

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00349

可卡因-苯丙胺调节转录肽蛋白疫苗在吗啡镇痛及其耐受中的作用

宋娟,郭卫,柴景蕊,由振东*,路长林

第二军医大学基础部神经生物学教研室,上海 200433

[摘要] **目的:**检测可卡因-苯丙胺调节转录肽(CART)蛋白疫苗在吗啡镇痛及其耐受中的作用。**方法:**利用基因克隆技术构建 pGEX-4T3-CART₅₅₋₁₀₂表达质粒,通过谷胱甘肽 S 转移酶(GST)亲和层析法纯化出 GST-CART 蛋白。实验分为 6 组:空白对照组,生理盐水组,GST+弗氏佐剂组,CART 蛋白疫苗 5 μ g 组、10 μ g 组和 20 μ g 组,免疫两次后热板法对各组进行痛反应检测。皮下注射 6 mg/kg 吗啡进行镇痛效应检测,计算最大镇痛效应百分率(MPE%)。随后建立吗啡耐受模型,并于末次给药 12 h 后皮下注射 6 mg/kg 吗啡进行耐受效应检测。**结果:**CART 蛋白疫苗本身对基础痛阈没有影响($P>0.05$)。10 μ g CART 蛋白疫苗组显著降低了吗啡镇痛效应($P<0.05$)。对比生理盐水组,疫苗组显示出抗耐受的潜力,其中 10 μ g 组 MPE% 增高具有显著性差异($P<0.05$)。**结论:**CART 蛋白疫苗本身对痛反应没有影响,但削弱了啡的镇痛效应,同时对啡镇痛耐受具有拮抗作用。

[关键词] 可卡因-苯丙胺调节转录肽蛋白;疫苗;吗啡;镇痛;药物耐受性

[中图分类号] R 338 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0349-04

Effect of CART₅₅₋₁₀₂ protein vaccine on morphine analgesia and tolerance

SONG Juan, GUO Wei, CHAI Jing-rui, YOU Zhen-dong*, LU Chang-lin

Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) protein vaccine on morphine analgesia and tolerance. **Methods:** The expression plasmid pGEX-4T3-CART was constructed by gene cloning. The CART protein was purified by glutathione s-transferase (GST)-affinity chromatography. The experiment included 6 groups: blank control, normal saline (NS), GST+Freund's adjuvant, and CART protein vaccine (5 μ g, 10 μ g and 20 μ g) groups. After immunization for twice, all groups were tested in hot plate. Morphine analgesia effect was evaluated through *s.c.* injection with 6 mg/kg morphine solution, calculated by MPE%. Then morphine tolerance model was established, and the tolerance to morphine was tested by *s.c.* injection with 6 mg/kg morphine 12 h after the last injection. **Results:** CART vaccine itself had no pronounced effect on the pain threshold ($P>0.05$). CART vaccine at 10 μ g significantly depressed the analgesic effect of morphine analgesia ($P<0.05$). Compared with NS group, vaccine groups showed a potential antagonizing tolerance effect, especially in the 10 μ g group, with the MPE% significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** CART vaccine itself has no influence on the pain response; however, it can impair the analgesia effect of morphine and can antagonize the analgesia tolerance to morphine.

[KEY WORDS] cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein; vaccine; morphine; analgesia; drug tolerance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(4): 349-352]

可卡因-苯丙胺调节转录肽 (cocaine-amphetamine-regulated transcript, CART), 是一种表达受到可卡因和苯丙胺调节的多肽^[1]。CART 肽是一种新型的肽类神经递质或调质, 在摄食、应激、感觉信息的加工处理、内分泌、生物节律及药物依赖等多种生理过程发挥重要作用^[2-4]。近年来研究发现

CART 肽在调制疼痛的过程中具有重要作用。然而, CART 肽参与疼痛调制作用的行为学研究结果不完全一致。脊髓鞘内注射 CART₅₅₋₁₀₂, 剂量依赖性缩短了小鼠热板试验舔足潜伏期, 提示 CART 可能具有致痛敏的作用^[5]。另有研究表明侧脑室注射 CART₅₅₋₁₀₂, 鼠源性 CART₄₂₋₈₉、CART₄₉₋₈₉, 可剂量依

[收稿日期] 2007-07-31 **[接受日期]** 2008-03-24

[基金项目] 国家重点基础研究规划("973"计划)(2003CB515400); 国家自然科学基金(30371642)。Supported by the National Basic Research Program("973")(2003CB515400) and the National Natural Science Foundation of China(30371642)。

[作者简介] 宋娟, 硕士。E-mail: songjuan@shbiochip.com

* 通讯作者 (Corresponding author)。Tel: 021-25070327, E-mail: youzdk@online.sh.cn

赖性延长小鼠的缩足潜伏期^[6-7],说明 CART 具有镇痛作用。

吗啡具有镇痛作用,广泛应用于临床疼痛的治疗,但是重复用药可产生耐受和依赖。Damaj 等^[8]研究发现,脊髓鞘内先注射 CART₅₅₋₁₀₂,后鞘内或同时皮下注射吗啡,CART 肽能够增强吗啡的镇痛作用。

以上研究显示 CART 可能参与了痛觉的调制和吗啡镇痛的调节,但其作用机制目前尚不清楚。有研究表明,改变内源性 CART 肽水平可引起某些脑区中 μ 阿片受体水平的变化^[9],慢性吗啡处理可导致下丘脑视上核 (SON) 和室旁核 (PVN) 中 CART mRNA 表达上调^[10],提示内源性 CART 系统与内源性阿片系统之间可能存在相互调节关系。改变中枢内源性 CART 肽水平是否可以影响吗啡镇痛或调节吗啡诱导的痛觉耐受,目前尚无相关文献报道。本研究的实验目的是通过皮下注射 CART 蛋白疫苗降低中枢内源性 CART 肽水平,观察其在痛觉调节、吗啡镇痛和吗啡耐受中的作用。

1 材料和方法

1.1 细菌菌种、质粒 *E. coli* BL21(DE3) (Novogen)。pBluescript-CART 质粒, pGEX-4T3 载体由第二军医大学基础部神经生物学教研室提供。

1.2 实验动物 雌性昆明种小鼠 60 只,体质量 20~25 g,由第二军医大学实验动物中心提供。实验前动物在动物房内适应 3 d,每天抓取 1 次。室温 (22±2)℃,整个实验过程中自由饮水及摄食。

1.3 仪器和试剂 热板测痛仪,美国 MED 公司产品。酶标仪, Bio-Rad microplate reader model 650, 美国伯乐公司产品。盐酸吗啡,青海制药厂生产,用 pH 3.5~4.0 的生理盐水配制。限制性内切酶 *Bam*H I 酶和 *Sal* I 酶为 TaKaRa 公司产品。弗氏佐剂: Sigma 公司产品。HRP conjugated anti-mouse IgG 购自上海华舜生物工程有限公司。TMB 试剂购自 Pierce 公司。其他分析纯试剂均为市售。

1.4 CART₅₅₋₁₀₂ 蛋白疫苗的制备 从 GenBank 上检索到大鼠短的 CART 全长基因序列,用 DNASTar (DNASTar, Inc.) 计算机程序按照引物设计基本原则设计相关引物,送生物公司合成。上游引物 T_m 为 63.9℃,下游 T_m 为 65.3℃,GC 百分比为 54.5%,上游引物引入 *Bam*H I 酶切位点,下游引物引入 *Sal* I 酶切位点,在 pBluescript-CART 质粒上

扩增出 CART₅₅₋₁₀₂ 片段。

获得的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,切割下目的条带,并进行胶回收。将胶回收产物以及 pGEX-4T3 载体用限制性内切酶 *Bam*H I 酶和 *Sal* I 酶双酶切,胶回收片段和载体,用 T₄DNA 连接酶连接。连接产物转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株,挑取单克隆,菌落 PCR 鉴定,筛选阳性克隆,测序,谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 亲和层析方法纯化蛋白,以 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析方法鉴定蛋白。

将纯化出的蛋白用生理盐水稀释成合适的浓度,弗氏佐剂和蛋白溶液等体积混合,用注射器或震动混合器充分混合成油包水抗原乳剂。取 1 滴滴于水面 (4~8℃) 上,若不散开且保持滴状,即可使用。

1.5 基础痛阈检测 热板测痛仪温度设定为 55℃,10 min 后(使装置预热)开始实验。检测时将单只小鼠放入热板上的透明器皿中(无底,有顶盖)。动物一旦接触热板,便开始计时。动物在热刺激下,经过一段时间会本能的舔后足,一旦出现这一动作,计时停止。动物在 30 s 内仍未出现舔足动作时,则将其取出,以免灼伤,且舔足潜伏期记为 30 s^[11-12]。实验过程中测痛仪热板表面保持干燥,无排泄物。实验在隔音室中进行,室温保持在 21℃ 左右。以 10~30 s 为标准筛选动物。

1.6 动物分组及免疫 将筛选后的动物随机分为空白对照组、生理盐水组、GST+弗氏佐剂组、CART 蛋白疫苗 5 μ g 组、10 μ g 组和 20 μ g 组,每组 9 只。并对 5 μ g 组、10 μ g 组和 20 μ g 组进行尾静脉取血,分离血清备用。首次免疫,完全弗氏佐剂和 GST-CART₅₅₋₁₀₂ 蛋白溶液等体积混匀乳化,采用背部皮下多点注射,按 0.01 ml/g 给药,各组分别注射生理盐水、GST 蛋白(含 20 μ g GST)+弗氏佐剂、3 种剂量 CART 蛋白疫苗。免疫 2 周后进行第二次取血,分离血清备用,并加强免疫 1 次(用不完全弗氏佐剂配制疫苗,剂量和方法同第一次)。加强免疫 1 周后,再次测痛,结果用最大镇痛效应百分率 (MPE%) 表示,计算公式: MPE% = [(给药后痛阈 - 基础痛阈)/(30 - 基础痛阈)] × 100%。取血分离血清备用。

1.7 ELISA 法检测抗体效价 用 1 μ g/ml CART₅₅₋₁₀₂ 多肽包被 ELISA 板,以 HRP 标记的羊抗

鼠 IgG 为二抗,采用间接 ELISA 法检测抗血清的效价。

1.8 吗啡镇痛效应检测 空白对照组皮下注射等体积的生理盐水,其他各组分别皮下注射 6 mg/kg (0.01 ml/g) 的吗啡溶液。30 min 后进行镇痛效应检测。方法和条件都同于基础痛阈的检测。

1.9 吗啡耐受模型的建立及耐受检测 空白对照组给予等体积 NS,其他各组分别皮下注射 30 mg/kg (0.01 ml/g) 吗啡溶液,一日 3 次(8:00,14:00,20:00),连续 3 d。第 4 日上午 8:00 采用热板测痛仪检测吗啡镇痛耐受效应;各组分别皮下 6 mg/kg (0.01 ml/g) 的吗啡溶液,30 min 后进行痛反应

检测。

1.10 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析,组间比较用 LSD 分析,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标志。

2 结果

2.1 效价测定 首次免疫 2 周后平均抗血清效价达 1:1 000 以上,加强免疫 1~2 周后平均抗血清效价达 1:10 000,说明 GST-CART₅₅₋₁₀₂ 蛋白疫苗具有良好的免疫原性。CART 蛋白疫苗 5 μ g 组、10 μ g 组、20 μ g 组抗体效价比较:10 μ g > 20 μ g > 5 μ g (图 1)。

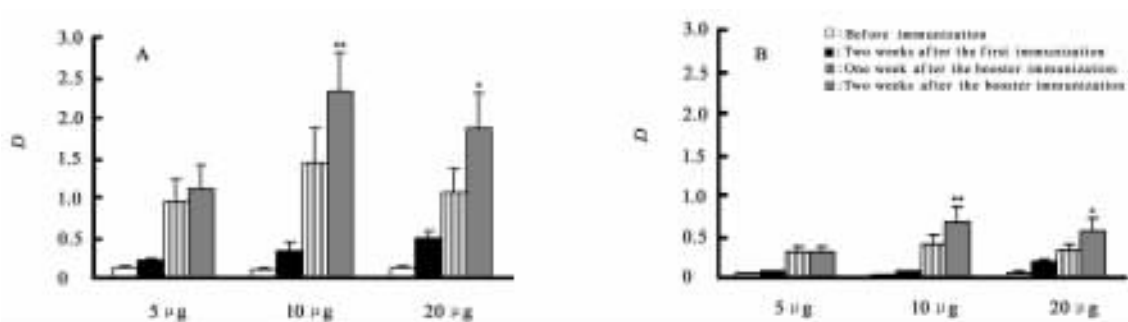


图 1 1:1 000(A)及 1:10 000(B)稀释时各疫苗组不同时间段的 D 值比较

Fig 1 Comparison of D values in vaccine groups at different time points when diluted at 1:1 000(A) or at 1:10 000(B)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 5 μ g group 2 weeks after the booster immunization. $n=9, \bar{x} \pm s$

2.2 CART 疫苗对痛反应的影响 加强免疫 1 周后实验各组痛阈的变化,经单因素方差分析,各组间不存在显著性差异($P > 0.05$),GST+弗氏佐剂组 MPE% (-10.75)与空白组(1.69)比有所降低,但无显著性差异($P > 0.05$),表明初次和加强免疫对小鼠的基础痛阈无明显影响。

2.3 CART 蛋白疫苗对小鼠吗啡镇痛的影响 在建立耐受模型前,检测 6 mg/kg 吗啡的镇痛作用,与空白对照组相比较,除 CART 蛋白疫苗 10 μ g 组外,其他各组的 MPE% 都显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与生理盐水组比较,GST+弗氏佐剂组、CART 蛋白疫苗 5 μ g 组和 20 μ g 组 MPE% 差异没有统计学意义($P > 0.05$),而 CART 蛋白疫苗 10 μ g 组的吗啡镇痛作用(MPE% 37.99),显著低于生理盐水组(MPE% 94.51, $P < 0.05$)。

2.4 CART 蛋白疫苗对吗啡诱导的痛觉耐受的影响 耐受模型建立后,6 mg/kg 吗啡的镇痛作用,与空白对照组比较,实验各组 MPE% 均显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与生理盐水组相比,GST+弗氏

佐剂组、CART 蛋白疫苗 5 μ g 组和 20 μ g 组 MPE% 的变化无明显差异($P > 0.05$),而 10 μ g 组的 MPE% 显著增加(MPE%:生理盐水组为 -33.73, 10 μ g 组为 7.83, $P < 0.05$)。

3 讨论

本实验结果表明,CART 蛋白疫苗和免疫操作对小鼠 MPE% 没有显著影响。对比空白组,GST+弗氏佐剂组 MPE% 值降低最明显,这可能是由于免疫反应激活粒细胞、巨噬细胞和 T 细胞等免疫细胞释放 TNF- α 、IL-1、IL-6 等致痛因子,所导致的痛觉过敏^[13-14]。同时,相对 GST 组,3 种剂量的 CART 疫苗组 MPE% 值呈现剂量依赖性增高,可能是由于在 GST 和 CART 连接处有水解位点,在体内出现部分水解,从而导致体内局部 CART 水平的升高,而 CART 本身具有镇痛效应^[6-7],从而拮抗了 TNF- α 、IL-1、IL-6 等致痛因子所产生的痛觉过敏效应。

对于 CART 肽在吗啡镇痛过程中作用,Damaj 等^[8]研究表明,利用甩尾动物模型,脊髓鞘内注射

CART₅₅₋₁₀₂,剂量依赖性增强了吗啡镇痛效应。且这种增强效应可被非选择性阿片受体阻断剂纳洛酮所逆转,进一步说明 CART₅₅₋₁₀₂在脊髓水平不直接干预痛觉的传递,但能协同阿片类药物抑制疼痛信息的传导,表明 CART 肽对阿片受体功能具有调节作用。本实验结果显示,CART 疫苗对吗啡镇痛作用具有拮抗效应。中等剂量(10 μg 组)时效应最强。这与 ELSIA 结果中该剂量组抗体滴度最高相吻合。注射 CART 疫苗导致 CART 抗体的产生,CART 抗体结合内源性 CART 肽,使其浓度降低,进而削弱其对吗啡镇痛的协同作用,可能是 CART 疫苗对抗吗啡镇痛的内在机制之一。

耐受实验结果表明,3 d 的重复性吗啡处理,导致显著的镇痛耐受。对比生理盐水组,疫苗组显示出抗耐受的潜力,且 10 μg 组效应最强。有研究表明 ICV 注射抗 CART 抗体,可引起海马、尾状核等脑结构中 μ 阿片受体的表达上调^[9]。受 CART 系统激活的某些递质系统如阿片系统,在内源性 CART 系统活性下降时(如注射抗 CART 抗体或本实验中的注射 CART 疫苗),这些系统活性也会随之下降,μ 阿片受体的表达上调可能正是以一种代偿的形式来抵消下降。这可能正是 CART 疫苗抗吗啡镇痛耐受的机制之一。

总之,随着 CART 肽受体的鉴定及吗啡镇痛耐受机制的深入研究,CART 蛋白疫苗在吗啡镇痛、耐受中的调节机制将最终得以阐明。

[参考文献]

- [1] Douglass J, McKinzie A A, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine[J]. *J Neurosci*, 1995, 15(3 Pt 2): 2471-2481.
- [2] Kuhar M J, Adams L D, Hunter R G, Vechia S D, Smith Y. CART peptides[J]. *Regul Pept*, 2000, 89(1-3): 1-6.
- [3] Vicentic A, Jones D C. The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 320: 499-506.
- [4] Kuhar M J, Adams S, Dominguez G, Jaworski J, Balkan B. CART peptides[J]. *Neuropeptides*, 2002, 36: 1-8.
- [5] Ohsawa M, Dun S L, Tseng L F, Chang J, Dun N J. Decrease of hindpaw withdrawal latency by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide to the mouse spinal cord[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 399(2-3): 165-169.
- [6] Damaj M I, Martin B R, Kuhar M J. Antinociceptive effects of supraspinal rat cart₅₅₋₁₀₂ peptide in mice[J]. *Brain Res*, 2003, 983(1-2): 233-236.
- [7] Bannon A W, Seda J, Carmouche M, Francis J M, Jarosinski M A, Douglass J. Multiple behavioral effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptides in mice: CART₁₄₂₋₈₉ and CART₄₉₋₈₉ differ in potency and activity[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299: 1021-1026.
- [8] Damaj M I, Hunter R G, Martin B R, Kuhar M J. Intrathecal CART₅₅₋₁₀₂ enhances the spinal analgesic actions of morphine in mice[J]. *Brain Res*, 2004, 1024: 146-149.
- [9] Rothman R B, Vu N, Wang X, Xu H. Endogenous CART peptide regulates mu opioid and serotonin 5-HT_{2A} receptors[J]. *Peptides*, 2003, 24: 413-417.
- [10] 何慧, 由振东, 王永久. 慢性吗啡处理加强可卡因-苯丙胺调节转录肽 mRNA 在大鼠下丘脑的表达[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2002, 11: 95-99.
- [11] Bohn L M, Lefkowitz R J, Caron M G. Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice[J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 10494-10500.
- [12] Bohn L M, Lefkowitz R J, Gainetdinov R R, Peppel K, Caron M G, Lin F T. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2[J]. *Science*, 1999, 286: 2495-2498.
- [13] Arruda J L, Sweitzer S, Rutkowski M D, DeLeo J A. Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat; possible immune modulation in neuropathic pain[J]. *Brain Res*, 2000, 879(1-2): 216-225.
- [14] Shavit Y, Wolf G, Goshen I, Livshits D, Yirmiya R. Interleukin-1 antagonizes morphine analgesia and underlies morphine tolerance[J]. *Pain*, 2005, 115: 50-59.

[本文编辑] 尹 茶