

80 Hz 电刺激伏隔核对吗啡诱导的大鼠条件性位置偏爱行为形成的影响

杨文进,周晓平*,胡小吾,姜秀峰,曹依群

(第二军医大学长海医院神经外科,上海,200433)

[摘要] **目的:**探讨 80 Hz 电刺激伏隔核对吗啡诱导的大鼠条件性位置偏爱形成的影响。**方法:**雄性 SD 大鼠 30 只,随机分为吗啡-刺激组、吗啡-假刺激组、正常对照组,每组各 10 只。3 组大鼠分别在不同条件下进行条件性位置偏爱实验,其中吗啡-刺激组、吗啡-假刺激组分别进行预测试、手术、训练、刺激、测试 5 个阶段实验,正常对照组进行预测试、手术、训练、测试 4 个阶段实验;在训练阶段,吗啡-刺激组和吗啡-假刺激组每天交替注射吗啡和生理盐水各 1 次,正常对照组每天注射 2 次生理盐水;在刺激阶段,吗啡-刺激组采用 80 Hz 电刺激伏隔核,吗啡-假刺激组不刺激伏隔核。分别记录预测试和测试阶段 3 组大鼠在白箱内平均停留时间,并给予比较。**结果:**吗啡-假刺激组训练后,在白箱内平均停留时间明显长于训练前和同期的正常对照组 ($P < 0.01$),吗啡诱导的心理依赖模型建立成功。吗啡-刺激组在伏隔核刺激条件下完成条件性位置偏爱训练后,在白箱停留时间长于吗啡-假刺激组 ($P < 0.01$),表明电刺激伏隔核显著强化了大鼠的觅药行为。**结论:**80 Hz 电刺激大鼠双侧伏隔核可明显地促进吗啡诱导的位置偏爱行为的形成,表明该频率电刺激可强化吗啡诱导的心理依赖。

[关键词] 伏核;条件性位置偏爱;吗啡;电刺激**[中图分类号]** R 749.611 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1336-04

80 Hz electrical stimulus to nucleus accumbens influencing the formation of conditioned place preference induced by morphine in rats

YANG Wen-jin, ZHOU Xiao-ping*, HU Xiao-wu, JIANG Xiu-feng, CAO Yi-qun (Department of Neurosurgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the influence of 80 Hz electrical stimulus to nucleus accumbens (NAc) on the formation of conditioned place preference (CPP) induced by morphine in rats. **Methods:** Thirty male SD rats were evenly randomized into 3 groups: the morphine stimulation group, morphine-fake stimulation group, and normal control group. The CPP test was carried out under different situations in 3 groups. Five steps were included in the morphine stimulation and morphine-fake stimulation groups, namely, the pre-test, surgery, training, stimulation or fake stimulation, and test steps. Four steps were included in the control group, namely, the pre-test, surgery, training, and test steps. During the training step, rats in morphine stimulation group and morphine-fake stimulation were respectively injected with morphine and normal saline by turns everyday, and those in normal control group were injected with normal saline twice a day. During the stimulation step, 80 Hz electrical stimulus was applied to the NAc in the morphine stimulation group and the fake-stimulation group received no stimulation. The average stay periods in the white case during the period of pre-test and test were recorded and compared in the 3 groups. **Results:** The average stay in the white case of morphine-fake stimulation group was longer than that before training and that of the saline control group at the same step ($P < 0.01$), suggesting that the model of morphine-induced psychological dependence was successfully established. The average stay of morphine stimulation group was longer than that of morphine-fake stimulation group ($P < 0.01$), indicating that the electrical simulation greatly enhanced the drug-seeking behaviors of rats. **Conclusion:** 80 Hz electrical stimulation of bilateral NAc can obviously promote the formation of morphine-induced CPP behaviors in rats, indicating that the morphine-induced psychological dependence is strengthened under 80 Hz electrical stimulus.

[KEY WORDS] nucleus accumbens; conditioned place preference; morphine; electrical stimulation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1336-1339]

中脑边缘多巴胺系统是阿片类药物引起精神依赖的轴心部位,一切药物成瘾的神经生理学基础。中脑边缘多巴胺能神经元胞体集中在中脑腹侧被盖区,纤维主要投向伏隔核(NAc)。现在普遍认为 NAc 是造成药物心理依赖的关键所在^[1]。本实验使用电极刺激成瘾大鼠的 NAc,通过条件性位置偏爱实验,观察大鼠位置偏爱行为的变化,来探讨 80

Hz 频率电刺激 NAc 对大鼠觅药行为的影响。

[基金项目] 国家自然科学基金(30471776)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30471776)。**[作者简介]** 杨文进,硕士生, E-mail: yangwenjin@126.com

* Corresponding author. E-mail: zhouxpk@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 30 只(第二军医大学实验动物中心提供), 体质量 220~260 g, 随机分为吗啡-刺激组、吗啡-假刺激组、正常对照组, 每组各 10 只。饲养于控湿、控温动物室, 自由进食、饮水。

1.2 条件性位置偏爱实验(conditioned place preference, CPP)

1.2.1 实验设备 条件性位置偏爱实验箱^[2]: 尺寸为 75 cm×30 cm×30 cm 木制箱体, 分为 A 和 B 两箱, 尺寸各为 30 cm×30 cm×30 cm, 两箱之间有小通道连接。其中 A 箱六面涂成黑色, 箱底为黑色且粗糙; B 箱六面涂成白色, 箱底为白色光滑, 且较 A 侧高 1 cm。B 箱顶部设置一 5 W 白炽灯。箱子两侧各有一个 8 cm×5 cm 的观察窗, 可由外向内观察大鼠行为。箱子侧壁安装一套光电计时系统, 用来记录大鼠在不同箱体中的累计停留时间。并将实验箱放入安静和通风的实验室中以避免噪音干扰。

1.2.2 实验方法 分为预测试阶段、手术阶段、训练阶段、刺激阶段和测试阶段 5 个部分。

(1) 预测试阶段: 将实验大鼠饲养在实验室 1 周, 使其熟悉实验室环境。在手术前 3 d 进行预测试, 每天 1 次, 每次 15 min。测试时将实验箱中间隔板打开, 大鼠放入中间过道内, 打开计时器分别记录大鼠在两箱内的累积停留时间。以此来确定大鼠的天然偏爱倾向, 并以非偏爱箱为伴药盒。

(2) 手术过程: 所有大鼠用 3% 戊巴比妥钠 60 mg/kg 腹腔注射麻醉后, 将大鼠固定在江湾 I 型 C 立体定向仪(第二军医大学制造)上, 门齿杆高度低于耳间线 3.0 mm, 取前囟为 0 点, 按照 Paxinos 和 Watson 大鼠脑立体定位图谱(1997 年第 3 版)确定 NAc 靶点坐标, 选择的电极末端植入坐标为前囟前 1.6 mm, 中线旁开 1.5 mm, 颅骨下 6.2 mm。消毒后切开头皮, 根据电极末端植入坐标在颅骨表面确定标记点, 颅骨钻孔 2 枚, 用电极末端刺破硬脑膜, 植入自制同轴不锈钢双极电极外套管, 其末端置于颅骨下 6.2 mm, 在颅骨表面另钻孔 4 枚, 拧入固定螺丝后, 涂牙科水泥固定电极外套管。术后休息 5 d。

(3) 训练阶段: 训练时将通道封闭, 每天训练 2 次, 对于吗啡-刺激组和吗啡-假刺激组, 一次在伴药盒内(背部皮下)注射盐酸吗啡, 一次在非伴药盒内(背部皮下)注射相同剂量的生理盐水, 两次注射间隔 8 h, 交替进行(如第 1 天早上注射吗啡, 下午为生

理盐水, 则第 2 天早上为生理盐水, 下午为吗啡, 依此类推)^[3,4], 每次注射后让大鼠在注射侧箱体活动 45 min, 然后取出置回饲养笼中。吗啡的起始剂量为 5 mg/kg, 每日 1 次, 第 2 天为 10 mg/kg, 以后每日递增 10 mg/kg, 最后达到 50 mg/kg, 共给药 6 d。正常对照组在训练阶段的 6 d 内, 每天注射两次相同剂量的生理盐水。

(4) 刺激阶段: 吗啡-刺激组大鼠在每日给药结束 4 h 后, 3% 戊巴比妥钠麻醉, 立体定向仪固定后, 拔出电极外套管帽子, 将电极内芯插进外套管内, 进入长度 15 mm 并固定, 使其下端超出外套管下端 2 mm 并固定。再将同轴不锈钢电极的两极分别接 JL-C2 型电刺激器输出端两极, 刺激大鼠双侧 NAc。刺激参数设定为: 强度 5 V, 波宽 0.2 ms, 频率 80 Hz。每天刺激 3 次, 每次刺激 10 min, 间隔 10 min, 重复 3 次, 连续 6 d。刺激结束后拔出电极内芯, 再用电极帽封盖电极外套管口。吗啡-假刺激组麻醉后, 进行如上操作, 但不给予刺激。

(5) 测试阶段: 在训练结束后第 2 天进行测试, 将中间通道打开, 让大鼠在两箱内自由穿梭。测试时间为 15 min, 分别记录 3 组大鼠在两箱内停留时间。为避免频繁的测试抑制大鼠的 CPP 行为, 分别选择在训练后的第 1、2、3、5、6、7、9、10 天进行 CPP 行为的测试观察^[5,6]。

1.3 组织学鉴定 实验结束后, 吗啡-刺激组和吗啡-假刺激组大鼠在戊巴比妥钠麻醉下, 心脏灌注 4% 多聚甲醛后取脑, 以穿刺点为中心, 60 μ m 冠状切片, 用 nissl 染色来观察, 双侧 NAc 区明显破坏或电极位置不正确的个体剔除。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数的显著性检验采用独立样本的 *t* 检验, 训练前后比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 组织学分析 伏隔核坐标范围: 前囟前 2.70~0.48 mm, 中线旁开 0.4~2.6 mm, 颅骨下 6.0~8.0 mm。实验中电极外套管采用的定位坐标: 前囟前 1.6 mm, 中线旁开 1.5 mm, 颅骨下 6.2 mm。3 组大鼠脑标本双侧 NAc 区未见明显破坏。

2.2 电刺激对吗啡诱导的条件性位置偏好行为形成的影响 CPP 训练后 1~10 d, 正常对照组大鼠在白箱内平均停留时间与训练前比较无明显变化。吗啡-假刺激组大鼠从 CPP 训练后第 2 天起, 在白箱平均停留时间均明显长于训练前($P < 0.01$), 从 CPP 训练后第 2 天起, 在白箱内平均停留时间均显著长

于同期的正常对照组 ($P < 0.01$)。表明吗啡诱导的心理依赖模型建立成功。吗啡-刺激组大鼠从训练后第 1 天起,在白箱停留时间均长于训练前 ($P < 0.01$)。吗啡-刺激组大鼠在 NAc 刺激条件下完成

CPP 训练后,在白箱停留时间均明显长于吗啡-假刺激组 ($P < 0.01$),表明电刺激 NAc 显著强化了大鼠的觅药行为。

表 1 3 组大鼠 CPP 训练前后在白箱内平均停留时间
Tab 1 Average stay in white case in 3 groups after CPP training

($n=10, \bar{x} \pm s, t/s$)

Time	Control group	Fake stimulation group	Morphine stimulation group
Pre-training	116.9 ± 17.3	110.4 ± 25.0	130.6 ± 22.4
Post-training 1st day	122.4 ± 22.6	137.8 ± 19.8	378.4 ± 31.9 ^{△△}
2nd day	116.2 ± 14.0	389.8 ± 50.1 ^{**}	591.4 ± 73.9 ^{△△}
3rd day	137.1 ± 31.8	402.8 ± 38.4 ^{**}	634.1 ± 64.3 ^{△△}
5th day	112.4 ± 20.0	424.8 ± 58.8 ^{**}	684.8 ± 58.4 ^{△△}
6th day	122.2 ± 18.0	440.9 ± 42.3 ^{**}	743.9 ± 37.9 ^{△△}
7th day	147.0 ± 38.0	390.5 ± 44.9 ^{**}	651.3 ± 49.4 ^{△△}
9th day	139.5 ± 22.4	347.0 ± 59.9 ^{**}	615.2 ± 34.0 ^{△△}
10th day	133.9 ± 19.2	299.3 ± 31.3 ^{**}	602.0 ± 23.5 ^{△△}

** $P < 0.01$ vs control group; ^{△△} $P < 0.01$ vs fake stimulation group

3 讨论

药物成瘾是一种慢性复发性脑疾病,可分为生理依赖和心理依赖。目前药物治疗主要是从生理上去除戒断反应,而心理依赖尚无特殊治疗方法。目前立体定向功能神经外科治疗戒毒主要有毁损术和脑深部电刺激(DBS)两个方向,近几年来脑深部电刺激技术取得了长足的进步,理论上 DBS 与毁损术相比,具有微损伤、可调节、可逆性以及更符合伦理学要求的特点。参考帕金森病中 DBS 的应用经验,研究特定频率下 DBS 对药物成瘾心理依赖形成的影响,对于 DBS 在治疗药物成瘾方面的临床应用,及电刺激参数的选择具有重要的意义。目前有关不同频率电刺激 NAc 对成瘾过程中心理依赖的影响国内外鲜有报道。本实验利用 CPP 模型,通过研究成瘾大鼠在 NAc 刺激前后觅药行为的变化,来探讨 80 Hz 电刺激 NAc 对成瘾大鼠心理依赖形成的影响及可能的机制。

现代神经科学研究表明,中脑-边缘多巴胺系统是存在于中枢神经系统内的奖赏系统,是一切药物产生心理依赖的神经解剖学基础。该系统起源于中脑腹侧背盖区(VTA),其纤维主要投射到 NAc、前额叶。前额叶皮质、杏仁核、海马、腹侧苍白球、黑质等脑区与 NAc 通过纤维联系构成一个神经环路,NAc 是环路的中心。一切天然的奖赏性刺激都是

通过作用于该系统,引起 NAc 内多巴胺释放增多,从而产生奖赏效应。可见 NAc 在药物心理依赖产生过程中起着核心作用,因此在本实验中将 NAc 作为电刺激的靶点。

预测试阶段结果显示,大鼠在黑箱内停留时间远远长于在白箱内停留时间,说明大鼠对黑箱存在天然偏爱,为了消除天然偏爱给实验结果带来的误差,本实验中以白箱(B)为伴药盒,以黑箱(A)为非伴药盒。

条件性位置偏爱实验中,多采用在不用药的情况下,测试动物在先前用药环境中停留的时间来反映动物对药物的渴求和依赖程度^[7]。吗啡-假刺激组从训练后第 2 天起,在白箱内平均停留时间均明显长于训练前和同期的正常对照组,提示大鼠对白箱的位置偏爱形成,吗啡诱导的心理依赖模型建立成功。本实验中所采用的 CPP 训练方法,采用实验动物背部皮下注射吗啡,连续训练 6 个周期,来制备的成瘾药物心理依赖模型,训练周期短,吗啡总用量相对较少,制作成功率高,动物死亡率低,适合于 SD 大鼠的成瘾模型制备,而且 CPP 训练后 10 d 内吗啡诱导的大鼠条件性位置偏好行为稳定。

吗啡刺激组大鼠在 NAc 电刺激干预下,在白箱内累计停留时间长于吗啡假刺激组,且两组差异显著 ($P < 0.01$),表明在 NAc 电刺激干预下,大鼠对白箱形成的位置偏爱较吗啡-假刺激组更加明显且稳

固,说明80 Hz电刺激可以明显促进大鼠的条件性位置偏爱行为的形成,提示80 Hz电刺激NAc可强化大鼠对吗啡的心理依赖。电刺激后未见明显的并发症和不良反应。

目前认为多巴胺神经递质和与其相关的多巴胺神经元与药物奖赏现象密切相关。阿片主要作用于多脑区的阿片受体,并通过他们向NAc区的传入性投射产生奖赏效应,但也可直接作用于NAc区的 δ 和 μ 受体产生作用;同时脑中存在NAc-苍白球-中脑被盖反馈环路,此环路以GABA为主要递质^[8]。推测吗啡作用于NAc的 μ 受体,使胞体位于NAc的GABA能神经元抑制,对苍白球的抑制作用下降,进而苍白球到中脑被盖的神经元兴奋,与阿片直接结合于中脑腹侧背盖区的 μ 受体使DA神经元去抑制作用协同介导药物奖赏和依赖的产生。

据此推测80 Hz电刺激强化大鼠觅药行为可能的机制:该频率电刺激NAc可能激活了 μ 受体,强化了吗啡对于位于NAc的GABA能神经元抑制作用,使得GABA能神经元对苍白球的抑制作用进一步下降,从而使苍白球到中脑被盖的神经元兴奋性提高,加强了大鼠的药物奖赏和依赖,强化其觅药行为。另外,本实验中观察到的结果可能不仅与NAc区的神经元胞体受刺激有关,而且也可能与经过靶点区的神经纤维受刺激有关,电刺激NAc刺激了由VTA区投射到NAc的神经纤维,引起NAc区多巴胺含量进一步增加,强化了大鼠的心理依赖。本实验也印证了NAc在成瘾药物导致心理依赖中所起

的核心作用。目前药物奖赏和成瘾机制研究尚不十分清楚,实验中所用电刺激大鼠双侧NAc强化大鼠觅药行为的机制,以及其他不同刺激条件下电刺激NAc对大鼠心理依赖建立的影响有待进一步研究和探索。

[参考文献]

- [1] Ito R, Dalley J, Howes S, et al. Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats[J]. *J Neurosci*, 2000, 20: 7489-7495.
- [2] 刘屏, 马志鹏, 郭晓冰, 等. 计算机自动控制的条件性位置偏爱实验系统[J]. *中国药理学通报*, 2000, 16: 344-346.
- [3] 刘杰, 肖琳, 李勇辉, 等. 影响条件性位置偏爱实验各种因素的研究现状[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2005, 14: 85-88.
- [4] Nadal R, Rotllant D, Marquez C, et al. Perseverance of exploration in novel environments predicts morphine place conditioning in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2005, 165: 72-79.
- [5] Sakoori K, Murphy NP. Maintenance of conditioned place preferences and aversion in C57BL6 mice: effects of repeated and drug state testing[J]. *Behav Brain Res*, 2005, 160: 34-43.
- [6] Do Couto BR, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, et al. Long-lasting rewarding effects of morphine induced by drug primings[J]. *Brain Res*, 2005, 1050: 53-63.
- [7] Katz RJ, Gromezano G. A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1979, 11: 213-233.
- [8] Tomkins DM, Sellers EM. Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence[J]. *CMAJ*, 2001, 164: 817-821.

[收稿日期] 2006-08-01

[修回日期] 2006-10-14

[本文编辑] 曹静

· 读者 作者 编者 ·

GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》规定的文献著录格式(IV)

专利文献

著录格式:

[序号] 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期[引用日期]. 获取和访问路径.

示例:

[1] 姜锡洲. 一种温热外敷药制备方案: 中国, 88105607. 3[P]. 1989-07-26.

[2] 西安电子科技大学. 光折变自适应光外差探测方法: 中国, 01128777. 2[P/OL]. 2002-03-06[2002-05-28]. <http://211.152.9.47/sipoasp/zljs/hyjs-yx-new.asp?recid=01128777.2&leixin=0>.