·基础研究·

鞘内注射 NOS 抑制剂对吗啡戒断大鼠脊髓神经元磷酸化 CREB 表达的影响

刘海林，张 跃△，郑国龙
（南京医科大学附属淮安市第一人民医院麻醉科，江苏淮安 223300）

摘 要：目的 研究鞘内注射 NOS 抑制剂对吗啡依赖大鼠纳洛酮催促戒断反应、脊髓 p-CREB 表达的影响。**方法** 建立大鼠吗啡依赖和戒断模型，SD 大鼠 72 只，分为正常对照组、吗啡依赖组、吗啡戒断组、L-NAME 组，每组 18 只大鼠。采用行为学（n=8）、免疫组织化学（n=6）和 Western blot（n=4）方法观察鞘内注射 L-NAME 对吗啡依赖大鼠纳洛酮催促戒断反应、脊髓 p-CREB 表达的影响。**结果** （1）鞘内注射 L-NAME、可明显减轻吗啡依赖大鼠戒断症状，戒断组戒断症状评分为 28.60±4.89，L-NAME 组 22.10±4.52（P<0.05）；戒断组 TEA 评分为 13.50±2.55，L-NAME 组 9.80±3.11（P<0.05）。（2）鞘内注射 L-NAME 可明显减少戒断大鼠脊髓背角 p-CREB 阳性神经元的数目（380±71），L-NAME 组（283±47）低于戒断组（P<0.05）。（3）Western blot 结果显示：鞘内注射 L-NAME 明显抑制吗啡戒断期间脊髓 p-CREB 表达的增加。**结论** 鞘内注射 NOS 抑制剂能明显抑制吗啡戒断大鼠脊髓神经元 p-CREB 的表达。

关键词：吗啡；物质戒断综合征；脊髓；一氧化氮；反应元件
doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2011.23.018 **文献标识码：**A **文章编号：**1671-8348(2011)23-2335-03

Effects of intrathecal injection of NOS inhibitor on the expression of phospho-CREB in spinal cord of morphine-induced withdrawal rats

Liu Hailin, Zhang Yue△, Zheng Guolong
(*Department of Anesthesiology, 1st Hospital of Huai'an, Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu* 223300, *China*)

Abstract: Objective To explore the effects of intrathecal injection of NOS inhibitor L-NAME on morphine withdrawal response and the spinal phospho-CREB expression in morphine-induced withdrawal rats. **Methods** Morphine dependence and withdrawal models were developed. 72 SD rats were divided into 4 groups: control group, dependence group, withdrawal group, L-NAME group, 18 rats for each group. Praxiologic assay (n=8), immunohistochemical method (n=6) and Western-blotting technique (n=4) were used to evaluate morphine withdrawal response and the expression of phospho-CREB in the spinal cord. **Results** The results showed that intrathecal injection of NOS inhibitor significantly alleviated morphine withdrawal symptoms. Morphine withdrawal scores in L-NAME group(22.10±4.52)were significantly lower than that of withdrawal group(28.60±4.89)（P<0.05）; TEA score of withdrawal group was (13.50±2.55), which was significantly higher than that of L-NAME group (9.80±3.11, P<0.05). Phospho-CREB positive neurons in the spinal dorsal horn of withdrawal group were 380±71, which was higher that of L-NAME group (283±47, P<0.05). Compared with withdrawal group, level of phospho-CREB protein detected by Western blot in spinal cord of L-NAME group were significantly lower. **Conclusion** The NOS inhibitor can significantly suppress expression of phospho-CREB in spinal cord.

Key words: morphine; substance withdrawal syndrome; spinal cord; nitric oxide; response elements

药物依赖性可分为精神依赖性（psychological dependence）和躯体依赖性（physical dependence）；精神依赖性是药物成瘾的主要原因。这一观点的存在使对躯体依赖性的研究缺乏应有的重视。躯体依赖性是指反复使用具有依赖性潜能药物所造成的一种适应状态，用药者一旦停药或使用药物受体拮抗剂，将发生一系列生理功能紊乱，并出现戒断综合征（withdrawal syndrome）。一氧化氮（nitric oxide，NO）是一种具有高反应性的自由基，参与了机体多种生理和病理过程，一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）是 NO 合成的关键酶。NO/cGMP 信号转导通路在吗啡依赖和戒断中发挥重要作用[1]。NO 参与脊髓水平伤害性信息调制和中枢敏感化的形成过程，通过抑制 NOS 减少 NO 的产生能减轻吗啡的戒断反应和抑制吗啡的依赖形成过程[2]。

cAMP 反应元件结合蛋白（cAMP response element binding protein，CREB）转录因子属于碱性氨基酸亮氨酸拉链转录因子家族，作为一种核内转录因子，参与多种生物分子基因表达的调控。CREB 的上调是阿片成瘾早期细胞内信号转导的改变之一，在阿片成瘾的过程中起重要作用[3-4]。本组采用行为学、免疫组织化学和 Western blot 方法观察鞘内应用 NOS 抑制剂对吗啡依赖大鼠纳洛酮催促戒断反应、脊髓磷酸化 CAMP 反应元件结合蛋白（phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein，p-CREB）表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂 雄性 Sprague-Dawley 大鼠，体质量 200～250 g，由徐州医学院实验动物中心提供。吗啡系沈阳第一制药厂产品（批号 020903）；纳洛酮、N-硝基-L-精氨酸甲酯（N-nitro-L-argininemethyl ester，L-NAME）系 Sigma 公司产品；p-CREB 抗体购于美国 Santa Cruz 生物技术公司。免疫组化试剂盒由北京中杉生物技术公司提供。

1.2 鞘内注射[5] 鞘内给药采用直接注射给药法：取 L5～L6 腰椎间隙，局部剪毛，2%利多卡因 0.3 mL 局麻后 7.5 号针头破皮，使用 25 μL 微量注射器刺入蛛网膜下腔，出现典型鼠尾侧向甩动和抖动视为穿刺成功。所有动物药物注射总量均为 10 μL。对照组注射生理盐水，各用药组大鼠腹腔注射纳洛酮

△ **通讯作者**，Tel：13861561822；E-mail：liuhailin_1971@163.com。

4 mg/kg激发吗啡戒断症状。

1.3 动物模型和实验分组 72 只 SD 大鼠先被分为两组，分别皮下注射吗啡和生理盐水，吗啡首日每次 10 mg/kg，每日 2 次，隔日每次增加 10 mg/kg，至第 6 日末次注射 50 mg/kg，建立吗啡依赖模型；生理盐水组（n=18）注射同体积的生理盐水。末次注射后 4 h，两组中的部分大鼠被留下作为正常对照组（n=18）和吗啡依赖组（n=18），其余大鼠腹腔注射纳洛酮 4 mg/kg建立吗啡戒断模型，在纳洛酮激发戒断前 30 min，鞘内注射 L-NAME。因此吗啡戒断模型大鼠又被分为两组，即吗啡戒断组（n=18）、L-NAME 组（n=18）。

1.4 戒断症状评分 每组取 8 例在纳洛酮激发戒断后的 1 h 内，根据湿狗样抖动、异常姿势、激惹症状、咬牙、植物神经系统症状、体质量降低等进行戒断症状评分。

1.5 吗啡戒断致痛觉异常（allodynia）评分[6] 每组取 8 例用一根玻璃棒轻轻接触大鼠肋腹部，根据大鼠对这种非伤害性轻触刺激引起的反应对吗啡戒断致痛觉异常进行评分。0 分：对轻触刺激无反应；1 分：轻触刺激后，发出中度嘶叫，并试图逃避接触；2 分：轻触刺激后，发出重度嘶叫，并撕咬玻璃棒。戒断后 1 h 内，每 5 min 评分一次。

1.6 免疫组织化学 每组取 16 例吗啡戒断后 1 h，用戊巴比妥钠将大鼠进行深度麻醉，经升主动脉先灌注 100 mL 冰冷的生理盐水，再灌注 400 mL 4% 冰冷多聚甲醛溶液（溶于 0.1 mol/L PBS，pH7.4）。将脊髓的胸腰段取出后在同样的固定液中后固定 3 h 后，转入 30% 的蔗糖溶液（溶于 0.1 mol/L PBS），4 ℃过夜。连续冰冻切片（厚 40 μm），每间隔 5 张取 1 张，收集在 0.1 mol/L PBS 液中。切片用 PBS 清洗后，在 5% 正常羊血清加0.3% TritonX-100 室温孵育 30 min，然后分别在 p-CREB 一抗（1∶400）中 4 ℃孵育 48 h；用 PBS 洗去未结合的一抗，加入生物素标记羊抗兔 IgG（二抗）（1∶200），37 ℃孵育 1 h；PBS 洗去未结合的二抗，加入辣根酶标记链霉抗生物素蛋白（1∶100），37 ℃孵育 2 h；切片充分清洗后，用 0.05% 3,3′-二氨基联苯胺（3,3′-diaminobenzidine，DAB）加 0.003%双氧水显色 5～10 min，用蒸馏水终止反应。最后将切片转到涂有明胶的玻片上，风干，脱水，透明，封片。每只大鼠选择 5 张阳性神经元最多的切片，并记录两侧脊髓全层 p-CREB 阳性神经元总数，所有计数的阳性神经元均不考虑其染色深浅度。

1.7 Western blot 法 每组取 4 例吗啡戒断后 1 h，用戊巴比妥钠将大鼠进行深度麻醉，快速将其胸腰段脊髓取出并放入液氮中冷冻保存备用。根据以下步骤进行胞浆和胞核蛋白提取：脊髓先放入预冷的匀浆液 A（10 mmol/L HEPES、1 mmol/L Na_3VO_4、1.5 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L KCl、50 mmol/L NaF、0.1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L EGTA、0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟、1 mmol/L 二硫苏糖醇、0.02% 蛋白酶抑制剂 cocktail，pH7.9）中，低温匀浆，加入 90 μL 10% NP-40 后剧烈震荡 30 s，4 ℃ 800 g 离心 15 min，取上清液，即为细胞浆成分。胞浆蛋白分装－70 ℃保存备用。

按 Bradford 法测定样本蛋白浓度后加入 1/3 体积的 4 倍样本缓冲液（250 mmol/L Tris/HCl，pH6.8，含 0.01% 考马斯亮蓝-G、8%十二烷基硫酸钠、200 mmol/L 蔗糖及 300 mmol/L 二硫苏糖醇），95 ℃变性 5 min。取 40 μg 蛋白样本在 10%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳，然后电转至硝酸纤维素膜上，硝酸纤维素膜在 3%牛血清封闭 3 h 后与 p-CREB 抗体（1∶400）4 ℃孵育过夜，TBST 冲洗，15 min×3 次，加入碱性磷酸酶标记的兔二抗（1∶1 000），室温振荡孵育 1.5 h，TBST 冲洗，15 min×3 次，用四唑氮蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸检测反应条带，半定量分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计分析软件进行统计分析，所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组内及组间相比用 t 检验，进行统计学处理，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 行为学观察结果 正常和吗啡依赖大鼠没有戒断反应和痛觉异常。戒断组症状评分为（28.60±4.89），L-NAME 组为（22.10±4.52）；戒断组 TEA 评分为（13.50±2.55），L-NAME 组为（9.80±3.11）。鞘内注射 L-NAME 能明显抑制纳洛酮催促戒断症状评分和戒断引起的痛觉异常（$P<0.05$）（图 1、2）。

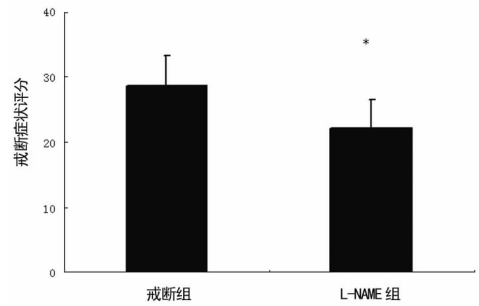

图 1 鞘内注射 L-NAME 降低大鼠吗啡戒断症状评分（n=8）

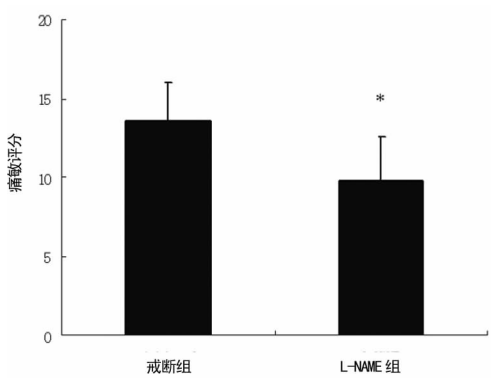

图 2 鞘内注射 L-NAME 减轻吗啡戒断引起的痛觉异常（n=8）

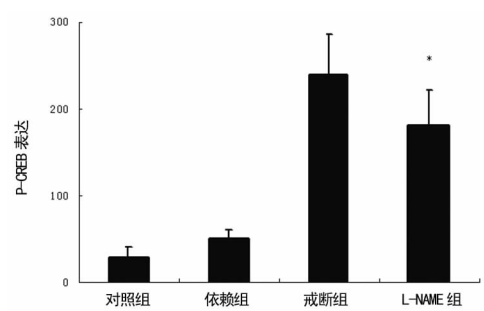

图 4 鞘内注射 L-NAME 抑制吗啡依赖纳洛酮催促戒断大鼠脊髓神经元 p-CREB 的表达（n=6）

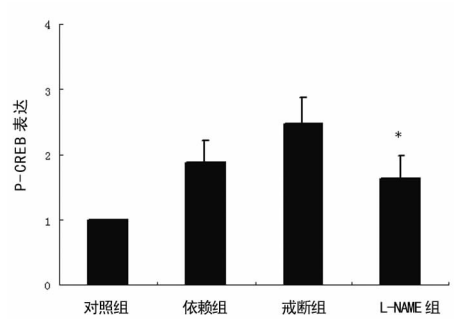

图 5 吗啡依赖和纳洛酮催促戒断大鼠脊髓神经元 p-CREB 表达变化（n=4）

2.2 p-CREB 免疫组织化学 正常大鼠脊髓神经元仅有极少量 p-CREB 阳性神经元表达，吗啡依赖和纳洛酮催促戒断明显增加脊髓神经元 p-CREB 阳性神经元表达，p-CREB 阳性神经元在双侧脊髓全层均大量分布为(380±71)。鞘内注射 L-NAME 能明显减少吗啡戒断大鼠脊髓 p-CREB 阳性神经元表达(283±47)($P<0.05$)。见插Ⅳ图 3，图 4。

2.3 p-CREB 免疫印迹 Western blot 检测胞核 p-CREB 水平表明，纳洛酮催促戒断大鼠 p-CREB 蛋白水平表达较高，鞘内注射 L-NAME 能明显减少吗啡戒断大鼠脊髓 p-CREB 蛋白表达($P<0.05$)(图 5)。

3 讨 论

本实验结果显示：(1)鞘内预先应用 L-NAME 能明显抑制吗啡戒断反应和纳洛酮催促戒断引起的痛觉过敏，与行为学结果一致。(2)吗啡依赖状态下脊髓神经元 p-CREB 表达增多，在纳洛酮促发戒断反应后继续增高，免疫组织化学与 Western blot 显示鞘内预先应用 L-NAME 戒断大鼠脊髓神经元p-CREB的表达减少，并与行为学结果相一致。上述结果提示，脊髓神经元 p-CREB 参与介导吗啡依赖的形成和戒断反应的表达，鞘内应用 L-NAME 能抑制戒断大鼠神经元 p-CREB 的表达。

NO 在吗啡耐受、依赖和戒断中的作用已被大量实验所证实[1,7]。NO 参与 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate，NMDA)受体介导的信息传递，敲除 NOS 基因的小鼠对可卡因不形成条件性位置偏爱，同时减弱药物引起的行为敏感化，提示 NMDA/NO/cGMP 信号转导通路参与成瘾行为的学习记忆[8]。L-NMDA 能阻断小鼠对吗啡的依赖，IP20 肽(蛋白激酶 A 选择性抑制剂)可阻断吗啡成瘾小鼠脑内 NOS 活性的升高。提示其可能机制是：吗啡与 μ 受体结合后激活蛋白激酶 C，蛋白激酶 C 磷酸化 NMDA 受体，使大量 Ca^{2+} 内流与钙调蛋白结合激活 NOS。另外慢性给予吗啡使神经元中 cAMP 信号系统上调，蛋白激酶 A 可直接磷酸化 NOS 分子。

CREB 作为一种核内转录因子，参与多种生物分子基因表达的调控。CREB 的磷酸化是其发挥调节转录功能的基础，磷酸化 CREB 先与 CREB 结合蛋白结合，共同结合到靶基因上的特定序列 cAMP 反应元件，即可募集 RNA 聚合酶Ⅱ组成转录复合体，调节靶基因的转录。外周伤害性刺激可引起脊髓背角 p-CREB 大量表达，鞘内注射 CREB 反义寡核苷酸能明显抑制外周神经损伤引起的痛觉行为反应[9-12]。Yang 和 Pu[13] 研究发现小鼠海马神经元在吗啡依赖及戒断过程中 CREB 的磷酸化水平逐渐增高，Han 等[14] 研究发现吗啡依赖大鼠蓝斑核神经元放电增高与 CREB 密切相关，对 CREB 的调控可以影响吗啡的戒断反应。CREB 是 NO 信号通路重要的下游信号蛋白，NOS 非选择性抑制剂 L-NAME 通过对 NOS 的抑制进而使得 NO 产生减少，CREB 的活性降低，吗啡戒断大鼠的表现则是戒断症状减轻。

本实验研究显示，鞘内注射 NOS 抑制剂能明显抑制吗啡依赖及戒断大鼠脊髓 p-CREB 表达并与行为学的改变相一致，提示激活的 NO 信号通路可能参与介导吗啡依赖及戒断大鼠的脊髓神经元 CREB 的磷酸化。

参考文献：

[1] Gabra BH, Afify EA, Daabees TT. The role of the NO/NMDA pathways in the development of morphine withdrawal induced by naloxone in vitro [J]. Pharmacol Res, 2005, 51(4): 319-327.

[2] Abdel-Zaher AO, Abdel-Rahman MS, ELwasei FM. Blockade of nitric oxide overproduction and oxidative stress by Nigella sativa oil attenuates morphine-induced tolerance and dependence in mice [J]. Neurochem Res, 2010, 35(10): 1557-1565.

[3] Cao JL, Vialou VF, Lobo MK, et al. Essential role of the cAMP-cAMP response-element binding protein pathway in opiate-induced homeostatic adaptations of locus coeruleus neurons [J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107(39): 17011-17016.

[4] Parlato R, Cruz H, Otto C, et al. Effects of the cell type-specific ablation of the cAMP-responsive transcription factor in noradrenergic neurons on locus coeruleus firing and withdrawal behavior after chronic exposure to morphine [J]. Neurochem, 2010, 115(3): 563-573.

[5] 徐叔云，卞如濂，陈修. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002：893.

[6] Yaksh TL, Harty GJ, Onofrio BM. High dose of spinal morphine produce a nonopiate receptor-mediated hyperesthesia: clinical and theoretic implications [J]. Anesthesiology, 1986, 64(5): 590-597.

[7] Gunduz O, Karadag CH, Ulugol A, et al. Modulatory role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine (ADMA), in morphine tolerance and dependence in mice [J]. J Neural Transm, 2010, 117(9): 1027-1032.

[8] Benturquia N, Le Guen S, Canestrelli C, et al. Specific blockade of morphine-and cocaine-induced reinforcing effects in conditioned place preference by nitrous oxide in mice [J]. Neuroscience, 2007, 149(3): 477-486.

[9] Chen A, Muzzio IA, Malleret G, et al. Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4(CREB-2) and C/EBP proteins [J]. Neuron, 2003, 39(4): 655-669.

[10] Ma W, Hatzis C, Eisenach JC. Intrathecal injection of cAMP response element binding protein (CREB) antisense oligonucleotide attenuates tactile allodynia caused by partial sciatic nerve ligation [J]. Brain Res, 2003, 988(1/2): 97-104.

[11] Hoeger-Bement MK, Sluka KA. Phosphorylation of CREB and mechanical hyperalgesia is reversed by blockade of the cAMP pathway in a time-dependent manner after repeated intramuscular acid injections [J]. Neuroscience, 2003, 23(13): 5437-5445.

[12] Ma W, Quirion R. Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein(CREB)in the superficial dorsal horn neurons following partial sciatic nerve ligation [J]. Pain, 2001, 93(3): 295-301.

[13] Yang HY, Pu XP. Chronic morphine administration induces over-expression of aldolase C with reduction of CREB phosphorylation in the mouse hippocampus [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 609(1/3): 51-57.

[14] Han MH, Bolañ CA, Green TA, et al. Role of cAMP response element-binding protein in the rat locus ceru-leus: regulation of neuronal activity and opiate withdrawal behaviors [J]. J Neurosci, 2006, 26(17): 4624-4629.

(收稿日期：2011-01-09 修回日期：2011-03-22)