

Research on changes of adenylate cyclase in cerebral regions related to morphine dependence in rats

嗎啡依賴鼠成癮相關腦區腺苷酸環化酶的變化研究*

洪仕君^[1] 李俊麟^[2] 李利華^[1] 瞿勇強^[1] 趙永和^[1]

^[1] 昆明醫學院法醫學院

^[2] 昆明市公安局官渡分局

Hong Shi-jun^[1] Li Jun-lin^[2] Li Li-hua^[1] Qu Yong-qiang^[1] Zhao Yong-he^[1]

^[1] Faculty of Forensic Medicine, Kunming Medical College

^[2] Guandu Branch of the Public Security Bureau of Kunming City

摘要

目的: 觀察嗎啡依賴鼠成癮相關腦區腺苷酸環化酶的變化並探討腺苷酸環化酶的變化與嗎啡依賴機制的關係。**方法:** 建立嗎啡依賴大鼠模型，應用酶組織化學方法對嗎啡依賴鼠七個相關腦區腺苷酸環化酶的變化進行觀察。**結果:** 嗎啡依賴組與空白對照組比較，腺苷酸環化酶含量升高。嗎啡依賴組之間兩兩比較，嗎啡依賴一周組與兩周組、四周組、八周組之間有顯著性差異；嗎啡依賴兩周組與四周組、八周組之間有顯著性差異。**結論:** 嗎啡成癮相關七個腦區腺苷酸環化酶含量隨嗎啡依賴時限的延長有增加的趨勢。提示嗎啡依賴機制與特定腦區腺苷酸環化酶的含量變化有密切關係。

關鍵字 嗎啡依賴 成癮相關腦區 腺苷酸環化酶

* 雲南省自然科學基金資助專案：專案編號 2001C0045M

Abstract

Objective: To establish models of morphine-dependent rats, observe the changes of adenylate cyclase (AC) in cerebral regions related to morphine dependence in rats. Then investigate the relationship between the enzymological changes in seven cerebral regions related to morphine dependence and the mechanism of morphine dependence. **Method:** Models of morphine-dependent rats were established. The technique of enzyme-histochemistry was used to detect the variations of AC in seven special cerebral regions related to morphine dependence. **Results:** The major enzymological changes in the seven regions related to morphine dependence were as follows: compared with the control group, the content of AC in the morphine-dependent groups increased. There were significant differences among these groups. Comparisons of the four morphine-dependent groups with each other revealed that the content of AC was significantly different between 1 week and 2 weeks, 4 weeks, and 8 weeks of morphine dependence; and between 2 weeks and 4 weeks, and 8 weeks of morphine dependence. **Conclusion:** Results show that the content of AC increased in these regions. The mechanism of morphine dependence was closely related to the increase of AC.

[Key words] morphine-dependent, cerebral regions related to morphine-dependence, adenylate cyclase

本研究以嗎啡依賴鼠大腦七個成癮相關腦區額葉皮質、豆狀核、杏仁核、黑質、海馬、中腦導水管周圍灰質、藍斑為研究重點，建立嗎啡依賴大鼠模型，觀察嗎啡依賴大鼠戒斷症狀並評分；對七個腦區的腺苷酸環化酶的變化採用光鏡酶組織化學方法進行觀察，對不同依賴時限七個成癮相關腦區腺苷酸環化酶的變化進行實驗研究。探討嗎啡依賴大鼠腺苷酸環化酶變化與依賴機制的關係，為進一步闡明嗎啡依賴和戒斷的機制提供新的依據，為脫癮戒斷治療和藥物的開發和研製提供客觀的毒理病理學資料。

1 材料與方法

1.1 實驗動物

健康 SD 大鼠 60 隻，體重 $260 \pm 20\text{g}$ ，雌雄各半，由昆明醫學院實驗動物中心提供。按隨機分組原則，分為嗎啡依賴組 (N) 和空白對照組 (n)；嗎啡依賴組又分為嗎啡依賴一周組 (N1)，嗎啡依賴二周組 (N2)，嗎啡依賴四周組 (N3)，嗎啡依賴八周組 (N4) 四個亞組。即實驗大鼠共分 5 組，每組 12 隻，分籠餵養，自由攝食、飲水。觀察其活動、攝食量、飲水量、大便等情況。

1.2 實驗方法

1.2.1 嗎啡依賴模型的建立 嗎啡依賴組大鼠按逐日遞增原則，背部皮下注射鹽酸嗎啡，每天注射3次（8：00，12：00，16：00），連續注射5天。每次注射劑量依次為：第1天5mg.Kg-1；第2天10mg.Kg-1；第3天20mg.Kg-1；第4天40mg.Kg-1；第5天50mg.Kg-1。每次注射前嚴格消毒，用一次性注射器注射，每天稱體重一次。空白對照組注射相同劑量的生理鹽水。四組嗎啡依賴大鼠於第6天每組隨機選取2隻於嗎啡注射前2小時皮下注射鹽酸

納洛酮5mg.Kg-1進行催促試驗誘發戒斷症狀並給予評分，空白對照組給予同樣處理並給予評分。確認嗎啡依賴後，嗎啡依賴1周組、嗎啡依賴2周組、嗎啡依賴4周組、嗎啡依賴8周組分別給予30mg.Kg-1鹽酸嗎啡背部皮下注射，一天一次，連續注射1周、2周、4周、8周，建立四個不同時段的嗎啡依賴大鼠模型。參照 Blasig J等（1973），Wei E T等（1981）和 Maldonade R等（1992）的方法觀察和評價各組大鼠的戒斷症狀。

1.2.2 灌注固定和取材 大鼠於末次給藥3小時後用戊巴比妥鈉50mg.kg-1進行麻醉後開胸，打開心包，在右心房做一切口，再在左心室心尖部做一切口，插入灌注插管，進行主動脈插管灌注；先快速灌注每100mL含氯化鈉0.85g、氯化鉀0.025g、碳酸氫鈉0.02g的血管沖洗液200-250mL，再用含0.5%戊二醛、4%多聚甲醛和100m mol.L-1磷酸緩衝液（pH7.2）300mL進行灌注固定，開顱，取腦並參照鼠腦立體定位圖譜，用鋒利刀片分別取額葉皮質、豆狀核、杏仁核、黑質、海馬、中腦導水管周圍灰質、藍斑七個腦區組織，用於腺苷酸環化酶光鏡酶組織化學檢測。

1.2.3 酶組織化學染色與光鏡、電鏡觀察 採用硝酸鉛法（Fujimoto等,1981）來檢測腺苷酸環化酶。其原理腺苷酸環化酶分解腺苷酰亞胺二磷酸（AMP-PNP），在產生cAMP的同時產生亞胺二磷酸，用鉛離子捕捉亞胺二磷酸形成亞胺二磷酸鉛而沉著於反應部位。

檢測方法

反應液配製：總量約10mL，pH7.4。100m mol.L-1Tris⁺順丁烯二酸緩衝液（pH7.4）8mL，AMP⁺PNP2.6mg，茶鹼3.6mg，80m mol.L-1硫酸鎂0.5mL，左旋米唑6.02mg，20m mol.L-1硝酸鉛1.0mL，氯化鈉8.4mg，二甲亞砷0.5mL，蔗糖0.8g。

固定：將已切好的各部位組織片，單獨用2%多聚甲醛浸泡固定15分鐘。

洗淨：用含8%蔗糖，5%(V/V)二甲亞碸，pH7.4的100m mol.L⁻¹二甲胂酸緩衝液洗數次（每洗一次換一次液體），洗1小時。

切片製作：製成20 μm冷凍切片用於光鏡酶組織化學檢測。

反應：切片用上述反應液浸泡60分鐘（37℃恒溫水浴，保濕盒內），每20分鐘更換一次反應液，共更換反應液2次。

反應後的處理：反應結束後，用蒸餾水洗切片數次；切片在1%黃色乃至無色硫化銨水溶液中浸泡2分鐘，顯色後再用蒸餾水漂洗；用甘油或明膠封片；觀察結果。

對照：採用抽提底物的方法。

陽性結果：棕褐色沉澱為腺苷酸環化酶陽性產物。

1.2.4 結果處理 利用HPIAS高清晰度彩色病理圖文報告分析系統分別測定空白對照組、嗎啡依賴1周組、嗎啡依賴2周組、嗎啡依賴4周組、嗎啡依賴8周組七個不同腦區酶反應產物的灰度值，所得資料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用方差分析q檢驗分別比較同一依賴時段不同腦區之間酶學水平的變化、不同依賴時段同一腦區之間酶學水平的變化。

2 結果

2.1 嗎啡依賴大鼠模型的建立、戒斷症狀與評分

通過對實驗大鼠戒斷症狀的觀察，發現嗎啡依賴組大鼠各種可數戒斷症狀表現顯著，且發生次數明顯多於對照組（結果見表1），經過統計學t檢驗，具有顯著性差異($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)，證明已成功建立嗎啡依賴大鼠模型。

表 1 嗎啡依賴大鼠可數戒斷症狀觀察結果

症狀	嗎啡依賴組 (n) 次數	空白對照組 (n) 次數
濕狗樣顫抖	7.13 ± 0.93*	0.75+0.66
伸展	12.13 ± 0.78**	0.75+0.43
清理皮毛	6.13 ± 1.45**	0.63+0.48
吞咽	8.63 ± 1.32**	0.88+0.33
站立	8.50 ± 2.18**	0.87+0.33
跳躍	4.38 ± 1.11*	0.51+0.50
齒顫	8.13 ± 1.76*	0.25+0.43

(注：* P < 0.05, ** P < 0.01 依賴組與對照組 t 檢驗。)

2.2 光鏡觀察結果 染色結果分為四級：強陽性（+++）：可見棕褐色的沉積物，較多而密集；陽性（++）：可見棕褐色沉積物，相對較少；弱陽性（+）：可見少數棕褐色沉積物；陰性（-）：未見沉積物。

空白對照組：呈弱陽性（+），可見少量散在棕褐色顆粒，分佈於細胞漿和細胞膜（圖 1）。

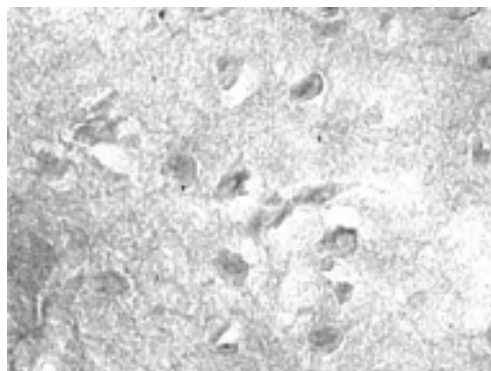


圖 1：空白對照組大鼠海馬腺苷酸環化酶呈弱陽性（+），細胞漿和細胞膜可見散在棕褐色顆粒。（硝酸鉛法 × 400 倍）

嗎啡依賴 1 周組：呈弱陽性（+）- 陽性（++），可見散在棕褐色顆粒，量較空白對照組稍多，分佈於細胞漿和細胞膜（圖 2）。

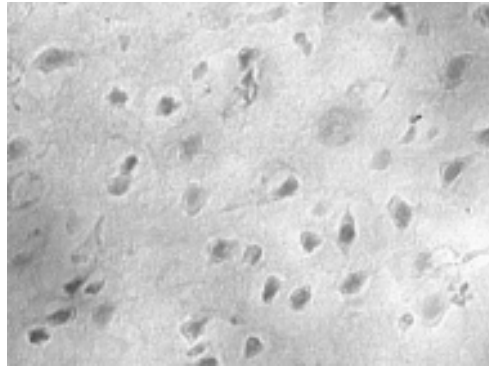


圖 2：嗚啡依賴 1 周組人鼠豆狀核的腺苷酸環化酶呈陽性（++），細胞漿和細胞膜可見散在棕褐色顆粒。（硝酸鉛法 × 400 倍）

嗚啡依賴 2 周組：呈陽性（++），可見散在棕褐色顆粒，分佈於細胞漿和細胞膜（圖 3）。

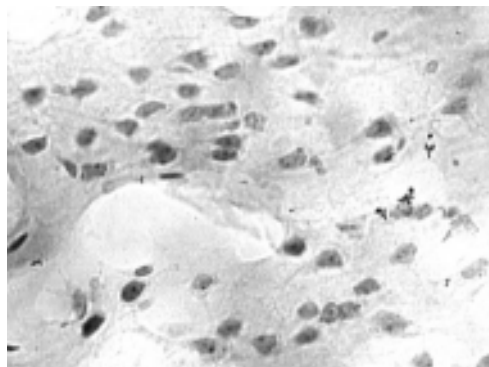


圖 3：嗚啡依賴 2 周組人鼠額葉皮質的腺苷酸環化酶呈陽性（++），細胞漿可見散在棕褐色顆粒。（硝酸鉛法 × 400 倍）

嗚啡依賴 4 周組：呈陽性（++）- 強陽性（+++），可見多量棕褐色顆粒，分佈於細胞漿和細胞膜（圖 4）。

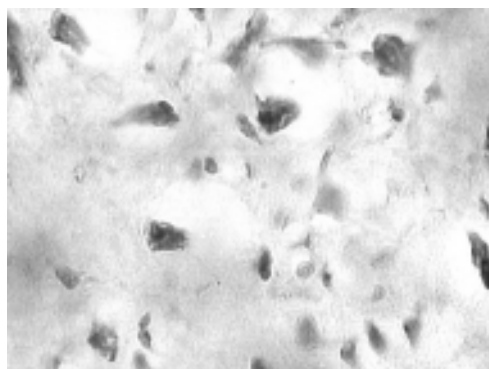
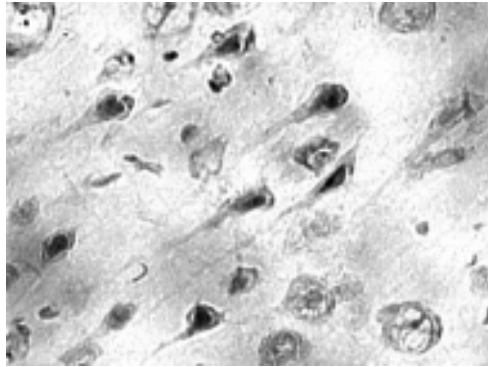


圖 4：嗚啡依賴 4 周組人鼠杏仁核的腺苷酸環化酶呈陽性（++）- 強陽性（+++），細胞漿和細胞膜可見多量散在棕褐色顆粒。（硝酸鉛法 × 400 倍）



嗎啡依賴8周組：呈強陽性（+++），可見多量密集棕褐色顆粒，分佈於細胞漿和細胞膜（圖5）。

圖5：嗎啡依賴8周組大鼠豆狀核的腺苷酸環化酶呈強陽性（+++），細胞漿和細胞膜可見多量密集棕褐色顆粒。（硝酸鉛法 × 400倍）

陰性對照：腺苷酸環化酶染色，未見陽性反應產物（圖6）。

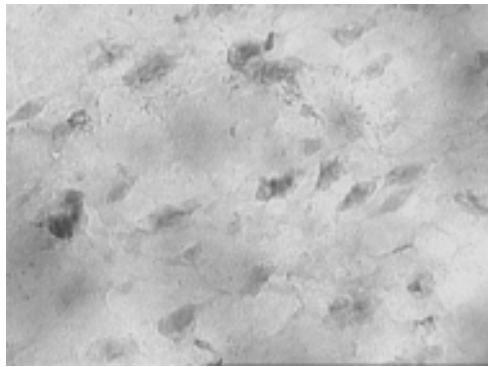


圖6：陰性對照的杏仁核腺苷酸環化酶染色呈陰性（-），細胞漿未見陽性反應產物。（硝酸鉛法 × 400倍）

2.3 圖像分析結果

對照組和四個嗎啡依賴亞組腺苷酸環化酶的檢測結果採用HPIAS彩色病理圖文報告分析系統測定灰度值（見表2）。測定結果用SPSS統計套裝軟體進行統計學處理（見表3、表4）。

表 2 腺苷酸環化酶的灰度值結果

組別	部位 1	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5	部位 6	部位 7
對照組	204.73 6.86	197.90 8.95	208.35 8.26	198.55 2.89	210.23 5.42	193.20 3.78	207.23 10.21
依賴一周組	196.23 1.46	184.68 11.22	197.80 20.55	189.13 1.41	195.30 17.48	182.30 10.14	196.30 11.93
依賴二周組	185.95 1.51	175.60 6.71	186.40 4.74	178.15 19.86	180.50 11.08	172.53 11.32	184.33 6.07
依賴四周組	177.38 18.23	170.23 43.28	183.67 5.97	148.15 6.05	165.35 3.93	170.78 8.72	174.15 4.97
依賴八周組	168.17 9.12	165.83 7.99	170.30 5.14	125.90 3.51	153.80 9.46	168.45 12.66	173.28 4.92

(注：部位 1 代表中腦導水管周圍灰質，部位 2 代表豆狀核，部位 3 代表海馬，部位 4 代表黑質，部位 5 代表藍斑，部位 6 代表額葉皮質，部位 7 代表杏仁核。)

表 3 腺苷酸環化酶灰度結果 t 檢驗結果 (不同依賴時段不同腦區比較)

對照組號	P 值
N1 與 N2	< 0.01
N1 與 N3	< 0.01
N1 與 N4	< 0.01
N1 與 n	< 0.01
N2 與 N3	< 0.05
N2 與 N4	< 0.05
N2 與 n	< 0.05
N3 與 N4	< 0.05
N3 與 n	< 0.01
N4 與 n	< 0.01

(注：n 代表對照組，N1 代表依賴 1 周組，N2 代表依賴 2 周組，N3 代表依賴 4 周組，N4 代表依賴 8 周組。)

表 4 腺苷酸環化酶灰度變化方差分析 q 檢驗結果 (LSD 法)

(同一腦區不同依賴時段兩兩比較 P 值表)

對照組號	P 值						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
N1 與 N2	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.05
N1 與 N3	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.05
N1 與 N4	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01
N1 與 n	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
N2 與 N3	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.05
N2 與 N4	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01
N2 與 n	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.01
N3 與 N4	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.05
N3 與 n	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01
N4 與 n	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01

(注：P1 代表中腦導水管周圍灰質，P2 代表豆狀核，P3 代表海馬，P4 代表黑質，P5 代表藍斑，P6 代表額葉皮質，P7 代表杏仁核。)

經統計學分析，同一腦區不同依賴時段比較結果：腺苷酸環化酶空白對照組與嗎啡依賴 1 周組、2 周組、4 周組和 8 周組比較，具有顯著性差異；嗎啡依賴 1 周組與 2 周組、4 周組、8 周組比較有顯著性差異；依賴 2 周組與 8 周組有顯著性差異；而嗎啡依賴 2 周組與 4 周組、4 周組與 8 周組比較無顯著性差異。就某一腦區而言，除豆狀核和額葉皮質兩個腦區 2 周組與 4 周組、4 周組與 8 周組比較無顯著性差異，海馬 2 周組與 4 周組、杏仁核 4 周組與 8 周組比較無顯著性差異之外，其餘腦區之間均有顯著性差異。

經統計學分析，同一依賴時段不同腦區（七個腦區）之間比較，四個時段不同腦區間均有顯著性差異 ($p < 0.01$)。嗎啡依賴 1 周組除中腦導水管周圍灰質與黑質比較，豆狀核與額葉皮質、杏仁核比較，海馬與額葉皮質、杏仁核比較無顯著性差異以外，其餘腦區之間比較均有顯著性差異 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。嗎啡依賴 2 周組除中腦導水管周圍灰質與額葉皮質、杏仁核比較，豆狀核與海馬、杏仁核比較，黑質與額葉皮質比較無顯著性差異以外，其餘腦區之間比較均有顯著性差異 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。嗎啡依賴 4 周組除中腦導水管周圍灰質與海馬比較，豆狀核與海馬、黑質比較，額葉皮質與

杏仁核比較無顯著性差異以外，其餘腦區之間比較均有顯著性差異 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。嗎啡依賴 8 周組除中腦導水管周圍灰質與杏仁核比較，豆狀核與中腦導水管周圍灰質比較，海馬與杏仁、中腦導水管周圍灰質比較無顯著性差異以外，其餘腦區之間比較均有顯著性差異 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。

3 討論

腺苷酸環化酶(adenylate cyclase, AC)催化ATP生成cAMP,而cAMP是蛋白質和肽類激素等對靶細胞作用的第二信使。腺苷酸環化酶是目前研究較多的與嗎啡依賴有關的酶類之一。目前認為，在許多細胞和神經組織中，阿片類物質的急性作用可通過啟動與G_i蛋白耦聯的阿片受體而抑制腺苷酸環化酶活性，降低細胞基礎cAMP水平，而其慢性作用則可能引起AC/cAMP系統的上調。這一系統的上調可能是阿片耐受和依賴的重要機制。與嗎啡依賴有關的腦區中對藍斑的研究較為深入。八十年代已有學者發現嗎啡長時作用可使大鼠藍斑AC活性及cAMP含量明顯升高。而Nestler等(1994)的研究則表明嗎啡耐受大鼠藍斑蛋白激酶A (protein kinase A, PKA) 活性升高，提示AC/cAMP-PKA系統的增強可能是嗎啡依賴的生化基礎。Rasmussen K等(1999)的研究表明，嗎啡戒斷大鼠藍斑神經細胞活性增強與動物表現出的戒斷症狀有關，並且認為G蛋白和cAMP系統的上調與藍斑神經細胞的活性增強有關。Jolas T等(2000)研究表明在慢性嗎啡作用下中縫背核的五羥色胺能神經元的 γ -氨基丁酸(GABA)水平升高，同時伴隨有cAMP系統的上調。1997年，Lane-Ladd S B等(1997)首次用藍斑內注射cAMP反應元件結合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)反義寡核酶酸的方法闡明了此種轉錄因數在嗎啡誘導的cAMP通路上調中的重要作用。首次獲得了CREB在藍斑介導了cAMP通路的上調的直接證據，而這種上調作用與嗎啡產生的軀體依賴有直接關係。眾多學者認為調控阿片身體依賴性的部位不只局限于藍斑，可能還存在於其他未知領域。中樞神經系統的其他部位也發現了cAMP系統的上調，Tewilliger R Z等(1991)發現脊髓背根神經節(dorsal root ganglion/spinal cord, DRG/SC)同樣有AC、PKA活性增強的情況。但是對於其他公認與嗎啡的軀體依賴和精神依賴有關的腦區腺苷酸環化酶的變化缺乏系統的研究資料。

我們的研究發現，除了藍斑以外，其他六個成癮相關腦區(額葉皮質、豆狀核、杏仁核、黑質、海馬、中腦導水管周圍灰質)同樣存在腺苷酸環化酶活性增加的情況。進一步印證了調控嗎啡的軀體依賴性還有其他腦區部位的假設。我們的研究結果表明嗎啡依賴大鼠七個成癮相關腦區腺苷酸環化酶均呈活性增加的情況，並隨著依賴時限的延長而增加。提示隨著嗎啡依賴時限的延長，腺苷酸環化酶的活性呈現逐漸上升的趨勢，此結果與文獻報道一致。腺苷酸環化酶活性的增強，使cAMP的含量也相應升高，由此導致AC/cAMP-PKA系統上調，引起細胞內生化過程發生一系列的繼發性改變，導致了嗎啡的軀體性依賴的發生。



研究發現，腺苷酸環化酶空白對照組與嗎啡依賴 1 周組、2 周組、4 周組和 8 周組比較，具有顯著性差異；嗎啡依賴 1 周組與 2 周組、4 周組、8 周組比較有顯著性差異；依賴 2 周組與 8 周組有顯著性差異；而嗎啡依賴 2 周組與 4 周組、4 周組與 8 周組比較無顯著性差異。就某一腦區而言，除豆狀核和額葉皮質兩個腦區 2 周組與 4 周組、4 周組與 8 周組比較無顯著性差異，海馬 2 周組與 4 周組、杏仁核 4 周組與 8 周組比較無顯著性差異之外，其餘腦區之間均有顯著性差異。此研究結果提示嗎啡依賴形成後，腺苷酸環化酶的活性即開始增加，但並不是呈直線上升，在依賴 2-4 周、4-8 周兩個時段呈平緩升高的趨勢，而且在不同腦區的變化也有所差別。腺苷酸環化酶的活性升高涉及了成癮相關的所有七個腦區，由此提示腦內腺苷酸環化酶的變化不僅是嗎啡軀體依賴的基礎，而且是精神依賴的基礎。

方芳等（2000）對嗎啡依賴小鼠腦組織的研究結果表明，嗎啡依賴小鼠紋狀體、海馬及大腦皮質 AC 活性、cAMP 含量和可溶相蛋白激酶 A(PKA) 活性明顯增加，給嗎啡前在腦室注射 PKA 抑制劑可抑制嗎啡依賴的產生。據此推測嗎啡依賴時腦組織存在 AC/cAMP-PKA 系統的上調，此變化由阿片受體所介導；PKA 可通過影響 AC 的磷酸化狀態使 AC 活性升高，造成嗎啡長時作用下 AC/cAMP 系統的正反饋調節，這可能是嗎啡依賴機制中的重要環節。

根據上述學者的研究和我們的研究結果，腺苷酸環化酶在嗎啡依賴和戒斷中起到重要作用，在嗎啡依賴時其活性呈上升的趨勢，並且引起 cAMP 水平升高，導致 AC-cAMP-PKA 系統的上調，是嗎啡依賴和戒斷機制中的重要環節。下一步的研究工作應放在闡明此系統上調的具體生化過程上，闡明此機制對於嗎啡依賴的治療和相應藥物的開發具有重要意義。

參考文獻

- Blasig J, Herz A, Reinhold K, et al (1973). Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome on rats. *Psychopharmacologia (Berl.)*. 33: 19~38
- 方芳，汁青，曹清等：〈嗎啡依賴小鼠腦組織 cAMP 系統的變化及腺苷酸環化酶磷酸化調節〉，《中國醫學科學院學報》，第 22 卷，第 1 期（2000），頁 14~19
- Fujimoto K, Toibana M and Ogawa K. (1981). *Acta Histochem. Cytochem.* 14,678
- Jolas T, Nestler E J, Aghajanian G K(2000). Chronic morphine increase GABA tone on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus: association with an up-regulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroscience.* 95(2): 433~443
- Lane-Ladd S B, Pineda J, Boundy V A, et al(1997). CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J Neurosci.*17(20): 7890~7901
- Maldonado R, Negus S, Koob G F (1992). Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-delta-and-kappa-selective opioid antagonists. *Neuro- pharmacology* . 31(12): 1231~1235
- Nestler E J, Alreja M, Aghajanian G K (1994). Molecular and cellular mechanisms of opiate action: studies in the rat locus coeruleus. *Brain Res Bull.* 35: 521~528

Rasmussen K, Beitner-Johnson D B, Krystal, J H, et al(1999). Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J Neurosci*,10(7): 2308~2317

Tewilliger R Z, Beitner-Johnson D, Sevarino K A, et al(1991). A general role for adaptations in G-protein and the cyclic AMP system in mediating the chronic action of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res.* 548: 100~110

Wei E T(1981). Pharmacological aspects of shaking behavior produced by TRH, AG-3-5, and morphine withdrawal. *Federation Proc.* 40: 1491~1496