

吗啡依赖小鼠脑组织 cGMP 水平、鸟苷酸环化酶及磷酸二酯酶活性的调节

方 芳 宋福津* 曹 清 王艳红 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; *北京协和医院病理科, 北京 100005)

摘要 以递增剂量吗啡 sc, 使小鼠产生对吗啡的躯体依赖, 观察脑组织 cGMP 水平、PDE 和 sGC 的活性变化及 PKA 对其磷酸化调节。结果表明, (1) 小脑、纹状体、海马及大脑皮质 cGMP 含量显著降低; (2) 在小脑、海马中 sGC 活性明显降低, PDE 活性无明显变化, 在纹状体及大脑皮质中均明显升高, 且体外磷酸化水平也均明显下降, PKA 抑制剂可抑制此变化; (3) 纳洛酮拮抗组未见上述变化。结果提示, 吗啡依赖小鼠脑组织 cGMP 水平普遍降低, 在小脑和海马可能因 sGC 活性下降引起, 在纹状体及大脑皮质可能因 PDE 活性升高所致。

关键词 吗啡; 依赖; 鸟苷酸环化酶; 磷酸二酯酶; 环磷酸鸟嘌呤

阿片类物质依赖性机制的研究一直是神经科学领域的热点。阿片可通过作用于与阿片受体耦联的胞内信使系统而影响细胞功能。cGMP 是一重要的信使物质, 与鸟苷酸环化酶、磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)及一氧化氮(nitric oxide, NO)组成细胞信号传导系统。有研究发现, 在阿片短时或长时作用下大鼠纹状体 cGMP 水平发生改变^[1,2], 提示 cGMP 的变化可能与阿片镇痛及耐受和依赖有关。cGMP 水平的变化分别受 GC 和 PDE 对其合成代谢及分解代谢的调节。为进一步了解 cGMP 系统在阿片依赖中的变化, 本文观察了吗啡依赖小鼠脑组织中 cGMP 水平、调节其水平的 PDE 和可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC)活性的变化及蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)对 PDE, sGC 活性的磷酸化调节。

材 料 与 方 法

动物及主要试剂 ♂昆明小鼠, 体重 18~22 g, 购自中国医学科学院实验动物研究所。硫酸吗啡(morphine sulfate, Mor.): Peninsula 公司。盐酸纳洛酮(naloxone hydrochloride, Nal.)、腺苷、尿苷、PKA 抑制剂、PKA 催化亚单位: Sigma 公司。QAE-Sephadex A-25: Fluka 公司。 γ -³²P-ATP(18.5×10^{13} Bq·mmol⁻¹), 北京亚辉生物医学工程公司。³H-cGMP(81.4×10^{10} Bq·mmol⁻¹), 北京原子能研究所。

实验分组及药物处理 小鼠随机分 4 组: 吗啡依赖组(morphine group)、对照组(control group)、纳洛酮拮抗组(Nal. + Mor. group)均按我室以往建立的方法进行^[3]; PKA 抑制剂组(Mor. + PKA inhibitor): 用自制的聚乙烯管(充满 2 μ l 生理盐水)插入至脑室并固定。通过注射 1% 美蓝染料、取脑时观察染料的部位以确定插管是否入脑室。术后 24~36 h, 活动正常、脑室内注射(icv)生理盐水无任何异常反应的小鼠用于实验。每次 sc 吗啡 15 min 前通过插管缓慢注入 PKA 抑制剂 2 μ l(2 μ g)。

cGMP 含量测定 小鼠末次给药后 2 h 断头处死, 迅速取出脑组织, 加入预冷的 10% 三氯醋酸匀浆, 于 4℃, 3000 r·min⁻¹ 离心 10

收稿日期 1998-02-26

本研究得到国家自然科学基金(No. 39770852)和博士点基金资助

min, 上清液用 4 倍体积的水饱和乙醚洗提 4 次, 水相在 60°C 水浴上吹干。测定时吹干的样品溶于适量的 50 mmol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液 (pH 6.2)。采用放射免疫分析法测定 cGMP。

sGC 活性测定 参照 Moro 等^[4]的方法并改良。在脑组织中加入预冷缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ Tris, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 1 mmol·L⁻¹ DTT, 250 mmol·L⁻¹ 蔗糖, pH 7.4) 匀浆。4°C 以 105000 × g 离心 60 min, 上清液用于 sGC 的测定。反应体积 200 μl, 含 25 mmol·L⁻¹ Tris (pH 7.4), 5 mmol·L⁻¹ GTP, 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 3 mmol·L⁻¹ IBMX, 1 mmol·L⁻¹ EGTA, 10 μmol·L⁻¹ SNP 及适量 sGC 提取液, 于 30°C 水浴反应 5 min 后置入沸水中 3 min 终止酶反应。加入 200 μl 50 mmol·L⁻¹ 醋酸钠, 4°C 以 3500 r·min⁻¹ 离心 20 min, 测定上清液中 cGMP 的含量, 以产物 cGMP 的量来反映 sGC 活性。

PDE 活性测定 在脑组织中加入预冷缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ Tris, 1 mmol·L⁻¹ DTT, 1 mmol·L⁻¹ PMSF, pH 7.4) 匀浆, 4°C 以 20000 × g 离心 50 min, 上清液用于 PDE 活性测定。测定方法按文献^[5]进行。

sGC 及 PDE 反磷酸化测定 (back-phosphorylation assay) 参考文献^[6,7]稍加改

进。利用反磷酸化测定技术了解脱磷酸化底物含量的高低, 推算体内底物蛋白/酶的磷酸化程度, 即: 离体测定组织中所需要掺入的 ³²P 量越少 (SDS-PAGE 放射自显影条带越浅), 说明体内磷酸化状态的相应底物越多, 反之则越少。反应体积 50 μl, 含 20 mmol·L⁻¹ Tris (pH 7.5), 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 100 μmol·L⁻¹ EGTA, 2 μmol·L⁻¹ cAMP, 100 μmol·L⁻¹ ATP, 10⁻⁴ u PKA 催化亚单位, γ-³²P-ATP 5.4 × 10⁴ Bq, 及适量酶样品 (样品制备同活性测定), 25°C 反应 5 min 后加入 2 × SDS 加样缓冲液 50 μl, 置沸水中 5 min 后进行 SDS-PAGE 分析 (积层胶 5%, 分离胶 8%)。电泳结束后于凝胶干燥机上干胶。将干燥过的凝胶置于暗盒, 压上 X 光片, 于 -70°C 曝光 2~3 d。结果用光密度扫描仪分析显影条带。

数据处理 数据用 Pharmacologic calculation system 4.1 版软件进行统计学处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间差异用双侧 *t* 检验进行统计学处理。

结 果

1 吗啡依赖小鼠脑组织 cGMP 含量变化

采用递增剂量给药法, 可使小鼠产生对吗啡的躯体依赖性^[3]。在末次吗啡给药 2 h 后,

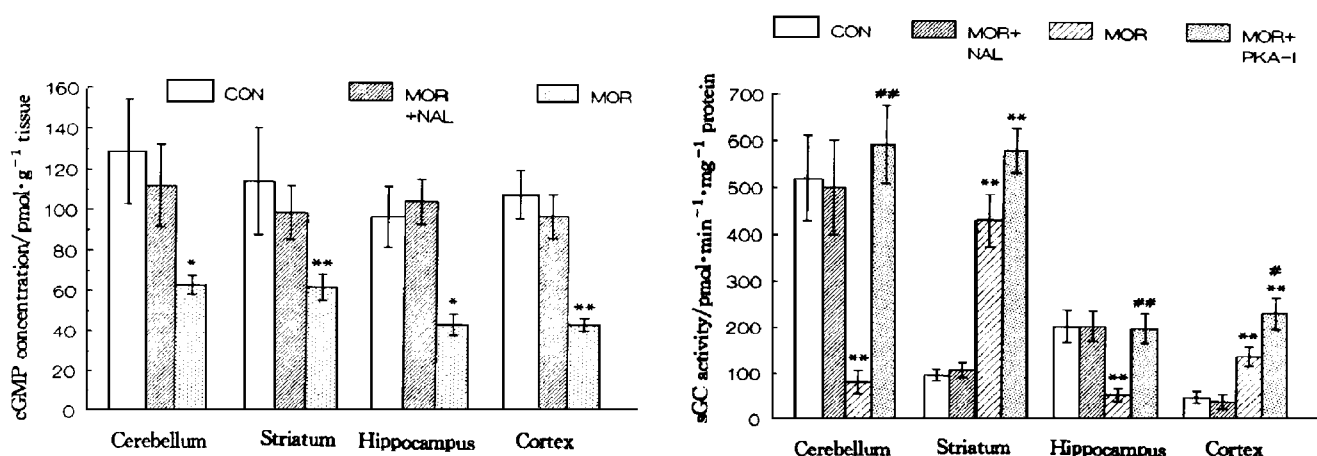


Fig 1 Concentration of cGMP in the brain regions of morphine-dependent mice. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control. CON: control, MOR: morphine, NAL: naloxone.

Fig 2 sGC activity in the brain regions of morphine-dependent mice, and effect of PKA inhibitors (PKA-I) on sGC activity. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with morphine group.

断头取脑组织测定 cGMP 含量。结果显示(图 1),吗啡依赖小鼠的小脑、纹状体、海马、大脑皮质等脑组织 cGMP 含量均明显低于对照组小鼠,分别下降了 50%,45%,54%和 58%。纳洛酮拮抗组 cGMP 含量未见明显变化。

2 PKA 对吗啡依赖小鼠脑组织 sGC 活性的磷酸化调节

吗啡依赖小鼠小脑及海马中 sGC 活性明显下降,而 icv PKA 抑制剂组 sGC 活性与吗啡

依赖小鼠比明显升高。吗啡依赖小鼠纹状体及大脑皮质中 sGC 活性与对照比显著升高($P < 0.01$),icv PKA 抑制剂对抗了 sGC 活性的增高(图 2)。纳洛酮拮抗组未见上述变化。吗啡依赖小鼠纹状体、大脑皮质 sGC 体外磷酸化水平与对照组比明显降低,说明体内磷酸化状态的 sGC 多。icv PKA 抑制剂组与吗啡递增给药组比可见 sGC 体外磷酸化明显增强(图 3)。

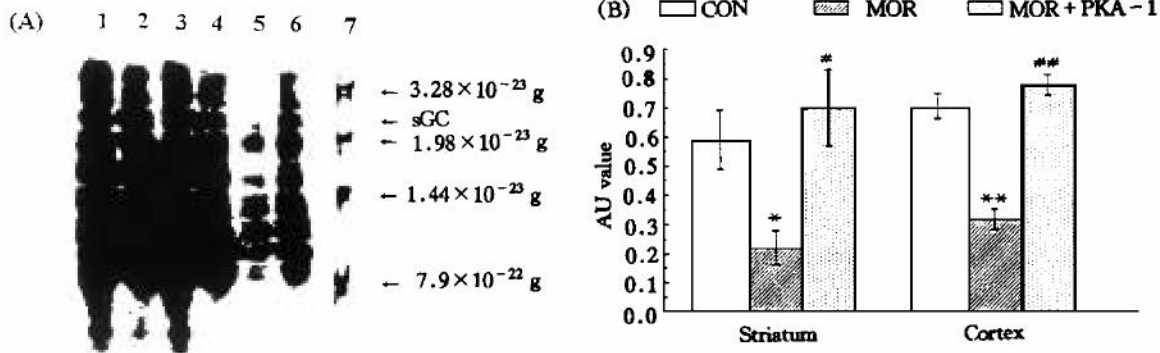


Fig 3 Phosphorylation of sGC in morphine-dependent mice *in vitro* by PKA. (A) Lane 1. Control striatum; Lane 2. Mor. striatum; Lane 3. Mor. + PKA-I striatum; Lane 4. Control cerebral cortex; Lane 5. Mor. cerebral cortex; Lane 6. Mor + PKA-I cerebral cortex; Lane 7. Protein molecular weight standards. (B) The band corresponding to sGC was analyzed by scanning densitometry. Results from three separate experiments are presented as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with morphine group.

3 PKA 对吗啡依赖小鼠脑组织 PDE 活性的磷酸化调节

吗啡依赖小鼠纹状体、大脑皮质 PDE 活性与对照组比显著增高($P < 0.05$),而 icv PKA 抑制剂组 PDE 活性明显低于吗啡依赖小鼠($P < 0.05$);吗啡依赖小鼠小脑及海马脑组织 PDE 活性未见明显变化(图 4)。吗啡依赖小鼠纹状体、大脑皮质 PDE 体外磷酸化强度明显低于对照组,说明体内磷酸化状态 PDE 多,icv PKA 抑制剂组纹状体 PDE 体外磷酸化水平与对照组及吗啡递增给药组比明显增强,而大脑皮质 PDE 体外磷酸化水平虽与对照组比无明显差别(图 5),但与吗啡递增组比却明显增加。

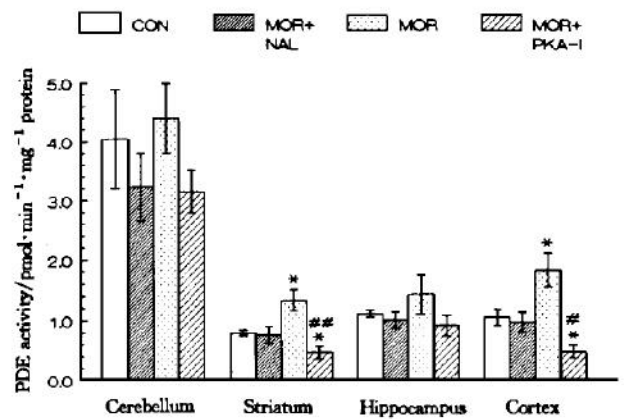


Fig 4 PDE activity in the brain regions from morphine-dependent mice, and effect of PKA inhibitor (PKA-I) on PDE activity. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with morphine group.

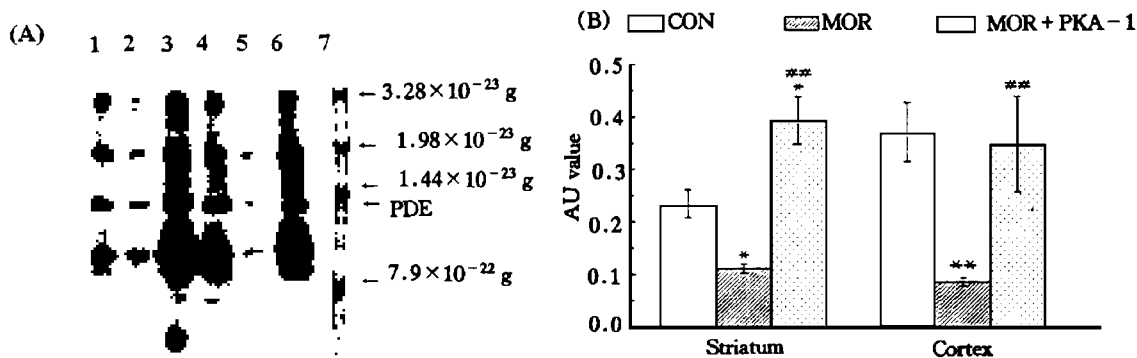


Fig 5 Phosphorylation of PDE in morphine-dependent mice *in vitro* by PKA. (A) Lane 1. Control striatum; Lane 2. Mor. striatum; Lane 3. Mor. + PKA-I striatum; Lane 4. Control cerebral cortex; Lane 5. Mor. cerebral cortex; Lane 6. Mor + PKA-I cerebral cortex; Lane 7. Protein molecular weight standards. (B) The band corresponding to PDE was analyzed by scanning densitometry. Results from three separate experiments are presented as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control. *** $P < 0.01$ compared with morphine group.

讨 论

cGMP 是胞内重要的信使物质,参与调节多种细胞功能,如钙离子内流、递质的释放及摄取、细胞膜的超或去极化等。有研究发现,在吗啡短时作用下大鼠纹状体 cGMP 水平升高^[1],而在吗啡长时作用下,脑组织 cGMP 水平则降低^[2]。我们研究发现,吗啡依赖小鼠的小脑、纹状体、海马及大脑皮质等脑组织中 cGMP 水平普遍降低。值得注意的是,许多人观察到在吗啡长时作用下 cAMP 水平的升高^[8,9]与 cGMP 水平的变化恰恰相反。我们推测,吗啡依赖时 cGMP 水平的降低可能导致对水解 cAMP 的 PDE 作用减弱,从而使 cAMP 水平升高。进一步研究二者之间的关系变化,将有助于了解阿片类的作用机制。

本文结果提示,吗啡依赖时体内水解 cGMP 的 PDE 可能因 PKA 使其磷酸化水平升高而活性增加,而 cGMP-PDE 活性的升高可能是吗啡依赖时脑组织 cGMP 水平下降的重要原因。我们还发现,吗啡依赖小鼠小脑及海马中 sGC 活性降低,提示这两部位 cGMP 水平的下降可能与 sGC 活性的降低而导致其合成减少所致。问题是我们研究发现吗啡依赖小鼠纹状体及大脑皮质中 sGC 活性却是增加的,且体

外磷酸化水平明显降低,其活性也受 PKA 对其磷酸化调节。我们推测,在吗啡依赖小鼠的纹状体及大脑皮质中,水解 cGMP 的 PDE 对 cGMP 的水解作用可能比 sGC 促 cGMP 合成的作用要强,所以最终 cGMP 的水平是下降的。但吗啡依赖时这两部位中 sGC 促 cGMP 合成的原因和意义尚不清楚。由于 sGC 的活性受 NO 的调节,且近年有报道 NO 与阿片耐受和戒断有关^[10,11],所以我们推测吗啡依赖时脑组织可能存在 NOS 活性的升高,这也许是纹状体及大脑皮质中 sGC 活性升高的原因。

总之,深入了解 cGMP 系统、包括 NO 在内的该信号系统中各环节的相互关系在阿片类药物效应中的作用,将有助于进一步阐明阿片依赖机制。

参 考 文 献

- 1 Minneman KP, Iversen LL. Enkephalin and opiate narcotics increase cGMP accumulation in slices of rat neostriatum. *Nature*, 1976, **262**:313
- 2 Burton CK, Ho IK, Hoskins B. Evidence for involvement of cyclic GMP phosphodiesterase in morphine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, **252**:104
- 3 方芳,陈轶琨,王小明,等. 吗啡长时程作用对小鼠脑组织蛋白激酶 A 及 C 活性的影响. *基础医学与临床*, 1997, **17**:115

- 4 Moro MA, Russeau RJ, Celtek S, *et al.* cGMP mediates the vascular and platelet actions of NO: confirmation using an inhibitor of the sGC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**:1480
- 5 刘景生, 刘晔, 金荫昌. 钙调蛋白的制备及活性测定. 中国医学科学院学报, 1985, **7**:453
- 6 Zwiller J, Revel MO, Basset P. Evidence for phosphorylation of rat brain guanylate cyclase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, **101**:1381
- 7 Louis JC, Revel MO, Zwiller J. Activation of soluble guanylate cyclase through phosphorylation by protein kinase C in intact PC12 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1177**:299
- 8 Collier HO. Cellular site of opiate dependence. *Nature*, 1980, **283**:625
- 9 Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci*, 1992, **12**:2439
- 10 Kolesnikov YA, Pick CG, Ciszewska G. Blockade of tolerance to morphine but not κ -opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**:5162
- 11 Kimes AS, Vaupel DB, Lodon ED. Attenuation of some signs of opioid withdrawal by inhibitors of nitric oxide synthase. *Psychopharmacology*, 1993, **112**:521

MODULATION OF cGMP LEVELS, SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE AND PHOSPHODIESTERASE ACTIVITIES IN BRAIN OF MORPHINE-DEPENDENT MICE

Fang Fang(Fang F) Song Fujin(Song FJ), Cao Qing(Cao Q),
Wang Yanhong(Wang YH) and Liu Jingsheng(Liu JS)

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

ABSTRACT By inducing morphine dependence in mice, the changes of cGMP contents, phosphodiesterase (PDE) and soluble guanylate cyclase (sGC) activities and their phosphorylation regulated by protein kinase A(PKA) were observed. It was found that: (1) cGMP contents in cerebellum, striatum, hippocampus and cerebral cortex were significantly lower. (2) The sGC activities were apparently decreased in cerebellum and striatum. In the striatum and cerebral cortex the sGC activities and phosphorylation levels *in vitro* were significantly increased and were inhibited by PKA inhibitor. (3) The PDE activities showed no change in cerebellum and hippocampus, but in striatum and cerebral cortex PDE activities and phosphorylation levels *in vitro* were significantly increased and were inhibited by PKA inhibitor. (4) These changes described above were not observed in mice treated with naloxone 30 min prior to daily morphine injection. Our data indicate that the decrease of cGMP contents occurred generally in brain regions of morphine-dependent mice. The decrease of cGMP contents in cerebellum and hippocampus may be due to the decrease of sGC activities, but the decrease of cGMP contents in striatum and cerebral cortex may be mainly due to the increase of PDE activity. Both sGC and PDE activities were regulated by PKA.

KEY WORDS Morphine; Dependence; Soluble guanylate cyclase; Phosphodiesterase; cGMP; Phosphorylation