

纳络酮诱发吗啡成瘾大鼠 CPA 模型及影响因素*

须 卫 罗小景 谭北平 郑希耕 杨晓燕 隋 南

(中国科学院心理研究所心理健康重点实验室, 北京 100101)

摘要 目的:探讨纳络酮诱发吗啡成瘾大鼠条件性位置厌恶反应(CPA)的影响因素。方法:起始剂量分别为 6、12mg/kg 吗啡以 20%递增方式腹腔注射(ip)致瘾,共 10 天。分别在吗啡致瘾阶段或戒断后以 0.5mg/kg、1.0mg/kg 纳络酮诱发 CPA。结果:纳络酮可以诱导吗啡成瘾大鼠形成明显的 CPA;本研究中所采用的不同剂量吗啡和纳络酮对 CPA 形成没有明显差异;纳络酮诱发依赖期大鼠出现 CPA,而在戒断期大鼠却未出现。结论:在吗啡依赖的致瘾阶段和戒断后进行行为训练对 CPA 建立具有不同的影响。

关键词 吗啡;纳络酮;戒断;条件性位置厌恶反应

EFFECT OF NALOXONE ON CONDITIONED PLACE AVERSION IN MORPHINE-TREATED RATS

XU Wei, LUO Xiao-Jing, TAN Bei-Ping, ZHENG Xi-Geng, YANG Xiao-Yan, SUI Nan

(Key Lab of Mental Health, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract Objective: To study the effect of naloxone on the acquisition and retention of conditioned place aversion (CPA) in morphine-treated rats. Methods: Rats were made physically dependent on morphine with the initiative dose (6 or 12 mg/kg) by intraperitoneal injection in 20% increased every day within 10 days, and were trained to develop CPA induced by naloxone (0.5 or 1.0 mg/kg) in a biased three-chamber conditioned place apparatus. Results: Naloxone produced distinct CPA in the morphine-dependent rats. No dose-response relationship has been found for morphine and naloxone in our experiment on the acquisition and retention of CPA in dependent-rats. The conditioning training with naloxone produced CPA in the dependent rats, however, that with naloxone in the abstinent rats did not. Conclusions: Naloxone could play different roles in the acquisition of CPA at the phase of morphine-treated or abstinence in rats.

Key words Morphine; Naloxone; Withdrawal; Conditioned place aversion

药物依赖(drug dependence)是以强迫性觅药行为为主要特征的慢性脑疾病^[1]。强迫性觅药行为与两类相反的效应有关,即对奖赏的预期(正性强化)和对回避戒断期厌恶反应的预期(负性强化)。对戒断症状或相关刺激的回避即厌恶反应,是促发觅药和复吸行为的重要因素^[2]。成瘾患者药物戒断后,不仅可以产生躯体戒断症状,而且产生以厌恶性情绪为特征的戒断征候群,包括焦虑、坐立不安、精神紧张、过度激惹、抑郁、烦躁不安等^[3]。临床研

究表明:和躯体戒断症状相比,戒断的情绪症状和药物觅求及强迫性觅药行为的复发具有更大的相关性^[3,4]。深入研究阿片戒断诱发的厌恶性情绪反应,对全面揭示阿片依赖的神经生物学机制,寻找有效的治疗手段,减少药物觅求行为,预防复吸的发生,具有重要的意义。

本实验目的在于建立稳定的纳络酮诱发吗啡成瘾大鼠 CPA 模型,并观察不同吗啡和纳络酮剂量对其建立的影响及 CPA 在获得和保持上的变化。

本工作受国家自然科学基金(30170324、39970256)、中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-SW-204-02)、中国科学院研究生科学与社会实践资助专项(创新研究类)项目资助。

通讯作者

材料与amp;方法

1. 实验动物和分组 雄性 Wistar 大鼠,由中国科学院遗传所动物房提供,起始体重 170g \pm 20g,共 55 只,分组饲养,自由取食。控制室温为 22 \pm 2,湿度为 40% \pm 5%,保持光照节律(7:00 ~ 19:00 照明)。55 只大鼠进行 Morris 水迷宫训练后,依据标准剔除 10%,共 5 只。50 只用于位置倾向性测查和正式实验。根据 Morris 水迷宫所测学习能力情况和位置倾向性测查结果,将大鼠进行匹配分组。本研究为 2 (吗啡剂量 6、12mg/kg) \times 2 (纳络酮剂量 0.5、1.0mg/kg) \times 2 (CPA 训练时间:致瘾阶段、戒断后)设计加上 2 个对照组(NS 1.0 mg/kg, NL 1.0 mg/kg; NS 1.0 mg/kg, NS 1.0 mg/kg),共 10 组,每组 4 ~ 6 只。

2. 实验药物 盐酸吗啡(Morphine Hydrochloride, MH) 粉剂,青海制药厂生产[青卫药准字(1995)第 0113 号];盐酸纳络酮(Naloxone Hydrochloride, NL) 粉剂, Sigma 公司生产。吗啡和纳络酮均在实验当日以生理盐水配制成相应浓度。

3. 实验装置 (1) Morris 水迷宫和条件性位置实验箱图象跟踪处理系统。(2) Morris 水迷宫由不透明圆柱形金属储水池(d = 94cm, h = 55cm)和可移动的有机玻璃透明站台组成。条件性位置实验箱装置为长方形无顶盖木质箱,大小为 100cm \times 40cm \times 40cm,底板为可抽拉式活动有机玻璃板,分为三个箱体。两侧箱体 45cm \times 40cm,一个黑色背景光滑底板;另一个为蓝色背景粗糙底板,四壁蓝色背景粘贴黑色多边形图案;中间箱体为 10cm \times 40cm,两侧背景各一半。中间隔板为两个可抽拉式有机玻璃板,分别与两侧图案背景相同,即黑色背景光滑底板侧隔板为两面黑色,而蓝色背景侧为两面蓝色背景粘贴黑色多边形图案。

两种实验装置都配有自行开发的图象跟踪处理系统,包括监视记录动物行为的摄像头、将图象转化成数字的图象采集卡、即时图象跟踪处理软件、对信息进行处理的计算机系统。

4. 实验步骤

(1) 学习能力测查:条件性位置反应的建立有赖于基本的学习记忆功能,利用 Morris 水迷宫测查大鼠的学习记忆能力,剔除学习不良者,排除个体学习能力的差异对 CPA 建立的影响。训练时,控制水温及室温,站台位于圆心,3min 内找到站台的大鼠立即取出,找不到站台的则放到站台上停留 10sec 后

取出。全部完成训练后再进行下一次,2 ~ 3h/次,每天 4 次。在 2 天训练大鼠寻找隐蔽站台 8 次。计算机跟踪系统自动记录每次训练大鼠寻找到站台的时间。首先剔除 4 次及以上未找到站台者,共 5 只。对其余大鼠所测数据依据下公式转化:学习时间差值 = 前 4 次学习时间累加值 - 后 4 次学习时间累加值。学习时间差值可以代表学习能力,差值越大,学习能力越强。

(2) 位置倾向性测查:确定大鼠对实验箱除中间箱外两部分箱体的偏爱程度。测查时,抽取中间隔板,使大鼠在箱体内自由活动 10min,共 3 次,以 3 次测试的平均值确定大鼠的偏爱程度。摄像头跟踪大鼠活动轨迹,计算机自动记录大鼠在两侧箱体停留时间。本研究中条件性位置实验箱具有自然偏爱性,其中有 32 只起始偏爱侧为蓝色粗糙底板侧(停留蓝色粗糙底板侧时间比 > 0.67),5 只为黑色光滑底板侧(停留蓝色粗糙底板侧时间比 < 0.33),13 只为无明显起始偏爱(停留蓝色粗糙底板侧时间比介于 0.67 和 0.33 之间)。

(3) 吗啡致瘾和 CPA 训练程序:实验第 1 日至第 10 日,以递增方式腹腔注射吗啡,起始剂量分别为 6、12 mg/kg,以后在前一日基础上以 20% 的比例增加,每日 1 次,共 10 天。实验第 8 日或第 25 日(戒断后第 15 天)分别开始条件性位置训练,每日 1 次,共 4 天。每日于吗啡注射 8h 后,ip 纳络酮或生理盐水,并限制大鼠在实验箱一侧达 15min。实验第 8 日、第 10 日,将大鼠放置于黑色背景光滑底板侧,实验第 9 日、第 11 日在蓝色背景粗糙底板侧。在大鼠起始偏爱侧注射纳络酮,非偏爱侧注射生理盐水。无明显起始偏爱侧的大鼠,以蓝色背景粗糙底板侧为伴药侧。戒断后开始训练组仅按以上程序进行厌恶反应训练,不给予吗啡。

(4) CPA 测试:CPA 训练后第 1 日、第 20 日,去除中间隔板,将大鼠放入实验箱,自由活动 10min。计算机自动记录大鼠在实验箱各部分停留时间。

5. 数据处理 将所记录的实验数据依据以下公式:停留伴药侧时间比 = 停留伴药侧时间 / (停留伴药侧时间 + 非伴药侧时间) 转化为实验结果分析数据。在位置倾向性测查中,伴药侧和非伴药侧分别为起始偏爱侧和起始非偏爱侧。均使用 SPSS 软件分别进行方差分析和独立样本 t 检验。结果以均数 \pm 标准误 (Mean \pm S. E. M.) 表示,以 $P < 0.05$ 作为统计学差异的界线。

结果

吗啡致瘾程序前根据 Morris 水迷宫所测学习能力和位置倾向性测查所得起始偏爱侧情况进行匹配分组, 分组后各组停留伴药侧时间比大约在 0.75 ~ 0.85, ANOVA 分析表明各组间停留伴药侧时间比没有显著性差异 ($F_{(9,40)} = 1.812, P = .179$)。

1. 不同剂量吗啡和纳络酮对 CPA 形成的影响 (图 1, 图 2)

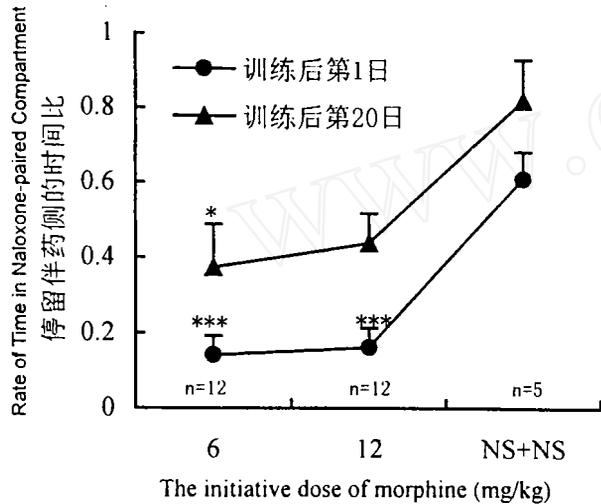


图 1 CPA 训练后第 1 日及第 20 日, 不同吗啡处理组对 CPA 的影响。*, ***: 与对照组相比, $P < 0.05, P < 0.001$

Fig. 1 Effect of different dose of morphine on the acquisition of CPA on day 1 and day 20 post-training. *, ***: $P < 0.05, P < 0.001$, compared with NS + NS group

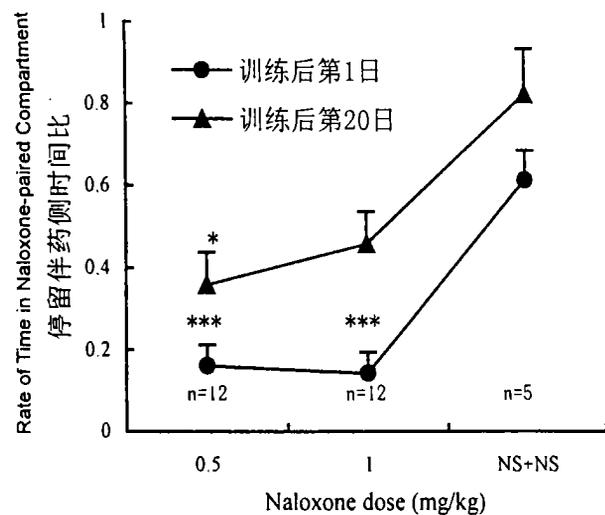


图 2 CPA 训练后第 1 日及第 20 日, 不同纳络酮处理组对 CPA 的影响。*, ***: 与对照组相比 $P < 0.05, P < 0.001$

Fig. 2 Effect of different dose of naloxone on the acquisition of CPA on day 1 and day 20 post-training. *, ***: $P < 0.05, P < 0.001$, compared with NS + NS group

纳络酮作用下改变了大鼠对实验箱两侧的偏爱性, 建立了 CPA。如图 1 所示, 训练后第 1 日不同吗啡剂量组停留伴药侧时间与对照组呈现极显著性差异 ($P < 0.001$)。CPA 随时间变化呈现缓慢消退趋势, 吗啡小剂量组 (6 mg/kg) 消退相对缓慢。在训练后第 20 日, 吗啡小剂量组与对照组仍存在显著性差异 ($P < 0.05$) (见图 1)。而在训练后第 1 日和第 20 日的测试中, 两种剂量吗啡组之间在停留伴药侧时间上都不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。本实验中不同剂量纳络酮都诱发出明显的 CPA, 训练后第 1 日都达到极显著水平 ($P < 0.001$)。训练后第 20 日, 停留伴药侧时间增加, 大剂量 (1.0 mg/kg) 回复略快, 与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); 小剂量组 (0.5 mg/kg) 与对照组之间差异呈显著水平 ($P < 0.05$)。0.5 mg/kg 组和 1.0 mg/kg 组之间比较在两测试日均无显著性差异 ($P > 0.05$) (见图 2)。可见, 高、低两种剂量纳络酮都一致性诱发高、低剂量吗啡成瘾大鼠的 CPA 获得, 而小剂量的纳络酮诱发小剂量吗啡成瘾大鼠的 CPA 保持时间相对长。

2. 纳络酮诱发不同吗啡致瘾状态大鼠在 CPA 获得和保持上的比较 (见图 3)

ANOVA 分析表明本实验中致瘾阶段 (实验第 8 日) 进行厌恶反应训练各组之间在 CPA 获得 ($F_{(3,20)} = 0.150, P = 0.923$) 和保持 ($F_{(3,20)} = 0.833, P = 0.501$) 上无明显差异 (见图 1、2), 因而我们合并 4 组不同吗啡和纳络酮剂量组为图 3 的 MH + NL 组。如图 3 所见, 吗啡致瘾组 (MH + NL 组) 训练后第 1 日、第 20 日停留伴药侧时间比与对照组差异显著, 分别达到极显著 ($P < 0.001$) 和显著水平 ($P < 0.05$); 而未使用吗啡 (naïve animal) 组 (NS + NL 组), 训练后第 1 日停留伴药侧时间比训练前减少, 与对照组差异达到显著性水平 ($P < 0.05$), 但厌恶反应持续时间短, 训练后第 20 日完全逆转 ($P > 0.05$)。行为训练对盐水对照组在实验箱两侧停留时间影响不大。不同处理组之间在 CPA 获得和保持的差异, 说明纳络酮诱发吗啡成瘾大鼠的 CPA 具有特异性。

3. 吗啡成瘾的不同阶段厌恶训练对 CPA 的影响 (图 4)

图 3 中 MH + NL 组为致瘾阶段训练组。戒断后 (停止吗啡给药第 15 日) 进行行为训练的不同组间行为训练后 1 日停留伴药侧时间比无显著性差异 ($F_{(3,12)} = 2.263, P = 0.133$), 合并为戒断后组。在

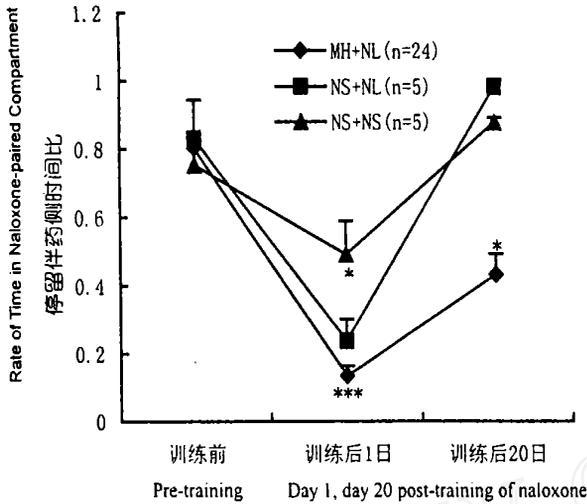


图3 纳络酮诱发不同吗啡成瘾状态大鼠所产生的 CPA 比较。***:与训练前相比 $P < 0.05$, $P < 0.001$

Fig. 3 Effect of the conditional training of naloxone to dependent and naive rats on the acquisition and retention of CPA on day 1, day 20 post-training of naloxone. *: $P < 0.05$ and $P < 0.001$ compared with pre-training phase

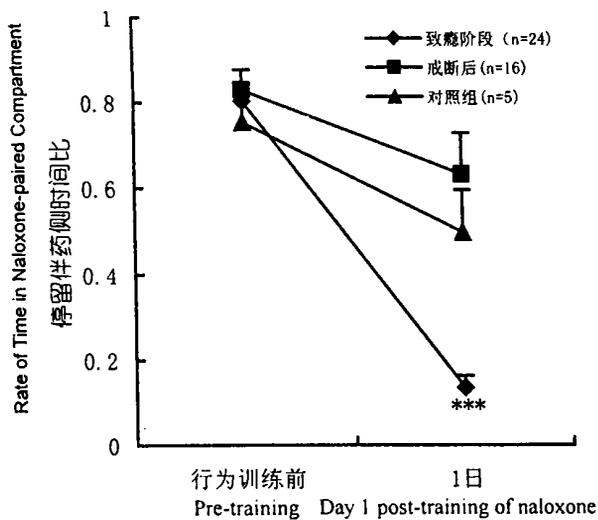


图4 吗啡成瘾的不同阶段进行厌恶训练对 CPA 的影响。***:与训练前相比 $P < 0.001$

Fig. 4 Effect of naloxone training in the different morphine-dependent phases on the acquisition of CPA on day 1 post-training. ***: $P < 0.001$, compared with pre-training phase

致瘾阶段进行厌恶反应训练组,训练后第 1 日实验组在伴药侧停留时间明显减少,与对照组差异极显著 ($P < 0.001$)。而戒断后组与对照组比较未达到显著性水平 ($P > 0.05$,见图 4)。

讨 论

学习、记忆和药物成瘾的关系是目前药物依赖研究的热点。大量的动物实验和临床研究表明学

习、记忆在药物依赖的发展和维持中起重要作用^[5]。而且学习、记忆作为一种基本能力,也影响条件性位置训练的效果,因而我们首先利用 Morris 水迷宫,剔除了学习不良大鼠,并对学习能力进行了区分,排除了学习能力对 CPA 建立的影响。利用条件性位置模型范式可以探讨成瘾药物的欲念属性 (appetitive nature) (包括偏爱和厌恶),从而预测药物的滥用潜力^[6]。本实验中所考察的戒断反应包括利用条件性位置模型考察戒断诱发的 CPA 和躯体戒断症状。躯体戒断症状主要记录了大便性状、惊叫、惊跳、湿狗样抖动、扭体等客观性强、易于观察的指标。除 1.0 mg/kg 纳络酮诱发的大便性状改变经卡方检验,与对照组差异显著外,其余差异均未达到显著性水平(未提供数据)。而利用条件性位置模型 0.5 和 1.0 mg/kg 纳络酮均诱发成瘾大鼠出现明显的 CPA。表明与躯体戒断症状相比,CPA 模型是一个考察药物戒断反应的更为敏感的指标^[4]。有关研究考察过不同剂量的纳络酮诱发成瘾大鼠的躯体戒断症状和 CPA 的剂量效应变化,结果是 0.002 mg/kg 的纳络酮既不能诱发躯体戒断症状,也不能诱发 CPA;0.01 mg/kg 只出现 CPA,而无躯体戒断症状;而 0.05 mg/kg 纳络酮除诱发 CPA 同时开始出现躯体戒断症状^[8]。

本研究中,不同剂量纳络酮分别诱发吗啡成瘾大鼠产生 CPA,选用的吗啡和纳络酮剂量之间对成瘾大鼠厌恶反应的建立没有明显差异影响,考虑与本研究中所选剂量的效应区分度小有关。但在 CPA 的保持上存在差异,呈现小剂量的吗啡和纳络酮诱发的 CPA 保持时间更长,可能一方面大剂量吗啡增加了对学习、记忆功能的损害^[9],另一方面与大剂量纳络酮诱发的躯体戒断症状多,相对的干扰了对条件性环境线索的记忆效果,表现为在长时间记忆保持上大剂量组 CPA 减退的相对快^[7]。

纳络酮可以诱发未使用吗啡的大鼠产生厌恶反应,但保持时间短,消退快。与以往研究一致,表明纳络酮本身具有厌恶性质^[10]。而纳络酮诱发成瘾大鼠所产生的 CPA,在训练后 20 天仍存在,说明纳络酮诱发吗啡成瘾大鼠所建立的 CPA 具有一定的稳定性和持久性。最近,研究者用 15μg/kg 的低剂量纳络酮诱发了 CPA,而且持续超过了 16 周^[7],进一步说明该特点。

临床研究表明,和躯体戒断症状相比,戒断的情绪症状和药物觅求及强迫性觅药行为的复发具有更大的相关性^[3]。目前认为正性强化和负性强化分

别在强迫性觅药行为的不同阶段起作用,药物本身的正性强化是强迫性觅药行为的起始因素;而在依赖形成后,戒断诱发的负性情绪反应起维持觅药行为的作用^[11]。因而负性强化是觅药行为反复出现,稽留症状持续存在的主要因素^[12]。因而利用 CPA 模型,探讨长时程而稳定的 CPA 的脑环路和神经化学物质基础,对于透彻研究成瘾的发展和复吸易感性相关脑区变化具有重要意义。CPA 模型也可以应用于情绪记忆领域的研究,通过比较成瘾药物诱发的特殊情绪记忆和其他情绪记忆编码和加工过程的特点,探讨是否药物诱发的记忆具有其独特的神经药理学基础,为深入揭示记忆的脑神经机制提供新的研究途径。

参 考 文 献

- 1 Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev*, 1993, 18:247 ~ 291.
- 2 Childress AR, Hole AV, Ehrman RN, et al. Cue reactivity and cue-reactivity interventions in drug dependence. *NIDA Res Monogr*, 1993, 137:73 ~ 95.
- 3 Koob GF, Markou A, Weiss F, et al. Opponent process and drug dependence: Neurobiological mechanisms. *Semin Neurosci*, 1993, 5:351.
- 4 Schulteis G, Markou A, Gold LH, et al. Relative sensitivity to naloxone of multiple inducers of opiate withdrawal: a quantitative dose-response analysis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 271:1391 ~ 1398.
- 5 Boening JAL. Neurobiology of an addiction memory. *J Neural Transmission*, 2001, 108:755 ~ 765.
- 6 Mucha RF, Van der Kooy D, O'Shaughnessy M, et al. Drug reinforcement studied in rats using place conditioning. *Psychopharmacol*, 1984, 82:241 ~ 247.
- 7 Higgin GA, Nguyen P, Jonarchi N, et al. Effect of 5-HT₃ receptor antagonists on behavioral measures of naloxone-precipitated opioid withdrawal. *Psychopharmacol*, 1991, 105:322 ~ 328.
- 8 Higgins GA, Sellers EM. Antagonist-precipitated opioid withdrawal in rats: evidence for dissociations between physical and motivational signs. *Pharmacol Biochem Behav*, 1994, 48:1 ~ 8.
- 9 Stone WS, Walser B, Gold SD, et al. Scopolamine and morphine-induced impairments of spontaneous alternation performance in mice: reversal with glucose and with cholinergic and adrenergic agonists. *Behav Neurosci*, 1991, 105:264 ~ 271.
- 10 Planeta da Silva C, Aizenstein ML, DeLucia R. Reinforcing properties of fencamfamine: involvement of dopamine and opioid receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, 50:35 ~ 40.
- 11 Kreek MJ, Koob GF. Drug dependence: Stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend*, 1998, 51:23 ~ 47.
- 12 Koob GF, LeMoal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacol*, 2000, 24:97 ~ 129.

智能低下患者疼痛阈值的定量躯体感觉测验

人们基于行为观察而普遍认为智能低下(MR)患者的痛觉敏感度降低。然而,有害刺激的敏感度在这种患者中并未系统的测量。为此,我们设计了这项试验协议,并用它训练轻度智能低下患者(未指明的智能低下及唐氏综合征)来测量手部的热痛阈值(HPT),然后使用基于反应时间(RT)的极限法(MLD)和不基于反应时间的等级方法(MLE)来进行测量。这样就考虑了对这些患者的反应时间和传导速率的间接评价。我们发现在未指明的智能低下(41.23 ± 1.86)和唐氏综合征(40.96 ± 2.93)组中,当使用等级方法($P < 0.05$)进行测量时,热痛阈值明显低于对照组(42.86 ± 2.42)。使用极限法时两组在热痛阈值上没有明显区别。但是,未指明的智能低下及唐氏综合征患者的反应时间和传导速率值明显低于对照组(例如,相对于1.2秒的平均反应时间分别为1.86和2.55, $P < 0.01$)。从这项工作可以看出智能低下患者不仅可感知疼痛,而且对于热痛比正常人更加敏感。考虑到智能低下患者的低反应时间和传导速率值,建议在对他们进行计算机化定量测试疼痛阈值时,最好采用不考虑反应时间的方法(如MLE)来测量。

(Ruth D, Chaim G. P, Chava Peretz, et al. *Pain*, 2004, 108:58 ~ 66 时霄冰节译,于生元审校)