

## 戒断对吗啡依赖小鼠自发活动及场景性恐惧条件化表达的影响

宋 赠<sup>1</sup>, 宋 娟<sup>2</sup>, 欧阳新平<sup>1</sup>, 高 军<sup>1</sup>, 付爱文<sup>3</sup>, 田绍文<sup>1\*</sup>

(1. 南华大学医学院生理学教研室, 衡阳 421001; 2. 第二军医大学基础医学部神经生物学教研室, 上海 200433; 3. 山东省阳信县计划生育服务站, 阳信 251800)

**[摘要]** **目的:** 研究不同戒断期对吗啡依赖小鼠自发活动及场景性恐惧条件化表达的影响。**方法:** 以剂量递增法连续皮下注射(sc)盐酸吗啡7 d建立吗啡依赖小鼠模型, 随机分成吗啡戒断1 d、吗啡戒断7 d、吗啡戒断21 d组, 并设立生理盐水戒断1、7、21 d组作为对照, 每组12~13只。戒断后采用旷场实验观察小鼠自发活动(检测穿梭格数、直立次数、理毛时间、中央区活动时间、进入中央次数及外周时间等指标); 随后对小鼠进行场景性恐惧条件化, 并于24 h后进行恐惧反应(僵直)的检测。

**结果:** 与生理盐水对照组相比, 吗啡戒断1 d、7 d组小鼠的水平活动度( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ )和进入中央区次数( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ )明显降低; 戒断1 d组小鼠垂直运动也显著下降( $P < 0.001$ ); 吗啡戒断1 d组的理毛行为增加( $P < 0.05$ ); 但各吗啡戒断组的中央区、外周活动时间无显著差异。吗啡处理还选择性损害了戒断1 d组小鼠的场景性恐惧条件化表达( $P < 0.05$ )。

**结论:** 戒断早期降低了吗啡依赖小鼠部分自发活动, 同时损害了场景性恐惧条件化表达。

**[关键词]** 吗啡依赖; 物质戒断综合征; 自发活动; 恐惧

**[中图分类号]** R 971.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0385-04

### Effects of abstinence on locomotor activity and contextual fear conditioning in morphine-dependent mice

SONG Zeng<sup>1</sup>, SONG Juan<sup>2</sup>, OUYANG Xin-ping<sup>1</sup>, GAO Jun<sup>1</sup>, FU Ai-wen<sup>3</sup>, TIAN Shao-wen<sup>1\*</sup> (1. Department of Physiology, Medical College, Nanhua University, Hengyang 421001, China; 2. Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Service Station of Family Planning of Yangxin County, Yangxin 251800)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the impact of different abstinence periods on locomotor activity and contextual fear conditioning in morphine-dependent mice. **Methods:** Morphine hydrochloride was administrated (sc) to mice at a gradually increasing dose for 7 d to establish morphine-dependent model. After the last injection, animals were divided into MW1 d (Morphine Withdrawal for 1 d), MW7 d, MW21 d, SW1 d (Saline Withdrawal for 1 d), SW7 d and SW 21 d groups randomly; the spontaneous activities of mice, including the numbers of crossing and rearing, grooming times, the number of center entries and time spent in center area, and the time spent in peripheral area, were observed in the open field box after different periods of abstinence. After the observation, the mice were trained using eight unconditioned stimulus (0.5 s; 0.5 mA foot shock) and contextual fear conditioning was tested 24 h later. **Results:** The times of crossing and center entries decreased in MW1 d and MW7 d mice (W1 d;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ; W7 d;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ); the time of rearing in MW1 d group was also decreased significantly ( $P < 0.001$ ); mice in MW1 d group had more grooming behaviors ( $P < 0.05$ ). The periods spent in the center and peripheral areas were not significantly different between all the 3 morphine-dependent groups and their corresponding saline withdrawal groups. In addition, a history of morphine injection selectively impaired the contextual fear conditioning in mice of MW1 d group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** During the early period of morphine abstinence, mice have a decreased spontaneous activity and an impaired contextual fear conditioning.

**[KEY WORDS]** morphine dependence; substance withdrawal syndrome; spontaneous activity; fear

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 385-388]

慢性吗啡处理可导致成瘾, 并引起大脑结构与功能的不可逆改变, 对人类造成严重威胁。然而治疗成瘾效果甚微, 每年阿片类药物用药人数有增无减。其中一个重要因素与停药后(戒断)所出现厌恶性躯体、情感及认知功能障碍有关。因此, 探究慢性吗啡处理及戒断所导致的行为、神经生物学改变将有助于治疗阿片类药物成瘾。

早期实验证实, 在研究慢性吗啡处理及其戒断对大鼠焦虑行为影响过程中, 高架十字迷宫模型缺

**[基金项目]** 湖南省教育厅优秀青年基金(05B045). Supported by Outstanding Youth Foundation of the Hunan Education Department (05B045).

**[作者简介]** 宋 赠, 硕士. E-mail: songzeng115@126.com

\* Corresponding author. E-mail: tswneuro@126.com

乏有效性<sup>[1]</sup>。另有研究表明,吗啡处理5 d后,戒断1 d使自发活动轻度下降,戒断3、5 d时自发活动没有显著变化<sup>[2]</sup>。然而利用旷场实验研究戒断期间动物焦虑样行为变化,以及长期戒断对自发活动影响,目前尚无文献报道。尼古丁戒断可导致人类认知功能缺乏<sup>[3]</sup>;且动物实验也表明,慢性尼古丁处理后的戒断导致水平运动活性下降,同时损害了小鼠场景性恐惧条件化<sup>[4]</sup>;另外,慢性吗啡处理损害了戒断1 d和戒断7 d后的单次电击模式下场景性恐惧条件化表达,而对戒断21 d的没有影响<sup>[5]</sup>。但目前尚未见多次电击模式下戒断对恐惧条件化表达影响的报道。

本研究首先利用旷场实验检测不同戒断期对小鼠自发活动的影响;随后采用多次电击模式建立恐惧条件化,探讨不同戒断期对场景性恐惧条件化表达的影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 动物 雄性昆明小鼠72只,体质量30~35 g,由南华大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(湘)2003-0009。实验前动物放在动物房内适应3 d,每天抓取1次。室温25~26℃,整个实验过程中自由饮水及摄食。

1.1.2 装置 自发活动实验箱(上海吉量软件科技有限公司生产):40 cm×40 cm×40 cm,箱底分成16个面积为10 cm×10 cm小格。恐惧条件化装置:40 cm×40 cm×40 cm实验箱,地板由25根直径5 mm铜杆平行排列组成,并通过导线与电脑相连,电刺激强度、频率由电脑程序控制。两种实验箱都配有视频采集系统,可对实验过程进行同步录像。装置放在隔音室内。

1.1.3 药品 盐酸吗啡注射液:沈阳第一制药厂产品,批号:H21022436。

#### 1.2 方法

1.2.1 小鼠吗啡依赖模型的建立 将动物随机分为6组:吗啡戒断1 d组、吗啡戒断7 d组、吗啡戒断21 d

组、生理盐水戒断1 d组、生理盐水戒断7 d组和生理盐水戒断21 d组,每组12~13只。吗啡组皮下注射(sc)盐酸吗啡稀释液,每天2次(8:00,20:00),连续6 d,第7天,上午8:00注射1次,递增式剂量(单位:mg·kg<sup>-1</sup>):10,20;20,30;30,40;40,50;50,60;60,70;70<sup>[6-7]</sup>。生理盐水组注射等体积的生理盐水,其他步骤同。末次给药24 h后观测戒断症状:15 min内湿狗样抖动、跳跃和打洞(逃避反应)次数;15 min内各组出现上睑下垂、腹泻和前爪颤的动物数;戒断24 h前后体质量变化<sup>[8]</sup>。戒断症状评分参考文献<sup>[9]</sup>。

1.2.2 自发活动检测 戒断1 d、戒断7 d、戒断21 d组分别于末次给药后的d1、d7、d21进行自发活动检测。实验时将单只小鼠放于箱底中央,录像40 min。记录40 min内小鼠的穿梭格数(个),直立次数(次),理毛时间(秒),中央区活动时间(秒),进入中央区次数(次)和外周活动时间(秒)。

1.2.3 恐惧条件化及僵直行为检测 戒断1 d、戒断7 d、戒断21 d组分别于末次给药后的d1、d7、d21进行恐惧条件化。实验时将小鼠放在铜杆地板上,接受8次不可逃避的足部电击,电流强度0.5 mA,间隔(40±20)s,前2 min没有电击,总时间10 min左右。24 h后将动物再次置于与接受电击完全相同的实验装置中,不予电击,观察10 min并录像。记录10 min内的僵直时间。僵直的判断标准:除呼吸相关运动以外,动物所处的静止状态。

1.3 统计学处理 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用SPSS 11.0统计软件做组间t检验和方差分析(ANOVA)。

### 2 结果

2.1 戒断症状 如表1所示,戒断24 h后,吗啡组动物的戒断症状:湿狗样抖动、跳跃次数,各组出现上睑下垂、腹泻和前爪颤的动物数与对照组比较都有显著性增高( $P < 0.05$ );同时,体质量下降的数值也显著多于生理盐水对照组( $P < 0.001$ )。由此可知,本实验所建立的吗啡依赖模型是成功的。

表1 吗啡依赖小鼠的戒断症状

Tab 1 Abstinence symptoms in morphine-dependent mice

(n=8)

| Group          | Response time |                |                | Number of responding animals |          |                | Weight loss (m/g) |
|----------------|---------------|----------------|----------------|------------------------------|----------|----------------|-------------------|
|                | Jumping       | Wet-dog shakes | Escape digging | Ptosis                       | Diarrhea | Forepaw tremor |                   |
| Saline control | 0.33±0.16     | 0.66±0.18      | 0.44±0.20      | 0/8                          | 0/8      | 0/8            | 0.22±0.12         |
| Abstinence     | 12.74±2.29*** | 9.04±1.25*     | 0.50±0.26      | 5/8**                        | 7/8***   | 7/8***         | 0.61±0.30***      |

\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs saline control group

2.2 自发活动结果 慢性吗啡处理与各自生理盐水组相比,穿梭格子数在戒断 1 d、7 d 组显著降低 ( $P < 0.001$  或  $< 0.001$ );戒断 21 d 时差异无统计学意义。而且,随着戒断期的延长,慢性吗啡处理动物穿梭格子数呈线性增高,说明随着戒断期的延长,水平活动度逐渐恢复(图 1A)。吗啡戒断 1 d 组小鼠直立行为与生理盐水对照组间相比有显著差异 ( $P < 0.001$ );而吗啡戒断 7 d 和戒断 21 d 组两者之

间无显著差异(图 1B)。理毛行为只有在戒断 1 d 时,吗啡戒断组明显多于生理盐水对照组 ( $P < 0.05$ ,图 1C)。进入中央区次数,吗啡戒断 1 d、戒断 7 d 组明显低于生理盐水对照组 ( $P < 0.001, P < 0.05$ );而吗啡戒断 21 d 组与生理盐水对照组无显著差异(图 1D)。外周活动时间和中央区活动时间在吗啡戒断组与生理盐水对照组间无显著差异(图 1E、1F)。

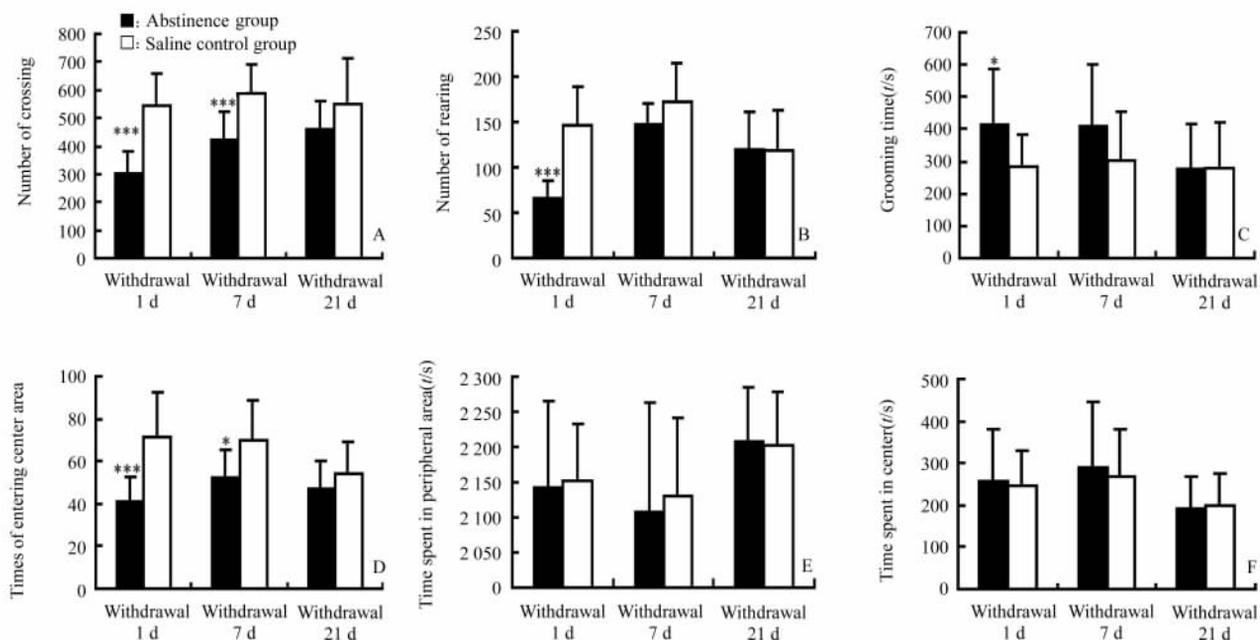


图 1 不同戒断期后的自发活动比较

Fig 1 Comparison of spontaneous activity after different withdrawal period

A: Crossing; B: Rearing; C: Grooming; D: Times of center entries; E: Time spent in peripheral area; F: Time spent in center area; \* \* \*  $P < 0.001$ , \*  $P < 0.05$  vs saline control group;  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 场景性恐惧条件化表达 吗啡戒断 1 d 组僵直百分比显著低于对照组 ( $P < 0.05$ );吗啡戒断 7 d 和戒断 21 d 组对比对照组无显著差异(图 2)。吗啡戒断组场景性恐惧条件化后的僵直百分比呈线性升高。经双因素方差分析,药物处理(吗啡或生理盐水)存在显著主效应 [ $F_{(1,83)} = 6.983, P < 0.01$ ];但药物处理与戒断期间不存在显著的交互效应 [ $F_{(2,83)} = 0.727$ ]。

与对照组间的差异减少,甚至消失。在利用恐惧条件化模型检测戒断对学习记忆能力影响的实验中,发现类似的变化曲线,即戒断 1 d 时僵直时间显著低于对照组,至 7 d、21 d 时已无显著差异,且表现为上升曲线。

### 3 讨论

本实验的主要发现是慢性吗啡处理后戒断降低了小鼠自发活动,表现为穿梭格子数和直立次数减少,进入中央区次数减少。这说明戒断不仅导致水平运动活性和探究行为能力降低,同时还增加了受试动物的恐惧焦虑感。至于戒断初期(戒断 1 d)理毛时间增多,则是戒断初期戒断症状的一种显著表现指标。另外,实验还发现戒断期延长(7 d 或 21 d)时,戒断组

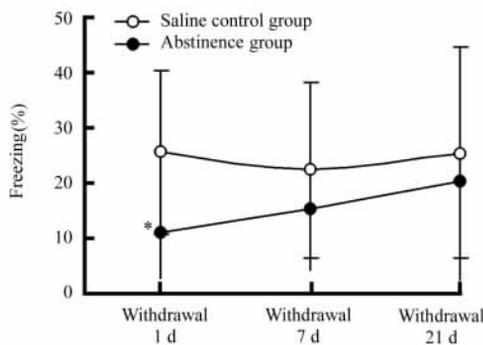


图 2 不同戒断期后僵直行为

Fig 2 Freezing behavior after different withdrawal periods

\*  $P < 0.05$  vs saline control group;  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

旷场实验是观察动物自然状态下活动状况的动物模型,目前广泛用于评价药物对机体精神神经系统的影响(例如兴奋性、抑制性)。从本实验结果,对比对照组,戒断1 d、戒断7 d时进入中央区次数降低,而戒断21 d时无差异,证实旷场实验可以作为研究阿片戒断对焦虑样行为影响的有效模型。而先前实验表明利用高架十字迷宫并不能有效检测戒断对焦虑行为的影响<sup>[1]</sup>,再次说明两种模型涉及不同的神经机制。

另外,本实验结果表明戒断早期(1 d、7 d)吗啡组水平活动度降低,表现为穿梭格子数下降,这似乎与戒断早期(1 d)吗啡组动物僵直时间百分比显著下降矛盾。然而,事实并非如此,通过对实验录像的分析,实验人员发现戒断早期吗啡组动物水平活动度下降并没有导致僵直行为的升高,而是将更多的时间用于其他行为表现。实验结果中戒断1 d时吗啡组动物理毛时间显著增多,就是很好的证据。戒断7 d时尽管对比对照组无显著差异,依然表现为理毛时间增多。

关于不同戒断期对慢性吗啡处理动物僵直行为的影响,本实验结果表明只有戒断1 d时显著损害了啡组场景性恐惧条件化表达,而 McNally 等<sup>[5]</sup>研究表明戒断1 d和戒断7 d都显著损害了恐惧的表达,这种差异有可能是由动物品系(大、小鼠)、慢性给药方式和药物剂量、恐惧条件化模式(单次、多次电击)等方法学上的差异引起的。

大量研究表明,慢性吗啡处理及其戒断可导致神经元的损毁及神经可塑性的改变<sup>[10]</sup>,长期戒断导致NAc壳核中的中等棘突神经元和前额叶及顶叶锥体细胞的树突数量及其分支减少和海马中某些亚结构受损。同时,慢性吗啡处理及其戒断还可从细胞、分子水平导致许多信号通路及相关分子的改变,如慢性吗啡处理后的cAMP系统的适应性上调<sup>[11-12]</sup>,大脑皮质和纹状体中MEK1/2磷酸化水平改变<sup>[13]</sup>,内源性阿片受体的去敏感化和内化<sup>[14]</sup>。另外,吗啡处理后的戒断可改变中枢神经系统中成瘾相关脑区(如VTA,NAc,Lc)中的胞外神经递质浓度,包括多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)浓度下降,去甲肾上腺素(NE)、谷氨酸(Glu)升高等<sup>[2,15-16]</sup>。因此,从细胞分子水平探讨戒断对自发活动及恐惧条件化作用机制,将更有利于阐明阿片类成瘾的神经机制,这也是本实验室下一步的工作重点。

## [参考文献]

[1] Grasing K, Wang A, Schlussman S. Behavioral measures of

anxiety during opiate withdrawal [J]. Behav Brain Res, 1996, 80(1-2):195-201.

- [2] Airio J, Ahtee L. Role of cerebral dopamine and noradrenaline in the morphine-induced locomotor sensitisation in mice [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1997, 58:379-386.
- [3] Snyder F R, Davis F C, Henningfield J E. The tobacco withdrawal syndrome: performance decrements assessed on a computerized test battery [J]. Drug Alcohol Depend, 1989, 3:259-266.
- [4] Davis J A, James J R, Siegel S J, et al. Withdrawal from chronic nicotine administration impairs contextual fear conditioning in C57BL/6 mice [J]. J Neurosci, 2005, 25:8708-8713.
- [5] McNally G P, Westbrook R F. Anterograde amnesia for Pavlovian fear conditioning and the role of one-trial overshadowing: effects of preconditioning exposures to morphine in the rat [J]. J Exp Psychol Anim Behav Process, 2003, 29: 222-232.
- [6] Wang H L, Zhao Y, Xiang X H, et al. Blockade of ionotropic glutamatergic transmission in the ventral tegmental area attenuates the physical signs of morphine withdrawal in rats [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2004, 28:1079-1087.
- [7] Chou W B, Zeng Y M, Duan S M, et al. M2 muscarinic receptor of spinal cord mediated increase of nNOS expression in locus coeruleus during morphine withdrawal [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23:691-697.
- [8] Sekiya Y, Nakagawa T, Ozawa T, et al. Facilitation of morphine withdrawal symptoms and morphine-induced conditioned place preference by a glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2004, 485(1-3): 201-210.
- [9] Maldonado R, Negus S, Koob G F. Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -selective opioid antagonists [J]. Neuropharmacology, 1992, 31: 1231-1241.
- [10] Nestler E J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction [J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2: 119-128.
- [11] De Vries T J, Shippenberg T S. Neural systems underlying opiate addiction [J]. J Neurosci, 2002, 22: 3321-3325.
- [12] Chao J, Nestler E J. Molecular neurobiology of drug addiction [J]. Annu Rev Med, 2004, 55: 113-132.
- [13] Asensio V J, Miralles A, Garcia-Sevilla J A. Stimulation of mitogen-activated protein kinase kinases (MEK1/2) by  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptor agonists in the rat brain: regulation by chronic morphine and opioid withdrawal [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 539(1-2):49-56.
- [14] Pei G, Kieffer B L, Lefkowitz R J, et al. Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C [J]. Mol Pharmacol, 1995, 48: 173-177.
- [15] Guo M, Xu N J, Li Y T, et al. Morphine modulates glutamate release in the hippocampal CA1 area in mice [J]. Neurosci Lett, 2005, 381(1-2): 12-15.
- [16] Sepulveda M J, Hernandez L, Rada P, et al. Effect of precipitated withdrawal on extracellular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an *in vivo* microdialysis study [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1998, 60:255-262.

[收稿日期] 2006-11-10

[修回日期] 2007-03-06

[本文编辑] 尹 茶