

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.11.007

吗啡成瘾及癫痫造模对 ICR 小鼠学习记忆能力的相关性研究

林 梅¹, 黄昶荃², 李永红³, 彭小东⁴, 林 红³, 杨 波³

(1. 四川中医药高等专科学校临床医学系内科教研室, 绵阳 621000; 2. 绵阳市第三人民医院老年康复科, 绵阳 621000;
3. 成都信息工程学院电子工程学院生物医学工程教研室, 成都 610225; 4. 川北医学院附属医院肿瘤科, 南充 637000)

【摘 要】目的: 观察吗啡成瘾及癫痫对 ICR 小鼠的空间学习记忆能力的影响是否具有相关性。方法: 将 40 只小鼠随机分成吗啡成瘾继发癫痫组、吗啡成瘾组、癫痫组和空白对照组, 每组 10 只。用连续注射吗啡建立吗啡成瘾模型, 用匹罗卡品(Pilocarpine, PLO)建立癫痫模型。用水迷宫实验检测各组小鼠的记忆能力。结果: 吗啡成瘾继发癫痫小鼠与癫痫小鼠水迷宫逃避潜伏期时间相对比明显延长($P < 0.05$)。结论: 吗啡成瘾与癫痫对 ICR 小鼠的学习记忆能力损害具有协同作用。

【关键词】成瘾; 癫痫; 水迷宫; 学习记忆

【中国图书分类法分类号】R749

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-13

Correlation between Morphine addiction, epilepsy model and learning and memorizing of ICR mice

LIN Mei¹, HUANG Changquan², LI Yonghong³, PENG Xiaodong⁴, LIN Hong³, YANG Bo³

(1. Teaching and Research Section of Internal Medicine, School of Clinical Medicine, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine; 2. Department of Geriatric Rehabilitation, the Third People's Hospital of Mianyang; 3. Teaching and Research Section of Biomedical Engineering, College of Electronic Engineering, Chengdu University of Information Technology; 4. Department of Oncology, the Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College)

【Abstract】Objective: To create Morphine addiction model by conditioned place preference firstly and then to create epilepsy model on the basis of Morphine addiction, finally to study whether Morphine addiction and epilepsy exert effects on spatial learning and memorizing of institute of cancer research(ICR) mice from behavioral by water maze. Methods: Totally 40 ICR mice having excellent performance by early platform of natural preference and training of water maze were selected. All these mice were equally divided into Morphine addiction complicated with epilepsy group, Morphine addiction group, epilepsy group and control group($n=10$). Seven days continuous injection of Morphine was used to create Morphine addiction model while Pilocarpine was injected to create epilepsy model. Water maze test was performed to observe the learning and memorizing of mice. Results: Water maze escape latency was longer in Morphine addiction complicated epilepsy mice than in epilepsy mice. Conclusion: Morphine addition and epilepsy exert synergistic effect on learning and memory of ICR mice.

【Key words】addiction; epilepsy; water maze; learning and memorizing

毒品成瘾是当今世界最棘手的公共卫生问题, 严重威胁人类生命安全与阻碍社会进步。吗啡是成瘾性最强的毒品之一, 其戒断症状重, 戒毒后的复发率高达 97%^[1]。解决吗啡类药物的依赖性不仅是社会的当务之急, 也对神经生物学的发展有着重要

的作用和意义。吗啡成瘾动物模型的建立为研究吗啡依赖和吗啡对人类学习记忆能力的影响提供了便利条件。有文献表明对于小鼠的学习和记忆机制, 吗啡成瘾和癫痫有着共同点, 例如前额叶皮层、海马和杏仁核等脑组织分别在两种模型中都起到了关键的作用^[2]。本课题依次建立吗啡成瘾模型、癫痫模型, 通过行为学(Morris 水迷宫实验)观察, 研究吗啡成瘾及癫痫对小鼠空间学习记忆的影响, 并进

作者介绍: 林 梅(1962-), 女, 副教授,

研究方向: 常见内科慢性疾病的临床研究。

基金项目: 成都信息工程学院科研基金资助项目(编号: KYTZ201021)。

一步探讨两者对小鼠空间学习记忆能力的影响是否具有相关性。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

雄性 ICR 小鼠[四川省动物所提供,生产许可证号:SCXK(川)2008-24,体重(22 ± 2) g]40 只,自由饮水、饮食。盐酸吗啡注射液(东北制药集团公司沈阳第一制药厂,产品批号:080711)。匹罗卡品(Pilocarpine, PLO),由四川大学华西医院提供,腹腔注射,350 mg/kg,用以制成动物癫痫模型。LiCl 由四川大学华西医院提供,腹腔注射,127 mg/kg,用以减少 PLO 致癫痫死亡率。阿托品,西南药业股份有限公司生产,产品批号:07030008,腹腔注射,10 mg/kg,用以阻断 PLO 引起的外周胆碱能作用。地西洋(安定),天津金耀氨基酸有限公司生产,产品批号:0904141,腹腔注射,10 mg/kg,用于减少癫痫所致的动物死亡率。

1.2 吗啡成瘾小鼠模型的建立

吗啡成瘾小鼠模型的建立参照文献^[9]:雄性 ICR 小鼠腹腔注射盐酸吗啡 3 次/d(8、12、16 时),连续 7 d。1~7 d 每次具体给药剂量依次为:10、15、20、25、30、35、40 mg/kg。将实验动物随机分为 2 组,一组为吗啡组(20 只小鼠),另一组为生理盐水组(20 只小鼠),在实验给药前 3 d,将所有小鼠放在条件性位置偏爱(Conditioned place preference, CPP)实验装置中,训练时间为 15 min,通过在不同区域的停留时间,分别测定在自然条件下动物的位置偏好,由于小鼠对黑色区域有自然偏好的,伴药以白色区域作为伴药区。在给实验组小鼠注射吗啡前,应将小鼠放入伴药区停留 30 min,再注射吗啡,注射完后,再将小鼠放入伴药区停留 30 min。

1.3 癫痫模型的建立

吗啡成瘾小鼠和空白对照小鼠中各随机抽取 10 只,共 20 只,先给予 LiCl 120 mg/kg 腹腔注射,18~24 h 后给予 PLO 30 mg/kg 腹腔注射。在注射 PLO 之前 30 min 给予 1 mg/kg 阿托品腹腔注射,以阻断 PLO 引起的外周胆碱能作用。注射 PLO 后小鼠在 15~30 min 后陆续出现面肌抽动、咀嚼、点头、前肢阵挛、后肢阵挛、站立和跌倒等持续癫痫发作表现至少 30 min,定义为癫痫持续状态(Status epilepticus, SE)。观察动物的癫痫发作情况,按照 Racine 标准判定癫痫的发作程度,达到 4~5 级的小鼠认为癫痫模型已成功建立^[10]。在注射 PLO 产生 SE 之后的 60 min 给予安定 10 mg/kg 腹腔注射,以减少死亡率。

1.4 Morris 水迷宫实验

癫痫造模结束后,将上述 4 组小鼠:吗啡成瘾继发癫痫小鼠、吗啡成瘾小鼠、癫痫小鼠和空白对照组进行水迷宫实验。水迷宫实验主要包括两个方面:定位航行实验和空间搜索实验。本实验主要进行的是定位航行实验。其具体实验方法如下所述:定位航行实验时,将小鼠分别从第 1 和第 4 象

限放入,记录逃避潜伏期、游泳轨迹。对于最大游泳时间,本实验设置为 70 s。最大游泳时间会在统计中由于个别动物而影响整组数据,特别是选择较大的游泳时间时,因此,应该在实验前做好动物筛选工作,并在统计数据时去掉异常值,筛选方法是:在实验的第 1 天进行无平台自由游泳,评估动物的游泳能力和游泳方式及搜索策略。实验时,动物找到平台后,使其在平台上停留一段时间,加深其对周围环境的记忆,时间为 10、15、30 s 不等,对于 70 s 后仍未找到平台的小鼠,将其引导至平台,停留相同时间,其逃避潜伏期仍记为 70 s。

1.5 观察指标

实验中所有数据为小鼠在黑白盒中白盒一侧的数据,单位为分钟(min)。所有小鼠的测试时间均为 15 min。将小鼠分别从第 1 和第 4 象限放入,记录逃避潜伏期、游泳轨迹。对于最大游泳时间,本实验设置为 70 s。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吗啡成瘾造模期

吗啡成瘾造模期 CPP 白盒时间,如图 1 所示。

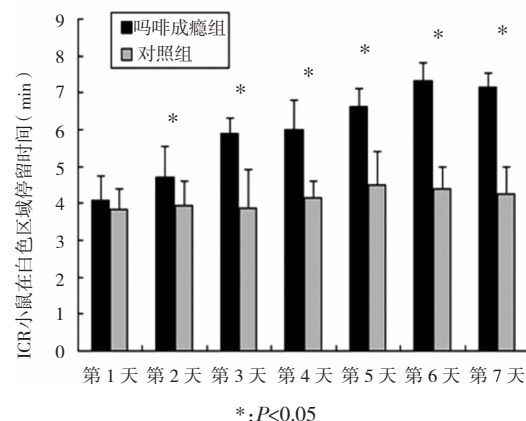


图 1 吗啡成瘾组与对照组在白色区域停留时间直方图

Fig.1 Time histogram of stay in the white area between Morphine addiction group and control group

吗啡成瘾实验组与对照组相比较具有显著的统计学差异,表明实验组 ICR 小鼠已成功建立吗啡成瘾模型。

吗啡成瘾造模期水迷宫实验中的逃避潜伏期时间对比如图 2 所示。

吗啡成瘾实验组与对照组相比较统计学差异显著,表明吗啡成瘾对 ICR 小鼠逃避潜伏期时间明显延长。

2.2 吗啡成瘾基础上继续癫痫期

吗啡成瘾基础上继续癫痫组小鼠与癫痫组小鼠水迷宫实验数据对比如图 3 所示。

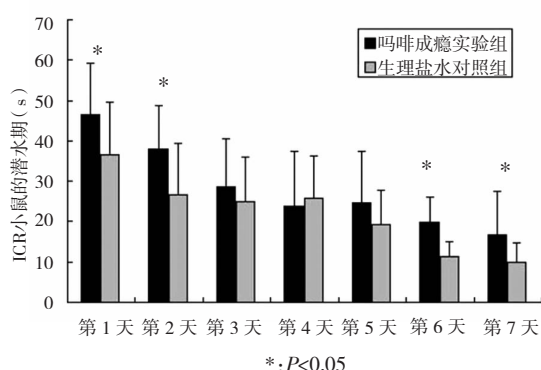


图2 吗啡成瘾实验组与对照组小鼠水迷宫逃避潜伏期时间直方图

Fig.2 Time histogram of water maze escape latency between Morphine addiction group and control group

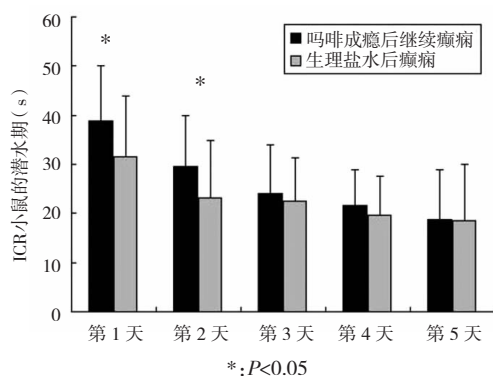


图3 吗啡成瘾+癫痫与癫痫小鼠水迷宫逃避潜伏期时间对比

Fig.3 Comparison on water maze escape latency between Morphine addiction complicated epilepsy group and epilepsy group

实验第1天、第2天,吗啡成瘾+癫痫与癫痫小鼠数据有统计学差异,表明吗啡成瘾和癫痫对ICR小鼠的学习记忆能力影响具有协同作用。

3 讨论

该研究中动物模型包括:吗啡成瘾继发癫痫小鼠、吗啡成瘾小鼠、癫痫小鼠和空白对照组,在学习记忆的行为学检测中发现癫痫发病可加重吗啡成瘾小鼠学习记忆能力下降。既往报道单纯吗啡成瘾和癫痫均可导致小鼠学习记忆能力下降^[5,6],结合本研究结果,显示吗啡成瘾和癫痫对学习记忆影响具有协同效应。

成瘾本身是一种对某种刺激反应产生记忆,这种记忆是一种得到快感的相关记忆,从而使个体不断地通过该刺激获得这种快感,从而导致成瘾。与记忆有关的大脑结构包括海马及大脑边缘系统,不同刺激导致的成瘾行为均通过一定途径作用于该

系统,因此吗啡成瘾最终作用部位在大脑海马和大脑边缘系统^[7]。行为学的记忆能力是记忆能力的一部分,其大脑相关结构主要也在大脑海马和大脑边缘系统,该研究结果提示吗啡成瘾对行为学记忆相关的大脑结构是一种负面作用,可能与参与行为记忆能力相关大脑结构受到损害相关。癫痫是大脑皮质一种较大范围的电兴奋活动,其与行为记忆能力关系目前尚不完全清楚,可能的机制是导致癫痫的大脑异常电兴奋活动通过一定的神经精神机制影响海马及大脑边缘系统功能,继而导致个体行为记忆能力下降^[8]。对于小鼠的学习和记忆机制,吗啡成瘾和癫痫有着共同点,例如前额叶皮层、海马和杏仁核等脑组织分别在两种模型中都起到了关键作用,并且均与小鼠学习和记忆机制有一定联系^[9,10]。癫痫发病原因较一致的观点认为是中枢神经系统兴奋与抑制性不平衡所致。目前研究表明,情绪是由大脑的某一回路所控制,这个回路是由前额叶皮层、杏仁核、海马、前部扣带回和腹中央纹状体等脑区构成,其中海马和杏仁核在整合加工情绪信息,继之产生情绪体验和行为的函数中起关键作用^[10]。

既往通过CPP位置偏好实验发现,癫痫可加重吗啡成瘾小鼠的戒断症状,表明癫痫和吗啡成瘾之间具有一定联系^[11]。这种联系可能是癫痫加强了对吗啡刺激产生快感的记忆(一种非正常记忆),该异常记忆的加强可能会影响正常记忆能力,包括行为学记忆能力。

本研究仅针对行为学相关的记忆能力进行了研究,证实吗啡成瘾和癫痫之间具有一定联系,即癫痫可能加重吗啡成瘾对行为学记忆能力的干扰。我们的研究结果提示,癫痫对吗啡成瘾的学习记忆能力损害随着时间延长而维持在一定水平不再加重,表明癫痫对吗啡成瘾的学习记忆能力影响有限。其具体的机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Fukushima D F. Haloperidol (but not ziprasidone) withdrawal enhances cocaine-induced locomotor activation and conditioned place preference in mice [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2007, 31 (4): 867-872.
- [2] 李天炼, 廖小平, 黄仕雄. 二醋吗啡与癫痫的关系探讨 [J]. 中国临床康复, 2003, 28 (12): 88-93.
- [3] Li T L, Liao X P, Huang S X. Research in the relation between heroin and epilepsy [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2003, 28 (12): 88-93.

- [3] Kelley A E, Berridge K C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(9): 3306–3311.
- [4] Szyndler J, Wierzbica-Bobrowicz T, Skorzevska A, et al. Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine induced spontaneous recurrent seizures[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005, 81(1): 15–23.
- [5] 李永红, 关俊文, 杨波, 等. 睡眠剥夺对吗啡成瘾小鼠学习记忆能力的影响[J]. *四川生理科学杂志*, 2011, 33(3): 100–102.
- Li Y H, Guan J W, Yang B, et al. Study on the effect of sleep deprivation morphine-addicted ICR mice in learning and memory[J]. *Sichuan Journal of Physiological Sciences*, 2011, 33(3): 100–102.
- [6] 张月辉, 关俊文, 李永红, 等. 早期安定干预影响颞叶癫痫小鼠学习记忆能力变化的研究[J]. *四川生理科学杂志*, 2011, 33(3): 97–98.
- Zhang Y H, Guan J W, Li Y H, et al. Effect of diazepam on the changes of learning-memory ability in pilocarpine induced temporal lobe epilepsy in mice[J]. *Sichuan Journal of Physiological Sciences*, 2011, 33(3): 97–98.
- [7] Phelps E A. Emotion and cognition: insights from studies of the human amygdala[J]. *Annu Rev Psychol*, 2006, 57: 27–53.
- [8] Moser M B, Moser E I. Functional differentiation in the hippocampus[J]. *Hippocampus*, 1998, 8(6): 608–619.
- [9] 贾丽景, 王维平, 刘瑞春, 等. 美金刚对戊四氮致痫大鼠空间学习记忆能力的影响及其机制[J]. *广东医学*, 2010, 31(2): 170–172.
- Jia L J, Wang W P, Liu R C, et al. Memantine pentylenetetrazol epileptogenic rat spatial learning and memory abilities of its mechanism[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2010, 31(2): 170–172.
- [10] Becker A, Schmitz M, Grecksch G. Kindling modifies morphine, cocaine and ethanol place preference[J]. *Exp Brain Res*, 2006, 168(1–2): 33–40.
- [11] 李永红, 陈敏, 杨波, 等. 氯化锂-匹罗卡品诱导癫痫对吗啡成瘾小鼠位置偏好的影响[J]. *西部医学*, 2010, 22(9): 1594–1595.
- Li Y H, Chen M, Yang B, et al. Impact of epilepsy with lithium-pilocarpine on morphine addiction in mice[J]. *Medical Journal of West China*, 2010, 22(9): 1594–1595.

(责任编辑: 冉明会)

《重庆医科大学学报》可以直接使用的英文缩略语

基础类词汇

A. 实验方法 \ 试剂 \ 动物

酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR)

实时-聚合酶链反应 (Real time-polymerase chain reaction, real time-PCR)

逆转录-聚合酶链反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

甲基化特异性 PCR (Methylation specific PCR, MSP)

流式细胞仪 (Flow cytometry, FCM)

苏木素-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE)

免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC)

四甲基偶氮唑盐 (Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)

过氧化物酶标 (Streptavidin-peroxidase, SP)

脱氧核糖核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法 (Terminal-deoxyribonucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)

磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate buffered solution, PBS)

洗膜缓冲液 (Tris buffered saline tween, TBST)

细胞培养基 (良伊格尔培养基) (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)

Eagle 基础培养基 (Basal medium eagle, BME)

乙二醇四乙酸 (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)

二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB)

二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)

胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)

牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)

异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC)

生物素复合体 (Strept avidin-biotin complex, SABC)

斯泼累格·多雷 (Sprague Dawley, SD)

B. 其它

脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA)

核糖核酸 (Ribonucleic acid, RNA)

信使核糖核酸 (Message ribonucleic acid, mRNA)

微小 RNA (microRNA, miRNA)

白细胞介素 (Interleukin, IL)

基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMP)

超氧化物歧化酶 (Super oxygen dehydrogenases, SOD)

碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)

丙氨酸转氨酶 (Alanine aminotransferase, ALT)

天冬氨酸转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST)

 γ -谷氨酰转肽酶 (Gamma-glutamyl transpeptidase, GGT)

三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP)

血肌酐 (Serum creatinine, SCr)

尿酸 (Uric acid, UA)

血尿素氮 (Blood urea nitrogen, BUN)

高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipid-cholesterol, HDL)

低密度脂蛋白胆固醇 (Low density lipid-cholesterol, LDL)

总胆固醇 (Total cholesterol, TC)

三酰甘油 (Triacylglyceride, TG)

白细胞 (White blood cell, WBC)

红细胞 (Red blood cell, RBC)

血小板 (Platelet, PLT)

白蛋白 (Albumin, ALB)

肿瘤细胞坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)

表皮生长因子 (Epidermal growth factor, EGF)

血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)

转化生长因子 (Transforming growth factor, TGF)

人体免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV)

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV)

人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV)

核因子- κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B)

C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)

血管紧张素 (Angiotensin, Ang)

感染复数 (Multiplicity of infection, MOI)

骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMM-SCs)