

## 青春期小鼠与成年小鼠在吗啡和食物诱导 条件化位置偏爱建立上的异同

戚仁莉<sup>1,2</sup>, 瞿家桂<sup>1,2</sup>, 陈艳梅<sup>2</sup>, 马原野<sup>1,2,3,\*</sup>, 胡新天<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. 中国科学技术大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230026; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223;

3. 中国科学院生物物理研究所 脑与认知国家重点实验室, 北京 100101;)

**摘要:** 该实验通过采用吗啡诱导的条件位置偏爱(conditioned place preference, CPP)与食物诱导 CPP 相结合的方法来研究青春期小鼠和成年小鼠的普通学习记忆和成瘾学习记忆之间是否存在差异。结果发现: 1)成年小鼠能够建立吗啡诱导 CPP, 而青春期小鼠不能建立; 2)青春期小鼠和成年小鼠都能够建立食物诱导 CPP。吗啡诱导 CPP 的结果提示, 青春期小鼠和成年小鼠在成瘾学习记忆上有差异, 青春期小鼠的成瘾记忆能力较弱。食物诱导 CPP 的结果提示, 青春期小鼠和成年小鼠在普通学习记忆上没有差异。吗啡诱导 CPP 和食物诱导 CPP 的结果比较提示, 小鼠的普通学习记忆系统和成瘾学习记忆系统发育进程是不平行的。

**关键词:** 青春期; 成年; 吗啡; 食物; 条件化位置偏爱

中图分类号: Q42; Q959.837; R338.1 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)05-0528-05

## Differences in morphine-induced and food-induced conditioned place preference between adolescent and adult mice

QI Ren-Li<sup>1,2</sup>, QU Jia-Gui<sup>1,2</sup>, CHEN Yan-Mei<sup>2</sup>, MA Yuan-Ye<sup>1,2,3,\*</sup>, HU Xin-Tian<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei Anhui 230026, PR China; 2. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, China; 3. State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, the Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China;)

**Abstract:** In the present study, the differences between addictive memory and ordinary memory were investigated by morphine-induced and food-induced conditioned place preference (CPP) in adolescent and adult mice. The result showed that: 1) morphine-induced CPP could be established in adult mice but not in adolescent mice. 2) food-induced CPP could be established both in adolescent and adult mice. This study indicated that between adolescent and adult mice, there was no difference in ordinary memory, but for addictive memory, they were quite different. Our data suggested that the development of addictive memory and ordinary memory system in mouse brain might not be paralleled.

**Key words:** Adolescent; Adult; Morphine; Food; CPP

药物成瘾是一个复杂的生物学过程。学习记忆参与药物成瘾过程(Nestler 2001; Kelley 2004)。与成瘾相关的线索, 如与用药相关的人物、地点或暗示等, 都可能诱导出觅药和用药行为。目前实验室广泛采用条件化位置偏爱(conditioned place preference, CPP)模型来研究动物线索诱导的药物依赖行为。CPP实质上是以巴甫洛夫条件反射为基础的一种行

为学习和记忆过程。通过把奖赏刺激与非奖赏中性刺激(如某特定环境)反复联系起来之后, 非奖赏性的中性刺激便可以诱导出奖赏效应。药物、食物、性活动等奖赏刺激都可以诱导出 CPP, 但成瘾药物诱导 CPP 所检测的成瘾记忆和食物诱导 CPP 所检测的普通记忆可能是两个不同甚至相拮抗的记忆系统。之前我们实验室研究发现大鼠腹腔注射阻断

收稿日期: 2011-04-27; 接受日期: 2011-07-22

基金项目: 成瘾学习记忆与成瘾学习记忆有何不同? (30870825)

\*通讯作者(Corresponding authors), E-mail: yuanma0716@vip.sina.com; xthu@mail.kiz.ac.cn

学习记忆的东莨菪碱明显抑制了食物诱导 CPP 的建立, 但是对于吗啡诱导 CPP 不仅没有抑制作用, 而且高剂量下还具有强化作用(Tan et al, 2007)。在 CPP 条件训练后, 药物诱发大鼠的癫痫持续状态会阻断大鼠食物诱导 CPP 的建立, 但对吗啡诱导 CPP 却没有影响(Zhang et al, 2009)。

学习记忆系统是随神经系统发育而不断完善的。青春期是一个特殊的发育阶段, 啮齿类动物青春期大约是从出生后 28~42 d(Spear et al, 1983)。这个时期的啮齿类动物前额叶中有大量 NMDA 受体和突触连接在消退(Guilarte, T.R., 1998), 杏仁核(Berdel et al, 1996)和海马(Dumas & Foster, 1998; Wolfer & Lipp, 1995)尚未发育成熟, 中脑-边缘系统和伏隔核的多巴胺合成水平较低(Spear, 2000)。青春期大鼠, 如出生后 35 d 的大鼠不能产生吗啡诱导 CPP 效应(Bolanos et al, 1996), 而成年大鼠就能够产生吗啡诱导 CPP 效应(Randall et al, 1997); 但 James et al(2000)研究表明, 成年与青春期大鼠的可卡因和吗啡诱导 CPP 都可以建立, 且两者并没有显著差异。啮齿类青春期动物是否能建立食物诱导 CPP 至今未见报道。在本研究中, 我们以昆明小鼠为对象, 通过比较青春期小鼠和成年小鼠吗啡及食物诱导 CPP 的建立情况来检测两者的成瘾记忆及普通学习记忆是否存在差异。如果青春期小鼠的吗啡诱导 CPP 和食物诱导 CPP 都不能建立, 则说明其成瘾学习记忆和普通学习记忆系统均未发育完全, 那么我们广泛采用的 CPP 范式将不适用于检测青春期小鼠; 如果青春期小鼠吗啡诱导 CPP 不能建立而食物诱导 CPP 能够建立, 则说明其吗啡成瘾记忆能力较弱, 而普通记忆能力正常, 那么这两种记忆系统的发育进程则是不平行的。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

成年雄性昆明小鼠购于昆明医学院[SCXK(滇 2005—0008)]。其中 44 只为出生后 60 d 以上, 开始实验时体重(36.0±2.99)g; 41 只为出生后 23 d, 开始实验时体重(18.1±2.19)g。所有动物在标准条件下饲养, 12 h 黑暗交替(7:00—19:00 为光周期)。实验在 9:00—16:00 之间完成。

### 1.2 药品

盐酸吗啡(10 mg/(mL·瓶), 沈阳制药厂, 产品批号: 070802)

### 1.3 实验装置与方法

1.3.1 CPP 装置 4 个 CPP 箱, 由 PVC 板制作。CPP 箱主要由两端两个相同尺寸(17 cm×15 cm×20 cm)的条件化箱和一个中间过渡箱(6 cm×15 cm×20 cm)组成。两个条件化箱内分别贴有黑白相间的横条纹和竖条纹, 且箱底部的粗糙程度有明显的差别, 一个粗糙; 另一个光滑。过渡箱内为灰色内壁。在两个条件化箱和过渡箱之间有可以开启和关闭的门。通过实验检测表明, 此行为检测装置不会导致实验动物先天性的位置偏爱, 统计上无差异。CPP 装置被放置在单独的房间内, 装置上方悬挂有摄像头, 用于记录 CPP 实验过程并保存在电脑内。实验记录的数据采用实验室自编软件进行统计。

1.3.2 实验方法和过程 小鼠在实验室适应环境一周后开始实验。成年小鼠被随机分为 4 组: 吗啡组( $n=12$ )、盐水组( $n=10$ )、食物组( $n=11$ )、食物对照组( $n=11$ ); 青春期小鼠被随机分为 4 组: 吗啡组( $n=10$ )、盐水组( $n=9$ )、食物组( $n=11$ )、食物对照组( $n=11$ )。

#### 1.3.2.1 吗啡诱导的 CPP 实验程序

1)条件化前期(第 1~3 d): 也称适应期, 打开 CPP 箱小门, 每天小鼠在 CPP 箱内自由活动 15 min (900 s)。第 3 天 动物在 CPP 箱内的行为被录像并进行数据分析。如果动物出现明显的位置偏爱, 如在一个箱内停留的时间超过总时间(900 s)的 70%(630 s)或少于总时间的 30%(270 s), 该动物将会被剔除。选择动物停留时间相对较短的箱子为伴药箱与吗啡相匹配。

2)条件化期(第 4~11 天): 在此期间, 条件化箱门关闭, 小鼠每天在腹腔注射吗啡(40 mg/kg 体重)或等体积生理盐水后, 立即进入所配对的箱子, 停留 40 min。吗啡组小鼠进入伴药箱前腹腔注射吗啡, 进入无伴药箱前腹腔注射盐水; 盐水组小鼠进入伴药箱和无伴药箱前都注射盐水。每天条件化训练一次。

3)条件化后期(第 12 天): 将 CPP 箱的小门打开, 小鼠在箱内自由活动 15 min(900 s)并录像。

#### 1.3.2.2 食物诱导的 CPP 实验程序

实验前统计小鼠每天的食物消耗量并得出其基础值, 实验前 5 d 及实验期间限制小鼠摄食量(给予基础值 85%的食物)。条件化前期(第 1~3 天)和条件化后期(第 10 天)与吗啡 CPP 程序相同。条件化期间(第 4~9 天), 条件化箱门关闭, 小鼠隔天

进入伴食箱或无伴食箱接受 40 min 条件化训练。食物组小鼠训练时, 伴食箱提供 5 g 食物, 无伴食箱不提供食物; 对照组小鼠训练时, 伴食箱和无伴食箱均不提供食物。食物组小鼠在伴食箱的训练结束后, 对剩余食物称重。每天条件化训练一次。

每次小鼠实验后, 取出箱子下面的底板, 用水清洗, 再使用酒精擦拭底板和箱子的四壁, 间隔 10 min 后再进行下一次实验。

#### 1.4 数据统计

CPP 效应的考察指标采用 CPP 评分, CPP 分数计算公式为伴药(食)箱停留的时间/[伴药(食)箱停留的时间+无伴药(食)箱停留的时间]。数据用 CPP 分数平均值±标准误差(SEM)表示, 对训练前后的 CPP 分数采用配对 *t* 检验进行分析(Hnasko et al, 2005; Airavaara et al, 2007), 应用软件 SPSS13.0 对数据进行统计分析。 $P < 0.05$  为在统计上有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 青春期小鼠与成年小鼠在吗啡 CPP 上的差异

小鼠适应期后进行连续 8 d 的吗啡条件位置匹配训练, 通过配对比较条件化训练前期与训练后期

的 CPP 分数来考察小鼠能否建立吗啡诱导 CPP 效应。结果表明: 青春期盐水组小鼠 条件化前期与条件化后期分数没有显著差异( $t = -1.654$ ,  $P = 0.133$ ), 青春期吗啡组小鼠条件化前期与条件化后期分数也没有显著差异( $t = -1.056$ ,  $P = 0.318$ ), 说明青春期小鼠在本实验使用的吗啡剂量下不能产生吗啡诱导的 CPP 效应(图 1a)。成年盐水组小鼠条件化前期与条件化后期分数没有显著性差( $t = -0.786$ ,  $P = 0.448$ ), 吗啡组小鼠条件化前期与条件化后期分数存在显著性差异( $t = -2.834$ ,  $P = 0.016$ ), 说明成年小鼠在本实验使用的吗啡剂量下能产生吗啡诱导的 CPP 效应(图 1b)。

### 2.2 青春期小鼠与成年小鼠在食物 CPP 上的差异

小鼠适应期后进行连续 6 d 的食物条件化位置匹配训练, 通过配对比较条件化训练前期与训练后期的 CPP 分数来检测小鼠能否建立食物 CPP 效应。结果表明: 青春期食物对照组小鼠条件化前期与条件化后期分数没有显著差异( $t = -1.268$ ,  $P = 0.237$ ), 青春期食物组小鼠条件化前期与条件化后期分数具有显著差异( $t = -2.477$ ,  $P = 0.033$ ), 说明青春期小鼠能产生食物 CPP 效应(图 2a)。成年食物对照组小鼠条件化前期与条件化后期分数没有显著性差

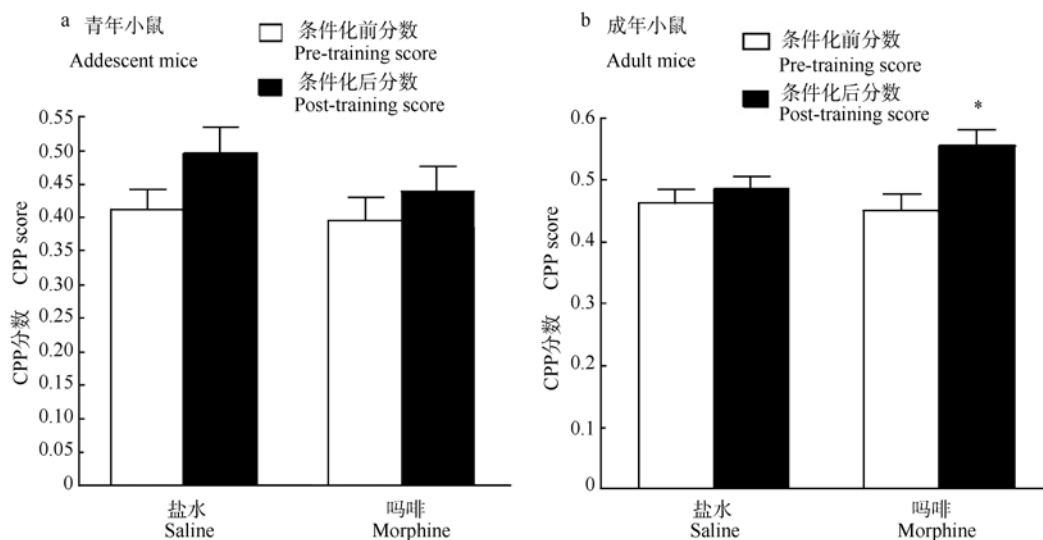


图 1 青春期和成年小鼠的吗啡诱导 CPP 效应

Fig. 1 Morphine-induced CPP effects in adolescent and adult mice

a: 青春期小鼠不能建立吗啡诱导 CPP (盐水组:  $n=9$ ; 吗啡组:  $n=10$ ); b: 成年小鼠能够建立吗啡诱导 CPP (盐水组:  $n=12$ ; 吗啡组:  $n=10$ ); \* $P < 0.05$ , 条件化前分数 vs. 条件化后分数。

a: Morphine-induced CPP can not be established in adolescent mice. (saline group:  $n=9$ ; morphine group:  $n=10$ ); b: Morphine-induced CPP can be established in adult mice. (saline group:  $n=12$ ; morphine group:  $n=10$ ); \* $P < 0.05$ , pre-training scores vs. post-training scores.

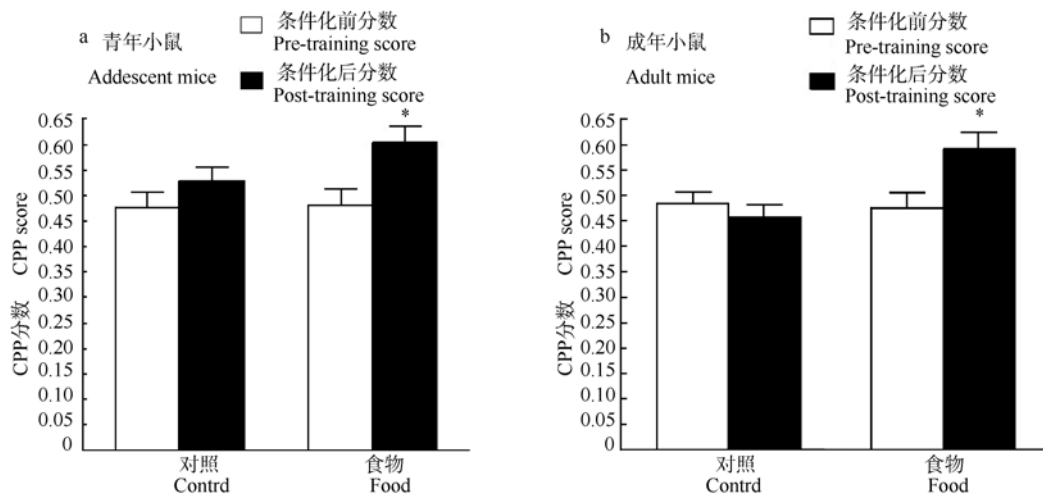


图2 青春期和成年小鼠的食物诱导 CPP 效应

Fig. 2 Food-induced CPP in adolescent and adult mice

a: 青春期小鼠能够建立食物诱导的 CPP 效应 (食物组:  $n=11$ ; 对照组:  $n=11$ ); b: 成年小鼠能够建立食物诱导的 CPP 效应(食物组:  $n=11$ ; 对照组:  $n=11$ ); \* $P<0.05$ , 前测分数 vs.后测分数。

a: Food-induced CPP can be established in adolescent mice(food group:  $n=11$ ; control group:  $n=11$ ); b: Food-induced CPP can be established in adult mice(food group:  $n=11$ ; control group:  $n=11$ ); \* $P<0.05$ , pre-training scores vs.post-training scores.

异( $t=-0.708$ ,  $P=0.494$ ), 成年食物组小鼠条件化前期与条件化后期分数存在显著性差异( $t=-3.057$ ,  $P=0.011$ ), 说明成年小鼠也能产生很好的食物 CPP 效应(图 2, b)。

### 3 讨论

青春期小鼠和成年小鼠经过连续 6 d 食物配对训练后都能够建立食物诱导 CPP, 说明青春期小鼠具有将环境背景和食物奖赏效应联合起来记忆的能力, CPP 范式能够用于检测青春期小鼠; 经过连续 8 d 吗啡配对训练后, 青春期小鼠不能建立吗啡诱导 CPP, 而成年小鼠能够建立。从青春期小鼠与成年小鼠的吗啡诱导 CPP 和食物诱导 CPP 结果的比较中可以看出, 青春期小鼠与成年小鼠在普通学习记忆上没有差异, 而在成瘾学习记忆上存在差异, 青春期小鼠成瘾记忆要弱于成年小鼠; 且在个

体发育过程中, 成瘾学习记忆和普通学习记忆这两个学习记忆系统的发育进程是不平行的。

青春期小鼠与成年小鼠相比成瘾学习记忆能力较弱的特点, 可能是机体在发育过程中的一个保护措施。之前有实验支持这一观点, Doherty et al (2009)对成年大鼠与青春期大鼠的自我给药、戒断和线索诱导复吸过程进行对比研究发现, 青春期大鼠与成年大鼠在自我给药剂量方面没有差异, 但在戒断后线索诱导的觅药行为上不如成年大鼠明显, 提示在个体发育的过程中, 青春期机体消除伤害刺激的保护机制比成年期机体更强。另外, 从进化的角度来看, 普通学习记忆能力是物种得以保存的基本能力, 所以在个体发育的早期就已具备, 而成瘾学习记忆相对于生存来说是比较高级的能力, 其发育进程滞后于普通学习记忆系统是可以理解的。

### 参考文献:

- Airavaara M, Tuomainen H, Piepponen TP, Saarna M, Ahtee L. 2007. Effects of repeated morphine on locomotion, place preference and dopamine in heterozygous glial cell line-derived neurotrophic factor knockout mice [J]. *Genes Brain Behav*, **6**(3): 287-298.
- Berdel B, Morys J, Maciejewska B et al. 1996. Acetylcholinesterase activity as a marker of maturation of the basolateral complex of the amygdaloid body in the rat [J]. *Int J Dev Neurosci*, **14**(5): 543-549.
- Bolanos CA, Garmsen GM, Clair MA, McDougall SA. 1996. Effects of the k-opioid receptor agonist U-50,488 on morphine-induced place preference conditioning in the developing rat [J]. *Eur J Pharmacol*, **317**(1): 1-8.
- Campbell J O, Wood R D, Spear L P. 2000. Cocaine and morphine-induced place conditioning in adolescent and adult rats[J]. *Physiol Behav*, **68**(4): 487-493.

- Doherty J, Osbornwan Y, Williams B, et al. 2009. Age-dependent morphine intake and cue-induced reinstatement, but not escalation in intake, by adolescent and adult male rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, **92**(1): 16-172.
- Dumas, T.C, Foster, T.C. 1998. Late developmental changes in the ability of adenosine A1 receptors to regulate synaptic transmission in the hippocampus [J]. *Devel. Brain Res*, **105**: 137-139.
- Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD. 2005. Morphine reward in dopamine-deficient mice [J]. *Nature*. **438**, 854-857.
- Kelley AE. 2004. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms [J]. *Neuron*, **44**(1): 161-79.
- Nestler EJ. 2001. Neurobiology. Total recall—the memory of addiction [J]. *Science*, **292**(5525): 2266-7.
- Randall CK, Kraemer PJ, Bardo MT. 1998. Morphine-induced conditioned place preference in preweanling and adult rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, **60**(1): 217-222.
- Spear LP. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, **24**(4): 417-63.
- Spear LP, Brake SC. 1983. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats [J]. *Dev Psychobiol*, **16**(2): 83-109.
- Tan H, Liu N, Wilson FA, Ma YY. 2007. Effects of scopolamine on morphine induced reward-related learning and memory [J]. *Addict Biol*, **12**(3-4): 463-9.
- Wolf DP, Lipp HP. 1995. Evidence for physiological growth of hippocampal mossy fiber collaterals in the guinea pig during puberty and adulthood [J]. *Hippocampus*, **5**: 329-340.
- Zhang J, Tan H, Niu H, Wang J, Tang X, Sanford L, Ma Y. 2009. Pentylentetrazole-induced status epilepticus following training does not impair expression of morphine-induced conditioned place preference [J]. *Addict Biol*, **14**(2): 174-84.

## 欢迎订阅 2012 年《基因组学与应用生物学》

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办，公开发行的双月刊科学期刊。广西大学聘请中国农业大学李宁院士任主编，北京大学教授朱玉贤博士和海南省热带农业资源研究所所长方宣钧博士任执行主编，国内众多的著名学者出任编委。

《基因组学与应用生物学》主要刊登现代生物技术的前沿学科和基础学科如基因组学、分子细胞遗传学、生化与分子生物学、应用生物学等相关的原始研究成果。刊登植物、动物及微生物领域的生物在组织、器官、细胞、染色体、蛋白质、基因、酶、发酵工程等不同水平上的现代生物技术等基础与应用基础研究的成果。本刊按国际标准编排，题目摘要、图表、引用文献等均实行中英文对照，同行评审发表模式。

《基因组学与应用生物学》，前身是原《广西农业大学学报》，创刊于 1982 年。广西农业大学合并入广西大学以后更名为《广西农业生物科学》。《广西农业生物科学》已入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版（即第五版）之综合性农业科学类的核心期刊，是中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊，也是中国科技核心期刊即中国科技论文统计源期刊。2001 年入选国家新闻出版总署“中国期刊方阵”，先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘：自然科学》(CSA: NS)、英国《动物学记录》(ZR)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。

承载着《广西农业生物科学》的历史与荣誉，《基因组学与应用生物学》将在新的高度开拓奋进，为现代生命科学和应用生物学的研究与发展提供学术交流的平台，使之成为中国科学家走向世界的桥梁。

《基因组学与应用生物学》《Genomics and Applied Biology》，ISSN1674-568X，CN45-1369/Q，双月刊，双月 28 日出版，国内定价：¥40.00/期，¥240.00/年；国际定价：\$40.00/期，\$240.00/年。

### 邮局汇款

地址：广西南宁市大学东路 100 号广西大学西校园榕江路《基因组学与应用生物学》编辑部

收款单位：《基因组学与应用生物学》编辑部

邮编：530004

联系电话：0771-3239102，0771-3232621

传真：0771-3232621

投稿邮箱：gab@hibio.org；gab@sophiapublisher.com

网址：www.genoapplbiol.org；www.gab.chinese.sophiapublisher.com