

[综述]

影响条件性位置偏爱实验各种因素的研究现状^{*}刘杰 肖琳 李勇辉 隋南^{**}

(中国科学院心理研究所心理健康重点实验室, 北京, 100101)

条件性位置偏爱 (conditioned place preference, CPP) 实验是一种广泛应用于药物奖赏以及药物渴求研究的动物模型。该模型训练周期短, 简单易行, 无药状态的测验能排除药物对测验成绩的干扰。但行为学模型的性质决定了如果不能周密地控制各个变量, 将削弱实验的信度与效度; 许多采用 CPP 模型的实验报告将其结果与以往相似实验的差异简单归因于 CPP 方法的不同, 这一点也值得商榷。而深入了解影响 CPP 的各种因素是正确使用 CPP 模型的前提条件, 因此本文综合近年来以 CPP 为模型的实验研究, 从环境线索、实验设计、药物影响以及试验动物自身等角度对影响 CPP 的各种因素进行了综述。

1 条件性刺激的选择

在 CPP 模型中, 为了最大程度区分两种环境,

实验箱提供了嗅觉、触觉、听觉、视觉、位置觉等多感觉通道的条件刺激。但多线索条件刺激存在的争议是: (1) 环境刺激单独与非条件刺激形成联系还是各种刺激组合成的试验情境与药物的奖赏作用形成联结; (2) 环境刺激的种类还是刺激的有效性在 CPP 的建立过程中起主要作用。因此建立对单一线索的位置偏爱反应更有利于深入研究 CPP 的学习记忆机制, 如 Sante 和 Nobre 等人把 CPP 实验与旷场环境结合, 不同质地地板的触觉差异作为区别环境的唯一线索^[1]。另外, 选用其他种系实验动物也为解决上述问题提供了新思路。研究显示, 以金鱼为实验对象, 可以把一个立方体水箱平均地分为若干象限, 以位置觉建立对药物的 CPP 的反应^[2]; 或者在日本鹌鹑对可卡因的 CPP 实验反应模式中, 由于鸟类发

- 40 Xia Z, Storm DR. Calmodulin - regulated adenylyl cyclases and neuromodulation[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 1997, 7: 391 - 396
- 41 Matsuoka I, Maldonado R, Defer N, et al. Chronic morphine administration causes region - specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA[J]. *Eur J Pharmacol*, 1994, 268: 215 - 221
- 42 Tzavara ET, Monory K, Hanoune J, et al. Nicotine withdrawal syndrome: behavioural distress and selective up - regulation of the cyclic AMP pathway in the amygdala[J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 16(1): 149 - 153
- 43 Jentsch JD, Olausson P, Nestler EJ, et al. Stimulation of protein kinase a activity in the rat amygdala enhances reward - related learning[J]. *Biol Psychiatry*, 2002, 52(2): 111 - 118
- 44 Ying SW, Fetter M, Rosenblum K, et al. Brain - derived neurotrophic factor induces long - term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis[J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 1532 - 1540
- 45 Brunzell DH, Russell DS, Picciotto MR. *In vivo* nicotine treatment regulates mesocorticolimbic CREB and ERK signaling in C57Bl/6 mice[J]. *J Neurochem*, 2003, 84(6): 1431 - 1441
- 46 Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, et al. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning[J]. *J Neurosci*, 2000, 20: 8177 - 8187
- 47 Panagis G, Hildebrand BE, Svensson TH, et al. Selective c - fos induction and decreased dopamine release in the central nucleus of amygdala in rats displaying a mecamlamine - precipitated nicotine withdrawal syndrome[J]. *Synapse*, 2000, 35: 15 - 25
- 48 Cicciocioppo R, Sanna PP, Weiss F. Cocaine - predictive stimulus induces drug - seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: reversal by D₁ antagonists[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1976 - 1981
- 49 Murphy CA, Russig H, Pezze MA, et al. Amphetamine withdrawal modulates FosB expression in mesolimbic dopaminergic target nuclei: effects of different schedules of administration[J]. *Neuropharmacology*, 2003, 44(7): 926 - 939
- 50 Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction[J]. *Science*, 1997, 278: 58 - 63
- 51 Thomas KL, Arroyo M, Everitt BJ. Induction of the learning and plasticity - associated gene Zif268 following exposure to a discrete cocaine - associated stimulus[J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 17(9): 1964 - 1972

收稿日期: 2004 - 04 - 15 修回日期: 2004 - 10 - 08

^{*}本研究受国家重点基础研究项目(课题编号: 2003CB515400)、国家自然科学基金重点项目(30230130, 30170324)、中科院知识创新工程项目(KSCX2 - SW - 204 - 02, KSCX - 2 - 03)资助

^{**}通讯作者: E-mail: suin@psych.ac.cn; Tel: (010) 64850858

达的视觉系统,分别用黄色、绿色以及白色作为三箱式 CPP 箱内壁颜色,使颜色成为区别不同环境的最主要线索^[3]。

2 两侧环境新颖程度的平衡

啮齿类动物倾向于探索新异环境,在新异环境中停留更长时间。CPP 实验多采用药物与生理盐水交错注射的设计,使动物在两侧环境中进行同等次数的条件化学习。但如果药物能够影响动物的学习能力,破坏对环境的习惯化过程,那么在测试时,相比生理盐水侧环境,药物注射侧更为新异,会吸引动物停留更长时间。因此完善的实验设计应该充分考虑学习记忆对于 CPP 结果的影响,例如 Hlinake 在采用 CPP 范式评价谷氨酸受体阻断剂 MK-801 奖赏效应时,考虑到 MK-801 阻断长时程增强效应对 CPP 的干扰,特别又选用高脚十字迷宫(elevated plus maze)模型来探查 MK-801 对学习记忆的影响^[4]。另一种克服新颖因素干扰的方法是采用三箱式 CPP 箱。三箱式 CPP 箱实验发现动物表现出对与苯丙胺、吗啡以及阿扑吗啡相匹配的环境的明显偏爱,而且相对生理盐水侧,动物倾向于在新颖环境中停留更长时间^[5],这也证实了实验环境的相对新颖性的确是一个必须加以重视的变量。

3 实验动物本身的自然偏爱

CPP 实验的核心在于明确动物对药物注射匹配环境的偏爱由药物的奖赏效应引发,但在进行条件化训练前,动物对一侧环境可能已有非条件性偏爱。因此,在正式训练前进行测查非条件性偏爱的前测(pretest)并根据前测的结果设计合理的实验方案被认为能有效控制非条件性偏爱的干扰。前测的基线值是客观解释实验结果的依据,还可筛除非条件化偏爱明显的动物^[6]:在 30 min 前测中,两侧停留时间差异大于 5 min 的动物被筛除^[7]或者 15 min 的前测中任何一侧箱体停留超过 560 s 可被淘汰^[8]。前测曾被认为会引发潜在性抑制,阻碍随后的条件刺激-非条件刺激联结学习,但实验发现,经过了 59 次前测后,动物并未有潜在抑制发生^[3]。值得注意的是,前测并不能完全排除动物的原本偏爱对实验结果的影响,动物的偏爱可能需要在反复与环境接触后才逐渐显露出来。因此,寻找适当的前测次数,使非条件性偏爱表现出来又不会导致潜在性抑制的出现,是一个迫切需要解决的问题。

其次,前测后的实验设计也会影响 CPP 的结

果,有实验发现只有偏倚实验设计才能建立大鼠对尼古丁的 CPP 反应^[9]。多种设计各有利弊,需要根据前测和实验目的灵活使用。平衡化设计指药物可与任何一侧环境匹配,要求前测没有表现非条件性偏爱,这种前测结果较为少见。多数情况下,实验设计需要决定哪一侧环境是给药环境:选择前测中的偏爱侧为给药环境会混淆条件性与非条件性偏爱,并且天花板效应可能会削弱 CPP 效应,不利于实验模型的建立;另一种方法偏倚设计是将药物与前测中的非偏爱侧环境相匹配,以动物对该侧环境厌恶的减弱衡量药物奖赏效应的强弱。偏倚设计的不足之处还在于可能产生假阳性结果,药物的抗焦虑成分会减弱对原本非偏爱的厌恶,而不是药物的奖赏的作用引发了动物的偏爱,此外,厌恶的减弱与奖赏性刺激引发的偏爱是否具有相同的神经机制也没有一致意见。综合来看,更合理的实验安排是抗衡设计—半数动物在前测中的偏爱侧环境接受药物注射,另一半动物在前测中的非偏爱侧环境接受药物注射^[10]。

同样, CPP 行为指标也有多种计量方法。单纯的组间设计忽略了不同处理组间的内在差异,将 CPP 定义为实验组动物在给药侧与对照组在对应环境中停留时间的差异;如果选用组内设计,可以不进行前测,直接把条件化训练后动物在测验时盐水侧环境与药物侧环境停留时间差异作为指标,但忽略了动物非条件性偏爱对实验结果所造成的影响。相比之下,较为科学的方法是不同的实验处理作为组间变量,训练前测试与训练后测试作为组内变量,采用混合设计,对实验数据进行重复测量的多因素方差分析。

4 给药程序的选择

就给药途径来看,对于吗啡,皮下注射较腹腔注射更易形成 CPP,而腹腔注射对海洛因更有效;对于可卡因,静脉给药与腹腔注射无区别,但静脉给药效果好于皮下注射。就剂量而言,虽然 CPP 的表达不存在明显的剂量-效应曲线,但低剂量药物的确不利于 CPP 的建立,高剂量的哌甲酯(methylphenidate, 1.25-20 mg·kg⁻¹)更容易建立起 CPP,低剂量处理(0.31 mg·kg⁻¹)无法建立起 CPP 反应。另外,药物注射的频率也会对 CPP 产生影响,研究发现,每天进行 1 次吗啡注射引起阿片 μ 受体在伏核增多,而每日进行 2 次或 3 次药物注射, μ 受体在伏核、尾壳核以及扣带回皮层都表现出增多。常规给药方式可

以使 C57BL/6J 型和 129/J 型两种小鼠均建立 CPP 反应模式,而“暴用型”(binge)给药方式 - 每小时给予一次 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 吗啡的腹腔注射,持续 3 h,只能使 C57BL/6J 型小鼠建立 CPP^[11]。另外,条件化训练次数的作用并不显著,可能 CPP 的获得仅需 1 - 2 次训练即可完成,但较长训练时间确实有利于 CPP 建立。对于吗啡,每次 45 min 条件化训练要比 20 - 30 min 更加能促进 CPP 的形成。对于测试时间,10 - 15 min 与 20 - 30 min 没有差异,但过长的测试时间反而会引起条件反应的消退^[12]。CPP 反应的建立呈现“全或无”模式:一旦建立后,随着训练天数的增加 CPP 成绩会始终维持在某一水平,不再持续增长。相对于自身给药模型中得到的倒 U 型曲线, CPP 模型得到的多为单向剂量 - 效应曲线,这种简单化的结果明了易懂,有利于做出明确结论,却同时限制了 CPP 的使用范围,使其不适用于解决药理学方面的复杂问题。治疗可卡因成瘾的一种可能途径是寻找与可卡因竞争性结合多巴胺转运体的阻断剂^[13],CPP 模型显然不适用于评价治疗药物对可卡因奖赏效应的阻断作用。而且由于不同药物剂量将只能作为组间变量处理,因此限制了一个实验中可以选择的剂量水平;此外, CPP 程序决定了只能在测验日才能得到对预期效应的检验,在前期的多次条件化训练中无法根据动物的反应及时调整剂量。

5 不同实验动物间的差异

实验动物的性别、年龄、饲养环境以及条件化训练时的身体状态都可能会影响 CPP 的获得。性别差异对可卡因奖赏效应影响的实验研究发现,大鼠对 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的可卡因均可以建立 CPP,大鼠需要 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可卡因处理;即使在同一剂量组中,大鼠只需要 4 次训练就建立 CPP 反应,大鼠需要 8 次训练,表明大鼠对可卡因奖赏效应更为敏感;肾上腺切除手术并未改变上述性别反应差异,提示大鼠对可卡因奖赏效应的高敏感性并不完全由下丘脑 - 腺垂体 - 肾上腺轴控制,性别差别可能有其它机制,比如下丘脑 - 腺垂体 - 性腺轴等^[14]。Vastola 发现同样的实验处理可以使青龄而不是成龄 Sprague - Dawley 大鼠建立对尼古丁的 CPP^[15]。本实验室的研究也发现,高、低两种新颖寻求的青龄大鼠获得 CPP 反应的差异在成龄大鼠并不明显^[16]。另有研究证明饲养环境也会影响动物 CPP 效应:大鼠单笼饲养 1 - 2 周后,社会隔离情境使大鼠体内 5 - 羟色胺 (5 - HT) 水平下降,在经

过 4 个轮次共 8 d 的条件化训练后,单独饲养的动物比群居饲养(每笼 10 只)表现出更显著的 CPP 效应;但隔离 3 周的大鼠没有表现出高易感性,可能机制是神经系统的适应使 5 - HT 水平得到恢复^[17]。CPP 训练前的用药史也会影响 CPP 的建立,有研究连续给予大鼠大剂量吗啡 ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 或者 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每天 1 次,共 3 d),诱发动物出现耐受后再进行条件化训练,发现耐受状态将会阻碍对低剂量吗啡 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的条件化建立过程^[18]。

6 动物的主动逃避反应

在 CPP 训练中生理盐水注射是必要的,否则在测试当天,一侧环境对动物将会是完全新颖的。但是,Barbo 指出在 CPP 训练过程中,可能同时建立起两种学习过程:在药物注射侧内,环境信号 (CS+) 与药物奖赏作用形成联结,以及在盐水注射侧,环境线索 (CS-) 与非奖赏性刺激形成联结^[19]。动物在伴药侧环境中形成了对奖赏刺激的趋近反应,在非药物匹配侧环境中同时形成了对非奖赏性刺激的条件性回避反应。尽管 CPP 测验的结果在统计检验上是显著的,但结果本身不但包括了对伴药侧环境的趋近,还包括了对非伴药侧环境的主动回避,是两种反应的综合结果。如何剔除主动回避反应对 CPP 的增强作用,目前尚缺乏有效的实验方法。

7 结语

随着对 CPP 模型的深入认识, CPP 更进一步被划分为获得、保持以及戒断后的复吸等不同阶段,因此适用于成瘾过程中由偶然到强迫性用药的各阶段的研究。同时,技术改进也拓展了 CPP 适用范围行为敏感化一直被认为与 CPP 作用于相同的神经环路 - 中脑边缘多巴胺系统。随着对动物在 CPP 实验环境中停留时间和活动距离两种行为指标同时监测技术的诞生^[20],已有相当数量的实验结果报告条件性位置偏爱与行为敏感化的分离。最近的损毁研究表明伏核中央区与激发行为敏感化有关,而内侧壳区与奖赏作用有关^[21]。综上所述,尽管 CPP 正成为研究药物精神依赖性的主要行为学模型,但多种潜在因素都会对 CPP 产生影响,诸如实验动物、药物剂量、给药途径、实验箱的选择、条件线索的设立,都应该在参照以往实验经验的基础上,结合前测结果,合理进行实验设计,使条件性位置偏爱实验更准确地应用到药物成瘾研究中。

8 参考文献

- 1 Sante AB, Nobre MJ, Brandao ML. Place aversion induced by blockade of mu or activation of kappa opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter[J]. *Behav Pharmacol*, 2000, 11: 583 - 589
- 2 Coelho JL, Medalha CC, Mattioli R. Analysis of the effects of CPA and L-histidine on goldfish tested on a conditioned place preference model[J]. *Behav Brain Res*, 2001, 124: 161 - 165
- 3 Levens N, Akins CK. Cocaine induces conditioned place preference and increases locomotor activity in Japanese quail[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2001, 68: 71 - 80
- 4 Hlinak Z, Krejci I. Oxiracetam prevents the MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice[J]. *Behav Brain Res*, 2000, 117: 147 - 151
- 5 Parker LA. Place conditioning in a three- or four-choice apparatus: role of stimulus novelty in drug-induced place conditioning[J]. *Behav Neurosci*, 1992, 106: 294 - 306
- 6 Mueller D, Stewart J. Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction[J]. *Behav Brain Res*, 2000, 115(1): 39 - 47
- 7 Tan SE. Impairing the amphetamine conditioning in rats through the inhibition of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity[J]. *Neuropharmacology*, 2002, 42(4): 540 - 547
- 8 Meririnne E, Kankaanpää A, Seppälä T. Rewarding properties of methylphenidate: sensitization by prior exposure to the drug and effects of dopamine D₁- and D₂-receptor antagonists[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(2): 539 - 550
- 9 Tzschentke TM, Schmidt WJ. Interaction of MK-801 and GYKI52466 with morphine and amphetamine in place preference conditioning and behavioral sensitization[J]. *Behav Brain Res*, 1997, 84: 99 - 107
- 10 Laviolette SR, van der Kooy D. GABA(A) receptors in the ventral tegmental area control bidirectional reward signaling between dopaminergic and non-dopaminergic neural motivational systems[J]. *Eur J Neurosci*, 2001, 13(5): 1009 - 1115
- 11 Zhong Y, Mantsch JR, Schlussman SD, et al. Conditioned place preference after single doses or binge cocaine in C57BL/6J and 129J mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 73: 655 - 662
- 12 Bardo MT, Rowlett JK, Harris MJ. Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1995, 19: 39 - 51
- 13 Matsumoto RR, Liu Y, Lerner M, et al. Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 469: 1 - 12
- 14 Russo SJ, Jenab S, Fabian SJ, et al. Sex differences in the conditioned rewarding effects of cocaine[J]. *Brain Res*, 2003, 970(1-2): 214 - 220
- 15 Vastola BJ, Douglas LA, Varlinskaya EI, et al. Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rats[J]. *Physiol Behav*, 2002, 77(1): 107 - 114
- 16 Zheng XG, Ke X, Tan BP, et al. Susceptibility to morphine place conditioning: relationship with stress-induced locomotion and novelty-seeking behavior in juvenile and adult rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 75: 929 - 935
- 17 Meyer A, Mayerhofer A, Kovar KA, et al. Rewarding effects of the optical isomers of 3,4-methylenedioxy-methylamphetamine ('Ecstasy') and 3,4-methylenedioxy-ethylamphetamine ('Eve') measured by conditioned place preference in rats[J]. *Neurosci Letters*, 2002, 330(3): 280 - 284
- 18 Zarrindast MR, Faraji N, Rostami P, et al. Cross-tolerance between morphine- and nicotine-induced conditioned place preference in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 74(2): 363 - 369
- 19 Bardo MT, Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? [J]. *Psychopharmacology*, 2000, 153: 31 - 43
- 20 Brockwell NT, Ferguson DS, Beninger RJ. A computerized system for the simultaneous monitoring of place conditioning and locomotor activity in rats[J]. *J Neurosci Methods*, 1996, 64: 227 - 232
- 21 Sellings LH, Clarke PB. Segregation of amphetamine reward and locomotor stimulation between nucleus accumbens medial shell and core[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(15): 6295 - 6230

收稿日期:2004-08-15

修回日期:2004-12-03