

创伤后应激障碍样大鼠酒精条件性位置偏爱获得与多巴胺 D1 受体的研究

王岚 张萍 于鲁璐 王学义

【摘要】 目的 探讨创伤后应激障碍(Post-traumatic stress disorder, PTSD)对酒精条件性位置偏爱(conditioned place preference, CPP)获得的易化作用及其多巴胺机制。**方法** Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 40 只分为 PTSD + 酒精(PE)组、正常对照 + 酒精(CE)组、PTSD + 生理盐水(PS)组和正常对照 + 生理盐水(CS)组, 每组大鼠进行 CPP 训练, 酒精组给予腹腔注射 20% 酒精 2 g/kg, 生理盐水组给予相同体积的生理盐水。PTSD 动物模型建立采用单一持续性刺激(SPS)方式, 通过僵立反应和高架十字迷宫分别测试 SPS 24 h、7 d 的恐惧记忆及焦虑行为, 在 SPS 7 d 检测训练后 CPP 值, 并用免疫组织化学方法测定大鼠杏仁核区域多巴胺 D1 受体的表达。**结果** 与正常对照组比较, 仅在 SPS 7 d 时 PTSD 组大鼠僵立时间显著延长[(89.13 ± 8.60)s, (22.25 ± 5.85)s, $q = 8.77, P < 0.01$]; 以及进入开放臂次数、时间明显降低[(4.25 ± 1.26)次, (14.38 ± 2.18)次, (12.38 ± 3.30)s, (40.38 ± 7.29)s, q 分别为 4.74 和 4.08, 均 $P < 0.01$]; CPP 测试中 PE 组训练后 CPP 值明显高于训练前, 差异有统计学意义($q = 31.81, P < 0.01$), 其余 CE、PS 及 CS 组训练前后 CPP 值均差异无统计学意义(q 分别为 1.53, 0.01, 0.27, $P > 0.05$); PE 组训练后的 CPP 值明显高于 CS 组、CE 组和 PS 组(q 分别为 -38.32, -22.21, -33.38, $P < 0.05$)。SPS 7d 4 组大鼠杏仁核区域多巴胺 D1 受体阳性细胞数评分差异无统计学意义($F = 0.07, P > 0.05$)。**结论** PTSD 样大鼠易于形成酒精条件性位置偏爱, 可能与杏仁核多巴胺 D1 受体数量变化无关。

【关键词】 创伤后应激障碍样大鼠; 酒精; 条件性位置偏爱; 多巴胺 D1 受体

The acquisition of alcohol-conditioned place preference in post-traumatic stress disorder-like rats and its relationship with the dopamine D1 receptor WANG Lan, ZHANG Ping, YU Lu-lu, WANG Xue-yi. *Mental Health Institute, the First Hospital of Hebei Medical University, Brain Ageing and Cognitive Neuroscience Laboratory, Shijiazhuang 050031, China*

【Abstract】 Objective To evaluate whether post-traumatic stress disorder(PTSD)-like rats more easily to acquire the alcohol induced conditioned place preference(CPP), and its relationship with dopamine D1 receptor. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into four groups: PTSD + ethanol group(PE), control + ethanol group(CE), PTSD + saline group(PS), and control + saline group(CS). All rats of each group were trained for CPP with alternate injections of alcohol(2 mg/kg, i. p.) and saline(10 ml/kg, i. p.). PE and PS group were subjected to single prolonged stress (SPS) for PTSD model. Four groups were evaluated the performances of freezing behavior and plus maze test after SPS 24 hours and 7 days. And on SPS 7 days four groups were respectively detected D1 dopamine receptor-positive cells number in amygdala by immunohistochemistry. **Results** Compared with control group, freezing time of PTSD group was remarkable longer on 7 days after SPS not 24 hours((89.13 ± 8.60) s vs(22.25 ± 5.85) s, $q = 8.77, P < 0.01$), and number of entry into the open arms and time spent in the open arms of PTSD group were both less than control group on 7 days after SPS not 24 hours((4.25 ± 1.26) vs (14.38 ± 2.18), (12.38 ± 3.30) s vs (40.38 ± 7.29) s, $q = 4.74$ and 4.08, $P < 0.01$). In CPP, the CPP value of post-conditioning only in PE group was obviously higher than that of pre-conditioning ($q = 31.81, P < 0.01$). The CPP value of post-conditioning in PE group was higher than that of CS group, CE group and PS group($q = -38.32, -22.21, -33.38, P < 0.05$). There were no significant differences in the number of D1 dopamine receptor-positive cells in the amygdala region among four groups($F = 0.07, P > 0.05$). **Conclusion** The PTSD-like rats are easier to acquire the alcohol CPP, which maybe not relate to the changes of the number of D1 dopamine receptor-positive cells in amygdala.

【Key words】 PTSD-like rats; Ethanol; Conditioned place preference; Dopamine D1 receptor

创伤后应激障碍(post-traumatic stress disorder, PTSD)与酒精成瘾/依赖的共病率较高, 应激性生活事

件增加饮酒量^[1], 并增加复饮的风险^[2]。众所周知, PTSD 的记忆损害或精神创伤与酒精依赖的形成有着

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2012.01.007

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2007BAII7B02);河北省科技厅科技攻关项目(10276105D-54)

作者单位:050031 石家庄,河北医科大学第一医院精神卫生研究所,河北省脑老化与认知神经科学重点实验室

[王岚,张萍(研究生),于鲁璐,王学义]

通信作者:王学义,Email:ydywxy@163.com

一定的联系;而条件性恐惧记忆形成的不同阶段会受到多巴胺(dopamine, DA)的调控,DA 又参与中枢系统的“奖赏-强化”环路,因此 DA 受体与 PTSD 和酒精滥用/成瘾共病将成为研究其生物学机制的靶点。有研究显示^[3],D1 受体拮抗剂 SCH 23390 能够阻断条件性恐惧记忆的获得;Mashhoon 等^[4]研究提示条件线索诱发的复吸依赖于杏仁核外侧基底 D1 受体的影响。因此推测 PTSD 和酒精滥用/成瘾共病与杏仁核 D1 受体相关,目前尚缺乏二者共病机制与 D1 受体表达的研究。本研究采用单一持续性刺激(Single prolonged stress, SPS)建立大鼠 PTSD 动物模型,以探讨 PTSD 对酒精条件性位置偏爱(conditioned place preference, CPP)获得的易化作用及其多巴胺 D1 受体的机制,研究 PTSD 易于发生酒精依赖共病的可能生物学机制。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物 通过高架十字迷宫筛选出行为学成绩无显著性差异清洁级健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只,体质量 290 ~ 310 g,河北医科大学实验动物中心提供(1006156)。实验前饲养 1 周。

2. 器材及试剂:电击箱、高架十字迷宫、条件性位置偏爱箱(均为安徽淮北正华生物仪器设备有限公司),D1 抗体(Chemicon 公司)。

二、方法

1. 实验分组:将 40 只 SD 大鼠随机数字表法分为 4 组:PTSD + 酒精(PE)组,PTSD + 生理盐水(PS)组,正常对照 + 酒精(CE)组和正常对照 + 生理盐水(CS)组,各 10 只。酒精组给予腹腔注射 20% 酒精 2 g/kg^[5],生理盐水组给予相同剂量的生理盐水,注射后休息 5 min^[6],以减少注射带来的疼痛刺激。

2. PTSD 模型建立^[7]:采用 SPS 方式,即:束缚 2 h,随后立即进行强迫游泳 20 min,休息 15 min 后给予乙醚麻醉大鼠至丧失意识。清醒后返回鼠笼,正常进食水。正常对照组不给予任何处理。采用僵立行为^[8]及高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)测评是否成功建立 PTSD 模型。将 PS 组与 CS 组大鼠给予足底电击(0.8 mA, 4 s),分别观察造模 24 h 和 7 d 时 3 min 内僵立时间。电击后休息 2 h,进行 EPM 测试,分别记录造模 24 h 和 7 d 时 5 min 内进入开放臂次数(open arm entry, OE)与时间(open arm time, OT)。

3. CPP 训练及测试:CPP 训练箱大小 30 cm × 25 cm × 32 cm,由中间盒分为 A 盒(白色光滑底面)和 B 盒(黑色粗糙底面)大小相同。实验操作采用无偏、平衡设计,包括三个阶段:基础值前测阶段、训练阶段、测试阶段。基础值前测试是测定每只大鼠 CPP 基础值(任由在 A、B 盒之间自由探索 10 min,计各自的停留时间)。训练阶段为造模第 2 ~ 5 天,伴药盒(即注射酒精后放入的盒子)为随机分配。每天上午给 PE

组、CE 组注射酒精^[5](20%, 2g/kg),休息 5 min,放入伴药盒,持续 20 min 取出。下午注射生理盐水(10 ml/kg),停留 5 min 后放入另一侧非伴药盒,持续 20 min 取出。PS 组和 CS 组大鼠上午下午均注射同等剂量生理盐水。于造模第 6 天按照第一阶段测试基础值方法再进行 CPP 值测定。记录 10 min 内每个盒子停留时间。将 CPP 值设定为伴药与非伴药停留时间的差值(s)。

4. 免疫组织化学检测 D1 受体表达:于造模第 7 d 灌注取脑,固定、后固定、脱水、石蜡包埋、切片(片厚 15 μm)。取杏仁核位置大致相同切片进行免疫组织化学染色。切片通经脱蜡、再水化、修复、封闭后,分别给予 1:50 的 D1 抗体,1:200 生物素标记二抗,1:200 辣根酶标记链霉卵白素,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,铺片,脱水,封片。应用高清晰度彩色图文分析系统(HPIAS-1000)测量杏仁核多巴胺 D1 受体阳性细胞的免疫组化评分(immunohistochemistry score, IHS)。评分标准^[9]:A 为阳性细胞数分级(0 ~ 1)% = 0、(1 ~ 10)% = 1、(10 ~ 50)% = 2、(50 ~ 80)% = 3、(80 ~ 100)% = 4;B 为阳性细胞显色强度分级 0(阴性)、1(弱阳性)、2(阳性)、3(强阳性),IHS = A × B。

5. 统计学处理:本实验采用 SPSS13.0 软件分析统计,所有数据均以均数 ± 标准差表示。行为学结果采用两因素重复测量方差分析,两两比较采用最小显著差法(LSD)检验;免疫组织化学结果采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠行为学测试

1. 僵立行为及 EPM 测试:经两因素重复测量方差分析,以处理因素(SPS)作为组间因素,检测时间(24 h、7 d)作为组内因素,结果显示僵立时间及 OE 的处理因素 × 检测时间的交互作用有统计学意义(F 分别为 14.25, 3.84, $P < 0.05$);OT 处理因素 × 检测时间的交互作用无统计学意义($F = 2.49$, $P > 0.05$)。两两比较 Post-hoc 分析显示,与正常对照组比较,PTSD 组 24 h 僵立时间、OE 及 OT 差异无统计学意义(q 分别为 1.75, 2.52, 2.35, 均 $P > 0.05$);7 d 时与正常对照组比较,PTSD 组僵立时间显著延长($q = 8.77$, $P < 0.01$),OE 和 OT 明显降低(q 分别为 4.74 和 4.08, 均 $P < 0.01$)。见表 1。

2. CPP 测试:经两因素重复测量方差分析,以分组作为组间因素,以检测时间(CPP 训练前和 CPP 训练后)作为组内因素,结果显示组间因素、组内因素以及二者的交互作用有统计学意义($F_{\text{组间}} = 5.86$, $F_{\text{组内}} = 11.07$, $F_{\text{组内} \times \text{组间}} = 8.75$, 均 $P < 0.01$)。经 LSD 两两比较的 Post-hoc 分析显示,PE 组训练后的 CPP 值明显高于 CS 组、CE 组和 PS 组(q 分别为 -38.32, -22.21,

表 1 PTSD 组与正常对照组僵立行为及 EPM 测试比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	僵立时间(s)		EPM 实验			
		24h	7d	OE24h(次)	OE7d(次)	OT24h(s)	OT7d(s)
PS 组	10	57.88 ± 10.46	89.13 ± 8.60 ^a	7.88 ± 1.67	4.25 ± 1.26 ^a	30.75 ± 5.55	12.38 ± 3.30 ^a
CS 组	10	44.50 ± 11.11	22.25 ± 5.85	13.88 ± 2.77	14.38 ± 2.18	46.88 ± 4.74	40.38 ± 7.29

注:经 Post-hoc 检验,与正常对照组比较,^a $P < 0.01$

-33.38, $P < 0.05$), 其余各组间训练后 CPP 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 仅 PE 组训练前后 CPP 值差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 其余各组训练前后的 CPP 值均差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组间训练前和训练后 CPP 值的比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	训练前(s)	训练后(s)	q 值	P 值
PTSD + 酒精组	10	-4.18 ± 7.00	83.83 ± 11.28 ^a	31.81	< 0.01
正常对照 + 酒精组	10	8.62 ± 8.29	26.61 ± 11.27	1.53	> 0.05
PTSD + 生理盐水组	10	7.13 ± 10.27	5.76 ± 13.71	0.01	> 0.05
正常对照 + 生理盐水组	10	4.08 ± 9.24	-1.06 ± 10.53	0.27	> 0.05

注:经 Post-hoc 检验

二、各组大鼠杏仁核多巴胺 D1 受体阳性细胞表达 IHS 评分的比较

经单因素方差分析,结果显示四组大鼠杏仁核的多巴胺 D1 受体阳性细胞 IHS 的差异均无统计学意义 ($F = 0.07$, $P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠杏仁核多巴胺 D1 受体阳性细胞表达 IHS 评分的比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	杏仁核
PTSD + 酒精组	10	3.60 ± 2.01
正常对照 + 酒精组	10	3.90 ± 1.79
PTSD + 生理盐水组	10	3.50 ± 2.01
正常对照 + 生理盐水组	10	3.70 ± 2.36

讨 论

本研究发现 PTSD 组与正常对照组间 24h 时僵立时间、OE 及 OT 成绩无显著性差异,而 7d 时 PTSD 组僵立时间明显延长,OE 和 OT 显著减少,表明 PTSD 组大鼠恐惧记忆及焦虑情绪具有显著延迟的特点,符合 PTSD 患者恐惧记忆增强、闪回等症状的发作特征,证实 PTSD 模型建立成功,与以往研究结果相一致^[10]。

成年 SD 大鼠对酒精奖赏效应敏感性差,很难形成酒精 CPP,并且会产生剂量依赖性的条件性位置偏好^[11]。本研究结果显示,CE 组与 CS 组训练后 CPP 值差异无统计学意义,说明正常成年 SD 大鼠未形成酒精 CPP,而 PE 组训练后 CPP 值明显高于 PS 组,表明 PTSD 样大鼠形成了酒精 CPP;且高于 CE 组训练后 CPP 值,提示 PTSD 模型对大鼠酒精 CPP 的形成具有促进作用。本研究与 Der-Avakian 等^[7]研究结果略有不同,后者认为无法逃避的应激可能促进 SD 大鼠形成羟可酮 CPP,但并不影响酒精 (1g/kg, 2g/kg) CPP 的获得。这可能与不同的应激源有关。与既往研究^[12]

采用急性足底电击、慢性食物剥夺等急、慢性应激模型成功训出酒精 CPP 不同,本研究采用 SPS 方式建立的 PTSD 模型证实了 PTSD 对酒精 CPP 的形成具有诱导作用,从实验动物学角度证实了临床上常见的 PTSD 患者易合并酒精依赖的现象^[1]。

应激可激活促肾上腺皮质激素释放因子和儿茶酚胺共同释放,从而增加边缘区域 DA 释放。中脑边缘部位多巴胺能系统组成了脑奖赏回路,对于物质奖赏效应起重要作用。DA 系统 (D1 受体) 参与调节应激对酒精奖赏效应的敏化作用^[13], 根据这一机制,本研究采用免疫组化的方法检测杏仁核 D1 受体的表达,结果显示,PE 组与其他对照组 (PS 组、CE 组以及 CS 组) 比较杏仁核 D1 受体阳性细胞 IHS 无明显差异。PTSD 作为应激反应的一种特殊形式,DA 反应水平增高也可能与临床症状具有类似的延迟反应特点^[14], 类似于 D1 受体激动剂能够激活酒精的摄入及偏爱现象。本研究结果提示 PTSD 对酒精 CPP 的形成与脑内多巴胺 D1 受体数量无明显关系,这可能与 DA 释放增加有关。另外,尚需大样本进一步研究加以证实。

参 考 文 献

- [1] Soderpalm AH, de Wit H. Effects of stress and alcohol on subjective state in humans. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002, 26: 818-826.
- [2] Overstreet DH, Knapp DJ, Breese GR. Similar anxiety-like responses in male and female rats exposed to repeated withdrawals from ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004, 78: 459-464.
- [3] de Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, et al. Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*, 2011, 95: 305-310.
- [4] Mashhoon Y, Tsikitas LA, Kantak KM. Dissociable effects of cocaine-seeking behavior following D1 receptor activation and blockade within the caudal and rostral basolateral amygdala in rats. *Eur J Neurosci*, 2009, 29: 1641-1653.
- [5] Der-Avakian A, Bland ST, Rozeske RR, et al. The effects of a single exposure to uncontrollable stress on the subsequent conditioned place preference responses to oxycodone, cocaine, and ethanol in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 2007, 191: 909-917.
- [6] Cunningham CL, Clemons JM, Fidler TL. Injection timing determines whether intragastric ethanol produces conditioned place preference or aversion in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 72: 659-668.
- [7] Wang W, Liu Y, Zheng H, et al. A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder. *Neurosci Lett*, 2008, 441: 237-241.
- [8] Iwamoto Y, Morinobu S, Takahashi T, et al. Single prolonged stress increases contextual freezing and the expression of glycine transporter 1 and vesicle-associated membrane protein 2 mRNA in the hippocampus of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2007, 31: 642-651.
- [9] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, 2000, 89: 2637-2645.
- [10] 晋翔, 谭庆荣, 王化宁, 等. 氟西汀对大鼠创伤后应激障碍预防作用的实验研究. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2010, 19: 389-391.
- [11] Philpot RM, Badanich KA, Kirstein CL. Place conditioning: age-related changes in the rewarding and aversive effects of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 2003, 27: 593-599.
- [12] 宋美, 翟海峰, 王学义, 等. 酒精条件性位置偏爱效应及其影响因素. *中国药物依赖性杂志*, 2007, 16: 321-325.
- [13] Matsuzawa S, Suzuki T. Psychological stress and rewarding effect of alcohol. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 2002, 37: 143-152.
- [14] 张黎明, 张有志, 李云峰. 创伤后应激障碍的神经生物学研究进展. *中国药理学通报*, 2010, 26: 703-707.

(收稿日期: 2011-08-15)

(本文编辑: 冯学泉)