27-5221-04

Effect of Glutamate, NMDA and Morphine on the Intracellular Calcium Signal of Cultured Rat Astrocytes*

ZHANG Jing, ZHANG Yun, ZHANG Ning, LIU Zhi-qiang[△], REN Wei

(College of Life Science & Center for Teacher Professional Ability Development, Shaanxi Normal University, Xi'an, 710062, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of glutamate, NMDA and morphine on the intracellular calcium signal of cultured rat astrocytes and their possible mechanisms. **Methods:** Using Leica AF6000 Live Cell Workstation to detect the effects of glutamate, NMDA and morphine perfusion on the calcium signal of cultured rat astrocytes. **Results:** Stimulated by glutamate, NMDA or morphine perfusion, the intracellular free Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) of astrocytes was increased obviously, whereas this effect was abolished by the corresponding receptor antagonists, respectively. **Conclusion:** The activation of mGluR5, NMDAR and μ -Opioid receptor can increase $[Ca^{2+}]_i$ of cultured rat astrocytes, and these modulation pathways of $[Ca^{2+}]_i$ might play an important role in the communication between astrocytes and neurons.

Key words: Astrocyte; Glutamate; NMDA; Morphine; Intracellular free Ca^{2+}

Chinese Library Classification(CLC): Q421, Q813 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)27-5221-04

前言

胶质细胞是脑内分布最广、数量最多的细胞亚群。传统的观点一致认为中枢神经系统(central nervous system, CNS)信息的传递和整合是由神经网络完成的,胶质细胞只是起支持、协助代谢等辅助作用。近年来的研究表明,星形胶质细胞不仅参与神经信息的传递、反应和释放,离子信号的传导和整合,甚至可以与神经元进行频繁的双向交流^[1]。“三组分突触”新概念阐述的正是这种星形胶质细胞与神经元之间的信息对话^[2]。

星形胶质细胞在受到创伤、缺血缺氧、药物或其它应激性的作用后,会发生功能性的改变,如胞内 Ca^{2+} 浓度的变化、对谷氨酸的摄取及 K^+ 缓冲能力的改变。胞内 Ca^{2+} 浓度的变化能通过缝隙连接在胶质细胞间传播,从而影响神经元的活动。因此有学者认为 Ca^{2+} 不仅是星形胶质细胞内以及细胞间重要的信使分子,而且可将胶质细胞内游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的变化和钙波的传导视为胶质细胞兴奋性的表现形式^[3-4]。

谷氨酸作为 CNS 内最重要的一种兴奋性神经递质,已被证明在神经元和胶质细胞的双向交流中起着举足轻重的桥梁作用。在生理条件下,神经元释放的谷氨酸可使胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,并且 Ca^{2+} 的这种变化可能参与了脑内的突触形成、突触传递的长时程增强和谷氨酸能递质依赖性事件^[5]。有研究表明,胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高正是其释放神经递质的重要机制之一^[6-7]。胶质细胞兴奋,可激活 Ca^{2+} 依赖性的机制,激发星形胶质细胞合成、释放多种化合物,如谷氨酸等,从而将信号反馈到神经元,以 NMDA 受体(NMDA receptor, NMDAR)依赖性的方式使相邻的神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高,间接或直接影响神经元的活动^[8-9]。因此,研究谷氨酸作用于星形胶质细胞的机制对理解神经元-胶质细胞的相互关系及胶质细胞在神经系统中的作用和地位是很重要的。

吗啡是一种常用的外源性阿片类镇痛药,长期应用后可发生耐受和成瘾^[10]。有报道显示,在吗啡耐受成瘾时,CNS 内胶质细胞钙离子通道数目和开放状态会发生适应性变化,影响胞内

* 基金项目 国家自然科学基金(81171264);中央高校基本科研业务费专项资金(GK 201002004)

作者简介 张静(1987-),女,硕士研究生,研究方向:生物物理学, E-mail: zjgoodluke@126.com

[△]通讯作者 刘志强,电话:029-85310269, E-mail: zqliu1969@163.com.

(收稿日期:2012-02-22 接受日期:2012-03-18)

钙离子的浓度,从而调节中枢神经活动,如吗啡可影响神经系统谷氨酸的浓度,而阻断谷氨酸对 NMDAR 的作用可减缓吗啡耐受和成瘾^[11-12]。当前吗啡耐受成瘾的研究主要集中在神经元细胞膜受体、信号蛋白、胞内钙的变化,而对神经胶质细胞的研究相对较少。

本研究将就谷氨酸、NMDA、吗啡灌流对培养星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响以及其可能的受体途径进行研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

D-MEM/F-12 培养基由 GIBCO 公司提供;胎牛血清由兰州荣晖生物科技公司提供,盐酸吗啡(morphine hydrochloride)由青海制药厂提供,HEPES, trypsin, poly-lysine, L-glutamate, NMDA, Fura-2/AM, NVP-AAM077(含 NR2A 亚基的 NMDAR 选择性拮抗剂),Ro 25-6981(含 NR2B 亚基的 NMDAR 选择性拮抗剂),CTAP(μ -阿片受体拮抗剂),MTEP(mGluR5 的选择性拮抗剂),Triton X-100 均由 Sigma 公司提供,Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) clone GA5, Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody 由 Millipore 公司提供。

1.2 星形胶质细胞培养和鉴定

1.2.1 细胞培养 对 Mc Carthy 和 Devellis^[13]原代培养星形胶质细胞的方法进行改良。无菌条件下,取 1-3 d 的乳鼠 4-6 只,75%的酒精消毒,断头,剥离脑组织,取部分大脑皮层,仔细分离脑膜和血管,将皮层组织置于预冷的 D-Hanks 溶液清洗,剪碎,移入离心管中。37℃下,用 0.125%的胰酶液消化 10 min。加入含有 20%血清的 D-MEM/F-12 培养基终止消化,200 目网筛过滤,然后以 1000 r/min 的速度离心 10 min,弃上清,重新加入培养基,制成初细胞悬液,种植于培养瓶中,CO₂ 恒温培养箱培养。每三天换一次液。

1.2.2 细胞纯化 培养 7-10 d 待细胞长满瓶底后,弃上清,预热的 D-Hanks 溶液洗两次,加入 0.125%的胰酶液,37℃下,消化 10 min,用吸管反复吹打使细胞脱落,培养基终止消化。制成的细胞悬液 1000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入含有 20%血清的 D-MEM/F-12 培养基继续培养。重复上述操作 2-3 次,使细胞传至第三代或者第四代,细胞即达到纯化目的,可进行相关实验。

1.2.3 细胞鉴定 取纯化后的细胞,接种到多聚赖氨酸包被的盖玻片的 24 孔板中,培养箱中培养 24 h 后,吸取培养基, PBS 洗三遍,4%冷的多聚赖氨酸固定 20 min, PBS 洗三遍后,即可进行神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组化染色。0.2% Triton X-100 通透 10 min, PBS 洗三遍,然后用与二抗相同宿主的血清封闭 30 min, PBS 洗三遍,加 GFAP 一抗(1:100),4℃湿盒过夜, PBS 洗三遍,加二抗室温孵育 2 h(避光), PBS 洗三遍,然后置于活细胞工作站中观察,并计算阳性率。阴性对照为 PBS 代替一抗,其余操作同上。

经免疫组化法鉴定后,GFAP 阳性细胞达 95%以上即可进行药物实验。

1.3 内钙浓度测定

1.3.1 Fura-2 加载 将 1 mg 的 Fura-2/AM 溶于 1 mL 的 DMSO (二甲亚砜),混合均匀,制成 1 mg/mL 的 Fura-2/AM 母液。然后

以 50 μ L 体积分装于 EP 管中,放置在 -20℃冰箱中避光保存。实验时,用胞外液冲洗共聚焦皿中的细胞两遍,并将皿内的溶液定量为 1 mL,在避光条件下加入解冻的母液 2 μ L。然后把共聚焦皿放入培养箱中避光孵育 30 min,再用胞外液冲洗两遍除去胞外多余 Fura-2/AM 后即可开始实验。

1.3.2 给药方法 将谷氨酸、NMDA、吗啡配成 1 mmol/L 的储备液,使用时分别稀释成 500 μ mol/L、100 μ mol/L、20 μ mol/L 的浓度。已纯化的胶质细胞经 Fura-2/AM 孵育处理后,置于 AF6000 活细胞工作站(Leica, German)测量细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化是由 F340/F380 的荧光比值来反映的。

1.3.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 对数据进行分析,用 mean $\pm$ SEM 表示,配对、成组 t 检验和单因素方差分析数据有无显著差异,以 $P < 0.05$ 为有差异,有统计学意义。

2 结果

2.1 谷氨酸可诱发星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高

经 3-4 次传代后,GFAP 免疫组化染色表明 95%以上细胞为星形胶质细胞(Fig.1A)。500 μ mol/L L-glutamate 灌流 Fura-2/AM 加载后的离体培养星形胶质细胞(Fig.1B)2 min,然后洗脱,76%的细胞对其有反应($n = 150$)(Fig.1C)。星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的幅值较 L-glutamate 灌流前升高约 28.89%,用配对 t 检验判断数据,具有极显著差异($P < 0.01$)。一般情况下,灌流谷氨酸 5-10 s 后,胞内钙离子浓度开始升高,约 90%的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的现象呈自发下降。 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化有多种形式,少数细胞荧光比值较小,多数比值明显升高。

2.2 谷氨酸通过激活 mGluR5 和 NMDAR 诱发星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高

在灌流液中加入 2 μ mol/L 的 MTEP,孵育 15 min 以阻断星形胶质细胞的 mGluR5,然后在 MTEP 存在的条件下,用 500 μ mol/L L-glutamate 灌流 2 min。发现星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的幅值较只灌流 500 μ mol/L L-glutamate 降低约 7.07%,用成组 T 检验判断数据,具有极显著差异(Fig. 2A、B, $P < 0.01$),表明谷氨酸升高星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用有部分是代谢性谷氨酸受体来实现的。

NMDA 是 NMDAR 的激动剂,以 100 μ mol/L 的 NMDA 灌流培养的星形胶质细胞 2 min 后,大部分细胞 (62.5% $n = 96$) $[Ca^{2+}]_i$ 升高(Fig. 3A)。在灌流液中预加入 0.5 μ mol/L NVP-AAM077,孵育 15 min 以阻断含 NR2A 亚基的 NMDAR,再灌流 100 μ mol/L NMDA 2 min, $[Ca^{2+}]_i$ 升高的幅值较只灌流 100 μ mol/L NMDA 降低约 28.67%,单因素方差分析法分析数据,具有极显著差异(Fig. 3A、B, $P < 0.01$)。同样,灌流液中预加入 1 μ mol/L Ro 25-6981,孵育 15 min 以阻断含 NR2B 亚基的 NMDAR,再灌流 100 μ mol/L NMDA 2 min 后, $[Ca^{2+}]_i$ 升高的幅值亦较只灌流 100 μ mol/L 的 NMDA 降低约 27.04%,单因素方差分析法分析数据,具有极显著差异(Fig. 3A、B, $P < 0.01$)。可见,含 NR2A 和 NR2B 亚基的 NMDAR 均参与了 NMDA 对培养的星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响。

2.3 阿片 μ 受体介导吗啡诱导的星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化

吗啡(20 μ mol/L)灌流 2 min,可使 60% ($n = 50$)的星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高(Fig. 4)。而在阿片 μ 受体拮抗剂 CTAP(2

$\mu\text{mol/L}$ 孵育 15 min 后 ,灌流 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 吗啡 ,星形胶质细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 受体作用于星形胶质细胞来升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的。
胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 无明显变化(Fig. 4)。由此可见 ,吗啡主要是通过阿片

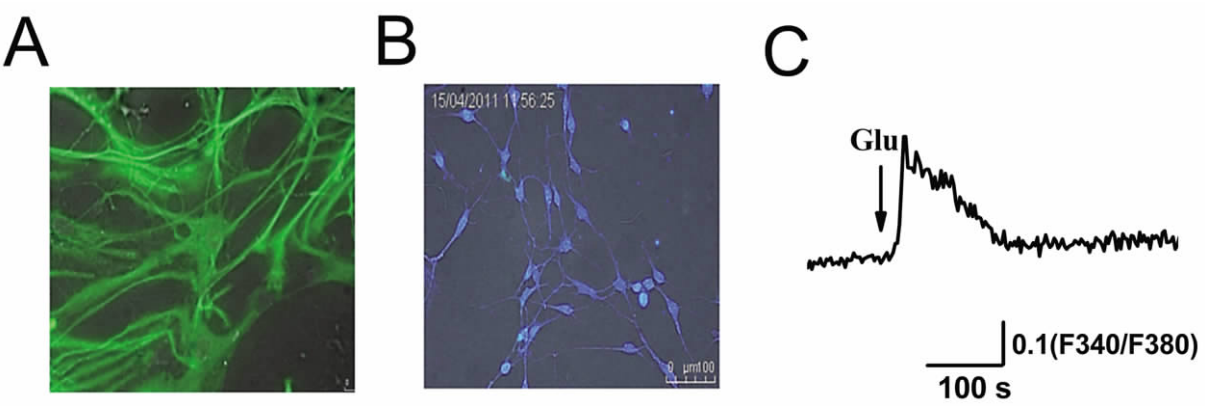


图 1 原代培养的星形胶质细胞内钙信号图

Fig.1 The intracellular calcium signal of cultured rat astrocytes

Note: A Immunofluorescence of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cultured rat astrocytes from cerebral cortex, B Cerebral cortex astrocytes loaded with Fura-2/AM, C A sample of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by $500 \mu\text{mol/L}$ L-glutamate perfusion in astrocytes. Abbreviations: Glu, L-glutamate.

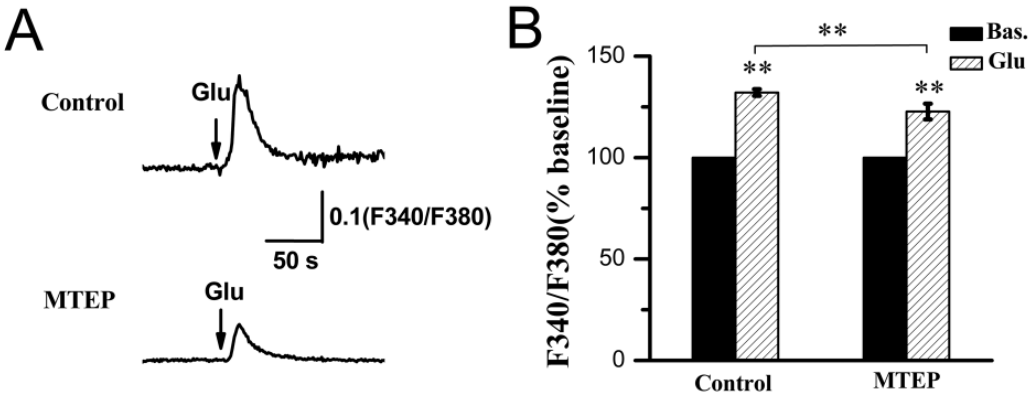


图 2 灌流谷氨酸可引起星形胶质细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高

Fig.2 Bath application of L-glutamate produced an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of astrocytes

Note: A top: a sample of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by $500 \mu\text{mol/L}$ L-glutamate perfusion in astrocytes ,A bottom: a sample of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by $500 \mu\text{mol/L}$ L-glutamate perfusion in presence of $2 \mu\text{mol/L}$ MTEP; B Summary of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ amplitudes induced by $500 \mu\text{mol/L}$ L-glutamate perfusion in astrocytes in the absence and presence of MTEP. Abbreviations: Bas, baseline; Glu, L-glutamate. ** $P < 0.01$.

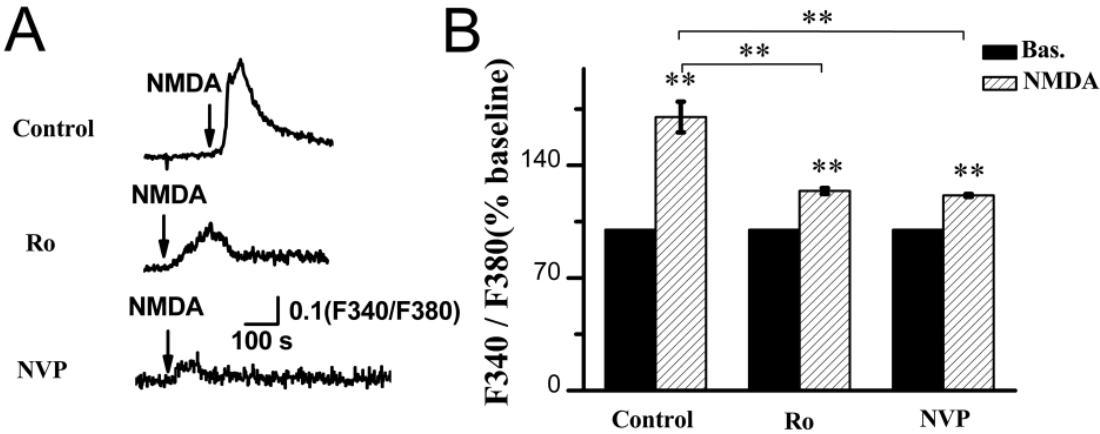


图 3 灌流 NMDA 可引起星形胶质细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高

Fig.3 Bath application of NMDA produced an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of astrocytes

Note :A top: a sample of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by $100 \mu\text{mol/L}$ NMDA perfusion in astrocytes, A middle: a sample of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by $100 \mu\text{mol/L}$ NMDA perfusion in presence of $1 \mu\text{mol/L}$ Ro25-6981, A bottom: a sample of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by $100 \mu\text{mol/L}$ NMDA perfusion in presence of $0.5 \mu\text{mol/L}$ NVP-AAM077; B Summary of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ amplitudes induced by $100 \mu\text{mol/L}$ NMDA perfusion in astrocytes under various conditions. Abbreviations: Bas, baseline; Ro, Ro25-6981 ; NVP, NVP-AAM077. ** $P < 0.01$.

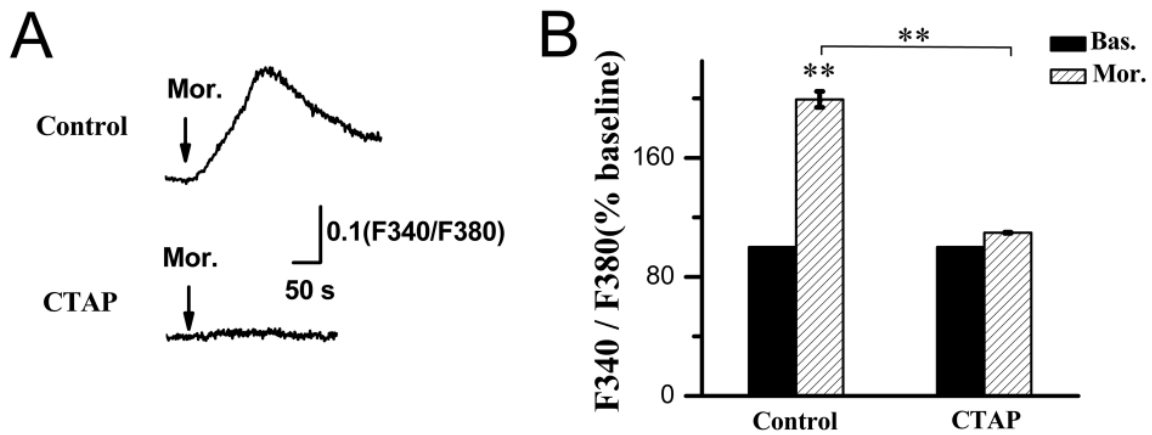


图 4 灌注吗啡可引起星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高

Fig. 4 Bath application of Morphine produced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ of astrocytes

Note: A top: a sample of $[Ca^{2+}]_i$ elevation induced by 20 $\mu\text{mol/L}$ Morphine perfusion in astrocytes, A bottom: a sample of $[Ca^{2+}]_i$ elevation induced by 20 $\mu\text{mol/L}$ Morphine perfusion in presence of 2 $\mu\text{mol/L}$ CTAP; B Summary of $[Ca^{2+}]_i$ amplitudes induced by 20 $\mu\text{mol/L}$ Morphine perfusion in astrocytes in the absence and presence of CTAP. Abbreviations: Bas, baseline; Mor, morphine. ** $P < 0.01$.

3 讨论

本实验利用 Fura-2/AM 作为荧光探针, Leica AF6000 活细胞工作站检测离体培养的星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的动态变化。分别灌注谷氨酸、NMDA、吗啡,观察到星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高,而用 MTEP、NVP-AAM077、Ro25-6981、CTAP 孵育后, $[Ca^{2+}]_i$ 的升高幅度分别较只灌注谷氨酸、NMDA、吗啡明显降低。由此可见,谷氨酸、NMDA、吗啡诱发离体培养星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化是可以通过 mGluR5、含 NR2A 和 NR2B 亚基的 NMDAR、阿片 μ 受体介导。

结果显示星形胶质细胞膜上可能存在代谢性谷氨酸受体、NMDAR 及阿片 μ 受体,并在钙信号的调节过程中起了重要的作用,免疫组织化学和生理学的有关研究支持了我们的推论^[14-15]。而这三种受体在星形胶质细胞钙动员中的调节机制仍需进一步研究。

谷氨酸作为一种兴奋性的神经递质,诱发大鼠原代培养星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高是通过多种途径实现的。有研究发现星形胶质细胞膜上表达具有 Ca^{2+} 通透性的 AMPA 受体^[16],在谷氨酸诱发的星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高中起了部分作用,Seifert 等认为星形胶质细胞上激活 AMPA 受体所诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高是通过可逆性 Na^+/Ca^{2+} 交换机制和胞内钙库释放 Ca^{2+} 来共同实现的^[17-18]。NMDAR、AMPA 受体和代谢性谷氨酸受体在此过程中起了重要作用,为我们进一步探索胶质细胞在神经系统信号传导中的作用提供了线索。

星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 振荡在 CNS 中参与信号的传递和递质的释放,而在阿片耐受与依赖机制中,星形胶质细胞的作用还没有引起足够的重视。实验结果提示吗啡除了直接作用于神经元阿片类受体,影响神经元功能外,还可以通过星形胶质细胞膜上的阿片 μ 受体使细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,从而调控神经递质的释放、突触可塑性和基因的表达等生理活动。

关于吗啡影响原代培养星形胶质细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的现象,早在 20 世纪 70 年代就被发现^[19]。吗啡作为一种外源性阿片类药物,是通过阿片 μ 受体介导星形胶质细胞内钙的变化。 μ 受体激动

后,可以直接兴奋 L 型钙通道,引起钙内流,而且内流的钙可以适度的增加细胞内第二信使 IP₃ 的水平,诱发 Ca^{2+} 从细胞内钙库进一步释放^[20]。Hauser 在吗啡作用于星形胶质细胞的研究发现,吗啡急性作用可以升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$,促进星形胶质细胞质合成,并有调控细胞内 DNA 的合成作用,然而当吗啡延时作用时,星形胶质细胞适应性发生变化,可能是由于阿片受体脱敏或者下调所致^[21]。

由此可见,吗啡通过阿片 μ 受体影响胞内 Ca^{2+} 浓度,从而干扰星形胶质细胞的生理和生化功能。然而,其具体的调控机制现在不是很清楚,还需要进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Carmignoto G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones[J]. Prog Neurobiol,2000,62(6):561-581
- [2] Gertrudis P. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information[J]. Trends in Neurosciences,2009,32(8):421-431
- [3] Cornell Bell AH, Finkbeiner SM. Ca^{2+} waves in astrocytes[J]. Cell Calcium,1991,12(2-3):185-204
- [4] Alexej Verkhratsky, Helmut Kettenmann. Calcium signalling in glial cells[J]. Cell Calcium,1998,24(5-6):405-416
- [5] Shelton MK, McCarthy KD. Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ[J]. Glia,1999,26 (1):1-11
- [6] Parpura V, Haydon PG. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000,97(15):8629-8634
- [7] Sanzgiri RP, Araque A, Haydon PG. Prostaglandin E (2) stimulates glutamate receptor-dependent astrocyte neuromodulation in cultured hippocampal cell[J]. Journal of Neurobiology,1999,41(2):221-229
- [8] Parpura V. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signaling [J]. Nature 1994,369(6483):744-777
- [9] Hassinger TD. Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves[J]. Journal of Neurobiology,1995,28(2):159-170

(下转第 5233 页)

- 1999,340:115-126
- [2] Gotsman, A.H. Sharpe, A.H. Lichtman, T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis[J]. Circulation Research,2008,103 (11):1220-1231
- [3] P.S. Olofsson, L.A. Soderstrom, D. Wagsater, et al. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice [J]. Circulation,2008,117 (10):1292-1301
- [4] Hansson GK. Inflammation atherosclerosis and coronary artery disease[J]. N Engl J Med,2005,352:1685-1695
- [5] Gotsman, A.H. Sharpe, A.H. Lichtman, T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis[J]. Circulation Research,2008,103(11):1220-1231
- [6] Dersen TR, Kjekshus J, Pyorala K, et al. Effect of Simvastatin on ischemic signs and symptoms in the Scandinavian simvastatin survival study (4S)[J]. Am J Cardiol,1998,81:333-335
- [7] Ughan CJ, Gotto AM, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol,2000,35:1-10
- [8] Epherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia [J]. N Engl J Med, 1995,333:1301-1307
- [9] Libby P, Aikawa M. Effects of statins in reducing thrombotic risk and modulating plaque vulnerability [J]. Clin Cardiol,2003,26(1S):111-114
- [10] Rosenson RS, Brown AS. Statin use in the acute coronary syndromes: cellular mechanism and clinical evidence[J]. Curr Opin Lipidol, 2002,13(6):625-630
- [11] Di Virgilio, Chiozzi D, Ferrari, et al. Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells[J]. Blood,2001,97:587-600
- [12] Szczeklik A, Munsial J, Undas, et al. Inhibition of thrombin generation by Simvastatin and lack of additive of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia [J]. J Am Coll Cardiol,1999,33:1286-1293
- [13] Kaneider NA, Egger P, Dunzendorfer S, et al. Rho-GTPase-dependent platelet-neutrophil interaction affected by HMG-CoA reductase inhibition with altered adenosine nucleotide release and function[J]. Atheroscler Thromb Vasc Biol,2002,22:1029-1035
- [14] Feig JE, Shang Y, Rotllan N, et al. Statins promote the regression of atherosclerosis via activation of the CCR7-dependent emigration pathway in macrophages[J]. PloS one,2011,6(12):e28534
- [15] Gotsman, A.H. Sharpe, A.H. Lichtman, T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis [J]. Circulation research,2008,103:1220-1231
- [16] Nakano, M. Fukumoto, Y. Satoh, K, et al. Shimokawa, OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization [J]. Cardiovascular research,2010, 88:539-546
- [17] Yan J, Wang C, Du R, et al. OX40-OX40 ligand interaction may activate phospholipase C signal transduction pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. Chemico-biological interactions,2009, 14, 180(3):460-464
- [18] VanWanrooij EJ, van Puijvelde GH, de Vos P, et al. Interruption of the Tnfrsf4/Tnfrsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2007,27:204-210
- [19] Wang X, Ria M, Kelmenson PM, Eriksson P, et al. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility[J]. Nat Genet,2005,37:365-372

(上接第 5224 页)

- [10] Yang JC, Shan J, Ng KF, et al. Morphine and methadone have different effects on calcium channel currents in neuroblastoma cells [J]. Brain Res,2000,870(1-2):199-203
- [11] Ramkumar V, El-Fakahany EE. Prolonged morphine treatment increases rat brain dihydropyridine binding sites:possible involvement in development of morphine dependence [J]. European Journal Pharmacology,1988,146(1):73-83
- [12] Belozertseva IV, Danysz W, Bessalov AY. Effects of short-acting NMDA receptor antagonist MRZ 2/576 on morphine tolerance development in mice [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,2000,361(6):573-577
- [13] Mc Carthy KD, Partlow LM. Preparation of pure neuronal and non-neuronal cultures from embryonic chick sympathetic ganglia: a new method based on both differential cell adhesiveness and the formation of homotypic neuronal aggregates [J]. Brain Res,1976,114 (3):391-414
- [14] Nishizaki T, Matsuoka T, Nomura T, et al. Store Ca^{2+} depletion enhances NMDA responses in cultured human astrocytes[J]. Biochem Biophys Res Com,1999,259 (3):661-664
- [15] Biber K, Laurie DJ, Berthele A, et al. Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia [J]. J Neurochem,1999,72(4):1671-1680
- [16] Iino M, Goto K, Kakegawa W, et al. Glia-synapse interaction through Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in Bergmann glia [J]. Science,2001, 292 (5518):926-929
- [17] Smith JP, Cunningham LA, Partridge LD. Coupling of AMPA receptors with the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in cultured rat astrocytes [J]. Brain Res,2000,887(1):98-109
- [18] Seifert G, Zhou M, Steinhauser C. Analysis of AMPA receptor properties during postnatal development of mouse hippocampal astrocytes [J]. J Neurophysiol,1997,78 (6):2916-2923
- [19] Yamamoto H, Mikita S, Yano I, et al. Studies on the physical dependability of analgesics. 2. Relationship between transformation of intramitochondrial structures in adrenocortical cells and corticosterone biosynthesis in morphine addicted rats [J]. Jpn J Pharmacol 1973,23(2):217-225
- [20] Wang D, Tolbert LM, Carlson KW, et al. Nuclear Ca^{2+} /calmodulin translocation activated by mu-opioid(OP3)receptor[J]. J Neurochem, 2000,74(4):1418-1425
- [21] Hauser KF, Stiene Martin A, Mattson MP, et al. Mu-Opioid receptor-induced Ca^{2+} mobilization and astroglial development: morphine inhibits DNA synthesis and stimulates cellular hypertrophy through a Ca^{2+} -dependent mechanism[J]. Brain Res,1996,720(1-2):191-203