

阿片类药物对 NG108-15 细胞 Ca²⁺ / 钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II 信息通路的作用

郭庆民, 刘景生*

(中国协和医科大学, 中国医学科学院基础医学研究所药理室, 北京 100005)

摘要: 目的 观察阿片类依赖时 Ca²⁺ / 钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II 信息通路的变化。方法 以 NG108-15 细胞作为体外的细胞模型, 分别用竞争性蛋白结合法及放射免疫法、PDE 法、^γ-³²P 参入法测定 cAMP 水平、钙调蛋白 (CaM) 活性和钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaMK II) 活性。结果 DPDPE 作用 NG108-15 细胞 48 h 可使细胞浆和细胞核 CaM 和 CaMK II 活性升高, 该变化可被 CaM 特异性拮抗剂 W-7 所抑制; CaMK II 特异性抑制剂 KN-62 可抑制 CaMK II 活性的增高, 而对 CaM 活性无明显影响。DPDPE 作用 NG108-15 细胞 48 h 后, 加入纳洛酮, CaM 活性、CaMK II 活性进一步增高。结论 Ca²⁺ / CaMK II 信息通路参与了阿片依赖的机制。

关键词: 阿片类药物; 钙调蛋白; 钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II

中图分类号: R338; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2001)09 - 0652 - 05

阿片类药物的显著特点是能够引起耐受、依赖和成瘾。而有关阿片依赖的细胞和分子机制仍不清楚, 有关的研究报道尚不多^[1]。本研究在以往工作的基础上, 研究在阿片依赖时, Ca²⁺ / 钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (calmodulin dependent protein kinase, CaMK II) 信息通路变化^[1]。

NG108-15 细胞是一种小鼠神经母细胞瘤和大鼠胶质细胞瘤的杂交细胞株, 表现出一系列神经元的性质, 可以表达 δ 阿片受体 (DOR), CaMK II 及其他的 G 蛋白偶联的受体。在细胞和分子水平研究阿片受体的信号转导过程中, NG108-15 细胞是一有效的工具。

本研究观察 DPDPE 长时程作用 NG108-15 细胞后, 细胞浆和细胞核钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 及 CaMK II 活性的变化, 并选择 CaM 特异性拮抗剂 W-7 及 CaMK II 特异性抑制剂 KN-62, 与不同浓度的阿片激动剂同时作用于 NG108-15 细胞, 观察阿片类药物依赖时, Ca²⁺ / CaMK II 信息通路活性的变化。

材料与 方法

试剂 D-Pen², D-Pen²-enkephalin, W-7, KN-62,

Naloxone, cAMP 和 CaM 标准, syntide-2, ATP, 活性炭 (100 - 200 目), 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 二硫苏糖醇 (DTT), HAT 为 Sigma 公司产品。[^γ-³²P]ATP (18.5 × 10¹³ Bq · mmol⁻¹) 为亚辉公司产品, ³H-cGMP (81.4 × 10¹⁰ Bq · mmol⁻¹), ³H-cAMP (10.29 × 10¹¹ Bq · mmol⁻¹) 为原子能所产品, PPO 和 POPOP 为 Fluka 公司产品, Tris 和 HEPES 为 Boehringer Mannheim 公司产品, 高糖 DMEM, L-谷氨酰胺购自 Gibco/BRL 公司, 其余为国产分析纯。

细胞为小鼠神经母细胞瘤和大鼠神经胶质瘤杂交瘤 NG108-15 细胞株, 由美国 UCSF Cell Culture Facility 的 Dr. Tuet 惠赠。

钙调蛋白 (CaM) 活性测定 (1) 样品制备: 将 NG108-15 细胞以每孔 2 × 10⁵ 细胞接种于 12 孔培养板。加药处理 48 h 后进行 CaM 测定。全细胞 CaM 样品制备用 50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (含 1 mmol · L⁻¹ EGTA, pH 7.0) 0.4 mL 稀释, 超声破碎, 取部分进行蛋白测定, 其余 100 °C 煮沸 5 min, 4 °C 12 000 r · min⁻¹, 30 min 离心, 取上清液, 用 4.5 mmol · L⁻¹ CaCl₂ 进行对半稀释, 4 °C 保存。细胞核 CaM 样品制备用 PBS 洗后细胞核提取液 A (50 mmol · L⁻¹ KCl, 1 mmol · L⁻¹ PMSF, 0.1 mmol · L⁻¹ DTT, 25 mmol · L⁻¹ HEPES pH 7.8, 0.5 % NP-40) 500 μL 加入细胞管, 移液器吹散后, 冰浴放置 4 min, 12 000 r · min⁻¹ × 1 min, 取沉淀, 加缓冲液 B (不含 NP-40, 其余同 A) 500 μL 进行洗涤, 然后加入 50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (含 1

收稿日期: 2001-3-30.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770852).
作者简介: 郭庆民 (1973 -), 女, 博士研究生;
刘景生 (1936 -), 男, 教授, 博士生导师.
* 通讯作者 Tel: (010) 65296403, Fax: (010) 65240529,
E-mail: jslu@public.bta.net.cn

mmol·L⁻¹ EGTA, pH 7.0) 0.4 mL 稀释。其余同全细胞 CaM 样品制备。(2) 活性测定: 利用 PDE 法测定^[2]。加样顺序为 100 μL 测定缓冲液(45 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 45 mmol·L⁻¹ 咪唑, 5.5 mmol·L⁻¹ 乙酸镁, pH 7.5), 20 μL 4.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂(或 4.5 mmol·L⁻¹ EGTA), 10 u PDE(20 μL), 100 μL calmodulin 样品和 50 μL ³H-cGMP (8.0 - 11.4 × 10² Bq·min⁻¹)。反应体系置入 30 °C 水浴 15 min, 100 °C 水浴 3 min 终止反应。冰浴放置 15 min, 加入 2.5 mmol·L⁻¹ 腺苷 700 μL, 上 QAE-Sephadex A-25 色谱柱, 加 4 mL 20 mmol·L⁻¹ 甲酸铵冲洗, 收集 1 mL 洗脱液, 进行液闪测定。

钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaMK II) 活性测定 (1) 细胞浆样品 CaMK II 活性测定: 细胞浆样品处理基本同 CaM, 不进行煮沸及 CaCl₂ 稀释。细胞浆样品测定^[3]: 细胞样品 10 μL, 加入 50 μL 反应液中, 反应液包括: 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.4), 20 μmol·L⁻¹ syntide-2, 1 mg·mL⁻¹ 牛血清白蛋白, 0.1 mmol·L⁻¹ ATP, 3.7 × 10⁴ μBq[γ-³²P]ATP。总钙调蛋白激酶 II 活性测定加 1 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 10 μg·mL⁻¹ Calmodulin。Ca²⁺ 非依赖性 CaMK II 活性测定加 5 mmol·L⁻¹ EGTA。Ca²⁺ 依赖性 CaMK II 活性为总 CaMK 活性与 Ca²⁺ 非依赖性 CaMK II 活性之差。CaMK II 活性用每分钟每 10⁵ 细胞参入 syntide-2 的 ³²P 的 fmol 数表示, 取 20 μL 加至滤膜上, 用 75 mmol·L⁻¹ 磷酸洗 3 次, 乙醇吹干, 液闪仪测定。(2) 细胞核样品 CaMK II 活性测定: 细胞核样品处理: 基本同 CaM, 不进行煮沸及 CaCl₂ 稀释。CaMK II 活性测定^[3] 同上。

cAMP 含量测定 样品制备: 每孔 2 × 10⁵ 细胞接种于 12 孔板。加药处理 48 h 后直接进行 cAMP 测定。弃培养基, 加入 0.5 mL TE buffer (50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 4 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 7.5) 终止反应, 用自制刮匙将孔底细胞刮下, 移入 1.5 mL Eppendorf 管, 细胞超声破碎仪破碎, 取出部分用于蛋白定量, 余置于 100 °C 水浴煮沸 5 min, 4 °C 12 000 × g 离心 5 min, 取上清, -20 °C 保存。cAMP 测定: 利用竞争性结合蛋白法测定。

蛋白测定 用牛血清白蛋白作为标准, 利用考马斯亮蓝法进行测定。

统计方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, DPDPE + W7, DPDPE + KN62 与 DPDPE 组实验数据对比用 "Student" *t*-test 进行计算, 不同程度的 DPDPE 组间实验数据用 LSD 方差分析法作统计处理。P < 0.05

表示有统计学意义。

结 果

1 DPDPE 长时程作用于 NG108-15 细胞对 cAMP 水平的影响

DPDPE 长时程作用于 NG108-15 细胞, cAMP 显著升高, 加入 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 纳洛酮作用 0.5 h 后, cAMP 水平反跳性增高。本实验结果和文献^[6]报道一致, 此现象是 NG108-15 细胞形成阿片类药物依赖的标志之一(图 1)。

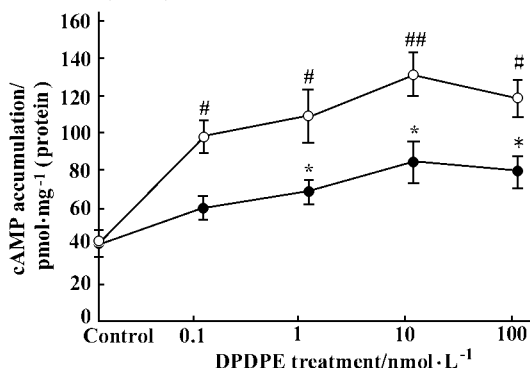


Figure 1 Effects of DPDPE on cAMP accumulation in NG108-15 cells. Cells were incubated in 0.1 - 100 nmol·L⁻¹ DPDPE for 48 h, then treated with or without naloxone for 15 min. cAMP level was measured using ³H-cAMP binding protein assay
n = 2, $\bar{x} \pm s$. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control of DPDPE treatment groups; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs control of DPDPE + naloxone treatment groups.
●—● DPDPE; ○—○ DPDPE + naloxone

2 DPDPE 长时程作用 NG108-15 细胞对 CaM 活性的影响

DPDPE 各用药组长时程作用于 NG108-15 细胞, 细胞浆 CaM 活性显著升高。当加入 CaM 特异性拮抗剂 W7, CaM 活性和未加 W7 的各组相比显著降低。而同时加入 10 μmol·L⁻¹ CaMK II 特异性抑制剂 KN62^[5], CaM 活性和未加 KN62 的各组相比无明显变化(图 2)。

DPDPE 各用药组长时程作用于 NG108-15 细胞, 细胞核 CaM 活性升高。当加入 CaM 特异性拮抗剂 W7, CaM 活性和未加 W7 的各组相比显著降低。加入 CaMK II 抑制剂 KN62, CaM 活性和未加 KN62 的各组相比无明显变化(图 3)。

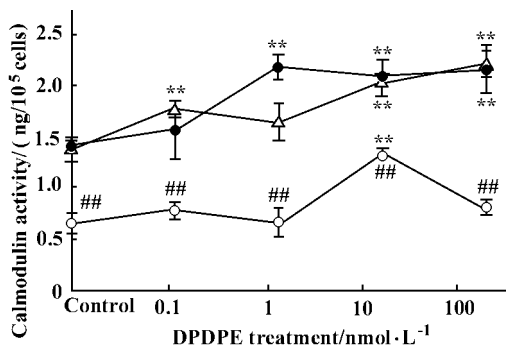


Figure 2 Effects of DPDPE on cytoplasm calmodulin activity in NG108-15 cells. Cells were treated with 0.1 - 100 nmol·L⁻¹ DPDPE, DPDPE and 10 μmol·L⁻¹ W7, DPDPE and 10 μmol·L⁻¹ KN62 for 48 h
n = 4, $\bar{x} \pm s$. ** P < 0.01 vs control; ## P < 0.01 vs DPDPE group. ●—● DPDPE; ○—○ DPDPE + W7; △—△ DPDPE + KN62

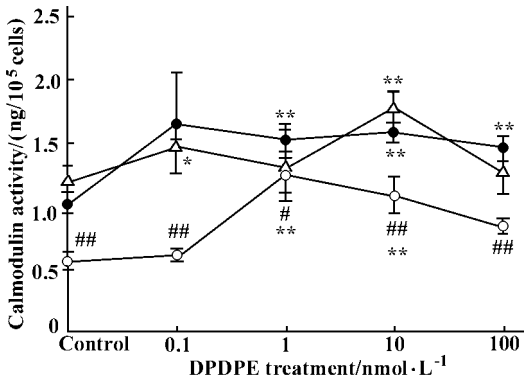


Figure 3 Effect of DPDPE on nuclear calmodulin activity in NG108-15 cells. Cells were treated with 0.1 - 100 nmol·L⁻¹ DPDPE, DPDPE and 10 μmol·L⁻¹ W7, DPDPE and 10 μmol·L⁻¹ KN62 for 48 h
n = 4, $\bar{x} \pm s$. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs DPDPE group. ●—● DPDPE; ○—○ DPDPE + W7; △—△ DPDPE + KN62

3 DPDPE长时程作用 NG108-15 细胞对 CaMK II 活性的影响

DPDPE 长时程作用于 NG108-15 细胞后,细胞浆 CaMK II 活性明显升高。当加入 CaM 特异性拮抗剂 W7,细胞浆 CaMK II 活性和未加 W7 的各组相比显著降低。而加入 CaMK II 特异性抑制剂 KN62,细胞浆 CaMK II 活性和未加 KN62 的各组相比也下降,100 nmol·L⁻¹ 剂量组差异具有显著性(图 4)。

NG108-15 细胞给予 DPDPE 48 h 后观察各不同处理组,细胞核 CaMK II 活性明显升高。当加入 CaM 特异性拮抗剂 W7,细胞核 CaMK II 活性和未加 W7 的各组相比显著降低。而加入 CaMK II 抑制剂 KN62,细胞核 CaMK II 活性和未加 KN62 的各组相

比明显降低(图 5)。

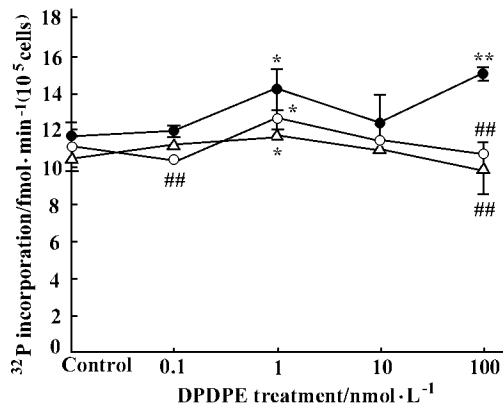


Figure 4 Effect of DPDPE on cytoplasm CaMK II activity in NG108-15 cells. Cells were treated with 0.1 - 100 nmol·L⁻¹ DPDPE, DPDPE and 10 μmol·L⁻¹ W7, DPDPE and 10 μmol·L⁻¹ KN62 for 48 h
n = 4, $\bar{x} \pm s$. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control; ## P < 0.01 vs DPDPE group. ●—● DPDPE; ○—○ DPDPE + W7; △—△ DPDPE + KN62

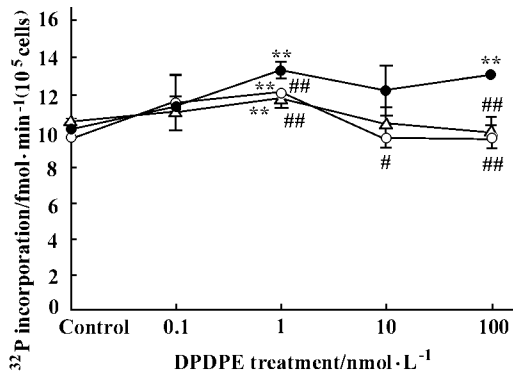


Figure 5 Effect of DPDPE on nuclear CaMK II activity in NG108-15 cells. Cells were treated with 0.1 - 100 nmol·L⁻¹ DPDPE, DPDPE and 10 μmol·L⁻¹ W7, DPDPE and 10 μmol·L⁻¹ KN62 for 48 h
n = 4, $\bar{x} \pm s$. ** P < 0.01 vs control; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs DPDPE group. ●—● DPDPE; ○—○ DPDPE + W7; △—△ DPDPE + KN62

4 纳洛酮诱发阿片戒断时对 CaM 及 CaMK II 活性的影响

在 NG108-15 细胞中加入 DPDPE 处理 48 h 之后,加入纳洛酮 15 min,收集细胞,进行 CaM 活性测定,发现细胞浆和细胞核中 CaM 活性显著增高;与 DPDPE 处理组相比,细胞浆和细胞核中 CaM 活性升高,在高剂量组差异具有显著性(图 6)。

图 7 中,DPDPE 长时程作用于 NG108-15 细胞,再加入纳洛酮诱发戒断,细胞浆和细胞核 CaMK II 活性升高;与 DPDPE 组相比,差异具有显著性。

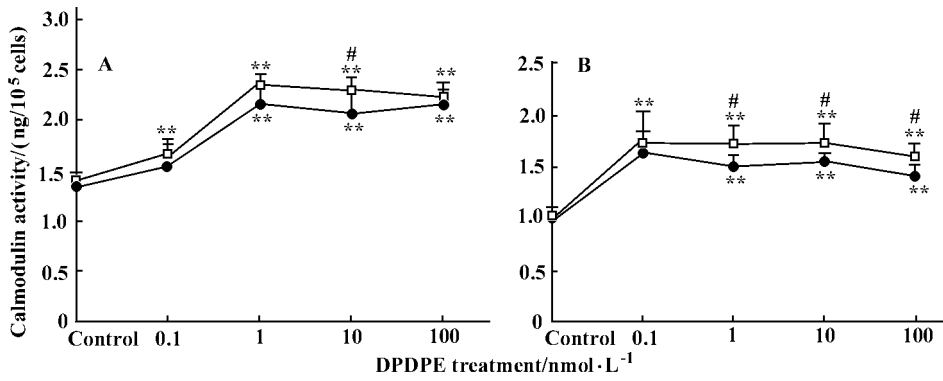


Figure 6 Effect of naloxone withdraw on calmodulin activity in 0.1 - 100 nmol·L⁻¹ DPDPE treatment NGL08-15 cells. Cells were treated DPDPE for 48 h, added naloxone for 15 min
A. Calmodulin activity in cytoplasm, B. Calmodulin activity in nucleus. $n = 4, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, DPDPE groups vs DPDPE + naloxone groups. ●—● DPDPE; □—□ DPDPE + naloxone

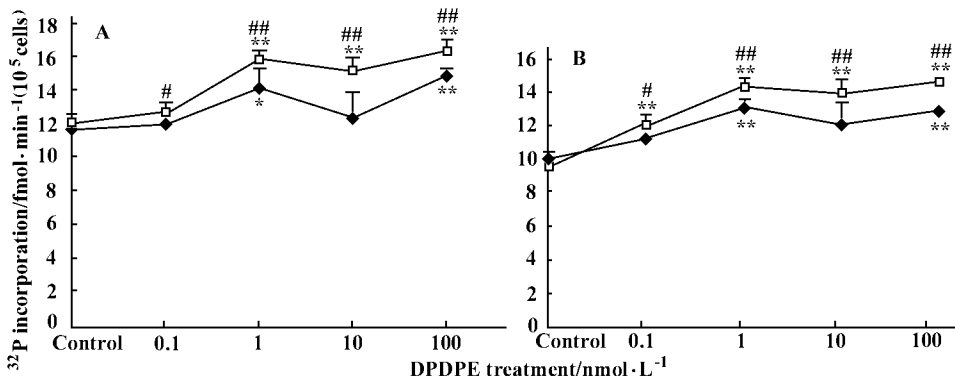


Figure 7 Effect of naloxone withdraw on CaMK II activity in 0.1 - 100 nmol·L⁻¹ DPDPE treatment NGL08-15 cells. Cells were treated DPDPE for 48 h, and added naloxone for 15 min
CaMK II activity in cytoplasm, B. CaMK II activity in nucleus. $n = 4, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ DPDPE groups vs DPDPE + naloxone groups. ◆—◆ DPDPE; □—□ DPDPE + naloxone

讨 论

在本实验中,首先观察 DPDPE 作用于 NGL08-15 细胞对 cAMP 水平的影响。DPDPE 长时程作用 NGL08-15 细胞(即 48 h)后,cAMP 水平明显升高;加入纳洛酮后,可测得细胞 cAMP 反跳性升高,是 NGL08-15 细胞形成阿片依赖的标志,因此 DPDPE 长时程作用的 NGL08-15 细胞可作为体外阿片依赖的细胞模型。利用这些细胞可进行 Ca²⁺/CaMK II 信号通路的研究。

本研究发现 DPDPE 长时程作用引起 NGL08-15 细胞中细胞浆和细胞核 CaM 活性和 CaMK II 活性升高,此时,加入纳洛酮诱发阿片的戒断症状,CaM 活性和 CaMK II 活性进一步升高。提示 DPDPE 长时程作用于 NGL08-15 细胞,Ca²⁺/CaMK II 信息通路活性

上调。CaM 拮抗剂 W-7 可抑制 CaM 活性和 CaMK II 活性的增高,CaMK 抑制剂 KN62 可抑制细胞浆和细胞核 CaMK II 活性增高,而对 CaM 活性无影响,证明 Ca²⁺/CaMK II 信息通路参与了阿片依赖的机制。

本室以前对于阿片依赖时细胞内 AG-cAMP 通路、NO-cGMP 通路以及[Ca²⁺]_i系统的变化进行了深入的探讨^[6],本研究在以往的工作基础上,观察 DPDPE 长时程作用引起 NGL08-15 细胞细胞浆和细胞核 Ca²⁺/CaMK II 信息通路的变化,企图揭示阿片依赖时,细胞核内细胞信号转导的机制。在本实验中,DPDPE 长时程作用 NGL08-15 细胞,细胞核内 CaM 活性和 CaMK II 活性增高。药物的长时程作用可能影响基因的转录和相关蛋白翻译后修饰。文献报道 CaMK II 可磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)^[7],CREB 参与了阿片成瘾过程^[8];有报道

CaMK II 也参与了阿片受体脱敏这种动物阿片类依赖的细胞机制^[9];在 NG108-15 细胞中,阿片类药物通过 δ 阿片受体刺激细胞内 CREB 的磷酸化,有 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 和 PKC 通路的参与^[10]。在该实验中,阿片类药物长时程作用引起细胞核内 CaM 活性和 CaMK II 活性增高,推测在阿片类依赖时, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMK II}$ 通路活性增高可能通过影响转录因子参与阿片类依赖机制。

REFERENCES:

- [1] Fan GH, Zhang WB, Yao CP, *et al.* Modulation by Calcium/calmodulin dependent protein kinase II of functional response of delta opioid receptor in neuroblastoma \times glioma hybrid (NG108-15) cells [J]. *Neuropharmacology*, 1997, **36**:1763 - 1769.
- [2] Liu JS, Liu Y, Chin YC. Preparation and assay of calmodulin [J]. *Acta Acad Med Sin* (in Chinese), 1985, **7**: 453 - 458.
- [3] Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, *et al.* Activity of cAMP dependent protein kinase and $\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulin}$ dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, **42**:254 - 261.
- [4] Mazur A, Roden DM, Anderson ME. Systemic administration of calmodulin antagonist W7 or protein kinase A inhibitor H-8 prevents torsade de pointes in rabbits [J]. *Circulation*, 1999, **100**:2437 - 2442.
- [5] Wei J, Wayman G, and Storm DR. Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin dependent protein kinase II *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**:24231 - 24235.
- [6] Zang MW, Meng AM, Shen Q, *et al.* Blockage of the development of opioid tolerance and dependence by methylene blue [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1999, **34**(8):576 - 581.
- [7] Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, *et al.* Calcium/calmodulin dependent protein kinase II and IV differently regulate CREB dependent gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, **14**:6107 - 6116.
- [8] Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, *et al.* CREB (cAMP response element binding protein) in the locus coeruleus: Biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence [J]. *J Neurosci*, 1997, **17**:7890 - 7901.
- [9] Lou L, Zhou T, Wang P, *et al.* Modulation by calcium/calmodulin dependent protein kinase II activity by acute and chronic morphine administration in rat hippocampus: differential regulation of alpha and beta isoforms [J]. *Mol Pharmacol*, 1999, **55**:557 - 563.
- [10] Bilecki W, Holtt V, Przewlocki R. Acute delta-opioid receptor activation induces CREB phosphorylation in NG108-15 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, **390**(1):1 - 6.
- [11] Badminton MN, Kendall JM, Rembold CM, *et al.* Current evidence suggests independent regulation of nuclear calcium [J]. *Cell Calcium*, 1998, **23**(2/3):79 - 86.

EFFECTS OF OPIOIDS ON $\text{Ca}^{2+}/\text{CALMODULIN}$ DEPENDENT PROTEIN KINASE SIGNAL PATHWAY IN NG108-15 CELLS

GUO Qing-min, LIU Jing-sheng

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

ABSTRACT: **AIM** To observe the change of $\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulin}$ dependent protein kinase II (CaMK II) signal pathway in opioid dependent NG108-15 cells. **METHODS** NG108-15 cells were used as an *in vitro* model system. Competitive protein binding assay and radioimmunoassay were used to examine the intracellular cAMP accumulation. Calmodulin activity was assayed by PDE method. CaMK II activity was assayed by $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ incorporation of syntide-2. **RESULTS** DPDPE long-term treatment increased calmodulin activity and CaMK II activity in both cytoplasm and nucleus of NG108-15 cells. Specific calmodulin antagonist W7 was found to significantly inhibit the elevation of calmodulin and CaMK II activity which resulted from DPDPE long-term treatment, and CaMK II inhibitor KN62 also inhibited elevation of CaMK II activity by DPDPE long-term treatment. When naloxone was added to NG108-15 cells which were long-term treated by DPDPE, calmodulin and CaMK II activity increased, indicating that naloxone withdrawal can increase $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMK II}$ pathway activity. **CONCLUSION** The results indicate that $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMK II}$ pathway was involved in the mechanisms of opioids dependence when DPDPE was long-term administered to NG108-15 cells.

KEY WORDS: opioids; calmodulin; calmodulin dependent protein kinase II