

吗啡对大鼠前额叶与海马 γ 振荡活动的差异性影响

田绍文, 邓海峰, 杨玉凤

(南华大学医学院生理学教研室, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 评估吗啡对大鼠前额叶与海马部位 γ 振荡活动的影响。 **方法** 大鼠吗啡腹腔给药, 连续 6 天; 同时在自由活动的大鼠上进行电生理信号记录与分析技术, 动态记录吗啡给药时大鼠前额叶皮质与海马 γ 振荡活动的变化; 采用 γ 振荡功率作为评价指标。 **结果** 在前额叶, 吗啡组大鼠 γ 振荡功率显著性低于生理盐水对照组; 在海马, 吗啡组大鼠 γ 振荡功率亦显著性低于生理盐水对照组。此外, 吗啡组大鼠前额叶 γ 振荡功率显著性低于海马部位。 **结论** 吗啡可引起大鼠前额叶与海马部位 γ 振荡活动降低, 且该效应存在脑区差异性。

关键词: 吗啡; 前额叶; 海马; γ 振荡; 大鼠

中图分类号: Q424 文献标识码: A 文章编号: 2095-1116(2011)01-0045-04

Differential Effects of Morphine on Gamma Oscillation in the Prefrontal Cortex and Hippocampus in Freely Moving Rats

TIAN Shao-wen, DENG Hai-feng, YANG Yu-feng

(Department of Physiology, Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of morphine on gamma oscillation in the prefrontal cortex and hippocampus in rats. **Methods** Rats were injected saline or morphine for continuous six days. At the same time, we recorded the activity of gamma oscillation in the prefrontal cortex and hippocampus by using an electrophysiological method adopted in the freely moving animals. Gamma oscillation power was calculated as an index. **Results** Compared with rats with saline, rats with morphine showed a significant less levels of gamma oscillation power in the prefrontal cortex and hippocampus. Furthermore, the gamma oscillation power in the prefrontal cortex was significantly decreased compared to that in hippocampus in the morphine-treated rats. **Conclusion** Morphine administration led to a decrease of gamma oscillation power in the prefrontal cortex and hippocampus. The effects of morphine on gamma activities in both regions were not uniform.

Key words: morphine; prefrontal cortex; hippocampus; gamma oscillation; rat

临床上, 吗啡可引起欣快感、镇痛、麻醉等效应, 也可影响高级认知功能, 如使记忆、注意、空间视觉编码等相关任务受损, 其机制仍不十分清楚^[1]。解剖上, 前额叶皮质与海马、感觉及前运动区有着广泛的纤维联系; 功能上, 前额叶皮质与海马能够参与各种感觉、情绪和行为反应的整合^[2], 如联合型学习

记忆过程、行为策略的选择和执行、条件化刺激动机特征的表征以及对行为反应的控制等^[3]。 γ 振荡 (30 ~ 100 Hz) 活动通过调谐局部神经元群尤其是功能上相关空间上相隔的神经元群同步化活动参与多种认知过程, 如联合型学习过程、语言的加工、感知与记忆的形成、选择性注意等^[4]; γ 振荡活动作为

收稿日期: 2010-09-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770689)、湖南省自然科学基金重点项目 (10JJ2009)、湖南省教育厅一般项目 (09C831)。

通讯作者: 田绍文, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: tsw.neuro@126.com.

研究脑高级认知功能的一个电生理指标已被广泛认可。本研究旨在记录分析吗啡对前额叶皮质与海马 γ 振荡的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 动物与分组

成年雄性 SD 大鼠(体重 250 ~ 280 g),单独饲养于温度(25 ± 2℃)、湿度恒定的环境中,自由取食和饮水。大鼠处于“12 h 明 - 12 h 暗”的周期中,每天早上七点钟开启照明装置。实验开始前,大鼠熟悉饲养环境 1 周;在此期间,实验者每天抚摸每只大鼠 2 ~ 3 min 以使其熟悉实验者以减少应激。实验操作遵照美国国立卫生研究院的《国家实验动物健康与管理条例》进行。大鼠随机分为生理盐水组($n = 10$)与吗啡组($n = 10$)。

1.2 手术与电极定位检测

戊巴比妥钠盐麻醉后将大鼠固定于立体定位仪上,沿中线切开头皮并将肌肉等组织向两侧剥离暴露出颅骨,清理干净颅骨表面,待干燥后,在前额叶与海马部位上方的颅骨各钻一直径约 0.5 mm 的小孔。套于石英管内的单根钨丝记录电极(直径 100 μm ;仅尖端暴露)被埋植于左侧半球的前额叶皮质区(AP, 4.2 mm; ML, 2.2 mm; DV, 4.0 mm)与海马部位(AP, -3.5 mm; ML, 2.0 mm; DV, 3.2 mm)。两个不锈钢小螺钉被钻入右侧半球颅骨分别作为参考电极(AP, 3; ML, 2)和地线(AP, -5; ML, 2)。此外,2 ~ 4 个类似的小螺钉被钻入颅骨的其它部分以起加固的作用。记录电极、参考电极和地线被连接到一个小型 6 针插头。随后用医用牙托水泥将整个装置固定于颅骨表面。术后大鼠恢复 10 天左右。

全部试验完成后,过量的戊巴比妥钠深度麻醉大鼠,经记录电极通以负向电流(10 mA, 20 s);随后,经左心室注入生理盐水,直至由静脉流出的液体几乎变白时,再灌注加 1% 亚铁氰化钾的 10% 福尔马林溶液,至静脉流出液为淡黄色为止。取下动物头部,放入 10% 福尔马林中固定 6 ~ 7 天,去除颅骨,取出脑组织置于 10% 福尔马林溶液中进行重固定。取固定后的脑组织,流水充分冲洗后,用振动切片机作连续的冠状切片,厚度为 50 μm 。在显微镜下,观察损伤灶的中心位置,即记录部位。

1.3 电生理记录装置

首先将大鼠头部的插头连接(通过一个可拨插的插座)到一个前置放大器,该放大器有助于减轻

运动带来的干扰。随后,EEG 信号被放大、滤波(带通:0.5 ~ 100.0 Hz)及数字化(双相,1 000 Hz),最后保存在电子表格内作进一步分析。

1.4 吗啡注射及电信号记录程序

正式吗啡或生理盐水注射之前,大鼠被置于一圆形小室(直径 45 cm,高度 50 cm)内适应 40 min/天,连续 3 天,以使大鼠适应实验装置。在吗啡注射期间(连续 6 天),在其第 1 天,大鼠首先被放入小室内 8 min,并在第 6 min 采集电生理信号,持续 2 min,随后取出;随机间隔 8 ~ 15 min 后,腹腔注射吗啡(8 mg/kg)或相同体积的生理盐水后立即放入小室内 30 min,并在第 25 min 后采集电生理信号,持续 2 min。在随后的 5 天内,试验程序与第 1 天相似,区别在于第 2 天与第 3 天吗啡剂量逐渐递增(15 mg/kg 与 30 mg/kg),并在第 4、5、6 天维持在 30 mg/kg 的剂量水平。

1.5 电信号的处理与功率计算

为了计算 γ 振荡功率,首先将单次连续 2 min 的电生理信号数据分割为 M 个无干扰的片断,每个片断包括 1 024 个采样点,然后对每个片断进行滤波(带通:30 ~ 100 Hz;点阻:48 ~ 52 Hz)后计算其 γ 振荡功率: $P = (1/N) \sum |x(n)|^2$ ($n = 1$ 至 1 024, $N = 1$ 024)。最后对 M 个片断的 γ 振荡功率进行平均作为当次记录的 γ 振荡功率;整个计算由 Matlab 软件包完成(Matlab 6.5)。为了评估单次吗啡对 γ 振荡活动的影响,计算归一化功率 P_{nmy} : $P_{nmy} = [(P_{my} - P_{by})/P_{by}] \times 100\%$ (P_{my} 为第 y 天吗啡注射第 25 min 后记录的功率; P_{by} 为第 y 天吗啡注射前在小室内记录的功率; $y = 1$ 至 6);因此, P_{nmy} 仅反映当天吗啡注射对 γ 振荡活动的效应而与以前吗啡注射产生的慢性效应无关。

1.6 数据分析

采用双因素重复性测量方差分析方法进行统计分析,Post-hoc 检测采用 Tukey HSD 方法。使用的统计分析软件为 Sigma Stat 3.2。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 判断差异有显著性。

2 结果

2.1 记录电极的定位

记录电极所在位置的组织学检测结果如图 1 所示,记录电极的尖端(图中箭头所指区域)主要集中于前额叶皮质的外侧部(图 1A)与海马的 CA1 区域(图 1B)。

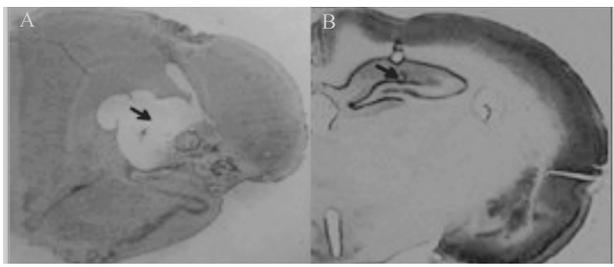


图1 记录电极的组织学检测结果

图中圆形阴影部分表示记录电极的尖端在前额叶皮质 (AP, 4.2 mm) 与海马 (AP, -3.5 mm) 的分布范围

2.2 吗啡对前额叶皮质 γ 振荡功率的影响

吗啡注射的第1天,与生理盐水组对照比较,8 mg/kg吗啡注射即能导致前额叶皮质 γ 振荡功率显著性降低 ($P < 0.05$);在第2天与第3天,当吗啡剂量增加至15 mg/kg与30 mg/kg时,前额叶皮质 γ 振荡功率表现出极显著水平的下降 ($P < 0.001$)。随后的3天,当吗啡剂量维持在30 mg/kg时,前额叶皮质 γ 振荡功率的降低呈现出回升的趋势,但仍然维持在极显著性降低的水平 ($P < 0.001$) (图2)。

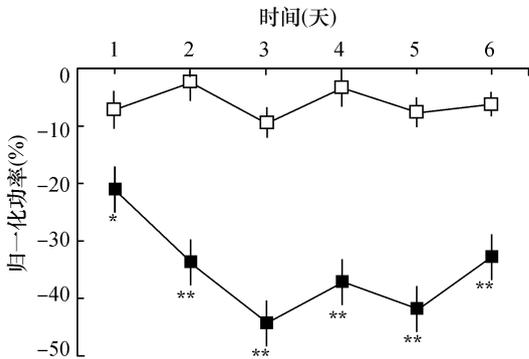


图2 生理盐水组(空心线)与吗啡组(实线)大鼠前额叶皮质 γ 振荡功率的比较

与同一时间点的生理盐水组比较, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.001$

2.3 吗啡对海马 γ 振荡功率的影响

吗啡注射的第1天,吗啡组大鼠海马 γ 振荡功率与生理盐水组比较差异无显著性 ($P > 0.05$);在第2天与第3天,当吗啡剂量增加至15 mg/kg与30 mg/kg时,海马 γ 振荡功率显著性降低 ($P < 0.05$ 与 $P < 0.01$)。随后的3天,当吗啡剂量维持在30 mg/kg时,前额叶皮质 γ 振荡功率的降低呈现出回升的趋势,但仍然维持在显著性降低的水平 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (图3)。

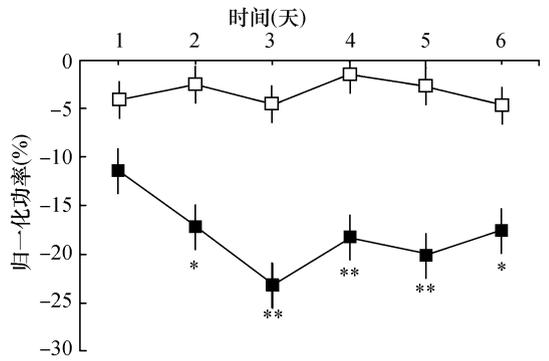


图3 生理盐水组(空心线)与吗啡组(实线)大鼠海马 γ 振荡功率的比较

与同一时间点的生理盐水组比较, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.001$

2.4 吗啡组大鼠前额叶与海马 γ 振荡功率的脑区间比较

吗啡注射的第1天,吗啡组大鼠前额叶与海马 γ 振荡功率差异无显著性;在随后的5天期间,前额叶 γ 振荡功率均较海马部位显著性降低 ($P < 0.01$) (图4)。

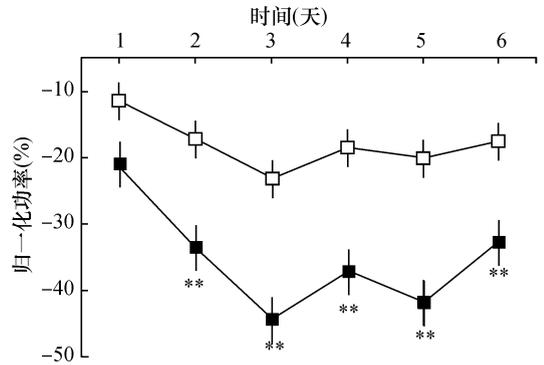


图4 吗啡组大鼠前额叶(实线)与海马(空心线) γ 振荡功率的脑区间比较

与同一时间点的海马部位的比较, ** : $P < 0.01$

3 讨 论

脑内存在大量的振荡性电活动, γ 振荡是指振荡频率为30 ~ 100 Hz的脑电活动。 γ 振荡产生的脑机制目前仍不十分清楚;在新皮层与丘脑,已发现多种神经元具有内在的 γ 振荡特征,其中丘脑—皮质投射性神经元很可能作为丘脑—皮质系统 γ 振荡的“起搏器”而起作用^[5]。海马 γ 振荡的产生,一方面源于海马外传入性输入的刺激;另一方面也能在仅由抑制性中间神经元构成的网络内产生,即通过中间神经元间的相互性突触抑制来介导,该过程

主要受控于 GABAA 反应衰退的动力学特征^[6]。功能上, γ 振荡主要通过三方面的机制参与多种精神活动与认知过程: 振荡区域在时域上对输入信息的门控效应; γ 振荡的长程同步化使得在空间上分隔但功能上相关的脑区神经元产生同步化发放; 同步化发放进一步导致相关脑区间突触连接强度的长时程改变。

在中枢神经系统, 阿片类药物如吗啡主要通过三类阿片受体 (μ 、 δ 和 κ 型受体) 的结合进而模拟内源性阿片肽来起作用的; 其中 μ 型阿片受体对介导阿片类药物奖赏效应起着关键的作用。伏隔核、腹侧背盖区、眶额叶皮质、丘脑中背侧核团、杏仁核及苍白球等组成皮质—苍白球—纹状体环路, 该环路具有高密度的 μ 型阿片受体分布以及密集的相互纤维投射, 在功能上该环路介导了药物的奖赏效应与目标朝向的行为反应^[7]。 μ 型阿片受体的激活通过 G 蛋白介导的机制降低突触前 GABA 释放; 而中间神经元的激活及随后的 GABA 释放在海马与新皮层 γ 振荡的产生与维持过程中起着关键性作用, 该过程在很大程度上决定于 GABAA 受体介导的 IPSP 的幅度及其动力学特征; γ 振荡能够进一步“募集”海马局部神经元及皮层功能柱内神经元同步化发放^[8]。因此, 阿片类药物可通过抑制 GABA 的释放降低甚至消除 γ 振荡活动进而使后者介导的认知功能受损。

慢性阿片吸食可通过不同的机制对生理及心理过程产生多方面的影响。 μ 型阿片受体的激活增加 DA 的释放介导了阿片的奖赏 (欣快感) 与强化效应; 阿片戒断的初期, DA 释放的降低可能与烦躁不安、欣快感丧失等戒断症状相关, 而 DAD2 受体拮抗剂能诱导吗啡依赖的动物出现戒断症状并能衰减阿片对阿片依赖动物的条件化强化效应, 表明了 DA 机制也涉及了阿片戒断症状及其诱导的动机效应; δ 与 κ 型阿片受体拮抗剂主要诱导情感方面的戒断症状^[9]。本试验结果表明, 阿片也可通过 GABA 机制降低前额叶皮质与海马 γ 振荡活动; 考虑到前额叶皮质与海马在情绪与认知调节中起着重要作用,

因此认为阿片引起的认知功能受损至少部分与前额叶皮质与海马 γ 振荡活动的降低相关。

此外, 本研究结果表明, 吗啡诱导的前额叶 γ 振荡功率的降低要显著高于海马部位, 提示吗啡对不同脑区 γ 振荡活动影响的强弱是脑区依赖性的, 其具体神经机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Whittington MA, Traub ED, Faulkner HJ, et al. Morphine disrupts long-range synchrony of gamma oscillations in hippocampal slices [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:5807-5811.
- [2] Hof PR. Human orbitofrontal cortex: cytoarchitecture quantitative immunohistochemical percolations [J]. J Comp Neurol, 1995, 359:48-68.
- [3] Gallagher M. Orbitofrontal cortex and representation of incentive value in associative learning [J]. J Neurosci, 1999, 19:6610-6614.
- [4] Miltner WHR, Braun C, Arnold M, et al. Coherence of gamma-band EEG activity as a basis for associative learning [J]. Nature, 1999, 397:434-436.
- [5] Pinault D, Deschênes M. Voltage-dependent 40 Hz oscillations in rat reticular thalamic neurons in vivo [J]. Neuroscience, 1992, 51:245-258.
- [6] Traub RD, Whittington MA, Buhl EH, et al. On the mechanism of the frequency shift in neuronal oscillations induced in rat hippocampal slices by tetanic stimulation [J]. J Neurosci, 1999, 19:1088-1105.
- [7] Pierce RC, Kalivas PW. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants [J]. Brain Res Rev, 1997, 25:192-216.
- [8] Whittington MA, Faulkner HJ, Doherty HC, et al. Neuronal fast oscillations as a target site for psychoactive drugs [J]. Pharmacol Therapeut, 2000, 86:171-190.
- [9] Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction [J]. Nature Rev Neurosci, 2001, 2:119-128.

(此文编辑 朱雯霞)