

伏隔核和中脑腹侧被盖区内食欲素 在吗啡奖赏中的作用*

白云静^{1, 2} 韩锦^{1, 2} 李勇辉¹ 黄砚北^{1, 2} 杨晓燕¹ 隋南¹

(¹中国科学院心理研究所, 心理健康重点实验室, 北京 100101) (²中国科学院研究生院, 北京 100087)

摘要 实验采用条件性位置偏爱 (CPP)模型考察中脑腹侧被盖区 (VTA)和伏隔核壳区 (NAcSh)内食欲素 (orexin)在吗啡奖赏中的作用。Wistar大鼠分为盐水训练组和吗啡训练组。3轮吗啡(或盐水)匹配训练前, 双侧 VTA 或 NAcSh 内给予 OXR1拮抗剂 SB334867(VTA: 0.1, 5 μ g; NAcSh: 0.1, 3 μ g); 或 2轮吗啡(或盐水)匹配训练前 NAcSh 内给予 orexin A (0.2, 4, 6 μ g), 观察其对吗啡 CPP 建立的影响。结果表明, VTA 内给予 SB334867抑制吗啡 CPP 建立, 并存在剂量效应关系; NAcSh 内给予 SB334867或 orexin A 均未影响吗啡 CPP 建立, 而 orexin A 可增加吗啡处理大鼠的运动性。以上结果表明, VTA 和 NAcSh 内的 orexin 在吗啡奖赏中扮演的角色不同, 可能调控成瘾行为的不同成分。

关键词 条件性位置偏爱; 食欲素; 中脑腹侧被盖区; 伏隔核; OXR1拮抗剂

分类号 B845

1 前言

食欲素 (orexin 又名 hypocretin) 是由下丘脑分泌的一种神经肽, 因最初发现其能够促进动物摄食而得名, 其神经元特异性分布于外侧下丘脑以及邻近的背内侧下丘脑和围穹隆区 (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998)。食欲素有两种存在形式: orexin A 和 orexin B 分别是包含 33 和 28 个氨基酸的多肽。目前已发现的食欲素受体有两种: I 型受体 (OXR1) 和 II 型受体 (OXR2), orexin A 可与两种受体结合, 亲和力相当, 而 orexin B 对 OXR2 的亲和力远高于 OXR1。虽然分布局限, 但食欲素神经元的投射相当广泛, 与全脑许多核团和脑区有着往返神经联系, 其中包括介导奖赏和动机功能的中脑边缘多巴胺系统 (Fadel & Deutch, 2002; Siegel, 2004), 这使得人们致力于揭示食欲素在奖赏相关行为中的可能作用, 并且为病理性的奖赏行为如药物成瘾的形成机制提供了一些线索 (De Leone, Georgescu & Nestler, 2003)。

事实上, 已有研究发现食欲素在药物成瘾中发挥重要作用。急性给以安非他明可使 orexin 神经元激活 (c-Fos 表达增强), 慢性给以安非他明和吗啡可激活 orexin 神经元内 cAMP-CREB 通路 (De Leone et al., 2003; Georgescu et al., 2003)。并且, 敲除 orexin 基因的小鼠减轻了对吗啡的躯体依赖, 且不能建立起吗啡诱导的条件性位置偏爱 (conditioned place preference, CPP) (Georgescu et al., 2003)。这都说明, orexin 参与了成瘾药物的作用过程, 是成瘾行为发生和发展的必要分子。

中脑腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA) 和伏隔核 (nucleus accumbens, NAc) 是中脑边缘多巴胺系统的核心脑区, 在成瘾药物如吗啡的作用下, VTA 内的多巴胺 (DA) 神经元被激活, 使 NAc 内 DA 水平显著升高, 这一过程是成瘾药物发挥奖赏和强化效应以及成瘾行为建立的重要神经基础。研究表明, orexin 神经元与上述两个脑区均有密切的神经联系 (Fadel & Deutch, 2002; Peyron et al., 1998)。前期研究发现, orexin 神经元向 VTA 的神经投射参

收稿日期: 2008-08-26

* 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2009CB522002, 2003CB515404); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCXFTW-R-68); 国家自然科学基金项目 (30600184, 30770719); 中国科学院“西部之光”人才培养计划“联合学者”项目。

通讯作者: 隋南, E-mail: sun@psych.ac.cn

与药物奖赏过程。如, VTA 内给予 OXR1 拮抗剂 SB334867 抑制吗啡 CPP 建立 (Narita et al, 2006); 化学损毁单侧外侧下丘脑内 orexin 神经元和药理性封闭对侧 VTA 内 OXR1 (OXR1 拮抗剂) 显著抑制了吗啡 CPP 的建立 (Harris, Wimmer, Randall-Thompson & Aston-Jones, 2007)。

然而, 目前关于 orexin 调控药物奖赏的脑区机制的研究都集中在 VTA, 其它核团的作用尚未见报道。在机体接触成瘾药物时, orexin 神经元被激活, 如, 在 CPP 训练箱内给大鼠注射吗啡可激活外侧下丘脑的 orexin 神经元 (c-Fos 表达增加) (Harris et al, 2007)。而除了 VTA, 激活的 orexin 神经元也可向其它脑区释放递质, 从而影响药物的奖赏过程。接受来自 VTA 的 DA 投射的重要核团 NAc 内就分布有丰富的 orexin 能神经纤维 (Peyron et al, 1998)。NAc 可分为核区 (NAcCo) 和壳区 (NAcSh), 二者在细胞构筑、解剖联系以及功能意义上显著不同 (Kelley, 2004)。投射到 NAc 的 orexin 纤维主要分布在壳区背内侧 (Kelley, 2004)。NAcSh 内亦存在两种受体亚型 OXR1 和 OXR2, 但明显以后者为多 (Chludray, Harrison & Hervieu, 2002)。因而, 本研究的目的是考察中脑边缘多巴胺通路上的另一重要核团 NAcSh 内的 orexin 是否参与吗啡的奖赏过程, 并与 orexin 在 VTA 内的作用相比较。条件性位置偏爱 (CPP) 是反映奖赏以及奖赏学习过程的有效模型 (Tzschentke, 1998)。由于目前尚无商品化的 OXR2 拮抗剂, 本研究只观察了 VTA 和 NAcSh 内分别给予 OXR1 拮抗剂 (或全激动剂) 对吗啡 CPP 建立的影响。

2 材料与方法

2.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 (购自维通利华实验动物技术有限公司), 初始体重 240 ± 20 g 动物在 $25 \text{ cm} \times 22.5 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ 的不锈钢笼中单笼饲养, 自由饮水、进食。光周期为 8:00~20:00, 实验室温度控制在 $20 \sim 24^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $40\% \sim 60\%$ 。适应性饲养 1 周后进入实验。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。

2.2 药品

盐酸吗啡 (青海制药厂, 中国) 溶于生理盐水, 3 mg/ml SB334867 (Tocris 公司, 英国), OXR1 选择性拮抗剂, 溶于二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma 公司, 美国)。Orexin A (Tocris 公司, 英国) 溶于生理盐水。

2.3 核团立体定位插管术

大鼠体重达 $280 \sim 320$ g 时行双侧核团插管手术。10% 水合氯醛 (4 ml/kg) 腹腔注射麻醉大鼠。将大鼠头部固定在立体定位仪上, 消毒后剪除颅顶部毛皮, 暴露颅骨, 碘伏消毒颅面, 以前囟为原点, 根据特定核团的立体定位坐标确定其颅面位置, 用麻花钻 ($\varphi = 1000 \mu\text{m}$) 慢慢钻透颅骨, 将不锈钢套管 (o. d. 0.6 mm , i. d. 0.35 mm) 缓缓植入脑内。牙科水泥覆盖创面, 以 3 颗小螺钉固定。防尘针 (0.3 mm) 插入套管, 超出套管末端 $0.2 \sim 0.3 \text{ mm}$ 。VTA 立体定位坐标为: AP -5.2 mm , ML $\pm 0.9 \text{ mm}$, DV -7.7 mm (颅骨表面下) (Paxinos and Watson, 1997), 插管末端位于 VTA 上方 1 mm 。NAcSh 立体定位坐标为: AP $+1.7 \text{ mm}$, ML $\pm 0.8 \text{ mm}$, DV -5.5 mm (颅骨表面下), 插管末端位于 NAcSh 上方 1.5 mm 。动物术后恢复至少 1 周进入实验程序。行为实验后, 所有大鼠核团注射 1% 溴胺天蓝染料后断头取脑, 4% 多聚甲醛固定后行冰冻切片, 显微镜下鉴别注射位点准确性。剔除注射位点不准确大鼠的行为数据。

2.4 实验装置

两箱式条件性位置偏爱箱为 $80 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$ 长方体箱, 由黑色有机玻璃板围成, 顶端开放, 内以挡板分隔成两个大小相等但视觉和触觉环境线索不同的箱体。其中一个箱体为光滑底面, 侧壁有 3 cm 宽的红色竖条纹; 另一个箱体为栅格底面, 四壁无条纹。动物训练时分别在两个箱体内进行, 测试时将中间挡板去除。悬于箱体上方的摄像跟踪系统自动记录动物在两个箱体内停留的时间和水平运动距离。

2.5 CPP 训练程序

CPP 程序分为自然位置偏爱测试 (15min)、条件化训练、训练后偏爱测试 (15min) 三个阶段。自然位置偏爱测试共 2 次, 1 次厌, 此时去除两箱之间的挡板, 允许大鼠在箱内自由活动 15min, 记录其在两箱体内的停留时间, 将 2 次自然偏爱测试的平均值作为自然偏爱基值。基值测试表明大鼠偏爱栅格底板侧箱体, 即侧壁有条纹而底板光滑的箱体为大多数动物的非偏爱侧, 因此采用偏倚式 CPP 程序训练大鼠, 即在大鼠的非偏爱侧 (伴药侧) 给以吗啡, 而偏爱侧给以盐水。条件化训练阶段共 6 天, 每天训练 1 次, 吗啡和盐水训练各 3 天, 交替进行。吗啡训练组大鼠经吗啡 (morphine) (3 mg/kg) 皮下注射后立即被放入非偏爱侧箱体中训练 45min, 次日

生理盐水 (saline) 皮下注射后被放入偏爱侧箱体中训练 45min, 如此交替进行, 而盐水训练组大鼠无论在偏爱侧还是非偏爱侧始终被给以盐水注射, 训练时两箱体以挡板隔开。动物个体的自然偏爱被考虑进来, 如少数大鼠 (1/10) 以栅格底板侧箱体为伴药侧。条件化训练结束后第 2 天进行位置偏爱测试, 测试条件与自然位置偏爱测试相同, 记录大鼠在两箱体内停留时间。与盐水训练组相比, 吗啡训练组大鼠在非偏爱侧 (伴药侧) 停留时间显著增加并达到统计学意义, 即建立了吗啡 CPP。

2.6 实验分组

研究分三个实验进行。每个实验中动物均被随机分组, 同时根据动物的自然偏爱差异将其均匀分入各组, 即各组动物自然偏爱测试的基值之间无显著差异, 且各组基值的标准误相差不超过 5。实验一考察拮抗 VTA 内 OXR1 对吗啡 CPP 建立的影响, 共分 5 组。首先大鼠分为盐水训练组和吗啡训练组, 其中盐水训练大鼠 VTA 内分别给予对照溶剂 (DMSO) 和 SB334867 (5 μ g), 而吗啡训练大鼠 VTA 内分别给予 DMSO 和 SB334867 (1, 5 μ g) 处理。实验二考察拮抗 NA cSh 内 OXR1 对吗啡 CPP 建立的影响, 共分 5 组。首先大鼠分为盐水训练组和吗啡训练组, 其中盐水训练大鼠 NA cSh 内分别给予对照溶剂 (DMSO) 和 SB334867 (3 μ g), 吗啡训练大鼠 NA cSh 内分别给予 DMSO 和 SB334867 (1, 3 μ g) 处理。此外, 考虑 NA cSh 内以 OXR2 为多, 因此实验三考察 NA cSh 内给以 OXR 激动剂 orexin A 是否促进吗啡 CPP 建立, 共包括 6 组。大鼠亦分为盐水训练组和吗啡训练组, 但条件化训练为 4 天, 即吗啡和盐水训练各 2 天, 交替进行。其中盐水训练大鼠 NA cSh 内分别给予对照溶剂 (生理盐水) 和 orexin A (4 μ g), 吗啡训练大鼠 NA cSh 内分别给予生理盐水 (saline) 和 orexin A (2.4, 6 μ g) 处理。以上所有对照溶剂和干预药物均于每次条件化训练前 10~15min

核团内注射, 注射容量为 0.5 μ l/侧, 60s 内注射完毕, 留针 60s。

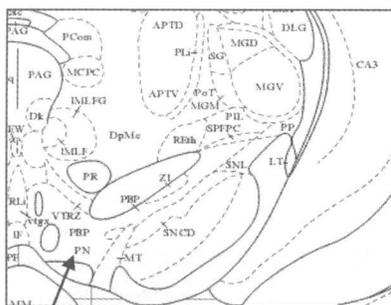
2.7 统计方法

数据以条件化训练前后大鼠在伴药侧箱体停留时间之差 (测试值-基值) (偏爱值) 显示。数据以均值 \pm 标准误表示。偏爱值或水平运动距离的组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。Post Hoc LSD 检验用于组间两两比较。使用 SPSS 11.5 统计软件分析。

3 结果

3.1 VTA 内给予 SB334867 抑制吗啡 CPP 建立

图 1 显示 VTA 注射位点。行为实验结束后, 根据脑内注射位点鉴定结果剔除注射位点不准确动物的行为数据。最终, 盐水训练 DMSO 处理组 7 只, SB334867 处理组 6 只; 吗啡训练 DMSO 处理组 9 只, 低剂量 SB334867 处理组 6 只, 高剂量 SB334867 处理组 6 只动物进入统计分析。吗啡训练前双侧 VTA 内给予 SB334867 (1, 5 μ g) 的结果如图 2 所示。one-way ANOVA 表明, 各组大鼠对伴药侧箱体的偏爱值存在显著差异, $F(4, 30) = 2.70, p < 0.05$ 。Post Hoc LSD 检验进一步显示, 给以 DMSO 的吗啡训练组大鼠表现出对吗啡匹配侧的明显偏爱 ($180.5 \pm 31.3, p < 0.05$ 与盐水训练 DMSO 处理组比较), 说明动物建立了显著的吗啡 CPP, 而 VTA 内仅给以 SB334867 (5 μ g) 并不影响盐水训练组大鼠对两侧箱体的偏爱 ($24.9 \pm 56.9, p > 0.05$ 与盐水训练 DMSO 处理组比较)。而如图所示, 双侧 VTA 内给以 SB334867 可抑制吗啡训练大鼠 CPP 的建立, 并存在剂量效应关系。当给予 5 μ g 的 SB334867 时, 该抑制效应达到显著水平 ($87.1 \pm 45.3, p < 0.05$ 与吗啡训练 DMSO 处理组比较; $p > 0.05$ 与盐水训练 SB334867 处理组比较)。



VTA



图 1 左图: VTA 位点示意图 (Paxinos and Watson, 1997); 右图: 显微镜下 VTA 注射位点。

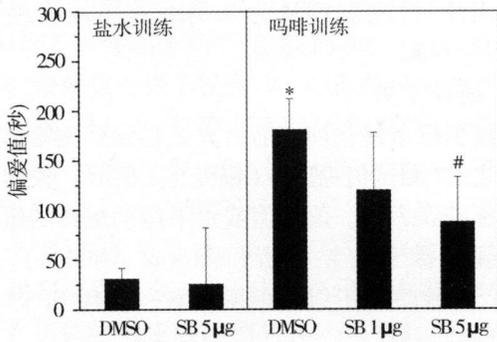


图 2 双侧 VTA 内注射 SB334867 对吗啡 CPP 建立的影响 (均值 ± 标准误)

注: * $p < 0.05$ 与盐水训练 DMSO 处理组比较; # $p < 0.05$, 与吗啡训练 DMSO 处理组比较。

3.2 NA cSh 内给予 SB334867 不影响吗啡 CPP 建立

图 3 显示 NA cSh 注射位点。根据脑内注射位点鉴定结果剔除注射位点不准确动物的行为数据。盐水训练 DMSO 处理组 6 只, SB334867 处理组 8 只; 吗啡训练 DMSO 处理组 11 只, 低剂量 SB334867

处理组 5 只, 高剂量 SB334867 处理组 5 只动物进入统计分析。经过吗啡条件化训练 3 轮, 每次训练前 NA cSh 内给予 SB334867 (1, 3μg) 的结果如图 4 所示, 因实验过程中大鼠有死亡现象, 导致数量不充足, 且两个剂量的 SB334867 没有显著区别, 因而将其数据合并。经 one-way ANOVA 分析发现, 各组大鼠对伴药侧箱体的偏爱值存在显著差异, $F(3, 31) = 3.46, p < 0.05$ 。Post Hoc LSD 检验显示, NA cSh 内给以 3μg 的 SB334867 不影响大鼠的自然偏爱值 ($55.1 \pm 73.1, p > 0.05$, 与盐水训练 DMSO 处理组比较)。吗啡训练 DMSO 处理组动物建立起明显的吗啡 CPP, 其偏爱值与盐水训练 DMSO 处理组相比有显著差异, $200.5 \pm 33.7, p < 0.05$ 但双侧 NA cSh 内注射 SB334867 并未影响吗啡 CPP 的形成, 其偏爱值与吗啡训练 DMSO 处理组无差异 ($200.3 \pm 35.3, p > 0.05$), 而显著高于盐水训练 DMSO 处理组 ($p < 0.05$), 说明该组动物也建立了显著的吗啡 CPP。

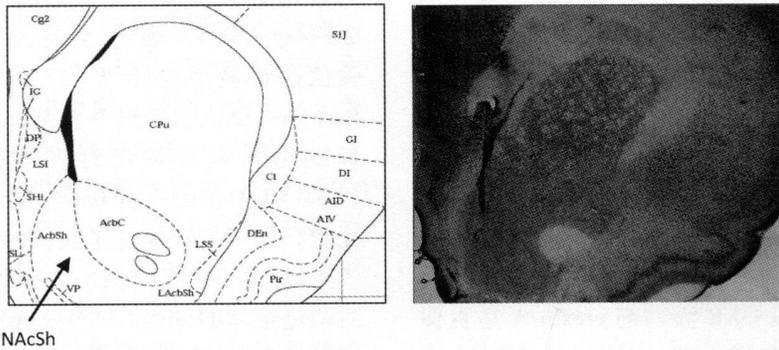


图 3 左图: NAcSh 位点示意图 (Paxinos and Watson, 1997); 右图: 显微镜下 NAcSh 注射位点。

3.3 NA cSh 内给予 orexin A 不影响吗啡 CPP 建立

NA cSh 内注射 SB334867 不影响吗啡 CPP 建立

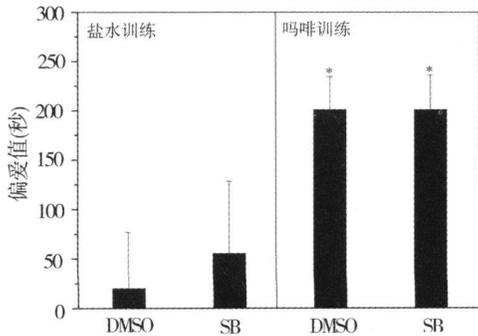


图 4 双侧 NA cSh 内注射 SB334867 对吗啡 CPP 建立的影响 (均值 ± 标准误)

注: * $p < 0.05$ 与盐水训练 DMSO 处理组比较。

说明 OXR1 并不参与此过程, 然而, NA c 内以 OXR2 为多 (Cheruy et al., 2002), 因此上述结果还不能说明 NA cSh 内的 orexin 不参与吗啡 CPP 建立过程。由于尚无 OXR2 拮抗剂, 本实验直接向 NA cSh 注射 OXR 激动剂 orexin A (与两种类型受体都结合), 考察其对吗啡 CPP 建立的影响。此时大鼠经过吗啡训练和盐水训练各 2 天, 交替进行, 每次训练前向双侧 NA cSh 内注射 orexin A, 结果如图 5 所示。盐水训练 saline 处理组 10 只, orexin A 处理组 9 只; 吗啡训练 saline 处理组 13 只, 低剂量 orexin A 处理组 14 只, 中剂量 orexin A 处理组 13 只, 高剂量 orexin A 处理组 9 只动物进入统计。one-way ANOVA 分析发现各组大鼠对伴药侧箱体的偏爱值存在显著的组间差异, $F(5, 62) = 3.05, p < 0.05$ 其中, 无论是否接受 orexin A 注射, 经过吗啡训练的各组动物均

形成了明显的吗啡 CPP(如图: $p < 0.05$ 或 0.01 , 与盐水训练 saline处理组比较), 而 NA cSh 内给以低、中、高剂量 orexin A 并未明显影响吗啡 CPP的建立 ($p > 0.05$ 与吗啡训练 saline处理组比较) (Post Hoc LSD 检验)。

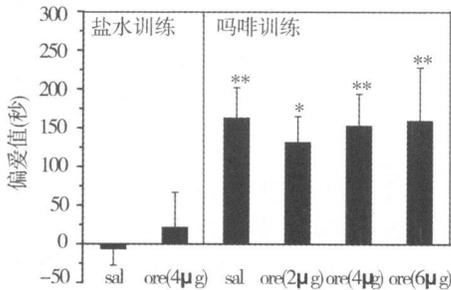


图5 双侧 NA cSh 内注射 orexin A 对吗啡 CPP 建立的影响 (均值 ± 标准误)

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 与盐水训练 saline处理组比较。

CPP训练过程中,大鼠的自发活动性(水平运动距离)同时被记录下来。图6显示2天的吗啡训练中,NA cSh内给予 orexin A 对大鼠运动性的影响。oneway ANOVA 分析发现,第1天训练中各组大鼠的运动距离有显著差异, $F(5, 62) = 3.51$, $p < 0.05$ 。PostHoc LSD 检验进一步表明,盐水训练 saline处理组动物的运动距离显著高于吗啡训练 saline处理组 ($p < 0.05$),说明第一次吗啡注射后的45min内大鼠的自发活动性明显降低。orexin A 处理的盐水训练组动物的运动距离高于其 saline处理组,但未达到显著水平 ($p > 0.05$)。而 orexin A 处理的吗啡训练组动物的运动距离也高于其 saline处理组,但均未达到显著水平 ($p > 0.05$);第2天训练中各组大鼠运动距离的差异接近显著 ($F(5, 62) = 2.75$, $p = 0.08$), PostHoc LSD 检验显示,吗啡训练大鼠中的 orexin A (2, 4μg)处理组和 saline处理组之间运动距离的差异接近显著 ($p = 0.06$),说明 orexin A 增加了吗啡训练大鼠的自发活动性,且各剂量 orexin A 处理组之间无明显差异,即不存在剂量效应关系。其余组间的差异均不显著。以上结果表明,尽管 NA cSh内注射 orexin A 对吗啡 CPP建立无影响,但能够增加大鼠的自发活动性,尤其是吗啡训练大鼠的运动性。

4 讨论

本研究采用吗啡诱导大鼠建立条件性位置偏爱(CPP)的行为模型初步考察与比较了 VTA 和 NA cSh内 orexin在吗啡奖赏中的作用。结果发现,VTA

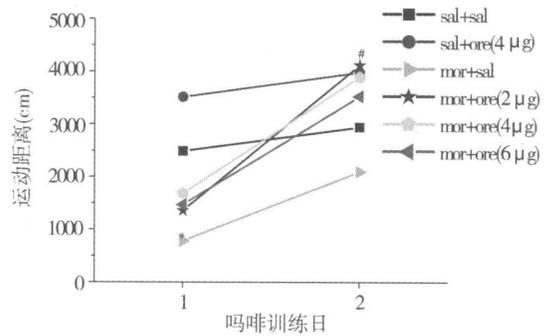


图6 双侧 NA cSh 内注射 orexin A 对吗啡 CPP 训练中大鼠水平运动距离的影响

注: * $p < 0.05$ 与盐水训练 saline处理组比较; # $p = 0.06$ 与吗啡训练 saline处理组比较。

内给以 OXR1 选择性拮抗剂 SB334867 可抑制吗啡 CPP 建立, 而 NA cSh 内给以 SB334867 或 orexin A 均不影响吗啡 CPP 建立, 但 NA cSh 内给以 orexin A 可增加大鼠的自发活动性。可见, VTA 和 NA cSh 两个核团内的 orexin 在吗啡奖赏中的作用有所不同。

VTA 是吗啡等阿片类药物发挥奖赏和强化效应所必需的核团。本实验中双侧 VTA 内给予 OXR1 拮抗剂 SB334867 抑制了吗啡 CPP 建立, 并存在剂量效应关系, 当给以 5μg 的 SB334867 时达到显著性水平, 这与 Narita 等人的研究结果一致, 即 VTA 内注射 SB334867 抑制吗啡 CPP 建立 (Narita et al., 2006)。关于 orexin 通过 VTA 参与吗啡奖赏过程的神经机制, Narita 等 (Narita et al., 2006) 认为, orexin 可调节药物的奖赏效应, 证据是 orexin 能兴奋 VTA 的 DA 神经元 (Korotkova, Sergeeva, Eriksson, Haas & Brown, 2003), VTA 内给予 orexin A 可增加 NA c 内 DA 水平, 而阻断 VTA 内 OXR1 则减少吗啡诱导的 NA c 内 DA 释放, 因而, orexin 增加 VTA 内 DA 神经元活动以及 NA c 内 DA 释放可能是吗啡产生强烈奖赏效应的神经基础之一 (Narita et al., 2006)。而 VTA 内给予 OXR1 拮抗剂就阻断了 orexin 的作用, 减弱了吗啡的奖赏效应, 从而抑制了吗啡 CPP 建立。然而, 目前也存在其他的解释。CPP 是基于经典条件反射原理建立的行为模型, 除了药物的奖赏效应这一必备要素, 条件化学习过程 (奖赏与环境线索之间连接) 也是 CPP 建立的另一必备条件。已有研究发现, orexin A 通过 VTA 参与药物奖赏和环境线索关联学习的过程, 因为只有当在训练箱中注射吗啡才能激活外侧下丘脑的 orexin 神经元, 而在饲养笼中注射吗啡则不能激活外侧下丘脑内 orexin 神经元, 即只有当药物和环境线索匹配出现时 orexin

神经元才被激活;而化学损毁一侧外侧下丘脑的 orexin 神经元和药理性封闭对侧 VTA 内 OXR1(即切断外侧下丘脑-VTA 的 orexin 传递)则显著抑制了吗啡 CPP 建立(Harris et al., 2007)。该研究说明, orexin 可能通过 VTA 参与药物奖赏诱导的条件化习得过程。若阻断 VTA 内 orexin 的作用,如拮抗 OXR1 条件化学习过程受损,则吗啡 CPP 无法建立。事实上,体外研究已发现 orexin A 能够诱导 VTA 内 DA 神经元上谷氨酸受体介导的突触可塑性增强,而 SB334867 可阻断可卡因诱导的 VTA 神经元上的突触可塑性增强(Bogland, Taha, Sarti, Fields, & Bonci, 2006)。成瘾药物反复作用导致 VTA 内发生持久的神经可塑性变化,是成瘾行为建立的重要神经基础(Thomas & Malenka, 2003),而 orexin 参与突触可塑性(学习过程的重要神经机制)这一发现为支持 orexin 参与条件化习得过程提供了直接证据。由此可见,在 VTA 内,orexin 除了促进成瘾药物的奖赏效应,也参与了药物作用下发生的神经可塑性改变,这都可能促进了药物的强化效应,从而参与成瘾行为的建立。

在本实验结果条件下没有发现 NAcSh 内的 orexin 参与吗啡 CPP 建立。由于 NAcSh 内 OXR1 较少,orexin 可能主要通过 OXR2 发挥作用,而目前尚无 OXR2 选择性拮抗剂可用,因此,我们选择直接观察 NAcSh 内注射 orexin A 对吗啡 CPP 的影响。随成瘾药物使用剂量、训练次数以及训练时间等条件的不同,动物建立起位置偏爱的程度在一定范围内有强弱之别,我们的前期探索表明本文中采用的吗啡训练程序所建立的 CPP 仍有上升空间,尤其只接受 2 次吗啡训练所建立的 CPP。若 NAcSh 内 orexin 参与吗啡 CPP 建立,那么给以 orexin A 将能够增加 CPP 的强度。然而本实验未得到这样的发现,结合前述 NAcSh 内 SB334867 也不影响吗啡 CPP 建立的结果说明,orexin 在 NAcSh 内可能既不调节吗啡的奖赏效应,也不参与奖赏和环境线索连接学习的过程。尽管前期的研究证明 NAcSh 内 DA 受体激活为吗啡 CPP 建立所必需(Di Chiara et al., 2004),而且在 NAcSh 内 orexin A 与 DA 受体激动剂有协同效应,即 orexin A 能够增强 NAcSh 单侧注射 D1 和 D2 受体激动剂联合应用所诱导的大鼠旋转行为(turning behavior)(Kotani, Ikeda, Koshikawa, & Cook, 2008),但显然 NAcSh 内 orexin A 对 DA 受体活动的这种调控作用与吗啡 CPP 建立无关。

然而,我们发现 NAcSh 内给予 orexin A 可增加

大鼠的运动性,这与他人的研究结果一致(Thorpe & Kotz, 2005),而且,本研究还发现 orexin A 增加了吗啡处理大鼠的活动性。在吗啡初期使用时(如本实验),其镇静效应明显,吗啡处理大鼠的运动性不及盐水处理的动物高,但 orexin A 能够部分抵消甚至显著提高吗啡处理大鼠的运动性,orexin A 的这一行为效应有可能是对 NAcSh 内 DA 传递发挥调控作用的体现,如,协同 DA 受体的活动,因为吗啡能够间接激活 VTA 内 DA 神经元,增加 NAcSh 内 DA 释放。而且,NAcSh 内 orexin A 增加运动性的作用极可能是通过 OXR2 而非 OXR1 实现的,因为他人的研究已证明,OXR1 拮抗剂 SB334867 不能影响上述 orexin A 的运动兴奋效应(Kotani et al., 2008; Thorpe & Kotz, 2005),而 NAcSh 内给予 orexin B(与 OXR2 的亲和力远高于 OXR1)也能够增强 DA 受体激动剂诱发的旋转行为(Kotani et al., 2008)。

目前,NAcSh 内的 orexin 在药物成瘾行为中究竟扮演何种角色尚无定论,至少本研究表明其并不参与药物奖赏的条件化过程。值得一提的是,几乎所有的成瘾药物都具有精神运动(psychomotor)兴奋效应,即药物诱发的活动性(locomotor activity)增加(依赖于 NAc 内 DA 传递增加)(Wise & Bozarth, 1987),且反复接触药物后动物对药物的精神运动兴奋效应的敏感性增加,即行为敏感化,被认为是药物成瘾的特征性行为(Vanderschuren & Kalivas, 2000)。实际上,最近的研究已发现,慢性应用可卡因后(形成了行为敏感化),大鼠 NAcSh 内 OXR2 蛋白水平长期处于上调状态,预示着长期用药使得 NAcSh 内 orexin 的传递系统发生适应性改变,因而有可能是行为敏感化表达的关键机制(Zhang, Mao, Liu, & Wang, 2007)。已知在 VTA 内反复注射 OXR1 拮抗剂 SB334867 可抑制可卡因诱导的行为敏感化形成,但测试前给以 SB334867 不影响行为敏感化的表达(Bogland et al., 2006)。大量的实验证据表明,VTA 是成瘾药物诱导行为敏感化形成的关键核团,而敏感化效应的表达和维持则与 NAc 关系更密切(Vanderschuren & Kalivas, 2000)。因此,NAcSh 内的 orexin A 增加动物的活动性极可能有着行为层面的意义。也许,orexin 在 NAc 内的作用与成瘾药物诱导的行为敏感化的表达有关,而这还需实验的进一步证实,也为今后的研究方向提供了线索。

参 考 文 献

- Borghland S. L., Taha S. A., Sartj F., Fields H. L., & Bonci A. (2006). OrexinA in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron*, 49 (4), 589–601.
- Chideay, J. E., Harrison D. C., & Hervieu G. J. (2002). Protein distribution of the orexin2 receptor in the rat central nervous system. *Regulatory Peptides*, 104 (1–3), 131–144.
- De Lecea L., Kilduff T. S., Peyron C., Gao X. B., Foye P. E., Danielson P. E., et al (1998). The hypocretins: Hypothalamic specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (1), 322–327.
- Di Chiara G., Bassareo V., Fenu S., De Luca M. A., Spina L., Cadoni C., et al (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47 (Suppl 1), 227–241.
- DiLeone R. J., Georgescu D., & Nestler E. J. (2003). Lateral hypothalamic neuropeptides in reward and drug addiction. *Life Sciences*, 73 (6), 759–768.
- Fadel J., & Deuth, A. Y. (2002). Anatomical substrates of orexin/dopamine interactions: Lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 111 (2), 379–387.
- Georgescu D., Zachariou, V., Barrot M., Medina M., Willie J. T., Eisch, A. J., et al (2003). Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *Journal of Neuroscience*, 23 (8), 3106–3111.
- Harris G. C., Wimmer M., Randall-Thompson, J. F., & Astor Jones G. (2007). Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. *Behavioural Brain Research*, 183 (1), 43–51.
- Kelley A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27 (8), 765–776.
- Konikova T. M., Sergeeva O. A., Eriksson K. S., Haas H. L., & Brown, R. E. (2003). Excitation of ventral tegmental area dopamine and nondopamine neurons by orexins/hypocretins. *Journal of Neuroscience*, 23 (1), 7–11.
- Kotani A., Ikeda H., Koshikawa N., & Coolidge A. R. (2008). Role of orexin receptors in the nucleus accumbens in dopamine dependent turning behaviour of rats. *Neuropharmacology*, 54 (3), 613–619.
- Narita M., Naguma Y., Hashimoto, S., Narita M., Khotik J., Miyatake M., et al (2006). Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *Journal of Neuroscience*, 26 (2), 398–405.
- Peyron C., Tighe D. K., van den Pol A. N., de Lecea L., Heller H. C., Sutcliffe J. G., et al (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *Journal of Neuroscience*, 18 (23), 9996–10015.
- Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R. M., Tanaka H., et al (1998). Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92 (4), 573–585.
- Siegel J. M. (2004). Hypocretin (orexin): Role in normal behavior and neuropathology. *Annual Review of Psychology*, 55, 125–148.
- Thomas M. J., & Malenka R. C. (2003). Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358 (1432), 815–819.
- Thorpe A. J., & Kotz C. M. (2005). Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity. *Brain Research*, 1050 (1–2), 156–162.
- Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, 56, 613–672.
- Vanderschuren L. J., & Kalivas P. W. (2000). Alterations in dopamine and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 151 (2–3), 99–120.
- Wise R. A., & Bozarth M. A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological Review*, 94 (4), 469–492.
- Zhang G. C., Mao, L. M., Liu X. Y., & Wang J. Q. (2007). Long-lasting upregulation of orexin receptor type 2 protein levels in the rat nucleus accumbens after chronic cocaine administration. *Journal of Neurochemistry*, 103 (1), 400–407.

The Roles of Orexins in the Nucleus Accumbens and Ventral Tegmental Area on Reward-Associated Behavior Induced by Morphine

BAI Yun-Jing^{1, 2}, HAN Jin^{1, 2}, LI Yong-Hui¹, HUANG Yan-Bei^{1, 2}, YANG Xiao-Yan¹, SU IN an¹

(¹ The Key Lab of Mental Health, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100087, China)

Abstract

Orexins are neuropeptides produced by the hypothalamus. Orexin neurons have extensive projections to the mesolimbic dopamine system (MLSD) and are critically involved in drug addiction. The central nucleus of the MLSD, the ventral tegmental area (VTA) and nucleus accumbens (NAc), contain abundant orexinergic fibers and receptors. In the VTA, orexins are implicated in drug reward-elicited place preference and acquisition of behavioral sensitization. However, less study has been focused on the role of orexins in the NAc in drug reward by now. The present study aims to investigate the roles of orexins in the VTA and NAc in drug reward-associated behavior.

The development of conditioned place preference (CPP) induced by morphine was used to investigate the roles of orexins in the VTA and NAc in drug reward. The apparatus for the CPP was consisted of two distinctive compartments. The 135 male Wistar rats were alternatively treated with morphine (3mg/kg) or saline before conditioning training (45min), with one injection per day. Before three conditioning sessions with morphine, the OXR1 antagonist SB334867 was bilaterally microinjected into the VTA (Q1, 5 μ g) or NAcSh (Q1, 3 μ g). Before two conditioning sessions with morphine, orexin A (Q2, 4, 6 μ g) was bilaterally microinjected into the NAcSh. One-way ANOVA and Post Hoc LSD were used to reveal the difference among groups.

The results showed that the development of morphine CPP was inhibited when SB334867 was infused into the VTA and not affected when SB334867 was infused into the NAcSh. Orexin A microinjected into the NAcSh did not enhance or inhibit morphine CPP, but increased locomotor activity especially in the rats treated with morphine.

The present study demonstrated the different roles of orexins in the VTA and NAcSh in drug reward induced by morphine, indicating that orexins in these two brain regions might regulate the different aspects of addictive behavior.

Key words conditioned place preference; orexin; ventral tegmental area; nucleus accumbens; OXR1 antagonist