

孕晚期吗啡暴露对子代鼠吗啡成瘾易感性的影响

杨 柳 姚卫东 钱 敏 金孝炬

(皖南医学院附属弋矶山医院 麻醉科 安徽 芜湖 241001)

【摘 要】目的: 检测孕晚期吗啡暴露对子代鼠吗啡成瘾易感性的影响。方法: 孕晚期 SD 大鼠 48 只随机分为吗啡组(M 组) 和生理盐水组(N 组) 。M 组孕鼠在孕 12 ~ 18 d 每天 9: 00 和 17: 00 两次皮下注射吗啡, 首剂量为 2 mg/kg, 逐日递增 1 mg/kg, 至 6 mg/kg 维持。N 组孕鼠以同样的方式注射等体积的生理盐水。取上述 2 组体质量接近的子代鼠 50 只正常喂养至 8 周龄。每组子代鼠先采用恒量法(吗啡剂量 3 mg/kg) 连续颈背部皮下注射吗啡 7 d 进行条件位置偏爱(CPP) 训练, 训练结束 24 h 后对 CPP 效应进行检测; 之后继续采用递增法(吗啡首剂量 4 mg/kg, 逐日递增 1 mg/kg) 以同样方式注射吗啡连续训练 7 d 至 10 mg/kg, 训练结束 24 h 后对子代鼠再次进行 CPP 效应的检测。结果: ①预测试时, 两组的 CPP 基数值 [分别为(99. 2 ± 22. 96) s 和(86. 1 ± 20. 27) s] 差异无统计学意义($P > 0. 05$); 经过 7 d 的吗啡恒量训练后, M 组子代鼠 CPP 测试值(284. 6 ± 58. 93) s 相对于基线值(99. 2 ± 22. 96) s 明显增高($P < 0. 01$), 而 N 组子代鼠 CPP 测试值(116. 6 ± 36. 95) s 与基线值(86. 1 ± 20. 27) s 相比无明显差异($P > 0. 05$); 继续经过 7 d 的吗啡递增量训练后, M 组和 N 组子代鼠 CPP 测试值 [分别为(432. 3 ± 74. 21) s, (221. 0 ± 58. 26) s] 与 CPP 基线值 [分别为(99. 2 ± 22. 96) s, (86. 1 ± 20. 27) s] 相比均出现差异($P < 0. 01$, $P < 0. 01$), M 组子代鼠 CPP 测试值(432. 3 ± 74. 21) s 与 N 组(221. 0 ± 58. 26) s 相比差异有统计学意义($P < 0. 05$); 且 M 组子代鼠 CPP 分值(331. 4 ± 69. 47) s 明显高于 N 组子代鼠 CPP 分值(124. 8 ± 58. 68) s($P < 0. 05$)。结论: 孕晚期吗啡暴露可增加子代鼠对吗啡的成瘾易感性。

【关键词】孕晚期; 吗啡暴露; 子代鼠; 条件位置偏爱; 成瘾易感性

【中图分类号】R 749. 61 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 04. 002

Late gestational morphine exposure increasing addiction vulnerability in offspring rats

YANG Liu, YAO Weidong, QIAN Min, JIN Xiaojie

Department of Anesthesiology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To observe the impact of late pregnancy morphine exposure to addiction vulnerability in offspring of rats. **Methods:** Forty-eight late pregnant SD rats were randomized divided into morphine group (M group) and saline group (N Group). Pregnant rats in M group were subcutaneously injected with morphine at 9:00 AM and 8:00 PM twice daily during 12 to 18 days of pregnancy. Initial dose was 2 mg/kg and increased at 1 mg/kg day by day till final 6 mg/kg. Pregnant rats in N group were administered with the same volume of saline as the same protocol. Fifty offspring rats with similar body weight were selected from the two groups and routinely fed for 8 weeks. Constant dose of morphine (3 mg/kg) was subcutaneously administered at the back of neck for 7 days to start conditioned place preference(CPP) paradigm and the CPP effects were examined after 24 h of condition. Then magnitude dose of morphine(initial dose at 4 mg/kg by additional 1 mg/kg day by day) was applied in the same protocol for 7 days till final dose of 10 mg/kg and the CPP effects were further determined after 24 h of conditioning. **Results:** CPP cardinality value was (99. 2 ± 22. 96) s and (86. 1 ± 20. 27) s for the two groups and the difference was not significant($P > 0. 05$). After 7 day of constant morphine sensitizing, CPP values were significantly increased in the offspring rats in group M as compared with baseline values [(284. 6 ± 58. 93) s vs. (99. 2 ± 22. 96) s] ($P < 0. 01$), whereas CPP values remained no significant difference in group N [(116. 6 ± 36. 95) s vs. (86. 1 ± 20. 27) s] ($P > 0. 05$). After magnitude dose conditioning with morphine for 7 days, CPP values tested in the group M and group N were different from the baseline values [(432. 3 ± 74. 21) s and (221. 0 ± 58. 26) s vs. (99. 2 ± 22. 96) s and (86. 1 ± 20. 27) s] ($P < 0. 01$; $P < 0. 05$) and group M had significantly higher CPP test values than group N [(432. 3 ± 74. 21) s vs. (221. 0 ± 58. 26) s] ($P < 0. 05$).

基金项目: 安徽省高校省级自然科学基金项目(JK2013Z337); 皖南医学院重点科研培育基金项目(WK2012ZF05); 皖南医学院中青年科研基金项目(WK200922F)

收稿日期: 2015-03-16

作者简介: 杨 柳(1991-), 女, 2013 级硕士研究生, (电话) 15855535448, (电子信箱) yang_liu0119@163. com;

金孝炬, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) jinxi@163. com, 通讯作者。

<0.05). CPP score of group M was significantly higher than group N [(331.4 ± 69.47) s vs. (124.8 ± 58.68) s] ($P < 0.05$). **Conclusion:** Late gestational morphine exposure may increase the vulnerability of offspring rats to addiction to morphine.

【Key words】 late pregnancy; morphine exposure; offspring rats; conditioned place preference; vulnerability to addiction

目前怀孕妇女中滥用阿片类药物的现象非常严重,产妇滥用阿片类药物可致95%新生儿发生戒断反应综合征^[1]。然而产前阿片类药物暴露对患儿的长期影响,目前资料尚不充分,且由于社会环境和家庭因素的双重影响,患儿接触毒品的几率要大于其他普通人群,故对子代成瘾易感性的研究及机制的探讨具有重要的理论和现实意义。有研究报道,胚胎期被动暴露于吗啡的新生大鼠会有行为和神经化学的改变,其中包括心理依赖吗啡^[2]。Malanga等报道孕期雌鼠暴露于成瘾药物如可卡因可能会增加子代鼠的成瘾易感性^[3]。应用条件位置偏爱(conditioned place preference, CPP)模型的实验显示,吗啡可使子代鼠产生更强的奖赏效应^[4]。其基本原理是把基础奖赏刺激与某一特定环境因素反复联系后,这一特定环境即可获得奖赏特性,这在研究药物的精神依赖方面有突出优势^[5]。大量研究证明吗啡的成瘾性与大脑的中脑边缘多巴胺系统(mesolimbic dopamine system, MLDS)密切相关,MLDS的生长发育开始于孕12 d,到孕18 d结束^[6]。故本实验选取孕晚期即妊娠12~18 d为吗啡暴露期,建立孕鼠吗啡暴露模型,采用吗啡CPP模型观察孕晚期吗啡暴露对子代鼠吗啡成瘾易感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 健康Sprague-Dawley大鼠雌鼠62只,雄鼠31只作为亲代大鼠,购于南京青龙山动物繁殖基地,12~16周龄,体质量250~300 g,单笼饲养,在动物房雌雄分开适应饲养1周后开始实验。

1.1.2 实验药品 盐酸吗啡注射液由沈阳第一制药有限公司提供。

1.1.3 实验装置 CPP视频分析软件购于上海吉量软件科技有限公司, CPP实验箱为有机玻璃箱,箱中间有一块可移动隔板将实验箱分割成两部分,其中一侧内面为黑色,底面光滑;另一侧内面为白色,网格状粗糙底面。CPP箱置于隔音室,实验箱顶部安装有摄像头进行录像并记录。

1.2 方法

1.2.1 孕晚期吗啡暴露模型制备及子代鼠的分组 在动物房适应饲养1周后,将体质量接近的62只

雌鼠,31只雄鼠按2:1进行雌雄配对分组,下午8:00进行合笼,第2天早上8:00观察雌鼠阴道有阴栓者视为怀孕的第1天^[7]。62只合笼的雌鼠中,有48只雌鼠看见阴栓,将此48只孕鼠随机分为吗啡组28只和生理盐水组20只,从看见阴栓第12天开始分别注射吗啡和生理盐水(NS)。吗啡组雌鼠于头颈部皮下注射吗啡,每天2次,注射时间为上午9:00和下午5:00,起始剂量为2 mg/kg,以后逐日递增1 mg/kg,至第5天为6 mg/kg后不再增加直至孕鼠分娩。生理盐水组以同样的方式注射等量的生理盐水。出生时每组各有子代鼠150只,分为孕晚期吗啡暴露子代组(MO)和产前NS对照子代组(NO),留取上述2组体质量接近的子代鼠50只正常喂养至8周龄后进行下面实验程序。

1.2.2 建立子代鼠吗啡CPP模型及CPP测试

1.2.2.1 预实验阶段(d_{1-3}) 打开CPP实验箱中间的隔板,将每组子代鼠在箱的两侧自由活动15 min,每天1次,连续3 d,使子代鼠适应实验箱环境。在第2、3天各测试1次大鼠在箱两侧的停留时间,将两次的平均值作为CPP基线值(单位为s)。以其中停留时间长的为自然偏爱箱,以时间停留短的为伴药箱(即大鼠注射吗啡后放入该侧)训练大鼠。

1.2.2.2 条件化训练阶段(d_{4-10}) 关闭CPP实验箱中间的隔板,将每组子代鼠头颈部皮下注射吗啡后放入伴药箱45 min,间隔8 h后注射等量NS,放入自然偏爱侧45 min。吗啡剂量恒定为3 mg/kg,连续训练7 d。

1.2.2.3 测试阶段(d_{11}) 末次训练24 h后,打开实验箱中间的隔板,将每组子代鼠放在箱两侧自由活动15 min,记录其在伴药侧的停留时间,定义为CPP测试值(单位为s)。

1.2.2.4 继续条件化训练阶段(d_{12-18}) 操作方法同条件化训练阶段(d_{4-10}),但吗啡剂量起始为4 mg/kg,逐日递增1 mg/kg,连续训练7 d至10 mg/kg。

1.2.2.5 测试阶段(d_{19}) 操作方法同测试阶段(d_{11}),经组内给药前后对照,明确大鼠CPP的形成。用CPP分值(CPP测试值 - CPP基线值)评价子代大鼠吗啡成瘾易感性。CPP分值越大,表明吗啡成瘾易感性越高。

在训练期间孕晚期吗啡暴露的子代组共死亡 8 只(2 只被同笼子代鼠咬死,另 6 只死因不明)淘汰 10 只(根据 CPP 基线值去除停留时间 >630 s 的子代鼠^[8]),对照组子代鼠无死亡,淘汰 5 只,最终每组留取 30 只子代鼠进行分析。

1.2.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件分析实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

子代大鼠 CPP 模型检测预测测试时,两组的 CPP

基数值差异无统计学意义($P > 0.05$);经过 7 d 的吗啡恒量训练后,M 组子代鼠 CPP 测试值相对于基线值明显增高($P < 0.01$),而 N 组子代鼠 CPP 测试值与基线值相比无明显差异($P > 0.05$),表明 M 组子代鼠 CPP 模型建立成功;继续经过 7 d 的吗啡递增量训练后,M 组和 N 组子代鼠 CPP 测试值与 CPP 基线值相比均出现差异($P < 0.01, P < 0.01$),表明 M 组和 N 组子代鼠 CPP 模型均建立成功;然而 M 组子代鼠 CPP 测试值与 N 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),且 M 组子代鼠 CPP 分值明显高于 N 组子代鼠 CPP 分值($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组子代鼠在吗啡训练后 CPP 测试结果比较($s, \bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	CPP 基线值	CPP 测试值(吗啡恒量)	CPP 测试值(吗啡增量)	CPP 分值
产前吗啡暴露子代组(MO)	99.2 ± 22.96	284.6 ± 58.93 ^{ab}	432.3 ± 74.21 ^{ab}	331.4 ± 69.47 ^b
产前 NS 对照子代组(NO)	86.1 ± 20.27	116.6 ± 36.95	221.0 ± 58.26 ^a	124.8 ± 58.68
<i>t</i> 值	0.372	2.116	2.024	2.062
<i>P</i> 值	0.714	0.046	0.049	0.047

与 CPP 基线值比较 ^a $P < 0.01$; 与 NO 组比较 ^b $P < 0.05$

3 讨论

经吗啡训练后的子代鼠,因表现出对用药地点的 CPP 形成与人类吗啡依赖者相似的渴求行为,因此,子代鼠对吗啡的 CPP 可用来评价其对吗啡的成瘾易感性程度^[5]。经过 7 d 的 3 mg/kg 恒定剂量的吗啡训练,孕晚期吗啡暴露的子代鼠对白箱产生稳定的 CPP,而对照组子代鼠并未表现出吗啡 CPP;之后继续进行 7 d 的首剂量为 4 mg/kg 递增剂量的吗啡训练,孕晚期吗啡暴露的子代鼠和对照组子代鼠均对白箱产生稳定的 CPP,但通过 CPP 分值的比较可以发现二者的成瘾易感性存在差异。有研究表明,吗啡 CPP 效应呈剂量依赖性增强,吗啡剂量越高,其表现出的吗啡成瘾性越强^[9]。本实验在进行吗啡递增量训练后,相比吗啡恒量训练,孕晚期吗啡暴露的子代鼠表现出对吗啡更强的成瘾性。故本研究对照组子代鼠在吗啡递增剂量的训练下也表现出了吗啡 CPP,但从 CPP 分值的比较依然可以发现实验组子代鼠的吗啡成瘾性明显增强。本研究在进行 CPP 训练时给予的吗啡剂量的选择参考了以往的研究数据^[2,4]。值得思考的是,如果所用剂量过大则可能会导致 CPP 的形成及表达被药物的巨大奖赏效应所掩盖,当然剂量过小也会对实验动物 CPP 倾向的形成造成影响。

临床观察和动物实验的结果表明,孕期阿片类

药物暴露对子代鼠脑结构和功能可产生持久的负性效应^[10];且增加对毒品的成瘾易感性^[11]。同样的,Rocha 等发现产前可卡因的暴露增加了子代鼠对可卡因的自我给药^[12]。本研究发现,孕晚期吗啡暴露对子代鼠的吗啡成瘾性有明显的增强作用,这与相关研究结论一致。Robio 等应用 CPP 模型证明了孕期暴露于 δ -9-四氢大麻酚可增强子代鼠的吗啡奖赏效应^[13]。应用吗啡诱导自发活动实验显示子代鼠对吗啡会产生更强的兴奋性^[2,4]。Chiang 等还提出受产前阿片类药物暴露的子代鼠会产生痛觉敏化和吗啡易耐受^[1]。另一方面,孕晚期吗啡暴露模型还不能完全模拟现实生活中产妇滥用成瘾药物这一现象,然而,连续的孕晚期吗啡暴露对研究这一现象的基本过程是恰当的,它们的研究目的是一致的。

在实验中发现孕晚期吗啡暴露的子代鼠进行吗啡 CPP 训练期间,共有 8 只子代鼠死亡,其中 2 只被同笼子代鼠咬死,另 6 只死因不明,这一现象是否与孕晚期给予吗啡暴露有关尚需进一步实验研究。目前关于产前吗啡暴露对子代鼠成瘾性的报道尚少,这一结论为以后研究孕晚期接触成瘾药物造成子代远期成瘾性的改变提供了一定的理论依据,但仍需进一步具体研究其神经生物学机制。本实验的吗啡暴露期选取孕 12~18 d,且吗啡为小剂量,如选取不同的孕期和不同的吗啡剂量进行暴露,结果是

否一致尚需进一步实验研究。

【参考文献】

[1] Chiang YC ,Hung TW ,Lee CW ,et al. Enhancement of tolerance development to morphine in rats prenatally exposed to morphine , methadone and buprenorphine[J]. J Biomed Sci 2010 ,17: 46.

[2] Timár J ,Sobor M ,Király KP ,et al. Peri ,pre and postnatal morphine exposure: exposure-induced effects and sex differences in the behavioural consequences in rat offspring [J]. Behav Pharmacol , 2010 21(1) : 58 – 68.

[3] Malanga CJ ,Kosofsky BE. Does drug abuse beget drug abuse? Behavioral analysis of addiction liability in animal models of prenatal drug exposure[J]. Brain Res Dev 2003 ,147: 47 – 57.

[4] Riley MA ,Vathy I. Mid-to late gestational morphine exposure does not alter the rewarding properties of morphine in adult male rats [J]. Neuropharmacology 2006 ,51(2) : 295 – 304.

[5] Bardo MT ,Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward [J]? Psychopharmacology (Berl) 2000 ,153(1) : 31 – 43.

[6] Everitt BJ ,Wolf ME. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective[J]. J Neurosci 2002 22(9) : 3312 – 3320.

[7] Chen Zhenyan ,Li Jing ,Huang Guangying. Effect of Bushen Yiqi Huoxue recipe on placental vasculature in pregnant rats with fetal

growth restriction induced by passive smoking[J]. Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2013 ,33(2) : 293 – 302.

[8] Watanabe T ,Nakagawa T ,Yamamoto R ,et al. Involvement of noradrenergic system within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal induced conditioned place aversion in rats [J]. Psychopharmacology (Berl) 2003 ,170: 80 – 88.

[9] Shoaib R ,Spanagel R ,Stohr T ,et al. Strain differences in the rewarding and dopamine-releasing effects of morphine in rats [J]. Psychopharmacology ,1995 ,117: 240 – 247.

[10] Derauf C ,Kekatpure M ,Neyzi N ,et al. Neuroimaging of children following prenatal drug exposure [J]. Semin Cell Dev Biol 2009 , 20(4) : 441 – 454.

[11] 黄晓科 ,银晓勇 ,黄艳秋 等. 大鼠海马毁损与学习记忆研究进展[J]. 中国老年学杂志 2012 ,32(10) : 2199 – 2201.

[12] Rocha BA ,Mead AN ,Kosofsky BE. Increased vulnerability to self-administer cocaine in mice prenatally exposed to cocaine [J]. Psychopharmacology 2002 ,163: 221 – 229.

[13] Buka SL ,Shenassa ED ,Niaura R. Elevated risk of tobacco dependence among offspring of mothers who smoked during pregnancy: a 30-year prospective study [J]. Am J Psychiatry 2003 ,160: 1978 – 1984.

(上接第 309 页)

时经灌胃给药 10 d 的颞叶癫痫大鼠全部死亡^[10] , 这提示高剂量 Res 对机体可能产生一定的毒性作用。

通过本研究 ,我们推测白藜芦醇抗癫痫效果的作用机制可能是通过保护海马神经元、维持神经元 Glu/GABA 平衡实现的。

【参考文献】

[1] Albrecht J ,Sidoryk-werzynowicz M ,Zielinska M ,et al. Roles of glutamine in neurotransmission [J]. Neuron Glia Biol , 2010 , 6 (4) : 263 – 276.

[2] De Rubels DA ,Young GB. Continuous EEG monitoring in a patient with massive carbamazepine overdose [J]. J Clin Neurophysiol , 2001 , 18(2) : 166 – 168.

[3] Wu Z ,Xu Q ,Zhang L ,et al. Protective effect of Resveratrol against Kainate-Induced Temporal Lobe Epilepsy in Rats [J]. Neurochem Res , 2009 , 34(8) : 1393 – 1400.

[4] Watson C ,Paxinos G. The Rat Brain in stereotaxic coordinates [M]. Imprint: Academic press , 2007: 145 – 146.

[5] Racine R , Okujava V , Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol , 1972 , 32(3) : 295 – 299.

[6] Parathath SR , Parathath S , Tsirka SE. Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice [J]. J Cell Sci , 2006 , 119(Pt 2) : 339 – 349.

[7] Ueda Y , Doi T , Tokumaru T. Collapse of extracellular Glu regulation during epileptogenesis: down-regulation and functional failure of GluTs function in rats with chronic seizure induced by kainic acid [J]. J Neurochem , 2001 , 76 (3) : 892 – 900.

[8] Eid T , Thomas MJ , Spencer DD , et al. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus : possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy [J]. Lancet , 2004 , 363(9402) : 28 – 37.

[9] Sepkuty JP , Cohen AS , Eccles C , et al. A neuronal GluTs contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy [J]. J Neurosci , 2002 , 22(15) : 6372 – 6379.

[10] Crowell JA , Korytko PJ , Morrissey RL , et al. Resveratrol-associated renal toxicity [J]. Toxicol Sci , 2004 , 82(2) : 614 – 619.