

· 论 著 ·

基底外侧杏仁核至伏隔核环路在大鼠丙泊酚依赖中的作用

黄炳武¹, 陈依尔¹, 崔燕华¹, 连庆泉¹, 苏颖², 林函^{1,2}

(1. 温州医科大学附属第二医院育英儿童医院麻醉与围术期医学科, 浙江温州 325027;

2. 浙江省麻醉学重点实验室, 浙江温州 325035)

摘要:目的 探讨基底外侧杏仁核(BLA)至伏隔核(NAc)环路在大鼠丙泊酚自身给药行为中的作用及相关分子机制。方法 ① 通过丙泊酚自身给药行为训练将大鼠分为丙泊酚依赖大鼠和丙泊酚非依赖大鼠, Western 印迹法检测 2 种大鼠 NAc 内谷氨酸能 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体(AMPA)的亚基 GluA1 和 GluA2 蛋白表达水平。② 24 只丙泊酚依赖大鼠随机分为对照组、NBQX(AMPA 拮抗剂)0.25, 0.5 和 1 μ g 组, 在连续 14 d 丙泊酚自身给药行为训练后, 第 15 天测试前 30 min 于 NAc 内注射生理盐水或 NBQX, 观察 NBQX 对大鼠丙泊酚自身给药行为的影响。③ 24 只丙泊酚依赖大鼠随机分为增强型黄绿色荧光蛋白(eYFP)组、eYFP+NBQX 组、光敏感通道蛋白(ChR2)-eYFP 组和 ChR2-eYFP+NBQX 组。其中 eYFP 组和 eYFP+NBQX 组在 BLA 区注射腺相关病毒载体(AAV)-钙调蛋白依赖激酶 II α (CaMK II α)-eYFP, ChR2-eYFP 组和 ChR2-eYFP+NBQX 组在 BLA 区注射 AAV-CaMK II α -ChR2-eYFP。在病毒表达 4 周后, 进行连续 14 d 丙泊酚自身给药行为训练, 于第 15 天测试前 30 min, eYFP 组和 ChR2-eYFP 组在 NAc 区给予生理盐水, 而 eYFP+NBQX 组和 ChR2-eYFP+NBQX 组在 NAc 区给予 NBQX 0.5 μ g, 并在测试期间蓝光刺激 BLA-NAc 环路, 观察兴奋 BLA-NAc 环路对大鼠丙泊酚觅药行为的影响。结果 ① 与丙泊酚非依赖组相比, 丙泊酚依赖组大鼠有效鼻触次数明显增加($P<0.05$)。Western 印迹结果显示, 丙泊酚依赖大鼠较丙泊酚非依赖大鼠 NAc GluA1 和 GluA2 蛋白表达水平明显增高($P<0.05$)。② 与对照组相比, NBQX 0.5 和 1 μ g 组大鼠有效鼻触次数显著减少($P<0.01$)。③ 与 eYFP 组相比, ChR2-eYFP 组大鼠有效鼻触次数显著增加($P<0.01$), 与 eYFP+NBQX 组相比, ChR2-eYFP+NBQX 组大鼠有效鼻触次数显著增加($P<0.01$)。结论 兴奋 BLA-NAc 环路可增加大鼠丙泊酚自身给药行为, 该作用可能由 NAc 区 AMPAR 介导。

关键词: 基底外侧杏仁核; 伏隔核; NBQX; 丙泊酚; 自身给药

中图分类号: R964, R971.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002-(2022)06-0418-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.06.003

药物滥用和药物依赖是严重的公共安全和个人健康问题, 给整个社会和个人造成了不可估量的损失。目前, 药物滥用以大麻类、鸦片类和可卡因最为常见, 而这些药物都属于麻醉药品范畴。丙泊酚(propofol)又名异丙酚, 是一种起效快、苏醒迅速的静脉麻醉用药, 自 1986 年问世以来, 已广泛应用于临床麻醉的诱导和维持^[1]。近年来, 国外相继报道多起与丙泊酚相关的死亡事件, 引起了广大社会群体和医务人员的关注和担忧, 越来越多的证据表明, 丙泊酚可能存在一定的成瘾性^[2-3]。本课题组前

期已成功建立大鼠丙泊酚自身给药行为模型, 并验证了大脑伏隔核(nucleus accumbens, NAc)多巴胺受体 1、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)和糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)参与调控大鼠丙泊酚自身给药行为^[4-6]。目前, 关于谷氨酸(glutamate, Glu)能受体在药物成瘾中发挥重要调控作用的研究报道日益增多, 而最近本课题组也发现, ip 给予 Glu 受体拮抗剂可减少大鼠丙泊酚自身给药行为^[7], 但在 NAc 区给药对大鼠丙泊酚觅药行为的影响, 迄今尚无文献报道。

基底外侧杏仁核(basolateral amygdala, BLA)是中脑边缘系统的组成部位, 以 Glu 能神经元为主, 主要参与调控线索诱发的成瘾行为^[8-9]。NAc 是边缘奖赏系统的关键部分, 可与边缘系统内其他脑区

作者简介: 黄炳武, 硕士研究生, 主要从事麻醉药物精神依赖性研究; 林函, 博士, 教授, 主要从事麻醉药神经发育毒性研究。

通讯作者: 林函, E-mail: nanlinhannansh@qq.com

相互作用,参与调控多种成瘾药物的奖赏机制^[10]。研究表明,BLA 向 NAc 有 Glu 能神经投射,形成 BLA-NAc 环路并参与自然奖赏行为的调控^[11]。最近,Puud 等^[12]发现,抑制 BLA-NAc 环路可减少可卡因诱导的大鼠自身给药行为,提示 BLA-NAc 环路有可能参与药物成瘾的调控机制,但此环路对大鼠丙泊酚自身给药行为的影响及机制目前未见文献报道。本研究采用大鼠自身给药行为方法建立丙泊酚依赖模型,用 Western 印迹法检测丙泊酚依赖大鼠 NAc 内 Glu 能 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR) 的亚基 GluA1 和 GluA2 蛋白表达水平,然后在 NAc 内注射 NBQX (AMPA 拮抗剂),观察其对大鼠丙泊酚自身给药行为的影响,最后通过蓝光刺激和 NAc 区给药探索 BLA-NAc 环路对大鼠丙泊酚依赖行为的调控作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,7~8 周龄,体重 240~290 g,购自北京维通利华生物科技有限公司,动物许可证编号:SCXK(浙)2019-0001。大鼠用独立代谢笼适应性饲养,保持环境温度 22~24℃,相对湿度 50%~70%,每日限制进食 30 g 鼠饲料,饮水自由,保证 12 h 灯光照明(2:00~14:00 开灯,14:00~次日 2:00 关灯)。本实验过程符合温州医科大学动物中心动物伦理管理条例规定。

1.2 药品、试剂和仪器

丙泊酚,德国 Fresenius Kabi 公司;NBQX,美国 Sigma-Aldrich 公司;蔗糖,德国 BioFroxx 公司;多聚甲醛,上海凌峰化学试剂有限公司;兔抗鼠 GluA1 和 GluA2 单克隆抗体,美国 Cell Signaling Technology 公司;兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体和 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体,碧云天生物技术研究所;生理盐水,河北天成药业股份有限公司。

脑立体定位仪(68025)、微注射系统(KDS310)、导管、导管帽和注射内管,深圳瑞沃德生命科技有限公司;微量注射器,德国 Hamilton 公司;4℃ 孵育摇床(DLHR-Q200)和冰冻切片机(HI1210),美国 Thermo 公司;蛋白电泳仪,美国 Bio-rad 公司;凝胶成像系统,美国 GE 公司;荧光正置显微镜(DM5500B),德国 Leica 公司;智能激光光源(Aurora-220-473),杭州纽顿科技有限公司;光纤

和跳线,杭州茨博科技有限公司。AES-SYS16 大鼠自身给药行为训练笼,宁波安来科学仪器有限公司。整个行为实验装置由大鼠操作行为箱和计算机控制系统组成。大鼠操作行为箱中配有左、右各 1 套鼻触键和鼻触灯及 1 个笼灯,若大鼠鼻触反应正确,则笼灯灭,鼻触灯亮,此时大鼠可通过置入体内的静脉导管获得 1 次丙泊酚($1.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)的泵入。实验过程由计算机自动控制完成。

1.3 重组腺相关病毒构建

腺相关病毒载体(adeno-associated virus, AAV)-钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II α (calmodulin-dependent protein kinase II α , CaMK II α)-黄绿色荧光蛋白(enhanced yellow fluorescent protein, eYFP)和 AAV-CaMK II α -光敏感通道蛋白(channelrhodopsin-2, ChR2)-eYFP(每管 20 μL ,滴度为 $5.3\text{E}+12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),武汉枢密脑科学技术有限公司。AAV-CaMK II α -eYFP 含有 CaMK II α 基因启动子序列,可精确感染 Glu 能神经元,但不含 *ChR2* 基因,光照后不能激活 Glu 能神经元。AAV-CaMK II α -ChR2-eYFP 含有 CaMK II α 基因启动子序列和 *ChR2* 基因,可以精确感染 Glu 能神经元并使其被相应的蓝光激活,从而使 Na^+ 和 Ca^{2+} 通过激活的 ChR2 通道内流,导致神经元去极化。

1.4 大鼠丙泊酚依赖模型的建立

1.4.1 自身给药训练和分组

大鼠经 5% 水合氯醛麻醉后,将 PE-硅胶管置入右侧颈外静脉,并将导管出口从背后穿出,固定。取 12 只颈外静脉置管后的大鼠进行丙泊酚自身给药行为训练。每天 14:00 至次日 2:00 为行为学实验时间,连续 14 d,每天每只训练 3 h。训练时,将大鼠放入训练笼,将 PE-硅胶管出口与输液泵连接,运行固定比率 1(fixed ratio 1, FR1)程序,即当大鼠鼻触 1 次左侧鼻触键(有效开关),会得到 1 次丙泊酚($1.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)泵入,并伴随笼灯熄灭、左侧鼻触灯亮以及持续 5 s 的声音刺激线索。2 个训练周期间隔 30 s 的不应期,若大鼠在不应期内再次鼻触有效开关不能获取丙泊酚泵入及相关线索发生,但系统会记录 1 次鼻触次数;而当大鼠鼻触 1 次右侧鼻触键(无效开关)不会得到丙泊酚泵入及相关线索的发生^[4]。训练结束后,程序停止并记录有效和无效鼻触次数。根据训练第 12~14 天有效鼻触次数将大鼠分为丙泊酚依赖大鼠(有效鼻触次数均 >40 次,且波动 $\leq 10\%$)和丙泊酚非依赖大鼠(有效鼻触次数均 <20 次)。

1.4.2 Western印迹法检测NAc区GluA1和GluA2蛋白表达水平

在第 15 天训练结束后,立即将大鼠处死,取脑并分离 NAc 区,加入裂解液和蛋白酶抑制剂,捣碎、研磨、静置后超声匀浆,4℃,12 000×g 离心 30 min,收取上清液。用 BCA 试剂盒测定匀浆液蛋白浓度。在匀浆液中加入上样缓冲液,100℃煮沸 10 min 变性。每条泳道蛋白上样量 30 μg,经电泳、转膜后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,加入抗 GluA1, GluA2 和 GAPDH 一抗(稀释比例均为 1:1000),4℃摇床孵育 16~20 h。TBST 洗膜,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(稀释比例为 1:2000),室温孵育 2 h, TBST 充分洗膜,曝光后显示条带。ImageJ 1.51 软件分析蛋白条带的积分吸光度(integrated absorbance, IA),以目标蛋白与内参蛋白 IA 值的比值表示目标蛋白相对表达水平。

1.5 NAc 区注射 NBQX 对丙泊酚依赖大鼠觅药行为的影响

1.5.1 NAc 区套管置入手术

正常大鼠 ip 给予 5% 水合氯醛(7 mL·kg⁻¹)麻醉后固定在脑立体定位仪上,切开颅顶皮肤暴露前、后囟,调整至同一平面。根据前囟的位置,在 NAc 区(A/P: +1.8 mm; M/L: -1.5 mm; D/V: -8 mm)钻孔,将套管经孔缓慢下降至目标脑区,用凝胶海绵填塞套管与孔间的缝隙。在钻孔位置旁开 5 mm 处钻 2 个浅孔,各拧入 1 枚螺丝钉,用牙托粉将套管和螺丝钉包裹并固定。

1.5.2 大鼠分组、给药和丙泊酚觅药行为检测

大鼠 NAc 区埋置套管(同 1.5.1)和静脉埋置给药管(同 1.4.1),手术后恢复 7 d,而后进行丙泊酚自身给药训练,训练方法同 1.4.1,训练结束后次日(第 15 天)进行测试。测试开始前 30 min,将 24 只丙泊酚依赖模型大鼠随机分为 4 组($n=6$):对照组及 NBQX 0.25, 0.5 和 1 μg 组,在套管内置入给药管,通过微量注射泵在 NAc 区分别泵入生理盐水或 NBQX(泵入体积为 0.3 μL,流速为 0.2 μL·min⁻¹),

在 FR1 程序下观察 NBQX 对大鼠丙泊酚觅药行为的影响。实验流程见图 1。

1.6 蓝光激活 BLA-NAc 环路对大鼠丙泊酚觅药行为的影响

1.6.1 重组腺相关病毒注射

正常大鼠麻醉后固定在脑立体定位仪上,在 BLA 区(A/P: -2.5 mm; M/L: -4.9 mm; D/V: -8.5 mm)钻孔,然后将微量进样针缓慢插入至目标脑区,使用微量注射泵以 0.1 μL·min⁻¹ 的速度缓慢注入 0.5 μL 病毒,注射完毕后停针 10 min,缓慢退出微量进样针,并缝合皮肤和消毒。

1.6.2 大鼠分组、光刺激和丙泊酚觅药行为检测

将正常大鼠随机分为 2 组,分别在 BLA 区注射 AAV-CaMK II α-eYFP 和 AAV-CaMK II α-ChR2-eYFP(同 1.6.1),注射 3 周后,手术植入套管(同 1.5.1)和静脉给药管(同 1.4.1)。恢复 1 周后进行丙泊酚自身给药训练,训练方法同 1.4.1。选取丙泊酚依赖大鼠分为 eYFP 组、eYFP+NBQX 组、ChR2-eYFP 组和 ChR2-eYFP+NBQX 组($n=6$),在第 15 天进行测试。测试开始前 30 min, eYFP 组和 ChR2-eYFP 组在 NAc 区给予生理盐水, eYFP+NBQX 组和 ChR2-eYFP+NBQX 组给予 NBQX 0.5 μg(同 1.5.2)。测试时将套管内置入光纤并与 470 nm 激光发生器和训练笼相连接。根据 ChR2 通道蛋白的光电特性^[19],采用持续时间 4 s、频率 10 Hz、脉冲宽度 20 ms、输出功率 40 mW 的激光方波(蓝光),并控制输出至光纤尖端的功率稳定在 4~10 mW。在 FR1 程序下(即当大鼠鼻触 1 次有效开关,可获得 1 次药物泵入,同时伴随相关线索的发生和一串蓝光刺激)观察蓝光刺激对大鼠丙泊酚觅药行为的影响。实验流程见图 2。

1.6.3 免疫荧光法检测大鼠 BLA 和 NAc 区病毒表达

行为学测试结束后,将大鼠麻醉后心脏灌流,取脑固定、脱水、包埋。然后冰冻切片机切片,厚度 200 μm,固定漂洗后滴加抗荧光淬灭剂封片。在荧光正置显微镜下拍片,观察大鼠脑 BLA 和 NAc 区荧光表达并拍照。



Fig. 1 Flow chart of propofol self-administration training coupled with NAc administration in rats. The test was performed the day after 14 days of continuous propofol self-administration training. The propofol addicted rats were randomly divided into control group and NBQX [α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPA) antagonist, 0.25, 0.5 and 1 μg] group ($n=6$), and were given saline or NBQX via guide cannulae to the nucleus accumbens (NAc) (injection volume: 0.3 μL; flow rate: 0.2 μL·min⁻¹) 30 min before testing. The effect of NBQX on the number of active nasal contacts in propofol addicted rats was observed under the fixed ratio 1 (FR1) procedure.

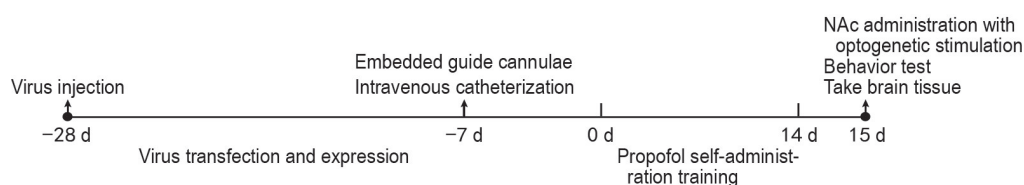


Fig.2 Flow chart of propofol self-administration training coupled with optogenetics test in rats. Four weeks before propofol self-administration training, the virus was injected into the basolateral amygdala (BLA). One week before propofol self-administration training, the venous catheter was placed and the guide cannulae was embedded into the NAc. The optogenetics test was performed the day after 14 days of continuous propofol self-administration training. The propofol addicted rats were randomly divided into enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) group, eYFP+NBQX group, channelrhodopsin-2 (ChR2)-eYFP group and ChR2-eYFP+NBQX group ($n=6$), and were given saline or NBQX 0.5 μg via guide cannulae to the NAc (injection volume: 0.3 μL ; flow rate: 0.2 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) 30 min before testing. During the test, optogenetic stimulation was delivered via guide cannulae to BLA-NAc circuit of propofol addicted rats and the number of active nasal contacts was observed under the FR1 procedure.

1.7 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。所有结果数据符合正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。丙泊酚依赖与丙泊酚非依赖大鼠行为学结果采用重复测量方差分析和 Tukey t 检验,Western 印迹结果采用独立样本 t 检验;蓝光刺激和 NAc 区注射给药后各组大鼠行为学结果采用单因素方差分析和 Tukey t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丙泊酚依赖大鼠觅药行为及 NAc 区 GluA1 和 GluA2 蛋白表达

行为学实验结果(图 3A)显示,与丙泊酚非依赖大鼠相比,丙泊酚依赖大鼠有效鼻触次数明显增加($P < 0.05$),即觅药行为增加。Western 印迹检测结果(图 3B-3D)显示,与非依赖大鼠相比,丙泊酚依赖大鼠 NAc 内 GluA1 和 GluA2 蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。

2.2 NAc 区注射 NBQX 对丙泊酚依赖大鼠觅药行为的影响

与对照组相比,NBQX 0.5 和 1 μg 组大鼠有效鼻触次数显著减少($P < 0.01$)(图 4)。提示阻断 NAc 区 AMPAR 可以抑制大鼠丙泊酚觅药行为。

2.3 蓝光刺激 BLA-NAc 环路对丙泊酚依赖大鼠觅药行为的影响

与 eYFP 组相比,ChR2-eYFP 组大鼠有效鼻触次数增加($P < 0.01$),而 eYFP+NBQX 组大鼠有效鼻触次数减少($P < 0.01$)。与 eYFP+NBQX 组相比,ChR2-eYFP+NBQX 组大鼠有效鼻触次数增加($P < 0.01$)。与 ChR2-eYFP 组相比,ChR2-eYFP+NBQX 组大鼠有效鼻触次数减少($P < 0.01$)。与 eYFP 组相比,ChR2-eYFP+NBQX 组大鼠有效鼻触次数无明显变化(图 5)。

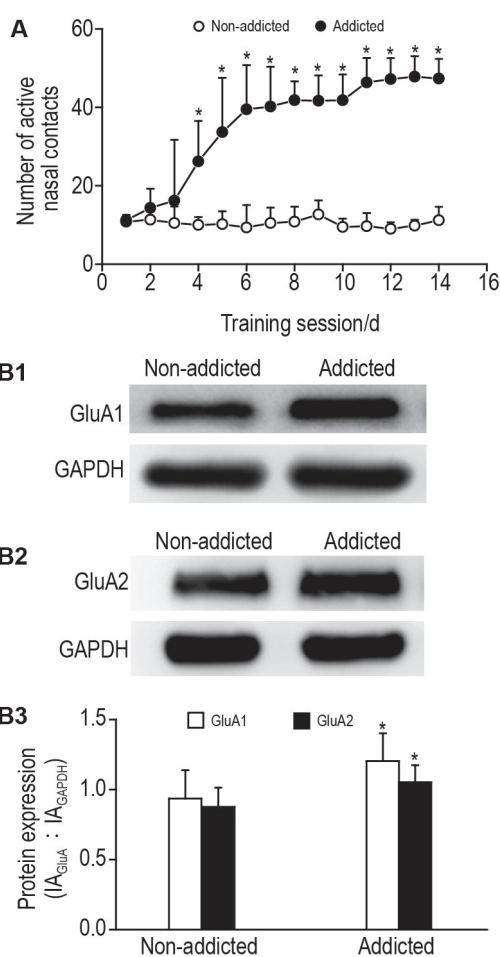


Fig.3 Propofol self-administration behavior (A) and expressions of GluA1 and GluA2 (B) in NAc of propofol addicted rats. Rats were trained under a FR1 schedule to discriminate propofol addicted from non-addicted. After 14-day training, rats whose number of active nasal contacts was 40 or larger in the last three days of the training and whose fluctuation was 10% or less were considered propofol addicted, while rats whose number of active nasal contacts was 20 or less were considered non-addicted. B3 was the semi-quantitative result of B1 and B2 by Western blotting. IA: integrated absorbance. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. $*P < 0.05$, compared with non-addicted rats.

2.4 BLA 和 NAc 区病毒表达鉴定

免疫荧光检测结果(图 6)表明,BLA 区病毒正

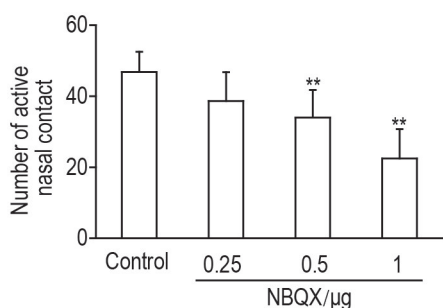


Fig. 4 Effect of NBQX on propofol seeking behavior in propofol addicted rats. See Fig.1 for the rat treatment. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P < 0.01$, compared with control group.

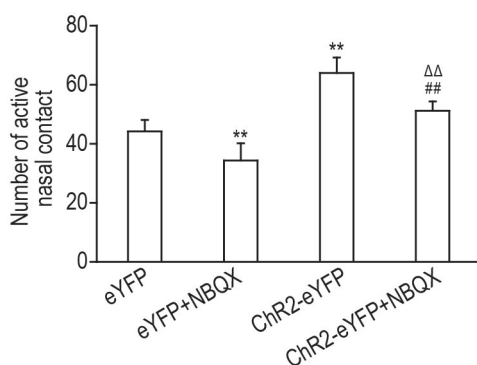


Fig. 5 Effect of blue optogenetic stimulation to BLA-NAc circuit on propofol seeking behavior in propofol addicted rats. See Fig.2 for the rat treatment. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P < 0.01$, compared with eYFP group; ## $P < 0.01$, compared with eYFP+NBQX group; $\Delta\Delta P < 0.01$, compared with ChR2-eYFP group.

确表达(图 6A),且可以成功转染到 NAc 区(图 6B)。

3 讨论

本研究发现,丙泊酚依赖大鼠 NAc 区 GluA1 和 GluA2 蛋白表达水平增高,拮抗 NAc 内 AMPAR 可显著减少大鼠丙泊酚觅药行为,而兴奋 BLA-NAc 环路可增加大鼠丙泊酚自身给药行为,并改善 NAc 内注射 AMPAR 拮抗剂对大鼠觅药行为的抑制作用。

中脑边缘奖赏系统在药物成瘾中起重要作用,已知的脑区主要有中脑腹侧被盖区、NAc、杏仁核、背侧纹状体、黑质、海马、前额叶皮质、岛叶皮质、下丘脑、丘脑底核和腹侧苍白球等,但这些脑区在药物成瘾中的调控机制尚未完全阐明^[14]。BLA 是 NAc 上游脑区,主要以 Glu 能神经元为主,BLA Glu 能神经元的异常兴奋可能是诱发和维持药物成瘾的重要原因,而 BLA Glu 能神经元失活可抑制对成瘾药物的依赖^[15-16]。BLA 和 NAc 均可参与调控线

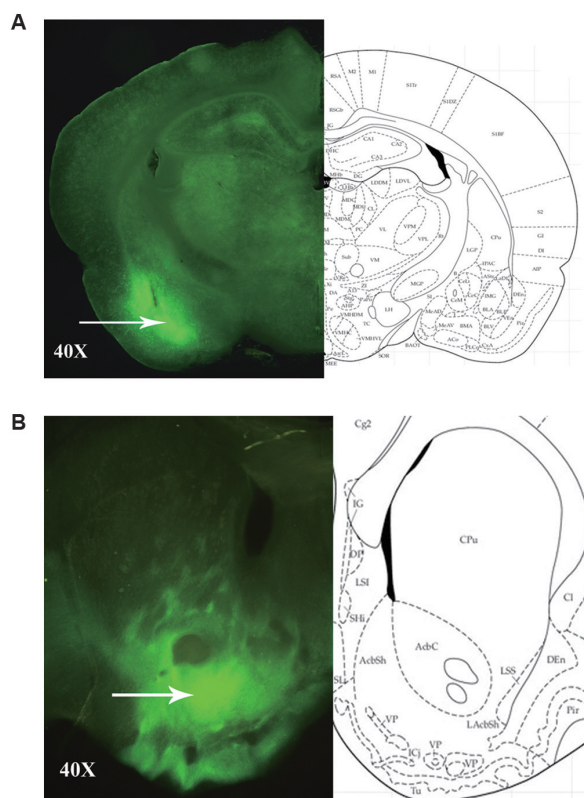


Fig. 6 eYFP expressions in BLA (A) and NAc (B) of rats after virus injection by immunofluorescence assay. See Fig.2 for the rat treatment. The arrows show the regions of virus expression.

索诱发的动机行为,二者不仅有解剖关系还存在功能上的联系。在线索诱发的奖赏行为中,BLA 神经元对线索的应答反应会先于 NAc 神经元,并参与对 NAc 神经元兴奋性的调控。电刺激 BLA 区可促进大鼠 NAc 区 Glu 能介导的多巴胺释放,引起 NAc 神经元细胞兴奋,进而诱发药物的奖赏效应^[17-18]。自身给药行为模型是目前药物成瘾研究中公认和普遍采用的实验方法^[19],本课题组前期研究发现,BLA 和 NAc 均可参与调控线索诱导的大鼠丙泊酚自身给药行为^[9],推测 BLA-NAc 环路可能参与调控大鼠丙泊酚的自身给药行为。免疫荧光结果表明,在 BLA 区注射携带 ChR2 的病毒可显示黄绿色荧光,并能成功转染至 NAc 区。光遗传学技术可以实现瞬间激活或失活神经元上特异性表达的 ChR2,即给光时通道蛋白打开,不给光时通道蛋白关闭^[20]。本研究中,病毒注射 6 周后再给予蓝光刺激,以便有足够的时间进行病毒转染和通道蛋白表达。在第 15 天大鼠自身给药行为测试期间,通过光纤在丙泊酚依赖大鼠 NAc 区给予蓝光刺激,可使 BLA 区和 NAc 区携带 ChR2 的神经元兴奋,从而实现兴奋

BLA-NAc 环路的作用。本研究结果表明,兴奋 BLA-NAc 环路可显著增加大鼠丙泊酚觅药行为。这与文献[11]报道的兴奋 BLA-NAc 环路可促进小鼠天然奖赏行为的结论相一致。

近年来研究发现,AMPA 在线索诱导的药物成瘾行为中起重要作用^[21-22]。AMPA 是离子型谷氨酸受体的一种,其中 GluA1 和 GluA2 蛋白是构成 AMPAR 的重要亚基,并在药物成瘾的调控机制中起关键作用^[23]。研究表明,吗啡依赖的大鼠表现为 NAc 内 GluA1 蛋白表达水平增高^[24]。另外,ip 给予糖原合成酶激酶 3 拮抗剂可促进小鼠酒精自身给药行为,并伴随 NAc 内 GluA2 蛋白表达水平增高^[25]。本研究发现,丙泊酚依赖大鼠 GluA1 和 GluA2 蛋白表达水平显著增高,表明 NAc 内 GluA1 和 GluA2 蛋白可能参与大鼠丙泊酚依赖的调控机制,而具体的调控机制还需要进一步研究。有研究报道,可卡因依赖大鼠 NAc 区 GluA1 和 GluA2 蛋白表达减少^[26],这与本研究中丙泊酚依赖大鼠 GluA1 和 GluA2 蛋白表达增高的实验结果似乎是矛盾的。另有研究表明,神经元 GluA1 蛋白增加或 GluA2 蛋白减少均可诱导 NAc 内神经元钙渗透性 AMPAR 表达水平的增高,而钙渗透性 AMPAR 具有高电导钙渗透性,可诱发长时程增强形成,进而促进药物的滥用和依赖^[21]。因此推测,丙泊酚可能主要通过增加 NAc 区 GluA1 蛋白表达诱导钙渗透性 AMPAR 表达水平增高,从而促进大鼠觅药行为;而可卡因可能主要通过减少 NAc 区 GluA2 蛋白表达诱导钙渗透性 AMPAR 表达水平增高,从而促进药物依赖,这可能是产生上述矛盾的原因之一。NAc 在长期高频刺激下可引发神经元 Ca^{2+} 内流增加,激活 CaMK II 相关通路促进神经元细胞 AMPAR 表达增加,进而诱发神经元之间长时程增强形成,促使药物滥用和依赖^[27-28]。研究表明,在 NAc 注射 AMPAR 拮抗剂可减少大鼠线索诱导的可卡因自身给药行为^[29],这与本研究发现的 NBQX 在 NAc 内给药可显著减少线索诱导的大鼠丙泊酚觅药行为相一致,提示 NAc 区 AMPAR 参与丙泊酚精神依赖性的调控机制。此外,NAc 区可接收整合来自皮质边缘系统输入的信息。研究报道,这些输入的信息可通过调控 NAc 内 AMPAR 水平介导大鼠可卡因觅药行为^[28]。本研究结果表明,兴奋 BLA-NAc 环路可以加剧丙泊酚依赖大鼠的丙泊酚觅药行为,并改善 NAc 区给予 NBQX 对丙泊酚依赖大鼠觅药行为的抑制作用,而在 Chr2 缺失的情况下,仅有 eYFP 表达不会影响 NBQX 对大鼠丙泊酚觅药行为的抑制作用。提示

BLA-NAc 环路在大鼠丙泊酚依赖中起着重要作用,该作用可能由 NAc 区 AMPAR 介导。

综上所述,大鼠丙泊酚依赖可能与 NAc 区 GluA1 蛋白表达增高有关,并且兴奋 BLA-NAc 环路可增加大鼠丙泊酚的自身给药行为,其机制可能与 NAc 区 AMPAR 的水平有关。本研究主要聚焦在大鼠丙泊酚成瘾的诱发和维持阶段,而丙泊酚复吸行为的机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Walsh CT. Propofol: milk of amnesia [J]. *Cell*, 2018, 175(1): 10-13.
- [2] Zacny JP, Lichtor JL, Thompson W, et al. Propofol at a subanesthetic dose may have abuse potential in healthy volunteers [J]. *Anesth Analg*, 1993, 77(3): 544-552.
- [3] Fry RA, Fry LE, Castanelli DJ. A retrospective survey of substance abuse in anaesthetists in Australia and New Zealand from 2004 to 2013 [J]. *Anaesth Intensive Care*, 2015, 43(1): 111-117.
- [4] Lian Q, Wang B, Zhou W, et al. Self-administration of propofol is mediated by dopamine D₁ receptors in nucleus accumbens in rats [J]. *Neuroscience*, 2013, 231: 373-383.
- [5] Wang B, Yang X, Sun A, et al. Extracellular signal-regulated kinase in nucleus accumbens mediates propofol self-administration in rats [J]. *Neurosci Bull*, 2016, 32(6): 531-537.
- [6] Wu B, Liang Y, Dong Z, et al. Glucocorticoid receptor mediated the propofol self-administration by dopamine D₁ receptor in nucleus accumbens [J]. *Neuroscience*, 2016, 328: 184-193.
- [7] Chen BP, Huang XX, Dong DM, et al. The role of NMDA receptors in rat propofol self-administration [J/OL]. *BMC Anesthesiol*, 2020, 20(1): 149 (2020-06-15) [2021-11-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32539742/>. DOI: 10.1186/s12871-020-01056-0.
- [8] Khakpoor M, Nasehi M, Vahdati A, et al. Additive effect of BLA GABA_A receptor mechanism and (+)-MK-801 on memory retention deficit, an isobologram analysis [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2016, 143: 57-64.
- [9] Wang S, Wang X, Lin W, et al. Dopamine D₁ receptor within basolateral amygdala is involved in propofol relapse behavior induced by cues [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(12): 2393-2403.
- [10] Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, et al. Asso-

- ciative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 877: 412-438.
- [11] Stuber GD, Sparta DR, Stamatakis AM, *et al.* Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking [J]. *Nature*, 2011, 475(7356): 377-380.
- [12] Puaud M, Higuera-Matas A, Brunault P, *et al.* The basolateral amygdala to nucleus accumbens core circuit mediates the conditioned reinforcing effects of cocaine-paired cues on cocaine seeking [J]. *Biol Psychiatry*, 2021, 89(4): 356-365.
- [13] Watanabe H, Sano H, Chiken S, *et al.* Forelimb movements evoked by optogenetic stimulation of the macaque motor cortex [J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3253 (2020-06-26) [2021-11-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32591505/>. DOI: 10.1038/s41467-020-16883-5.
- [14] Webb IC. Circadian rhythms and substance abuse: chronobiological considerations for the treatment of addiction [J/OL]. *Curr Psychiatry Rep*, 2017, 19(2): 12(2017-02-11) [2021-11-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28188587/>. DOI: 10.1007/s11920-017-0764-z.
- [15] Sharp BM. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction [J / OL]. *Transl Psychiatry*, 2017, 7(8): e1194 (2017-08-08) [2021-11-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28786979/>. DOI:10.1038/tp. 2017.161.
- [16] Goodman J, Hsu E, Packard MG. NMDA receptors in the basolateral amygdala mediate acquisition and extinction of an amphetamine conditioned place preference [J]. *Behav Neurosci*, 2019, 133(4): 428-436.
- [17] Floresco SB, Yang CR, Phillips AG, *et al.* Basolateral amygdala stimulation evokes glutamate receptor-dependent dopamine efflux in the nucleus accumbens of the anaesthetized rat [J]. *Eur J Neurosci*, 1998, 10(4): 1241-1251.
- [18] Ambroggi F, Ishikawa A, Fields HL, *et al.* Basolateral amygdala neurons facilitate reward-seeking behavior by exciting nucleus accumbens neurons [J]. *Neuron*, 2008, 59(4): 648-661.
- [19] Kalivas PW, Peters J, Knackstedt L. Animal models and brain circuits in drug addiction [J]. *Mol Interv*, 2006, 6(6): 339-344.
- [20] Weidner TC, Vincenz D, Brocka M, *et al.* Matching stimulation paradigms resolve apparent differences between optogenetic and electrical VTA stimulation [J]. *Brain Stimul*, 2020, 13(2): 363-371.
- [21] Murray CH, Loweth JA, Milovanovic M, *et al.* AMPA receptor and metabotropic glutamate receptor 1 adaptations in the nucleus accumbens core during incubation of methamphetamine craving [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(9): 1534-1541.
- [22] Tabakoff B, Hoffman PL. The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: an integrative history [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 113: 20-37.
- [23] Boudreau AC, Reimers JM, Milovanovic M, *et al.* Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(39): 10621-10635.
- [24] Lv XF, Sun LL, Cui CL, *et al.* NAc shell Arc/Arg3.1 protein mediates reconsolidation of morphine CPP by increased GluR1 cell surface expression: activation of ERK-coupled CREB is required [J/OL]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015, 18(9): pyv030 (2015-03-06) [2021-11-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25746394/>. DOI:10.1093/ijnp/pyv030.
- [25] Faccidomo S, Holstein SE, Santanam TS, *et al.* Pharmacological inhibition of glycogen synthase kinase 3 increases operant alcohol self-administration in a manner associated with altered pGSK-3 β , protein interacting with C kinase and GluA2 protein expression in the reward pathway of male C57BL/6J mice [J]. *Behav Pharmacol*, 2020, 31(1): 15-26.
- [26] Riday TT, Kosofsky BE, Malanga CJ. The rewarding and locomotor-sensitizing effects of repeated cocaine administration are distinct and separable in mice [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(4): 1858-1866.
- [27] Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(11): 844-858.
- [28] Boudreau AC, Ferrario CR, Glucksman MJ, *et al.* Signaling pathway adaptations and novel protein kinase A substrates related to behavioral sensitization to cocaine [J]. *J Neurochem*, 2009, 110(1): 363-377.
- [29] Di Ciano P, Everitt BJ. Dissociable effects of antagonism of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core and shell on cocaine-seeking behavior [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2001, 25(3): 341-360.

Effect of basolateral amygdala to nucleus accumbens circuit on propofol dependence in rats

HUANG Bing-wu¹, CHEN Yi-er¹, CUI Yan-hua¹, LIAN Qing-quan¹, SU Ying², LIN Han^{1,2}

(1. Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, the Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China; 2. Key Laboratory of Anesthesiology of Zhejiang Province, Wenzhou 325035, China)

Abstract: OBJECTIVE To investigate the role of the basolateral amygdala (BLA) to the nucleus accumbens (NAc) circuit in propofol self-administration in rats and the related mechanisms. **METHODS** ① SD rats were randomly divided into the propofol addicted group and the propofol non-addicted group via propofol self-administration training, and the expressions of GluA1 and GluA2 [the subunits of glutamatergic α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPA)] in NAc of rats were detected by Western blotting. ② Twenty-four propofol addicted rats were randomly divided into 4 groups: control group, NBQX (AMPA antagonist) 0.25, 0.5 and 1 μ g groups. After 14 days of propofol self-administration training, rats were injected with saline or different doses of NBQX via intra-NAc 30 min before the last training to observe the change of propofol seeking behavior. ③ Twenty-four propofol-addicted rats were randomly divided into the enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) group, eYFP+NBQX group, channelrhodopsin-2 (ChR2)-eYFP group and ChR2-eYFP+NBQX group. AAV-CaMK II α -eYFP was injected into BLA in the eYFP group and eYFP+NBQX group. AAV-CaMK II α -ChR2-eYFP was injected into BLA in the ChR2-eYFP group and ChR2-eYFP+NBQX group. After 4 weeks of virus injection, rats received 14 days of training in propofol self-administration. On the 15th day, rats were given saline (eYFP and ChR2-eYFP group) or NBQX 0.5 μ g (eYFP+NBQX and ChR2-eYFP+NBQX group) via intra-NAc 30 min prior to the test before blue light stimulation from the BLA to the NAc circuit was performed during the test to observe the change of propofol seeking behavior. **RESULTS** ① Compared with the propofol non-addicted rats, the number of effective nasal contacts in propofol-addicted rats was significantly increased ($P<0.05$). Western blotting results indicated that the expressions of GluA1 and GluA2 in NAc of propofol-addicted rats were increased more significantly than in propofol non-addicted ones ($P<0.05$). ② Compared with the control group, NBQX 0.5 and 1 μ g could significantly attenuate the propofol self-administration behavior in rats ($P<0.01$). ③ Compared with the eYFP group, propofol self-administration behavior in the ChR2-eYFP group was enhanced ($P<0.01$). Compared with the eYFP+NBQX group, ChR2-eYFP+NBQX group could enhance propofol self-administration behavior in rats ($P<0.01$). **CONCLUSION** Exciting the BLA to NAc circuit can enhance propofol self-administration behavior in rats, and the mechanism may be related to AMPAR in NAc.

Key words: basolateral amygdala; nucleus accumbens; NBQX; propofol; self-administration

Corresponding author: LIN Han, E-mail: nanlinhannansh@qq.com

(收稿日期: 2021-01-11 接受日期: 2022-06-02)

(本文编辑: 赵楠)