海洛因依赖大鼠海马 CA3 区 PS 幅值的变化*

肖 邦**，潘贵书***
（遵义医学院 生理学教研室，贵州 遵义 563003）

［摘 要］**目的**：应用细胞外电生理记录方法观察海洛因依赖大鼠海马 CA3 区的长时程增强（LTP）变化。**方法**：将 40 只 SD 大鼠随机分成海洛因依赖组、海洛因 + MK801 组、海洛因戒断组及空白对照组，在体记录由刺激海马外侧穿通纤维（lateral perforant path，LPP）所诱发的 CA3 区细胞群体峰电位幅值（PS 幅值）。**结果**：高频刺激后第 1、5、10、20、30、40、50、60 min 时点的 PS 幅值变化率在戒断组明显低于对照组、海洛因依赖组和海洛因 + MK801 组，差异有显著性；海洛因依赖组、对照组与海洛因 + MK801 组的差异无显著性。**结论**：海洛因戒断大鼠海马 CA3 区 LTP 效应受损。

［关键词］海洛因依赖；长时程增强；海马；大鼠，Sprague-Dawley
［中图分类号］R338 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2011）02-0143-04

A Study on Long-term Potentiation Changes in Hippocampus CA3 Area of Heroin Dependent Rats

XIAO Bang, PAN Guishu
(*Department of Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To observe the long-term potentiation (LTP) changes in hippocampus CA3 area of heroin dependent rats with the method of extracellular electrophysiological recording. **Methods**: Forty SD rats were randomly divided into four groups: heroin dependent group (group HD), heroin + MK-801 group (group HM), heroin abstinence group (group HA) and control group (group C). Population spikes of cells in CA3 region of each group were recorded *in vivo*. LTP effect induced by high-frequency stimulations was observed. **Results**: After tetanic stimulation, the change rates of population spike in group HA were significantly lower than those in groups HM, HD and C at time points of 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 minutes, and no significant difference was found among the latter 3 groups. **Conclusions**: The LTP effect is impaired in heroin abstinence rats.
［**Key words**］heroin dependence; long-term potentiation increase; hippocampus; rat, Sprague-dawley

海洛因属阿片类毒品，是吗啡的二乙酰衍生物，易通过血脑屏障，其毒性及成瘾性较大，是吗啡的 5 ~ 10 倍，是迄今为止滥用倾向最大、依赖潜力最强、社会危害最大的吗啡衍生物[1]。突触传递的长时程增强（long-term potentiaton，LTP）是指高频刺激传入神经纤维后引起突触效能的持续性增强的现象，是研究学习记忆的电生理指标，亦是突触可塑性的一个功能性指标，在经验依赖性突触可塑性的发展和形成中具有重要作用。药物成瘾不仅是一种慢性复发性脑病，而且是一种病理性学习记忆过程。为了研究海洛因成瘾对大鼠 LTP 的影响，采用电生理观察方法对海洛因成瘾、海洛因戒断及正常动物的大鼠海马 CA3 区 LTP 进行观察。

*［基金项目］贵州省省长基金（c - 349）。
**贵州省遵义医学院 2006 级硕士研究生，现工作单位四川省川北医学院。
***通讯作者 E-mail：pgs@ zmc. edu. cn

1　材料与方法

1.1　实验动物

健康 SD 大鼠 40 只,雄性,体重 220 ~ 260 g,由第三军医大学大坪医院动物中心提供[许可证号 SCXK-(军)2007017],清洁级动物。分笼饲养,自由饮水、进食。按随机分组的原则,分为海洛因成瘾组、海洛因戒断组、海洛因 + MK801 组和对照组,每组 10 只。

1.2　实验仪器及药品

SN-3N 型脑立体定位仪(日本, Narishige),SEN-320 型三道电子刺激器(日本, Nihon Kor2den),SS-102J 型隔离器(日本, Nihon Kor-den),海洛因(贵州省公安厅提供),盐酸纳洛酮注射液(Sigma),MK-801(ALEXIS)。

1.3　实验方法

1.3.1　动物模型　海洛因依赖组、海洛因 + MK-801 组及戒断组大鼠参照文献[2]方法制作动物模型。按逐日递增海洛因 3 mg/kg 的原则,首日每次剂量 3 mg/kg(以每天的体重),一日两次(上午 9:00,下午 5:00)连续皮下注射 9 d(第 9 天每次剂量达到 27 mg/kg);戒断组大鼠第 10 天用 5 mg/kg 纳络酮诱发戒断症状,记录可数症状齿颤、扭体、站立、湿狗样抖、伸展、清理皮毛;不可数症状有上睑下垂,每 2 min 评价一次,以上症状观察30 min,根据文献[3~5]进行评分,全部症状得分之和为戒断评分,确定大鼠是否成瘾。戒断组确定成瘾后不再给海洛因[6]。海洛因依赖大鼠组末次用药后维持剂量 9 d 即可进行实验(每天皮下注射海洛因 27 mg/kg 作为维持量),直到实验时停止。海洛因 + MK801 组在每次海洛因给药前 15 ~ 30 min 给予 MK801(0.1 mg/kg)。按同样的方式注射等容积的生理盐水建立对照组。

1.3.2　记录海马 CA3 区 LTP

各组大鼠造模后以 20% 的乌拉坦(4 ml/kg)麻醉并俯卧在恒温台上,自主呼吸,头部固定于脑立体定位仪上。剥开头皮及骨膜,在颅骨表面的相应位置钻开两个直径为 3 mm 左右的小孔,分别埋植记录电极和刺激电极。记录电极为单根绝缘的镍铬合金丝,直径 110 μm,尖端裸露,定位于海马 CA3 区锥体细胞层,坐标为:AP 3.3 ~ 3.5 mm,L(R)3.3 ~ 3.5 mm,H 3.0 ~ 4.0 mm[7];刺激电极由两根绝缘的镍铬合金丝绞合而成,尖端裸露,两尖端上下相距 0.1 ~ 0.3 mm,置于外侧穿通纤维(lateral per2forant path,LPP)处,坐标为:AP 6.7 ~ 6.9mm,L(R)4.3 ~ 4.4 mm,H 3.3 ~ 3.5 mm[7]。记录高频刺激后第 1、5、10、20、30、40、50、60 min 时点的群体峰电位幅值(population spike,PS 幅值),比较各组 PS 幅值变化率(刺激后 PS 幅度/刺激前幅度 ×100 %)。

1.4　统计分析

采用 SPSS 13.0 for Windows 统计软件。实验所得数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用方差分析,两两比较用最小显著差法,$\alpha = 0105$ 。

2　结果

2.1　海洛因成瘾大鼠模型

成瘾组大鼠与对照组大鼠戒断症状评分结果见表 1,成瘾组各项可数戒断症状评分与对照相比较具有显著性差异($P < 0.01$)。

表 1　大鼠纳洛酮催促戒断症状

Tab. 1　Hastened withdrawal symptoms in rats treated with naloxone ($\bar{x} \pm s$)

戒断症状	戒断时间(次/30 min)	
	对照组	戒断组
湿狗样抖	0.3 ± 0.55	1.5 ± 0.44(1)
伸展	0.7 ± 0.83	4.0 ± 1.32(1)
清理皮毛	1.1 ± 1.05	5.0 ± 0.87(1)
直立	0.9 ± 0.93	5.4 ± 1.33(1)
扭体	0	2.0 ± 0.44(1)
齿颤	0	1.1 ± 0.33(1)
上睑下垂	0	1.1 ± 0.33(1)

注:(1) 与对照组比较,$P < 0.01$,说明海洛因成瘾大鼠模型建立成功。

2.2　各组大鼠 PS 幅值　见表 2 及图 1 ~ 图 4,戒断组的 PS 幅值明显低于对照组、海洛因依赖组和海洛因 + MK801 组,除戒断组外,其余 3 组高频刺激前后 PS 幅值变化率则无显著差异。

3　讨论

药物成瘾是一种慢性、复发性的脑疾病。滥用个体在难以自控的强迫性反复连续用药过程中,形成了药理学和毒理学意义的精神依赖性与身体依赖性,一旦中断用药即可出现戒断症状和体征。LTP 是一种学习记忆的电生理指标,是突触可塑性

表 2　各组大鼠不同时点海马 CA3 区 PS 幅值变化率比较

Tab. 2　Comparison of change rates of population spike at different time points in each group

组别	n	高频刺激后(%, $\bar{x} \pm s$)							
		1 min	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
对照组	10	152.68	159.52	163.33	158.77	179.25	182.42	176.81	158.1
		±7.0	±5.3	±7.9	±6.5	±9.3	±9.7	±1.3	±1
戒断组	10	107.67	108.2	111.98	107.83	112.66	107.79	109.03	108.76
		±3.9(1)	±3(1)	±4.7(1)	±1.7(1)	±3.6(1)	±1.4(1)	±2.2(1)	±0.7(1)
海洛因依赖组	10	158.58	189.60	183.83	149.95	173.37	169.03	175.85	169.1
		±17.5	±40	±66.3	±24.7	±29.6	±16.6	±27.3	±11.6
海洛因 + MK-801 组	10	150.22	152.57	154.74	153.14	163.36	166.23	169.74	154.52
		±15.3	±5.6	±5.8	±8.0	±4	±10	±5.8	±3.5

注:(1)差异有显著性,$P < 0.05$。

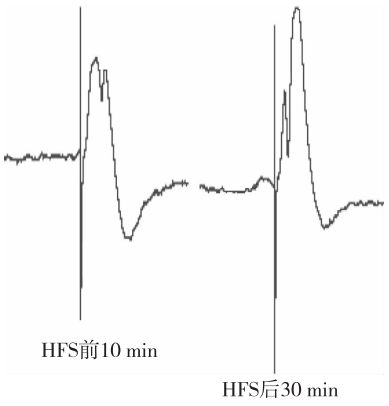


图 1　对照组

Fig. 1　control group

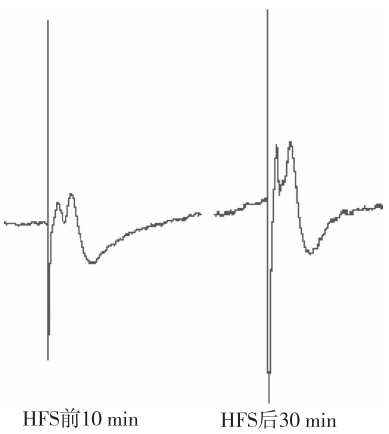


图 2　依赖组

Fig. 2　heroin dependent group

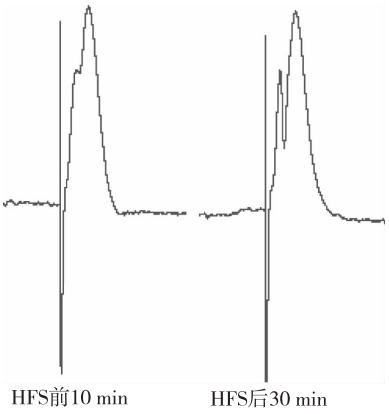


图 3　戒断组

Fig. 3　heroin abstinence group

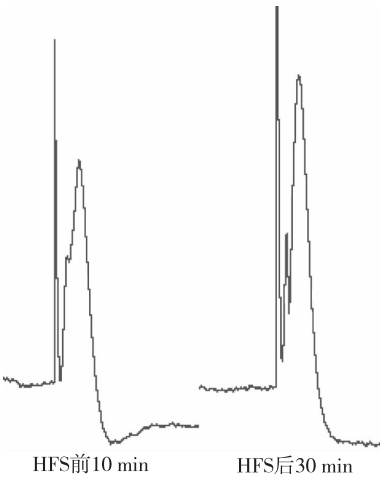


图 4　海洛因 + MK-801 组

Fig. 4　heroin + MK-801 group

的一个功能性指标,在经验依赖性突触可塑性的发展和形成中具有重要作用。导致成瘾的神经适应性变化与学习和记忆具有相同谷氨酸(gluatamate, Glu)依赖的细胞机制,药物成瘾的持续性和牢固性正是由于突触可塑性变化的特异模式不断变化的结果。本实验中用到的 MK-801 是 N-甲基-D 天门冬氨酸(NMDA)受体抑制剂,而 NMDA 受体参与形成突触传递的长时程增强过程,对细胞间信息传递、突触可塑改变以及学习记忆的意义尤为重要[8]。

海马 LTP 是目前公认的从突触水平上研究学习记忆的神经模型,海马 LTP 分为诱导和维持两个阶段,其诱导依赖 NMDA 受体激活,而维持则与 A-氨基酸-3 羟基-5 甲基-4 异恶唑丙基受体功能和电压依赖性 Ca^{2+} 通道开放有关。PS 幅值是 LTP 中的一项指标,反映了突触后细胞同步活动。在本研究中,海洛因戒断组在高频刺激前后的 PS 幅值变化率无明显变化,说明戒断组的突触传递增强受到了抑制,而海洛因依赖组的 PS 幅值变化率与对照组比较无显著差异,表明突触可能产生了适应性的变化。突触传递的适应性变化已经被认为是药物成瘾的一个重要因素[9],伴随着大鼠对海洛因的依赖形成,正常情况下依赖于海洛因的 CA3 区的突触功能在海洛因的作用下,产生了适应性的变化,当停用海洛因后,突触功能便受到影响。据文献报告,MK-801 能在 CA1 区抑制 LTP 的诱导,表明 CA1 区的突触传递可能有 NMDA 的介导,而本次研究中在 LPP-CA3 通路观察 PS 幅值的变化率,发现与对照组的变化率无显著差异,表明此通 路的突触传递功能持续增强可能是非 NMDA 受体所介导。但总的来说,LTP 的形成与药物的成瘾机制仍是十分复杂的问题,有待进一步研究。

4 参考文献

[1]邓祥发. 海洛因成瘾大鼠脑神经元死亡方式及其超微结构的变化[J]. 广西医科大学学报,2004(5): 660 – 662.

[2]潘贵书,徐国强,李淑芳,等. 海洛因成瘾大鼠模型的建立[J]. 贵阳医学院学报,1997(增):46.

[3]Maldonado R,Negus S,Koob GF. Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu delta and kappa selective opioid antagonists[J]. Neuropharmacology, 1992(12):1231.

[4]Wei E,Loh HH,Way EL. Quantitative aspects of precipitated abstinenle in morphine-dependent rats[J]. J Pharmacol Exp Ther,1973(2):398 – 403.

[5]张开镐. 药物依赖性的动物实验方法(一)[J]. 中国药物依赖性杂志,1999(1):23 – 26.

[6]叶晓明,王新华,李家乐,等. 吗啡依赖和戒断大鼠某些脑核团中 β-内啡肽含量的变化[J]. 中国疼痛医学杂志,1999(4):233 – 236.

[7]包新民. 大鼠立体定位图谱. 北京:人民卫生出版社,1991:175.

[8]Ali DW, Salter MW. NMDA receptor regulation by Src kinase signaling in excitatory transmission and plasticiy[J]. Curr opin Neuro-biol,2001(3):336 – 342.

[9]Milner TA, Drake CT Ultrastructural, evidence for presynaptic mu-o-piod receptor modulation of synaptic plasticity in NMDA-receptor containing dendrites in the dentate gyrus[J]. Brain Res Bull,2001(2):131.

(2011 – 03 – 08 收稿,2011 – 03 – 21 修回)

(上接第 142 页)

重组蛋白等,为进一步研究其生物功能及其该蛋白在诊断、药物及疫苗研究中的应用提供依据。

4 参考文献

[1] 吴观凌. 人体寄生虫学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2005:515 – 530.

[2] 黄江,胡旭初,徐劲,等. 猪带绦虫成虫 cDNA 质粒文库的构建及 EST 测序[J]. 中国人兽共患病学报,2008(12):1126 – 1128.

[3] Aguilar-Diaz H,Bobes RJ,Carrero JC,et al. The genome project of Taenia solium [J]. Parasitol Int,2006(55):127 – 130.

[4] Sciutto E,Fragoso G,Fleury A,et al. Taenia solium disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions [J]. Microbes Infect, 2000(2):1875 – 1890.

[5] Mafojane NA ,Appleton CC,Krecek RC,et al. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa [J]. Acta Trop,2003(87):25 – 33.

[6] Yin HL. Gelsolin:calicium and polyphosophoinositide regulated actin modulating protein [J]. Bioessays,1987(4): 176 – 179.

[7] 陈琦,姚咏明. 凝溶胶蛋白结构和功能研究新进展[J]. 中国病理生理杂志,2010(7):1433 – 1439.

[8] 李明娟,闵锐. 凝溶胶蛋白及其生物医学作用[J]. 生命科学,2010(3):267 – 271.

(2011 – 03 – 09 收稿)