

شناسایی و تعیین میزان بیان mRNA دو اسپلایس واریانت گیرنده IL اوپیوئیدی hMORE-1A و hMORE-10 در لمفوسیت‌های خون محیطی معتادان ترک‌کرده

دکتر نسیم وثوقی*، دکتر فرشاد روشن ضمیر**، علی گودرزی***، تینا صداقتی****، دکتر محمدرضا

زرین‌دست*****، دکتر محمدرضا نوری دلویی*****

* فارماکولوژیست، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
** استاد فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
*** دستیار علوم اعصاب شناختی، پژوهشکده علوم شناختی، تهران، ایران.
**** دانشجوی بیولوژی، مرکز پژوهشی سلولی و مولکولی سینا، تهران، ایران.
***** استاد فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
***** استاد ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف

گیرنده IL اوپیوئیدی در بروز آثار سوء و نیز درمانی اوپیوئیدها مانند مرفین و هرویین نقشی اساسی دارد. این گیرنده در مسیرهای عصبی مربوط به اعتیاد در مغز به میزان زیادی بیان می‌شود. هدف این مطالعه، یافتن یک بیومارکر محیطی در مطالعات مربوط به اعتیاد از طریق بررسی میزان بیان mRNA مربوط به دو اسپلایس واریانت گیرنده IL اوپیوئیدی، یعنی hMORE-1A و hMORE-10 در لمفوسیت‌های خون محیطی معتادان ترک کرده، می‌باشد.

روش بررسی

این پژوهش از نوع مطالعات مورد شاهدهی و جامعه مورد بررسی، مذکر و شامل ۲ گروه بودند: گروه مورد را افرادی تشکیل می‌دهند با میانگین سنی ۳۳/۵±۶/۱ سال که قبلاً به اوپیوئیدها اعتیاد داشته و سپس مصرف این مواد را ترک کرده و مدت زمان زیادی از ترک اعتیاد آنها گذشته است. گروه شاهد شامل افراد سالم داوطلب با میانگین سنی ۳۱±۷/۵۳ سال بود که سابقه اعتیاد به هیچ نوع ماده مخدری را نداشتند برای ارزیابی میزان بیان mRNA در لمفوسیت‌های خون گروه‌های مورد مطالعه، از روش RCP emiT-laeR و رنگ SYBR Green استفاده گردید.

یافته‌ها

میزان بیان mRNA مربوط به hMOR-1A در لمفوسیت‌های معتادان ترک‌کرده نسبت به گروه شاهد با کاهش معنادار به ۰/۳۳ میزان گروه شاهد رسید ($P<0/001$). در مورد اسپلایس واریانت hMOR-10 نیز نتایج مشابهی به دست آمد و میزان بیان mRNA آن در لمفوسیت‌های معتادان ترک‌کرده به ۰/۳۸ میزان آن در گروه شاهد کاهش یافت ($P>0/001$).

نتیجه‌گیری

کمبود میزان بیان mRNA دو اسپلایس واریانت گیرنده IL اوپیوئیدی، یعنی hMOR-1A و hMOR-10 می‌تواند به عنوان یکی از عوامل احتمالی مستعدکننده‌ای در جهت گرایش افراد به اعتیاد مورد بررسی‌های بعدی قرار گیرد. اندازه‌گیری این میزان با استفاده از لمفوسیت‌های خون ممکن است به عنوان یک بیومارکر محیطی در شناسایی این افراد مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: لمفوسیت، بیان mRNA اوپیوئیدها، اعتیاد، اسپلایس واریانت‌های گیرنده IL اوپیوئیدی.

نویسنده مسئول مکاتبات: گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: nooridalooi@sina.tums.ac.ir

تلفن: ۰۵-۸۸۹۵۳۰۰-۲۱-۹۸+

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۶/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۶/۱۳

مقدمه

وابستگی به اویپوئیدها اختلالی مزمن و عودکننده است که منجر به مصرف اجباری دارو و بروز علائم محرومیت در صورت قطع دارو می‌شود (۱). گیرنده μ اویپوئیدی در بروز آثار سوء و نیز درمانی اویپوئیدها مانند مرفین و هرویین نقشی اساسی دارد (۲). این گیرنده در مسیرهای عصبی مربوط به اعتیاد در مغز به میزان زیادی بیان می‌شود. مهم‌ترین این مسیرها، مسیر مزولیمبیک است که از ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) منشأ گرفته، به هسته اکومینس (NAc) ختم می‌شود (۳). با وجود این که شواهد بالینی و مطالعات فارماکولوژیک همه دلالت بر وجود چندین نوع زیرگونه متنوع گیرنده μ اویپوئیدی دارند، ولی تاکنون تنها یک ژن برای این گیرنده شناسایی شده است (۵،۴). یکی از راه‌های محتمل برای تولید زیرگونه‌های مختلف یک گیرنده از یک ژن واحد، پدیده Alternative Splicing می‌باشد (۶). بر همین مبنا تاکنون انواع متعددی از اسپلیس واریانت‌های گیرنده μ اویپوئیدی در انسان شناسایی شده‌اند این واریانت‌ها در دارا بودن اگزون‌های ۲، ۱ و ۳ مشترک بوده، تفاوت آن‌ها در اگزون‌های بعدی می‌باشد (شکل شماره ۱) که موجب می‌شود بخش انتهایی پایانه کربوکسیلی گیرنده در واریانت‌های مختلف متفاوت باشد. در این بخش گیرنده محل‌های مختلفی برای فسفریلاسیون توسط کینازهای مختلف، مانند پروتئین کیناز A، پروتئین کیناز C و کازئین کیناز II وجود دارد (۷،۶). اطلاعات موجود درباره تفاوت‌های عملکردی و پراکندگی واریانت‌های گوناگون بسیار محدود بوده و نقش این گوناگونی در ایجاد آثار زیستی آن‌ها مشخص نیست (۸).

بیان گیرنده μ اویپوئیدی در بافت‌های دیگری غیر از سیستم عصبی، مانند سلول‌های ایمنی نیز به اثبات رسیده (۹)، که توجه‌کننده آثار تنظیمی اویپوئیدهای آندوژن و اگزوژن در پدیده ایمنی است. برخی دانشمندان عقیده دارند که بیان گیرنده‌های مربوط به نوروترانسمیترها در سلول‌های ایمنی و به ویژه لمفوسیت‌های خون محیطی، ممکن است تا حدودی منعکس‌کننده و به موازات بیان این گیرنده‌ها در مغز باشد. به عنوان مثال در اسکیزوفرنی افزایش میزان بیان گیرنده دوپامینی در لمفوسیت‌های خون به اثبات رسیده (۱۰-۱۲) و مشخص شده است که این افزایش با شدت علائم بالینی بیماری ارتباط مستقیمی دارد (۱۳). هدف مطالعه حاضر در ابتدا شناسایی mRNA دو اسپلیس واریانت گیرنده μ اویپوئیدی، یعنی hMOR-1A و hMOR-1O، در لمفوسیت‌های خون محیطی و سپس مقایسه میزان بیان mRNA این دو واریانت در لمفوسیت‌های خون گروه شاهد با گروهی است که سابقاً به اویپوئیدها معتاد بوده و اینک مدت زمان زیادی از ترک آن‌ها می‌گذرد تا بتوان احتمال به کارگیری لمفوسیت‌ها را به عنوان بیومارکری محیطی در مطالعات مربوط به اعتیاد بررسی نمود.

روش بررسی

این پژوهش از نوع مطالعات مورد شاهدهی و جامعه مورد بررسی همگی مذکر و شامل ۲ گروه بودند: گروه مورد را افرادی تشکیل می‌دهند با میانگین سنی $33/5 \pm 6/1$ سال که سابقاً به اویپوئیدها اعتیاد داشته (به مدت $4/93 \pm 10/55$ سال)، سپس مصرف این مواد را ترک کرده و مدت زمان زیادی ($4/18 \pm 2/35$ سال) از ترک اعتیاد آن‌ها گذشته است. گروه شاهد شامل افراد سالم داوطلب با میانگین سنی $31 \pm 7/53$ سال بود که سابقه اعتیاد به هیچ نوع ماده مخدری را نداشتند. نمونه‌های گروه افراد با سابقه اعتیاد از انجمن معتادان

گنم و نمونه‌های گروه شاهد از دانشجویان و همکاران دانشگاه علوم پزشکی تهران و پرسنل مرکز ملی مطالعات اعتیاد جمع‌آوری شد. زمان جمع‌آوری نمونه‌ها، ۶ ماهه اول سال ۱۳۸۶، مکان آن شهر تهران، و تعداد نمونه‌ها در هر دو گروه ۳۰ نفر است. به منظور تأیید اعتیاد قبلی در گروه با سابقه اعتیاد، از معیارهای دستورالعمل تشخیصی و آماری بیماری‌های روانی-ویراست چهارم (DSM-IV) استفاده شد. معیارهای خروج از مطالعه در هر دو گروه عبارتند از: ابتلا به بیماری‌های عفونی و التهابی مانند هپاتیت B، هپاتیت C و ایدز، استفاده از هر نوع داروی مؤثر بر عملکرد سیستم عصبی، ابتلا به بیماری‌های نورولوژیک، اختلالات عمده روانپزشکی و بیماری‌های مزمن هورمونی و قلبی عروقی، بود. مشخصات کلیه افراد شرکت‌کننده در مطالعه مخفی مانده و از همگی آنان رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. شایان ذکر است که پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، سایر مراحل عملی پژوهش به طور مشترک در گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز پژوهشی ملکولی و سلولی سینا انجام گرفت. تهیه لمفوسیت‌های خون محیطی: از هر یک از شرکت‌کنندگان در مطالعه، نمونه خون محیطی به مقدار ۱۲ سی‌سی از ورید قدامی فوقانی ساعد گرفته شده، به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین تتراسدیک اسید (EDTA، مرک، آلمان) منتقل شد. سپس با استفاده از محلول مخصوص جداسازی سلول‌ها به نام هیستوپرپ (Histoprep، بگ، آلمان) و نیز دستگاه سانتریفوژ، طبق پروتکل پیشنهادی سازنده محلول، لایه محتوی سلول‌های لمفوسیت از خون حاوی EDTA جدا گردید پس از جمع‌آوری این لایه‌ها، سلول‌های لمفوسیت ۳ بار با محلول استریل PBS (مرک، آلمان) شسته شدند. فاصله زمانی بین تهیه نمونه خون و جداسازی لمفوسیت‌ها در هیچ یک از آزمایش‌ها بیش از ۴ ساعت نبود.

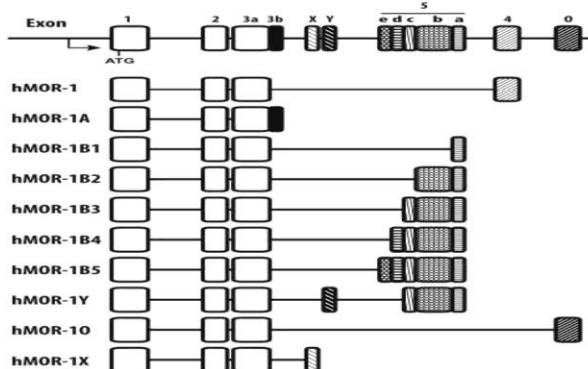
استخراج RNA و ساختن cDNA: پس از آماده سازی لمفوسیت‌ها، RNA آن‌ها با استفاده از کیت "Total RNA Isolation System" RNA Agents® (پرومگا، آمریکا) استخراج شد. مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ تعیین گردید. سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA تک رشته‌ای با نام Quantitect (کیژن، آمریکا)، از هر ۱ ماکروگرم RNA استخراج شده، با توجه به پروتکل شرکت سازنده، مقدار ۲۰ ماکرولیتر cDNA ساخته شد.

پرایمرهای مورد استفاده جهت Real-Time PCR: از ژن بتا اکتین به عنوان استاندارد داخلی به منظور تصحیح میزان بیان ژن‌های هدف استفاده گردید. پرایمرهای مربوط به hMOR-1A و hMOR-1O با استفاده از بانک اطلاعاتی (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) و نرم‌افزار Beacon Designer طراحی شدند. پرایمرهای ژن بتا اکتین از بانک پرایمر شرکت کیژن (آمریکا) تهیه گردید. جزییات پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعه تکثیر شده توسط آن‌ها در جدول آمده است.

جدول پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR

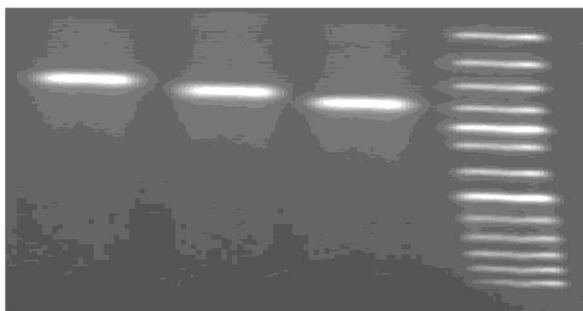
طول قطعه تکثیر شده (bp)	توالی پرایمرها	mRNA
۱۸۶	Sense: TTC TGT ATC CCA ACC TCT TCC	hMOR-1A
	Antisense: CTC CTA GTT TAG CAC AAA GCC	
۱۷۰	Sense: AAC TAA TCA TCA GCC ACC CTT G	hMOR-1O
	Antisense: GCC TTT CAC TCT GTC ACA TAA	
۱۲۶	ATC	Beta-actin
	از بانک پرایمر شرکت کیژن (آمریکا) شماره کاتالوگ: QT00095431	

در واریانت hMOR-1O اگزون O و در واریانت hMOR-1A قسمت 3b اختصاصی و عامل افتراق این واریانت‌ها با سایر انواع می‌باشند.



شکل شماره ۱: نمای شماتیک ژن گیرنده μ اویپوئیدی

شکل شماره ۲ مربوط به الکتروفورز محصول Real-Time PCR ژن بتا-اکتین و اسپالیس واریانت‌های hMOR-1A و hMOR-1O لMFوسیت‌های خون محیطی بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ می‌باشد. باند‌های اسپالیس واریانت‌ها پس از ۵۰ سیکل و باند بتا اکتین پس از ۳۰ سیکل Real-Time PCR به خوبی نمایان می‌باشند.

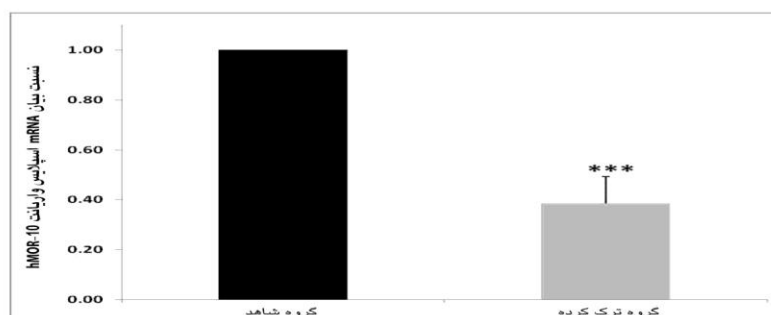


شکل شماره ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصولات Real-time PCR

ژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر بر روی لMFوسیت‌ها، از چپ به راست به ترتیب بتا-اکتین، hMOR-1O، hMOR-1A و سایز مارکر ۵۰ جفت بازی (فرمتاز، سیناژن)

شکل شماره ۳ نشان‌دهنده میزان بیان نسبی mRNA اسپالیس واریانت hMOR-1A در لMFوسیت‌های خون محیطی معتادان ترک کرده در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. بیان اسپالیس واریانت فوق در گروه معتادان ترک کرده به طور معناداری نسبت به گروه شاهد کمتر بوده و ۰/۳۳ مقدار گروه شاهد می‌باشد (P=۰/۰۰۱).

شکل شماره ۳: نمودار نسبت بیان mRNA مربوط به hMOR-1A در لMFوسیت‌های خون محیطی گروه شاهد و گروه معتادان ترک کرده. P<۰/۰۰۱ *** در مقایسه با گروه شاهد



واکنش زنجیره پلی‌مراز (Real-Time PCR): واکنش‌های

زنجیره پلی‌مراز (Real-Time PCR) با استفاده از I Master Mix (کیت، استرالیا) انجام شد. در همه واکنش‌ها Quantifast iBiljH SYBR Green (کیژن، آمریکا) و دستگاه Rotorgene ۶۰۰۰ (کرت، استرالیا) استفاده شد. مقدار یکسانی از cDNA ساخته شده (۲ ماکرولیتر) مورد استفاده قرار گرفت. دمای بهینه اتصال پرایمر یا آنیلینگ، برای هر ژن که با انجام واکنش‌های متعدد به دست آمد، از ۵۳ تا ۶۱ درجه سانتی‌گراد متغیر بود. اختصاصی بودن محصول واکنش زنجیره پلی‌مراز هر ژن، با مشاهده قله‌ای واحد در منحنی ذوب (Melting Curve) آن مورد تأیید قرار گرفت. به منظور تأیید توالی و طول محصول PCR به دست آمده برای هر ژن، از روش تعیین توالی یا Sequencing و ژل آگارز ۲/۵٪ استاندارد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برومید (مرک، آلمان) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های PCR

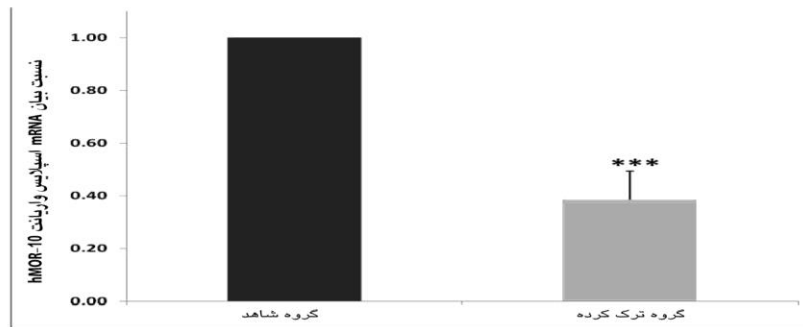
Real-Time PCR، از روش منحنی استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد با استفاده از رقت‌های متوالی یک نمونه خاص cDNA در هر بار انجام واکنش به دست آمد. به منظور تعیین میزان بیان ژن هدف در هر نمونه ابتدا سیکلی که فلورسانس نمونه در آن به حد آستانه متمایزی از زمینه می‌رسید، تعیین گردید. سپس این سیکل به منحنی استاندارد ارجاع شد تا با استفاده از آن، عدد مربوط به میزان نسبی بیان ژن نمونه به دست آید. همه اندازه‌گیری‌ها نسبت به ژن استاندارد داخلی، یعنی بتا اکتین تصحیح شدند. هر نمونه ۲ بار وارد واکنش شده، میانگین اعداد به دست آمده برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. تحلیل آماری به منظور تعیین افزایش و یا کاهش معنادار بیان ژن‌های هدف در گروه با سابقه اعتیاد نسبت به گروه شاهد با استفاده از نسخه دوم نرم‌افزار REST-XL انجام شد (۱۴). در این نرم‌افزار تعیین کمیت ژن و تصحیح آن نسبت به استاندارد داخلی به طور هم‌زمان صورت می‌گیرد. نتایج به صورت نسبت میانگین میزان بیان تصحیح شده ژن خطای استاندارد میانگین (S.E.M) نمایش داده شده است.

یافته‌ها

شکل شماره ۱ نمای شماتیک ژن گیرنده μ اویپوئیدی و برخی از اسپالیس واریانت‌های مشهور آن را در انسان نشان می‌دهد. ساختار ژن در قسمت بالای شکل و اسپالیس واریانت‌ها در پایین نمای ژن نشان داده شده‌اند. اگزون‌ها با مستطیل و اینترون‌ها با خطوط افقی مشخص شده‌اند. (بر اساس داده‌های ارایه شده در منبع شماره ۶).

کرده تفاوتی معنادار با گروه شاهد داشته و ۰/۳۸ میزان گروه شاهد می باشد ($P=0.001$).

بیان نسبی mRNA اسپالایس واریانت hMOR-1O در لمفوسیت های خون محیطی معتادان ترک کرده در مقایسه با گروه شاهد در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. بیان این اسپالایس واریانت نیز در گروه معتادان ترک



شکل شماره ۴: نمودار نسبت بیان mRNA مربوط به hMOR-1O در لمفوسیت های خون محیطی گروه شاهد و گروه معتادان ترک کرده. $P<0.001$ *** در مقایسه با گروه شاهد

بحث

اعتیاد به اویپوئیدها پدیده ای پیچیده است که عوامل متعدد محیطی و ژنتیکی در آن دخالت دارند (۱۵). کشف اسپالایس واریانت های گیرنده μ اویپوئیدی ضمن پیچیده تر کردن موضوع، دیدگاه جدیدی را در مطالعات اعتیاد گشوده است؛ زیرا داشتن تنوع در پایانه کربوکسیلی گیرنده μ اویپوئیدی، موجب می شود که اسپالایس واریانت های مختلف در اتصال به پروتئین های G اختصاصی، فعال کردن آدنیلیل سیکلاز، حساسیت زدایی (Desensitization) گیرنده ای و اندوسیتوز با هم متفاوت باشند (۱۶، ۱۷). همچنین بیان این واریانت ها برای هر سلول و یا بافت اختصاصی است (۱۸). یافته های تحقیق حاضر نشان داد که hMOR-1A و hMOR-1O در لمفوسیت های خون محیطی بیان می شوند و شاید مطالعه اخیر اولین گزارش مبنی بر شناسایی اسپالایس واریانت های گیرنده μ اویپوئیدی در این سلول ها باشد. محققین بسیاری گزارش کرده اند که بیان گیرنده های مربوط به سیستم عصبی در لمفوسیت ها ممکن است تا حدودی به موازات وضعیت این گیرنده ها در مغز باشد. کاهش بیان گیرنده های دوپامینی در لمفوسیت های بیماران مبتلا به پارکینسون (۱۹) و کاهش گیرنده های کولینرژیک موسکارینی در بیماران مبتلا به آلزایمر (۲۰) نمونه هایی از شواهد به دست آمده برای اثبات این فرضیه هستند. از آن جایی که اسپالایس واریانت های انسانی با استفاده از رده های سلولی نوروبلاستوما انسانی مانند BE(2)-C و یا SHSY-5Y کشف شده اند (۶)، بنابراین در حال حاضر اطلاعات چندانی درباره نحوه توزیع این واریانت ها در قسمت های مختلف سیستم عصبی انسان در دست نیست و نمی دانیم آیا الگوهای Splicing مشاهده شده در مغز جوندگان به سیستم عصبی انسان نیز قابل تعمیم است یا خیر. یافته های مطالعه حاضر نشان داد که بیان mRNA hMOR1A- و hMOR-1O در لمفوسیت های افراد با سابقه اعتیاد به اویپوئیدها در مقایسه با گروه شاهد به میزان معناداری کمتر است. از آن جایی که میانگین مدت زمان ترک این افراد نسبتاً طولانی است، به نظر می رسد که تفاوت های مشاهده شده بین این گروه و گروه شاهد در

نتیجه اعتیاد آن ها نبوده و پیامد زمینه ای ژنتیکی باشد؛ هر چند که احتمال مؤثر بودن هر دو عامل را نیز نمی توان نادیده گرفت. با این فرض که نتایج حاصل از لمفوسیت ها منعکس کننده وضعیت مغزی باشد، یافته های این مطالعه نشان می دهند که در سیستم اعصاب مرکزی معتادان ترک کرده، نقصی در گیرنده های μ اویپوئیدی وجود دارد. علی رغم نبود اطلاعات کافی درباره نحوه توزیع hMOR-1A و hMOR-1O در نواحی مختلف مغز انسان، مطالعات اخیر نشان داده اند که این دو اسپالایس واریانت و یا همولوگ های آن ها در قسمت هایی از مغز موش صحرایی که در پدیده پاداش دخالت دارند، به میزان زیادی بیان می شوند (۸، ۱۸). اگر الگوی مشابهی در مغز انسان وجود داشته باشد، کمبود بیان این اسپالایس واریانت ها می تواند در نهایت به کاهش رهایش دوپامین در سیستم دوپامینرژیک مزولیمبیک منجر شده، سندرم نقص پاداش (Reward Deficiency Syndrome) را ایجاد کند که سبب کاهش احساس لذت ناشی از پاداش های طبیعی مانند غذا، ارتباط جنسی و غیره شده و فرد مبتلا را به سمت مصرف مواد اعتیادآور سوق می دهد (۲۱). از سوی دیگر مطالعات انجام شده نشان داده اند که محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال یکی از اجزای اصلی سیستم پاسخ به استرس بوده و اویپوئیدهای آندوژن از طریق تأثیر بر گیرنده های μ و نیز K باعث مهار این محور می شوند. همچنین فعالیت بیش از حد و افزایش پاسخ دهی این محور نسبت به عوامل استرس زا می تواند باعث مصرف خود سرانه مواد اویپوئیدی شود. مشاهده شده است که در افراد با سابقه اعتیاد به هرویین، افزایش پاسخ دهی محور استرس تا مدت ها پس از ترک و گاهی اوقات تا آخر عمر ادامه داشته و می تواند سبب بازگشت به سوی مصرف مواد اویپوئیدی باشد (۲۲). بر اساس نتایج مطالعه حاضر این فرضیه مطرح می شود که احتمالاً نقص مشاهده شده در بیان mRNA گیرنده μ اویپوئیدی در معتادان ترک کرده، می تواند به افزایش پاسخ دهی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال منجر شده، افراد را به سوی مصرف اویپوئیدها سوق دهد. تأیید این فرضیه در آینده به انجام آزمایشات و مطالعات بیشتری نیازمند است.

نتیجه گیری

تا فهم کامل مکانیسم‌های نورویولوژیکی اعتیاد به عنوان یک اختلال مزمن هنوز راه زیادی باقی مانده است. یافته‌های این مطالعه نشان دادند که mRNA اسپالایس واریانت‌های hMOR-1A و hMOR-1O در لمفوسیت‌های خون محیطی انسان بیان می‌شوند و چنانچه بیان mRNA این گیرنده‌ها در لمفوسیت‌ها، منعکس کننده وضعیت بیان آن‌ها در مغز باشد، به نظر می‌رسد که کاهش

بیان این دو اسپالایس واریانت می‌تواند به عنوان یک عامل خطر، سبب متمایل شدن افراد به سمت مصرف داروهای اویپوئیدی شود و اندازه‌گیری این میزان در لمفوسیت‌ها به عنوان یک مارکر محیطی می‌تواند به شناسایی این افراد کمک کند. البته باید مدنظر داشت که تولید mRNA لزوماً به ترجمه و بیان پروتئین منجر نمی‌شود. تأیید نتایج حاصل از این مطالعه در سطح بیان پروتئین، نیازمند انجام مطالعات و تحقیقات وسیع‌تری در آینده است.

References:

1. Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of Addiction. *Neuron* 1998;21:467-76.
2. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, et al. Loss of Morphine-Induced Analgesia, Reward Effect and Withdrawal Symptoms in Mice Lacking the Mu-Opioid-Receptor Gene. *Nature* 1996;383:819-23.
3. Contet C, Kieffer BL, Befort K. Mu Opioid Receptor: A Gateway to Drug Addiction. *Curr Opin Neurobiol* 2004;14:370-8.
4. Giros B, Pohl M, Rochelle JM, Seldin MF. Chromosomal Localization of Opioid Peptide and Receptor Genes in the Mouse. *Life Sci* 1995;56:369-75.
5. Wendel B, Hoehe MR. The Human Mu Opioid Receptor Gene: 5 Regulatory and Intronic Sequences. *J Mol Med* 1998;76:525-32.
6. Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pan YX, Pasternak GW. Identification and Characterization of Six New Alternatively Spliced Variants of the Human Mu Opioid Receptor Gene, Oprm. *Neuroscience* 2005;133:209-20.
7. Pan YX. Diversity and Complexity of the Mu Opioid Receptor Gene: Alternative Pre-mRNA Splicing and Promoters. *DNA Cell Biol* 2005;24:736-50.
8. Oldfield S, Braksator E, Rodriguez-Martin I, Bailey CP, Donaldson LF, Henderson G, et al. C-Terminal Splice Variants of the Mu-Opioid Receptor: Existence, Distribution and Functional Characteristics. *J Neurochem* 2008;104:937-45.
9. Sedqi M, Roy S, Ramakrishnan S, Elde R, Loh HH. Complementary DNA Cloning of a Mu-Opioid Receptor From Rat Peritoneal Macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:563-74.
10. Bondy B, Ackenheil M, Birzle W, Elbers R, Frohler M. Catecholamines and Their Receptors in Blood: Evidence for Alterations in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1984;19:1377-93.
11. Bondy B, Ackenheil M, Elbers R, Frohler M. Binding of 3H-Spiperone to Human Lymphocytes: A Biological Marker in Schizophrenia? *Psychiatry Res* 1985;15:41-8.
12. Ilani T, Ben-Shachar D, Strous RD, Mazor M, Sheinkman A, Kotler M, et al. A Peripheral Marker for Schizophrenia: Increased Levels of D3 Dopamine Receptor mRNA in Blood Lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:625-8.
13. Kwak YT, Koo MS, Choi CH, Sunwoo I. Change of Dopamine Receptor Mrna Expression in Lymphocyte of Schizophrenic Patients. *BMC Med Genet* 2001;2:3.
14. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative Expression Software Tool (REST) for Group-wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
15. Duaux E, Krebs MO, Loo H, Poirier MF. Genetic Vulnerability to Drug Abuse. *Eur Psychiatry* 2000;15:109-14.
16. Koch T, Schulz S, Schroder H, Wolf R, Raulf E, Holtt H. Carboxyl-Terminal Splicing of the Rat Mu Opioid Receptor Modulates Agonist-Mediated Internalization and Receptor Resensitization. *J Biol Chem* 1998;273:13652-7.
17. Wolf R, Koch T, Schulz S, Klutzny M, Schröder H, Raulf E, et al. Replacement of Threonine 394 by Alanine Facilitates Internalization and Resensitization of the Rat Mu Opioid Receptor. *Mol Pharmacol* 1999;55:263-8.
18. Abbadie C, Pan YX, Pasternak GW. Differential Distribution in Rat Brain of Mu Opioid Receptor Carboxy Terminal Splice Variants MOR-1C-Like and MOR-1-Like Immunoreactivity: Evidence for Region-Specific Processing. *J Comp Neurol* 2000;419:244-56.
19. Nagai Y, Ueno S, Saeki Y, Soga F, Hirano M, Yanagihara T. Decrease of the D3 Dopamine Receptor mRNA Expression in Lymphocytes From Patients with Parkinson's Disease. *Neurology* 1996;46:791-5.
20. Ferrero P, Rocca P, Eva C, Benna P, Rebaudengo N, Ravizza L, et al. An Analysis of Lymphocyte 3H-N-Methyl-Scopolamine Binding in Neurological Patients. Evidence of Altered Binding in Alzheimer's Disease. *Brain* 1991;114:1759-70.
21. Comings DE, Blum K. Reward Deficiency Syndrome: Genetic Aspects of Behavioral Disorders. *Prog Brain Res* 2000;126:325-41.
22. Kreek MJ. Methadone-Related Opioid Agonist Pharmacotherapy for Heroin Addiction. History, Recent Molecular and Neurochemical Research and Future in Mainstream Medicine. *Ann N Y Acad Sci* 2000;909:186-216.

Detection and Quantization of the Expression of Two mu-Opioid Receptor Splice Variants mRNA (hMOR-1A and hMOR-1O) in Peripheral Blood Lymphocytes of Long-Term Abstinent Former Opioid Addicts

N. Vouseoghi, Pharm D*; F. Roushanzamir, PhD**; A. Goodarzi, MD***; T. Sedaghati, MD****; M.R. Zarrindast, PhD*****; M.R. Noori Daloui, PhD*****

* Pharmacologist, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

** Professor of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran.

*** Resident of Neurology, Sina Cellular and Molecular, Tehran, Iran.

**** Student of Medical, Sina Cellular and Molecular, Tehran, Iran.

***** Professor of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran.

***** Professor of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Background and Objectives

The mu-Opioid receptor (MOR) exerts a critical role on effects of opioids. The objective of this study is to find a peripheral bio-marker in addiction studies through quantization of the expression of two MOR splice variants mRNA (hMOR-1A and hMOR-1O) in peripheral blood lymphocytes (PBLs) of long-term abstinent former opioids addicts.

Methods

In this case-control study, case and control people were male and divided in two groups: people who gave up addiction to opioids (case) and healthy individuals without history of addiction (control). The mRNA expression in PBLs of participants was detected and measured by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) using SYBR Green Dye.

Results

The hMOR-1A mRNA expression in PBLs of abstinent group was significantly reduced and reached to 0.33 of the control group ($p < 0.001$). Similar results were obtained for the other splice variant with the mRNA expression of hMOR-1O in PBLs of abstinent group reaching to 0.38 of that of the control group ($p < 0.001$).

Conclusion

mRNA expression deficiency of two mu-opioid receptor splice variants, hMOR-1A and nMOR-1O, seems to be a risk factor making individuals vulnerable to drug addiction. Based on this analysis measuring the amount of mRNA expression of these two splice variants in PBLs can serve as a peripheral bio-marker for detecting people at risk.

Keywords: Lymphocytes; mRNA Expression Profiling; Analgesis, Opioids; addiction; mu-Opioid Receptor Splice Variants.

Corresponding Author: Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Phone No.: (+98)21-88 95 30 05;

Email: nooridaloui@sina.tum.ac.ir

Received: 3/Sep, 2008

Accepted: 18/Sep, 2008