

[论著]

不同频率电刺激 VTA 对吗啡成瘾大鼠 ACbSh 的放电活动的影响^{*}

王 军^{1**} 马 羽² 王 丹³ 贾媛媛¹ 高东明^{1***}

¹ (辽宁医学院生理学教研室, 锦州, 121001)

² (首都医科大学附属天坛医院神经外科, 北京, 100050)

³ (辽宁医学院附属第一医院, 锦州, 121001)

摘要 目的: 观察电刺激大鼠腹侧被盖区 (VTA) 对吗啡成瘾大鼠伏隔核壳部 (ACbSh) 神经元的影响, 为应用脑深部电刺激治疗阿片类药物成瘾提供实验依据。方法: 采用单管玻璃微电极细胞外记录法, 观察不同频率电刺激 VTA 对吗啡成瘾大鼠 ACbSh 神经元放电的影响。结果: 低频 (50 Hz) 电刺激 VTA, 吗啡组 ACbSh 神经元主要表现为无反应 (47.83%); 高频 (135 Hz) 电刺激 VTA, 吗啡组多数 ACbSh 神经元表现为抑制性作用 (50.00%)。结论: 高频电刺激 VTA 有可能作为新方法用于治疗阿片类药物成瘾。

关键词 脑深部电刺激; 吗啡; 腹侧被盖区; 伏隔核壳部

EFFECTS OF DIFFERENT FREQUENCIES OF ELECTRICAL STIMULATION TO VENTRAL TEGMENTAL AREA ON NEURONAL ACTIVITIES OF ACCUMBENS NUCLEUS SHELL IN RATS

WANG Jun¹, MA Yu², WANG Dan³, JIA Yuanyuan¹, GAO Dongming¹

¹ (Department of Physiology, Liaoning Medical University, Jinzhou, 121001)

² (Department of Neurosurgery, Affiliated Tiantan Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing, 100050)

³ (First Affiliated Hospital of Liaoning College of Medicine, Jinzhou, 121001)

ABSTRACT *Objective:* To observe the effect of different frequencies of electrical stimulation to

- [17] Gilman JM, Bjork JM, Hommer DW. Parental alcohol use and brain volumes in early - and late - onset alcoholics[J]. Biol Psychiatry, 2007, 62(6): 607 - 615
- [18] Rangaswamy M, Porjesz B, Chorlian DB, et al Beta power in the EEG of alcoholics[J]. Biol Psychiatry, 2002, 52(8): 831 - 842
- [19] 孙九伶, 秦颖洁, 楚更五, 等. 慢性酒中毒病人认知功能障碍与脑电图变化 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2000, 9(2): 127 - 129
- [20] 王永彬, 穆俊林, 赵敏. 35例酒依赖患者认知状况的研究 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2003, 6(7): 607 - 608
- [21] 郭崧, 杜万君, 王援朝, 等. 酒依赖者认知功能障碍的事件相关电位研究 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2001, 10(4): 271 - 273
- [22] 徐鹤定, 陈俊, 闻晖, 等. 酒依赖的事件相关电位 P300实验研究 [J]. 上海精神医学, 2003, 15(3): 140 - 142
- [23] Coutin - Churchman P, Moreno R, Anez Y, et al Clinical correlates of quantitative EEG alterations in alcoholic patients[J]. Clin Neurophysiol, 2006, 117(4): 740 - 751
- [24] Chao LL, Meyerhoff DJ, Cardenas VA, et al Abnormal CNV in chronic heavy drinkers[J]. Clin Neurophysiol, 2003, 114(11): 2081 - 2095

收稿日期: 2009 - 03 - 30

修回日期: 2009 - 04 - 20

^{*} 中国博士后科学基金 (20070420399)

^{**} E - mail: Wutongye002@163.com

^{***} 通讯作者: E - mail: jzgaodm@163.com

Tel: 0416 - 4673239

ventral tegmental area (VTA) on neuronal activities of accumbens nucleus shell (ACbSh) of morphine - addicted rats, and provide references for the use of deep brain stimulation for the treatment of opiate addiction. **Methods:** Single - tube glass electrode extracellular recording method was used to observe the discharge changes for different frequencies of electrical stimulation to VTA on ACbSh of morphine - addicted rats. **Results:** Low - frequency (50 Hz) electrical stimulation to VTA, the ACbSh neurons of morphine - dependent rats mainly expressed no response (47.83%). While high - frequency (135 Hz) electrical stimulation to the VTA, the majority of ACbSh neurons of morphine - dependent rats showed inhibiting (50.00%). **Conclusion:** High - frequency (135 Hz) electrical stimulation to VTA may be a potential new method for the treatment of opiate addiction.

KEY WORDS deep brain stimulation (DBS); morphine; ventral tegmental area (VTA); accumbens nucleus shell (ACbSh)

阿片类药物(吗啡、芬太尼、可待因等)多用来治疗各种急性锐痛和晚期癌症的持续性疼痛。近年来,这类药物的不合理使用所导致的药物成瘾问题越来越突出,它不仅给患者带来了巨大的身心伤害,而且带来了严重的社会问题。治疗药物成瘾的方法大体包括药物治疗、心理治疗和脑定向损毁术治疗。传统的药物治疗在长期应用后能产生躯体、心理依赖和耐药性,具有很大的副作用。损毁手术虽能够帮助戒毒,但存在医疗隐患和医学伦理学问题。

目前对阿片类药物成瘾机制的研究主要集中在脑内奖赏系统。脑内奖赏系统的神经元通路起始于腹侧被盖区(VTA)的中脑多巴胺(DA)神经元并向边缘系统投射(包括伏隔核、杏仁核和海马)^[1]。从VTA到伏隔核的神经通路是众多阿片类药物成瘾的共同作用点,DA神经元的传出纤维由VTA投射到伏隔核壳部(ACbSh)^[2],直接影响ACbSh神经元放电活动。本文采用细胞外记录法,观察不同频率电刺激VTA,对ACbSh神经元放电活动的影响,以探索脑深部电刺激(DBS)VTA治疗阿片类药物成瘾的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康成年 Sprague - Dawley (SD)大鼠,辽宁医学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(辽)2008 - 0002,体重 220 - 250 g,分笼饲养,自然昼夜循环,非直接光照生活,通风良好,自由饮食、饮水。随机分为两组:对照组 20只,吗啡组 13只。

1.2 药品及试剂

盐酸吗啡注射液:东北制药集团沈阳第一制药厂生产(10 mg · ml⁻¹,批号:080403);盐酸纳洛酮

注射液:康哲(湖南)制药有限公司生产(0.4 mg · ml⁻¹,批准文号:H43021669);焦油紫:美国 Sigma公司;滂胺天蓝:美国 Sigma公司;氨基甲酸乙酯:沈阳化工试剂厂;多聚甲醛:沈阳化工试剂厂。

1.3 吗啡成瘾大鼠模型的建立

采用剂量递增法腹腔注射(ip)盐酸吗啡^[3],每天给3次,连续12 d(见表1),对照组则ip等量生理盐水。

末次注射吗啡2 h后,动物ip 5 mg · kg⁻¹的纳洛酮进行催促戒断,观察戒断症状20 min。戒断症状分为可数症状和不可数症状,可数症状包括齿颤、吞咽、站立、跳跃、湿狗样抖、伸展、清理皮毛,记录它们的次数。不可数症状包括上睑下垂、流涎。按戒断评分标准评分(见表2)。其中每2 min内评定1次上睑下垂,凡有接触惊叫大鼠均增加2分。评分在15分以上者确定为造模成功。

表1 吗啡给药剂量(mg · kg⁻¹)

时间	早	中	晚
d1	0	0	5
d2	5	5	10
d3	10	10	15
d4	15	15	20
d5	20	20	25
d6	25	25	30
d7	35	35	40
d8	45	45	50
d9	55	55	60
d10	65	65	70
d11	75	75	88
d12	85	85	90

表 2 戒断症状评分标准

症状	1分	2分	3分
湿狗样抖	1 - 3次	4 - 6次	>7次
伸展	1 - 3次	4 - 6次	>7次
清理皮毛	1 - 3次	4 - 6次	>7次
吞咽	1 - 5次	6 - 10次	>11次
站立	1 - 5次	6 - 10次	>11次
跳跃	1 - 3次	4 - 6次	>7次
齿颤	1 - 3次	4 - 6次	>7次
上睑下垂	1 - 4次	5 - 8次	>9次

1.4 电生理学方法

1.4.1 麻醉及手术 大鼠经 20%氨基甲酸乙酯 (8 ml · kg⁻¹体重) ip 麻醉后,固定于脑立体定位仪上。行常规开颅术,暴露脑组织,剥离硬脑膜,行小脑延髓池引流。

1.4.2 核团定位 根据《Paxinos & Watson大鼠脑图谱》,确定 VTA 与 ACbSh 的位置,见表 3。

表 3 VTA 与 ACbSh 的核团定位

核团	AP(mm)	ML(mm)	VD(mm)
VTA	- 6.30	0.5	8.00
ACbSh	1.6	0.8	5.6 - 7.7

1.4.3 神经元放电记录方法 采用单管玻璃微电极 (尖端直径 < 2 μm,电阻 5 M^Ω - 15 M^Ω,注入含 1% 涪胺天蓝的 3 mol · L⁻¹ NaCl 溶液) 进行细胞外记录。

1.4.4 电刺激方法 将双极同心圆电极 (NEX100, 外径 0.25 mm) 置于 VTA。电刺激由 A320 隔离电刺激器产生,经同心圆电极输出。刺激参数:刺激频率分别为低频 (50 Hz) 和高频 (135 Hz),波宽 0.06 ms,刺激强度为 0.4 mA,刺激时程 5 s。

1.5 组织学检测

每次实验结束后,经单管玻璃微电极通以 - 20 μA 的电流 20 min,将涪胺天蓝泳入核团内,标记放电部位。然后用含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液灌流固定,迅速取出完整脑组织,行连续冠状冰冻切片,片厚 30 μm,焦油紫染色。光镜下观察,只有刺激和记录部位都正确的神经元才能进行统计分析 (见图 1)。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。放电频率的比较用 *t* 检验,放电

形式和构成比的比较用 χ^2 检验。

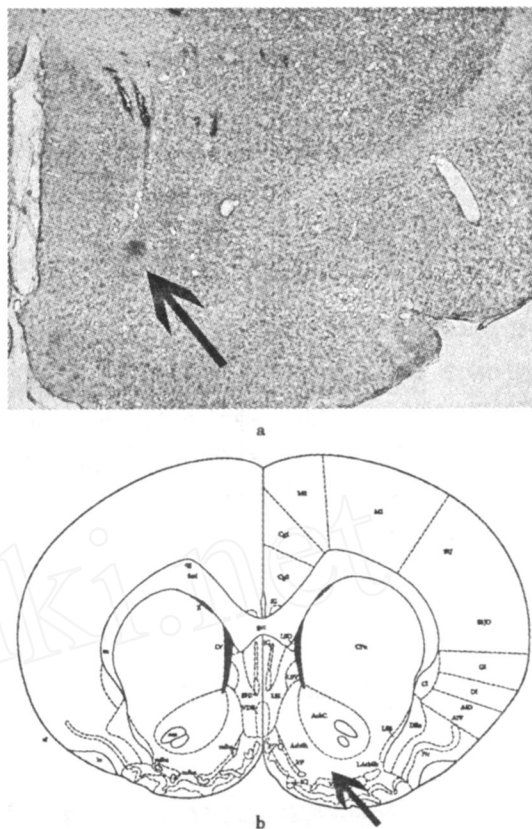


图 1 大鼠脑冠状切片定位图

a: 大鼠脑冠状冰冻切片,图中箭头所示为用涪胺天蓝标记的放电部位,放大倍数 4 × 10。 b: 《Paxinos & Watson 大鼠脑图谱》,图中箭头所示为与涪胺天蓝标记点对应的位置

2 结果

2.1 吗啡成瘾大鼠的行为学观察

13 只大鼠 ip 盐酸吗啡,除有 2 只因个体差异造成药物过量致死外,其余均观察到戒断症状。主要戒断症状表现为站立、齿颤、上睑下垂,同时多伴有伸展、清理皮毛等行为。戒断症状评分平均为 19 分。

2.2 大鼠 ACbSh 神经元自发放电活动

实验中共记录了对照组大鼠 39 个神经元和吗啡组大鼠 46 个神经元自发放电。对照组大鼠 ACbSh 神经元平均放电频率为 3.14 Hz ± 4.21 Hz,吗啡组大鼠 ACbSh 神经元的平均放电频率为 19.34 Hz ± 12.14 Hz,比对照组显著增高 (*P* < 0.05)。吗啡组大鼠 ACbSh 神经元出现 3 种放电形式:规则放电、不规则放电和爆发式放电 (见图 2)。吗啡组大鼠 ACbSh 神经元不规则放电神经元构成比明显增多,而对照组大鼠 ACbSh 神经元则以规则放电和不规则放电为主 (见表 4),差异显著 ($\chi^2 = 11.12, P < 0.05$)。

表 4 对照组和吗啡组 ACbSh 神经元自发放电形式

放电形式	对照组	吗啡组	合计
规则放电	15	8	23
不规则放电	13	32	45
爆发式放电	11	6	17
合计	39	46	85

2.3 不同频率电刺激 VTA 对 ACbSh 神经元放电的影响

实验中共观察了对照组 39 个 ACbSh 神经元与吗啡组 46 个 ACbSh 神经元低频 (50 Hz) 和高频 (135 Hz) 电刺激 VTA 对 ACbSh 神经元的影响。两组神经元在电刺激 VTA 后均出现兴奋、抑制和无反应 3 种形式。吗啡组 ACbSh 神经元在 50 Hz 电刺激 VTA 时以无反应为主 ($\chi^2 = 19.08, P < 0.05$), 135 Hz 电刺激 VTA 时抑制作用明显 ($\chi^2 = 7.70, P <$

0.05); 对照组 ACbSh 神经元的放电频率在 50 Hz 电刺激 VTA 时以兴奋为主, 135 Hz 电刺激 VTA 时以抑制为主 (见表 5, 图 3, 图 4)。

表 5 50 Hz 与 135 Hz 电刺激 VTA 对 ACbSh 神经元放电活动的影响

	对照组 (n=39)		吗啡组 (n=46)	
	n	%	n	%
50 Hz				
兴奋	23	58.97	14	30.43
抑制	14	35.90	10	21.74
无反应	2	5.13	22	47.83
135 Hz				
兴奋	14	35.90	9	19.57
抑制	22	56.41	23	50.00
无反应	3	7.69	14	30.43

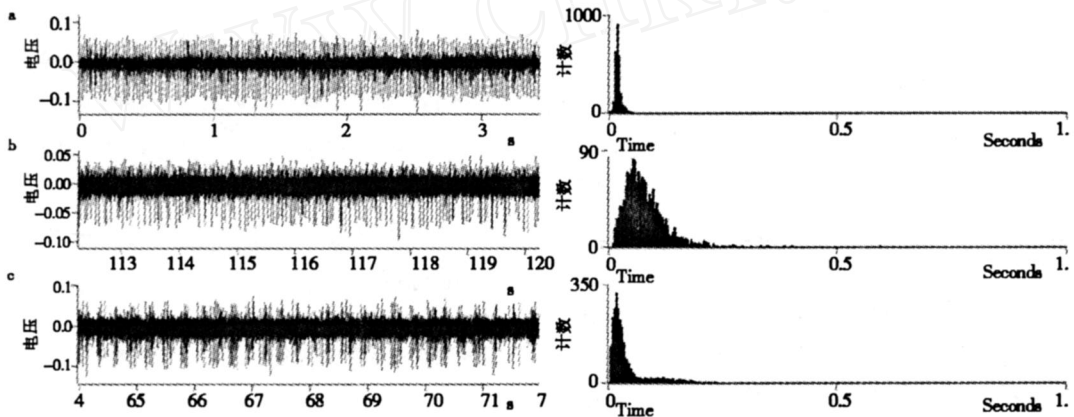


图 2 吗啡组大鼠 ACbSh 神经元自发放电活动

左侧: ACbSh 神经元自发放电波形图, 右侧: ACbSh 神经元自发放电时间直方图 a: 规则放电 b: 不规则放电 c: 爆发式放电

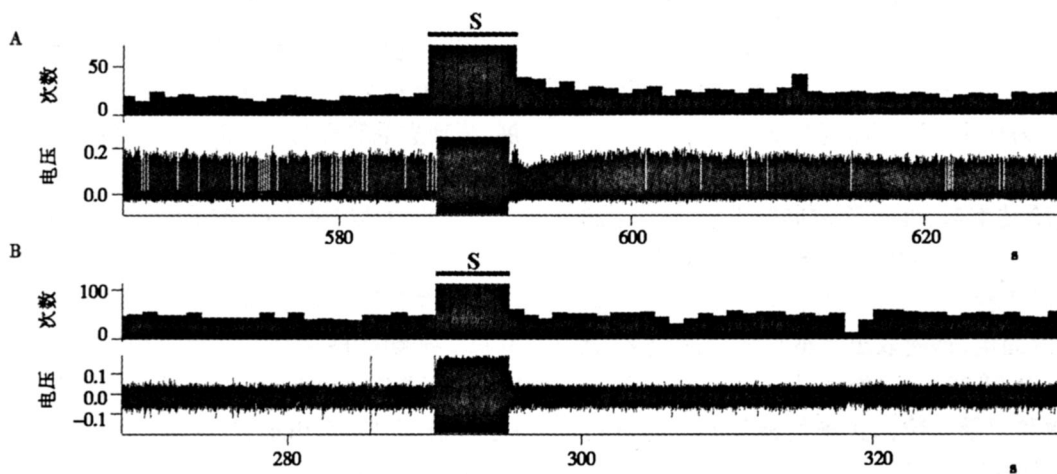


图 3 低频 (50 Hz) 电刺激 VTA 对两组大鼠 ACbSh 神经元放电活动的影响

A: 低频电刺激 VTA 引起对照组大鼠 ACbSh 神经元放电频率增加 B: 低频电刺激 VTA 对吗啡组大鼠 ACbSh 神经元放电频率无影响 S: 50 Hz 低频电刺激过程

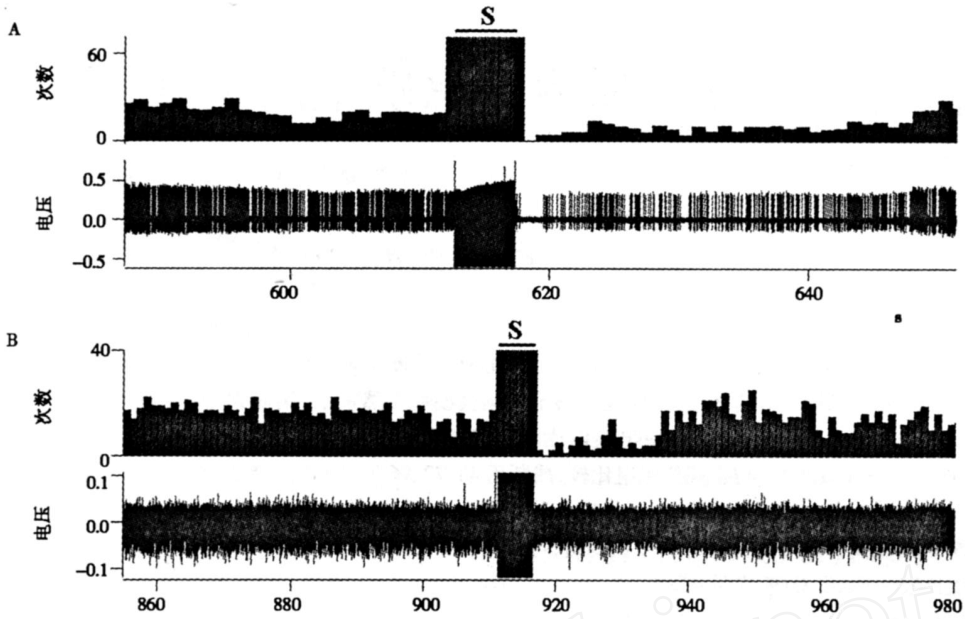


图 4 高频 (135 Hz)电刺激 VTA 对两组大鼠 ACbSh 神经元放电活动的影响

A:高频电刺激 VTA 引起对照组大鼠 ACbSh 神经元放电频率降低 B:高频电刺激 VTA 吗啡组大鼠 ACbSh 神经元放电频率降低 S: 135 Hz 高频电刺激过程

3 讨论

阿片类药物成瘾的脑内奖赏作用,主要涉及中脑边缘多巴胺系统。大量资料表明,VTA 和 ACbSh 在这一系统中起重要作用,ACbSh 神经元主要含有 DA D₁和 D₂受体,接受来自 VTA 的 DA 能神经元投射纤维。

研究结果显示,吗啡组大鼠 ACbSh 神经元的自发放电频率及放电形式与对照组相比具有显著性差异,吗啡组 ACbSh 神经元的自发放电频率比较高,放电形式以不规则为主。这可能与吗啡增加 ACbSh 中神经元 DA 含量有关。吗啡抑制 VTA 中 -氨基丁酸 (GABA)能神经元,减少了 GABA 的释放,DA 能神经元脱抑制^[4],使投射到 ACbSh 中的 DA 能纤维活动增强,而对照组 VTA 中的 GABA 神经元紧张性抑制了 DA 能神经元,导致释放到 ACbSh 中的 DA 减少^[5];此外,吗啡也可能提高了伏隔核及缝际背核支配脑区的 5-羟色胺水平,进而导致 ACbSh 中的 DA 增加^[6]。

本文结果亦显示,不同频率电刺激 VTA 对大鼠 ACbSh 神经元的放电活动的影响不同。电生理实验证实吗啡依赖大鼠觅药行为与 VTA 内 DA 神经元电活动直接相关^[7],低频电刺激 VTA 后 ACbSh 多数神经元放电频率未发生较大改变,初步推测可能的原因为,低频电刺激 VTA 可能未改变 VTA 中 GABA 能神

经元中 GABA 的释放,使得 DA 能神经元 DA 释放未发生变化。对照组低频电刺激 VTA 导致的 ACbSh 神经元放电频率的增高,则可能与 VTA 中的 GABA 能神经元降低或者失去了对 DA 能神经元的紧张性抑制,引起 ACbSh 神经元放电频率增高有关。高频电刺激 VTA,吗啡组和对照组在刺激后均观察到 ACbSh 神经元放电频率降低,产生抑制作用。我们推测:高频电刺激 VTA 可能激活了 VTA 中 GABA - B 受体,使 GABA - B 受体产生了 GABA - B 受体激动剂的效应,从而减少了 ACbSh 中神经元多巴胺的释放^[8]; White 等^[9]证实 ACbSh 中的神经元含有 DA, D₁和 D₂受体, D₂受体激动剂可使其中 75%的神经元产生抑制, D₁受体激动剂可使 38%的神经元产生抑制,而 ACbSh 中的神经元主要接收来自 VTA 中 DA 能神经元的投射纤维。本文结果显示高频电刺激产生了类似 DA 受体激动剂的效应。目前研究发现,DA 受体激动剂可能是治疗阿片类药物成瘾的有效方法^[7]。而高频电刺激 VTA 与 DA 受体激动剂的某些相似性作用则使高频电刺激 VTA 有可能成为治疗阿片类药物成瘾的新方法。

总之,吗啡成瘾是多个神经递质与受体相互作用的结果,目前的研究也只是取得一些初步的进展,应用 DBS 治疗阿片类药物成瘾的机制仍需进一步探讨。

4 参考文献

[1] Cam ū, Farr ĘM. Drug addiction[J]. N Engl J Med, 2003, 349(10): 975 - 986

[论著]

大鼠吗啡依赖戒断后焦虑模型的建立和评价^{*}

高家林^{**} 罗素元^{1***} 何继锋¹ 黄彬² 田艳¹ 汤贤春¹

¹ (遵义医学院细胞生物与遗传学教研室, 遵义, 563003)

² (遵义医学院药理学教研室, 遵义, 563003)

摘要 目的:利用高架十字迷宫建立大鼠吗啡戒断后焦虑模型。方法:342只大鼠按给药总时间的不同,随机分为7、10、14 d 3大组。每大组各 114只,按戒断时间的不同再分设戒断 0、24、48、72、96、120、144 h,丁螺环酮治疗、生理盐水对照共 9小组。采用剂量递增法给药,建立吗啡依赖模型后自然戒断,用高架十字迷宫观察各组大鼠焦虑行为。结果:(1)7 d大组,戒断后 48 h表现出焦虑症状,与生理盐水组比较,其 OE、OT、OE%、OT% 4项指标均下降 ($P < 0.05$)。 (2)10 d大组,与生理盐水组比较,戒断后 48、72、96 h均表现出焦虑症状 ($P < 0.05$),其中又以 72 h组最为显著,OE、OT、OE%均明显下降 ($P < 0.01$);丁螺环酮治疗组与戒断 72 h组比较,其 OE、OT、OT%均增高 ($P < 0.05$),OE%显著增高 ($P < 0.01$)。 (3)14 d给药组,与 10 d给药组相类似,典型的焦虑症状也出现在戒断后 72 h,与生理盐水组比较,OE、OT、OT%均明显降低 ($P < 0.01$),OE%降低 ($P < 0.05$);丁螺环酮组与戒断 72 h组比较,OE%、OT、OT%均明显增高 ($P < 0.01$),OE增高 ($P < 0.05$)。结论:吗啡持续给药 7、10、14 d大鼠通过自然戒断均能成功建立吗啡戒断后焦虑模型,但以 10 d戒断 72 h为最佳。该模型可较为客观和准确地反映吗啡依赖戒断后焦虑行为。

关键词 吗啡戒断;焦虑模型;高架十字迷宫

ESTABLISHMENT AND EVALUATION ON ANXIETY MODEL OF MORPHINE - WITHDRAWAL RATS

GAO Jialin¹, LUO Suyuan¹, HE Jifeng¹, HUANG Bin², TIAN Yan¹, TANG Xianchun¹

¹ (Department of Cell Biology and Genetics, Zunyi Medical College, Zunyi, 563003, China)

² (Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi, 563003, China)

ABSTRACT *Objective:* To establish an anxious model of morphine - withdrawal in rats, based

[2] Liu HY, Jin J, Tang JS, et al. Chronic deep brain stimulation in the rat nucleus accumbens and its effect on morphine reinforcement[J]. Addict Biol, 2008, 13(1): 40 - 46

[3] 纪家涛,王新华,由振东,等. 吗啡依赖大鼠模型的建立 [J]. 第二军医大学学报, 1997, 18(1): 81 - 82

[4] 杜江,赵敏,谢斌. -氨基丁酸在物质滥用中的作用机制 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2006, 12(2): 92 - 95

[5] Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons[J]. J Neurosci, 1992, 12(2): 483 - 488

[6] 陈清山. 与阿片类药物成瘾相关的神经递质及受体 [J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2008, 21(6): 370 - 372

[7] 王惠玲,赵晏. 阿片类药物依赖与中脑 - 边缘多巴胺系统回路 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2003, 12(1): 2 - 5

[8] B rebner K, David C. A potential role for GABA agonists in the treatment of psychostimulant addiction[J]. Alcohol Alcohol, 2002, 37(5): 478 - 484

[9] White FJ, Wang RY. Electrophysiological evidence for the existence of both D - 1 and D - 2 dopamine receptors in the rat nucleus accumbens[J]. J Neurosci, 1986, 6(1): 274 - 280

收稿日期: 2009 - 07 - 04 修回日期: 2009 - 08 - 09

^{*}教育部科学技术重点项目 (06年度)基金 (206136);贵州省教委重点项目基金 (黔教科 2005109)

^{**} E - mail: gaojialin1981@126.com

^{***} 通讯作者: E - mail: swx_100@163.com

Tel: 13984276456