

吗啡、食物诱导的条件性位置偏爱 获得与保持的比较*

李勇辉^{1,2} 郑希耕¹ 鞠平^{1,2} 刘杰^{1,2} 杨晓燕¹ 隋南^{1†}

(1 中国科学院心理研究所, 中国科学院心理健康重点实验室, 北京 100101; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

(2004 年 6 月 9 日收稿; 2004 年 8 月 6 日收修稿)

Li YH, Zheng XG, Ju P, et al. Comparison between acquisition and retention of morphine and food induced conditioned place preference. *Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, 2005, 22(4): 467~ 471

摘要 应用条件性位置偏爱模型研究了大鼠吗啡与食物条件性位置偏爱(CPP)获得与保持的差异, 结果发现, 经过 6 轮训练后吗啡与食物都形成相同程度的条件性位置偏爱; 但 5 次熄灭测试后吗啡的条件性位置偏爱程度没有明显的消退, 而食物的条件性位置偏爱明显消退. 表明经过充分训练后吗啡与食物奖赏记忆的获得没有显著差异, 但吗啡奖赏记忆保持时间更长. 成瘾药物所产生的奖赏记忆的长久性可能是成瘾长期性的重要原因之一.

关键词 吗啡, 食物, 条件性位置偏爱, 获得, 记忆保持

中图分类号 R96

1 引言

药物成瘾的形成是从偶尔或控制性使用药物发展到不可控制的强迫性使用药物的过程, 其主要特征是产生不惜一切代价的觅药行为并长期保持这一行为^[1]. 这一过程伴随着学习记忆功能的变化. 大量研究表明, 不论是学习记忆还是成瘾过程都使相应脑区结构和功能发生长时程变化从而导致行为改变. 药物成瘾过程与学习记忆可能存在相同的神经生物学基础: 行为学实验表明二者作用于相同的脑区, 学习记忆过程中起关键作用的相关脑区(如海马)参与成瘾药物的强化效应, 在药物成瘾过程中起关键作用的中脑多巴胺系统也参与学习记忆过程; 电生理实验证明二者有相同的细胞机制, 尽管成瘾药物主要通过中脑多巴胺系统产生强化作用, 学习记忆过程主要发生于海马、杏仁核、前额叶皮层等脑区, 但两个过程都在相应脑区出现细胞突触长时程增强(LTP)或长时程抑制(LTD)现象; 分子生物学研究表明, 学习记忆和成瘾的形成无论发生在哪一脑区, 不论是通过何种信号转导机制最终大多汇聚于环一磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB, cAMP response element binding protein), 通过 CREB 调控相应的靶基因改变细胞的可塑性^[2]. 此外, 某些个体初次接触成瘾药物就能产生深刻记忆从而形成和维持强迫性用药行为; 熄灭很长一段时间的成瘾行为仍能由条件线索诱发^[3]. 以上事实表明, 学习记忆功能的改变是产生药物成瘾的重要原因. 自然奖赏物(如食物)也是通过中脑多巴胺系统产生奖赏效应, 但一般情况下自然奖赏物不会导致成瘾. 那么自然奖赏物产生的奖赏记忆与成瘾药物产生的奖赏记忆在获得与保持上是否存在差异, 这种差异是否就是导致成瘾的重要原因? 本实验通过比较食物和吗啡诱发的条件性位置

* 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 2003CB515404)、国家自然科学基金重点项目(30230130)、中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-SW-204 02)资助

† 通讯联系人, E-mail: Sun@psych.ac.cn

偏爱(CPP)的大小,以及在熄灭过程中 CPP 保持时间的长短,从行为学的角度探求成瘾与学习记忆功能改变的关系。

2 材料与方法

2.1 实验动物与分组

24 只 δ SD 大鼠,初始体重 200~240g(购自中国科学院遗传研究所实验动物中心,许可证号:199036),分为食物组、吗啡组、对照组。动物在 25cm \times 22.5cm \times 30cm 的不锈钢笼中单笼饲养,自由饮水、进食。光周期为 7:00~19:00,实验室温度控制在 20~24 $^{\circ}$ C,相对湿度为 40%左右。适应性饲养 2 周,体重达到 350g 左右开始限制性进食。适应期间每天抚摩捉拿动物,使其适应实验主试人员的操作,排除非实验特异性的应激因素对实验的干扰。

2.2 实验装置

条件性位置偏爱测试箱为 60cm(长) \times 30cm(宽) \times 30cm(高)有机玻璃长方体箱,中间有隔板将箱体分成相等的两部分。一侧线索为白色侧壁光滑底面;另一侧黑色侧壁栅格底面。自动跟踪系统记录两侧停留时间和穿梭次数。

2.3 实验程序

2.3.1 限制性进食程序

适应性饲养 2 周后,大鼠开始限制性进食,每天 10~12g,直至体重降到限制性程序实施时体重的 85%,然后控制进食量保持体重相对稳定。训练、测试、熄灭 3 个阶段均维持限制性进食。

2.3.2 药物

盐酸吗啡(青海制药厂,批号:20020201),生理盐水溶解,ip 给药,剂量为 2mg \cdot kg $^{-1}$ 。

2.3.3 CPP 测试程序

CPP 测试分 3 阶段完成,首先观察自然位置偏爱倾向,分 3d 进行,d1 适应 1 次,d2、d3 分别测试一次。适应时抽出两侧箱体中间的隔板,大鼠在两侧箱体内自由活动 15min,熟悉环境,不记录停留时间。d2、d3 与 d1 的程序一致,但记录其在两侧箱体的停留时间。以 2 次测试的平均值作为自然偏爱基值。第 2 阶段为条件训练阶段,共 6 轮训练,每轮包括 2 次训练,1 次吗啡或食物训练,1 次生理盐水或无食物训练;分 12d 进行,每天 1 次,20:00 开始训练,吗啡与生理盐水或有食物与无食物的训练先后次序平衡。本实验采用非平衡箱偏倚训练程序,由于大鼠自然偏爱黑箱,故以白箱作为食物、吗啡训练侧,黑箱为无食物、生理盐水训练侧。吗啡条件化训练时,插上箱体中间的隔板,注射吗啡(2mg \cdot kg $^{-1}$,1mL \cdot kg $^{-1}$)或等体积生理盐水后立即放入相应的箱内,训练时间 45min;食物训练时,将 8g 食物粒撒在底板上,训练时间 30min。d6(1 轮训练后测试)、d10(3 轮训练后测试)程序有所变化,16:00 进行 CPP 表达测试,为了避免测试带来的熄灭效应,在 20:00 进行相应的匹配训练。第 3 阶段为 CPP 测试阶段,分别在 d6(1 轮训练后)、d10(3 轮训练后)、d16(6 轮训练后)进行。测试时抽出箱体中间的隔板,将大鼠放入箱内自由活动 15min,记录大鼠分别在两侧箱体的停留时间。以白箱停留时间除以总时间(白箱停留时间所占的百分数)作为 CPP 的指标。

2.3.4 CPP 熄灭程序

在 d16CPP 测试结束后,每隔 1d 进行 1 次 CPP 测试(d18, d20, d22),连续 3 次,1 周后(d29)进行第 4 次测试。熄灭阶段不接触吗啡。CPP 测试结束 30min 后再给相应量的食物维持体重。记录每次测试时两侧箱体内停留时间,并计算出白箱停留时间所占百分数。

2.4 数据统计

训练前后伴药侧停留时间的变化采用 2 因素重复测量方差分析(3 \times 4),实验处理为组间变量(吗啡,食物,生理盐水),测试次数为组内变量(自然倾向测试,1 轮训练后测试,3 轮训练后测试,6 轮训练后测试);熄灭阶段伴药侧的时间变化采用 2 因素重复测量方差分析(3 \times 5),实验处理为组间变量(吗

啡, 食物, 生理盐水), 测试次数为组内变量(1、2、3、4、5 次测试). 所有的分析均由 SPSS11.5 for Windows 统计软件包完成.

3 结果与分析

3.1 不同训练程度的吗啡与食物条件性位置偏爱比较

如图 1 所示, 方差分析结果表明, 处理(吗啡、食物、生理盐水)主效应显著 ($F(2, 21) = 6.388, P < 0.01$), 训练次数主效应显著 ($F(3, 63) = 61.157, P < 0.01$), 二者之间交互作用显著 ($F(6, 63) = 5.980, P < 0.01$). 简单效应分析表明, 3 轮训练后各组 CPP 表达差异显著 ($F(2, 21) = 9.326, P < 0.01$); 吗啡、食物组形成了显著的 CPP ($P < 0.01, P < 0.05$), 吗啡 CPP 程度略大于食物 CPP ($P = 0.062$); 6 轮训练后各组 CPP 表达差异显著 ($F(2, 21) = 8.182, P < 0.01$), 吗啡、食物组均形成了显著的 CPP ($P < 0.01, P < 0.01$), 但吗啡组与食物组 CPP 差异不显著 ($P > 0.05$). 第 1、3 轮训练之间处理与训练次数交互作用显著 ($F(2, 21) = 5.19, P < 0.05$), 第 3 轮训练后吗啡、食物组白箱停留时间显著大于二者第 1 轮训练后的值 ($P < 0.01, P < 0.05$). 第 3、6 轮训练处理与训练次数交互作用不显著 ($F(2, 21) = 1.18, P > 0.05$). 说明第 3、6 轮训练的啡、食物 CPP 没有显著差异. 以上结果表明, 在中度食物限制的情况下, 3 轮训练后吗啡、食物训练均能形成 CPP, 但吗啡 CPP 的程度略大于食物 CPP; 6 轮训练后吗啡与食物 CPP 的程度相当, 且与 3 轮训练的结果没有显著差异, 3 轮训练后吗啡、食物 CPP 程度大于 1 轮训练. 说明经过 6 轮训练 CPP 已达到稳定水平.

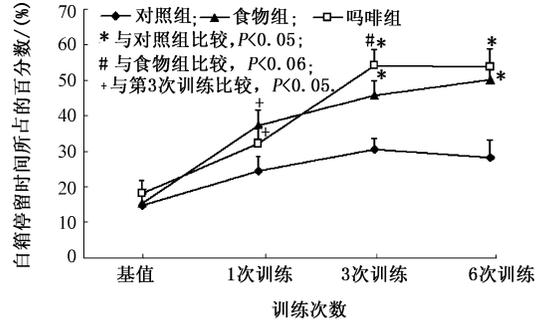


图 1 不同程度训练后 CPP 的表达

3.2 熄灭过程中吗啡与食物条件性位置偏爱的比较

如图 2 所示, 方差分析表明, 处理(吗啡、食物、生理盐水)主效应显著 ($F(2, 21) = 4.064, P < 0.05$), 测试次数主效应差异不显著 ($F(4, 84) = 1.122, P > 0.05$), 二者交互作用显著 ($F(8, 84) = 2.133, P < 0.05$). 简单效应分析表明, 对照组、吗啡组白箱停留时间 5 次测试过程中没有显著变化 ($F(4, 84) = 1.18, P > 0.05, F(4, 84) = 0.16, P > 0.05$), 食物组白箱停留时间 5 次测试过程中差异显著 ($F(8, 84) = 4.04, P < 0.01$); 食物组第 4、5 次测试白箱停留时间显著低于第 1 次测试 ($P < 0.05, P < 0.01$). 说明食物组 CPP 已明显消退. 第 1、2、3、4 次测试中吗啡组 CPP 均大于对照组 ($P < 0.01, P < 0.05, P < 0.07, P < 0.01$), 并且在第 4、5 次测试中吗啡组白箱停留时间大于食物组 ($P < 0.05, P = 0.064$); 食物组在第 2、3、4、5 次测试中白箱停留时间与对照组差异不显著 ($P > 0.05$). 以上结果说明, 经过 5 次测试吗啡 CPP 没有明显消退, 而食物 CPP 在第 4 次测试已经消退.

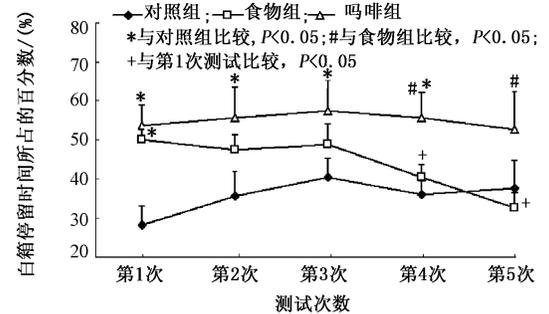


图 2 熄灭过程中 CPP 的测试值

4 讨论

条件性位置偏爱 是奖赏物的奖赏效应与特定环境线索相联结产生的情境条件反射 (context conditioning), 不仅是衡量奖赏效应大小的基本模型, 也是测量学习记忆的有效模型. CPP 获得的大小受两种因素制约: 一是奖赏物与环境匹配时个体的学习能力; 二是奖赏物产生的奖赏效应的强弱. 而 CPP 的熄灭过程则反映已经获得的奖赏记忆保持时间的长短, 是衡量记忆能力的指标. 本实验结果表明, 在

中度食物限制(体重维持在限制性进食程序实施时体重的 85% 的水平)的情况下,3 轮训练后吗啡、食物均能形成显著的 CPP, 并且吗啡的 CPP 程度略大于食物 CPP; 经过 6 轮训练后吗啡与食物产生显著的 CPP, 但二者程度没有显著差异. 不论是吗啡还是食物组, 6 轮训练与 3 轮训练 CPP 的程度没有明显差异. 说明经过 6 轮训练已经形成稳定并且显著的 CPP. 相同次数的熄灭训练后吗啡 CPP 没有明显的消退, 食物 CPP 显著消退. 以上结果说明, 在中度食物限制状况下吗啡、食物产生的奖赏效应没有明显差异, 但吗啡产生的奖赏记忆保持更持久.

CPP 的大小是奖赏物与环境线索匹配时个体学习能力与奖赏物奖赏效应二者相互作用的结果, 在学习记忆未受明显影响的情况下, CPP 的获得并不是反映奖赏记忆强弱的指标, 更多的是反映奖赏效应的大小. 有研究表明, 吗啡对学习记忆的损害存在剂量关系, 低剂量($3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以下)的吗啡不影响大鼠的学习记忆能力, 大剂量的吗啡损害大鼠的空间学习记忆^[4-6]. 本实验采用 $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的吗啡, 因此不会影响匹配时的学习能力. 另外, 机体皮质酮水平对学习记忆有重要影响, 皮质酮水平升高损害学习能力^[7], 但长期慢性食物限制对皮质酮的水平没有显著影响^[8]. 由此可知, 本实验中奖赏物与环境线索匹配时个体的学习能力未受明显影响. 因此, 食物、吗啡 CPP 表达时出现的差异, 主要反映的是二者奖赏效应大小的差异, 即在中度食物限制的情况下, 6 轮训练后二者的奖赏效应没有显著差异.

熄灭过程反映了获得后的奖赏记忆的持久性, 吗啡奖赏记忆一旦获得便能长期保存, 本实验观察到 2 周内连续测试的情况下吗啡的 CPP 并不消退, 与 Mueller D 等观察的结果一致^[9], 而食物 CPP 经 3 次测试后便消退. 说明吗啡产生的奖赏记忆更持久. 可能的原因有: (1) 吗啡促进多巴胺的释放, 多次注射吗啡能产生敏感化, 多巴胺神经元的形态发生改变, 使多巴胺系统的效能增强; 第 1 次接触新颖食物多巴胺释放增加, 但再次接触相同的食物时多巴胺的释放不增加(不能形成敏感化)^[10]. 而多巴胺是诱因凸显过程(incentive salience attribution)的关键神经递质, 当条件线索与初级奖赏物(非条件线索)结合后, 多巴胺系统效能增加(敏感化状态)使条件线索凸显更具有吸引力, 从而诱发渴求, 并且多巴胺系统敏感化状态一旦形成便长期存在不消退^[11]; 而多次食物接触多巴胺系统不产生敏感化. 故吗啡的 CPP 保持时间更长. 此外, 多巴胺也能促进记忆的获得与保持^[11]. (2) 吗啡可能通过胆碱能系统对学习记忆产生影响, 阿片系统与胆碱系统的相互作用存在时效因素, 急性注射吗啡抑制乙酰胆碱的释放, 慢性吗啡注射增加乙酰胆碱的释放; 不仅如此, 吗啡促进多巴胺释放后多巴胺系统的激动也能促进乙酰胆碱的释放^[12]; 乙酰胆碱的增加能有利于记忆的保持. (3) 吗啡注射可导致皮质酮释放增加, 皮质酮能促进记忆的巩固^[13]; 此外, 吗啡还可能通过 NMDA 系统促进记忆的巩固与保持^[14]. 以上事实表明, 吗啡通过与学习记忆相关的多种递质系统相互作用, 促进奖赏记忆的保持与巩固. 但是大剂量的吗啡本身又损害学习记忆能力. 因此, 吗啡对奖赏记忆的影响非常复杂, 不仅与剂量以及作用时程有关, 而且可能与脑内不同核团及相应的递质系统在学习记忆过程中不同阶段所起作用不同有关. 具体机制有待进一步研究.

References

- [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] Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 2002, 78: 637~647
- [3] Weiss F, Maldonado Vlaar CS, Parsons IH, et al. Control of cocaine seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 4321~4326
- [4] Zheng XG, Li XW, Sui N. Effects of scopolamine and physostigmine on acquisition of morphine-treated rats in Morris water maze performance. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2002, 23(5): 477~480
- [5] Ragozzino ME, Parker ME, Gold GE. Spontaneous alternation and inhibitory avoidance impairments with morphine injections into the medial septum: Attenuation by glucose administration. *Brain Res.*, 1992, 597: 241~249
- [6] Ma GY, Fan XL, Xu XH, et al. Effects of morphine dependence on learning and memory in rats and mice. *Chinese Journal of Behavioral Medical Science*, 2000, 9(5): 329~331 (in Chinese with English abstract)

- [7] Klennerova V, Jurcovicova J, Kaminsky O, *et al.* Combined restraint and cold stress in rats: effects on memory processing in passive avoidance task and on plasma levels of ACTH and corticosterone. *Behav. Brain Res.*, 2003, 142(1-2): 143~ 149
- [8] Suber GD, Evans SB, Higgins MS, *et al.* Food restriction modulates amphetamine conditioned place preference and nucleus accumbens dopamine release in the rat. *Synapse*, 2002, 46(2): 83~ 90
- [9] Mueller D, Perdikaris D, Stewart J. Persistence and drug induced reinstatement of a morphine induced conditioned place preference. *Behav. Brain Res.*, 2002, 136(2): 389~ 397
- [10] Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience. *Brain Res. Rev.*, 1998(28): 309~ 369
- [11] Levin ED, Rose JE. Acute and chronic nicotinic interaction with dopamine systems and working memory performance. *Ann N Y Acad Sci.*, 1995, 757: 245~ 252
- [12] Imperato A, Obinu MC, Casu MA, *et al.* Chronic morphine increases hippocampal acetylcholine release: possible relevance in drug dependence. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, 302(1-3): 21~ 26
- [13] Hui GK, Figueroa IR, Poytress BS, *et al.* Memory enhancement of classical fear conditioning by post training injections of corticosterone in rats. *Neurobiol. Learn Mem.*, 2004, 81(1): 67~ 74
- [14] Khavandgar S, Homayoun H, Zarrindast MR. The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state dependent learning induced by morphine in mice. *Psychopharmacology*, 2003, 167(3): 291~ 296

附中文参考文献

- [6] 马光瑜, 樊小力, 徐小虎, 等. 吗啡成瘾对大鼠及小鼠学习与记忆能力影响的实验研究. *中国行为医学科学*, 2000, 9(5): 329~ 331

Comparison between Acquisition and Retention of Morphine and Food-Induced Conditioned Place Preference

LI Yong-Hui^{1,2} ZHENG Xi-Geng¹ JU Ping^{1,2} LIU Jie^{1,2} YANG Xiao-Yan¹ SUI Nan¹

(1 Key Laboratory of Mental Health, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract To confirm the hypothesis that persistence of addiction is caused by reward related memory of addictive drugs. 24 rats, in food restriction, were trained in biased conditioned place preference procedure. Both morphine and food established conditioned place preference at the same level after 6 sessions training. Food-induced CPP was extinct, while morphine induced CPP was preserved after 4 retests. It is suggested acquisition of conditioned place preference produced by morphine and food is similar, however, morphine CPP is maintained longer. The inveterate reward related memory induced by addictive drugs is a major factor for the persistence of addiction.

Key words morphine, food, conditioned place preference, acquisition, retention