

·基础研究·

杏仁中央核 NMDA 受体对急性吗啡依赖大鼠戒断诱发条件性位置厌恶的影响*

刘彩谊 李勇辉 白云静 隋南 @

【摘要】目的：研究杏仁中央核（Central nucleus of the amygdala, CeA）N-甲基-D-天冬氨酸（N-methyl-D-aspartate, NMDA）受体在纳络酮诱发急性吗啡依赖大鼠戒断性情绪反应中的作用。方法：吗啡、纳络酮间隔 4 小时皮下注射，通过两轮纳络酮匹配训练建立条件性位置厌恶（Conditioned place aversion, CPA），作为急性吗啡依赖戒断诱发的情绪反应模型。观察纳络酮匹配训练前 CeA 微量注射 NMDA 受体拮抗剂地卓西平（MK801）对大鼠训练后在纳络酮匹配侧停留时间的影响。结果：戒断组大鼠经过两轮训练后在纳络酮匹配侧停留时间（230.4 ± 32.8 s）比假手术组（457.6 ± 47.8 s）显著缩短（ $P < 0.01$ ），训练前 CeA 微量注射 MK801 大鼠在纳络酮匹配侧停留时间（447.0 ± 51.8 s）比戒断组（230.4 ± 32.8 s）显著延长（ $P < 0.01$ ），非戒断组大鼠（急性吗啡依赖组，未接触吗啡组）训练前 CeA 注射 MK801 训练前后在处理侧停留时间差异无显著性（ $P > 0.05$ ）。结论：CeA 注射 MK801 既无奖赏效应也无厌恶效应，但能阻断 CPA 的建立，提示 CeA 的 NMDA 受体参与急性吗啡依赖戒断诱发的情绪反应。

【关键词】 吗啡依赖；急性戒断；条件性位置厌恶；杏仁中央核；N-甲基-D-天冬氨酸受体；

中图分类号：R595.5 文献标识码：A 文章编号：1000-6729(2008)002-0094-04

Effect of NMDA Receptor within the Central Nucleus of the Amygdala on Conditioned Place Aversion Induced by Withdrawal in Acute Morphine-dependent Rats

LIU Cai-Yi^{1,2,3}, LI Yong-Hui¹, BAI Yun-Jing^{1,2}, et al.

- 1 Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101
- 2 Graduate School of CAS, Beijing 100087
- 3 The General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700

【Abstract】Objective: To investigate the role of glutamate receptors (NMDA) within the CeA in the negative affective component of morphine withdrawal from acute morphine-dependent rats. **Methods:** The negative affective component of naloxone-precipitated withdrawal in acute morphine-dependent rats were assessed with the conditioned place aversion paradigm (CPA). **Results:** Compared with the sham control group, the rats in withdrawal group spent significantly less time on naloxone-paired compartment (230.4 ± 32.8 s/457.6 ± 47.8 s $P < 0.01$), showing obvious naloxone-induced CPA. But microinjection NMDA receptor antagonist MK801 into CEA inhibited the development of CPA (447.0 ± 51.8 s/230.4 ± 32.8 s, $P < 0.01$). There was no this effect in blank control or acute dependent group (those without withdrawal). **Conclusion:** The present data suggested that NMDA receptors within the CeA play a key role in the negative affective component of withdrawal from acute dependence on morphine in rats.

【Key words】 morphine dependence; acute withdrawal; conditioned place aversion; the central nucleus of amygdala; NMDA receptor

急性阿片依赖是指一次或短期给予阿片受体激动剂后给予阿片受体拮抗剂，能诱发广泛的戒断症状，除躯体症状外还包括焦虑、烦躁、抑郁等情绪反应，这些症状与长期依赖戒断相似^[1]。新的药物动机理论（负性强化的情绪过程模型）^[2]强调：在一开始的

偶然用药发展到强迫性用药的整个过程中，戒断性负性情绪在成瘾用药行为的维持和复吸中均起着关键作用。相对于慢性依赖的深入研究，对调控急性依赖的神经机制知之甚少。深入研究急性（早期）依赖的神经机制，对揭示从偶然用药到强迫性用药的转变机

* 基金项目：国家重点基础研究发展计划（973计划，CB515404）、国家自然科学基金重点项目（30230130）、中科院“西部之光”人才培养计划项目资助

中国科学院心理研究所，北京 100101 中国科学院研究生院，北京 100087 北京军区总医院，北京 100700 @通讯作者 Email: suin@psych.ac.cn

制以及寻找有效的方式降低渴求、治疗成瘾具有重要的意义。

作为泛杏仁核（包括杏仁中央核、终纹床核和伏隔核）的重要组成部分，杏仁中央核（CeA）在焦虑等情绪反应中起重要作用，并且 CeA 的 C-fos 在急性吗啡戒断诱发 CPA 建立中反应增强，说明 CeA 参与急性 CPA 的建立^[3]。同时 CeA 分布有高密度的谷氨酸神经元胞体和受体。近来大量的实验表明 NMDA 受体具有明确的抗焦虑作用。最显著的是 NMDA 受体非竞争性拮抗剂 MK801，在 Vogel test 实验中外周给与极低剂量的 MK801 即有显著的抗焦虑作用。因而，推测 CeA 的 NMDA 受体参与吗啡急性依赖戒断诱发的 CPA 反应。CPA 模型是根据经典条件反射原理，通过阿片 μ 受体拮抗剂纳络酮诱发吗啡急性依赖大鼠产生戒断性情绪反应，使之与中性环境（包括视觉、触觉及嗅觉等线索）相结合，建立起条件性厌恶反应。本研究将以 CPA 为戒断性情绪反应模型，利用脑区微量给药技术研究 CeA 的 NMDA 受体在急性吗啡依赖大鼠戒断性情绪反应中的作用。

1 对象与方法

1.1 动物

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 55 只，初始体重 280 ± 20 g，分成 5 组每组 9 - 13 只，去除定位手术点不准确大鼠，实际每组 7 - 8 只。购自维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 试剂和仪器

盐酸吗啡（青海制药厂），纳络酮、地卓西平（MK801）（均为 Sigma 公司）。仪器为两箱式条件性位置偏爱测试箱，两端箱体中间有一黑色有机玻璃隔板隔开，一端箱体三壁上各有两条 3cm 宽的红色竖条纹，光滑底面；另一端箱体侧壁无条纹，栅格底面。摄像跟踪系统自动记录动物在两侧箱体停留时间。

1.3 实验方法

1.3.1 脑区定位手术

手术前禁食、禁水 12h。以 10% 水合氯醛（3.5 - 4.0ml/kg）腹腔给药麻醉。将大鼠头部固定在立体定位仪上（Narishige SN-2 型，Japan）进行脑区定位手术。参照图谱（Paxinos and Watson, 1986），杏仁中央核区外套管植入点的坐标为前囟后 2.3mm，中缝外侧 4.3 mm，颅骨表面下 7.0 mm（位于杏仁中央核上方 1.0 mm）。动物术后恢复 7 - 10 天后进行行为学实验。

1.3.2 CPA 实验程序

CPA 程序分为适应、自然位置偏爱倾向测试、条件化匹配训练、训练后偏爱测试四个阶段。第 1 天适应环境，让大鼠在两箱内自由活动 15min；第 2 天进行自然偏爱倾向测试，记录大鼠在两箱内停留时间；结果表明大鼠在两侧箱体内停留时间无差异。第 3 至第 6 天为条件性匹配训练阶段，用隔板将两侧箱体隔开，共分 4 天进行，每天训练一次，每次训练 40 分钟；注射生理盐水和药物训练交替进行，两天为一轮实验，其中第 3 天上午注射生理盐水，间隔 4 小时后再次注射生理盐水并放入一侧训练箱 40 分钟，该箱称之为“非药物匹配侧”或“非处理侧”；第 4 天上午皮下注射盐酸吗啡 5.6mg/kg，间隔 4 小时后皮下注射纳络酮 0.5 mg/kg 并放入另一侧训练箱 40 分钟，该箱称之为“纳络酮匹配侧”或“处理侧”。第 5 天和第 6 天分别重复第 3 天和第 4 天的训练。第 7 天进行训练后位置偏爱测试，将隔板拿开，将大鼠放入箱内自由活动 15 分钟，记录大鼠分别在两箱体的停留时间。以训练前、后在“纳络酮匹配侧”或“处理侧”停留时间变化来衡量 CPA 反应是否建立。

1.3.3 实验分组及脑区给药

在 CPA 程序的第二天前测结束后将大鼠分为戒断程序组和非戒断程序组，其中戒断程序组包括假手术组、戒断组和戒断干预组，假手术组大鼠只作手术，CeA 给予生理盐水 0.5 μ l 皮下注射，不给予吗啡和纳络酮皮下注射；戒断组大鼠与假手术组不同是给予吗啡和纳络酮皮下注射来制作戒断模型；戒断干预组与戒断组的不同是注射纳络酮前 20 分钟 CeA 微量注射 MK801（20nmol/side, 0.5 μ l）以考察 CeA 注射 MK801 对急性依赖戒断 CPA 建立的影响。非戒断程序组包括急性吗啡依赖组和未接触组以考察 CeA 微量注射 MK801 对急性吗啡依赖和未接触吗啡的大鼠是否有奖赏或厌恶效应。与戒断干预组的不同是急性吗啡依赖组不给予纳络酮注射，只给吗啡皮下注射和 CeA 注射 MK801。未接触组与急性吗啡依赖组的不同是不给予吗啡注射。

1.3.4 脑区注射位点鉴定

行为学实验完成后，在大鼠 CeA 内注射 1% 的溴胺天蓝 0.5 μ l，断头取脑，冰冻切片，显微镜下鉴别注射位点。图 1 显微镜照片显示了注射位点的典型位置。图 2 取自图谱 Paxinos and Watson (1986)，示意注射套管的针道及内套管末端注射位点位于 CeA，末端灰色圆形范围包含了本实验中所有位于 CeA 的正确位点。

1.4 统计方法 进行 t 检验。

2 结果

2.1 CeA 注射 MK801 对 CPA 建立的影响

表 1 显示训练前戒断组在纳络酮匹配侧停留时间

与假手术组和戒断干预组比较, 差异均无显著性 ($P > 0.05$); 训练后停留时间戒断组短于假手术组, 说明纳络酮能够诱发急性吗啡依赖大鼠建立 CPA; 戒断干预组的停留时间长于戒断组, 说明训练前 CeA 注射 MK801 阻断了 CPA 的建立。

表 1 戒断程序组各组大鼠训练前后在纳络酮匹配侧停留时间 (s) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 假手术组 ($N=7$) | 戒断组 ($N=8$) | 戒断干预组 ($N=8$) | F 值 | P 值 | 两两比较 $P < 0.01$ |
|----------|-------------------|--------------------|---------------------|-------|-------|--------------------|
| 训练前 (前测) | 443.0 \pm 41.5 | 462.6 \pm 57.2 | 408.1 \pm 43.9 | 0.252 | 0.859 | |
| 训练后 (后测) | 457.6 \pm 47.8 | 230.4 \pm 32.8** | 447.0 \pm 51.8### | 0.618 | 0.003 | > |

2.2 对未接触吗啡和急性吗啡依赖大鼠 CeA 注射 MK801 的条件性位置效应

无论是未接触组还是急性吗啡依赖大鼠, 训练前、后在处理侧停留时间均无显著差异, 说明训练前 CeA 注射 MK801 既无奖赏效应也无厌恶效应 (见表 2)。

表 2 非戒断程序组各组大鼠训练前、后在处理侧停留时间 (s) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 训练前 | 训练后 | F 值 | P 值 |
|-------------------|------------------|------------------|--------|-------|
| 未接触组 ($N=8$) | 451.6 \pm 49.1 | 471.5 \pm 73.5 | -0.479 | 0.647 |
| 急性吗啡依赖组 ($N=7$) | 463.3 \pm 39.2 | 414.0 \pm 45.7 | 0.904 | 0.401 |

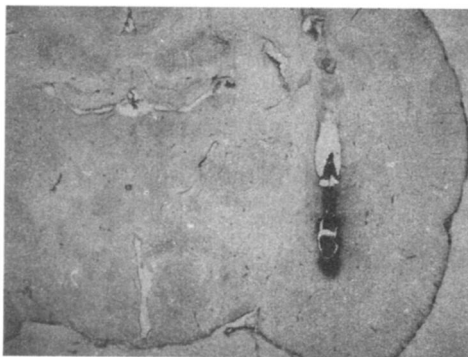


图 1 切片 CeA 注射位点的显微镜下照片

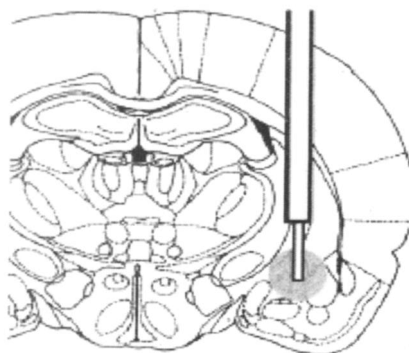


图 2 图谱上 CeA 位点示意图及套管

3 讨论

本研究表明 CeA 注射 MK801 可阻断急性吗啡依赖戒断诱发的 CPA 的建立, 但对急性吗啡依赖或未接触吗啡的大鼠并无奖赏或厌恶效应。有研究表明 MK801 不仅影响情绪, 其本身亦有奖赏效应并且能影响学习记忆, 因此需要深入讨论 CeA 微量注射 MK801 阻断急性 CPA 建立的神经机制。

尽管有文献提示外周注射 MK801 具有奖赏作用能产生条件性位置偏爱 (Conditioned place preference, CPP) 效应^[4], 但 MK801 产生 CPP 效应可能依赖于使用剂量和实验条件, 因为另有研究表明 MK801 在啮齿类既不产生位置偏爱也未产生位置厌恶^[5]。在 Watanabe 的研究中^[6], 在 CeA 采用两个剂量的 MK801 (10nmol 和 30nmol/每侧) 进行微量注射, 30nmol/每侧脑区的 MK801 有轻微的奖赏效应而 10nmol/每侧的 MK801 无奖赏效应。本研究中采用 20nmol 的剂量, 结果表明该剂量在急性吗啡依赖及未接触过吗啡的大鼠均未形成条件性位置偏爱, 可推测本研究中 MK801 本身的奖赏效应对 CPA 的建立无影响, 但由于第二大组的两组大鼠均未设立各自的对照组, 故结论尚需验证。

许多研究显示 NMDA 受体参与学习记忆, 例如 NMDA 受体拮抗剂微量注射到杏仁核损害对条件性恐惧的记忆^[7-9]。然而亦有与此不一致的结果: NMDA 受体拮抗剂苯派酚醇能抑制吗啡诱发的 CPP, 但其对记忆无任何影响^[4]; 类似地, Popik^[5]研究表明非竞争性 NMDA 受体拮抗剂美金刚抑制纳络酮参与的吗啡戒断诱发的 CPA, 但对食物诱发的 CPP 无影响, 也不影响 Morris 水迷宫空间任务的记忆提取。这些结果表明 CeA 的 NMDA 受体参与吗啡诱发的 CPP 或吗啡戒断诱发的 CPA 并不是因为其对学习记忆的影响造成的。提示 MK801 对学习记忆的影响在本研

究中可能不是 CeA 注射 MK801 阻断 CPA 建立的主要原因。

谷氨酸受体和细胞体遍布整个杏仁核,并且在杏仁中央核和基底外侧杏仁核有着高密度分布^[10, 11]。这里的谷氨酸纤维大多起源于皮层和皮层下脑区,负责将感觉信息传入杏仁中央核,对识别和习得这些感觉信息所携带情绪和动机成分起重要作用。推测 CeA 是谷氨酸受体参与急性吗啡依赖大鼠戒断诱发的 CPA 反应的主要结构基础(由于本研究未设立非 CeA 干预组,因而使 CeA 参与 CPA 反应的特异性受到影响)。

总之, CeA 的 NMDA 受体参与急性吗啡依赖戒断诱发的 CPA 反应,提示 CeA 的 NMDA 受体参与急性吗啡依赖戒断诱发的情绪反应。

参考文献

- Harris AC, Atkinson DM, Aase DM, et al. Double dissociation in the neural substrates of acute opiate dependence as measured by withdrawal-potentiated startle. *Neurosci*, 2006, 139: 1201 - 1210.
- Baker TB, Piper ME, McCarthy DE, et al. Addiction motivation reformulated: an affective processing model of negative reinforcement. *Psychol Rev*, 2004, 111: 33 - 51.
- Jin C, Araki H, Nagata M, et al. Expression of c-fos in the rat central amygdala accompanies the acquisition but not expression of conditioned place aversion induced by withdrawal from acute morphine dependence. *Behav Brain Res*, 2005, 161: 107 - 112.
- Suzuki T, Kato H, Tsuda M, et al. Effects of the non-competitive NMDA receptor antagonist ifenprodil on the morphine-induced place preference in mice. *Life Sci*, 1999, 64: 151 - 156.
- Popik P, Danysz W. Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, memantine. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 280: 854 - 865.
- Watanabe T, Nakagawa T, Yamamoto R, et al. Involvement of glutamate receptors within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Jpn J Pharmacol*, 2002, 88: 399 - 406.
- Kim M, McGaugh JL. Effects of intra-amygdala injections of NMDA receptor antagonists on acquisition and retention of inhibitory avoidance. *Brain Res*, 1992, 585: 35 - 48.
- Maren S, Aharonov G, Stote DL, et al. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav Neurosci*, 1996, 110: 1365 - 1374.
- Miserendino MJ, Sananes CB, Melia KR, et al. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated Startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*, 1990, 345: 716 - 718.
- Farb CR, Aoki C, Ledoux JE. Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, 1995, 362: 86 - 108.
- McDonald AJ. Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. *J Comp Neurol*, 1996, 365: 367 - 379.

责任编辑: 张卫华

2006 - 11 - 25 收稿, 2007 - 04 - 20 修回

(上接第 86 页)

- 黄希庭, 余华, 郑涌, 等. 中学生应对方式初步研究. *心理科学*, 2000, 23 (1): 1 - 5.
- 肖水源, 杨德森. 社会支持对身心健康的影响. *中国心理卫生杂志*, 1987, 1 (1): 184 - 187.
- 吴文源. 症状自评量表 (Symptom Checklist 90, SCL-90). 见: 张明园. 主编. *精神科评定量表手册*. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993: 15 - 25.
- Jořeskog KG, Sořibom D. Recent developments in structural equation modeling. *J Market Res*, 1982, 19: 404 - 416.
- 侯杰泰, 温忠麟, 成子娟. 结构方程模型及其应用. 北京: 科学教育出版社, 2004: 194 - 197.
- 钟霞, 姜乾金, 吴志霞, 等. 生活事件、社会支持、压力反应对医务人员应对方式的影响. *中国行为医学科学*, 2004, 13 (5): 560 - 562.
- 李金钊. 应对方式、社会支持和心理压力对中学生心理健康的影响研究. *心理科学*, 2004, 27 (4): 980 - 982.
- 井世洁. 初中学生的应对方式与心理健康的相关研究. *宁波大学学报 (教育科学版)*, 2001, 23 (4): 1 - 5.
- Lutz CJ, Lakey B. How People Make Support Judgments: Individual Differences in the Traits Used to Infer Supportiveness in Others. *J Pers Soc Psychol*, 2001, 81 (6): 1070 - 1079.
- Cohen S, Wills TA. Stress, social support and the buffering hypothesis. *Psychol Bull*, 1985, 98 (2): 307 - 357.
- 宫宇轩. 社会支持与健康的关系研究概述. *心理学动态*, 1994, 2 (2): 34 - 39.

责任编辑: 石川

2007 - 06 - 10 收稿, 2007 - 10 - 22 修回