

[论著]

伏核壳部含有 GluN2B 亚基的 NMDA 受体参与吗啡奖赏记忆的再巩固*

陈 慧 李亦婧** 吴臻**

(北京大学神经科学研究所、北京大学基础医学院神经生物学系、
神经科学教育部和卫生部重点实验室,北京,100191)

摘要 目的:再次暴露于药物相关线索能唤起药物成瘾记忆并使之处于不稳定状态,此时可经再巩固后形成稳定记忆,也可干扰其再巩固过程削弱或消除该记忆。本研究检测了伏核内含有 GluN2B 亚基的 NMDA 受体在吗啡奖赏记忆再巩固中的作用。方法:将已形成吗啡条件性位置偏爱(conditioned place preference, CPP)的大鼠再次暴露于伴吗啡箱后,观察其伏核壳部和核心部 NMDA 受体各亚基的蛋白水平;再次暴露于伴吗啡箱后,在大鼠双侧伏核壳部和核心部分别注射 GluN2B 亚基选择性 NMDA 受体拮抗剂 Ro 25-6981,观察对大鼠吗啡 CPP 表达的影响。结果:(1)吗啡 CPP 大鼠再次暴露于用药环境后,伏核壳部 NMDA 受体的 GluN2B 亚基蛋白水平特异性升高, GluN2A 亚基降低, GluN1 亚基不变;核心部 GluN2B、GluN2A 和 GluN1 亚基蛋白水平均无明显变化。(2)再次暴露于用药环境后,伏核壳部注射 Ro 25-6981 的大鼠没有表现出对伴吗啡箱的偏爱,这种对吗啡 CPP 的抑制作用可持续至给药后 14 d,并且小剂量吗啡处理不能使 CPP 行为重建;核心部注射 Ro 25-6981 的大鼠仍可表现出对伴吗啡箱的偏爱。结论:伏核壳部含有 GluN2B 亚基的 NMDA 受体在吗啡奖赏记忆再巩固中发挥了重要的作用。

关键词 吗啡;条件性位置偏爱;NMDA 受体;成瘾记忆再巩固

doi: 10.13936/j.cnki.cjdd1992.2017.02.004

中图分类号 R395.2

GLUN2B – CONTAINING NMDA RECEPTORS IN THE SHELL OF THE NUCLEUS ACCUMBENS WERE INVOLVED IN THE RECONSOLIDATION OF MORPHINE – INDUCED REWARD MEMORY

CHEN Hui, LI Yijing, WU Liuzhen

(Neuroscience Research Institute, Peking University; Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center; Key Laboratory of Neuroscience, The Ministry of Education and Ministry of Public Health, Beijing, 100191)

ABSTRACT *Objective:* Re-exposure to the drug-related cues can reactivate the drug-associated memory and trigger the relapse of drug abuse. If the reconsolidation of drug-related memory is interrupted, the relapse may be prevented. This study is designed to determine the role of GluN2B-containing NMDARs in the nucleus accumbens (NAc) on the reconsolidation of morphine-induced reward memory. *Methods:* Using the conditioned place preference (CPP) as an animal model that mimics drug-associated learning and memory, the protein level of GluN2B, GluN2A and GluN1 subunits were detected in the NAc shell and core after re-exposure to the drug-paired context. The effect of Ro 25-6981, an antagonist of GluN2B-containing NMDARs, on the reconsolidation of morphine CPP in rats was investigated. *Results:* GluN2B subunits protein level was increased while the GluN2A subunits were

* 国家重大科学研究计划(973计划)项目(2015CB553500) 国家自然科学基金青年科学基金项目(81201031)

** 通信作者: E-mail: liuzw@bjmu.edu.cn; liyijing@bjmu.edu.cn

decreased in the NAc shell after re-exposure to drug-paired context. Protein level of GluN1 subunits in the NAc shell and these three kinds of NMDAR subunits in the NAc core stayed unchanged. After re-exposure to drug-paired context, microinjection of Ro 25-6981 into the NAc shell but not the core could inhibit the expression of morphine CPP. This effect lasted for at least 14 days and was not abolished by a priming injection of morphine. *Conclusion*: These results suggested that the GluN2B-NMDARs in the NAc shell play a critical role in the reconsolidation of morphine-induced reward memory.

KEY WORDS morphine; conditioned place preference; NMDA receptor; reconsolidation

成瘾性药物的精神活性与用药相关线索的关联性记忆是药物滥用(成瘾)者用药行为复发的主要诱因之一。与正常的学习记忆类似,有药物滥用经历的人和动物,如再次暴露于药物相关线索会唤起药物成瘾记忆并使之处于不稳定状态,通过再巩固过程可使记忆稳定下来,从而使药物相关记忆长期存在。如果干预成瘾记忆再巩固的分子机制,则有可能消除成瘾记忆,减少复吸^[1-3]。

N-甲基-D-门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)是一种重要的离子型谷氨酸受体,在正常学习记忆和药物成瘾记忆的形成和再巩固中均发挥着重要的作用。NMDAR通常是由GluN1和GluN2亚基组成的四聚体复合物。其中,GluN1是NMDAR的结构亚基,GluN2是调节亚基,有GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D四种。药物成瘾相关脑区如前额叶、海马、纹状体等分布有较高水平的GluN1、GluN2A和GluN2B亚基^[4]。已有研究发现NMDAR拮抗剂氯胺酮(ketamine)等可以抑制吗啡奖赏记忆的再巩固过程^[5-6],并且含有GluN2B亚基的NMDAR(GluN2B-NMDAR)参与了恐惧记忆激活后的去稳定过程^[7-10],但GluN2B-NMDAR是否在吗啡成瘾记忆再巩固中发挥作用并未明确。本研究采用吗啡条件性位置偏爱(conditioned place preference, CPP)模型来模拟吗啡成瘾记忆的激活和再巩固,并观察伏核内GluN2B-NMDAR在吗啡奖赏记忆再巩固中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物

采用雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,起始体重约200-250g,由北京大学医学部实验动物中心提供,每笼4只。饲养温度控制在 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度 $50 \pm 5\%$,12h光/暗交替,每天早晨7:00开始照明,自由饮水、摄食。动物接受的所有操作均符合实验动物伦理学。

1.2 吗啡 CPP 模型

1.2.1 CPP 实验装置 实验采用计算机自动监控的CPP实验装置,每个CPP箱由A、B、C三个有机玻璃箱构成。三箱之间的通道由可提插的闸门控制开或闭。其中A箱与C箱为条件化训练箱,位于B箱的两侧,大小相同($28.0\text{ cm} \times 22.0\text{ cm} \times 22.5\text{ cm}$),均为黑色;A箱侧壁上有4盏黄色发光二极管构成正方形,C箱侧壁则为正三角形作为训练时的视觉刺激;两箱底分别为不锈钢网格(A箱,每格 $2.25\text{ cm} \times 2.25\text{ cm}$)或不锈钢钢条(C箱,间距 1.5 cm)作为训练时的触觉刺激。B箱较小($13.5\text{ cm} \times 22.0\text{ cm} \times 22.5\text{ cm}$),箱内、外壁及底均为灰色,为预测试及测试时开始跑动的起始位置。各箱与箱体长轴相平行的侧壁上分布有相对应的红外发光及检测二极管,大鼠在各箱中活动时阻断光束,计算机软件自动记录大鼠分别在三箱内的停留时间、出入次数等数据。

1.2.2 吗啡 CPP 模型的建立与再巩固

1.2.2.1 吗啡 CPP 模型的建立

(1) 预测试期(天然偏爱测试阶段):实验第0天为预测试期。开放三箱间通道,启动计算机上CPP程序,将大鼠从B箱放入,任其自由跑动15min,记录并分析结果。偏爱分数=伴药箱(A或C箱)停留的时间/(A+C)箱的停留时间。淘汰偏爱分数在0.4-0.6之外的大鼠。

(2) 条件化训练期:第1~4天为条件化训练期。封闭三箱间通道,每组大鼠每天上、下午各注射一次(其中实验组一次注射盐水,另一次注射吗啡;对照组两次均注射盐水),相隔至少6h。吗啡剂量为 $4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (购自青海制药厂)。吗啡或生理盐水按照 $2\text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的体积进行腹腔注射后,立即将大鼠放入A或C箱中(按照对抗平衡原则,各组均有半数的大鼠以A箱为伴药箱,另一半以C箱为伴药箱;而每只大鼠的伴药箱是固定的),停留45min。

(3) 吗啡 CPP 测试期:第5天为CPP测试期。开放三箱间通道,不予任何注射,启动计算机上CPP

程序,将大鼠置于中间箱内,记录其 15 min 内在各箱中的停留时间、进出次数。计算大鼠对伴药箱的偏爱分数。

1.2.2.2 吗啡奖赏记忆的唤起

为观察吗啡奖赏记忆唤起后,伏核壳部和核心部 NMDAR 的 GluN2 和 GluN1 亚基蛋白水平的差异,在实验的第 6 天,将大鼠放入伴药箱,暴露于相关环境线索,停留 15 min^[5],唤起吗啡奖赏记忆。将动物从伴药箱取出后立即或 10 min 或 30 min 后断头处死,剥出全脑迅速放入铝箔纸托,加入包埋剂没过组织,放入事先准备好的 -70℃ 正己烷中,35 s 后取出,在 -80℃ 冰箱内保存。

为观察伏核内 GluN2B - NMDAR 在吗啡奖赏记忆再巩固中的作用,在吗啡奖赏记忆唤起后,取出大鼠并立即给予核团注射盐水或选择性 GluN2B - NMDAR 拮抗剂 Ro 25 - 6981(购自 Tocris 公司)。

1.2.2.3 吗啡 CPP 的重复测试

吗啡奖赏记忆唤起并给予 Ro 25 - 6981 后的第 1 天(Day 7)和第 14 天(Day 20),各测试一次大鼠对伴药箱的偏爱情况。

1.2.2.4 吗啡 CPP 的点燃:

如果吗啡奖赏记忆唤起并给予 Ro 25 - 6981 后的第 14 天,吗啡 CPP 仍被抑制,24 h 后,利用小剂量(2 mg · kg⁻¹ i. p.) 的吗啡进行点燃。吗啡注射后 10 min 将其放入 B 箱开始 15 min 的测试。

1.3 伏核亚区的定位给药

1.3.1 核团插管手术

大鼠用 40 - 50 mg · kg⁻¹ 戊巴比妥钠麻醉,插耳棒,腹卧位固定于大鼠立体定位仪上。调整门齿杆低于耳杆 3.3 mm,使前、后囟在同一水平面上。根据 Paxinos 和 Watson(1986) 脑立体定位图谱选取伏核壳部和核心部的坐标。其中,伏核壳部:前囟前 1.6 mm,外侧 0.8 mm,埋管深度(距颅骨表面) 7.0 mm;伏核核心部:前囟前 1.6 mm,外侧 2.0 mm,埋管深度(距颅骨表面) 7.0 mm。用定位仪确定颅骨表面坐标点,用骨钻(Φ 1.0 mm) 在相应部位钻透颅骨,将已消毒不锈钢外套管(外径 0.8 mm) 及配套的内芯下至指定深度。用牙科水泥固定套管。术中及术后 3 d 连续注射青霉素(20 万单位) 以防感染,手术后恢复 5 ~ 7 d 后进行 CPP 建模等操作。

1.3.2 微量注射

微量注射时,轻轻拔出内芯,用微量进样器吸取 5 μM 的 Ro 25 - 6981 分别给予伏核壳部、核心部双侧各 1 μl 的药物,经 PE - 20 管连接已消毒的注射针缓慢插入外套管,注射针超出外

套管 0.5 - 1 mm,由微量注射泵缓慢推进药物,注射结束后留置注射针 1 分钟,之后缓慢拔出注射针,再次插入内芯。

1.3.3 注射针定位

实验结束后,用 17.5% 水合氯醛(350 mg · kg⁻¹ i. p.) 将大鼠麻醉后,从左心室经升主动脉先后灌入 200 ml 预热的(35 - 37℃) 生理盐水和 250 ml 预冷(4℃) 的 4% PFA 溶液。随后取脑,放入 4% PFA 溶液中,在 4℃ 冰箱后固定过夜,换到 4℃ 20% 蔗糖溶液中浸泡,沉底后再换至 4℃ 30% 蔗糖溶液,沉底后可进行包埋,切片和焦油紫染色,并观察注射针位置,位置不准确的大鼠的行为学数据将被剔除。

1.4 Western blotting 实验

1.4.1 核团定位取材方法

将保存在 -80℃ 冰箱的脑组织取出后放在 -20℃ 切片机上平衡 30 min,用包埋剂将脑组织粘在组织托上,要切的一面朝上放置。将组织托固定在冰冻切片机上,调整刀头位置连续切片,切片厚度为 50 μm。根据 Paxinos 和 Watson(1986) 脑立体定位图谱切至伏核后时,采用 16 号注射器针头分别取出伏核壳部和核心部,置于已冷却好的 EP 管内,立即对其进行蛋白提取。

1.4.2 组织总蛋白的提取

在装有核团组织的 1.5 ml 离心管中加入 120 μl 的组织裂解液(蛋白提取试剂盒,购自北京普利莱基因公司) 置于冰上用眼科剪剪碎,用超声探头充分均浆,冰上静置 10 min。匀浆液 800 × g 4℃ 离心 5 min,上清为胞浆胞膜混合物。BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce) 定量。

1.4.3 Western blotting 实验

10% SDS - PAGE 电泳;转膜;5% 脱脂奶粉封闭室温 1 h;一抗 4℃ 孵育过夜,其中,Anti - GluN2B: 多克隆兔 IgG, Anti - GluN2A: 单克隆兔 IgG, Anti - GluN1: 单克隆小鼠 IgG, 购自 Millipore 公司(1:2000), Anti - β - Actin: 小鼠单克隆 IgG, 购自 Sigma 公司(1:3000);HRP 标记羊抗兔二抗和抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司) 室温孵育 1 h;TBST(0.05% Tween 20/1 × TBS) 洗膜;化学发光液(购自北京普利莱基因公司) 孵育 5 min;暗室曝光。

1.5 数据处理和统计学分析

将数据输入 Microsoft Excel 加以计算、整理、保存,其结果用平均值 ± 标准误(Mean ± S. E. M) 表示。统计学分析软件采用 Prism 5.0 版。单因素多组数据间的差异用单因素方差分析(one - way ANOVA) 并继之以 Newman - Keuls *post - hoc* test。两因素多组数据间的差异用双因素方差分析(two -

way ANOVA) 并继之以 Bonferroni *post-hoc* test。以 $P < 0.05$ 作为有统计学差异的界限。

2 结果

2.1 吗啡奖赏记忆唤起后,伏核壳部 NMDAR 的 GluN2B 亚基蛋白水平升高,而 GluN2A 亚基蛋白水平降低

经过 4 d 的吗啡条件化训练后,吗啡 CPP 成功建立。随机将大鼠分为不暴露(在饲养笼内,伴随暴露组的时间点取材, NR)、暴露后 10 min 取材(R-10)和暴露后 30 min 取材(R-30)三组。第 6 天,将大鼠再次放入伴药箱 15 min 以唤起吗啡奖赏记忆,从箱内取出 10 min 或 30 min 后断头取脑。观察伏核壳部和核心部内 NMDAR 的 GluN2B、GluN2A 和 GluN1 亚基的蛋白水平(流程如图 1a 所示)。

如图 1b 所示,伴药箱暴露后 30 min,大鼠伏核壳部 GluN2B 亚基的蛋白水平显著高于暴露后 10 min 组和不暴露组(One-way ANOVA, $F(2, 9) = 6.976, P < 0.05$)。而核心部 GluN2B 亚基的蛋白水平在三组间没有明显差异(图 1c)。

在相同的时间点,我们也观察了 GluN2A 亚基的蛋白水平。如图 1d 所示,伴药箱暴露后 10 min 和 30 min,大鼠伏核壳部 GluN2A 亚基的蛋白水平显著低于不暴露组(One-way ANOVA, $F(2, 12) = 4.189, P < 0.05$)。而核心部 GluN2A 亚基的蛋白水平在三组间没有明显差异(图 1e)。

GluN1 是组成 NMDAR 所必要的结构亚基,因此我们在相同的时间点还观察了 GluN1 亚基的蛋白水平。伴药箱暴露后的 10 min 和 30 min,大鼠伏核壳部和核心部 GluN1 亚基的蛋白水平在各组间均无显著差异(图 1f, g)。

2.2 伏核壳部的 GluN2B - NMDAR 参与介导吗啡 CPP 的再巩固

如图 2a 所示,在吗啡 CPP 测试后 24 h,将大鼠再次放入伴药箱 15 min 后取出,立即将 Ro 25-6981 注射到伏核壳部($5 \mu\text{M}, 1 \mu\text{l}$)。结果发现,吗啡 CPP 的表达被抑制(Post-T1, 图 2b 左图)(Two-way ANOVA 显示不同测试时间点有显著差异 $F(3, 64) = 18.66, P < 0.0001$; 给予盐水或 Ro 处

理有显著差异, $F(1, 64) = 19.98, P < 0.0001$)。这个效应可以持续至少 14 d (Post-T14, 图 2c), 此时即使给予小剂量吗啡注射($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}, \text{i. p.}$)也不能使 CPP 重建(Priming, 图 2c)(One-way ANOVA, $F(4, 43) = 8.337, P < 0.0001$)。如果没有经过吗啡伴药环境的再暴露,而是在饲养笼中接受 Ro 25-6981 注射,则不能抑制吗啡 CPP 的表达(图 2b, 右图)。

为了排除 Ro 25-6981 抑制吗啡 CPP 表达的作用是由于 Ro 25-6981 本身有奖赏或是厌恶效应,我们用生理盐水来进行 4 天的条件化训练,在第 6 天将大鼠暴露于训练箱 15 min,取出后立即将 Ro 25-6981 ($5 \mu\text{M}, 1 \mu\text{l}$) 注射到伏核壳部。结果发现,盐水注射不能建立明显的位置偏爱,伏核壳部给予 Ro 25-6981 注射也不会改变动物的偏爱分数,引起位置偏爱或是厌恶(图 2d)。

2.3 伏核核心部的 GluN2B - NMDAR 不参与吗啡 CPP 的再巩固

为了明确伏核不同亚区的 GluN2B - NMDAR 对吗啡 CPP 再巩固的贡献。我们对吗啡 CPP 大鼠进行伴药线索的再暴露后,将 Ro 25-6981 注射到伏核核心部($5 \mu\text{M}, 1 \mu\text{l}$)。结果发现, Ro 25-6981 没有影响吗啡 CPP 的表达,动物仍表现出对伴吗啡侧的明显偏爱(图 3b)。伏核核心部注射 Ro 25-6981 也没有偏爱或是厌恶效应(图 3c)。

3 讨论

在以往有关记忆再巩固分子机制的研究中, NMDAR 一直倍受关注。已有研究证明 NMDAR 参与了药物成瘾记忆的再巩固过程^[5-6, 11-13]。但是目前尚不明确哪种亚基类型的 NMDAR 参与了吗啡奖赏记忆的再巩固过程。本研究发现,吗啡 CPP 大鼠再次暴露于吗啡伴药箱后 30 min,伏核壳部 GluN2B 亚基蛋白含量显著升高, GluN2A 亚基蛋白含量明显下降, GluN1 亚基含量不变;而核心部的 GluN2B、GluN2A 和 GluN1 亚基的蛋白水平均无变化。当再次暴露于伴吗啡箱后,选择性抑制伏核壳部的 GluN2B - NMDAR,可阻断吗啡 CPP 的再巩固过程,消除大鼠的吗啡奖赏记忆。

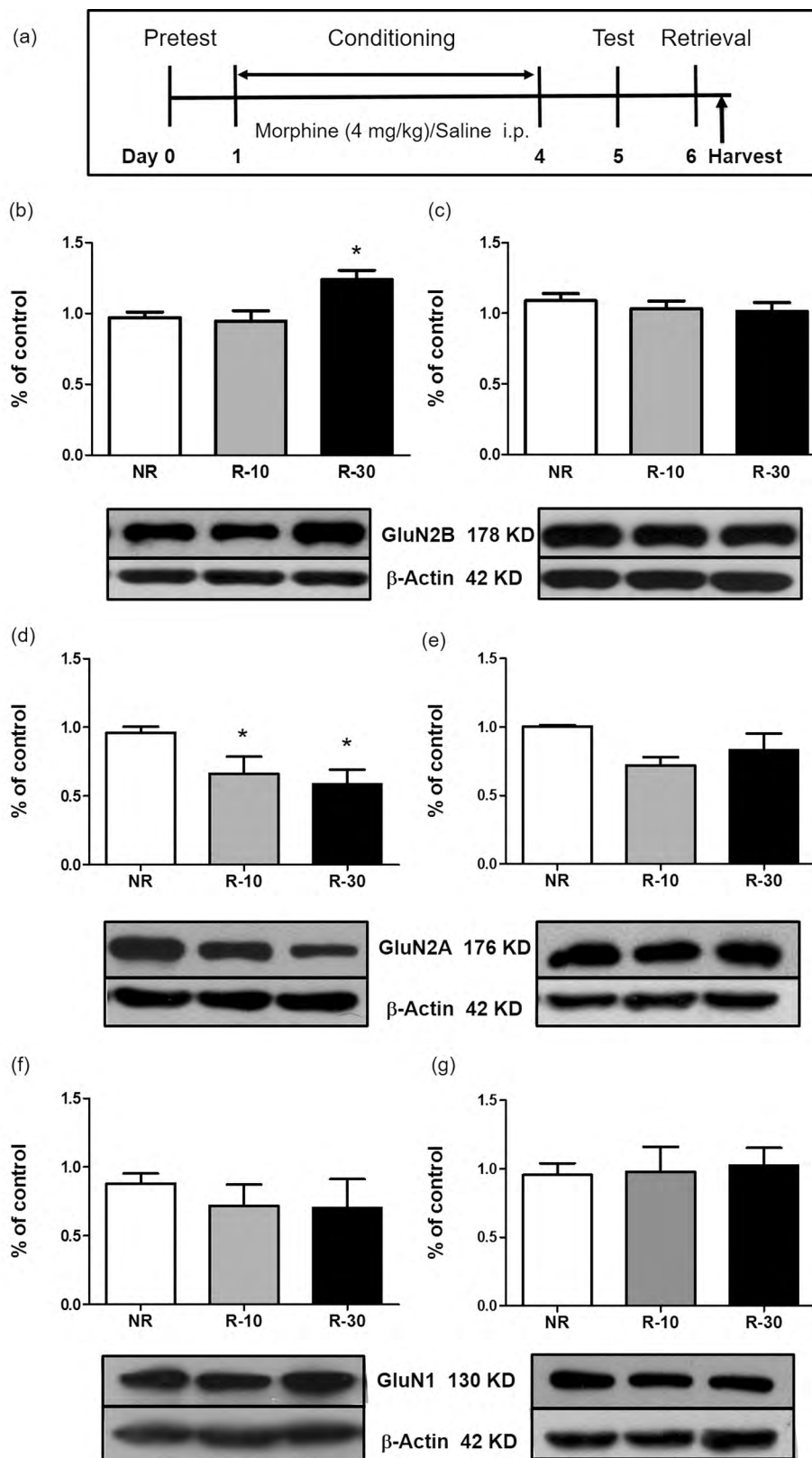


图1 吗啡奖赏记忆唤起后,伏核壳部 NMDAR 的 GluN2B 亚基蛋白水平升高,而 GluN2A 亚基蛋白水平降低。(a) 实验流程图。再暴露于吗啡伴药箱后,(b) 伏核壳部 GluN2B 亚基的蛋白水平升高,* $P < 0.05$,与 NR 和 R-10 组比较;(c) 伏核核心部 GluN2B 亚基的蛋白水平没有明显变化;(d) 伏核壳部 GluN2A 亚基的蛋白水平降低,* $P < 0.05$,与 NR 组比较;(e) 伏核核心部 GluN2A 亚基的蛋白水平无明显变化;(f-g) 伏核壳部和核心部 GluN1 亚基的蛋白水平无明显变化。NR, 未进行再暴露;R-10,再暴露后 10 min;R-30,再暴露后 30 min。

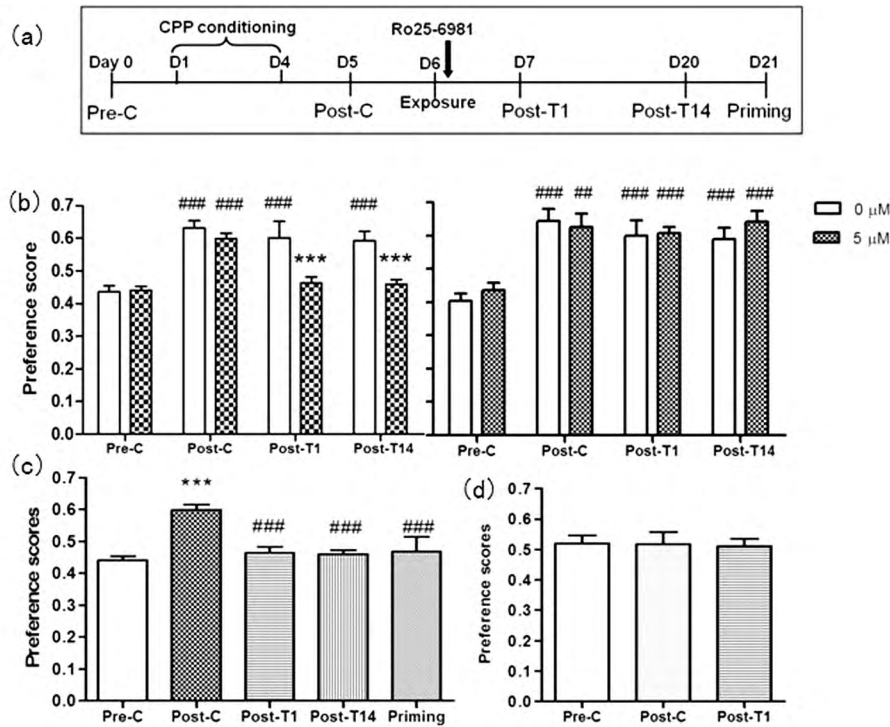


图2 伏核壳部注射 Ro 25 - 6981 可以抑制吗啡 CPP 的再巩固。(a) 实验流程图。(b) 再暴露于吗啡伴药箱后, 伏核壳部注射 Ro 25 - 6981 可以抑制吗啡 CPP 的表达(左图) 如未再暴露, 则 Ro 25 - 6981 对吗啡 CPP 表达无影响(右图)。### $P < 0.001$, # $P < 0.01$, 与 Pre - C 比较, ** $P < 0.001$ 与 0 μM 组的 Post - T1/14 比较。(c) Ro 25 - 6981 对吗啡 CPP 的抑制作用可以持续至少 14 d, *** $P < 0.001$ 与 Pre - C 比较, ### $P < 0.001$ 与 Post - C 比较。(d) 伏核壳部注射 Ro 25 - 6981 对盐水条件化训练大鼠的偏爱分数无影响。Pre - C, 训练前; Post - C, 训练后测试; Post - T1, 核团注射后 1 天; Post - T14, 核团注射后 14 d。

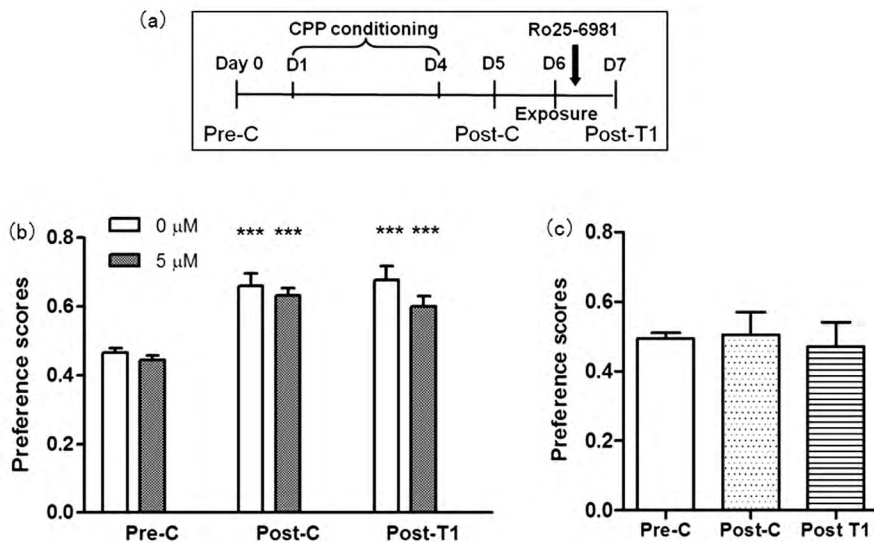


图3 伏核核心部注射 Ro 25 - 6981 对吗啡 CPP 的再巩固无影响。(a) 实验流程图。(b) 再暴露于吗啡伴药箱后, 双侧伏核核心部注射 Ro 25 - 6981 对吗啡 CPP 无影响。*** $P < 0.001$ 与 Pre - C 比较。(c) 伏核核心部注射 Ro 25 - 6981 对盐水条件化训练大鼠的偏爱分数无影响。Pre - C, 训练前; Post - C, 训练后测试; Post - T1, 核团注射后 1 天。

NMDAR 功能的差异主要来自于组成受体的 GluN2 亚基的不同。不同亚基组成的 NMDAR 在通道动力学、药理学特性、突触定位、受体转运、下游信

号等方面存在诸多不同^[14]。例如,与 GluN2A - NMDAR 相比, GluN2B - NMDAR 通道的失活更慢,与谷氨酸的亲和力更高,通道开放概率较低。它们的下

游信号分子也不尽相同,如 CaMKII 与 GluN2B 亚基的亲合力要强于 GluN2A 亚基^[15]。NMDAR 的亚基组成是可变的。随着正常发育的进程,突触内 NMDAR 的组成从含 GluN2B 为主逐渐转化成含 GluN2A 为主^[14-16]。改变受体亚基组成即可显著改变 NMDAR 的功能,进而影响胞内信号传导和神经元的突触效能^[15]。药物成瘾过程中,NMDAR 也会发生亚基组成的改变。有研究发现,酒精可以通过激活 H-Ras 和抑制酪氨酸激酶 Src 来增加 GluN2A 亚基的内吞,使得受体亚基组成转变为以 GluN2B 为主^[17]。吗啡 CPP 表达后,NAc 壳部神经元的突触体成分中 GluN2B 亚基的蛋白水平升高,而 GluN2A 亚基蛋白水平不变^[18]。侧脑室给予 GluN2B 特异性抗体可抑制吗啡 CPP 的形成,而给予 GluN1 或 GluN2A 抗体则无影响^[19]。这些证据说明成瘾性药物可以通过改变 NMDAR 组成来影响 NMDAR 的功能。Sakurai 等发现海马内注射 NMDAR 拮抗剂 D-APV 或 CaMKII 拮抗剂 KN-93,可以干扰成瘾记忆再巩固过程,促进安非他明诱导的 CPP 的消退^[13]。这提示 NMDAR/CaMKII 这条信号通路可能在药物奖赏记忆的再巩固中发挥了重要作用。而 CaMKII 与 GluN2B 亚基有很强的结合能力,GluN2B 与其结合可以稳定 CaMKII 的活性形式^[20]。本研究中,伏核壳部 GluN2B 亚基蛋白水平升高而 GluN2A 亚基水平下降,GluN1 亚基水平不变,提示此时该脑区神经元中以 GluN2B-NMDAR 为主。因此,我们推测当再暴露于伴药环境后,GluN2B-NMDAR 很有可能会通过与 CaMKII 作用,使突触效能发生长时程改变,从而实现吗啡 CPP 的再巩固,形成长时程的吗啡强化记忆。

但是,有关条件性恐惧记忆再巩固过程的研究发现,杏仁核内注射 GluN2B-NMDAR 拮抗剂 ifenprodil,可以抑制条件性恐惧记忆激活后的去稳定,使得动物的条件性恐惧记忆得以保留。而 GluN2A-NMDAR 拮抗剂 NVP-AAM077 则可以干扰记忆再巩固过程^[2],消除动物的恐惧记忆。这些研究提示 GluN2B-NMDAR 的作用可能是使记忆去稳定从而诱发再巩固的发生,而 GluN2A-NMDAR 可能是在记忆的再稳定阶段发挥调节作用。这一发现与本研究的结果存在不同,对此我们

分析认为本实验采用是吗啡 CPP 模型,它属于一种病理性学习记忆,其再巩固机制可能不同于正常的学习记忆。另外,本研究关注的是伏核内参与药物奖赏记忆再巩固的分子机制,不同脑区的记忆再巩固的分子机制可能不尽相同。

为了明确不同亚区的 GluN2B-NMDAR 对吗啡 CPP 再巩固的作用是否存在差异,本研究分别将 GluN2B-NMDAR 拮抗剂 Ro 25-6981 注射到了伏核壳部和核心部,结果发现核心部的 GluN2B-NMDAR 不参与吗啡 CPP 的再巩固过程。伏核壳部和核心部在神经递质、受体分布、与其他核团的纤维联系等方面都存在不同^[21-23],因此这两个亚区在药物成瘾记忆形成和再巩固中的作用也有差异^[1]。例如,可卡因成瘾记忆唤起后,伏核核心部的多泛素化蛋白的水平升高(壳部不变),从而启动蛋白降解使记忆变得不稳定^[24]。本实验室近期研究也发现吗啡 CPP 形成后,伏核壳部而非核心部的 GluN2B 亚基会特异性升高^[18]。但也有研究显示,伏核核心部注射 NMDAR 拮抗剂 D-APV 能够抑制吗啡 CPP 的再巩固过程^[6]。这个结果与我们的观察也并不完全矛盾,因为本实验使用的 GluN2B-NMDAR 选择性拮抗剂,能够证明的是伏核核心部内 GluN2B-NMDAR 不参与吗啡 CPP 的再巩固过程,但我们并没有观察核心部 GluN2A-NMDAR 的作用。因此,有可能是由于 D-APV 同时抑制了伏核核心部内 GluN2A-NMDAR 而导致与本实验研究结果的差异。这个推测还需要利用 GluN2A-NMDAR 选择性拮抗剂来进一步证明。

已有研究表明干预成瘾记忆再巩固过程可以降低药物成瘾者的心理渴求^[25-26]。因此,对成瘾记忆再巩固机制的深入研究将有助于我们适时的消除成瘾记忆,达到降低复吸的目的。

4 结论

本研究结果显示,吗啡成瘾记忆唤起后伏核壳部(而非核心部)的 NMDAR 以 GluN2B-NMDAR 为主,并且壳部(而非核心部)的 GluN2B-NMDAR 参与了吗啡 CPP 的再巩固过程,为进一步揭示吗啡奖赏记忆再巩固的分子机制提供了参考。

5 参考文献

- [1] Miller CA, Marshall JF. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory [J]. *Neuron*, 2005, 47: 873-884
- [2] Milton AL, Merlo E, Ratano P, et al. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(3): 1109-1115
- [3] Taylor JR, Olausson P, Quinn JJ, et al. Targeting extinction and reconsolidation mechanisms to combat the impact of drug cues

- on addiction [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56(Suppl 1): 186-195
- [4] Goebel DJ, Poosch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 69: 164-170
- [5] Zhai H, Wu P, Chen S, et al. Effects of scopolamine and ketamine on reconsolidation of morphine conditioned place preference in rats [J]. *Behav Pharmacol*, 2008, 19: 211-216
- [6] Wu Y, Li Y, Gao J, et al. Differential effect of NMDA receptor antagonist in the nucleus accumbens on reconsolidation of morphine-related positive and aversive memory in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674: 321-326
- [7] Yu YJ, Huang CH, Chang CH, et al. Involvement of protein phosphatases in the destabilization of methamphetamine-associated contextual memory [J]. *Learn Mem*, 2016, 23(9): 486-493
- [8] Espejo PJ, Ortiz V, Martijena ID, et al. Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process. Involvement of the basolateral amygdala complex [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 109: 349-356
- [9] Crestani AP, Zacouteguy BF, Haubrich J, et al. Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13633
- [10] Ferrer Monti RI, Giachero M, Alfei JM, et al. An appetitive experience after fear memory destabilization attenuates fear retention: involvement GluN2B-NMDA receptors in the basolateral amygdala complex [J]. *Learn Mem*, 2016, 23(9): 465-478
- [11] Kelley JB, Anderson KL, Itzhak Y. Long-term memory of cocaine-associated context: disruption and reinstatement [J]. *Neuroreport*, 2007, 18: 777-780
- [12] Li Y, Ge S, Li N, et al. NMDA and dopamine D1 receptors within NAc-shell regulate IEG proteins expression in reward circuit during cocaine memory reconsolidation [J]. *Neuroscience*, 2016, 315: 45-69
- [13] Sakurai S, Yu L, Tan SE. Roles of hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in amphetamine-produced conditioned place preference in rats [J]. *Behav Pharmacol*, 2007, 18: 497-506
- [14] Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(6): 383-400
- [15] Barria A, Malinow R. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII [J]. *Neuron*, 2005, 48: 289-301
- [16] Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences [J]. *Neuroscientist*, 2013, 19(1): 62-75
- [17] Suvarna N, Borgland SL, Wang J, et al. Ethanol alters trafficking and functional N-methyl-D-aspartate receptor NR2 subunit ratio via H-Ras [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 31450-31459
- [18] Li YJ, Ping XJ, Qi C, et al. Re-exposure to morphine-associated context facilitated long-term potentiation in the vSUB-NAc glutamatergic pathway via GluN2B-containing receptor activation [J]. *Addict Biol*, 2017, 22(2): 435-445
- [19] Narita M, Aoki T, Suzuki T. Molecular evidence for the involvement of NR2B subunit containing N-methyl-D-aspartate receptors in the development of morphine-induced place preference [J]. *Neuroscience*, 2000, 101: 601-606
- [20] Bayer KU, De KP, Leonard AS, et al. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation [J]. *Nature*, 2001, 411: 801-805
- [21] Jongen-Relo AL, Voorn P, Groenewegen HJ. Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat [J]. *Eur J Neurosci*, 1994, 6: 1255-1264
- [22] Voorn P, Brady LS, Berendse HW, et al. Densitometrical analysis of opioid receptor ligand binding in the human striatum - I. Distribution of mu opioid receptor defines shell and core of the ventral striatum [J]. *Neuroscience*, 1996, 75: 777-792
- [23] Zahm DS, Brog JS. On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum [J]. *Neuroscience*, 1992, 50: 751-767
- [24] Ren ZY, Liu MM, Xue YX, et al. A critical role for protein degradation in the nucleus accumbens core in cocaine reward memory [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(5): 778-790
- [25] Xue YX, Luo YX, Wu P, et al. A memory retrieval-extinction procedure to prevent drug craving and relapse [J]. *Science*, 2012, 336: 241-245
- [26] Saladin ME, Gray KM, McRae-Clark AL, et al. A double blind, placebo-controlled study of the effects of post-retrieval propranolol on reconsolidation of memory for craving and cue reactivity in cocaine dependent humans [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013, 226(4): 721-737

收稿日期: 2017-02-15

修回日期: 2017-02-28