维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)05－0625－03

与海洛因依赖有关的特异性 mRNA 研究

蒙华庆[1]，王广新[3]，刘先俊[4]，周歧新[2]，邓　伟[1]

(1.重庆医科大学临床学院精神科，重庆　400016；2.重庆医科大学基础医学院药理学教研室，重庆　400016；
3.山东省济宁医学院附属第二医院，济宁；4.重庆医科大学基础医学院生化教研室，重庆　400016)

【摘　要】目的：寻找与海洛因依赖有关的特异性基因。方法：用递增法建立海洛因依赖小鼠模型。纳洛酮催瘾后，分别提取实验组及对照组小鼠脑内的总 RNA、mRNA，然后进行抑制性消减杂交，杂交产物扩增，凝胶电泳分析。结果：实验组小鼠脑内 mRNA 含量高于对照组，并于实验组小鼠脑内分离出差异表达的 cDNA 片段。结论：海洛因依赖小鼠脑内可能存在特异性基因表达。

【关键词】海洛因依赖；mRNA；抑制性消减杂交

【中国图书分类法分类号】R971$^+$.2　　【文献标识码】B　　【收稿日期】2002－09－17

A study on specific mRNA related to the heroin dependence

MENG Huaqing, et al

(*Department of Psychiatry, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To find out the specific gene related to heroin dependence. *Methods*: Heroin－dependent models in mice were established by dose－increasing administration. After withdrawal syndrome was precipitated by naloxone, total RNA and mRNA were isolated from the brains of experimental and control groups respectively, then suppressive subtractive hybridization was proceeded. The hybridization sample was amplified by PCR and analyzed on a agarose/EB gel. *Results*: The mRNA level of the experimental group was significantly higher than that of control group and a differently expressing cDNA fragment was obtained from the brain of the experimental group. *Conclusion*: There is probably an expression of the specific gene in the brain of heroin－dependent mice.

【Key words】Heroin dependence; mRNA; Suppressive subtractive hybridization

吸毒已成为全球性的严重公害，联合国已将每年的 6 月 26 日定为“国际禁毒日”。加强对毒品依赖的基础研究，特别是依赖机制的研究，是毒品依赖防治的关键。目前，科学家认为一些基因相互作用使某些个体滥用物质的易感性增强，但对其神经生物学机制尚缺乏系统研究[1,2]。本文采用抑制性消减杂交法探索与海洛因依赖性形成有关的特异性基因表达，以期阐明海洛因依赖的分子生物学机制。

1　材料与方法

1.1　材料

C_{57}BL/6J 小鼠，18～20g，购自重庆医科大学实验动物中心。海洛因由重庆市公安局禁毒处提供，纯度为 82.7%。Tripure 分离试剂，购自 Boehringer mannheim。PolyATtract m RNA 分离系统Ⅲ购自 Promega PCR－select^{TM} cDNA 消减试剂盒购自 Clontech，DNA 分子量标准(Φ×174DNA/HaeⅢ)购自 Promega。

1.2　海洛因依赖小鼠模型的建立

将小鼠随机分为实验组和对照组，每组各 4 只。模型建立参考国外 Comings 等人的方法[3]。实验组小鼠采用递增法皮下注射海洛因，第 1 天 10mg/kg。第 2 天 20mg/kg，第 3、4 天 40mg/kg，第 5、6 天 80mg/kg，分二次注射(9AM、9PM)，第 7 天 9AM 一次皮下注射 80mg/kg，2h 后腹腔注射纳洛酮 5mg/kg。对照组小鼠皮下注射同体积的生理盐水及同剂量的纳洛酮。注射纳洛酮后立即将小鼠放入玻璃观察罩内，观察 15min 内跳跃次数，15min 内出现眼睑下垂、腹泻、湿狗样抖动及前爪震颤的动物数，之后马上断头处死，迅速取出小鼠的全部脑组织，并进行下一步操作。

1.3　鼠脑总 RNA 和 mRNA 的提取

采用 Tripure 分离试剂盒分别提取实验组和对照组脑组织的总 RNA，操作严格按试剂盒说明进行。采用 polyAT-

基金项目：重庆市科委应用基础基金资助项目(99－16－110)

作者介绍：蒙华庆(1956－　)，男，主任医师，硕士，
主要研究方向：精神病学和医学心理学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

tract®mRNA 分离系统Ⅲ分离总 RNA 中的全部 mRNA,然后用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 和 mRNA。用紫外分光光度计(uv-265)检测其全部浓度,最后计算出所提取的总 RNA 和 mRNA 量。

1.4 消减杂交

采用 clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction 试剂盒,按用户手册中的说明进行操作,步骤简述如下:分别以"1.3"中分离纯化的实验组和对照组的 mRNA 为模板合成双链 cDNA。

将实验组 cDNA 分为二管,分别连接特殊设计的核苷酸接头 1 和接头 2,然后分别与对照组 cDNA 杂交,合并二种杂交产物后再与对照 cDNA 进行第二次杂交,然后将杂交产物进行选择性 PCR 扩增,使实验组中特异性 cDNA 得到特异扩增,最后进行琼脂糖凝胶电泳分析。

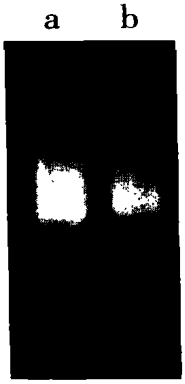


图 1 二组 mRNA 的琼脂糖凝胶电泳图

a. 实验组 b. 对照组

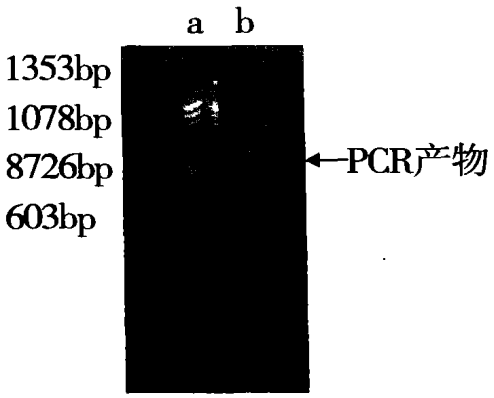


图 2 差异表达的 cDNA 片断的 PCR 产物电泳图

a. DNA 分子量标准 b. PCR 产物

表 1 二组小鼠脑内总 RNA 和 mRNA 量(μg)的比较

	实验组	对照组	t 值	P 值
总 RNA	365.79±16.13	295.20±89.64	0.63	>0.05
mRNA	3.72±0.23	2.67±0.36	2.00	<0.05

2 结 果

2.1 海洛因依赖小鼠模型

实验组小鼠腹腔注射纳洛酮后皆出现戒断症状,15 min 内跳跃次数为 9.75±1.65 次,对照组为 0 次,二组间有显著性差异($P<0.01$)。实验组小鼠全部出现腹泻,湿狗样抖动,眼睑下垂,前爪震颤,而对照组小鼠则无上述症状。海洛因依赖小鼠模型建立成功。

2.2 二组总 RNA、mRNA 量的比较

实验组及对照组小鼠脑内总 mRNA 琼脂糖凝胶电泳电泳结果见(图 1),两组小鼠脑内总 RNA 和 mRNA 量见(表 1),表 1 显示,实验组小鼠脑内总 RNA 和 mRNA 量均较对照组高,但仅 mRNA 的差异具有显著性($P<0.05$)。

2.3 海洛因依赖小鼠脑内差异表达的 cDNA 片断

经二轮抑制性消减杂交后,获得杂交混合物,经 PCR 和巢式 PCR 扩增,获得了差异表达的 cDNA 片断(图 2)。

3 讨 论

在阿片类依赖的实验研究中,通常采用吗啡建立依赖模型以研究其依赖形成的神经生物学机制,而罕见用海洛因来建立小鼠依赖模型进行研究,但造成依赖的阿片类物质在国内外主要是海洛因,其脂溶性比吗啡强,能很快透过血脑屏障进入中枢神经系统,具有作用强,起效快等特点。因此用海洛因建立依赖模型以深入研究其神经生物学机制具有更重要的理论和临床实践意义。本实验用海洛因建立小鼠依赖模型,腹腔注射纳洛酮后戒断症状明显,如出现腹泻、湿狗样抖动、眼睑下垂、前爪震颤,15 min 内跳跃次数为 9.75±1.65,与文献报道一致[1,4],说明海洛因依赖小鼠模型建立成功。

药物依赖的发生机制至今未完全明了。近年来,探索药依赖的分子生物学机制已成为该领域研究的热点和主流趋势。目前,对药物依赖的分子机制特别是基因表达改变的研究主要有以下三种思路:(1)利用多态分析方法对细胞内信息传导通路的特定元件进行研究。自 Blum 等[5]报道多巴胺 D_2 受体(DRD_2)基因的变异与酒依赖有关以来,已有许多研究探讨 DA 受体基因与物质依赖的关系,Bond 等(1998)通过对 113 例海洛因依赖者和 39 例正常

维普资讯 http://www.cqvip.com

健康人的 μ—阿片受体基因编码区的单核苷酸多态 DNA 进行分析,发现 5 个特异性基因变异与海洛因依赖有关,其出现频率明显高于正常健康人[6]。另外,与 γ—氨基丁酸(GABA),5—羟色胺(5—HT)系统有关的基因也可能参与物质依赖的形成[7~8]。(2)从基因调控如结构基因,转录因子等进行研究,通过对其研究来弄清物质相关基因的表达调控。(3)依赖物质与特异性基因表达之间的关系,筛选特异性基因,这些特异性基因经克隆、测序、对照基因库,确证新基因,然后检测神经系统中表达部位,并应用反义 RNA 技术,观察抑制其表达后对成瘾的影响来证实它的功能。本研究采用第三种思路,利用最新的基因克隆技术,寻找与海洛因依赖相关的特异性基因表达。本研究还对海洛因依赖小鼠与对照组小鼠脑内总 RNA、mRNA 量进行对照分析,结果显示,用药组小鼠脑内 mRNA 量较对照组小鼠高,其差异有显著性($P<0.05$),与 Erdtmann 等研究发现大鼠反复给予吗啡处理及纳洛酮催瘾后皆可引起脑内背侧纹状体及某些皮层 c—fos 的大量表达的研究结果一致[11],提示海洛因依赖戒断可引起基因表达的改变。

抑制性消减杂交(Suppression subtractive Hybidization,SSH)方法自 1996 年问世以来[9,10],目前已成为有效地检测低丰度的差异表达基因的手段,显示了很多优越性:首先,SSH 方法的最大优点是降低假阳性率,它的两步杂交和两步 PCR,保证该方法具有较高的特异性。Stein 等报道[11],他们用转移性和非转移性的两种胰腺肿瘤细胞 Bsp73—ASML 与 Bsp73—1AS 作比较,证明了 SSH 技术的真阳性率高达 94%。其次,SSH 方法具有高度的敏感性。由于经每一 mRNA 合成的 cDNA,再由 RsaI 酶切后产生一个以上的 cDNA 片断,这样具有差异表达的 cDNA 检出率得以提高,另外,由于该方法的均等化和目标片段的富集,保证了稀少丰度表达的 mRNA 能够被检出。我们首次成功地运用海洛因依赖小鼠模型,通过抑制性消减杂交方法扩增出特异性 cDNA 片断,提示海洛因依赖小鼠脑内可能存在特异性基因表达。目前,我们正在进行基因的克隆并鉴定其所编码的蛋白质的功能,以期最终揭示海洛因依赖的分子机制,为将来直接通过调控特异性基因的表达或开发更为有效的药物来预防和治疗海洛因依赖奠定理论基础。

致谢:重庆市公安局禁毒总队陈光明总队长,陶秋副总队长对本研究提供了大力支持和帮助,深表谢意!

参 考 文 献

[1] 徐贵丽,陈 力,赵 晶,等.褪黑素对海洛因依赖性大小鼠作用的实验研究[J].中国药物滥用防治杂志,1998;5:14-16.

[2] Gelernter J, Kranzler HR. Variant detection at the δ opioid receptor(OPRD1) locus and population genetics of a novel variant affecting protein sequence[J]. Hum Genet, 2000; 107(1):86-88.

[3] Comings DE, Blake H, Dietz G. The proenkephalin gene (PENK) and opioid dependence[J]. Neuroreport, 1999;10(5):1133-1135.

[4] 刘 萍,宋长杰,席正雄.吗啡依赖大鼠和小鼠戒断后应激行为和激素水平的观察[J].中国药物依赖性通报,1997;6(1):18-21.

[5] Blun K, Noble EP, Sheridan PJ, et al. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism[J]. J AMA, 1990;263:2055-2060.

[6]Bond C, laForg KS, Tian M, et al. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction[J]. Proc Natl Acad sci USA, 1998;95(16):9608-9613.

[7] Loh EW, Higuchi S, Matsushita S, et al. Association analysis of the GABA(A) receptor subunit genes cluster on 5q33—34 and alcohol dependence in a Japanese population[J]. Mol Psychiatry. 2000;5(3):301-307.

[8] Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, et al. Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence [J]. Mol Psychiatry. 1997;2(6):490-494.

[9] Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, et al. Suppresion subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA Probes[J]. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1996;93:6025-6030.

[10] Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, et al. Equalizing cDNA Subtraction Based on Selective Suppression of Polymerase Chain Reaction: Cloning of Jurkat Cell transcripts induced by phytohemaglutinin and phorbol 12—myristatel3—Acetate[J]. Anal Biochem, 1996;240:90-97.

[11] Stein OD, Thies WG, Hofmann M. A high throughput Screening for rarely transcribed differentially expressed genes [J]. Nucleic Acids Res, 1997;25(13):2589-2620.