

伽玛刀治疗吗啡依赖猴双侧伏隔核后多巴胺 D3 受体变化的研究

黄晓斌¹⁾, 赵宁辉¹⁾, 曹洪明²⁾, 孙亮²⁾, 方绍龙¹⁾

(1) 昆明医科大学第二附属医院神经外科, 云南昆明 650101; 2) 昆明医科大学第二附属医院伽玛刀治疗中心, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 建立猴吗啡依赖实验模型, 观察伏隔核、海马、扣带回、额叶皮质等脑区多巴胺 D3 受体成瘾后和治疗前后的变化. **方法** 健康恒河猴 4 只, 分为吗啡依赖伽玛刀治疗组 (2 只, A 组)、吗啡依赖对照组 (1 只, B 组) 和正常对照组 (1 只, C 组). 模仿 Seever's 法剂量递增建立猴吗啡依赖模型, 免疫组化法观察 3 组猴大脑标本伏隔核、海马、扣带回、额叶皮质中多巴胺 D3 受体的变化. **结果** 免疫组化法检测发现大脑伏隔核、海马、扣带回、额叶皮质多巴胺 D3 受体表达 B 组明显高于 C 组 ($P < 0.01$), 表达密度上调 254% ~ 499% 不等, A 组明显低于 B 组 ($P < 0.01$), 但仍高于 C 组, 其中伏隔核、海马、扣带回下降幅度较大, 伏隔核较接近正常. **结论** 伽玛刀治疗吗啡依赖猴双侧伏隔核后多巴胺 D3 受体表达明显减少, 推测多巴胺 D3 受体在吗啡成瘾中发挥调节作用.

[关键词] 恒河猴; 吗啡依赖; 伽玛刀; 伏隔核

[中图分类号] R651 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 06 - 0030 - 03

Change of Dopamine D3 Receptor Expression in Nucleus Accumbens after Gamma-knife Treatment on Morphine Dependent Rhesus Monkey

HUANG Xiao-bin¹⁾, ZHAO Ning-hui¹⁾, CAO Hong-ming²⁾, SUN Liang²⁾, FANG Shao-long¹⁾

(1) Dept. of Neurosurgery; 2) Gamma-Knife Center, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To establish the experimental model of morphine dependent rhesus monkey and observe the changes of D3R expression in nucleus accumbens, hippocampus, cingulate gyrus and cortex of frontal lobe. **Methods** Four rhesus monkeys were divided into three groups: treatment group (Group A with two monkey), control group (Group B with one monkey) and normal group (Group C with one monkey). The model of morphine dependent monkey was established with imitated Seever's method and treated by gamma-knife. The changes of D3R expression in nucleus accumbens, hippocampus, cingulate gyrus and cortex of frontal lobe of three groups were observed using immunohistochemistry. **Results** The D3R expression in Group B was higher than that in Group C ($P < 0.001$), and the expression density increased range from 254% to 499%. The D3R expression in Group A was lower than that in Group B ($P < 0.001$), but higher than that in Group C. The D3R expression in the nucleus accumbens, hippocampus and cingulategyurs decreased significantly and the expression in nucleus accumbens approached normal after gamma-knife treatment. **Conclusion** The expression of D3R in the nucleus accumbens significantly decreased after gamma-knife treatment, suggesting D3R is effective to adjust the process of morphine addiction.

[Key words] Rhesus monkey; Morphine dependence; Gamma-knife; Nucleus accumbens

[基金项目] 云南省中青年学术技术带头人后备人才基金资助项目 (2009CI034); 云南省卫生厅卫生系统学科带头人基金资助项目 (D-201221)

[作者简介] 黄晓斌 (1982~), 男, 云南临沧市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事神经外科临床和神经生物学研究工作.

[通讯作者] 方绍龙. E-mail: fangshaolong@163.com

近年来国际医学界把药物成瘾界定为“以阿片类药物的滥用、成瘾、依赖为特征的反复发作性慢性脑病”。有关成瘾机制多集中于对伏隔核(nucleus accumbens, NAC)的研究, NAC是一个与动机、奖赏、摄食、药物成瘾等功能相关的脑区。NAC是边缘系统和锥体外运动系统的分界面, 在行为、动机、奖赏和成瘾多种功能活动中起重要作用, 与多种运动性疾病、精神分裂症以及毒品成瘾等的发生密切相关^[1,2]。NAC内多巴胺(dopamine, DA)受体尤其是D3R受体的含量相当高, 这些受体选择性地位于脑的边缘区, 是毒品成瘾以及精神分裂症等常见的神经、精神性疾病重要的决定因素^[3,4]。本实验旨在了解吗啡依赖猴NAC的伽玛刀治疗前后DAD3R受体的变化, 从而进一步证实DAD3R受体在吗啡依赖过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

由昆明医科大学神经科学研究所提供健康成年恒河猴4只, 雌雄不限, 体重4.2~5.5 kg, 平均4.7 kg, 分为吗啡依赖伽玛刀治疗组(2只, A组)、吗啡依赖对照组(1只, B组)和正常对照组(1只, C组)。

1.2 实验方法

1.2.1 猴吗啡依赖实验模型建立 模仿 Seevers 法, A、B组吗啡剂量递增, 皮下注射, 每日2次, 初始剂量 5.0 mg/(kg.d) × 2周, 每2周增加 5.0 mg/(kg.d), 至 20.0 mg/(kg.d), 维持至 60 d 停药。

1.2.2 双侧 NAC 伽玛刀治疗 A组静脉全麻后安装 Leksell 定位头架, MRI 扫描行双侧 NAC 定位, 伽玛刀治疗, 治疗数据如下: 4 mm 准直器、中心剂量 120 Gy、边缘剂量 60 Gy、50%剂量曲线。

1.2.3 D3R 免疫组化检测 3组同时用 4%多聚甲醛心脏灌注, 免疫组化法观察 3组猴大脑标本 NAC、海马、扣带回、额叶皮质中 DAD3R 受体的变化。免疫组化观测标准: 免疫组化染色阳性强度用灰度值来反应, 依其灰度的强度分为阴性(-)、淡黄色(+)、黄色(++)、棕黄色(+++) 4个级别^[5]。多数 D3R 在神经元胞膜表达, 少部分胞浆表达。两人双盲法观察切片, 在高倍镜下数阳性细胞数, 只要灰度值具有 1 个“+”以上认为阳性细胞。每个部位取 4 张切片每张切片选择 5 个具有代表性的高倍视野(×200), 计算阳性细胞数。

1.3 统计学方法

实验数据用 SPSS 统计软件包进行统计分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 症状评分治疗前后采用两样本均数的配对 *t* 检验, A、B 两组同期评分采用两样本均数的成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

免疫组化法检测标本发现 NAC、海马、扣带回、额叶皮质中 DAD3R 受体表达 B 组明显高于 C 组 ($P < 0.01$), 表达密度上调 254% ~ 499% 不等。A 组明显低于 B 组 ($P < 0.01$) (见图 1), 但仍高于 C 组, 其中 NAC、海马、扣带回下降幅度较大, NAC 较接近正常 (见表 1)。

3 讨论

药物成瘾是一种反复发作的慢性脑病, 主要表现为强迫性药物应用, 在断绝药物应用后出现烦躁、焦虑易激惹等情绪精神异常, 是严重的社会与医学问题。目前, 有关成瘾机制多集中于对 NAC

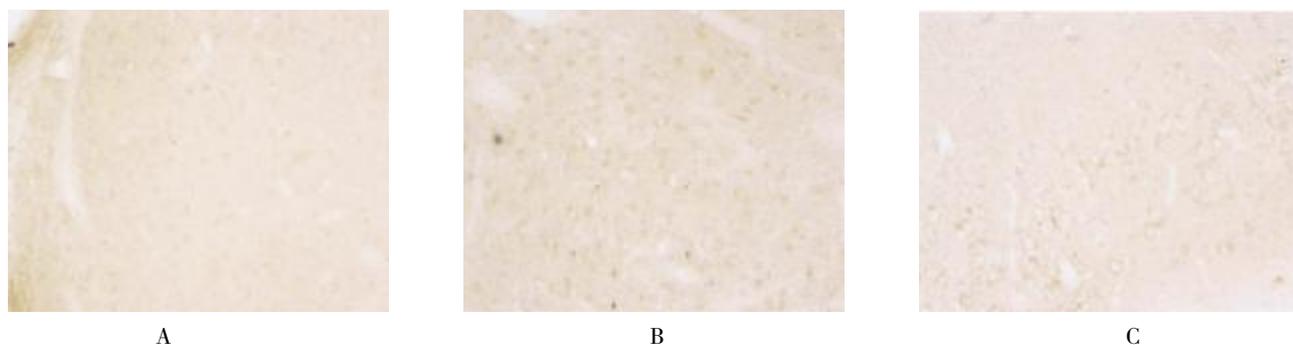


图 1 3组伏隔核 D3R 阳性细胞 (×200)

Fig. 1 The D3R-positive cells in the three groups

A:治疗组; B:吗啡依赖对照组; C:正常对照组。

表 1 3 组伏隔核 D3R 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 The comparison of D3R-positive cells among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

部 位	A 组标本 (n = 40)	B 组标本 (n = 40)	C 组标本 (n = 40)
伏隔核阳性细胞数 /HP	53.28 ± 10.39 ^{##}	108.75 ± 2.02 ^{**}	42.85 ± 3.33
海马阳性细胞数 /HP	48.2 ± 5.25 ^{##}	118.2 ± 14.18 ^{**}	33.45 ± 2.37
扣带回阳性细胞数 /HP	59.55 ± 9.83 ^{##}	118.55 ± 7.62 ^{**}	23.75 ± 2.77
额叶皮质阳性细胞数 /HP	53.23 ± 5.22 ^{##}	71.25 ± 16.08 ^{**}	15.75 ± 2.51

与 C 组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与 B 组比较, ^{##} $P < 0.01$.

的研究.

猴是最接近人的高等动物, 用猴做实验得出的结果对临床研究的指导意义最大, 且猴是国际上通用的评价阿片类药物身体依赖性的实验动物. 本实验建立猴吗啡依赖实验模型, 观察 NAC、海马、扣带回、额叶皮质等脑区 DAD3R 受体成瘾后和治疗前后的变化, 从而进一步证实 DAD3R 受体在吗啡依赖过程中的作用.

对药物成瘾和依赖机理的研究已有很长历史, 现已证实该系统主要与躯体依赖密切相关, 但不是唯一的主要相关核团^①. 近年来研究发现阿片类药物的强化作用是由中脑边缘 DA 系统 (mesolimbic dopamine system, MLDS) 介导的, MLDS 是一切药物产生强化效应的神经解剖学基础, 参与了绝大部分成瘾药物的奖赏效应^{②,③}. DA 能神经元胞体主要集中在 VTA, 纤维大部分投射向 NAC, NAC 是调节药物强化的关键部位和最后通路, 几乎所有成瘾药物 (包括阿片类、可卡因、尼古丁、酒精、苯丙胺类) 都提高 NAC 内 DA 的释放, 静脉注射可卡因、吗啡、苯丙胺均可使 DA 的含量增加^④.

DA 作为一种内源性神经递质, 主要通过 DA 受体调控其功能. 在 DA 受体中, D3R 受体与 DA 的结合能力是所有亚型中最高的, 并主要分布于中脑边缘系统, 特别是中脑边缘系统投射区 NAC、海马、黑质、Calleja 岛等, 在大脑皮质亦少有分布, D3R 受体在神经性和精神性疾病的发病过程中起着重要作用^⑤. D3R 具有调节 DA 合成、释放 DA 能神经元功能的作用.

在药物依赖过程中 D3R 受体发生适应性改变. 研究证实可卡因依赖大鼠 NAC 区 D3R 表达增加, 动物实验显示, 海洛因长期给药大鼠脑中 NAC 区 D1R 受体密度显著性增加 (达 44%), 由此笔者推测 D3R 受体亦应成上调趋势, 我们的实验正证明了这一点. 在笔者的实验中, 吗啡依赖猴 NAC、海马、扣带回、额叶皮质 D3R 受体密度都明显上调, 表达密度上调 254% ~ 499% 不等. 伽玛刀治疗双侧 NAC 后, 其 D3R 受体密度表达都有不

同程度下降, 且戒断症状基本消除. 我们推测伽玛刀治疗抑制了 NAC 中亢进的 D3R 受体功能, 对其破坏, 从而使 NACD3R 受体表达下降, 不能完成其吗啡强化效应, 表现为觅药苛求下降和戒断症状的消失. 又由于阻断了成瘾环路中的关键部位, DA 传导受阻, 海马、扣带回、额叶皮质等脑区 D3R 密度都不同程度的生理性降低. 本研究充分证实了 NAC 在调节灵长类动物药物强化作用方面占据核心地位, 是药物精神依赖和躯体依赖主要的生理基础.

[参考文献]

- [1] KOOB G F, VOLKOW N D. Neurocircuitry of addiction [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 35: 217 - 238.
- [2] CLAY S W, ALLEN J, PARRAN T. A review of addiction [J]. *Postgrad Med*, 2008, 120 (2): 1 - 7.
- [3] PIERCE R C, KUMARESAN V. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2006, 30: 215 - 238.
- [4] DALLEY J W, EVERITT B J. Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, 20 (4): 403 - 410.
- [5] BASILE A S, FEDOROVA I, ZAPATA A, et al. Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99 (17): 11 452 - 11 457.
- [6] LI T, HOU Y, YAN C X, et al. Dopamine D3 receptor knock-out mice display deficits in locomotor sensitization after chronic morphine administration [J]. *Neurosci Letters*, 2010, 485 (3): 256 - 260.
- [7] BERRIDGE K C. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2007, 191 (3): 391 - 431.
- [8] XI Z X, STEIN E A. GABAergic Mechanisms of opiate reinforcement [J]. *Alcohol Alcohol*, 2002, 37 (5): 485 - 494.
- [9] HEILDBREDER C A, NEWMAN A H. Current perspectives on selective dopamine D3 receptor antagonists as pharmacotherapeutics for addictions and related disorders [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1187: 4 - 34.
(2013 - 04 - 13 收稿)