

电针抑制大鼠吗啡条件性位置偏爱

史向党, 罗 非, 崔彩莲, 韩济生

(北京大学 神经科学研究所, 北京 100083)
基础医学院神经生物学系

[关键词] 电针; 吗啡; 条件性位置偏爱; 海洛因依赖

[摘 要] 目的: 观察不同频率电针刺激能否抑制大鼠吗啡条件性位置偏爱 (conditioned place preference, CPP) 的表达。方法: 采用计算机自动控制的三室迷宫 CPP 系统, 第 1 天测试天然偏爱; 第 2 至 5 天进行条件训练 (吗啡 4 mg·kg⁻¹ i.p., 对照组给予等量的生理盐水); 第 6 天在无药状态下观察大鼠在伴药盒的停留时间。于 CPP 检测后 24 h, 分别给予大鼠 2 Hz 或 100 Hz 的电针刺激, 每天 1 次, 连续 3 天, 最后一次电针结束后 24 h 测定大鼠在伴药盒停留时间。结果: 实验组大鼠在伴药盒的偏爱分数明显高于对照组。2 Hz 及 100 Hz 电针均能明显降低 CPP 大鼠在原伴药盒的偏爱分数。结论: 多次 2 Hz 及 100 Hz 电针均能抑制大鼠吗啡 CPP 表达, 两种频率的抑制效应差异无显著性。

[中图分类号] R454.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-167X(2003)03-0248-04

Electroacupuncture suppresses morphine - induced conditioned place preference (CPP) in rats

SHI Xiangdang, LUO Fei, CUI Cailian, HAN Jisheng

(Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, Peking University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100083, China)

KEY WORDS Electroacupuncture; Morphine; Conditioned place preference; Heroin dependence

SUMMARY Objective: To examine the effects produced by electroacupuncture (EA) of different frequencies on the expression of morphine conditioned place preference (CPP) in rats. **Methods:** SD rats were given 4 days consecutive trials in a computerized three-chamber "unbiased" CPP apparatus. Twenty-four hours later, the time spent on drug-pairing compartment of the rat was examined. Rats trained with CPP paradigms were then given EA of 2 Hz or 100 Hz once a day for 3 days. Twenty-four hours after the final EA session, they were again put to the CPP chamber, and the time spent on drug-pairing compartment was measured. **Results:** Rats receiving morphine at a dose of 4 mg·kg⁻¹ (i.p.) showed significantly enhanced preference scores in drug-pairing side than that of the control group. In other words, rats preferred the drug-pairing environment to the nondrug-pairing place. In addition, rats that received treatment with EA of 2 Hz or 100 Hz spent significantly less time on the drug pairing side than that of the CPP control group. **Conclusion:** Morphine-induced CPP paradigms were stably established in rats using a computer-controlled 3-chamber CPP experimental system. The expression of CPP could be significantly inhibited by multiple treatments with EA of either 2 Hz or 100 Hz.

(*J Peking Univ [Health Sci]*, 2003, 35:248-251)

毒品滥用问题已成为当今世界公害,在我国主要以阿片类物质(海洛因)的滥用为主。研究表明,经脱毒治疗后,成瘾者身体依赖的症状虽可消失,但是对于药物的心理渴求(精神依赖)依然存在,这是导致复吸的主要原因^[1]。因此寻找有效遏制精神依赖的治疗手段是防治复吸的关键。目前尚无有效遏制精神依赖的办法。针刺疗法在我国的应用已有

两千多年,本所自 1965 年以来,在探索针刺镇痛原理方面取得了显著成果,并在此基础上发明了韩氏穴位神经刺激仪(HANS)。1992 年以来本所将此刺激仪应用于戒毒实验和临床研究,有效地解除了吗啡依赖动物^[2]和海洛因成瘾者^[3]的阿片戒断综合征。近两年在缓解人类海洛因成瘾者脱毒后的焦虑情绪^[4]、促进性功能恢复^[5]、降低复吸率^[6]方面取

基金项目:科技部基础研究重大项目前期研究专项(2001-50)资助 Supported by the Basic Research Program of the Ministry of Science and Technology of China (2001-50)

Corresponding author email, clcui@bjmu.edu.cn

得了一定进展。那么 HANS 是否通过抑制成瘾者的心理渴求而有效地抑制了复吸? 王玢等^[7]在二室条件性位置偏爱 (conditioned place preference, CPP) 装置上已证明单次较强的 2 Hz 电针刺激可以抑制大鼠吗啡 CPP, 而 100 Hz 无效。本工作在三室 CPP 装置上建立大鼠吗啡 CPP 模型, 检测较弱强度的 2 Hz 和 100 Hz 电针是否能抑制吗啡 CPP, 为进一步探讨电针降低海洛因复吸率的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

雄性 SD 大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 由北京实验动物中心提供。每笼 4 只, 饲养温度 (24 ± 1) °C, 相对湿度 50%, 黑/白照明周期为 12 h/12 h。盐酸吗啡注射液为沈阳市第一制药厂生产。计算机自动控制的三室迷宫 CPP 实验系统由本实验室及北京永环实业有限公司联合开发。韩氏穴位神经刺激仪 (LH 800) 系北京航空航天大学制造。

1.2 CPP 装置

计算机自动监控的 CPP 实验装置 (图 1), 由一台工控机及 12 个长方形 (71.5 cm × 36.5 cm × 30 cm) 的 CPP 箱组成, 每个 CPP 箱由 A、B、C 3 个有机玻璃盒构成, 即三室迷宫。盒与盒之间的通道由可提插的闸门控制开或闭。其中 A 盒与 C 盒为伴药 (或盐水) 盒, 位于 B 盒的两端, 大小相同 (24 cm × 35 cm), 均为黑色。A 与 C 盒内正对通道的一侧壁上分布有 9 盏黄色发光二极管。实验时开启其中的 4 盏构成正方形 (A 盒) 或正三角形 (C 盒) 作为训练时的视觉刺激; 两盒的盒底分别为不锈钢网格 (A 盒) 或不锈钢钢条 (C 盒) 作为训练时的触觉刺激。B 盒较小 (15.5 cm × 19.5 cm), 盒内、外壁及底均为灰色, 为预测试及测试时开始跑动的起始位置。各盒与箱体长轴相平行的侧壁上 (距离盒底 3 cm) 分布有相对应的红外发光二极管及检测二极管, 能将大鼠在各盒中的活动情况通过大鼠阻断光束的时间和次数由计算机相应软件自动记录并在相应界面显示出来。整个实验过程中, CPP 箱上方盒盖关闭, 采用盒内信号灯照明 (28 lx), 同时添加白噪声 (计算机工作的噪声)。

1.3 建立 CPP 模型

CPP 模型的建立分为预测试期 (天然偏爱测试阶段)、条件性训练期、CPP 测试期 3 个阶段。72 只大鼠随机分为 6 组, 每组 12 只。其中 5 组为吗啡 CPP 建模组, 1 组为盐水对照组。实验 5 ~ 7 d 前领取大鼠, 使之适应饲养环境, 每天对大鼠进行 1 次模

拟注射的操作处理, 消除大鼠对实验者的惧怕心理, 避免注射时产生应激反应 (不利于 CPP 形成)。实验第 1 天为预测试期, 开放通道, 启动计算机上 CPP 监测程序, 将大鼠置于中间灰盒, 任其自由跑动 15 min, 记录并分析结果。第 2 ~ 5 天为条件性训练期, 封闭三盒间通道, 各组大鼠每天上、下午各注射 1 次 (实验组其中 1 次注射吗啡, 1 次注射盐水; 对照组两次均注射盐水), 相隔 6 h。经吗啡 (4 mg · kg⁻¹) 或生理盐水 (2 ml · kg⁻¹) 腹腔注射后立即放入 A 或 C 盒中 (随机伴药, 使每组的一半在 A 盒, 一半在 C 盒, 而每只大鼠的伴药盒是固定的) 停留 45 min。第 6 天为 CPP 测试期, 开放三盒间通道, 不予任何注射, 将大鼠置于中间盒内, 记录其 15 min 内在各盒中的停留时间、进出次数。大鼠对伴药盒的偏爱程度以偏爱分数表示。偏爱分数 = 伴药盒 (A 或 C) 停留的时间 / (A + C 盒的停留时间)。

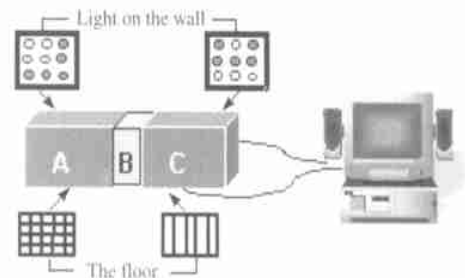


图 1 计算机自动控制的条件性位置偏爱 (CPP) 系统
Figure 1 The computer-controlled conditioned place preference (CPP) experimental system

1.4 电针治疗

将大鼠固定于特制的塑料套筒内, 双后肢及尾部均自然地露在筒外, 将两对直径为 0.25 mm 的不锈钢针灸针分别插入大鼠双侧“足三里” (ST36, 胫骨前结节外侧 5 mm) 和“三阴交” (SP6, 胫骨后 1 mm, 内踝上 3 mm) 穴位。采用 LH800 韩氏穴位神经刺激仪进行电刺激。频率分别为 2 Hz、100 Hz, 方波刺激的波宽在 2 Hz 时为 0.6 ms, 在 100 Hz 时为 0.2 ms。刺激强度每 10 min 递增一次, 分别为 0.5 mA, 1.0 mA 和 1.5 mA, 共刺激 30 min。

1.5 统计学分析

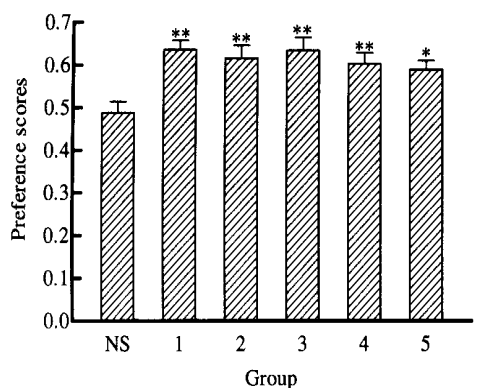
实验数据以偏爱分数的均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) 表示, 统计学处理采用 ANOVA 继以 Newman-Keuls 检验, 以 $P < 0.05$ 作为判断显著性的标准。

2 结果

2.1 CPP 模型的检测

预测试结果显示, 大鼠对两侧盒无明显偏爱, 在

A、C 两盒的停留时间分别为 (317 ±7) s 和 (318 ±6) s。采用非倾向性、对称平衡的程序进行条件性训练^[8]后结果显示,5 组实验组大鼠在伴药盒停留时间均明显延长,偏爱分数与盐水对照组相比,差异有显著性, $P < 0.05$ (图 2)。提示腹腔注射 4 mg · kg⁻¹ 吗啡,经过 4 d 的训练可产生明显而稳定的 CPP 效应。



NS, normal saline. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with NS control group.

图 2 吗啡 CPP 模型的检测结果

Figure 2 The test result of morphine-induced CPP paradigm

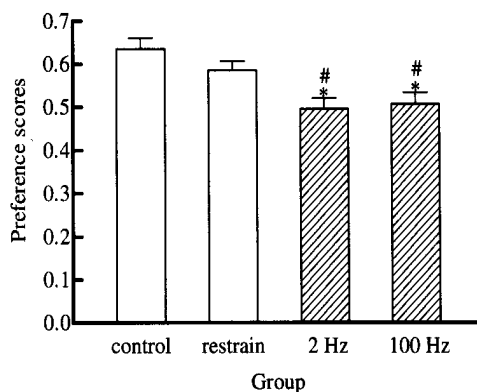
2.2 不同频率电针对大鼠吗啡 CPP 表达的影响

CPP 模型确立后 24 h,将 48 只吗啡 CPP 模型大鼠随机分为 4 组,分别为对照组、束缚组、2 Hz 电针组和 100 Hz 电针组。每天电针 1 次,连续 3 d。最后一次电针结束后 24 h 测定大鼠对原伴药盒偏爱分数的变化,观察 CPP 的表达。结果如图 3 所示,束缚组大鼠对伴药盒内的偏爱分数与对照组(单纯 CPP 组)比较差异无显著性 ($P > 0.05$);而 2 Hz 及 100 Hz 电针组大鼠对其原伴药盒内的偏爱分数明显减小,与单纯 CPP 组及束缚组大鼠比较差异有显著性 ($P < 0.05$),但两种频率的电针效应差异无显著性。以上结果提示,低频 (2 Hz) 及高频 (100 Hz) 电针均可抑制吗啡 CPP 的表达。

3 讨论

强迫性反复用药是药物成瘾的主要特征。大量资料表明,脱毒治疗后的药物渴求复吸的始动因素^[9]。欲阐明药物渴求的机制,首先要建立能够模拟人类成瘾者心理渴求的动物模型。长期以来, CPP 模型一直被作为评定药物是否具有精神依赖性(奖赏效应,强化效应)的主要方法之一,它可模拟人类成瘾者在脱毒后,置身于早期的用药环境即可激起患者对药物的强烈渴求,并引发复吸。因其具有操作简单和效应稳定等优点,而被广泛用于精神

依赖机制的研究^[10]。但 CPP 实验波动较大,要求的动物数较多,而且目前大多数实验室的 CPP 装置并未引入自动化系统,所以实验结果常常受到人的主观因素影响。本实验首先建立了计算机自动控制的 CPP 实验装置系统,使实验结果更具客观性、精确性,也提高了工作效率。另一方面,根据国内外各种 CPP 模型建立的方法,综合了各种利于吗啡 CPP 模型成功而稳定的因素^[8],优化了建立 CPP 模型的实验条件,即应用三室模型和非倾向性、对称平衡的训练方法,更易形成吗啡 CPP 效应, CPP 的偏爱分数离散度很小,实验重复性很好。



* $P < 0.01$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with restrain group.

图 3 2 Hz 或 100 Hz 电针对大鼠吗啡 CPP 表达的抑制作用

Figure 3 Inhibition effects of 2 Hz or 100 Hz electroacupuncture on morphine induced CPP in rats

鉴于本所在戒毒基地的多年临床实践,2 Hz 和 100 Hz 经皮电刺激不仅能抑制成瘾者停药后的戒断症状,也能降低其复吸率^[6],提示电针可压抑吸毒者对药物的心理渴求。本所王玢等^[7]利用两室 CPP 模型,电针刺激强度由 1 mA、2 mA 逐级递增到 3 mA,当频率为 2 Hz 时,1 次电针刺激即可消除吗啡 CPP 的表达,但 100 Hz 则不能阻断 CPP 的表达。本实验采用了较小的电针刺激强度 (0.5 mA, 1.0 mA, 1.5 mA 逐级递增),经连续 3 天 (每天 1 次) 的电刺激,对大鼠吗啡 CPP 的表达才产生抑制效应,并发现 2 Hz 及 100 Hz 电针均可显著对抗吗啡 CPP 的表达。上述结果提示,由于造模方法、刺激参数及次数的不同,所得结果可以有所差异。

本室以往在针刺镇痛方面的研究表明,不同频率电针镇痛效应是由不同的中枢部位释放不同的阿片肽,通过不同的阿片受体所介导,如 2 Hz 促使脑内释放脑啡肽和内啡肽作用于 μ 和 κ 受体发挥镇痛作用;100 Hz 刺激的信息经臂旁核下传至脊髓释放强啡肽,作用于 κ 受体起镇痛作用^[11]。郭惠夫

等^[12]发现,单次 2 Hz 及 100 Hz 电针后 24 h,脑内的前脑啡肽、前强啡肽原 mRNA 的表达呈现较高的水平,从而在分子水平支持了本研究中电刺激对吗啡渴求的累加治疗作用。王玢等^[7]发现,2 Hz 阻断 CPP 表达的效应可被预先给予的小剂量纳洛酮完全取消,说明 2 Hz 电针抑制 CPP 表达,可能是促进脑啡肽、内啡肽的释放而发挥作用的。邹冈等^[13]也发现电针使伏核等脑区内脑啡肽含量升高,而且相应脑区前脑啡肽 mRNA 水平也明显升高,表明电针在促使脑啡肽释放的同时,也加速了其生物合成。由此我们可以推测,2 Hz 电针可能使奖赏脑区脑啡肽含量升高,消除了大鼠停止吗啡注射后由于内源性阿片肽不足而寻求外源性吗啡的渴求行为,从而抑制了大鼠吗啡 CPP 的表达。

100 Hz 电针刺激信息经臂旁核转达脊髓,释放强啡肽发挥镇痛作用^[11],而臂旁核又是介导吗啡厌恶效应的中枢部位^[14]。Funada 等^[15]证明系统给予强啡肽类似物激活 受体可取消或减弱吗啡 CPP。由此推测,本实验中 100 Hz 电针可能通过促进内源性强啡肽的释放,激活相应部位的 受体而消除 CPP 的表达。可以假设,单次电针即可引起脑啡肽、内啡肽释放增加,而要引起强啡肽生成增加则要多次电针才能奏效。这一设想有待进一步研究证实。当然,电针对中枢神经系统(CNS)的影响不仅局限于内源性阿片系统,还可同时激活其它非肽类递质,如多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、缩胆囊素(CCK)、谷氨酸(Glu)等,这些递质也参与了吗啡的 CPP 效应。特别是伏核内的 5-HT 介导了吗啡的奖赏效应^[16]。Scott 等^[17]认为,针刺可通过影响上行的 5-HT 能通路,逐渐使伏核、杏仁核内 DA 释放增多而产生满足感,使成瘾者脑内异常的奖赏功能恢复正常。

总之,稳定的 CPP 模型是研究药物精神依赖以

及复吸机制的有效工具。本工作证明了高频及低频电针均能够抑制吗啡的心理渴求,为进一步阐明其作用机制,奠定了基础。

参考文献

- 1 Withers NW, Plzwcenci L, Koob GF, *et al.* Cocaine abuse and dependence[J]. *J Clin Psychopharmacol*, 1995, 15: 63-78
- 2 Cui CL, Wu LZ, Han JS. Spinal kappa-opioid system plays an important role in suppressing morphine withdrawal syndrome in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 295: 45-48
- 3 吴鏊桢,崔彩莲,韩济生. 韩氏穴位神经刺激仪治疗阿片戒断综合征的临床研究[J]. *中国疼痛医学杂志*, 1995, 1: 30-37
- 4 吴鏊桢,崔彩莲,韩济生. 2/100 Hz 电刺激可降低脱毒期美沙酮用量和脱毒后近期抑郁及焦虑情绪[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2001, 10: 124-126
- 5 吴鏊桢,崔彩莲,韩济生. 2/100 Hz 跨皮电刺激(多导 HANS 仪)对 33 例男性海洛因成瘾者性机能障碍及血清 L.H、T 浓度的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20: 15-18
- 6 张本国,罗非,刘崇悦,等. 单独应用韩氏戒毒仪治疗海洛因成瘾 121 例报告[J]. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20: 593-595
- 7 Wang B, Luo F, Yingqiu X, *et al.* Peripheral electric stimulation inhibits morphine-induced place preference in rats[J]. *Neuroreport*, 2000, 11: 1017-1020
- 8 Bardo MT, Rowlett J K, Harris MJ. Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: A meta-analysis [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1995, 19: 39-51
- 9 Markou A, Weiss F, Gold LH, *et al.* Animal models of drug craving[J]. *Psychopharmacology*, 1993, 112: 163-182
- 10 Narita M, Funada M, Suzuki T. Regulations of opioid dependence by opioid receptor types[J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 89: 1-15
- 11 Han JS, Wang Q. Mobilization of specific neuropeptides by peripheral stimulation of identified frequencies [J]. *News Physiol Sci*, 1992, 7: 176-180
- 12 郭惠夫,王晓民,田今华,等. 2 Hz 和 100 Hz 电针加速脑内三种阿片肽基因表达[J]. *生理学报*, 1997, 49: 121-127
- 13 邹冈,易庆成,吴时祥,等. 脑啡肽在针刺镇痛中的作用:放射免疫测定. 见:张香桐,季钟仆,黄家骝. 针灸针麻研究[M]. 北京:科学出版社,1986. 197-205
- 14 Bechara A, Martin GM, Pridgar A, *et al.* The parabrachial nucleus: a brain stem substrate critical for mediating the aversive motivational effects of morphine[J]. *Behav Neurosci*, 1993, 107: 147-160
- 15 Funada M, Suzuki T, Narita M, *et al.* Blockade of morphine reward through the activation of kappa-opioid receptors in mice[J]. *Neuropharmacology*, 1993, 32: 1315-1323
- 16 Spyrali C, Nomikos GG, Galanopoulou P, *et al.* Drug induced place preference in rats with 5,7-dihydroxytryptamine lesions of the nucleus accumbens[J]. *Behav Brain Res*, 1988, 29: 127-134
- 17 Scott S, Scott WN. A Biochemical hypothesis for the effectiveness of acupuncture in the treatment of substance abuse: Acupuncture and the reward cascade[J]. *Amer J Acupun*, 1997, 25: 33-40

(2002-12-31 收稿)

(本文编辑:任英慧)

消息

北京大学医学部获 2 项 全国优秀博士学位论文作者专项基金资助

在 2002 年高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金资助项目评审中,北京大学医学部韩文玲的“新基因家族 CKLFSF 的克隆、表达和功能研究”以及杨振军的“信号肽或

氨基寡糖缀合异核苷酸参与反义寡核苷酸合成及生物活性研究”2 个项目入选,批准经费 125 万元。

(北京大学医学部科研处)