

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00809

毒品成瘾与脑组织基因表达谱的研究进展

陈峰, 李涛, 樊栓良, 党永辉, 陈腾, 阎春霞

西安交通大学医学院法医学系, 卫生部法医学重点实验室, 环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 西安 710061

摘要: 毒品成瘾是由滥用毒品外在因素与遗传易感性等内在因素共同作用而导致的一种慢性脑疾病; 毒品成瘾的机制目前还不十分清楚。毒品成瘾研究的一个主要目标是鉴别和分离毒品导致脑功能障碍的分子机制; 采用高通量的基因表达谱技术研究毒品成瘾者在不同状态下脑基因表达全貌, 对深入认识毒品成瘾的机制具有重要的意义。文章综述了毒品成瘾的遗传机制及高通量脑组织基因组表达技术——SAGE 和微阵列(Microarray)在毒品成瘾研究中的进展。

关键词: 毒品滥用; 毒品成瘾; 基因表达谱; 基因表达系列分析(SAGE); 微阵列; 生物信息学

Gene expression profiling in drug addicted brain

CHEN Feng, LI Tao, FAN Shuan-Liang, DANG Yong-Hui, CHEN Teng, YAN Chun-Xia

Department of Forensic Sciences; Key Laboratory of the Health Ministry for Forensic Sciences; Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases of the Education Ministry, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710061, China

Abstract: Drug addiction, a chronic brain disease caused by interaction of *in vitro* drug toxification and *in vivo* gene susceptibility, has been widely studied but its underlining mechanism is so far been elucidated. A major goal in this field is to identify drug-induced molecular changes and their effects on brain function. By the advance of high throughput technologies in genomics and transcriptomics, the whole gene expression profile in addicted brain could be obtained and proved to be a very powerful tool to unclothe the molecular mechanism underlying the addiction biology context. Here, we summarized the progress of serial analysis of gene expression (SAGE) and microarray, as well as their application in drug addiction.

Keywords: drug abuse; drug addiction; gene expression profiling; serial analysis of gene expression (SAGE); microarray; bioinformatics

毒品滥用和成瘾目前是一种严重危及人类健康并为全球所关注的公共卫生问题, 同时也给社会、经济及安全带来严重的危机^[1]。对毒品成瘾的问题, 不同领域的专家进行了广泛的研究, 并取得长足的进展, 但其机制仍然还不十分清楚。采用功能基因组和生物信息学技术探索脑功能和成瘾的机制是目前神经生物学领域的一个热点方向。本文综述了毒

品成瘾的遗传机制及高通量脑组织基因组表达技术——SAGE和microarray在毒品成瘾研究中的进展。

1 毒品滥用和成瘾

毒品成瘾(Drug addiction)是滥用毒品(Drug abuse)而导致的一种流行性、复发性的慢性脑疾病, 是反复使用毒品造成中枢神经系统发生适应性变化

收稿日期: 2008-01-11; 修回日期: 2008-02-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30672356, 30572089)和陕西省社会发展科技攻关项目(No. 2006K08-G6)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672356, 30572089) and Shaanxi Key Project of Science and Technology (No. 2006K08-G6)]

作者简介: 陈峰(1982-), 男, 河南商丘人, 博士研究生, 研究方向: 法医学及人类遗传学。Tel: 029-82657977; E-mail: chenfeng418@stu.xjtu.edu.cn

通讯作者: 阎春霞(1967-), 女, 陕西商洛人, 博士, 副教授, 研究方向: 法医学、人类遗传学研究及毒品依赖机制。Tel: 029-82655117; E-mail: yanchx@mail.xjtu.edu.cn

陈腾(1965-), 男, 陕西富平人, 博士, 教授, 研究方向: 法医学、人类遗传学及毒品依赖机制。Tel: 029-82657977; E-mail: chen-teng@mail.xjtu.edu.cn

而导致的耐受(Tolerance)、躯体依赖(Physical dependence)、心理依赖(Psychological dependence)即渴求(Craving)、复吸(Relapse)等复杂的病理生理过程,并伴有觅药(Drug-seeking)、用药(Drug-taking)等强迫行为(Compulsive behavior)^[1-4]。

目前已有证据表明,与毒品成瘾相关的脑区域有:前额叶皮质(FLC)、颞叶皮质(TLC)、蓝斑核(NUC)、苍白球(GP)、中脑腹侧被盖区(VTA)、腹隔核(NAc)、杏仁核(AMG)、海马(HIP)、下丘脑(HT)、尾状核(CPu)等^[1-4]。常见的毒品,如海洛因、吗啡、杜冷丁、美沙酮等阿片类物质的效应与这些部位都有联系,苯丙胺类兴奋剂的效应与腹隔核联系更显著,而可卡因类毒品的作用与皮质额叶联系更显著。各类毒品通过与以上脑区域相互作用之后激活一个或多个信号转导通路产生各种毒理作用,这些信号通路包括:脑内阿片受体通路^[5]、多巴胺通路^[6]、大麻受体通路^[7]、谷氨酸受体通路^[8]和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等^[9]通路,这些通路可介导多种神经兴奋或抑制功能,并影响突触的可塑性、脑学习、记忆等高级功能^[1,2,10]。因此毒品成瘾是一种具有复杂症状的脑疾病。

毒品成瘾不但是一个个体脑疾病,同时也是目前严重危及人类健康并为全球所关注的公共卫生问题。据《2004 年度世界毒品报告》全球有 1.85 亿人滥用毒品^[11];我国大陆在册的吸毒人数达 105.3 万,现有吸毒人员 74 万余人,其中阿片类、海洛因吸毒者 65 万人;吸毒人员遍布全国所有的省市,涉及不同的民族及人群层次。尽管毒品问题进行了广泛的研究,成瘾的机制目前并不十分清楚,各种戒毒治疗方法均不理想,戒毒后的复吸率高达 90%,吸毒的人数仍然在持续上升。艾滋病(HIV)感染目前我国进入广泛流行期,其主要特点是 HIV 感染者以静脉注射吸毒(IVDU)者为主,IVDU 也引起了乙肝(HBV)、丙肝(HCV)传播,导致多系统发生感染;25% 吸毒成瘾者会在开始吸毒后 10~20 年左右死于中毒、疾病、外伤等,即发生各类毒品相关死亡(Drug-related death)^[12],从而造成一系列社会危机。

由于毒品成瘾是一种脑疾病,该疾病可以因为对其发生机制的深入了解而得到有效治疗,从而使患病个体和整个社会受益。因此,采用新的研究策略,在整个中枢神经系统的基因、基因表达产物及系统生物学水平探索毒品成瘾的本质,发现新的治疗药物作用靶标,预防毒品相关死亡的发生将具有

重要的社会 and 科学意义。基因组学及功能基因组学为成瘾研究提供一个强大的工具^[13]。

2 毒品成瘾具有遗传易感性

关于毒品成瘾的形成,目前研究认为 40%~60% 的易感性与遗传因子即基因有关^[14,15],是多个遗传因子及其与环境因素共同作用而导致的一种复杂的脑疾病。目前已经鉴别出很多与成瘾相关的基因。动物实验表明,对动物一些基因的进行修饰或基因敲除之后,动物对毒品的反应性发生改变。如 Bohn 等^[16]敲除小鼠 β -arrestin-2 基因,无论急性大剂量给药或慢性给药,基因敲除小鼠中均没有 μ 阿片受体的脱敏化表现,也不表现吗啡耐受;但是 β -arrestin-2 基因敲除不能阻止慢性吗啡引起的腺苷酸环化酶活性增加,仍能形成对吗啡的躯体依赖。 $mGluR$ 5 受体基因敲除,小鼠自身给药行为消失^[17]; $Muscarinic$ $M5$ 受体基因缺乏,小鼠对阿片的偏好消失^[18]; $Alpha$ $1b$ 肾上腺素能受体基因缺乏,小鼠对吗啡、可卡因口服给药的行为降低^[19];P 物质受体基因缺乏,小鼠对阿片的奖赏效应降低^[20]。Olive 等^[21]采用定向基因敲除的技术研究表明蛋白激酶(Protein kinase C, PKC)的 γ 和 ϵ 亚型基因在小鼠药物成瘾中也发挥重要作用。2006 年, Zhang 等^[22]研究了 D1 和 D3 受体在可卡因成瘾者细胞内信号传导和基因表达中的作用时发现, D1 和 D3 受体在脑内发挥相反的作用。D1 和 D3 受体突变的小鼠与野生型小鼠在可卡因给药后,分别表现为活动抑制和活动增加;且 D1、D3 受体在 c-fos 的表达中起着相反的调控作用。

在人群中的研究表明: μ 和 δ 阿片受体基因在不同群体之间存在单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP),特别是 μ 阿片受体基因 118 nt 位置的 SNP 在不同种族之间有很大的差别,具有特定 SNP 的人群的阿片受体对 β -内啡肽的亲合力增大 3 倍,从而使该人群对阿片毒品的易感性显著增加^[23];前脑啡肽基因、D2、D3、D4 和 D5 多巴胺受体基因多态性与海洛因依赖易感性有关^[22,24]。

2003 年人类基因组完成图在 *Science* 杂志发表,2005 年人类基因组变异图在 *Nature* 杂志发表^[25],标志着在基因组学领域研究人员的工作重点从识别各个不同的基因向阐明基因功能方面转移。

基因的功能由其最终表达产物——蛋白质来实现,但是大量的研究证明,蛋白产物的数量直接决定于 mRNA 的数量。所以,成瘾脑细胞活动的特定条

件和特定时期,含有的mRNA的种类和数目可以反映其功能和生化特性,如突触可塑性、细胞骨架功能、神经元能量的变化、细胞内信号的转导等。这种转录水平的基因表达谱(Gene expression profile)^[26]可以用脑的转录组(Transcriptome)^[27, 28]来表示,即特定脑区域转录的所有基因及其表达丰度。

脑内的转录组并不是一成不变的,受神经元内部和外部因素的调控。在毒品成瘾的不同病理状态下,如依赖、戒断、渴求、复吸状态下,一些基因表达增强,一些基因表达降低,各基因表达的丰度不同。因此对成瘾脑转录组的研究不仅能够提供有关神经元的生物学功能的基本信息,还能从脑整体水平反映神经元对毒品刺激的生物学反应,从而探明成瘾的机制、建立有效的治疗方法。这是神经生物学领域目前研究的一个热点方向。

3 毒品成瘾与脑基因表达谱研究

早在2000年美国NIH国家毒品滥用研究所(NIDA)、国家酒精滥用及成瘾研究所(NIAAA)为了鼓励毒品和药物滥用的研究,在政府财政年会上发布了毒品应用研究的请求(Request for Application, RFAs);除此之外,NIDA和NIAAA还激励研究人员应用基因表达谱技术识别毒品和酒精毒性作用所导致的基因表达谱特征性改变(<http://www.nida.nih.gov>)。2003年,我国国家重点基础研究发展计划(973计划)启动了“精神活性物质依赖的生物学基础及防治”项目,其中涉及对成瘾相关主要脑区研究基因表达及蛋白质功能研究(<http://www.nartc.cn/973/index.htm>)。2008年,973计划重要支持方向也包含了精神依赖的神经生物学机制的研究等相关项目(<http://www.973.gov.cn/>)。

有很多研究基因表达谱的方法,包括基因表达序列分析(Serial analysis of gene expression, SAGE)^[29]、表达序列标签(Expressed sequence tags, EST)^[30]、mRNA差异显示(Differential display, DD)^[31]、微阵列杂交(Microarray)^[32]、cDNA消减杂交(Substraction hybridization, SM)^[33]以及新近发展起来的GeneCalling技术^[34]。但高通量研究基因表达谱的方法目前常用的主要是SAGE和microarray技术,并在毒品成瘾研究中得到应用。

3.1 SAGE 技术的原理

SAGE技术是在1995年由Velculescu等^[29]提出

并首先发表在著名的*Science*杂志。经过不断的发展和改进,SAGE技术目前成为精确定量、综合分析组织细胞中基因表达谱的强有力工具。

SAGE技术主要基于两个原理^[29, 35-42]:首先由锚定酶(Anchoring enzyme, AE)*Nla* 识别并酶切cDNA序列poly A端特定位置(酶切识别位点为CATG),形成的10 bp的短核苷酸序列,即SAGE标签;理论上10 bp的标签能够形成 4^{10} (1 048 576)种不同的序列组合,远远大于目前人类基因组中所预测的基因的数量,因此SAGE标签足以识别人类基因组中所有基因的转录产物。其次,SAGE标签经随机连接可以形成长的核苷酸多联体(Concatemer),这个长的DNA分子经过克隆、测序,就可以得到代表基因表达的标签,标签的种类代表不同的转录物,而标签重复出现的次数代表该转录物的拷贝数,即基因表达的丰度。

SAGE技术主要应用了多酶切、PCR扩增、纯化、分子克隆、DNA测序及生物信息学分析方法。实验的基本过程为:混合RNA样本和寡核苷酸(Oligo dT)磁珠,以寡核苷酸为引物反转录合成cDNA;用锚定酶*Nla*消化,形成含有单标签的末端,末端10 bp为标签序列;将消化所得的cDNA等分为两部分,分别与含标签酶(Tagging enzyme, TE)位点的接头A或接头B连接。常用的标签酶常用是*BsmF1*,为典型的S类限制酶,能在其不对称识别位点上游的20 bp处切割DNA双链,产生平末端,得到长约50 bp的标签;混合连有不同接头的标签,经连接形成双标签(Ditag)。根据接头序列设计引物,扩增双标签;用锚定酶消化双标签,释放出约26 bp的双标签;连接酶连接双标签可以得到一个长的DNA分子,进行克隆及测序。对标签数据采用SAGE软件进行分析(<http://www.sagenet.org>),并与已有的SAGE文库进行比较(<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/sage/map/Hs/Nla>),发现表达差异的基因。

3.2 SAGE 的技术优化

早期的SAGE技术对实验材料的数量要求大,在用于活组织检查等少量或微量的生物样本时受限。实验中在应用PCR扩增提高标签数量的同时,往往不可避免的产生大量的接头二聚体污染。为此Datson提出了microSAGE^[35]解决方案,该方法将SAGE步骤从RNA分离到标签释放的所有步骤简化为“单管”程序,这不仅将原始RNA用量减少至

1/500 ~ 1/5 000, 也提高了效率, 减少了纯化步骤; 另外, 该法还采用有限的PCR循环次数获得足量双标签。Peters等^[36]提出了SAGE-Lite法, 将实验材料的初始用量进一步减少到 0.1 μg , 同时也使SAGE标签与长cDNA更易快速分离。Ye等^[37]提出了mini-SAGE法, 该方法许多方面都做了改进, 且他们用此法成功建立了两个成纤维细胞的SAGE标签库, 对其中一个库的3,838个标签的初步分析, 证实了一个典型的成纤维细胞基因表达图谱。Vilain于2003年提出的SAR-SAGE (Small amplified RNA-SAGE)^[38], 在SAGE实验过程中非常巧妙地引入了一个mRNA的扩增步骤, 从而显著降低了mRNA的用量, 并克服了SAGE-Lite等方法由于引入了额外的PCR步骤进行样品扩增而产生的忠实性大大降低的问题。2004年Heiden-blut提出了aRNA-longSAGE(Antisense RNA-longSAGE)技术^[39], 他利用扩增得到的反义RNA来构建SAGE文库, 起始总RNA用量减少到了40 ng。总之, SAGE技术的不断革新完善, 使其能够更加适应全局分析基因表达谱的需要。为了分析基因的启动子区域和起始位点的变异, Hashimoto等^[43]建立了人类细胞5'-端SAGE技术, 5'-端SAGE的数据库也随之建立, 通过该技术建立的数据库提供了各种mRNA标签的频率和存在于启动子区域、内含子和基因间区的转录起始位点。更加拓宽了SAGE技术的应用范围。

3.3 SAGE 技术在毒品成瘾研究中的应用

SAGE技术在人体疾病研究方面, 目前应用最多的是对肿瘤的研究^[40], 包括肿瘤部位组织和周围正常组织基因表达的比较, 肿瘤不同阶段、治疗前后、不同治疗方案基因表达谱的特征, 肿瘤细胞脱离原发环境的基因表达谱的改变。

与SAGE技术在肿瘤研究及其他方面相比, SAGE在脑基因表达谱研究方面相对较少。2003年Hauser等^[41]为了识别帕金森氏综合征特异性基因表达, 建立了2个正常人脑黑质和相邻中脑的SAGE文库, 识别出3 700个转录本, 其中有3个表达非常高的SAGE标签和已知的基因及ESTs都不相匹配, 从而筛选出了与帕金森氏综合症发病可能相关的新的基因。Sun等^[42]采用SAGE技术研究了双相性精神障碍患者尸体脑组织大脑额叶皮质基因表达谱, 并与精神分裂症、抑郁症患者和正常尸体脑组织额叶皮质的表达谱进行比较, 发现编码5-羟色胺转运蛋白和NF-kappaB转录因子复合物的基因转录水平在

这3种疾病中均显著升高。

目前用SAGE技术研究毒品依赖机制较少。Ouchi等^[44]用SAGE技术研究了一次急性分别给予大鼠甲基安非他明(Methamphetamine, METH)和苯环利定(Phencyclidine, PCP)1小时后大鼠脑皮质中基因表达谱, 从两种SAGE文库中均获得50 000种标签, 18 000种标签得到注释; 通过与盐水对照组大鼠皮质SAGE文库进行比较, 识别出了与METH和PCP急性反应相关的基因。在两种文库表达显著上调的基因有7种: 钙调蛋白2(Calmodulin 2, CaM2)、基质细胞衍生因子受体1(Stromal cell-derived factor receptor 1)、脑特异性血管生成抑制因子1相关蛋白2(Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 associated protein 2)、basigin、Rheb、olfactomedin-related ER-localized蛋白和促甲状腺激素释放激素受体(Thyrotropin-release hormone receptor)。下调的基因有5种: lipocalin、醛缩酶A(Aldolase A)、甘氨酸受体2(Glycine receptor 2)、importin 13和脂肪酸结合蛋白3(Fatty acid binding protein 3)。本研究给我们提供了METH和PCP急性药物作用与不同基因反应之间的联系, 但是急性一次给药与人体毒品依赖时反复用药的模式还有很大的差别。目前尚未有对毒品依赖状态下人体全脑组织基因表达谱的系统研究。

3.4 SAGE 和 Microarray 技术比较

与SAGE技术同年诞生、并肩走过12载的Microarray技术^[32]也是目前研究基因表达谱的常用工具, 在毒品成瘾、脑组织基因表达谱研究中也得到应用。2006年Lehrmann等^[45]采用Mammalian Gene Collection(MGC)芯片组分析了可卡因(Cocaine)、大麻(Cannabis)和苯环利定(Phencyclidine)毒品成瘾死亡者大脑额叶皮质基因表达情况, 发现钙调基因(*CALM1*, *CALM2*, *CAMK2B*)转录降低, 与胆固醇合成运输相关基因(*FDFT1*, *APOL2*, *SCARB1*)、与高尔基/内质网(ER)功能相关的基因(*SEMA3B*, *GCC1*)转录增加, 并且通过与对照组比较, 表明这些变化不是细胞和机体代谢应急所导致的一般改变, 而是滥用毒品所引起的特异性改变。2007年, Mash等^[46]采用Affymetrix公司人类基因组U133 AB芯片组(<http://www.affymetrix.com>)研究了慢性可卡因成瘾者脑组织海马区基因转录情况, 与对照组相比, 慢性可卡因依赖者显示海马区有151个基因转录上调, 91个基因转录下调, 其中转录改变最显著的是*RECK*基因(*reversion-inducing-cysteine-rich*

protein with kazal motifs), 该基因表达产物是一种新型基质金属蛋白酶(MMP)抑制剂, 可在转录后调节细胞外基质整合、抑制血管的形成。

尽管 Microarray 是一种强有力的基因表达谱研究工具, 但是芯片杂交过程的很多因素影响实验结果, 包括杂交和洗涤时的温度、离子强度、pH 值、cDNA 用量、非特异性杂交及其荧光燃料的强度、饱和度等, 因此各实验室之间所获得的结果难以相互比较; 而 SAGE 技术不存在这方面的不足。SAGE 第二优点是不断丰富的电子化的 SAGE 数据库 (www.sagenet.org), 可以使不同实验室的研究者直接比较所获得的实验结果。与 Microarray 技术相比, SAGE 最大的优点不需要预先知道所研究基因的序列或者克隆特征, 是一种开放的技术平台系统, 对于药物依赖等多基因疾病基因表达谱的研究, SAGE 技术的应用价值不容忽视。

参考文献(References):

- [1] Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(2): 119–128. [\[DOI\]](#)
- [2] Leshner AI. Addiction is a brain disease and it matters. *Science*, 1997, 278(5335): 45–47. [\[DOI\]](#)
- [3] Robinson TE, Berridge KC. Addiction. *Annu Rev Psychol*, 2003, 54: 25–53. [\[DOI\]](#)
- [4] Cami J, Farre M. Drug addiction. *N Engl J Med*, 2003, 349(10): 975–986. [\[DOI\]](#)
- [5] Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol*, 2002, 66(5): 285–306. [\[DOI\]](#)
- [6] Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron*, 2003, 37(4): 577–582. [\[DOI\]](#)
- [7] Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasenfiz L, Arinami L, Arinami T, Uhl GR. Brain neuronal cb2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS ONE*, 2008, 3(2): 1–11. [\[DOI\]](#)
- [8] Kalivas PW. Glutamate systems in cocaine addiction. *Current Opinion in Pharmacology*, 2004, 4(1): 23–29. [\[DOI\]](#)
- [9] Roberts CJ, Nelson B, Marton MJ, Stoughton R, Meyer MR, Bennett HA, He YD, Dai H, Walker WL, Hughes TR, Tyers M, Boone C, Friend SH. Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science*, 2000, 287(5454): 873–880. [\[DOI\]](#)
- [10] Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*, 2006, 29: 565–598. [\[DOI\]](#)
- [11] The 47th Conference of WHO Commission on Narcotic Drugs, Vienna. The world situation on drug addiction. 2004, 3.
WHO 麻醉药品委员会第 47 届会议. 药物滥用的世界形势. 2004 年 3 月, 维也纳.
- [12] YAN Chun-Xia, ZHANG Hong-Xing, MA Li-Xia, ZHANG Ping, FANG Jie, TANG Cheng-Han. The forensic analysis of 86 drug related death. *Chinese Journal of Drug Dependence*, 2002, 11(3): 35–39.
阎春霞, 张宏星, 马丽霞, 张平, 方杰, 唐承汉. 86 例毒品相关死亡的法医学研究及分析. *中国药物依赖性杂志*, 2002, 11(3): 35–39.
- [13] Nestler EJ, Landsman D. Learning about addiction from the genome. *Nature*, 2001, 409(6822): 834–835. [\[DOI\]](#)
- [14] Uhl GR. Molecular genetics of addiction vulnerability. *NeuroRx*, 2006, 3(3): 295–301. [\[DOI\]](#)
- [15] Li CY, Mao X, Wei L. Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS Comput Biol*, 2008, 4(1): 2. [\[DOI\]](#)
- [16] Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 2000, 408(6813): 720–723. [\[DOI\]](#)
- [17] Grueter BA, Gosnell HB, Olsen CM, Schramm-Sapota NL, Nekrasova T, Landreth GE, Winder DG. Extracellular-signal regulated kinase 1-dependent metabotropic glutamate receptor 5-induced long-term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted by cocaine administration. *J Neurosci*, 2006, 26(12): 3210–3219. [\[DOI\]](#)
- [18] Yamada M, Basile AS, Fedorova I, Zhang W, Duttaroy A, Cui Y, Lamping KG, Faraci FM, Deng CX, Wess J. Novel insights into M5 muscarinic acetylcholine receptor function by the use of gene targeting technology. *Life Sci*, 2003, 74(2-3): 345–353. [\[DOI\]](#)
- [19] Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, Tassin JP. Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J Neurosci*, 2002, 22(7): 2873–2884.
- [20] Zhou X, Li JJ, Yu LC. Plastic changes of calcitonin gene-related peptide in morphine tolerance: behavioral and immunohistochemical study in rats. *J Neurosci Res*, 2003, 74(4): 622–629. [\[DOI\]](#)
- [21] Wang HL, Xiang XH, Guo Y, Wu WR, Cao DY, Wang HS, Zhao Y. Ionotropic glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area modulates DeltaFosB expression in the nucleus accumbens and abstinence syndrome in morphine withdrawal rats. *Eur J Pharmacol*, 2005, 527(1-3): 94–104. [\[DOI\]](#)
- [22] Zhang JH, Xu M. Opposite regulation of cocaine-induced intracellular signaling and gene expression by dopamine D1 and D3 receptors. *New York Academy of Sciences*, 2006, 1074: 1–12. [\[DOI\]](#)

- [23] Bart G, Heilig M, LaForge KS, Pollak L, Leal SM, Ott J, Kreek MJ. Substantial attributable risk related to a functional mu-opioid receptor gene polymorphism in association with heroin addiction in central Sweden. *Mol Psychiatry*, 2004, 9(6): 547–549. [\[DOI\]](#)
- [24] Thomas TC, Kruzich PJ, Joyce BM, Gash CR, Suchland K, Surgener SP, Rutherford EC, Grandy DK, Gerhardt GA, Glaser PE. Dopamine D4 receptor knockout mice exhibit neurochemical changes consistent with decreased dopamine release. *J Neurosci Methods*, 2007, 166(2): 306–314. [\[DOI\]](#)
- [25] The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*, 2005, 437(7063): 1299–1320. [\[DOI\]](#)
- [26] Pleasance ED, Marra MA, Jones SJM. Assessment of SAGE in transcript identification. *Genome Res*, 2003, 13(6): 1203–1215. [\[DOI\]](#)
- [27] Saha S, Sparks AB, Rago C, Akmaev V, Wang CJ, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 508–512. [\[DOI\]](#)
- [28] Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Hoshino N, Kaneko S. Genome-wide transcriptome mapping analysis identifies organ-specific gene expression patterns along human chromosomes. *Genomics*, 2004, 84(5): 867–875. [\[DOI\]](#)
- [29] Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995, 270(5235): 484–487. [\[DOI\]](#)
- [30] Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and Human Genome Project. *Science*, 1991, 252(5013): 1651–1656. [\[DOI\]](#)
- [31] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257(5072): 967–971. [\[DOI\]](#)
- [32] Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follett MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(13): 1675–1680. [\[DOI\]](#)
- [33] Sive HL, John TS. A simple subtractive hybridization technique employing photoactivatable biotin and phenol extraction. *Nucleic Acids Res*, 1998, 16(22): 10937. [\[DOI\]](#)
- [34] Shimkets RA, Lowe DG, Tai JT, Sehl P, Jin H, Yang R, Predki PF, Rothberg BE, Murtha MT, Roth ME, Shenoy SG, Windemuth A, Simpson JW, Simons JF, Daley MP, Gold SA, McKenna MP, Hillan K, Went GT, Rothberg JM. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(8): 798–803. [\[DOI\]](#)
- [35] Datson NA, van der Perk-de Jong J, van den Berg MP, de Kloet ER, Vreugdenhil E. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(5): 1300–1307. [\[DOI\]](#)
- [36] Peters DG, Kassam AB, Yonas H, O'Hare EH, Ferrell RE, Brufsky AM. Comprehensive transcript analysis in small quantities of mRNA by SAGE-lite. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(24): 39. [\[DOI\]](#)
- [37] Ye SQ, Zhang LQ, Zheng F, Virgil D, Kwitrovich PO. miniSAGE: gene expression profiling using serial analysis of gene expression from 1 microg total RNA. *Anal Biochem*, 2000, 287(1): 144–152. [\[DOI\]](#)
- [38] Vilain C, Libert F, Venet D, Costagliola S, Vassart G. Small amplified RNA-SAGE: an alternative approach to study transcriptome from limiting amount of mRNA. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(6): 24. [\[DOI\]](#)
- [39] Heidenblut AM, Lüttges J, Buchholz M, Heinitz C, Emmersen J, Nielsen KL, Schreiter P, Souquet M, Nowacki S, Herbrand U, Klöppel G, Schmiegel W, Gress T, Hahn SA. aRNA-longSAGE: a new approach to generate SAGE libraries from microdissected cells. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(16): 131. [\[DOI\]](#)
- [40] Walter-Yohrling J, Cao X, Callahan M, Weber W, Morgenbesser S, Madden SL, Wang C, Teicher BA. Identification of genes expressed in malignant cells that promote invasion. *Cancer Res*, 2003, 63(24): 8939–8947.
- [41] Hauser MA, Li YJ, Takeuchi S, Walters R, Nouredine M, Maready M, Darden T, Hulette C, Martin E, Hauser E, Xu H, Schmechel D, Stenger JE, Dietrich F, Vance J. Genomic convergence: identifying candidate genes for Parkinson's disease by combining serial analysis of gene expression and genetic linkage. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(6): 671–677. [\[DOI\]](#)
- [42] Sun Y, Zhang L, Johnston NL, Torrey EF, Yolken RH. Serial analysis of gene expression in the frontal cortex of patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry Suppl*, 2001, 41: 137–141. [\[DOI\]](#)
- [43] Hashimoto S, Suzuki Y, Kasai Y, Morohoshi K, Yamada T, Sese J, Morishita S, Sugano S, Matsushima K. 5'-end SAGE for the analysis of transcriptional start sites. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(9): 1146–1149. [\[DOI\]](#)
- [44] Ouchi Y, Kubota Y, Ito C. Serial analysis of gene expression in methamphetamine- and phencyclidine-treated rodent cerebral cortices: are there common mechanisms? *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1025: 57–61. [\[DOI\]](#)
- [45] Lehmann E, Colantuoni C, Deep-Soboslay A, Becker KG, Lowe R, Huestis MA, Hyde TM, Kleinman JE, Freed WJ. Transcriptional changes common to human cocaine, cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS ONE*, 2006, 1: 114. [\[DOI\]](#)
- [46] Mash DC, French-Mullen J, Adi N, Qin Y, Buck A, Pablo J. Gene expression in human hippocampus from cocaine abusers identifies genes which regulate extracellular matrix remodeling. *PLoS ONE*, 2007, 2(11): 1187. [\[DOI\]](#)