文章编号:1000-5404(2005)21-2135-04

论著

吗啡长时程作用对培养 SK-N-SH 细胞表达 *fosB* 基因的影响

苏彦君,张国忠,丛 斌,张 瑾,李淑瑾,姚玉霞,付丽红 (河北医科大学法医学教研室, 石家庄 050017)

提 要: 目的 探讨吗啡长时程作用时 SK-N-SH 细胞 *fosB* 基因表达的改变。**方法** 建立慢性吗啡依赖 SK-N-SH 细胞模型,分别采用放射免疫法 (radioimmunoassay, RIA)、电泳迁移率改变分析(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)和 RT-PCR 检测 cAMP(cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate)、CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein) 的 DNA 结合活性和 *fosB* mRNA 表达。**结果** 吗啡长时程作用 SK-N-SH 细胞 CREB 的 DNA 结合活性及 *fosB* mRNA 水平升高。**结论** 吗啡长时程作用诱导 SK-N-SH 细胞 *fosB* 基因表达上调可能通过 CREB 的 DNA 结合活性升高而调控。

关键词: 吗啡;SK-N-SH 细胞;CREB;*fosB*

中图法分类号: R394.2; R749.610.2; R996 **文献标识码**: A

Effects of long-term morphine on the expression of *fosB* gene in *in vitro* cultured SK-N-SH cells

SU Yan-jun, ZHANG Guo-zhong, CONG Bin, ZHANG Jin, LI Shu-jin, YAO Yu-xia, FU Li-hong (Department of Forensic Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of long-term morphine on the expression of *fosB* gene in cultured SK-N-SH cells. **Methods** Morphine-dependent SK-N-SH cells were established by culturing SK-N-SH cells with morphine for 48 h, then divided into morphine-dependent group and naloxone-withdrawn group in which the morphine-dependent SK-N-SH cells were treated with 10 μmol/L naloxone for 15 min. The SK-N-SH cells cultured with physiological saline served as normal control group. The intracellular cAMP, the DNA-binding activity of CREB, and the expression of *fosB* mRNA were detected by radioimmunoassay (RIA), electrophoresis mobility shift assay (EMSA), and RT-PCR respectively. **Results** The intracellular cAMP, the DNA-binding activity of CREB, and *fosB* mRNA were significantly elevated in morphine-dependent and naloxone-withdrawn SK-N-SH cells. **Conclusion** The upregulation of *fosB* mRNA in SK-N-SH cells treated with long-term morphine may be mediated through the activation of the DNA-binding activity of CREB.

Key words: morphine; SK-N-SH cell; CREB; *fosB*

外源性阿片类滥用已成为日益严重的社会问题,戒除阿片类依赖为人类社会面对的重要难题之一。由于对阿片类依赖的分子机制尚未阐明,故缺乏有效的戒除手段,尤其对于精神依赖。近来在药物依赖中受到密切关注的 ΔfosB 被认为是一种持续表达的分子开关,可使急性药物反应逐步转化成相对稳定的适应状态,造成药物成瘾时长期的神经元和行为可塑性改变[1]。ΔfosB 为 *fosB* 基因产物,该基因受 CREB 调控[1~3]。在 SK-N-SH 细胞,吗啡长时程作用时 *fosB* 基因表达变化的研究在国内外少见报道。

本实验研究了在吗啡长时程作用的人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞株 CREB 的 DNA 结合活性以及 *fosB* mRNA 表达的改变,为从基因调控水平探讨吗啡依赖的分子机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器设备

SK-N-SH 细胞株 (中国典型培养物保藏中心), 盐酸吗啡 (10 mg/ml, 批号:020909; 沈阳第一制药厂), 盐酸纳络酮、L-谷胺酰胺和 MEM 培养基 (Sigma 公司,美国); Gel-shift Assay

基金项目:河北省卫生厅跟踪项目(2002-320)
Supported by the Funds for Item Traced by Health Department of Hebei Province(2002-320)

作者简介:苏彦君 (1967-), 女,河北省赵县人,硕士,讲师,主要从事阿片类依赖分子机制方面的研究。电话:(0311) 6266502, E-mail: dfz941019@yahoo.com.cn

通讯作者:丛 斌,电话:(0311) 6265602; E-mail: bincong@263.net

收稿日期:2004-07-05;**修回日期**:2004-11-20

System、AMV-RT 和 Taq DNA polymerase（Promega 公司，美国）；*fosB* 及 β-actin 引物（上海 Sangon）；Trizol（GIBCO BRL 公司，美国）；^{125}I-cAMP 试剂盒（上海中医药大学）；γ-[^{32}P]ATP（北京市福瑞生物工程公司）；抗 CREB 多克隆抗体（Santa Cruz，美国）；Gene Amp 480 型 PCR 仪（Perkin Elmer 公司，美国）。

1.2 细胞培养

在含 2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、2.2 g/L 碳酸氢钠、10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 μg/ml链霉素的 MEM 培养液内单层细胞培养。孵育箱内含 95 % 空气，5% CO_2，恒温 37 ℃。

1.3 实验分组

实验分为 3 组：C 组：生理盐水对照组，加入等量生理盐水；M 组：吗啡依赖组，细胞融合到 60 % ~ 70 % 时，培养液内加入终浓度 100 μmol/L 的吗啡，作用 48 h；M + N 组：纳络酮戒断组，终浓度 100 μmol/L 的吗啡作用 48 h 后，加入终浓度为 10 μmol/L 的纳络酮，作用 15 min。用倒置显微镜观测各组细胞形态及数量。

1.4 实验方法

1.4.1 cAMP 含量测定 ①样品制备：采用 0.25 % 胰蛋白酶消化后，收集细胞，加入裂解缓冲液（100 mmol/L HEPES，10 g/L Triton X-100，1 mmol/L EDTA，10 mmol/L DTT，1 mmol/L PMSF）冰浴中裂解细胞 20 min，4 ℃ 20 000 × *g* 离心 15 min，上清即为细胞浆蛋白。取 300 μg 胞浆蛋白，加入 2 ml 无水乙醇，3 000 × g 离心 15 min，收集上清。将上清置 55 ℃烤箱烘干，残渣置 4 ℃保存。② cAMP 测定：采用放射免疫法，按说明书操作。

1.4.2 提取细胞核蛋白 按参考文献[4]方法提取。

1.4.3 ^{32}P 标记 CREB 结合双链寡核苷酸探针 CREB 结合双链寡核苷酸探针序列为（加下划线者为 CRE 序列）：5′-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3′，3′-TCTCTAACGGACTGCAGTCTCTCGATC-5′，用 T4 多核苷酸激酶对其 5′末端标记 γ-^{32}P。采用 75 % 乙醇纯化标记探针。

1.4.4 检测吗啡长时程作用对 CREB 的 DNA 结合活性的影响 采用电泳迁移率改变分析（electrophoresis mobility shift assay，EMSA），具体操作参考文献[4]。实验内容包括：①结合反应，反应体系中加入核蛋白 10 μg，标记 CREB 结合双链探针（比活度为 7.92×10^{12} Bq/mmol）3.5 pmol，总反应体系为 10 μl；②抑制结合，包括特异性抑制结合（反应体系中加入未标记 CREB 结合双链探针，浓度为标记探针的 100 倍）及非特异性抑制结合（反应体系中加入为标记探针浓度 100 倍的未标记 AP-2 结合双链探针，其序列为：5′- GATCGAACTGACCGCCCGCGGCCCGT-3′）；③对照结合反应：设立阴性对照（未加细胞核提取物）和阳性对照（加 HeLa 细胞核提取物）；④电泳，反应产物经 6 % 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，电压 300 V，时间 45 min。电泳结束后，将凝胶干燥后，置 - 80 ℃放射自显影 48 h。用凝胶分析软件（Gel-Pro Analyzer Version 3.0，Media Cybernetics）对电泳谱带进行半定量分析，以任意单位 AU（Aarea · Adensity）即凝胶谱带面积与吸光度乘积表示 CREB 的 DNA 结合活性。

1.5 应用 RT-PCR 检测 *fosB* mRNA 表达改变

1.5.1 RNA 提取及鉴定 应用 Trizol 提取细胞总 RNA，按说明书操作。经紫外分光光度计定量［$D(260)/D(280) = 1.8 \sim 2.0$］后，用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5.2 引物 *fosB*[5]（Sequence accession L49169）上游引物：5′-GCTATTTATCCCTTTCCTG-3′，下游引物：5′-TGCTCACACTCTCACACTC-3′；扩增片断长 461 bp。β-actin[5]（Sequence accession X00351）上游引物：5′-TACCACTGGCATCGTGATGGACT-3′，下游引物：5′-TCCTTCTGCATCCTGTCGGCAAT-3′；扩增片断长 506 bp。

1.5.3 反转录 按说明书操作。

1.5.4 PCR 扩增 取 4 μl cDNA，分别加入 50 pmol 的 *fosB* 上游和下游引物，25 pmol 的 β-actin 上游和下游引物，2.5 U *Taq* DNA 聚合酶，组成 50 μl 反应体系。扩增条件为 94 ℃ 3 min，然后每个循环 94 ℃、45 s，56 ℃、45 s，72 ℃、45 s，循环 35 次后，72 ℃ 延伸 5 min。

1.5.5 RT-PCR 产物半定量分析 取 15 μl PCR 反应产物经 1.8 % 琼脂糖凝胶电泳，电压 100 V，时间 40 min。采用 Gel-Pro Analyzer Version 3.0 凝胶图像分析软件对电泳谱带进行半定量分析，计算 *fosB*/β-actin 的吸光度比值，以表示 *fosB* mRNA 相对表达量。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用 SPSS 11.0 统计分析软件进行单因素方差分析，两两比较用 S-N-K 法。

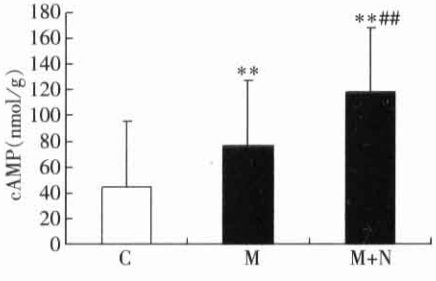
2 结果

2.1 细胞形态及数量

倒置显微镜下见各组细胞形态一致，均为上皮样，有少量突起。细胞贴壁良好，培养液澄清，未见死细胞漂浮。利用计数板对各组细胞计数，数量分别为 1.03×10^9 个/L（C 组）、1.02×10^9 个/L（M 组）和 1.03×10^9 个/L（M + N 组），无显著性差异（$F = 0.333$，$P = 0.729$；$P > 0.05$）。

2.2 吗啡长时程作用对 cAMP 含量的影响

吗啡作用 48 h，细胞内 cAMP 含量较生理盐水对照组明显升高（$F = 756.100$，$P = 0.000$；两两比较 $P < 0.01$），纳络酮戒断使细胞内 cAMP 含量进一步升高约 53 %（$P < 0.01$），见图 1。



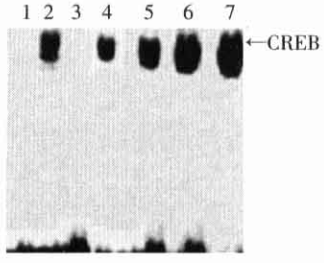
**：$P < 0.01$，*vs* C；##：$P < 0.01$，*vs* M

图 1 吗啡长时程作用影响 SK-N-SH 细胞内 cAMP 含量

Fig 1 Effects of long-term morphine on cAMP content in SK-N-SH cells

2.3　吗啡长时程作用对 CREB 的 DNA 结合活性的影响

阳性对照证实所用的实验方法可成功检测 CREB-DNA 复合物。吗啡依赖组和纳络酮戒断组 SH-N-SH 细胞 CREB 的 DNA 的结合活性明显高于生理盐水组（$F = 52367.718$，$P = 0.000$；两两比较：$P < 0.01$），且纳络酮戒断组高于吗啡依赖组约 8 %（$P < 0.01$）。为标记探针浓度 100 倍的特异性未标记 CREB 结合双链探针可完全抑制电泳滞后带形成。不含 CRE 序列的未标记 AP-2 结合双链探针则没有抑制作用，见图 2。



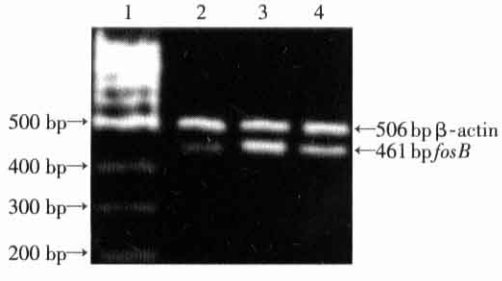
1：Negative control；2：Positive control；3：The retarded band was effectively competed for by the addition 100-fold excess of a cold CREB binding double-stranded probe；4：The retarded band was not competed for by the addition 100-fold excess of a cold AP-2 binding double-stranded probe；5：Normal control；6：Morphine dependence；7：Naloxone-withdrawal

图 2　吗啡长时程作用影响 SK-N-SH 细胞 CREB 的 DNA 结合活性

Fig 2　Effects of long-term morphine on the DNA-binding activity of CREB in SK-N-SH cells by representative EMSA

2.4　吗啡长时程作用对 *fosB* mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果表明，生理盐水对照组细胞表达少量 *fosB* mRNA，吗啡长时程作用使其表达明显升高（$F = 14\,634.506$，$P = 0.000$；两两比较：$P < 0.01$），纳络酮戒断使其水平回落约 57%（$P < 0.01$），但仍高于生理盐水对照组（$P < 0.01$），见图 3。



1：100 bp DNA step marker；2：Saline-treated control；3：Morphine；4：Morphine + naloxone

图 3　吗啡长时程作用 SK-N-SH 细胞表达 *fosB*/β-actin 基因共扩增电泳结果

Fig 3　Effects of long-term morphine on the expression of *fosB* and β-actin mRNA in SK-N-SN cells by representative RT-PCR

3　讨论

SK-N-SH 细胞株来自人类大脑，以 1.5∶1 的比例表达人 μ 及 δ 阿片受体，并具有神经元主要特性。吗啡主要通过与 μ 受体结合而产生止痛及欣快效应，而 μ 受体也是阿片类依赖产生的主要靶点[6]。同只表达 δ 阿片受体的 NG108-15 细胞株[7]相比，实验结论更可靠。

本实验应用 RIA 检测到吗啡长时程作用的 SK-N-SH 细胞内 cAMP 含量明显升高，纳络酮诱发戒断时引起 cAMP 含量进一步升高，证明采用的吗啡依赖和纳络酮戒断细胞模型是成功的[7]，并观察到吗啡及纳络酮对细胞生长未见明显影响。

以往研究表明，药物依赖和耐受是神经元可塑性和适应性改变的结果。慢性应用吗啡造成这一改变的基础是转录因子调节一些基因表达增加，导致机体稳态重建的结果[8]。目前在体和离体实验均证实，cAMP 信号系统活性和转录因子 CREB 磷酸化水平升高是慢性应用吗啡导致依赖和耐受形成的主要通路[8]。CREB 在脑组织内含量丰富，以神经元内居多。cAMP 可通过上调蛋白激酶 A 活性，使 CREB 的 Ser-133 位残基磷酸化而被激活。磷酸化 CREB 形成二聚体与内源性基因启动子内 CRE 序列结合而诱导靶基因表达上调[8,9]。ΔfosB 由 *fosB* 基因编码。ΔfosB 为 Fos 转录因子家族的一员，在慢性药物滥用导致的行为异常中所起的作用愈来愈受重视，被认为与精神依赖密切相关[1]。ΔfosB 高度稳定，可在神经元内至少存在数周[1-3]。慢性应用可卡因和吗啡等均导致 ΔfosB 在大鼠脑内的一些核团，如伏隔核和背侧纹状体等的神经元内持续增加，在阿片受体拮抗剂诱发的大鼠吗啡身体依赖中同样观察到该现象[6,10]，但其在身体依赖中所起的作用不清楚，也未引起足够重视[1]。

由于前强啡肽和前脑啡肽基因启动子内有 CRE 序列，人们曾推想药物滥用导致的伏隔核内 CREB 磷酸化水平升高可增加该部位神经元释放强啡肽和脑啡肽，从而使大脑对药物滥用的奖赏效应产生耐受[1,8]。但事实上，慢性应用吗啡减少该部位前强啡肽和前脑啡肽 mRNA 产生，可能是由于 ΔfosB 产生过多的结果。其机制尚不清楚。

本研究表明，吗啡长时程作用于 SK-N-SH 细胞，引起细胞内 cAMP、CREB 的 DNA 结合活性和 *fosB* mRNA 增加；纳络酮诱发戒断导致 cAMP 含量及 CREB 的 DNA 结合活性进一步增加，*fosB* mRNA 则有所下降，但仍高于生理盐水对照组。*fosB* mRNA 水平降低的机制，尚待进一步探讨。

以上结果提示，在吗啡长时程作用的 SK-N-SH 细胞，CREB 的 DNA 结合活性增加可能介导了吗啡长时程作用诱导的 *fosB* 基因表达上调。这为进一步从基因调控水平探讨吗啡依赖的形成机制及进行基因治疗提供了实验依据。

参考文献：

[1] Nestler E J, Barrot M, Self D W. ΔfosB: a sustained molecular switch for addiction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(20): 11042-11046.

[2] Chen J, Kelz M B, Hope B T, *et al*. Chronic Fos-related antigens: stable variants of ΔfosB induced in brain by chronic treatments[J]. J Neurosci, 1997, 17(13): 4933-4941.

[3] Andersson M, Konradi C, Cenci M A. cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum[J]. J Neurosci, 2001, 21(24): 9930-9943.

[4] 丛 斌，凌亦凌，谷振勇，等. 八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导大鼠肺组织 NF-κB 活性增高的抑制作用[J]. 中国病理生理杂志，2002, 18(6): 615-618.

[5] Bernard K, Cambiaggi A, Guia S, *et al*. Engagement of natural cytotoxicity programs regulates AP-1 expression in the NKL human NK cell line[J]. J Immunol, 1999, 162(7): 4062-4068.

[6] Georgescu D, Zachariou V, Barrot M, *et al*. Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal[J]. J Neurosci, 2003, 23(8): 3106-3111.

[7] 郭庆民，刘景生. Ca^{2+}/钙调蛋白依赖的蛋白激酶Ⅱ信息通路在 DPDPE 长时程作用的 NG108-15 细胞中的作用[J]. 中国药理学通报，2002, 18(1): 23-28.

[8] Barrot M, Olivier J D, Perrotti L I, *et al*. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(17): 11435-11440.

[9] Walters C L, Blendy J A. Different requirements for cAMP response element binding protein in positive and negative reinforcing properties of drugs of abuse[J]. J Neurosci, 2001, 21(23): 9438-9444.

[10] Johnstone L E, Brown C H, Meeren H K, *et al*. Local morphine withdrawal increases *c-fos* gene, Fos protein, and oxytocin gene expression in hypothalamic magnocellular neurosecretory cells[J]. J Neurosci, 2000, 20(3): 1272-1280.

（编辑 栗 嘉）

（上接 2124 页）

cDNA 片段相同，表明扩增产物即为本实验的目的基因片段，阴性对照无表达，阳性对照产物符合试剂盒所提供的 462 bp 片段。

GABAA 受体的所有亚基均有表达，其中，α1、β1、γ2 这 3 种亚基的 mRNA 在前庭内侧核的表达相对较强，γ3、δ 这两种亚基的 mRNA 表达相对较弱。GABAB 的两种受体均有表达。

3 讨论

既往研究表明，前庭神经核内存在 GABA 的 A 受体和 B 受体，但对两种受体的亚基或亚型未作进一步的研究[4]。Hironaka 等[5]报道前庭核中含有 GABAA 受体的 α1 亚基，但对 GABAA 受体其他亚基和 GABAB 受体未作报道。Sur 等[6]在金鱼的前庭核内可见 γ2 亚基，也未涉及前庭核的其他亚基。本实验结果显示前庭内侧核中存在着丰富的 GABAA 受体亚基，α1-α6、β1-β3、γ1-γ3、δ 亚基的 mRNA 均有不同程度的表达；GABAB 受体也有表达。Rezaee 等[2]报道在大鼠前庭外周存在着 GABAA 受体的 α1-α6、β1-β3、γ1-γ3 亚基，但没有 δ 亚基，其结果与本实验在前庭核内观察到的结果极为相近，提示 GABAA 受体亚基在前庭外周和前庭中枢的表达具有一致性。

不同亚基组成的受体的药理学特性不一样，如含有 α1 亚基的受体能使唑吡旦（一种催眠药）与配体的亲和力增高，具有 α2、α3 和 α5 亚基的受体则使唑吡旦与配体的亲和力下降，含有 α4 和 α6 亚基的受体对安定不敏感[7]。前庭内侧核内 α1-α6 这 6 种亚基的基因均有表达，提示前庭内侧核存在着不同药理学特性的 GABAA 受体。GABAA 受体的 β 亚基具有高度的类同性，每个亚基都有一个便于磷酸化作用的序列，而磷酸化作用对受体活性调节有重要作用。

（致谢：本实验得到第三军医大学野战外科研究所第三研究室伍亚民、廖文红教授的大力支持，谨致谢意！）

关键词：RT-PCR；γ-氨基丁酸；前庭内侧核；受体

中图法分类号：R338.3 R339.17 R764.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] de Waele C, Muhlethaler M, Vidal P P. Neurochemistry of the central vestibular pathways[J]. Brain Res Brain Res Rev, 1995, 20(1): 24-46.

[2] Rezaee A, Robinson A M, Pitovski D Z. Expression of gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the vestibular system[J]. Laryngoscope, 1999, 109(2 Pt 1): 329-333.

[3] Durgam V R, Vitela M, Mifflin S W. Enhanced gamma-aminobutyric acid-B receptor agonist responses and mRNA within the nucleus of the solitary tract in hypertension[J]. Hypertension, 1999, 33(1 Pt 2): 530-536.

[4] 贺付成，安玉会，卢惠卿，等. 酸性神经肽 I 对吗啡成瘾小鼠脑内 GABA 及环核苷酸含量的影响[J]. 郑州大学学报(医学版)，2005, 40(2): 262-264.

[5] Hironaka T, Morita Y, Hagihira S, *et al*. Localization of GABAA-receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the lower brainstem of the rat[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1990, 7(4): 335-345.

[6] Sur C, McKernan R, Triller A. GABAA receptor-like immunoreactivity in the goldfish brainstem with emphasis on the Mauthner cell[J]. Neuroscience, 1995, 66(3): 697-706.

[7] Smith T A. Type A gamma-aminobutyric acid (GABAA) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment[J]. Br J Biomed Sci, 2001, 58(2): 111-121.

（编辑 陈聪连）