

# NO-cGMP 信号转导系统的上调参与阿片类药物耐受和戒断的生化机制

臧梦维, 孟爱民, 沈琦, 汪青, 郭菲, 刘景生\*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学基础医学研究所药理室, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

**摘要:** 目的 观察阿片激动剂长时程作用对 NO-cGMP 信号转导系统的影响。方法 选用 iNOS cDNA 稳定表达的 NG-LNCX iNOS 细胞, 采用 NOS 活性和 cGMP 放免测定, Western 杂交和 NADPH 黄递酶组化染色技术。结果 阿片类药物长时程作用剂量依赖性增高胞浆相 iNOS 活性和胞内 cGMP 含量, 药物作用强弱顺序是 DPDPE > DADLE > 吗啡, EC<sub>50</sub> 都在 nmol·L<sup>-1</sup> 数量级。用纳洛酮急性戒断阿片耐受细胞, 造成酶活性和 cGMP 水平增加更显著。DPDPE 长时程作用还引起 iNOS 基因表达增强和 NADPH 黄递酶染色阳性细胞增多。结论 提示 NO-cGMP 信号转导系统上调可能是阿片耐受和成瘾的重要生化改变。

**关键词:**  $\delta$ -阿片受体; 阿片类依赖; 一氧化氮合酶; 环磷酸鸟苷; 信号转导

中图分类号: R963; R966; R971.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)08-0566-05

有关阿片耐受和依赖时, iNOS 基因表达介导的 NO-cGMP 信息通路的调节作用的研究尚未见报道。近来我们<sup>[1,2]</sup>研究表明, 在 iNOS 基因转染获得稳定表达的 NG108-15 细胞, 阿片激动剂长时程作用引起 cAMP 代偿性增加, 纳洛酮急性戒断诱发 cAMP 反跳性升高, 从而建立阿片类药物耐受和依赖细胞模型<sup>[3]</sup>。在此基础上, 本文进一步观察了阿片类药物长时程作用及阿片拮抗剂诱发戒断时 iNOS 活性, 胞内 cGMP 水平和 iNOS 蛋白表达及其功能变化, 旨在探讨 NO-cGMP 信号转导系统在阿片耐受和依赖机制中的作用, 为应用 NOS 抑制剂阻断阿片耐受成瘾提供实验依据。

## 材料与 方法

**药品与仪器** D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>-脑啡肽 (D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>-enkephalin, DPDPE), D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>-脑啡肽 (D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>-enkephalin, DADLE), 盐酸纳洛酮, L-NNA, 硝基蓝氮唑 (nitro blue tetrazolium, NBT) 为 Sigma 公司产品。盐酸吗啡为青海制药厂产品。高糖 DMEM 为 Gibco 公司产品, iNOS 单克隆抗体为 Transduction Laboratories 公司产品, HRP 酶联免疫标记的二抗为北京中山公司产品。其他常

用试剂均为国产分析纯。Ultrascan XL 图象激光密度扫描仪由 Pharmacia 公司生产。

**细胞培养与加药处理** 用 iNOS cDNA 转染 NG108-15 细胞, 获得的稳定表达 iNOS 基因工程细胞 NG-LNCX iNOS 由本室建株<sup>[2]</sup>。培养条件见参考文献<sup>[3]</sup>。在 iNOS 活性和 cGMP 含量测定实验中, 接种  $2 \times 10^5$  细胞至 6 孔板, 贴壁生长过夜, 换培养基, 分别加入  $\delta$ -受体选择性激动剂 DPDPE, DADLE  $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> 和吗啡  $10^{-9} \sim 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>, 37℃ 孵育 48 h。阿片激动剂组直接收获细胞制备样本, 阿片激动剂 + 纳洛酮组在收获细胞前, 弃培养基, PBS 洗涤细胞, 加入  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  纳洛酮孵育细胞 15 min; 实验还设置了空白对照组和纳洛酮组。在 Western 杂交和 NADPH-d 组化染色实验中, 除上述实验分组外, 还有 L-NNA + DPDPE 组, 即用  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  L-NNA 和  $10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> DPDPE 共同预处理细胞 48 h。

**NOS 催化活性测定** 测定方法见参考文献<sup>[3]</sup>。

**Western 杂交分析** 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离 100  $\mu\text{g}$  细胞裂解蛋白, 转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 用 iNOS 单克隆抗体杂交, 洗膜, 置于 HRP 酶联免疫标记的二抗中孵育, 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色。激光密度扫描仪测定 iNOS 蛋白条带的密度。

**NADPH 黄递酶组化染色** 参考 Janssens 等方法<sup>[4]</sup>加以改良。细胞爬片生长, 用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS (pH 7.4) 配制 4% 多聚甲醛固定细胞 2 h, 置于

收稿日期: 1999-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670827)

\* 联系人 Tel: (010) 65296403, Fax: (010) 65240529,

E-mail: jsliu@public.bta.net.cn

20%蔗糖磷酸缓冲液中 4℃ 过夜,在含有 0.25 g·L<sup>-1</sup> NBT, 1 g·L<sup>-1</sup> β-NADPH, 0.4% Triton X-100 溶液和 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS(pH 7.4) 中, 37℃ 孵育 2 h, 每次孵育中用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 漂洗 3 次, 甘油明胶封片, 光镜观察并照相, 胞浆蓝染表示 NADPH-d 染色呈阳性反应。激光密度扫描仪作图像定量分析, 以平均积分灰度值来反映 NADPH-d 染色阳性细胞数。

胞内 cGMP 含量测定 用 <sup>3</sup>H-cGMP 放射免疫测定法进行, cGMP 标准曲线的范围为 0.25 ~ 16.00 pmol·L<sup>-1</sup>, cGMP 含量以每毫克蛋白的 pmol 数(pmol·mg<sup>-1</sup> protein) 表示。

统计分析 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析(ANOVA)和 *t* 检验。

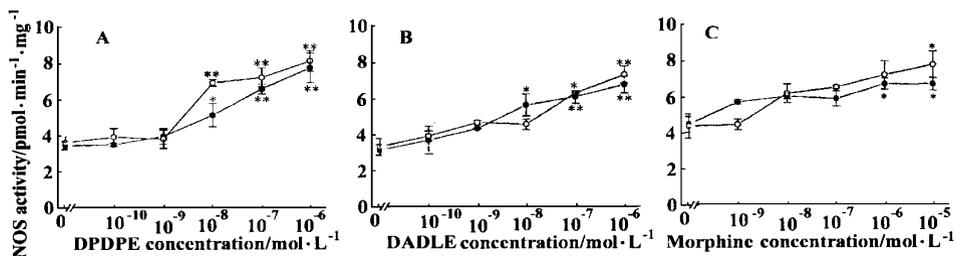


Fig 1 Effects of opioid agonist and antagonist on NOS activity after chronic exposure of NG-LNCX iNOS cells to DPDPE, DADLE and morphine. The NG-LNCX iNOS cells were pretreated with various concentrations of opioid agonists, DPDPE (A), DADLE (B) and morphine (C), for 48-hours as described in "materials and methods". Opioid agonist group (●-●) represents <sup>3</sup>H-Cit formation in the presence of the corresponding agonist. Opioid agonist + Naloxone group (○-○) represents NOS activity in the presence of naloxone after chronic treatment with various opioid ligands. After removal of preincubation medium, the cells were incubated in the medium containing naloxone 10 μmol·L<sup>-1</sup> at 37℃ for 15 minutes. *n* = 3 ~ 5,  $\bar{x} \pm s$ . \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 compared with corresponding control

本研究也比较了 NG108-15 细胞和 NG-LNCX iNOS 细胞用 DPDPE 长时程处理以及纳洛酮诱发戒断时 NOS 活性的变化。结果表明, 在对照 NG108-15 细胞, 递增浓度 DPDPE 长时程预孵细胞及纳洛酮急性用药, 胞浆 iNOS 活性与空白对照组和纳洛酮对照组相比, 无显著性变化 (*P* > 0.05), 而 NG-LNCX iNOS 细胞胞浆相 iNOS 活性呈剂量依赖性增加 (图 2)。

## 2 Western 杂交分析阿片激动剂长时程作用对 iNOS 蛋白表达的影响

为了确定阿片激动剂长时程作用引起 iNOS 活性变化和特异性 iNOS 基因蛋白表达的关系, 本实验观察了 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> DPDPE 单独用药或 10<sup>-6</sup>

## 结 果

### 1 阿片激动剂长时程作用对 iNOS 催化活性的影响

结果表明, 不同阿片激动剂长时程作用 NG-LNCX iNOS 细胞, 均引起胞浆相 iNOS 活性增高, 剂量效应呈正相关 (图 1)。DPDPE, DADLE 和吗啡单独作用 EC<sub>50</sub> 分别为 14 nmol·L<sup>-1</sup>, 20 nmol·L<sup>-1</sup> 和 130 nmol·L<sup>-1</sup>, 可见药物作用强弱顺序是 DPDPE > DADLE > 吗啡。纳洛酮本身不影响 iNOS 活性, 但在上述阿片类药物引起细胞发生耐受时, 用纳洛酮急性戒断, iNOS 活性增加更显著, 其 EC<sub>50</sub> 较相应的阿片激动剂单独作用分别减少了 35.7%, 55.0% 和 70.7%。

mol·L<sup>-1</sup> DPDPE 和 10 mmol·L<sup>-1</sup> L-NNA 共同孵育 NG-LNCX iNOS 细胞 48 h, 然后进行 Western 杂交分析 iNOS 基因蛋白。结果表明, 在 130 KDa 处出现一条 iNOS 蛋白条带; 光密度扫描显示, DPDPE 组蛋白表达产量比对照组略有增高, 而联合用 L-NNA 组, 表达产物含量明显减少 (图 3)。证实 DPDPE 引起 iNOS 活性增加是由于 iNOS 蛋白表达增多所致, 且可被 L-NNA 所阻断。

### 3 阿片激动剂长时程作用对 NADPH-d 活性的影响

DPDPE 单独用药及 L-NNA 和 DPDPE 联合用药长时程预处理 NG-LNCX iNOS 细胞, 细胞固定前加入纳洛酮孵育细胞 15 min, 然后进行 NOS 活性相关的 NADPH-d 组织化学反应。结果表明, 与空白

对照组相比, DPDPE 组和 DPDPE + 纳洛酮组可见大量细胞胞浆内呈明显的蓝染, NADPH-d 染色阳性细胞增多 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); L-NNA + DPDPE 组和 L-NNA + DPDPE + 纳洛酮组, 胞浆内蓝染细胞减少, NOS 反应阳性细胞数目明显低于 DPDPE 组和 DPDPE + 纳洛酮组 ( $P < 0.01$ )。

#### 4 阿片激动剂长时程作用对胞内 cGMP 水平的影响

为了探讨阿片耐受和依赖中 NO-cGMP 通路的调节机制, 本研究在发现阿片激动剂长时程作用引起 iNOS 活性增高的基础上, 又测定了胞内 cGMP 含量的变化。结果表明, 不同阿片类药物 (DPDPE, DADLE 和吗啡) 均可剂量依赖性增加胞内 cGMP 水平, 其  $EC_{50}$  分别为  $49 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 以  $\delta$ -阿片激动剂作用最明显; 若用纳洛酮诱发戒断, 药物作用的  $EC_{50}$  为  $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $11 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $35 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  分别减少 89.7%, 26.7% 和 65.0%, 这与胞浆相 iNOS 活性增加相一致。

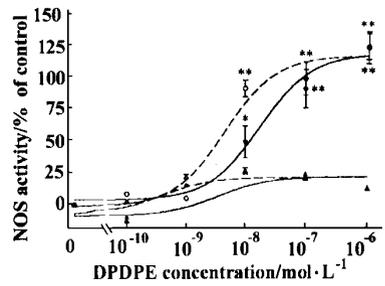


Fig 2 Chronic effects of various concentrations of DPDPE on iNOS activity in native and iNOS gene-transfected cells in the absence and presence of  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  naloxone. Both NGI08-15 cells and NG-LNCXiNOS cells were pretreated with DPDPE ( $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 48 hours. The dose-response curves for  $\delta$ -selective opioid agonist with and without naloxone were established in NG-LNCXiNOS cells. DPDPE group (NG-LNCXiNOS cell) ( $\bullet-\bullet$ ); DPDPE + Naloxone group (NG-LNCXiNOS cell) ( $\circ-\circ$ ); DPDPE group (NGI08-15 cell) ( $\blacktriangle-\blacktriangle$ ); DPDPE + Naloxone group (NGI08-15 cell) ( $\triangle-\triangle$ );  $n = 3 \sim 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared with corresponding control

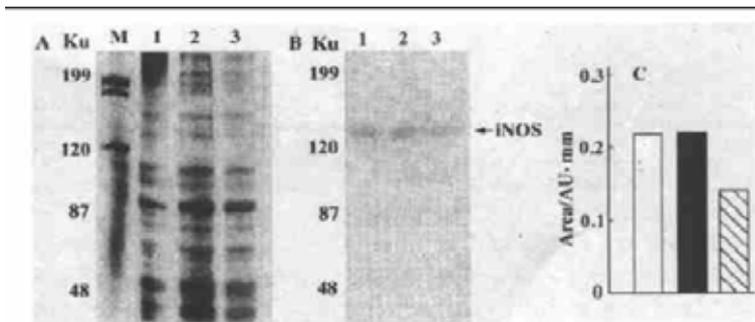


Fig 3 Western blot analysis of iNOS protein expression from iNOS gene-transfected cells pretreated with control (lane 1), DPDPE alone (lane 2), DPDPE combined with L-NNA (lane 3). A. SDS-PAGE electrophoresis; B. Western blot analysis; C. Laser density scanning analysis. Control ( $\square$ ); DPDPE ( $\blacksquare$ ); DPDPE + L-NNA ( $\text{hatched}$ )

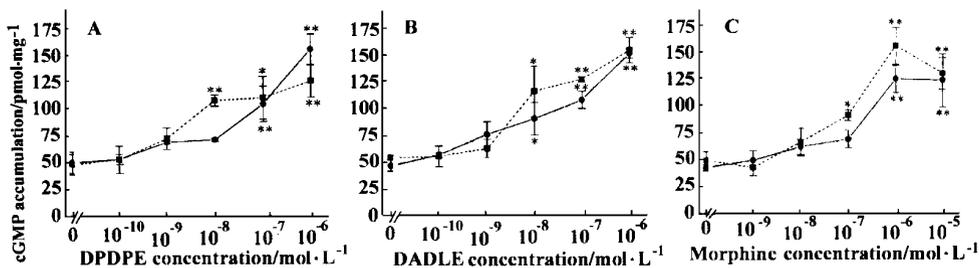


Fig 4 Concentration response curve of cGMP accumulation in NG-LNCXiNOS cells after chronic exposure to various opioid agonists in the absence or presence of naloxone. The NG-LNCXiNOS cells were pretreated with various concentrations of opioid agonists, DPDPE (A), DADLE (B) and morphine (C), for 48-hours as described in "materials and methods". Opioid agonist group ( $\bullet-\bullet$ ) represents cGMP level in the presence of the corresponding agonist. Opioid agonist + Naloxone group ( $\blacksquare-\blacksquare$ ) represents cGMP content in the presence of naloxone after chronic treatment with various opioid ligands. After removal of preincubation medium, the cells were incubated in the medium containing  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  naloxone at  $37^\circ\text{C}$  for 15 minutes.  $n = 3 \sim 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared with corresponding control

## 讨 论

小鼠神经母细胞瘤和大鼠神经胶质瘤 NG108-15 杂交细胞株表达  $\delta$ -阿片受体<sup>[5,6]</sup>,对研究  $\delta$ -受体功能及其在吗啡耐受机制中作用,是较为理想的细胞模型。我们<sup>[1,2]</sup>将 iNOS cDNA 转染 NG108-15 细胞,获得 iNOS 组成型表达的 NG-LNCX-iNOS 细胞株为研究在  $\delta$ -受体耐受和依赖中 NO-cGMP 信号系统的变化创造了条件。

有报道吗啡长时程给药小鼠小脑 NOS 活性升高<sup>[7]</sup>。吗啡长期用药大鼠的脊髓组织 NOS mRNA 表达增强,NOS 蛋白免疫反应性阳性细胞增多<sup>[8]</sup>。研究表明,靶向作用神经型 NOS(neuronal NOS, nNOS)的反义寡核苷酸探针能选择性下调 nNOS 活性,用其治疗的小鼠,可以阻断小鼠发生吗啡镇痛耐受<sup>[9]</sup>。本研究发现  $\delta$ -阿片激动剂(DPDPE 和 DADLE)及吗啡长时程作用 NG-LNCX-iNOS 细胞,可剂量依赖性增加胞浆相 iNOS 活性。药物作用的强弱顺序是 DPDPE > DADLE > 吗啡,推测吗啡耐受发生部分通过  $\delta$ -阿片受体介导。Western 杂交和 NADPH-d 染色方法证实阿片耐受和依赖时 iNOS 蛋白表达和功能增强,可被 L-NNA 阻断。上述体内外实验的结果,说明 NOS 激活使 NO 生成增多可能也是阿片耐受的一种适应性反应。

本实验发现在阿片耐受细胞中加入纳洛酮后,表现 iNOS 活性增加,其程度超过阿片激动剂单独作用,且酶活性增加与 NADPH-d 染色阳性细胞增多相一致,提示吗啡戒断反应时也刺激 iNOS 增高。此外,Barjavel 等研究显示<sup>[10]</sup>,在正常大鼠的大脑皮层匀浆中,加入  $\delta$ -, $\mu$ -, $\kappa$ -阿片激动剂,体外反应测得 NOS 活性无明显变化。而本实验用阿片激动剂长时程预处理细胞,再制备 NOS 活性测定样本,发现 NOS 活性明显升高,可见 NOS 活性增高并不是吗啡直接激活作用,而是吗啡耐受和依赖导致的生化改变。

研究表明,对脑室内注射吗啡诱发的抗伤害反应,NOS 抑制剂 L-精氨酸类似物和鸟苷酸环化酶(guanylyl cyclase, GC)抑制剂 LY-83,583 明显阻断吗啡急性耐受,使吗啡作用的量效曲线左移,提示脊髓上水平 NO/cGMP 系统参与吗啡耐受的发生<sup>[11]</sup>。本研究表明,阿片耐受和依赖细胞引起 NOS 活性增加同时伴有 cGMP 水平升高,与阿片激动剂剂量成正相关,以  $\delta$ -阿片激动剂作用更显著,推测阿片激动剂诱发耐受和依赖时 iNOS 活性增加,大量释放

NO,刺激 GC,促进 cGMP 生成增多,引起 NO-cGMP 转导系统上调,为开展 NOS 抑制剂和 GC 抑制剂治疗阿片耐受成瘾的临床应用提供了直接证据。

我们近来报告阿片激动剂长时程作用于 NG-LNCX-iNOS 细胞,可致 AC-cAMP 系统上调和受体下调。本研究发现阿片激动剂长时程作用诱发 NO-cGMP 信号系统上调这与阿片受体脱敏具有相同时相性,EG<sub>50</sub> 值都在 nmol·L<sup>-1</sup> 数量级,提示不仅是 AC-cAMP 系统上调,而且 NO-cGMP 系统激活均成为阿片耐受和依赖的主要生化机制,我们所建立的 NG-LNCX-iNOS 细胞株,可进一步用于在阿片耐受和依赖机制中 AC-cAMP 系统和 NO-cGMP 系统调节作用及其相互关系的研究。

## REFERENCES:

- [1] Zang MW, Peng XX, Hu P, *et al.* Construction of an inducible nitric oxide synthase gene transferring vector mediated by retrovirus[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1998, 19(2):121-127.
- [2] Zang MW, Shen Q, Wang Q, *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase gene in neuronal cells mediated by retrovirus vector[J]. *Acta Biochem Biophys Sin*, 1999, 31(3):233-238.
- [3] Zang MW, Shen Q, Wang Q, *et al.* Effect of opiate on receptor mediated adenylate cyclase-cAMP signal system in NG-Lncxin cell with the stable expression of inducible nitric oxide synthase gene[J]. *Acta Pharm Sin*, 1999, 34(7):484-490.
- [4] Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, *et al.* Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium derived relaxing factor/nitric oxide synthase [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267:14519-14522.
- [5] Evans CJ, Keith DE, Morrison H, *et al.* Cloning of a delta opioid receptor by function expression[J]. *Science*, 1992, 258:1952-1955.
- [6] Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, *et al.* The  $\delta$ -opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:12048-12052.
- [7] Leza JC, Lizasoain I, Sarri Martin-Clark O, *et al.* Morphine-induced changes in cerebral and cerebellar nitric oxide synthase activity[J]. *Eur J Pharmacol*, 1995, 285:95-98.
- [8] Machelska H, Ziolkowska B, Mika J, *et al.* Chronic morphine increases biosynthesis of nitric oxide synthase in the rat spinal cord[J]. *Neuroreport*, 1997, 8(12):2743-2747.
- [9] Kolesnikov YA, Pan YX, Babey AM, *et al.* Functionally differentiating two neuronal nitric oxide

- synthase isoforms through antisense mapping: Evidence for opposing NO actions on morphine analgesia and tolerance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 8220 - 8225.
- [10] Barjavel MJ, Bhargava HN. Effect of opioid receptor agonists on nitric oxide synthase activity in rat cerebral cortex homogenate [J]. *Neurosci Lett*, 1994, **181**: 27 - 30.
- [11] Xu JY, Hill KP, Bidlack JM. The nitric oxide/cyclic GMP system at the supraspinal site is involved in the development of acute morphine antinociceptive tolerance [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, **284**(1): 196 - 201.

## UP-REGULATION OF NO-cGMP SIGNAL TRANSDUCTION SYSTEM IS INVOLVED IN THE BIOLOGICAL MECHANISMS OF OPIATE TOLERANCE AND WITHDRAWAL

ZANG Mengwei, MENG Aimin, SHEN Qi, WANG Qing, GUO Fei, LIU Jingsheng

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

**ABSTRACT: AIM** To determine the effect of chronic treatment with opioid agonists on NO-cGMP signal system on the basis of successful establishment of a NG-LNCSiNOS cell line expressing iNOS cDNA and a cell model of opioid tolerance and naloxone-precipitated withdrawal. **METHODS** NOS activity and cGMP content were determined by the conversion of  $^3\text{H}$ -Arginine to  $^3\text{H}$ -Citrulline and radioimmunoassay, respectively. Western blot analysis and NADPH diaphorase (NADPH-d) histochemical assay were used to detect the level of iNOS gene expression and NADPH-d activity which is a histochemical marker for NOS. **RESULTS** Long-term exposure of NG-LNCSiNOS cells to various opioid agonists enhanced the cytosolic iNOS activity, accompanying the increase in intracellular cGMP content in a dose-dependent manner. The order of potencies was DPDPE > DADLE > morphine. The  $\text{EC}_{50}$  values of the above indicators were  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  level. When naloxone induced cell withdrawal, the iNOS activity and cGMP level were dramatically higher than those with agonists alone. Pretreatment of the cells with the more efficacious  $\delta$ -ligand (DPDPE) for 48 hours also may lead to high-level expression of iNOS protein and elevate the number of NADPH diaphorase-positive cells. **CONCLUSION** Chronic opioid treatment was shown to up-regulate the NO-cGMP signal pathway, which may reflect an important biochemical change accounting for development of tolerance to and dependence on opiate. Thus, NG-LNCSiNOS cells provide a suitable system for studying the relationship between AC-cAMP and NO-cGMP signal system on the molecular mechanisms of opiate tolerance and dependence.

**KEY WORDS:**  $\delta$ -opioid receptor; opiate dependence; nitric oxide synthase; cyclic GMP; signal transduction