

吗啡诱导条件位置性偏爱大鼠海马 CA1 区 NR2A、NR2B 的变化

邵晓霞¹⁾, 李洁¹⁾, 何繁漪¹⁾, 谢海萍²⁾, 赵永娜¹⁾

(1) 昆明医科大学药学院; 2) 昆明医科大学国际教育学院, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 检测吗啡诱发条件位置性偏爱 (conditioned place preference, CPP) 大鼠海马 CA1 区 NMDA 受体亚型 NR2A、NR2B 的变化, 探讨 NR2A、NR2B 在吗啡精神依赖形成过程的作用与可能机制. **方法** 采用恒量法 (10mg/kg) 连续颈背部皮下注射 (subcutaneous, SC) 吗啡 8 d 建立大鼠 CPP 模型. 采用免疫组化法测定海马 CA1 区 NR2A、NR2B 的表达. **结果** SC 10 mg/kg 吗啡 8 d 建立大鼠 CPP 模型, 吗啡组海马 CA1 区 NR2A 表达与生理盐水组比较无显著性变化 ($P > 0.05$), 而 NR2B 表达较生理盐水对照组增加 ($P < 0.05$). **结论** 吗啡诱导大鼠 CPP 海马 CA1 区 NR2B 表达增加, NR2B 可能参与吗啡诱导 CPP 形成.

[关键词] 吗啡; 条件位置性偏爱; 海马 CA1 区; NR2A

[中图分类号] R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 06 - 0017 - 04

Changes in Protein Expression of NR2A and NR2B Subunit in Hippocampal CA1 of Morphine-induced CPP Rats

SHAO Xiao-xia¹⁾, LI Jie¹⁾, HE Fan-yi¹⁾, XIE Hai-ping²⁾, ZHAO Yong-na¹⁾

(1) School of Pharmaceutical Science, Kunming Medical University; 2) International Education School, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To detect the changes of NMDA receptor subunit NR2A and NR2B in hippocampal CA1 area of morphine-induced CPP rats and explore the function and possible mechanism of NR2A and NR2B in morphine psychological dependence. **Methods** Morphine was administered via subcutaneous injection at constant dose (10 mg/kg) for 8 days to establish morphine CPP. The expression of NR2A and NR2B in hippocampal CA1 was detected by immunohistochemistry. **Results** CPP model was established successfully after injection of morphine (10 mg/kg) for 8 days. Compared with the saline group, the expression of NR2A had no significant difference ($P > 0.05$), while the expression of NR2B increased in the morphine group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of NR2B receptor increased in hippocampal CA1 area of morphine-induced CPP rats, and NR2B may involve in the establishment of CPP model induced by morphine.

[Key words] Morphine; Conditioned place preference; Hippocampal CA1; NMDA receptor; NR2A

阿片类药物所致的精神依赖及机制较复杂, 至今尚不明确. 笔者的研究发现吗啡诱导的 CPP 阶段大鼠海马 CA1 神经元出现由缺血、缺氧所致的变性、坏死和凋亡以及线粒体、内质网的损害^[1], 提示海马 CA1 神经元出现缺血、缺氧病变可能与吗啡精神依赖形成有关. N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体是一类中枢神经系统兴奋性谷氨酸

受体, NR2 是调节 NMDA 受体特性的亚基, 有 4 种亚型, NR2A、NR2B、NR2C 与 NR2D. 神经系统缺血缺氧时, 谷氨酸通过 NMDA 受体产生兴奋毒性, 引起神经元损伤^[2]. 有研究表明: NR2A、NR2B 的含量降低对脑缺血再灌注后海马神经细胞有明显的保护作用, NR2A、NR2B 在脑缺血时有神经毒性作用^[3]. 本研究通过探讨 NMDA 受体亚型

[基金项目] 云南省应用基础研究计划面上项目 (2006C0037Q)

[作者简介] 邵晓霞 (1982~), 女, 山西运城人, 硕士, 药师, 主要从事药品药物研究的工作.

[通讯作者] 赵永娜. E-mail: mszhaoyan@yahoo.com.cn

(NR2A、NR2B) 在吗啡诱发 CPP 大鼠海马 CA1 中表达的变化, 探讨 NR2A、NR2B 在吗啡精神依赖形成过程中的作用和可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雄性健康 SD 大鼠 (由昆明医科大学实验动物科提供、体重 (200 ± 10) g, 16 只, 合格证号: SCXK 滇 2005 - 0008。将 16 只 SD 大鼠按随机化原则分为生理盐水组和吗啡组, 每组 8 只。分笼喂养, 自由摄食、饮水。

1.2 实验仪器和试剂

HANNA pH211 台式酸度计 (意大利); 电热恒温培养箱 ($5 \sim 60^{\circ}\text{C}$) (上海跃进医疗器械厂); DZKW-D-L 电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器厂); BOSCH 电子天平 SAE200 (德国); REVC 超低温冰箱 (美国); 冰冻切片机 KY980288 (英国); Olympus 光学显微镜 BH-2 (日本); PixeLINK S/N80284 显微采图系统 (同济医科大学千屏影像工程公司); MiVnt 显微图象分析系统 (同济医科大学千屏影像工程公司)。

CPP 实验装置: CPP 装置包括 2 个 PVC 材料的穿梭盒 (长 \times 宽 \times 高 = $25\text{ cm} \times 35\text{ cm} \times 30\text{ cm}$), 两者有中间区连接 (长 \times 宽 \times 高 = $20\text{ cm} \times 15\text{ cm} \times 30\text{ cm}$)。其中 1 个箱子的底面为光滑的塑胶板, 墙面为水平的黑白相间的条纹; 另 1 个箱子的底面为粗糙的塑胶板, 墙面为垂直的黑白相间的条纹。中间区的底面为钻孔的塑胶板, 其两侧可移动挡板, 用以阻止动物的穿梭, 将其限制在 1 个箱子中。在整个实验过程中保持箱内的光线、色调、气味等环境条件的一致。

盐酸吗啡 (morphine hydrochloride, Mor) 批号: 951030, 青海制药厂; NR2A (鼠多抗) 批号: 0607036590 Chemicon, USA; NR2B (兔单抗) 批号: LV1350852 Chemicon, USA; S-P 即用型超敏试剂盒 (Kit-9720) 批号: 801169720 福州迈新生物技术开发公司。

1.3 吗啡 CPP 形成模型的建立

预测试期 (天然偏爱测试阶段): 建立 CPP 前, 第 1 天上午 8:00, 将实验箱隔板取走, 让大鼠自由在实验箱两侧适应观察 15 min, 第 2、3、4 天让大鼠在箱子内自由走动 15 min (900 s), 并记录其在两侧各停留的时间, 确定大鼠偏好倾向。以非天然偏好侧为伴药箱, 另一侧为非伴药箱。

吗啡 CPP 建立: 应用吗啡训练大鼠, 通过训

练使其对伴药箱产生条件反射。在此期间用隔板封闭两箱通道, 吗啡组上午 8:00 吗啡 (10 mg/kg , SC)、下午 16:00SC 等体积生理盐水, 每天各 1 次, 注射后分别交替放入伴药箱和非伴药箱训练 50 min; 生理盐水对照组除将吗啡替换为生理盐水外, 其余处理相同。连续训练 8 d。第 9 d 进行 CPP 测试: 将隔板打开, 大鼠未作任何处理放于两盒交界处, 让大鼠在箱子内自由走动 15 min (900 s), 并记录其在两箱停留的时间。

1.4 免疫组化程序及图像处理

CPP 测试后, 大鼠 (含吗啡组和生理盐水对照组) 用 20% 的乌拉坦 ($5\text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{ip})$) 腹腔注射麻醉, 麻醉生效后, 用 $100 \sim 150\text{ mL}$ 肝素生理盐水及 4% 多聚甲醛经主动脉插管灌注固定, 取大脑并经 4% 多聚甲醛后固定。然后, 依次进入 15%、30% 蔗糖 PBS 液脱水, 再置于 4°C 的冰箱内过夜直到沉底后取出。以嗅沟后缘和大脑脚后缘为界将全脑冠状切为 3 块组织, 大脑脚后的脑桥和延髓又从正中矢状切开。用液氮冻存, 放入恒温冰冻切片机连续冠状切片, 片厚 $15\text{ }\mu\text{m}$, 根据 Paxinos 和 Watson^[4] 大脑解剖图谱收集包含海马区的切片于 0.01 mol/L 的磷酸钠盐缓冲液中, 而后将切片粘贴于明胶处理过的载玻片上, 烘干后超低温冰箱中保存以备 SP 免疫组化使用。用 PixeLINKS/N80284 显微采图系统对大鼠海马 CA1 区的免疫反应阳性物进行采图, MiVnt 显微图象分析系统分别测量其平均灰度值。光密度 (Optical Density, OD) 又称吸光度, 是反映物质吸收光的多少的物理量, 如果该物质对应的数字图象的灰度 (Grey Level) 用 GL 表示, 光密度则表示为: $\text{OD} = -\lg(\text{GL}/255) = \lg(255/\text{GL})$ 。根据朗伯-比耳 (Lambert-Beer) 定律: 物质的光密度与物质的浓度成正比, 与灰度值成反比。所以测出的灰度值越大, 代表所测物质浓度越小; 反之物质浓度越大。

1.5 统计学处理

实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并用 SPSS 软件包进行方差分析, 方差齐性检验、样本均数间的两两比较 (q 检验)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吗啡诱导 CPP 形成大鼠行为学变化

经过 8 d 的训练, 吗啡组大鼠在伴药箱停留时间显著长于生理盐水对照组 [(428.8 ± 130.2) , (279.4 ± 108.6) , $P < 0.01$, $n = 8$], 提示吗啡组大

鼠已对伴药箱产生 CPP 效应, 吗啡诱导的大鼠 CPP 模型建立, 见表 1.

2.2 吗啡诱导 CPP 形成海马 CA1 区 NR2A、NR2B 表达的变化

吗啡组海马 CA1 区 NR2A 表达与生理盐水组比较无显著性变化 ($P > 0.05$). 而 NR2B 表达较生理盐水对照组增加 ($P < 0.05$), 见表 2.

表 1 CPP 测试时各组大鼠在伴药箱停留时间 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Time spent in the morphine-paired chamber test for CPP in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间 (s)
生理盐水对照组	279.4 ± 108.6
吗啡组	428.8 ± 130.2*

与生理盐水对照组比较, * $P < 0.05$.

表 2 吗啡 CPP 形成时海马 CA1 区 NR2A 及 NR2B 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Changes in the protein levels of NR2A and NR2B subunits in hippocampus CA1 following the morphine-conditioning ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NR2A	NR2B
生理盐水对照组	8	172.23 ± 4.64	171.28 ± 5.90
吗啡组	8	171.56 ± 3.64	163.47 ± 4.22**

与生理盐水对照组比较, ** $P < 0.01$.

3 讨论

条件位置性偏爱评价药物精神依赖性最方便、最常用的实验, 其基本原理是将特定的环境刺激与具有奖赏效应的某种药物搭配, 使动物把环境刺激与药物的奖赏效应联系起来, 经过一段时间的训练后, 动物会偏爱停留在给予药物奖赏的环境中, 与药物依赖者的觅药行为相似. 目前条件位置性偏爱广泛用于评估药物的奖赏效应^[6]. 海马 CA1 区与学习、记忆密切相关, 参与成瘾行为的病理性学习和记忆的形成, 是产生药物精神依赖的重要脑区. 本实验采用恒量法, 以 10 mg/kg 的剂量连续予大鼠颈背部皮下注射 (subcutaneous, SC) 吗啡 8 d, 吗啡组大鼠在伴药箱的停留时间显著增长, 表明大鼠 CPP 模型建立成功.

本实验用免疫组化方法对吗啡精神依赖形成中海马 CA1 区 NR2A 和 NR2B 表达的研究发现, 在吗啡诱导 CPP 建立过程中, 与生理盐水组比较吗啡组海马 CA1 区 NR2A 表达无明显的变化. 有人用 Western Blot 的方法显示了吗啡身体依赖大鼠 NAc 的 NR1、NR2A 表达增加, 在 PFC 和海马的

NR1、NR2A 表达减少, 而在上述脑区 NR2B 无变化^[6]. 这可能与 NR2A、NR2B 在不同脑区有不同的作用以及实验所使用吗啡依赖模型的不同有关.

侧脑室注射特异性 NR2B 抗体能阻断吗啡诱导的 CPP 的形成, 而相应的特异性 NR1 和 NR1A 的抗体则无此作用^[7]. Narita、Suzuki 等研究表明 NAc 区内 NR2B 在吗啡奖赏效应中起作用, 在 CPP 形成中 NAc 区内 NR2BmRNA 表达高于 NR2A. 利用抗体对抗 NR2B 能消除 CPP 表达, 而 NR1 和 NR2 则不能, 表明 NAc 区 NR2B 亚单位在吗啡心理依赖的建立和表达中起重要作用^[8]. 本实验结果显示吗啡诱导 CPP 形成后, 大鼠海马 CA1 区 NR2B 表达增加, 与上述结果相似, 提示海马 CA1 区 NR2B 亚单位参与吗啡诱导 CPP 形成.

吗啡诱导 CPP 形成除了依赖多巴胺能传递外, 还与激活 NMDA 受体有关^[9]. NR2B 被蛋白激酶 C 和酪氨酸激酶磷酸化的位点位于 NR2B 的羟基末端^[10,11], 酪氨酸激酶对 NR2B 亚基的磷酸化对调节 NMDA 依赖的神经元可塑性起重要作用^[12], 故可以认为由吗啡导致的 NR2B 的磷酸化可增加中脑边缘多巴胺系统的兴奋性, 从而导致吗啡的精神依赖. NR2B 的增加, 可能是通过药物奖赏效应与药物相关联的环境线索导致成瘾相关记忆的重新唤起来参加吗啡精神依赖的形成.

本研究结果表明, 大鼠 CA1 区参与吗啡诱导 CPP 的形成可能是通过增加 NR2B 表达来调节的.

[参考文献]

- [1] 邵晓霞,赵永娜,李树清,等. 吗啡诱导CPP建立和消退大鼠海马CA1区超微结构变化的研究[J]. 昆明医学院学报,2011,6(32):22-26.
- [2] DIMAGL U,IADECOLA C,MOSKOWITZ M A. Pathobiology of ischemic stroke:an integrated view [J]. Trends Neurosci,1999,22(9):391-397.
- [3] 张亚峰,裴冬生,张光毅. NMDA受体NR2A,NR2B亚基对大鼠脑缺血再灌注海马CA1区神经细胞损伤的作用[J]. 江苏医药,2009,35(1):81-83.
- [4] TRUJILLO K A,AND AKIL H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK801[J]. Science,1991,251(4989):85-87.
- [5] TZSCHENTKE T M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues [J]. Prog Neurobiol,1998,56(6):613-672.
- [6] MURRAY F,HARRISON N J,GRIMWOOD S,et al. Nucleus accumbens NMDA receptor subunit expression and function is enhanced in morphine-dependent rats[J]. Eur

- J Pharmacol, 2007, 562(3): 191-197.
- [7] NESTLER E J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction [J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(12): 119 - 128.
- [8] NARITA M, AOKI T, SUZUKI T. Molecular evidence for the involvement of NR2B subunit containing N-methyl-aspartate receptors in the development of morphine-induced place preference [J]. Neuroscience, 2000, 101(3): 601 - 606.
- [9] RIBERIO DO CB, AGUILAR MA, MANZANEDO C, et al. NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference [J]. Brain Res Bull, 2005, 64(6): 493 - 503.
- [10] LAU L-F, HUGANIR R L. Differential tyrosine phosphorylation of N-methyl-d-aspartate receptor subunits [J]. Boil Chem, 1995, 270(34): 20 036 - 20 041.
- [11] WAGNER D A, LEONARD J P. Effect of protein kinase - C activation on the Mg^{2+} -sensitivity of cloned NMDA receptor [J]. Neuropharmacology, 1996, 35(1): 29 - 36.
- [12] ROSTAS J A, BRENT V A, VOSS K, et al. Enhanced tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of the N-methyl-d-aspartate receptor in long-term potentiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(19): 10 452 - 10 456.

(2013 - 04 - 01 收稿)

(上接第 11 页)

细胞的特性, 将控制病毒复制的基因及部分病毒复制非必须基因去除后可制成各种病毒载体。目前已开发的病毒载体主要有逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、单纯疱疹病毒载体等, 其中逆转录病毒载体及腺病毒载体最常用^[6]。

本实验选用腺病毒载体, 它具有宿主细胞广泛、可感染静止及分裂期细胞、繁殖滴度高、性质稳定、包装容量大及整合等优点, 而成为被广泛应用的病毒载体, 主要用于 in vivo 基因治疗研究。通过中间载体将 L- 蛋氨酸 - γ 裂解酶基因引入腺病毒载体中, 成功构建了 PLP-Ade-Metase-CMV 型重组腺病毒载体。这为体内实验, 体内实验及临床研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277 - 300.

- [2] KOKKINAKIS D M, WICK J B. Metabolic response of normal and malignant tissue to acute and chronic methionine stress in athymic mice bearing human glial tumor xenografts [J]. Chem Res Toxicol, 2002, 15(11): 1 472 - 1 479.
- [3] 林琳, 赵瑜. 两种真核蛋氨酸裂解酶基因克隆, 鉴定及分析比较 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2009, 18(7): 20 - 23.
- [4] 陈丽, 陈滨. 细菌内重组法快速构建血管内皮生长因子 165 重组腺病毒载体 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(8): 6 505 - 6 508.
- [5] CELLARIER E, DURA, NDO X, et al. Methionine dependency and cancer treatment [J]. Cancer Treat Rev, 2003, 29(6): 489 - 99.
- [6] PERON K, JONES T N, GAUTHIER S A, et al. Targeting of a novel fusion protein containing methioninase to the urokinase receptor to inhibit breast cancer cell migration and proliferation [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2003, 52(4): 270 - 276.

(2013 - 03 - 03 收稿)