

正常猕猴与树鼩神经系统和免疫系统组织中 大麻素与阿片受体的表达

BACK

张庆余^{1,2}, 范晓娜¹, 曹毅^{1,*}

(1. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 为应用猕猴和树鼩动物模型研究毒品成瘾对神经/免疫系统的影响提供基础数据, 对大麻素及阿片受体在正常猕猴和树鼩神经系统和免疫系统的表达进行初步确定。采集正常猕猴和树鼩新鲜组织(皮质、小脑、脑干、海马、脊髓、脾脏), 应用半定量逆转录 PCR 和实时定量 PCR 的方法检测大麻素与阿片受体 mRNA 在猕猴和树鼩各组织中的表达情况。猕猴脑部各区包括脾脏均表达大麻素受体 1 (CNR1), 而大麻素受体 2 (CNR2) 只表达于脾脏内。三类阿片受体中, μ (μ) 受体表达最为广泛, 在以上各组织中均有表达; δ (δ) 受体表达的组织最少, 只在海马表达; κ (κ) 受体表达介于两者之间, 分别在皮质、小脑、脑干、脊髓中表达。在树鼩组织中, CNR1 和 CNR2 表达于整个大脑重要脑区中, 且 CNR1 表达量高于同一区域内 CNR2 表达的量; 脾脏中 CNR2 的表达较高, 而 CNR1 不表达。三类阿片受体只有检测到 μ 受体在脑部与脾脏表达, 且在各个脑区的表达量明显高于脾脏的表达量; δ 受体和 κ 受体在被检各个组织中均无表达。总体而言, 两种大麻素受体在猕猴和树鼩体内表达情况与人类和鼠的情况类似, 而三类阿片受体在猕猴体内表达情况与人类更为接近。猕猴和树鼩可能可用于人类毒品成瘾的研究; 猕猴在某些神经受体的表达更接近人类, 其在研究毒品成瘾的机理和对免疫系统的影响方面仍有不可替代的地位。

关键词: 猕猴; 树鼩; 大麻素受体; 阿片受体; mRNA 表达; 神经系统; 免疫系统

中图分类号: Q959.832; Q959.842; R338.2; R971.3 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)01-0031-09

Expression of cannabinoid and opioid receptors in nervous as well as immune systems of *Macaca mulatta* and *Tupaia belangeri*

ZHANG Qing-Yu^{1,2}, FAN Xiao-Na¹, CAO Yi^{1,*}

(1. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Kunming Yunnan 650223, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To make *Macaca mulatta* and *Tupaia belangeri* as experimental animals for studying functions of opioid and cannabinoid receptors in drug addiction, we examined expression of the opioid and cannabinoid receptors in nervous and immune system of the two animals. We dissected normal adult *M. mulatta* and *T. belangeri*, collected tissues of cortex, cerebellum, brain stem, hippocampus, spinal cord, and spleen, and then applied the semi-quantitative PCR and real-time quantitative PCR methods to investigate the mRNA expression levels of the opioid and cannabinoid receptors in these tissues. In *M. mulatta*, the cannabinoid receptor 1 (CNR1) mRNA was expressed in the all tissues; in contrast, the cannabinoid receptor 2 (CNR2) mRNA was only present in the spleen. The μ opioid receptor (MOPR) was detected in all tissues, and the κ opioid receptor (KOPR) was found in the cortex, cerebellum, brain stem, and spinal cord, but not in hippocampus and spleen. However, the δ opioid receptor (DOPR) was restrictively expressed in the hippocampus. In *T. belangeri*, CNR1 and CNR2 were expressed in the five regions of the brain. CNR2, but no CNR1, was also detected in the spleen. MOPR was expressed in all examined tissues, and its expression levels in the brain were higher than that in the spleen. DOPR and KOPR were not found in all tissues. Taken together, the expression profiles of cannabinoid receptors in human being, *M. mulatta*, *T. belangeri*, and rat were similar, and the expression patterns of the

收稿日期: 2010-12-06; 接受日期: 2011-01-19

基金项目: 中国科学院基础前沿研究专项项目 (KSCX2-EW-J-23); 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室资助项目

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: caoy@mail.kiz.ac.cn

第一作者简介: 张庆余, 男, 硕士研究生, 研究方向: 毒品成瘾机理, E-mail: zqy0401@hotmail.com

opioid receptors in *M. mulatta* were more close to human beings. The opioid and cannabinoid receptors were expressed in the tissues of nervous and immune systems of *M. mulatta* and *T. belangeri*, and both animals could be used for studying drug addiction. *Macaca mulatta* is still the best experimental animal for drug addiction research because it shows very similar expression profiles of these receptors to human beings.

Key words: *Macaca mulatta*; *Tupaia belangeri*; Cannabinoid receptor; Opioid receptor; mRNA expression; Nervous system; Immune system

对于研究人类神经-精神疾病, 非人灵长类动物模型具有独特优势和不可替代的作用。猕猴作为最常用的非人灵长类实验动物, 已广泛应用于人类神经-精神疾病的研究, 如毒品成瘾、抑郁症等。树鼩是进化上特殊的物种, 其神经系统结构与灵长类较为接近 (Sofroniew et al, 1981; Jiao et al, 2010), 已有树鼩作为实验动物应用于神经系统研究的报道 (Fuchs, 2005; Pawlik et al, 1999; Podlisny et al, 1991)。然而, 在分子水平系统研究毒品成瘾相关的大麻素受体与阿片受体在猕猴和树鼩的表达, 尚未见报道。

毒品成瘾(drug addiction)与各个脑区, 尤其是与学习记忆相关的结构, 如大脑前皮质(PFC)、海马(HIP)、腹侧被盖区(VTA)、伏隔核(NAc)密切相关 (Volkow et al, 2002; Bruijnzeel, 2009; Peters et al, 2009)。一般认为, 毒品成瘾过程中, 毒品中的致瘾成分与神经系统分布的各类受体(阿片受体、大麻素受体)结合(Maldonado, 2010; López-Moreno et al, 2010; Robledo, 2010), 从而改变神经元兴奋性, 最终导致神经可塑性改变, 改变整个神经网络的功能, 引起毒品躯体依赖, 甚至出现心理依赖。其中大麻素受体在参与毒品成瘾过程担当了重要的角色 (López -Moreno et al, 2010; Robledo, 2010)。至今已经发现大麻素受体有两种类型, 大麻素受体 1 (CNR1)和大麻素受体 2 (CNR2)。两种大麻素受体都为七次跨膜的 G 蛋白偶联受体, 人的 CNR1 和 CNR2 氨基酸序列有 44%的同源性, 在跨膜区氨基酸序列同源性达到 68 % (Jean et al, 2010)。CNR1 主要分布于神经系统神经元上, 其余在生殖系统与消化系统也有低的表达; CNR2 主要分布于免疫系统各类细胞膜表面, 是免疫系统特异的大麻素受体, 另外在胶质细胞也有表达, 参与脑部炎症反应的调节 (Jean et al, 2010; Martykánová, 2010)。阿片受体作为阿片类药物作用的经典靶位, 参与阿片类药物成瘾的过程。阿片受体共有三类: $\mu(\mu)$ 受体、 $\delta(\delta)$ 受体和 $\kappa(\kappa)$ 受体。三类阿片受体下有各种亚型,

各种亚型的分布各不相同。尽管三种受体在人体分布不同, 结合各类配体亦有其特异性, 但三类受体均为 G 蛋白偶联受体, 主要分布于神经元细胞, 调节神经网络的功能。亦有报导阿片受体分布于免疫系统的细胞 (Bidlack et al, 2006; Sharp, 2006), 参与细胞因子产生、免疫调节、细胞增殖、细胞凋亡等病理生理过程。

研究大麻素受体和阿片受体在猕猴和树鼩脑区及脾脏的分布情况, 是将两者应用为毒品成瘾动物模型, 研究毒品成瘾机制、毒品成瘾过程免疫系统功能紊乱的前期工作, 具有实际意义。本实验以猕猴和树鼩为实验对象, 采用逆转录 PCR(RT-PCR)的方法, 检测大麻素受体和阿片受体在它们脑区及脾脏组织的表达, 为猕猴和树鼩作为神经/免疫系统疾病研究的动物模型提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

冷冻离心机, Bio-Rad Mycycler PCR 仪, ABI stepone plus 实时定量 PCR 仪, 百泰克 Highpure RNase-free 总 RNA 提取试剂盒, pormega 反转录试剂盒, RNase free PCR 管, sigma jumpstart taq 酶, SYBR green I, DNTP。

1.2 实验动物

2 只正常成年猕猴, 年龄分别是 11 岁和 3.5 岁, 体重分别为 41.5 kg 和 35 kg。正常喂养成年树鼩 5 只, 体重 120~160 g。实验动物实验前未给过任何药物。实验动物由中国科学院昆明动物研究所实验动物中心提供[SCXK (滇) 2008-0001], 所有动物均按照动物饲养要求及动物福利进行饲养。

1.3 实验方法

1.3.1 解剖取材

在动物进食前, 空腹注射 3%戊巴比妥钠(1.2 mL/kg), 麻醉后处死。取出脑组织, 分别采取大脑皮质、小脑、海马、中脑、脊髓。脾脏组织也被采取。所有新鲜组织装入 1.5 mL RNase-free 的管子,

冻存于液氮中备用。

1.3.2 反转录

将冻存于液氮中的组织取出，放入预冷的研钵中，捣成块，取大约 50 mg 样品，其余装回管子。加液氮到研钵中将组织研磨成粉后，加 1 mL 裂解液(百泰克总 RNA 提取试剂盒)，边裂解边研磨，充分研磨后将匀浆收集装入 RNase-free 1.5 mL 管子，静置 5 min。以后步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。收集到的 RNA 进行 RNA 定量及电泳检测其质量。取 2~3 μg RNA 逆转成 cDNA。50 μL 逆转体系包括：5 μL 100 μmol/L 的 6 碱基随机引物、2 μL 逆转录酶(promega 公司)、2.5 μLDNTP mixture(10 mmol/L, 上海生工)、0.7 μLRNA 酶抑制剂 (takara 公司)、无 RNA 酶水(RNase-free H₂O) 4.8 μL。37℃

保温 1 h 以上，使 RNA 逆转，得到的 cDNA 用做 PCR 模板。

1.3.3 引物设计挑选

由于树鼩基因组测序没有完成，现在 GeneBank 尚无法获得各种基因的 cDNA 序列。因此，通过对比人、猕猴、大鼠、小鼠大麻素受体 mRNA 序列找出保守区域，确定引物位置，设置通用引物来对相应的受体进行扩增。设计好并合成的引物通过 PCR 检测，选择扩增效率高、特异性好的引物来检测各组织中相应受体 mRNA 的表达。两种大麻素受体和三种阿片受体的通用引物设计过程与大麻素受体通用引物设计过程一样。各受体 PCR 通用引物序列见表 1。

表 1 实验中所用的引物序列
Tab. 1 The primers used in the study

受体 Receptors	正向序列 Forward primer	反向序列 Reversed primer	产物长度 Products length (bp)
CNR1	5'AGTATGCTCTGCCTGCTGAA3'	5'GAGTCCCCCATGCTGTTATC3'	140
CNR2	5'CCCGTGGGAGGGCACTGGT3'	5'GGCACCTGCCTGTCCTGGT3'	259
MOPR	5'TCTTCGGAAACTTCCTGGTCA3'	5'TGCAGAGGGTGAATATGCTGG3'	230
DOPR	5'GCCACCAGCACGCTGCCT3'	5'GTTGATCAGCTTGGCCTTGG3'	217
KOPR	5'CCTGGCTTTGGCAGATGCTT3'	5'CATGTTGTAGTAATCAATGGAA3'	127
β-actin	5'GCCCTGAGGCTCTCTTCCA3'	5'CGGATGTCCACGTCACACTT3'	100

CNR1: 大麻素受体 1 (cannabinoid receptor 1); CNR2: 大麻素受体 2 (cannabinoid receptor 2); MOPR: μ型阿片受体 (mu opioid receptor); DOPR: δ型阿片受体 (delta opioid receptor); KOPR: κ型阿片受体 (kappa opioid receptor)。

1.3.4 半定量 PCR

25 μL 的 PCR 反应体系里包括：19.6 μL 双蒸水、2.5 μL 缓冲液、0.5 μL DNTP mixture(10 mmol/L 上海生工)、上下游引物各 0.5 μL、0.4 μL jumpstart taq 酶 (sigma 公司)、1 μL 逆转好的 cDNA 作模板。同时，设置阳性对照和阴性对照。各受体扩增条件为：95℃预热变性 1min; 95℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 70℃ 10 s, 共 20 个循环; 95℃变性 15 s, 55℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 10 s, 根据不同受体的丰度选择不同的扩增循环数(18±2); 70℃后延伸 5 min。β-actin 内参扩增条件为：95℃预热变性 1 min; 95℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 70℃ 10 s, 共 20 个循环; 70℃后延伸 5 min。PCR 扩增完成后取产物 5~8 μL，在含有溴化乙锭(EB)的 2%琼脂糖胶中，120 伏电压电泳 30 min，凝胶成像仪检测。

1.3.5 实时定量 PCR

实时定量 PCR 所用模板和引物与半定量 PCR 相同。实时定量 PCR 反应体系为：19.1 μL 双蒸水、

2.5 μL 缓冲液、0.5 μLDNTP mixture (10 mmol/L 上海生工)、上下游引物各 0.5 μL、0.4 μL jumpstart taq 酶 (sigma 公司)、0.5 μL 10xSYBR green I、1 μL 逆转好的 cDNA 作模板。同时，设置阴性对照以确定 PCR 过程中的本底荧光。每种引物每个样本做重复三管。采用ΔΔct 相对定量的方法，以 β-actin 作为内参，校正目的基因表达，获得目的基因在不同组织间的相对表达量。

2 结 果

2.1 Total RNA 提取与质量检测

分别抽提猕猴、树鼩脑区大脑皮质，小脑、中脑、海马、脊髓样品，抽提的 RNA 测定其浓度，按每孔 200 ng 进行琼脂糖电泳。电泳后，扫胶结果见图 1，18S 核糖体 RNA 和 28S 核糖体 RNA 条带相对完整，没有迷散，两者之间的比值接近 1/2,说明 RNA 的质量较好。

2.2 猕猴组织大麻素受体与阿片受体 mRNA 的表达

猕猴体内,大麻素受体 1 (CNR1)在脾脏及其余脑区内都表达,而大麻素受体 2 (CNR2)只在脾脏内有表达(图 2b,c)。阿片受体, μ 受体在各个脑区和脾脏表达(图 2d); κ 受体在皮质、小脑、脑干、脊髓中表达,在海马与脾脏中不表达见图 2(f); 与 κ 受体

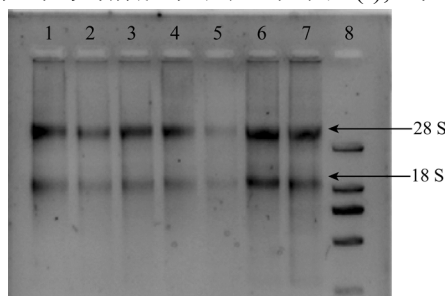


图 1 检查 RNA 的质量

Fig. 1 Quality control of the total RNA extracted

图为 2% 琼脂糖胶 total RNA 电泳图,点样孔所上样品来源依次是 1: 皮质; 2: 小脑; 3: 脑干; 4: 海马; 5: 脊髓; 6: 脾脏; 7: 脾脏; 8 marker(D2000)。The total RNA were separated by gel electrophoresis in 2% agarose. 1: cortex; 2: cerebellum; 3: brain stem; 4: hippocampus; 5: spinal cord; 6: spleen; 7: spleen; 8: marker (D2000).

不同, δ 受体在海马有表达,其余各处未检测到表达(图 2e)。实时定量 PCR 结果与半定量 PCR 结果一致(图 2g)。

2.3 树鼩组织大麻素受体与阿片受体 mRNA 的表达

同样以通用引物扩增树鼩组织来源的 cDNA,两种大麻素和 μ 型阿片受体引物有扩增产物,且扩增长度与猕猴组织 cDNA 扩增得到的产物长度一致。为了进一步确定所得的 PCR 产物是目的基因,对 PCR 产物进行测序,测序结果如表 2。测序结果与 GenBank 中的转录本进行 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 比对, CNR1 BLAST 比对,选取测序可信区域 89 nt 用 BLAST 工具进行序列比对,发现质询范围达到的 88% 时,该序列与小鼠和大鼠序列相似度达到 98%,质询范围达到 91% 时,与人和猴的序列相似度也达到 95%。与其他物种的大麻素受体 1 的序列相似度也较高,最低相似度是 92%(更格卢鼠属),同时没有发现除大麻素受体 1 的其他基因比对上; CNR2 BLAST 比对,选取测序可信区域 236 nt 比对,质询范围达到 97% 时,与人的相似度达到 96%,而质询范围达为 97% 时,与猕猴的相似度达到了 93%,质询范围为到 94%,与小鼠的相似度达到 82%,同时未发现有其他基因比对上; MOPR BLAST 比对结果,选取测序可信区域 175 nt,用 BLAST 工具进行序列比对,质询范围达

到 99% 时,与人和猕猴的序列相似度分别到达 94% 和 93%,而与大鼠和小鼠的相似度分别达到 91% 和 88%,同时亦未发现其他任何基因比对上。这表明

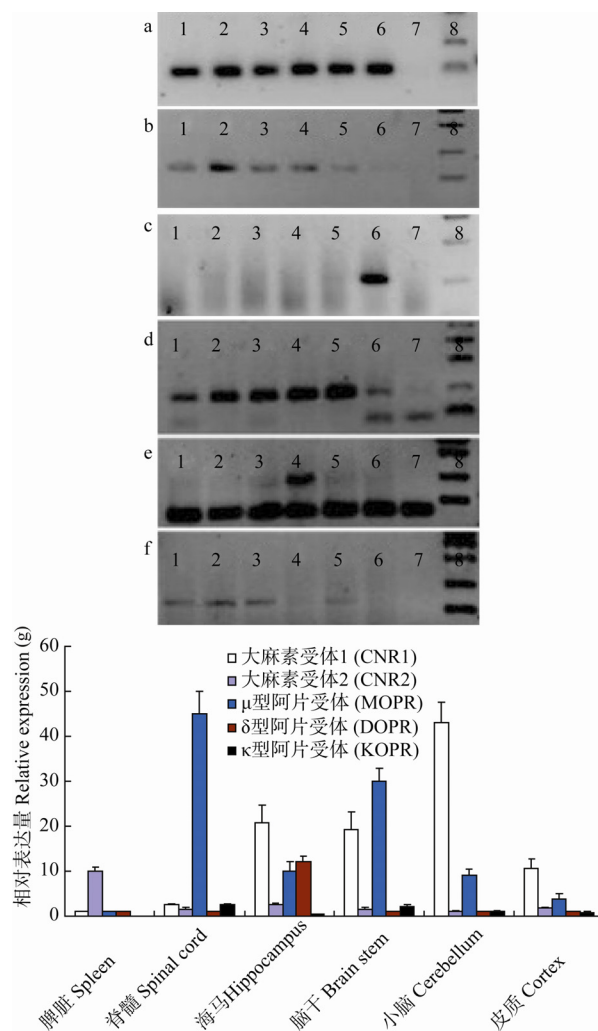


图 2 猕猴大麻素和阿片受体 mRNA 组织间相对表达情况

Fig. 2 Relative expression of cannabinoid and opioid receptors mRNA in the tissues of *Macaca mulatta*

1: 皮质; 2: 小脑; 3: 脑干; 4: 海马; 5: 脊髓; 6: 脾脏; 7: 阴性对照(水); 8: marker (D20000)。a: β -actin (100 bp), 内参表达; b: 大麻素受体 1 (CNR1, 140 bp); c: 大麻素受体 2 (CNR2, 259 bp); d: μ 型阿片受体 (MOPR, 230 bp); e: δ 型阿片受体 (DOPR, 217 bp); f: κ 型阿片受体表达 (KOPR, 127 bp); g: 实时定量 PCR 结果。采用 $\Delta\Delta Ct$ 相对定量的方法, 将脾脏中 CNR1、MOPR、DOPR 受体表达量设定为 1, 小脑中 CNR2、KOPR 受体表达量设定为 1。柱形图显示各受体在猕猴 6 种组织中的分布情况和相对表达量。

1: cortex; 2: cerebellum; 3: brain stem; 4: hippocampus; 5: spinal cord; 6: spleen; 7: negative control (H_2O); 8: DNA marker (D20000)。a: β -actin (100 bp); b: CNR1 (140 bp); c: CNR2 (259 bp); d: MOPR (230 bp); e: DOPR (217 bp); f: KOPR (127 bp); g: The results of the real-time quantitative PCR analysis, The expression of CNR1, MOPR, DOPR in spleen was set to 1 and the expression of CNR2 and KOPR in cerebellum was set as 1 as well, The picture showed the relative expressions of each receptor in the six tissues of *Macaca mulatta*.

表 2 树鼩三类受体 PCR 产物测序结果

Tab. 2 The PCR products sequencing results of three receptors of *Tupaia belangeri*

PCR 产物测序结果 PCR products sequencing results (5'→3')	
大麻素受体 1 (CNR1)	GCCCCTTACCGATCTCTATACTCTGAGGAGCAGGACCTGAGACATGC TTTCCGGAGCATGTTCCCTCGTGTGAAGGCACTGCGCAACCTCTGG ATAACAGCATGGGGGACTCA
大麻素受体 2 (CNR2)	GTTCAGCTACTGACAAGCGTGACTATGACCTTCACAAGCCTCTGTAGGT AGGCTCCTGCTGAACGCCATTGACCGATACCTCTGCCTGCGCTATCCAC CTTCCTACAAAGCTCTGCTCACCCGTGGAAGGGCACTGGTCACCTGG GCATCATGTGGGTCTCTCAGCACTAGTGTCTACCTGCCCTCATGGGA TAGACTTGCTGTCCCAGGCCCTGCTCTGAGCTTTTCCCCTGATCCACAA
μ 型阿片受体 (MOPR)	CGCGTTAACGTATCGATGGAGATCAGATCTTGCAAGGATGGTTCCAAA CGGCCACGTTCCCATTAGGTAATTGACACTCTGGAAGGGCAGGGTACTT GTTGCTAAAGCGTCTGCCAGGGCAAGGTTGAAAATGTAGATGTTGGTGG CAGTCTTCATTTTGGTGATCTGACATCACGTACATGACCAGGAAGTTT CCGAAGAA

表 3 各受体 mRNA 在猕猴与树鼩神经系统和免疫系统主要组织表达情况

Tab. 3 Expression profiles of the receptors at mRNA level in the nervous and immune systems of *Macaca mulatta* and *Tupaia belangeri*

物种和组织 Species and tissues	大麻素受体 Cannabinoid receptors		阿片受体 Opioid receptors		
	CNR1	CNR2	MOPR	DOPR	KOPR
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>					
皮质 Cortex	+++	—	+	—	+
小脑 Cerebellum	++	—	+	—	+
脑干 Brain stem	++	—	++	—	+
海马 Hip	++	—	+	++	—
脊髓 Spinal cord	+	—	+++	—	+
脾脏 Spleen	+	++	+	—	—
树鼩 <i>Tupaia belangeri</i>					
皮质 Cortex	+	++	++	—	—
小脑 Cerebellum	+	+	+++	—	—
脑干 Brain stem	+	+	+	—	—
海马 Hip	+	+	+	—	—
脊髓 Spinal cord	+++	+	+	—	—
脾脏 Spleen	—	+	+	—	—

+: mRNA 表达 (Positive mRNA expression); —: mRNA 不表达 (Negative mRNA expression)。

三种扩增产物序列与目的基因的同源基因序列是高度相同的图 3 (a,b,c)。因此, 认为通用引物扩增得到的 PCR 产物就是来源于对目的基因的扩增。通过 PCR 检测树鼩组织中三类受体表达, 发现大麻素受体 1 (CNR1)除在脾脏外, 其余脑区都表达; 大麻素受体 2 (CNR2)在各个脑区, 包括脾脏均有表达 (图 4b,c); 而阿片受体, 仅检测到μ受体的在各个脑和脾脏表达, 其余二类阿片受体无检测到表达 (图 4d, e, f)。实时定量 PCR 结果与半定量 PCR 结果基本一致(图 4g)。

3 讨 论

人类神经-精神疾病, 如毒品成瘾, 是严重的

社会健康问题。毒品成瘾涉及多个神经受体, 如大麻素受体与阿片受体等。毒品成瘾可导致严重神经-精神严重异常, 也影响机体免疫功能。研究神经系统和免疫系统组织中毒品成瘾相关受体的表达和分布, 对阐明毒品的神经-精神损伤及免疫异常机理有实际意义。逆转录 PCR(RT-PCR)是研究 mRNA 表达的常用方法, 其敏感性和特异性都较高。本课题应用半定量和定量 RT-PCR 方法, 研究猕猴与树鼩神经系统和免疫系统组织中大麻素受体与阿片受体的表达情况。脾脏含有各型免疫细胞, 在免疫器官中最具代表性, 且取材容易。在本研究中我们用脾脏作为免疫系统的代表。我们的结果表明: 猕猴体内大麻素受体 1 (CNR1) mRNA 在各个脑区和

a

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY522555.1	Mus musculus striatal cannabinoid receptor type 1 protein (Cnr1) gei	141	141	88%	5e-31	98%	
AY522554.1	Mus musculus striatal cannabinoid receptor type 1 protein (Cnr1) mR	141	141	88%	5e-31	98%	UG
NM_007726.3	Mus musculus cannabinoid receptor 1 (brain) (Cnr1), mRNA	141	141	88%	5e-31	98%	UEGM
BC079564.1	Mus musculus cannabinoid receptor 1 (brain), mRNA (cDNA clone MG	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
BC075644.1	Mus musculus cannabinoid receptor 1 (brain), mRNA (cDNA clone IM	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
BC070447.1	Mus musculus cannabinoid receptor 1 (brain), mRNA (cDNA clone MG	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
AK139417.1	Mus musculus 10 days neonate cortex cDNA, RIKEN full-length enrici	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
U17985.1	Mus musculus brain-type cannabinoid receptor mRNA, complete cds	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
Y18374.1	Mus musculus gene encoding cannabinoid CB1 receptor	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
BX005292.13	Mouse DNA sequence from clone RP24-407G18 on chromosome 4 Cor	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
AF153345.1	Mus musculus CB1 cannabinoid receptor (Cnr1) mRNA, complete cds	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
NM_012784.4	Rattus norvegicus cannabinoid receptor 1 (brain) (Cnr1), mRNA >eml	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
U40395.1	Rattus norvegicus neuronal cannabinoid receptor (CB1) mRNA, compl	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
U40709.1	Mus musculus neuronal cannabinoid receptor (CB1) mRNA, complete	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
U22948.1	Mus musculus CB1 cannabinoid receptor gene, complete cds	141	141	88%	5e-31	98%	UEG
XM_002746806.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cannabinoid receptor 1 (brain), transci	134	134	91%	9e-29	96%	GM
XM_002746805.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cannabinoid receptor 1 (brain), transci	134	134	91%	9e-29	96%	GM
XM_002746804.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cannabinoid receptor 1 (brain), transci	134	134	91%	9e-29	96%	GM
XM_002746803.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cannabinoid receptor 1 (brain), transci	134	134	91%	9e-29	96%	GM
XM_002714573.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus cannabinoid receptor 1-like, trans	134	134	91%	9e-29	96%	GM
XM_002714572.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus cannabinoid receptor 1-like, trans	134	134	91%	9e-29	96%	GM
DQ355990.2	Cavia porcellus cannabinoid 1 receptor mRNA, partial cds	134	134	91%	9e-29	96%	G
XM_002817137.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 1-like, transcript vari	128	128	91%	4e-27	95%	UGM
XM_002817136.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 1-like, transcript vari	128	128	91%	4e-27	95%	UGM
XM_002817135.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 1-like, transcript vari	128	128	91%	4e-27	95%	UGM
XM_002817134.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 1-like, transcript vari	128	128	91%	4e-27	95%	UGM

b

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XM_001105018.2	PREDICTED: Macaca mulatta cannabinoid receptor 2 (macrophage) (	270	270	91%	2e-69	95%	GM
AC192160.5	Pan troglodytes BAC clone CH251-489P14 from chromosome 1, comp	254	254	93%	2e-64	93%	
XM_001166534.1	PREDICTED: Pan troglodytes cannabinoid receptor 2 (macrophage), t	254	254	93%	2e-64	93%	GM
XM_513201.2	PREDICTED: Pan troglodytes cannabinoid receptor 2 (macrophage), t	254	254	93%	2e-64	93%	GM
XM_002811294.1	PREDICTED: Pongo abelii cannabinoid receptor 2 (macrophage) (CNR	252	252	91%	6e-64	94%	GM
AB463463.1	Synthetic construct DNA, clone: pFKB7157, Homo sapiens CNR2 gei	248	248	93%	8e-63	93%	
NM_001841.2	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (macrophage) (CNR2), mRNA	248	248	93%	8e-63	93%	UEGM
AL590609.15	Human DNA sequence from clone RP11-4M23 on chromosome 1 Cont	248	248	93%	8e-63	93%	E
AY242132.1	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (CNR2) gene, complete cds	248	248	93%	8e-63	93%	UEG
AM156854.1	Homo sapiens partial mRNA for cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene)	248	248	93%	8e-63	93%	UEG
AJ430064.1	Homo sapiens CNR2 gene for peripheral cannabinoid receptor CB2	248	248	93%	8e-63	93%	UEG
AJ430063.1	Homo sapiens mRNA for peripheral cannabinoid receptor CB2 (CNR2 g	248	248	93%	8e-63	93%	UEG
X74328.1	H.sapiens mRNA for CB2 (peripheral) cannabinoid receptor	248	248	93%	8e-63	93%	UEG
EUS17121.1	Homo sapiens testis-dominant CNR2 isoform CB2 (CNR2) mRNA, comp	243	243	93%	4e-61	92%	UG
CU686989.1	Synthetic construct Homo sapiens gateway clone IMAGE:100022674	243	243	93%	4e-61	92%	
BC074767.2	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (macrophage), mRNA (cDNA cl	243	243	93%	4e-61	92%	UEG
BC069722.1	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (macrophage), mRNA (cDNA cl	243	243	93%	4e-61	92%	UEG
AM156855.1	Homo sapiens partial mRNA for cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene),	243	243	93%	4e-61	92%	UEG
BC095545.1	Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (macrophage), mRNA (cDNA cl	237	237	93%	2e-59	91%	UEG
AM156856.1	Homo sapiens partial mRNA for cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene),	237	237	93%	2e-59	91%	UEG

c

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XM_002817504.1	PREDICTED: Pongo abelii mu-type opioid receptor-like, transcript var	267	267	99%	2e-68	94%	GM
XM_002817503.1	PREDICTED: Pongo abelii mu-type opioid receptor-like, transcript var	267	267	99%	2e-68	94%	GM
XM_002817502.1	PREDICTED: Pongo abelii mu-type opioid receptor-like, transcript var	267	267	99%	2e-68	94%	GM
XM_003121140.1	PREDICTED: Sus scrofa mu-type opioid receptor-like (LOC100514882	263	263	98%	3e-67	94%	GM
L38645.1	Sus scrofa mu opioid receptor mRNA, complete cds	263	263	98%	3e-67	94%	UG
AB590577.1	Synthetic construct DNA, clone: pFN21AB6696, Homo sapiens OPRM	261	261	99%	9e-67	93%	
NG_021208.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), RefSeqGene on chrom	261	261	99%	9e-67	93%	
GO258059.1	Homo sapiens opioid receptor mu 1 transcript variant hMOR-1JL (OPF	261	261	99%	9e-67	93%	UG
NM_001145283.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UGM
NM_001145282.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UGM
NM_001145286.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UGM
NM_001145287.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UGM
NM_001145284.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UGM
NM_001145281.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UGM
NM_001145280.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UGM
NM_001145279.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UGM
NM_001008504.2	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UEGM
NM_000914.3	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UEGM
NM_001145285.1	Homo sapiens opioid receptor, mu 1 (OPRM1), transcript variant MOR	261	261	99%	9e-67	93%	UGM
AL136444.16	Human DNA sequence from clone RP3-366F13 on chromosome 6, con	261	261	99%	9e-67	93%	E
EU340243.1	Homo sapiens mu opioid receptor splice variant hMOR-1G2 (OPRM1) i	261	261	99%	9e-67	93%	UG
EU340242.1	Homo sapiens mu opioid receptor splice variant hMOR-1G1 (OPRM1) i	261	261	99%	9e-67	93%	UG
EU340241.1	Homo sapiens mu opioid receptor splice variant hMOR-1i (OPRM1) mR	261	261	99%	9e-67	93%	UG
AK313901.1	Homo sapiens cDNA, FLJ94538, highly similar to Homo sapiens opioid	261	261	99%	9e-67	93%	UG
EF666090.1	Homo sapiens mu opioid receptor splice variant hMOR-1K1 (OPRM1) r	261	261	99%	9e-67	93%	UG

图3 树鼯大麻素受体1、大麻素受体2及 μ 型阿片受体PCR产物测序得到的序列,与GeneBank中的所有已有物种的全部转录本通过BLAST进行序列比对的结果

Fig. 3 Comparison of the CNR1, CNR2 and MOPR sequences obtained from the tissues of *Tupaia belangeri* with the GeneBank transcription database using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

a: CNR1 BLAST 比对结果; b: CNR2 BLAST 比对结果; c: MOPR BLAST 比对结果(由于截图区域有限,少部分物种比对结果未显示)。

a: the comparative results of CNR1; b: the comparative results of CNR2; c: the comparative results of MOPR.

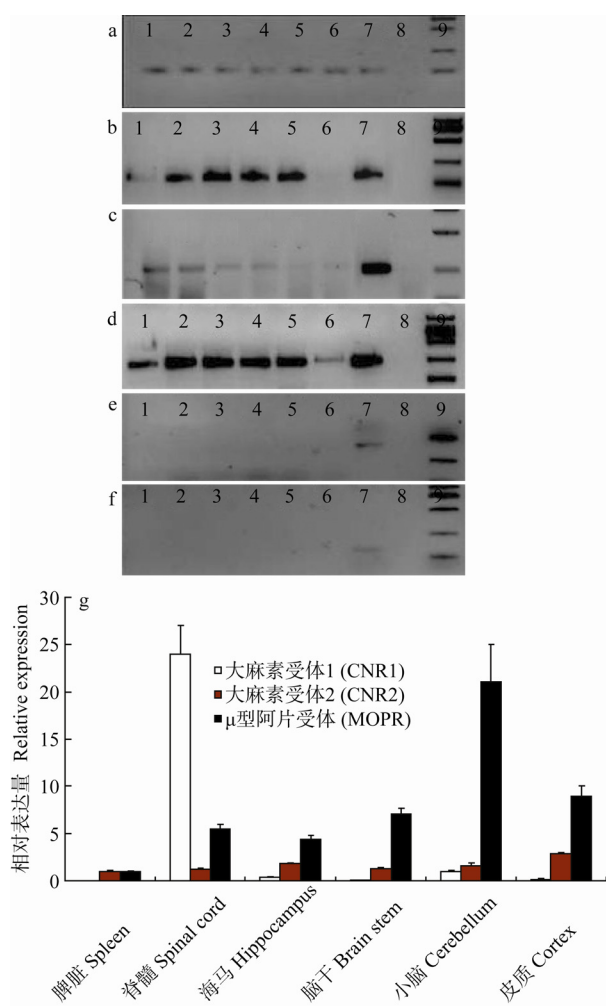


图4 树鼩大麻素受体与阿片受体 mRNA 组织间相对表达情况

Fig. 4 Relative expression of the cannabinoid receptors and opioid receptors mRNA in the tissues of *Tupaia belangeri*

1: 皮质; 2: 小脑; 3: 脑干; 4: 海马; 5: 脊髓; 6: 脾脏; 7: 阳性对照(基因组 DNA 或猕猴 cDNA); 8: 阴性对照(水); 9: marker(D20000)。a: 内参 β -actin (100 bp); b: 大麻素受体 1 (CNR1, 140 bp); c: 大麻素受体 2 (CNR2, 259 bp); d: μ 型阿片受体 (MOPR, 230 bp); e: δ 型阿片受体 (DOPR, 217 bp); f: κ 型阿片受体表达 (KOPR, 127 bp); g: 实时定量 PCR 结果。采用 $\Delta\Delta Ct$ 相对定量的方法, 将脾脏中 CNR2 和 MOPR 表达量设定为 1, 将小脑中 CNR1 表达量设定为 1。柱形图显示受体在树鼩 6 种组织中的分布情况和相对表达量。

mRNA in the tissues of *Tupaia belangeri* tissues. 1: cortex; 2: cerebellum; 3: brain stem; 4: hippocampus; 5: spinal cord; 6: spleen; 7: positive control (treeshrew genomic DNA or macaca cDNA); 8: negative control (H_2O); 9: marker (D2000). a: β -actin (100 bp); b: CNR1 (140 bp); c: CNR2 (259 bp); d: MOPR (230 bp); e: DOPR (217 bp); f: KOPR (127 bp); g: The results of the quantitative real-time PCR analysis. The expressions of CNR2 and MOPR in spleen were set to 1 and the expression of CNR1 was set to 1 as well. The picture showed the relative expression levels of each receptor in the six tissues of *T. belangeri*.

脾脏都有表达, 而大麻素受体 2 (CNR2) mRNA 仅检测到在外周的脾脏表达; 在树鼩体内大麻素受体 1 除在脾脏外, 在各个脑区也均有表达, 这与猕猴

稍有不同, 而大麻素受体 2 在树鼩各个组织中均有表达, 与猕猴相比差别较大。阿片受体 mRNA 在树鼩体内表达模式相对简单, 只检测到有 μ 型阿片受体 (MOPR) mRNA 表达, δ 型和 κ 型两种阿片受体在各个组织没有检测到表达。相比于树鼩, 猕猴体内阿片受体表达情况较为复杂, μ 型阿片受体 (MOPR) 与树鼩表达情况一样, 在这几个组织中均表达, 而 δ 型阿片受体 (DOPR) 只在海马表达, κ 型受体 (KOPR) mRNA 在皮质、小脑、脑干和脊髓处表达。除了表达外, 同一受体在不同的组织中表达量也不尽相同, 如大麻素受体 1 在猴各脑区中表达丰度, 高于脊髓与脾脏; μ 型阿片受体 (MOPR) mRNA 在猕猴的脊髓表达最高, 其次是脑干、海马、小脑、皮质, 表达最低的是脾脏。同一受体的 mRNA 在不同的物种表达模式也有区别, 例如大麻素受体 2 在树鼩的 6 类组织中均有表达, 但在猴的组织当中仅有外周的脾脏表达。再有 κ 型阿片受体 (KOPR) mRNA 在猕猴的皮质、小脑、脑干、脊髓有表达, 但是在树鼩体内这四种器官当中均没有检测到表达。这些结果说明各类受体表达方式是复杂的, 这可能跟物种生存环境、遗传进化因素等有关。

由于进化地位高低, 物种之间同一受体表达谱各异。人的大麻素受体 1 在脑广泛表达, 主要在于突触前神经元上, 调节神经元的兴奋性; 在脊神经元, 同样有大麻受体 1 的分布, 参与感觉传递; 免疫系统组织尚未发现有其分布。人大麻素受体 2 主要分布于免疫系统组织、细胞当中, 参与免疫调节、炎症反应等生理病理过程; 正常状态下, 脑和脊髓中分布较少, 主要存在于胶质细胞中; 病理过程时 (炎症反应), 含量会增加 (Onaivi et al, 2006; Emmanuel, 2006)。三种阿片受体在人脑与脊髓中都有表达, 在免疫系统组织、细胞中亦有分布 (Perry et al, 2004; Sharp, 2006)。鼠的大麻素受体 1 主要分布于脑区和脊髓的神经元突触上, 我们实验发现脾脏中也有较低的大麻素受体 1 的表达; 大麻素受体 2 作为免疫系统的特有的大麻素受体类型, 广泛存在于鼠免疫相关的细胞当中, 现在研究也发现功能性的大麻素受体 2 也分布在鼠的很多脑区 (大脑皮质、胼胝体、海马、基底核区及小脑浦肯野细胞层、脑桥), 参与了某些生理病理过程。三种阿片受体的在鼠体内表达相对而言都较为丰富, 正常情况下都存在于脑区、脊髓、免疫细胞当中 (Bagnoli et al, 2003; Wu et al, 2009), 机体应激状态下表达会随之发生改

变,协调机体对外界环境的适应(Sharp, 2006)。

总体看来,猕猴体内无论是大麻素受体还是阿片受体表达模式均与人更为接近。树鼩体内大麻素受体表达模式与人基本相同,而三类(μ 、 κ 、 δ)阿片受体,只检测到 μ 型受体的表达,其他两种阿片受体在任何组织中均未检测到有其mRNA表达,这与人相差较大。这可能意味着树鼩的阿片受体的表达与大麻素表达相比,更有选择性。在进化地位上,大麻素受体可能更为保守,参与基本的神经活动(奖赏效应、痛觉传递、恐惧记忆),而阿片受体可能与与灵长类高级认知功能(学习记忆、认知创造、复杂情绪等)关系更为密切。与树鼩相比,猕猴大麻素受体与阿片受体表达与人较为接近,这反映了猕猴的进化地位更高,受体表达模式与人更为相似;但也应当看猕猴体内大麻素受体2仅表达于脾脏。这与人不同,人脑区有大麻素受体2的表达,这提示我们大麻素受体2在进化过程中最初的组织起源可能是免疫系统组织,随着进化过程的发展逐渐表达于神经系统,连结神经免疫两大系统,并在神经免疫的过程中发挥作用。

本实验由于通用引物设计过程中引物对的选择余地不足,所用的通用引物没有检测到 δ 型和 κ 型两种阿片受体在树鼩各个组织的表达。尽管通用引物可以扩增包括人、猕猴、大鼠、小鼠等多种物种的cDNA,但是仍不能排除在树鼩体内两类受体

序列可能会与通用引物存在不匹配的情况,从而导致PCR检测失败,所以对于这两类受体的表达仍要进一步确定。我们还明确指出,mRNA的表达情况只是从一个方面反映其对应的基因的表达情况,有时mRNA表达量并不一定真实反应基因编码的蛋白质的含量,更不能反映其蛋白定位。另外,对大麻素与阿片受体在免疫系统中表达情况,我们只检测了有代表性,且取材相对容易的脾脏,而对其他免疫器官如胸腺、骨髓,对特定免疫细胞,如T淋巴细胞、B淋巴细胞、树突状细胞、K细胞、NK细胞等的表达此研究尚未涉及,这将限制神经免疫学的研究。因此,下一步将通过Rapid Amplification of cDNA End (RACE)等方法获取受体基因的cDNA全长、克隆、蛋白体外表达,最终获得有活性的蛋白,制备相应抗体,进而对这几种重要的受体在神经系统/免疫系统各类组织,包括具体不同类型细胞在mRNA和蛋白质两种水平上深入研究,以期全面认识猕猴和树鼩,更好地开发利用这些动物资源用于人类疾病的研究。

致谢:感谢中国科学院昆明动物研究所动物中心提供的实验用猕猴和树鼩。感谢昆明动物研究所分子病理实验室全体工作人员及部分研究生在动物解剖方提供的帮助。感谢后期审稿人的辛勤劳动和提供的修改意见。

参考文献:

- Bagnoli P, Dal Monte M, Casini G. 2003. Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals [J]. *Histol Histopathol*, **18**(4): 1219-1242.
- Bidlack JM, Khimich M, Parkhill AL, Sumagin S, Sun B, Tipton CM. 2006. Opioid receptors and signaling on cells from the immune system [J]. *J Neuroimm Pharmacol*, **1**(3): 260-269.
- Bruijnzeel AW. 2009. kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function [J]. *Brain Res Rev*, **62**(1): 127-146.
- Emmanuel SO. 2006. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain [J]. *Neuropsychobiology*, **54**: 231-246.
- Fuchs E. 2005. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder [J]. *CNS Spectr*, **10**(3): 182-190.
- Perry GF, Russell K, Portenoy RK. 2004. The Endogenous Opioid System[M]// McGraw Hill. A Clinical Guide to Opioid Analgesia. New York: Vendome Group, 9-15.
- Jean GL, Gran B, Constantinescu CS. 2010. Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system [J]. *Immunobiology*, **215**(8): 606-610.
- Jiao JL, He BL, Zheng H, Li B, Shen PQ. 2010. The comparative study of brain development among tree shrews (*Tupaia blangeri chinensis*) rhesus monkeys and rats [J]. *J Kunming Med Univ*, **5**: 39-41. [角建林, 何保丽, 郑红, 李波, 沈培清. 2010. 树鼩、恒河猴和大鼠脑发育的比较研究. 昆明医学院报, **5**: 39-41.]
- López-Moreno JA, López-Jiménez A, Gorriti MA, Fonseca FR. 2010. Functional interactions between endogenous cannabinoid and opioid systems: focus on alcohol, genetics and drug-addicted behaviors [J]. *Curr Drug Targets*, **11**(4): 406-428.
- Maldonado R. 2010. The endogenous opioid system and drug addiction [J]. *Ann Pharm Fr*, **68**(1): 3-11.
- Martykánová L. 2010. Endocannabinoid system I--the role in regulation of physiology functions [J]. *Cas Lek Cesk*, **149**(8): 363-367.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasensfitz L, Uhl GR. 2006. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain [J]. *Ann NY Acad Sci*, **1074**: 514-536.
- Pawlik M, Fuchs E, Walker LC, Levy E. 1999. Primate-like amyloid β sequence but no cerebral amyloidosis in aged tree shrews [J]. *Neurobiol Aging*, **20**(1): 47-51.
- Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ. 2009. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex [J]. *Learn Mem*, **16**(5): 279-288.
- Podlisny MB, Tolan DR, Selkoe DJ. 1991. Homology of the amyloid β protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta

- amyloidosis in Alzheimer's disease [J]. *Am J Pathol*, **138**(6): 1423-1435.
- Robledo P. 2010. Cannabinoids, opioids and MDMA: neuropsychological interactions related to addiction [J]. *Curr Drug Targets*, **11**(4): 429-439.
- Sharp BM. 2006. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling [J]. *Brain Behav Immun*, **20**(1): 9-14.
- Sofroniew MV, Weindl A, Schrell U, Wetzstein R. 1981. Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain [J]. *Acta Histochem Suppl*, **24**: 79-95.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Goldstein RZ. 2002. Role of Dopamine, the frontal cortex memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies [J]. *Neurobiol Learn Mem*, **78**: 610-624.
- Wu YT, Liu HL, Chen XS. 2009. Distributions of CB1 and CB2-positive cells in adult rat's brain [J]. *Chn J Rehab Med*, **24**(3): 197-199. [吴永涛, 刘宏亮, 陈兴书, 蔡其燕, 姚忠祥. 2009. 大麻素受体在成年大鼠脑组织中的分布特点. 中国康复医学杂志, **24**(3): 197-199.]