

# 慢性吗啡依赖大鼠条件性位置厌恶模型 伏隔核壳区蛋白激酶 A 表达变化

宋秀花 李文强 张景丹 石玉中 张瑞岭 李毅

**【摘要】 目的** 分析慢性吗啡依赖大鼠纳洛酮催瘾戒断条件性位置厌恶 (conditioned place aversion, CPA) 建立前后,与成瘾密切相关的脑区伏隔核壳区 (the shell of nucleus accumbens, AcbSH) 内蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 蛋白表达的适应性变化,探讨阿片依赖戒断后厌恶动机形成的生物学基础。**方法** 1. 将雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠分为研究组 (慢性吗啡注射 + 纳洛酮催瘾组 morphine + naloxone, MN), 对照组 (慢性吗啡注射 + 生理盐水“催瘾”组 (morphine + saline, MS), 慢性生理盐水注射 + 纳洛酮催瘾组 (saline + naloxone, SN), 每组 12 只。采用慢性吗啡注射 (10 mg/kg, BID, IP) 后予 1 次纳洛酮 (0.3 mg/kg) 催瘾注射 (同时与条件性位置训练箱搭配) 建立大鼠 CPA 模型。2. 在 CPA 建立前后,采用免疫组织化学方法检测 AcbSH 内 PKA 蛋白表达情况。**结果** CPA 建立前, MN 组 PKA 蛋白表达水平 (109.33 ± 5.508) 与对照组 MS 组 (111.86 ± 8.688) 和 SN 组 (132.25 ± 4.844), 差异无统计学意义 ( $F=2.306, P=0.130$ )。CPA 建立后, 各组 PKA 蛋白表达水平比较差异有统计学意义 ( $F=36.516, P=0.000$ ) 其中 MN 组 (109.50 ± 4.661) 高于 MS 组 (126.50 ± 3.697;  $P<0.01$ ), 高于 SN 组 (133.50 ± 6.364;  $P<0.01$ )。**结论** 1. AcbSH 内 PKA 蛋白的高表达导致的厌恶的中枢状态,可能是 CPA 建立的关键的神经机制。2. AcbSH 内 PKA 的适应性变化可能是物质依赖戒断后 CPA 相关神经可塑性变化的重要分子基础。

**【关键词】** 条件性位置厌恶; 蛋白激酶 A; 免疫组化

**Changes of protein kinase A expressions in shell of accumbens nucleus during the process of chronic morphine-induced conditioned place aversion in rats** SONG Xiu-hua, LI Wen-qiang, ZHANG Jing-dan, SHI Yu-zhong, ZHANG Rui-ling, LI Yi. Department of Psychiatry of the Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University; Henan Key Lab of Biological Psychiatry, Xinxiang 453002, China

**【Abstract】 Objective** To explore neurobiological mechanisms of the withdrawal-induced aversion, the changes of protein kinase A (PKA) were measured in shell of accumbens nucleus (AcbSH) of CPA model rats. **Methods** 1. All 36 male SD rats were divided into three groups, model group (MN group), and control group (MS group and SN group). MN group was injected with morphine, 6.5 days, 10mg/kg, intraperitoneally (IP), twice per day, naloxone injection, 0.3 mg/kg, ip, along with conditioned place aversion training, to develop the CPA model. The MS group was administrated equivalent volume of morphine and saline. Also the SN group was injected with equivalent volume of saline and naloxone. 2. During the development of CPA, the expression of protein kinase A was assayed with immunohistochemistry in the AcbSH. **Results** Before the development of CPA, PKA expressions were no significant differences among the three groups in the AcbSH ( $F=2.306, P=0.130$ ). However, after development of CPA, PKA expressions showed significant differences among the three groups ( $F=36.516, P=0.000$ ). The average gray intensity of MN group (109.50 ± 4.661) was apparently higher than the MS group (126.50 ± 3.697,  $P<0.01$ ), than the SN group (133.50 ± 6.364,  $P<0.01$ ). **Conclusions** 1. Protein kinase A expression, leading to the aversion in the AcbSH probably is a key pathway contributing to the development of CPA. 2. The neuroadaptation mediated by PKA may be one of important molecular underpinnings of CPA.

**【Key words】** Conditioned place aversion; Protein kinase A; Immunohistochemistry

毒品成瘾是一种慢性复发性脑病,具有很强的顽固性,可产生精神依赖和身体依赖性,一旦停药将产生戒断综合症<sup>[1-2]</sup>。吸毒者存在“吸毒→成瘾→戒断所

致厌恶动机→再吸毒(复吸)”循环,导致吸毒者摄毒动机难以自控,毒品使用形成恶性循环,即毒品的负性强化循环<sup>[3-4]</sup>。戒断所导致的厌恶动机是这条复吸通路的重要“源头”,可作为阻断复吸通路的重要“靶点”。对毒品成瘾戒断所致厌恶动机的生物学机制进行研究十分必要,具有重要的理论和临床意义。目前对毒品成瘾戒断所致的厌恶动机的研究主要集中在:厌恶动机的解剖基础以及神经生化基础两个方面,而在生物信息转导通路方面并不明确,条件性位置厌恶 (conditioned place aversion, CPA) 试验动物模型被广泛用于急、慢性阿片成瘾戒断所致的厌恶性动机的生物

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2012.03.013

基金项目:国家自然科学基金项目(30800364)

作者单位:453002 新乡,新乡医学院第二附属医院,河南省生物精神病学重点实验室(宋秀花、李文强、张景丹,石玉中、张瑞岭);武汉市精神卫生中心(李毅)

通信作者:李毅, Email: psylee@163.com; 石玉中, Email: shiyuzhong2000@yahoo.com.cn

学机制研究, 试验敏感、成熟<sup>[5-6]</sup>。蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 作为第二信使传导通路的关键分子之一, 其功能涉及突触可塑性<sup>[7]</sup>、基因转录<sup>[8]</sup> 等方面。物质依赖戒断后 CPA 建立的过程中, 有厌恶动机 / 情绪的产生, 那么特定脑区内 PKA 的表达变化是不是 CPA 的分子基础, 目前尚不明了。本实验通过对慢性吗啡成瘾雄性 SD 大鼠纳洛酮催瘾戒断后 CPA 动物模型的建立, 定位于伏隔核壳区, 测定 CPA 建立前后 PKA 蛋白表达水平。以期部分揭示毒品戒断后厌恶动机形成的生物学基础, 为打破毒品的负性强化循环寻找可能的干预靶点, 以此为切入点毒品成瘾的防治提供理论依据。

## 材料与方 法

### 一、材料

1. 仪器与试剂: YD-1058B 石蜡切片机 (浙江金华益迪医疗设备厂), Motic 病理图像分析系统 (厦门麦克奥迪实业集团有限公司), 盐酸吗啡注射液 (Morphine Hydrochloride Injection) (东北制药集团公司沈阳第一制药厂生产, 批号为 100305-1) 盐酸纳洛酮注射液 (Naloxone Hydrochloride Injection) (北京四环制药有限公司生产, 批号为 20100207), 兔抗大鼠 PKA 多克隆抗体 (美国 Millipore 公司, 批号 07-1468) 山羊抗兔二抗 (北京中杉公司, 批号 SP9001)。

2. 动物及分组: 选用 36 只 SPF 雄性 (Sprage-Dawley) SD 大鼠 (郑州大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (豫) 2005-0001), 10 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 独立通风笼具系统饲养, 颗粒型清洁级饲料 [许可证号: SCXK (豫) -2005-0001] 饲喂, 室温 (20 ± 2) °C, 自然昼夜循环, 非直接光照, 所有实验均在 8:00 ~ 20:00 完成。在整个实验过程中, 大鼠自由饮水及进食。人道主义对待实验动物。

本研究共分为 3 组。研究组: 慢性吗啡注射 + 纳洛酮催瘾组 (morphine + naloxone, MN), 简称 MN 组; 对照组: 慢性吗啡注射 + 生理盐水“催瘾”组 (morphine + saline, MS) 和慢性生理盐水注射 + 纳洛酮催瘾组 (saline + naloxone, SN), 分别简称 MS 和 SN 组。

慢性吗啡注射: 从第 1 天 (Day1) 至第 7 天 (Day7) 的上午 (共计注射 6.5 d), 每天 2 次 (8AM; 8PM), 10 mg · kg<sup>-1</sup> · 次<sup>-1</sup>, 腹腔注射 (IP)。慢性生理盐水注射: 按同期对照的原则, 注射的均为生理盐水。纳洛酮催瘾注射: 在慢性吗啡注射的第 6 天 (Day6), 0.3 mg/kg, 腹腔注射 1 次。

### 二、方法

1. 慢性吗啡依赖纳洛酮催瘾戒断 CPA 的建立: 即应用成瘾戒断所致的厌恶动机与特定的信号 (cues, 非条件刺激) 结合, 建立条件性反射后, 形成此反射的对象再次暴露于相同或相似的信号时, 表现出明显的厌恶动机, 并出现回避行为。行为训练大致可以分为三个

阶段: 条件化前期、条件化期条件化后 CPA 测试期训练均在受声光控制的环境进行: 照明 40 lux, 排气扇白噪音 50 dB。具体方法参考文献<sup>[9]</sup>。

2. 免疫组化标本的制备: 具体方法参考文献<sup>[10]</sup>。

3. PKA 蛋白表达测定: 每组选取免疫组织化染色切片各 4 张, 4 张图片分别来自不同的动物, 使用 Motic 病理图像分析系统 (厦门麦克奥迪实业集团有限公司) 测量阳性神经元的平均灰度值。

4. 统计处理: 所有的试验结果除非特殊说明, 均用以  $\bar{x} \pm s$  表示。所有的统计分析均采用 SPSS 12.0 软件包完成。多组均数间的多重比较, 采用方差分析 (ANOVA), 若存在差异, 采用 Levene 检验进行方差一致性检验, 若方差齐时, 两两比较用 Least-significant difference (LSD) 方法, 若方差不齐时用 Tamhane's T2 方法。两均数之间的比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、各组大鼠 CPA 评定的结果

CPA 条件化后, MN 组试验鼠在伴药侧的时间 (sec) 较条件化前期明显减少, 结果显示差异有显著性, MN 组大鼠形成了明显的 CPA, MS 组和 SN 组在伴药侧的时间结果显示两者之间的差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组试验鼠条件化搭配前、后在伴药侧时间及厌恶分数 ( $\bar{x} \pm s$ , 每组 *n* = 12)

组别	条件化前 (s)	测试阶段 (s)	厌恶分数 (s)
MN	608.60 ± 50.70	445.67 ± 42.40 <sup>a</sup>	-179.83 ± 38.92
MS	578.60 ± 87.95	526.66 ± 63.02	-55.13 ± 88.92
SN	553.63 ± 86.94	550.69 ± 78.11	-19.99 ± 37.79

注: 厌恶分数即吗啡依赖纳洛酮催瘾戒断的 CPA 分数 (s); 测试阶段 (Day7) 试验鼠在纳洛酮搭配侧, 又称为伴药侧 (withdrawal-paired compartment) 的时间减去条件化前阶段 (Day5) 在同侧的时间。研究组测试阶段与条件化前比较<sup>a</sup> *P* < 0.01

### 二、各组大鼠伏隔核壳区 PKA 蛋白表达水平

CPA 建立前, MN 组 PKA 蛋白表达水平较对照组 MS 组和 SN 组差异无显著性。CPA 建立后 MN 组 PKA 蛋白表达水平高于 MS 组和 SN 组, 差异有显著性。见表 2。

表 2 CPA 建立前后大鼠伏隔核壳区 PKA 的平均灰度值 ( $\bar{x} \pm s$ , 每组 *n* = 12)

组别	条件化前	测试阶段
MN	109.33 ± 5.51	109.50 ± 4.66 <sup>ab</sup>
MS	111.86 ± 8.69	126.50 ± 3.70
SN	132.50 ± 4.84	133.50 ± 6.36
<i>F</i> 值	2.31	36.52
<i>P</i> 值	0.13	0.00

注: 测试阶段 MN 组与 MS 组比较<sup>a</sup> *P* < 0.01, MN 组与 SN 组比较<sup>b</sup> *P* < 0.01

## 讨 论

目前对厌恶动机的分子机制的研究主要集中在生物信息转导通路方面,研究较多的途径主要是腺苷酸环化酶(adenylic acid, AC)-环磷酸腺苷(cAMP)-PKA-cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)途径、鸟苷酸环化酶-环磷酸鸟苷-蛋白激酶 G 途径和  $Ca^{2+}$ -钙调节蛋白(Calmodulin, CaM)-钙调节蛋白依赖的蛋白激酶( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase, CaMK)-CREB 等途径,其中,PKA 通路的上调是经典途径之一。长期滥用药物造成大脑神经适应性改变,这些改变导致行为变化并成为药物复吸的驱动力<sup>[11-12]</sup>。

本研究表明, MN 组试验鼠在测试阶段的时间较条件化前期明显减少, MN 组大鼠 CPA 模型成功建立, CPA 形成过程中, 研究组脑内 AcbSH 的 PKA 的蛋白表达明显高于对照组, 提示此脑区内 PKA 蛋白高表达可能是 CPA 建立的关键因素之一。前期的研究发现给予成瘾药物戒断后可增加 PKA 的活性, 给予大鼠可卡因戒断后在 NAc 区域 PKA 的活性增加维持了 30 d, 90 d 后才回到基线水平<sup>[13]</sup>, 本实验结果与之类似。慢性给予小鼠四氢大麻酚(THC), 停药后又快速给予大麻素受体拮抗剂发现躯体戒断症状如湿狗样抖动次数也会相应增加<sup>[14]</sup>, 而本实验在测试阶段 MN 组较对照组有明显的湿狗样抖动、躯体拉伸、跳跃和腹泻的表现。

AC/cAMP 系统内部存在一个正反馈调节, 即 AC / cAMP 的上调激活了 PKA, 而 PKA 不仅能启动信号通路的下游信号反应, 如使 CREB 磷酸化而改变一些基因的表达水平, 还能反过来使上游信号通路中的 AC 受到磷酸化调节而使 AC 活性进一步增强。AC/cAMP-PKA 系统的这一正反馈调节可能与维持或上调, 以及使神经元处于过度激活状态有关, 因此可能是形成和维持吗啡依赖状态的一个重要机制。在体外刺激大鼠纹状体神经元  $\mu$ -阿片受体可增加 PKA 催化亚基的核转录, 同时也增加磷酸化的 cAMP 反应元件结合蛋白(p-CREB)的水平, 此效应在成瘾戒断后可被加强<sup>[15]</sup>。这进一步证实了 PKA-CREB 通路在毒品成瘾戒断后所导致的厌恶动机的重要性。

PKA 可促进药物诱导的突触可塑性, PKA 通过磷酸化 AMPA 受体的 GluR1 亚基促进 AMPA 受体运输到细胞膜<sup>[16]</sup>。多巴胺 D1 受体激动剂 SKF81297 和 SCH23390 以及 PKA 激活剂 Sp-cAMPS 均增加了大鼠 NAc GluR1 细胞表面的表达<sup>[17]</sup>, 吗啡依赖戒断大鼠伏隔核谷氨酸水平的升高可能是由于相应突触释放谷氨酸所致<sup>[18]</sup>。提示 PKA 可能通过此机制增强物质依赖戒断后 CPA 的神经可塑性。

本实验的局限性在于仅从蛋白水平没有从 mRNA 水平检测 PKA 的表达变化来验证 PKA 的适应性变化可能是物质依赖戒断后 CPA 相关神经可塑性变化的重要分子基础。只观察了 AcbSH 脑区内 PKA 的表达变化与成瘾相关的其它脑区如杏仁核、腹侧被盖区等没有进行验证, 这些都需进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] 郝伟. 精神活性物质所致精神障碍//郝伟. 精神病学. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 74-78.
- [2] 刘海青, 白波. 阿片类药物成瘾的受体机制研究进展. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011, 20: 571-573.
- [3] Tang YL, Zhao D, Zhao CZ, et al. Opiate addiction in China: current situation and treatments. *Addiction*, 2006, 101: 657-65.
- [4] Sanchis SC, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol*, 2006, 11: 2-38.
- [5] Azar MR, Jones BC, Schulteis G. Conditioned place aversion is a highly sensitive index of acute opioid dependence and withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)*, 2003, 170: 42-50.
- [6] Stinus L, Cador M, Zorrilla EP, et al. Buprenorphine and a CRF1 antagonist block the acquisition of opiate withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Neuropsychopharmacol*, 2005, 30: 90-98.
- [7] Nguyen PV, Woo NH. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP dependent protein kinases. *Prog Neurobiol*, 2003, 71: 401-437.
- [8] Sands WA, Palmer TM. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal*, 2008, 20: 460-466.
- [9] Li Y, Liu X, Chen H, et al. Development, extinction and reinstatement of morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Addict Biol*, 2007, 12: 470-7.
- [10] 李毅. 吗啡依赖大鼠 CPA 建立、消退和重建及部分脑区内 CREB 和强啡肽基因表达. 长沙: 中南大学, 2005.
- [11] Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35: 217-38.
- [12] 张登科, 张宏卫, 石富娟, 等. 吗啡戒断对糖水条件性位置偏爱建立的影响. 中华行为医学与脑科学杂志, 2010, 19: 116-117.
- [13] Lu L, Grimm JW, Shaham Y. Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration in rats. *J Neurochem*, 2003, 85: 1604-1613.
- [14] Tzavara ET, Valjent E, Firmo C. Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum. *Eur J Neurosci*, 2000, 12: 1038-1046.
- [15] Yao L, McFarland K, Fan P. Activator of G protein signaling 3 regulates opiate activation of protein kinase A signaling and relapse of heroin-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8746-8751.
- [16] Man HY, Sekine-Aizawa Y, Haganir RL. Regulation of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 3579-3584.
- [17] Mangiavacchi S, Wolf ME. D1 dopamine receptor stimulation increases the rate of AMPA receptor insertion onto the surface of cultured nucleus accumbens neurons through a pathway dependent on protein kinase A. *J Neurochem*, 2004, 88: 1261-1271.
- [18] Wang XF, Wu N, Su RB, et al. Agmatine modulates neuroadaptations of glutamate transmission in the nucleus accumbens of repeated morphine-treated rats. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650: 200-205.

(收稿日期: 2011-10-05)

(本文编辑: 冯学泉)