

网络出版时间: 2023-03-28 15:26:00 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20230328.1033.016.html>

基于联合式学习机制建立小鼠海洛因成瘾行为学模型

张宇航^{1,2,3,4}, 马岩团², 黄薇², 张尊月³, 何秋月^{2,3}, 钱源^{1,2,3,4}

摘要 目的 基于联合式学习机制建立一个实验室 C57BL/6 小鼠海洛因成瘾模型。方法 选择黑箱与白箱作为记忆训练环境,开展 3 种行为学训练范式研究:① 巴甫洛夫条件位置偏好(CPP)训练范式,上午 9:00 腹腔注射 0.1 ml 对应浓度(5.0、10.0、20.0 mg/kg)海洛因后将小鼠放入白箱进行记忆强化训练 30 min,24 h 后腹腔注射 0.1 ml 0.9% 氯化钠溶液放入黑箱训练,训练结束后检测小鼠对黑白箱的记忆偏好程度(不同箱体的运动时间)。② 基于 CPP 训练范式的结果进行纳洛酮条件位置厌恶(CPA)训练范式;③ 行为敏化训练范式,基于 3 个行为学实验的统计学结果和实验小鼠给药后致死率建立了海洛因成瘾评分量表。选用 3 个不同剂量的海洛因(5.0、10.0、20.0 mg/kg)诱导海洛因成瘾,通过评分表上的结果来选择最合适浓度的海洛因。结果 在 CPP 训练范式中,5.0、10.0、20.0 mg/kg 海洛因组均出现 CPP($P < 0.05$ $P < 0.001$ $P < 0.05$); CPA 训练范式中,与对照组相比,10.0 mg/kg 海洛因组 CPA 诱导率最高且 2 次诱导后出现 CPA($P < 0.01$);行为敏化训练范式中,各浓度海洛因组均会引起行为敏化改变($P < 0.001$);其中 5.0、10.0 mg/kg 海洛因组不会导致动物死亡,10.0 mg/kg 海洛因组的剂量在评分表中得分最高,可作为建立稳定的海洛因成瘾实验动物模型浓度。结论 该研究有效地建立起小鼠海洛因成瘾模型,且适用于建模药物浓度筛选,动物成活率高,简单实用。联合式学习机制能有效地缩短海洛因成瘾实验动物模型建立周期。

关键词 海洛因;行为学范式;动物模型

中图分类号 R-33

2023-02-21 接收

基金项目 国家卫生健康委员会毒品依赖和戒治重点实验室科学研究项目(编号:2020DAMARA-007);昆明医科大学生物资源数字化开发应用项目(编号:202002AA100007);云南省卫生健康委员会医学学科带头人培养计划(编号:D-2019016)

作者单位¹ 昆明市妇幼保健院,昆明 650000

² 昆明医科大学研究生院,昆明 650500

³ 云南省国家卫生健康委员会毒品依赖和戒治重点实验室,昆明 650500

⁴ 普洱市人民医院(昆明理工大学附属普洱医院)检验科,普洱 665000

作者简介 张宇航,男,硕士;

钱源,女,教授,主任技师,博士生导师,责任作者,E-mail: yuanqian2x@hotmail.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0609-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.015

海洛因成瘾是一个与社会、生理、遗传、心理、环境等多种因素有关的一种持续性渴求和强迫性觅药行为的复发性脑慢病,同时也是目前严重危及人类健康并为全球所关注的公共卫生问题^[1]。既往研究^[2]中,实验动物模型是研究阿片类药物成瘾相关行为、生理、神经生物学、遗传和环境基础的重要工具。这些模型在很大程度上可靠且可重复,在理解成瘾药物的神经生物学机制和捕捉人类成瘾的各个方面提供了很大帮助^[3]。由于不同实验室使用海洛因的浓度及给药方式难以统一,目前并没有标准的方法来建立海洛因成瘾的动物模型^[4],该文旨在为海洛因成瘾联合学习记忆机制研究提供一种可靠的行为学范式,为进一步确定海洛因依赖的潜在分子机制,并为治疗和康复提供线索。

1 材料与方法

1.1 动物 C57BL/6J 小鼠,雄性,120 只,SPF 级,8 周龄,22~25 g,购自斯莱克景达(湖南)实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0004,饲养在(23±2)℃、(50±5)%湿度的单独笼子中,动物自由摄食饮水。小鼠饲养在一个 12 h/12 h 明暗交替的环境中。本研究获得昆明医科大学伦理委员会授予的项目许可(编号:kmmu20211261)。动物实验符合国家《实验动物护理和使用指南》(GB14925)。120 只小鼠被用于条件位置偏好(conditioned position preference, CPP)实验、条件位置厌恶(conditioned position aversion, CPA)实验、行为敏化实验。每个实验分为 4 组:生理盐水组(对照组,注射 0.9% 氯化钠溶液)、3 个海洛因组(模型组,注射海洛因,浓度分别为 5.0、10.0、20.0 mg/kg),每组 10 只。

1.2 药物 海洛因由云南省昆明公安局提供;盐酸纳洛酮购于上海麦克林实验室有限公司(批号:F3879-1G);注射用 0.9% 氯化钠溶液由昆明医科大学第一附属医院提供。所有药物均溶于 0.9% 的氯化钠溶液中,以达到其最终浓度。

1.3 CPP 实验范式 实验分为 4 个组,对照组和 3 个模型组(浓度分别为 5.0、10.0、20.0 mg/kg),每组 10 只。海洛因和 0.9% 的氯化钠溶液给予方式为腹腔注射,每次 0.1 ml。CPP 实验分为 3 个阶段的测试:适应阶段、记忆训练阶段和测试阶段。

1.3.1 适应阶段 造模前,让小鼠每日上午 9:00 在两室之间自由行走 15 min,连续 3 d。第 3 天,记录小鼠在两个箱体的停留时间,以确定其自然偏好,淘汰对某个箱体有自然偏好的小鼠。伴药箱随机选择,本实验选择白箱作为伴药箱,黑箱作为非伴药箱^[5]。

1.3.2 记忆训练阶段 两个箱体的通道用挡板(挡板通道关闭)隔断。第 1 天将海洛因组动物于上午 9:00 腹腔注射 0.1 ml 海洛因,浓度分别为 5.0、10.0 和 20.0 mg/kg,然后把小鼠放入伴药箱并训练 30 min;第 2 天将海洛因组动物于上午 9:00 腹腔注射 0.1 ml 0.9% 氯化钠溶液,然后把小鼠放入伴药箱并训练 30 min;2 d 为 1 个训练周期。对照组同样以 2 d 为 1 个训练周期,用 0.9% 氯化钠溶液代替海洛因并接受相同训练。

1.3.3 测试阶段 每个训练周期结束后进行测试,将两个箱体之间的挡板通道打开,不给予小鼠海洛

因干预,轻轻放入盒子中,让其自由活动 15 min,分别记录它们在伴药箱和非伴药箱中的停留时间,统计分析是否出现 CPP,若未出现偏好,进行下一个训练周期,若出现偏好则终止实验^[6]。见图 1、2。

1.4 CPA 实验范式 对照组腹腔注射 0.9% 的氯化钠溶液 0.1 ml,3 个模型组分别注射浓度分别为 5.0、10.0、20.0 mg/kg 海洛因 0.1 ml;纳洛酮给予方式为腹腔注射,每次 0.2 ml,浓度为 1 mg/kg。CPA 实验分为 3 个阶段的测试:适应阶段、记忆训练阶段和测试阶段。

1.4.1 适应阶段 造模前,让小鼠每日上午 9:00 在两室之间自由行走 15 min,连续 3 d。第 3 天,记录小鼠在两个箱体的停留时间,以确定其自然偏好,淘汰对某个箱体有自然偏好的小鼠。为保证伴药箱选择的随机性,本实验选择黑箱作为伴药箱,白箱作为非伴药箱。

1.4.2 记忆训练阶段 两个箱体的通道用挡板(挡板通道关闭)隔断。每日上午 9:00 给模型组小鼠腹腔注射 0.1 ml 海洛因,浓度分别为 5.0、10.0 和 20.0 mg/kg,对照组腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液。3 h 后模型组和对照组腹腔注射纳洛酮 0.2 ml,浓度为 1 mg/kg,然后放入伴药箱停留

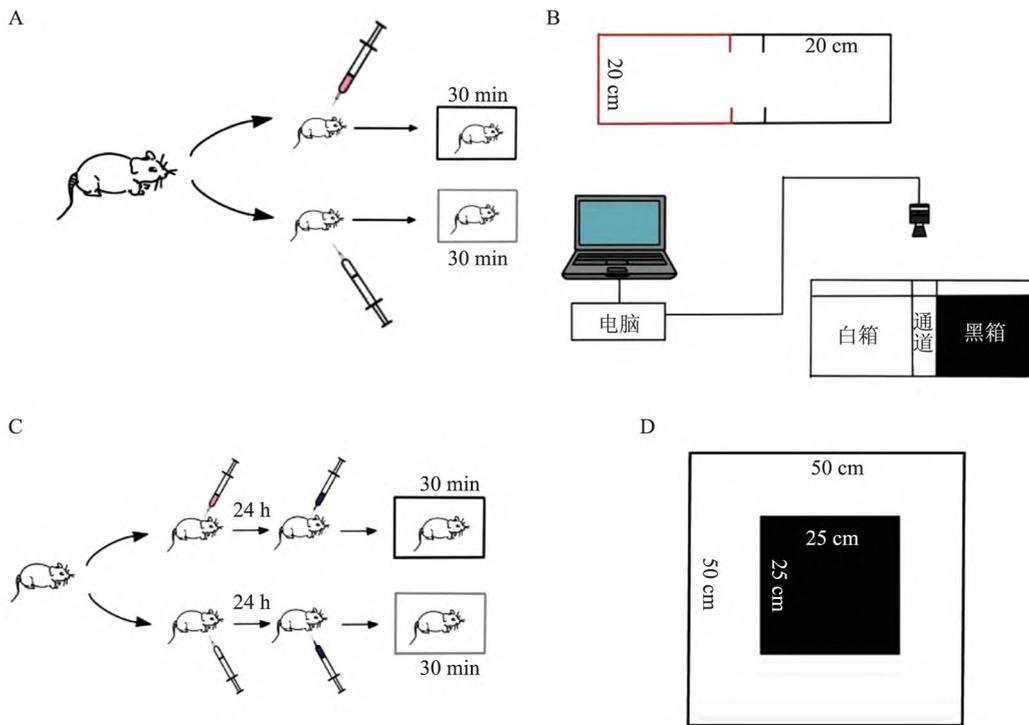


图 1 动物行为实验设置示意图、实验流程图

A: 海洛因诱导 CPP 的示意图; B: 行为测试设置示意图; C: 海洛因诱导 CPA 的示意图; D: 行为敏化实验装置示意图; 注射器中液体颜色: 红色指代海洛因,蓝色指代纳洛酮,白色指代生理盐水

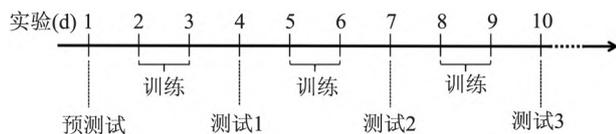


图2 CPP行为学训练范式

30 min。次日上午9:00 模型组和对照组小鼠腹腔注射等量0.9%氯化钠溶液 3 h后模型组和对照组腹腔注射纳洛酮0.2 ml 浓度为1 mg/kg 然后放入白药箱停留30 min。2 d为1个训练周期。对照组同样是2 d为1个训练周期,用0.9%氯化钠溶液代替海洛因并接受相同训练。

1.4.3 测试阶段 从第1个训练周期开始,每个周期结束后的第2天,两个箱体之间的挡板通道打开。将未处理的小鼠放入箱体中,让其自由活动15 min,并记录它们在不同箱体中的停留时间,统计分析,出现条件位置厌恶则终止实验。对照组用0.9%氯化钠溶液代替海洛因并且接受相同训练^[7]。见图1C和图3。



图3 CPA行为学训练范式

1.5 行为敏化实验装置及范式 行为敏化实验的设备是白色不透明箱体(50.0 cm × 50.0 cm × 37.5 cm) 小鼠可以在箱体内自由移动,并通过与行为跟踪软件ANY-maze-LAB(深圳赛昂斯公司)连接的平台顶部的摄像机,对小鼠进行定位跟踪监测(图1D)。实验共有四个阶段:第一阶段是预测试阶段(无药物干预);第二阶段是给药适应;第三阶段是停药期;第四阶段是给药刺激测试行为敏化改变。第1天进行预测试,选出40只正常运动的小鼠,然后将这些小鼠随机分为4组(每组10只):5.0、10.0、20.0 mg/kg 海洛因组(模型组)和对照组。模型组小鼠每日2次(上午9:00和下午6:00)腹腔注射对应浓度海洛因0.1 ml,对照组注射0.9%氯化钠溶液0.1 ml,持续3 d,然后停药5 d,在实验的第10天,给予对应浓度海洛因0.1 ml,并立即测量60 min的运动情况^[2]。见图4。

1.6 海洛因成瘾评定量表 为了筛选最适合的海洛因药物浓度,本研究根据行为学结果建立了海洛因成瘾评定量表。在表格中设定四个评分项:CPP、

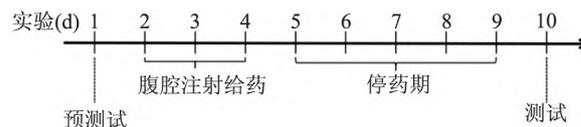


图4 行为敏化训练范式

CPA、行为敏化和实验动物死亡,每一个项目总分为3.0。评分细则:CPP评分根据统计学差异评分($P < 0.05$ 1分; $P < 0.01$ 2分; $P < 0.001$ 3分);CPA评分:纳洛酮诱导条件位置厌恶评分:训练1~2次出现显著条件位置厌恶 3分;训练3~4次出现显著条件位置厌恶 1分。行为敏化评分:与对照组相比出现行为敏化改变 3分;与对照组相比未出现行为敏化改变 0分。药物致死率评分:未出现死亡 3分;出现死亡 0分。

1.7 统计学处理 图标制作和数据分析采用开源统计软件,两组独立样本均值间差异采用Student's *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),当 $P < 0.05$ 时,认为方差不齐,采用非参数秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;当 $P \geq 0.05$ 时,认为方差不齐,用LSD法进行两两比较。

2 结果

2.1 巴甫洛夫训练阶段联合学习记忆对小鼠海洛因成瘾行为的影响 在CPP训练范式中,与对照组相比5.0、10.0、20.0 mg/kg 海洛因(模型)组小鼠在白箱运动时间增加,差异有统计学意义($P < 0.05$ $P < 0.001$ $P < 0.05$) ,见图5A。结合图5A结果,与对照组比较,3个模型组小鼠在白箱运动时间增加(图6A 红色区域增加)。在CPA实验结果中,用浓度为1 mg/kg的纳洛酮分别诱导3个模型组小鼠,10.0 mg/kg 海洛因组在第2次诱导后出现条件位置厌恶,结果有统计学差异($P < 0.01$);5.0 mg/kg 海洛因组小鼠第3次诱导后出现条件位置厌恶,结果有统计学差异($P < 0.05$);20.0 mg/kg 海洛因组在第4次诱导后出现条件位置厌恶,结果有统计学差异($P < 0.01$) ,见图5B、6B。

2.2 海洛因对小鼠行为敏化的影响 在预测试阶段进行测试,对照组和3个模型组均未用药物干预,3个模型组小鼠与对照组在旷场的运动距离相比较,组间差异无统计学意义。在停药期阶段结束后测试阶段进行测试,与对照组相比5.0 mg/kg、10.0 mg/kg、20.0 mg/kg 海洛因组在旷场运动距离增加,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图7。

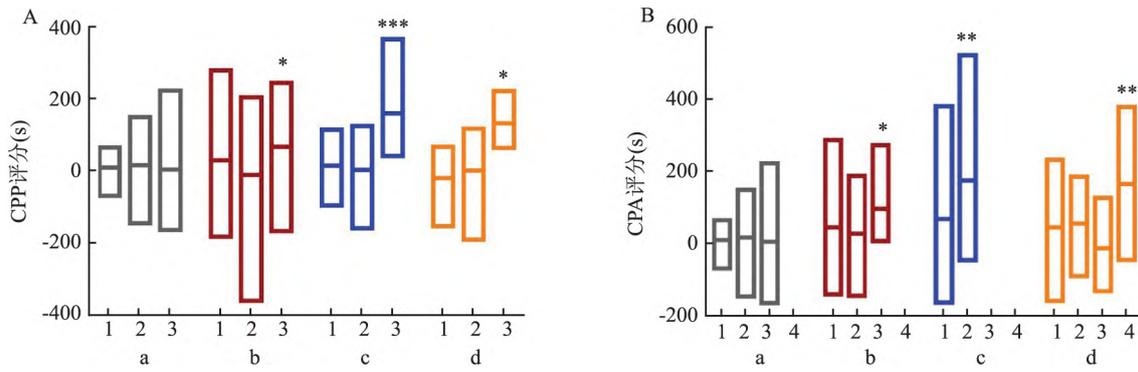


图5 CPP和CPA训练范式实验结果图

A: CPP 实验结果; B: CPA 实验结果; 1~4: 测试次数; a: 对照组; b: 5.0 mg/kg 海洛因组; c: 10.0 mg/kg 海洛因组; d: 20.0 mg/kg 海洛因组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

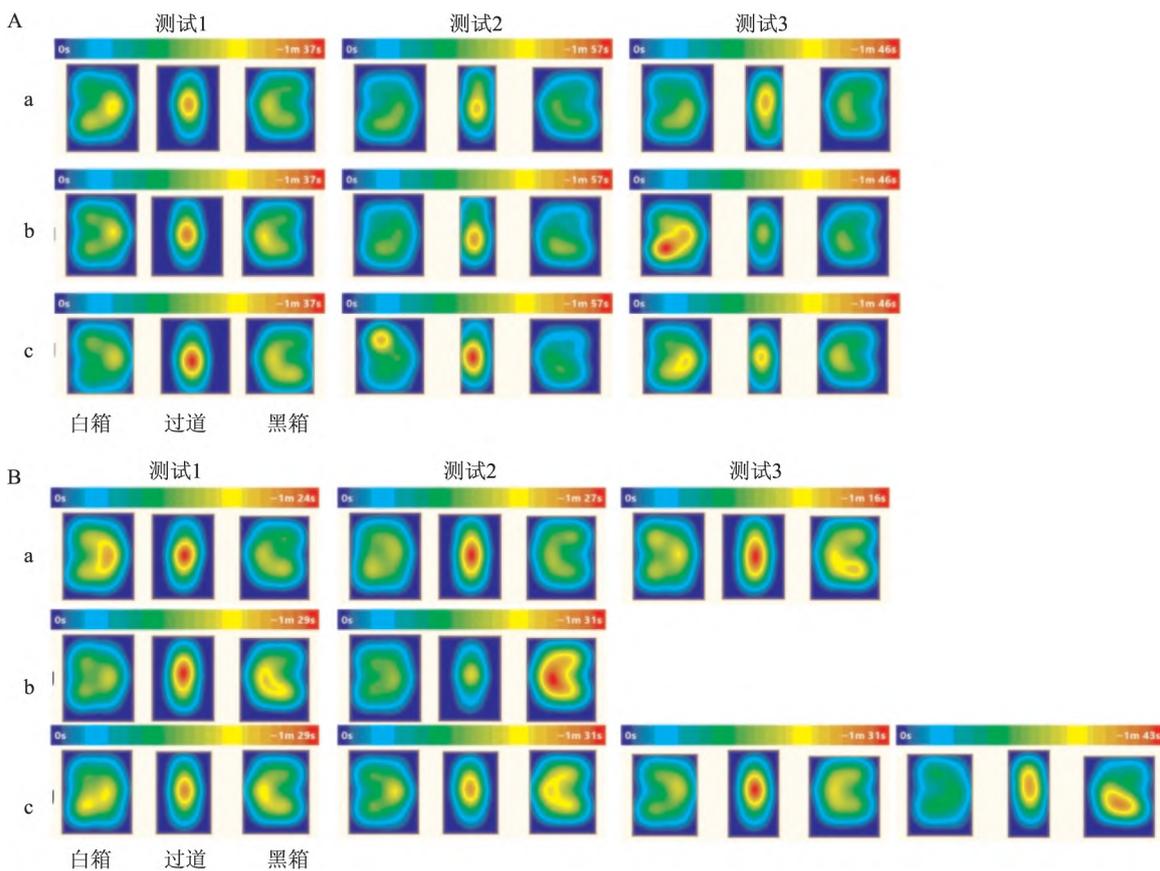


图6 不同浓度模型组 CPP 和 CPA 实验中小鼠行为学热源跟踪轨迹热图

A: 不同浓度模型组 CPP 行为学热源跟踪轨迹热图; B: 不同浓度模型组 CPA 行为学热源跟踪轨迹热图; a: 5.0 mg/kg 海洛因组; b: 10.0 mg/kg 海洛因组; c: 20.0 mg/kg 海洛因组

2.3 海洛因成瘾评分量表汇总 3 个浓度海洛因组评分都高于对照组,其中以 10.0 mg/kg 海洛因组评分最优。见表 1。

3 讨论

本研究选择了 3 个海洛因药物浓度,结合 CPP、CPA 和行为敏化 3 种行为学记忆强化训练范式进行

评估,并基于此建立了成瘾评分量表来筛选最适宜模型浓度。该研究结果显示,在所有模型小鼠中,10.0 mg/kg 剂量导致更高的依赖性而没有过量死亡及更高的戒断反应诱导率。

该研究采用的联合学习记忆是一种重要的信息获取方式,对于逻辑推理、联想思维、比较和计算都是必不可少的^[8]。当两个及以上的数量级事件在

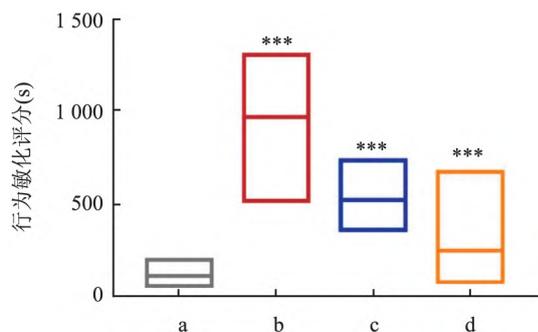


图7 行为敏化实验结果图

a: 对照组; b: 5.0 mg/kg 海洛因组; c: 10.0 mg/kg 海洛因组; d: 20.0 mg/kg 海洛因组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

表1 海洛因成瘾评分量表(分)

组别	CPP 评分	CPA 评分	行为敏化 评分	海洛因干预后 是否出现死亡	总分
对照	0	0	0	否(3.0)	3.0
5.0 mg/kg 海洛因	1.0	1.0	3.0	否(3.0)	8.0
10.0 mg/kg 海洛因	3.0	3.0	3.0	否(3.0)	12.0
20.0 mg/kg 海洛因	1.0	1.0	3.0	是(0)	5.0

时空上有多次反复的相互作用时,它们之间能相互关联,使机体明白一个事件的出现意味着其他事件的出现,即建立联合学习记忆^[9]。而巴甫洛夫条件反射也是联合学习记忆中的一种,其中 CPP 实验是评价觅药行为或心理渴求的经典动物模型,是一种相对简单的实验手段,自 20 世纪 80 年代以来 CPP 实验在药物滥用研究领域得到广泛应用。CPA 实验是基于 CPP 实验进行,其中纳洛酮为阿片类受体拮抗药,常用于阿片类药物复合麻醉药术后,拮抗该类致呼吸抑制,促使病人苏醒。纳洛酮会引起海洛因依赖小鼠的急性戒断反应,从而产生条件位置厌恶。在海洛因干预后用纳洛酮诱导条件位置厌恶的成功率越高,表明该浓度的海洛因对小鼠的影响程度越显著^[10]。产生 CPA 或 CPA 行为学改变是一种海洛因相关病理记忆变化,消除或减少这种记忆变化是海洛因成瘾治疗的关键,探索药物成瘾相关病理记忆新的靶点是关键问题所在^[11]。长期的病理记忆是通过药物和药物相关环境之间的巴甫洛夫条件反射形成的,因此,它已经成为持续的药物渴望和强迫性药物使用的强大驱动因素^[12]。

本研究基于巴甫洛夫条件反射的现代和传统理论公式,联合药物刺激的学习记忆机制建立模型^[13]。而自给药系统是一种由实验动物自主操控条件反射模型,通过手术干预建立自我给药系统,最大限度地模拟人类从吸毒到成瘾的自主性,以往的

研究^[14]表明它已被广泛应用于建立海洛因成瘾的实验动物模型,但该方法在实验动物的物种选择和手术风险方面存在局限性,且它在探索奖励相关学习记忆的机制方面存在困难。考虑到这些因素,该研究假设用固定的量周期性给药来建立海洛因成瘾实验动物模型,模型可用于测试无药物状态的动物,评估动物对药物奖赏和厌恶的敏感性,同时测量 CPP 和活动情况。CPP 通常产生单相剂量效应曲线,并且在检测涉及药物奖励的神经回路方面具有很高的实用性。此外,该研究模型存在一些局限性:① 海洛因成瘾模型的稳定性一直是关键问题,该模型尚未通过更多的实验得到验证;② 实验动物的新奇探索与药物干预之间存在相互作用,难以探究奖励机制分级,在获取某些药理学研究所需的分级剂量效应曲线方面存在困难;③ 动物在海洛因干预之前更喜欢环境时,很难区分海洛因偏好的产生,未能避免与药物偏好的相互作用,以及用作人类药物奖励的实验方案时缺乏有效性。

参考文献

- [1] Volkow N D, Koob G F, McLellan A T, et al. Neurobiologic advances from the brain disease model of addiction [J]. N Engl J Med 2016, 374(4): 363-71.
- [2] Cunningham C L, Bakner L, Schuette L M, et al. Morphine and ethanol pretreatment effect on expression and extinction of ethanol-induced conditioned place preference and aversion in mice [J]. Psychopharmacology (Berl) 2021, 238(1): 55-66.
- [3] Wu X, Pang G, Zhang Y M, et al. Activation of serotonin 5-HT (2C) receptor suppresses behavioral sensitization and naloxone-precipitated withdrawal symptoms in heroin-treated mice [J]. Neurosci Lett 2015, 607: 23-8.
- [4] Deroche-Gamonet V. The relevance of animal models of addiction [J]. Addiction 2020, 115(1): 16-7.
- [5] 李平, 傅先明, 钱若兵, 等. 吗啡成瘾大鼠伏核毁损术后行为学改变与脑内单胺类神经递质变化的相关性 [J]. 安徽医科大学学报 2008, 43(2): 138-42.
- [6] Valles C M, Falony G, Darzi Y, et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression [J]. Nat Microbiol 2019, 4(4): 623-32.
- [7] Sun K, Wang F, Ma L, et al. Genetic knockout of the G protein-coupled estrogen receptor 1 facilitates the acquisition of morphine-induced conditioned place preference and aversion in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun 2020, 525(4): 1061-7.
- [8] Gao Z, Chen L, Fan R, et al. Associations of unilateral whisker and olfactory signals induce synapse formation and memory cell recruitment in bilateral barrel cortices: cellular mechanism for unilateral training toward bilateral memory [J]. Front Cell Neurosci, 2016, 10: 285.

- [9] Wang J H ,Cui S. Associative memory cells: formation , function and perspective[J]. *F1000Res* 2017 6: 283.
- [10] Valero E ,Gómez-Milanes I , Almela P , et al. The involvement of CRF1 receptor within the basolateral amygdala and dentate gyrus in the naloxone-induced conditioned place aversion in morphine-dependent mice [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* , 2018 84(Pt A) : 102 – 14.
- [11] Zhu Z ,Wang H ,Jiang Y ,et al. Heroin exposure and withdrawal differentially influence expression of NMDA receptor NR2 subunits in the prelimbic region of rat medial prefrontal cortex[J]. *Neurosci Lett* 2020 721:134819.
- [12] Everitt B J ,Robbins T W. From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction [J]. *Neurosci Biobehav Rev* 2013 37(9 Pt A) : 1946 – 54.
- [13] Xu P , Li M , Bai Y , et al. The effects of piracetam on heroin-induced CPP and neuronal apoptosis in rats [J]. *Drug Alcohol Depend* ,2015 ,150: 141 – 6.
- [14] Wang F , Chen H , Sharp B M. Neuroadaptive changes in the mesocortical glutamatergic system during chronic nicotine self-administration and after extinction in rats [J]. *J Neurochem* ,2008 ,106 (2) :943 – 56.

A behavioral model of heroin addiction in mice based on associative learning mechanism

Zhang Yuhang^{1 2 3 4} , Ma Yantuanjin² , Huang Wei² , Zhang Zunyue³ , He Qiuyue^{2 3} , Qian Yuan^{1 2 3 4}

(¹ *Kunming Maternal and Child Health Hospital Kunming 650000*; ² *Graduate School of Kunming Medical University , Kunming 650500*; ³ *NHC Key Laboratory of Drug Addiction Medicine , Yunnan Province , Kunming 650500*; ⁴ *Dept of Clinical Laboratory , Pu'er People's Hospital , Kunming University of Science and Technology Affiliated Pu'er Hospital , Pu'er 665000*)

Abstract Objective To establish a laboratory model of heroin addiction in C57BL/6 mice based on associative learning mechanisms. **Methods** The black box and white box were selected as the memory training environment , and three behavioral training paradigms were studied: ① Pavlovian conditional position preference (CPP) training paradigm , mice were placed in the white box for memory reinforcement training for 30 min after intraperitoneal injection of 0.1 ml of corresponding concentrations (5.0 , 10.0 , 20.0 mg/kg) of heroin at 9:00 a. m. , and 24 h later 0.1 ml of 0.9% NaCl solution was injected intraperitoneally into the black box for training , and after the training , the mice were tested for their memory preference for the black and white boxes (movement time of different boxes) . ② A naloxone conditional position aversion (CPA) training paradigm was conducted based on the results of the CPP training paradigm. ③ Behavioral sensitization training paradigm , heroin addiction rating scale was established based on the statistical results of 3 behavioral experiments and the lethality of experimental animal disease mice after drug administration. Three different doses of heroin (5.0 , 10.0 , 20.0 mg/kg) were selected to induce heroin addiction , and the most appropriate heroin concentration was selected by the results on the rating scale. **Results** In the CPP training paradigm , CPP was observed in all heroin groups ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.05$) . In the CPA training paradigm , the CPA induction rate was highest in the 10.0 mg/kg heroin group compared to the control group ($P < 0.01$) . In the behavioral sensitization training paradigm , all heroin groups caused behavioral sensitization changes ($P < 0.001$) ; but the 5.0 and 10.0 mg/kg heroin groups did not cause animal mortality. Overall , the 10.0 mg/kg heroin group had the highest dose score on the rating scale. It could be used as a concentration to establish a stable experimental animal model of heroin addiction. **Conclusion** The study was effective in establishing a heroin addiction model in mice , and it was suitable for modeling drug concentration screening , with high animal survival rate and simple and practical. The combined learning mechanism can effectively shorten the model establishment period.

Key words heroin; behavioral paradigm; animal model