

异丙酚自身给药对大鼠伏隔核内 ERK 表达的影响

王本福 杨 博 孙安娜 黄茜茜 金胜威 李 军 赖苗军 周文华 刘惠芬 张富强 连庆泉

摘 要 **目的** 观察异丙酚静脉自身给药对大鼠伏隔核内 p-ERK 表达的影响。**方法** SD 大鼠随机分为 3 组 ($n=6$): 对照组 (C 组)、1.00mg/kg 异丙酚组 (P1 组)、1.70mg/kg 异丙酚组 (P2 组)。用静脉自身给药法建立异丙酚精神依赖模型, Western blotting 法检测大鼠伏隔核内 p-ERK 和 ERK 的变化。**结果** P1 组、P2 组的异丙酚可以诱发大鼠建立静脉自身给药行为。与 P1 组相比, P2 组大鼠有效鼻触 ($P<0.01$) 和注射次数 ($P<0.01$) 明显增加。随着异丙酚剂量的增加, 大鼠伏隔核内 p-ERK/ERK 的表达明显增加 ($P<0.01$)。**结论** 异丙酚静脉自身给药增加了大鼠伏隔核内 p-ERK 的表达, ERK 信号转导通路可能参与了异丙酚的精神依赖性。

关键词 异丙酚 精神依赖性 细胞外信号调节激酶 自身给药 伏隔核

Effect of Propofol Maintained Self-administration on Expression of ERK in Nucleus Accumbens. Wang Benfu, Yang Bo, Sun Anna, et al. Department of Anesthesiology of The Second Affiliated Hospital, The Institute of Neuroendocrine, Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the effect of propofol maintained self-administration on the expression of p-ERK in nucleus accumbens of rats. **Methods** Rats were divided into 3 groups ($n=6$): intralipid control group and propofol groups (P1 = 1.00mg/kg, P2 = 1.70mg/kg). To assess the psychic dependence of propofol, the technique of intravenous self-administration by rats was utilized. The expression of p-ERK/ERK in NAc was detected by Western blotting. **Results** All the rats trained with propofol at dose 1.00mg/kg and 1.7mg/kg showed self-administration behavior. Compared to P1 group, the number of active nose-poke response and injections of P2 group increased significantly ($P<0.01$). Further, changed of propofol, the expression of p-ERK/ERK in nucleus accumbens was dose-dependent increased ($P<0.01$). **Conclusion** The data suggested that propofol-maintained self-administration increase the expression of p-ERK in NAc, and the ERK signal pathway maybe involve in psychic dependence of propofol.

Key words Propofol; Psychological dependence; ERK; Self-administration; NAc

异丙酚因临床性能良好, 广泛地用于临床麻醉和 ICU 镇静。临床资料和动物实验提示异丙酚具有明显的精神依赖性。伏隔核是中脑边缘多巴胺系统的重要核团, 参与了药物的成瘾。细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated, ERK) 是促分裂原活化蛋白激酶家族中的重要成员, 牵涉到神经可塑性、学习、记忆和药物强化等方面, 可能参与了药物成瘾。自身给药实验可反映药物的强化效应, 是评价药物精神依赖性的常用方法。本实验采用静脉自身给药法建立异丙酚精神依赖性模型, 观察大鼠行为学改变, 应用 Western blotting 法检测伏隔核内 ERK 的表达,

探索异丙酚成瘾的机制。

对象与方法

1. 对象: 清洁级雄性 SD 大鼠 18 只 (浙江省实验动物中心提供), 体重 240 ~ 270g, 年龄 14 周。单笼饲养, 自由进食进水, 室温 21 ~ 25℃, 24h 昼夜交替饲养。随机分为 3 组 ($n=6$): 脂肪乳对照组 (C 组), 异丙酚 1.00mg/kg 组 (P1 组), 异丙酚 1.70mg/kg 组 (P2 组)。异丙酚 (批号: EF834, AstraZeneca 公司, 意大利), 脂肪乳剂 (批号: 80BE191, 华瑞制药厂)。

2. 方法: (1) 大鼠静脉自身给药实验^[1]: 大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 40mg/kg 和阿托品 0.3mg/kg 麻醉后, 右颈外静脉插管。静脉导管由 3.5cm 硅胶管 (外径 0.94mm, 内径 0.51mm) 和 10cm 聚乙烯管 (PE-20) 组成, 聚乙烯管部分通过背部穿出体外。置管后连续 3 天经颈外静脉注射 0.2ml 青霉素 10 万 U 抗感染, 0.1ml 肝素钠溶液 (50U/ml) 抗凝, 恢复 7 天。第 8 天, 每天 14:00 ~ 17:00 为实验期, 连续 14 天。实验期内禁食, 每次实验前, 检查大鼠的给药血管是否通畅、有无渗漏。每个笼配备两个鼻触探头, 分别为有效开关和无效开关, 实验程序为固定比率 1:1 (FR=1), 即大鼠鼻触 1 次有效开关注射 1 次异丙酚或脂肪乳剂, 鼻触无效开关不注射异

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972840/C16); 浙江省自然科学基金资助项目 (Z2101211); 温州市科技局项目 (Y20100046)

作者单位: 325027 温州医学院附属二院麻醉科、麻醉神经内分泌研究所 (王本福、黄茜茜、杨博、连庆泉); 315010 宁波, 微循环与莨菪类药物研究所 (孙安娜、赖苗军、刘惠芬、周文华、张富强)

通讯作者: 连庆泉, 电子邮箱: lianqingquan@yahoo.com.cn

丙酚或脂肪乳剂。开关上方的绿色信号灯在注射期间闪烁,注射完毕后熄灭,在注射期间上壁的笼灯熄灭,进入不应期30s,在此期间大鼠如再次触动有效开关则不诱发药物注射。记录有效鼻触、无效鼻触和药物注射次数,所有数据均由计算机自动记录。整个实验系统由计算机自动控制。实验通过训练使大鼠形成操作式条件反射一触鼻觅药行为。实验期间由计算机控制每隔1h给予大鼠1次强制注射,当大鼠的触鼻觅药行为形成(每天触鼻总数大于10次,连续3天),停止强制注射药物,不再干涉大鼠的行为反应,每天训练限定最高注射次数为50次,如果已经达到注射50次且没有到17:00,此后鼻触开关关闭不再记录。(2) Western blotting 检测:伏隔核ERK的表达采用BS3(Pierce Ltd, Rockford, IL)一种可通透细胞膜的水溶解的蛋白交联剂。脑组织放入2mmol/L的BS3冷的CSF溶液(148mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 1.2mmol/L CaCl₂, 0.85mmol/L MgCl₂, 10mmol/L glucose, 2mmol/L BS3) 4℃处理30min,用100mmol/L甘氨酸4℃10min中和反应;脑组织用匀浆缓冲液(25mmol/L HEPES, 500mmol/L NaCl, 2mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 1×蛋白酶抑制剂混和物, 1×磷酸酶抑制剂的混和物, 0.1% Nonidet P-40)超声匀浆10s。测定总蛋白浓度,样品分装,置-80℃冰箱保存备用。取一定量的样品,加SDS凝胶加样缓冲液和2-ME, 95℃水浴变性10min。取约30μg蛋白样品于4%~15%梯度胶中,电泳分离。其他受体和蛋白表达测定用SDS聚丙烯酰胺电泳,电泳完毕取出凝胶,将蛋白质电泳转移至PVDF上,将膜放在含10%脱脂牛奶的TBST缓冲液(150mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris-HCl pH7.4, 0.2% Tween-20)中孵育以封闭膜上的非特异性结合位点,先后与特异性抗体孵育,4℃过夜,用TBST缓冲液洗涤多次后,加入HRP连结的二抗处理60min,用ECL试剂盒检测,曝光于X线片后显影定影。扫描X线片上的特异性条带,并做图像分析。

3. 统计学方法:应用SPSS 13.0统计软件分析数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和重复测量方差进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

C组大鼠的有效鼻触和无效鼻触没有明显的变化,差异无统计学意义,大鼠不能形成自身给药行为。P1、P2组大鼠的有效鼻触明显增加,差异有显著性意义($P < 0.01$),大鼠形成明显的自身给药行为。和C组比较,P1组、P2组的有效鼻触明显增加,差异有显著性意义($P < 0.01$);无效鼻触未见明显变化,差异无显著性意义($P > 0.05$)。与P1组相比,P2组大鼠每天的有效鼻触增加,差异有显著性意义($P < 0.01$)(图1)。和C组比较,P1组、P2组注射次数增加,差异有显著性意义($P < 0.01$)。与P1组相比,P2组大鼠每天的注射次数也明显增多,差异有显著性意义($P < 0.01$)(图2)。随着异丙酚剂量的增加,大鼠伏

隔核内p-ERK/ERK的表达也增加,差异有显著性意义($P < 0.01$)(图3)。

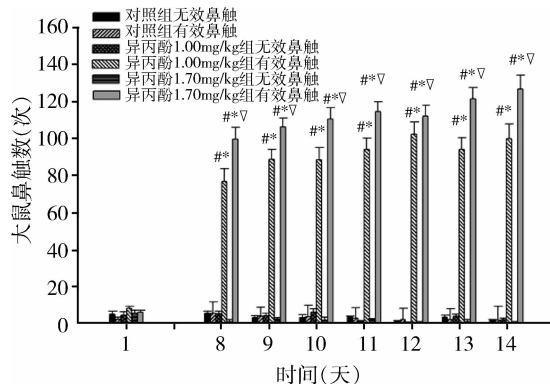


图1 大鼠自身给药实验鼻触数

和对照组比较, $^{\#}P < 0.05$; 和无效鼻触比较, $^*P < 0.05$; 和异丙酚1.00mg/kg组比较, $^{\nabla}P < 0.05$

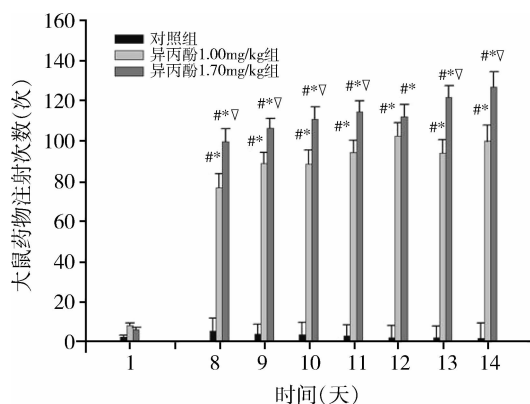


图2 大鼠自身给药实验药物注射次数

和对照组比较, $^{\#}P < 0.05$; 和第一天比较, $^*P < 0.05$; 和异丙酚1.00mg/kg组比较, $^{\nabla}P < 0.05$

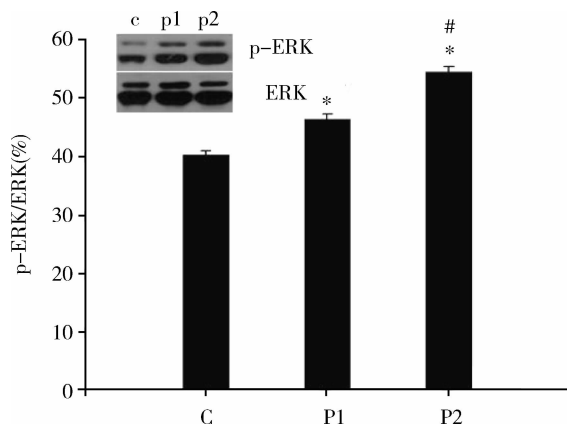


图3 各组自身给药大鼠伏隔核内p-ERK/ERK的比较

C. 对照组; P1. 异丙酚1.00mg/kg组; P2. 异丙酚1.70mg/kg组; 和C组比较, $^*P < 0.05$; 和P1组比较, $^{\#}P < 0.05$

讨 论

异丙酚作为静脉全麻药物,在临床应用 20 多年,因诱导迅速、易于控制、苏醒快、临床性能良好等特点,广泛地用于临床麻醉和 ICU 镇静。静脉注射异丙酚可产生兴奋、愉悦、欣快感,滥用异丙酚可导致药物的产生依赖性^[2~4]。位置偏爱试验和自身给药实验等动物研究也验证了异丙酚具有明显的精神依赖性^[1,5,6]。

自身给药实验是检验药物是否具有精神依赖性的可靠方法,利用操作性条件反射原理,动物通过觅药行为,可获得一定量的药物,建立自身给药模型。大鼠静脉自身给药模型较好地模拟了人类的用药行为,在成瘾研究中应用广泛,故本研究采用大鼠静脉自身给药法建立异丙酚依赖模型。

细胞外信号调节激酶牵涉到神经可塑性、学习、记忆和药物强化等方面,参与了药物的成瘾^[7~9]。ERK 在中枢内广泛表达,特别是在与药物成瘾相关的核团如杏仁核、额前皮质、伏隔核等。细胞外信号可以作用于酪氨酸激酶受体,酪氨酸激酶受体磷酸化,级联反应激活 G - 蛋白 Ras、丝氨酸 - 苏氨酸激酶 Raf - 1 和 MAPK/ERK 激酶,然后 MEK 自磷酸化激活 ERK。胞外信号也可以经 G 蛋白偶联受体和钙离子通道,分别通过第二信使 cAMP 和钙离子,激活蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 和钙调节蛋白,然后激活 ERK。ERK 磷酸化在吗啡、四氢大麻和苯丙胺的奖赏效应中也起了重要作用^[10,11]。而且,中脑 - 皮质 - 边缘的 ERK 通路激活可以引起药物的滥用^[12]。

目前认为海洛因、可卡因等成瘾药物的强化效应主要通过中脑边缘多巴胺投射系统,静脉注射各种依赖性药物增加了多巴胺传导^[13]。伏隔核作为中脑 - 边缘多巴胺系统的重要区域,在药物成瘾中起了重要作用^[14]。成瘾药物如可卡因、尼古丁、吗啡等可以使腹侧背盖区、伏隔核等区域的 ERK 磷酸化表达明显增加。伏隔核显微注射 MEK 阻滞剂 PD98059 或 U0126,可以减弱小鼠由吗啡^[10]和四氢大麻诱导的位置偏爱^[11]。伏隔核注入 MEK 抑制剂 PD98059 可以减弱苯丙胺诱导的位置偏爱。实验结果也发现异丙酚依赖模型大鼠伏隔核中 ERK 的表达水平增加,随着异丙酚剂量的增加,依赖大鼠模型伏隔核 p - ERK 表达也明显增强。异丙酚诱发大鼠产生静脉自身给药行为,增加了大鼠伏隔核内 p - ERK 的表达。因此,伏隔核 ERK 信号转导途径可能参与了异丙酚的精神依赖性。

总之,在一定剂量范围内,异丙酚可以诱发大鼠建立静脉自身给药行为。随着异丙酚剂量的增加,大鼠伏隔核内 p - ERK/ERK 的表达明显增加。伏隔核 ERK 信号转导途径可能参与介导了异丙酚的精神依赖性。

参考文献

- 1 王本福,金胜威,赖苗军,等. 异丙酚诱发大鼠精神依赖性的评价[J]. 中华麻醉学杂志,2009, 29(3):236 - 239
- 2 Wilson C, Canning P, Caravati EM. The abuse potential of propofol[J]. Clin Toxicol (Phila),2010,48(3):165 - 170
- 3 Bonnet U, Harkener J, Scherbaum N. A case report of propofol dependence in a physician[J]. Psychoactive Drugs, 2008, 40(2):215 - 217
- 4 Roussin A, Montastruc JL, Lapeyre - Mestre M. Pharmacological and clinical evidences on the potential for abuse and dependence of propofol: a review of the literature[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2007, 21(5):459 - 466
- 5 Pain L, Oberling P, Sandner G, *et al.* Effect of propofol on affective state as assessed by place condition in paradigm in rats[J]. Anesthesiology, 1996, 85(1):121 - 128
- 6 LeSage MG, Stafford D, Glowa JR. Abuse liability of the anesthetic propofol: self - administration of propofol in rats under fixed - ratio schedules of drug delivery[J]. Psychopharmacology (Berl), 2000, 153(1):148 - 154
- 7 Zhai H, Li Y, Wang X, *et al.* Drug - induced alterations in the extracellular signal - regulated kinase (ERK) signalling pathway: implications for reinforcement and reinstatement[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(2):157 - 172
- 8 Lin X, Wang Q, Ji J, *et al.* Role of MEK - ERK pathway in morphine - induced conditioned place preference in ventral tegmental area of rats[J]. Neurosci Res, 2010, 88(7):1595 - 1604
- 9 McGinty JF, Whitfield TW, Berglund WJ. Brain - derived neurotrophic factor and cocaine addiction[J]. Brain Res, 2010, 1314:183 - 193
- 10 Ozaki S, Narita M, Narita M, *et al.* Role of extracellular signal - regulated kinase in the ventral tegmental area in the suppression of the morphine - induced rewarding effect in mice with sciatic nerve ligation[J]. J Neurochem, 2004, 88(6):1389 - 1397
- 11 Valjent E, Pages C, Rogard M, *et al.* Delta 9 - tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk - 1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission[J]. Eur J Neurosci, 2001, 14(6):342 - 352
- 12 Corbille AG, Valjent E, Marsicano G, *et al.* Role of cannabinoid type 1 receptors in locomotor activity and striatal signaling in response to psychostimulants[J]. J Neurosci, 2007, 27(26):6937 - 6947
- 13 Wise RA. Dopamine, learning and motivation[J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(6):483 - 494
- 14 Koob GF. Brain stress systems in the amygdala and addiction[J]. Brain Res, 2009, 1293:61 - 75

(收稿:2011 - 05 - 05)

(修回:2011 - 05 - 17)