

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.009

大鼠大麻素 I 型受体绿色荧光融合蛋白真核表达载体的构建与鉴定*

冯睿^{1,2} 范娟¹ 刘一辉² 钱召强² 魏春玲² 任维^{2Δ}

(1 陕西师范大学生命科学学院 陕西 西安 710062; 2 陕西师范大学教师专业能力发展中心 陕西 西安 710062)

摘要 目的:构建大鼠大麻素 I 型受体绿色荧光融合蛋白真核表达载体并观察其在细胞中的表达。**方法:**大鼠 CB1 基因序列设计引物,以大鼠脑组织为模板扩增 CB1 基因编码区片段,克隆至增强型绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-N3 中,构建重组融合蛋白表达载体 pCB1-EGFP。将 pCB1-EGFP 质粒转染 HeLa 细胞,通过观察 EGFP 报告基因的表达以及免疫荧光,Western Blot 方法鉴定 CB1 可在真核细胞中过表达情况。**结果:**构建重组融合蛋白表达载体 pCB1-EGFP,单双酶切和测序验证正确。将 pCB1-EGFP 质粒转染 HeLa 细胞,荧光显微镜下观察到融合表达的绿色荧光蛋白,且呈胞膜表达。免疫荧光试验也证明重组载体转染后,CB1 基因和 GFP 共同定位于胞膜部分。Western Blot 实验证明表达 CB1 蛋白。**结论:**成功构建了高表达的 CB1-EGFP 融合蛋白真核表达载体。**关键词:**大鼠;HeLa 细胞;CB1;绿色荧光蛋白

中图分类号:R-332,Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)26-5034-04

Construction of Eukaryotic Expression Vector pCB1-EGFP and its Expression in HeLa Cells*

FENG Rui^{1,2}, FAN Juan¹, LIU Yi-hui², QIAN Zhao-qiang², WEI Chun-ling², REN Wei^{2Δ}

(1 College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi, 710062, China;

2 Key Laboratory of Modern Teaching Technology, Ministry of Education, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi, 710062, China)

ABSTRACT Objective: To construct the pCB1-EGFP plasmid and investigate its expression in HeLa cells. **Methods:** Rat CB1 coding sequence (CDS) was obtained, and primers were designed according to the mRNA sequence published in NCBI databases. With rat brain RNA as template, CB1 CDS was amplified by RT-PCR and cloned into pEGFP-N3 vector. Proved by enzyme digestion and sequencing the recombinant plasmid was constructed named pCB1-EGFP. The vector with pCB1-EGFP was transfected into HeLa cells, then it was analyzed by immunofluorescence staining and western blot. **Results:** The specificity of PCR products by DNA sequencing and restriction endonuclease reactions demonstrated that recombinant pCB1-EGFP plasmid was successfully constructed. Green fluorescence expression of the HeLa cells can be observed under fluorescence microscope and CB1-GFP fusion protein was expressed predominantly in cytomembrane while GFP was alone located in cells and expression of CB1 protein was detected in HeLa cells by western blot. **Conclusions:** pCB1-EGFP has been successfully cloned, which provided a basis for further investigation of CB1's physiological and physiopathological functions and regulatory mechanism.

Key word: Rat; HeLa cell; CB1; Reporter gene**Chinese Library Classification:** R-332, Q78 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)26-5034-04

前言

自从内源性大麻素系统(endocannabinoid system)被发现后,人们对该系统的生理功能、药理活性等方面进行了大量的研究。其中对大麻受体(cannabinoid receptors)尤其引人关注,目前已确认大麻素受体有两种亚型:CB1(Cannabinoid receptor type 1)和 CB2(Cannabinoid receptor type 2^[1])。CB1 受体主要表达于中枢神经系统,参与调节如 GABA、多巴胺、去甲肾上腺素、谷氨酸和 5-羟色胺(5-HT)等多种神经递质的释放^[2]。尽管在正常生理条件下,CB1 受体在外周免疫系统的表达量较低,但其仍然直接参与 T 细胞、B 细胞等的免疫调节^[3]。近年的

研究表明,在佛波酯的作用下,巨噬细胞 CB1 mRNA 及蛋白水平升高^[4]。在细胞因子,如 IL-4 的作用下,T 细胞 CB1 mRNA 及蛋白水平升高^[5,6],并且 CB1 在参与调节 T 细胞的凋亡中发挥了重要的作用^[7,8]。但调控机制尚不明确。基于以上研究结果,构建特异性 CB1 基因的真核表达载体,可望在细胞水平揭示其调控机理。大鼠是哺乳动物研究的最主要模式生物,本试验通过克隆大鼠 CB1 基因并构建真核融合蛋白表达载体,初步验证了 CB1 基因过表达及其在细胞的定位,为后期工作建立稳定表达的细胞系及深入研究大鼠和大型动物 CB1 基因生物学功能奠定了实验基础。

* 基金项目:中央高校基金课题(GK201101001)

作者简介:冯睿(1985-),硕士,主要研究方向:神经生理学,电话:13720618700,E-mail: fengrui@snnu.edu.cn

Δ 通讯作者:任维,电话:029-85310268,E-mail: renwei@snnu.edu.cn

(收稿日期:2014-03-01 接受日期:2014-03-29)

1 材料和方法

1.1 材料

体质量 250 g,健康、成年的 SD 雄性大鼠,细胞株 HeLa 由第四军医大学神经生物学教研室提供。质粒 pEGFP-N3, *E.coli* DH5 α 由第四军医大学神经生物学教研室保存。限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Pst* I 和 *Hind* III, T4DNA 连接酶、*rTaq* 酶、dNTP、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒(AxyPrep 质粒小量制备试剂盒)和胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit)购自 Axygen 公司。脂质体 Lipo2000、TRIzol 和 E-CL 化学发光试剂均购自 Invitrogen 公司。DMEM 和 opti-MEM 培养基购自 Gibco。PCR 引物合成和测序由上海生工生物科技有限公司完成。CB1 抗体(ab23703)购自 ABCam 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 分别根据大鼠 CB1 的 mRNA 基因编码序列(U40395)和 pEGFP-N3 进行引物设计,上游引物序列为 F: 5'-CGGAATTCATGAAGTCGATCCTAGATGG-3' (划线处为 *EcoR* I 酶切位点),下游引物序列为 R: 5'-CGGTCGACCAGAGCCTCGGCGGACGTGT-3' (划线处为 *Sal* I 酶切位点)。

1.2.2 大鼠 CB1 基因编码区序列的克隆与测序 Trizol 法提取大鼠脑组织总 RNA。参照 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书合成 cDNA。然后以该 cDNA 为模板扩增 CB1 基因的编码区序列。PCR 反应体系为 20 μ L,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物大小,目的扩增产物与 pMD19 T 载体连接,命名为 pMD19 T-CB1。将重组质粒转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,经 PCR 和 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定后,送交上海生工生物科技有限公司测序。

1.2.3 融合蛋白表达载体 pCB1-EGFP 的构建 将 pMD19 T-CB1 和 pEGFP-N3 分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后胶回收, T4DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆;细菌经扩增后,提取质粒;质粒经 PCR、*EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切以及 *Pst* I 和 *Hind* III 单酶切鉴定,将正确插入目的片段的重组质粒命名为 pCB1-EGFP,送交上海生工生物科技有限公司测序。

1.2.4 重组质粒的转染及转染后细胞观察 将 HeLa 细胞按 2×10^5 个接种于 24 孔板,在 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO $_2$ 培养 1 d 后,按说明书用 Lipo2000 转染 pCB1-EGFP,阴性对照细胞转染 pEGFP-N3 质粒,空白对照未转染质粒。培养 2 d 后荧光显微镜下观察转染结果。

1.2.5 转染细胞的免疫荧光染色与 Western Blot 将转染后的细胞用 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加入 10 g/L BSA 封闭 30 min。加入 CB1 一抗(稀释浓度 1:500), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加入荧光二抗,室温避光孵育 1 h 后, PBS 洗涤 3 次。切片经甘油封片后,置于荧光显微镜(Olympus BX51, 日本)下观察照相。

将转染后的细胞提取总蛋白,以 GAPDH 为内参,取 50 μ g 细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离(10%分离胶和 5%

浓缩胶),通过半干转印法转移至 PVDF 膜上,恒压 23 V 转膜 45 分钟, PVDF 膜经封闭液封闭 2 小时后,加入 CB1 抗体(稀释浓度 1:500,单克隆抗体 GAPDH 以 1:1000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 4 次,每次 10 分钟;加入 HRP 标记的相应二抗作用液(1:10 000 稀释),室温摇动孵育 1 小时, TBST 洗膜 3 次,每次 10 分钟;ECL 化学发光(WP20005, Invitrogen 公司),显影,定影,拍照;Western blot 检测条带用凝胶成像仪分析系统 Quantity One 软件扫描灰度值。

2 结果

2.1 克隆大鼠 CB1 基因编码区 cDNA 序列

以大鼠脑组织总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增得到 1427 bp 特异条带(图 1A)。将该特异性 PCR 扩增产物连入 pMD19 T 载体中,经转化 DH5 α 感受态大肠杆菌后,获取的质粒, PCR 挑取 CB1 质粒阳性(图 1B)。经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切验证,获得 1427 bp 和 2692 bp 的条带,与预测相同(图 1C)。经测序后,所获得的序列与 NCBI 数据库公布的大鼠 CB1 基因序列完全一致。从而获得大鼠 CB1 基因的 cDNA 序列。

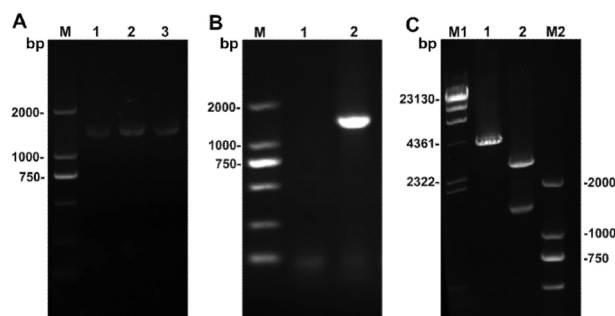


图 1 大鼠 CB1 基因编码区序列的克隆: A: CB1 基因的 PCR 扩增. 1. 2. 3 CB1 基因 PCR 产物; M. DL2000 DNA Marker; B: pMD19 T-CB1 菌液 CB1 PCR 扩增. 1. CB1 阴性 PCR 产物; 2. CB1 阳性 PCR 产物; M. DL2000 DNA Marker; C: pMD19 T-CB1 质粒酶切. 1. *EcoR* I 单酶切产物; 2. *EcoR* I/*Sal* I 双酶切产物; M1. λ /*Hind* III Marker; M2 DL2000 DNA Marker

Fig. 1 The results of rat CB1 CDS sequence cloning. A: CB1 gene amplification. 1. 2. 3 The CB1 amplified products; M. DL2000 DNA Marker; B: pMD19 T-CB1 vector amplified CB1 gene by PCR. 1. CB1 negative amplified product; 2. CB1 positive amplified product; M. DL2000 DNA Marker; C: pMD19 T-CB1 vector enzyme digestion. 1. The product of *EcoR* I enzyme digestion; 2. The product of *EcoR* I/*Sal* I enzyme digestion; M1. λ /*Hind* III Marker; M2 DL2000 DNA Marker

2.2 融合蛋白表达载体 pCB1-EGFP 的构建与酶切鉴定

将 CB1 cDNA 克隆到真核表达载体 pEGFP-N3 中, 构建 pCB1-EGFP 融合蛋白表达载体(图 2A), 经 PCR 酶切验证, 得到预想的结果(图 2B, 2C)。因此成功构建 pCB1-EGFP 融合蛋白真核表达载体。

2.3 转染重组质粒 pCB1-EGFP 的表达与 western Blot 检测

利用 lipoprotein2000 将重组质粒 pCB1-EGFP 和对照质粒 pEGFP-N3 转染于 HeLa 细胞中。转染了 pCB1-EGFP 的 HeLa

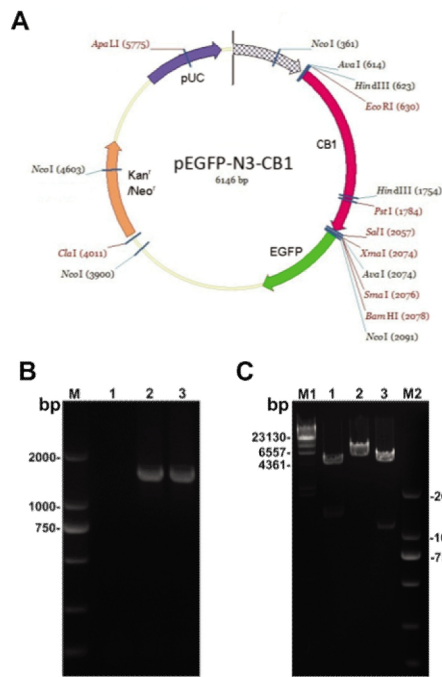


图2 融合蛋白表达载体 pCB1-EGFP 的构建与酶切鉴定:A:重组质粒的结构示意图;B:pEGFP-N3-CB1 菌液 CB1PCR 扩增.1. CB1 阴性 PCR 产物;2. 3.CB1 阳性 PCR 产物;M. DL2000 DNA Marker.;C: pEGFP-N3-CB1 质粒酶切.1. *EcoRI*/*SalI* 双酶切产物;2. *PstI* 单酶切产物;3. *HindIII* 单酶切产物;M1. λ /*HindIII* Marker;M2 DL2000 DNA Marker

Fig. 2 The construction of pCB1-EGFP vector and the results of enzyme digestion. A: The structure diagram of eukaryotic expression vector pCB1-EGFP (pEGFP-N3-CB1); B: pCB1-EGFP vector amplified CB1 gene by PCR. 1. CB1 negative amplified product; 2. 3. CB1 positive amplified product; M. DL2000 DNA Marker. ; C: pCB1-EGFP vector enzyme digestion. 1. The product of *EcoRI*/*SalI* enzyme digestion; 2. The product of *PstI* enzyme digestion; 3. The product of *HindIII* enzyme digestion; M1. λ /*HindIII* Marker; M2 DL2000 DNA Marker

细胞的绿色荧光主要在细胞膜上(图 3A),而转染了 pEGFP-N3 的质粒的 HeLa 细胞的绿色荧光主要集中在细胞浆中(图 3A)。免疫荧光染色显示:转染 pCB1-EGFP 的 HeLa 细胞表达 CB1 蛋白,并且与 GFP 共定位;而转染 pEGFP-N3 组未检测到 CB1 蛋白表达(图 3B)。Western Blot 显示:转染 pCB1-EGFP 的 HeLa 细胞表达 CB1 蛋白,转染 pEGFP-N3 组未检测到 CB1 蛋白表达,结果与免疫荧光实验结果一致(图 3C)。

3 讨论

CB1(Cannabinoid receptor type 1)基因 1990 年由 Matsuda 等从大鼠 cDNA 中首次克隆^[1]。虽然在克隆后不久,就在免疫系统中发现了 CB1 基因的表达^[9],但是由于 CB2 的克隆^[10],及 CB2 在外周免疫系统中的高度表达^[9],使得 CB2 在大麻素介导的免疫系统中的作用得到了更多的关注^[11,12]。近些年,随着 CB1 在自身免疫疾病多发性硬化^[13],炎症性肠疾病^[14]及克罗恩氏病^[15]中发挥着重要作用的报道,使得 CB1 受体在免疫系统中的作用的研究得到重视。

CB1 受体在免疫系统中的作用,主要集中于使用 CB1 受体拮抗剂(如 SR141716A、AM251、AM281 等),激动剂(如

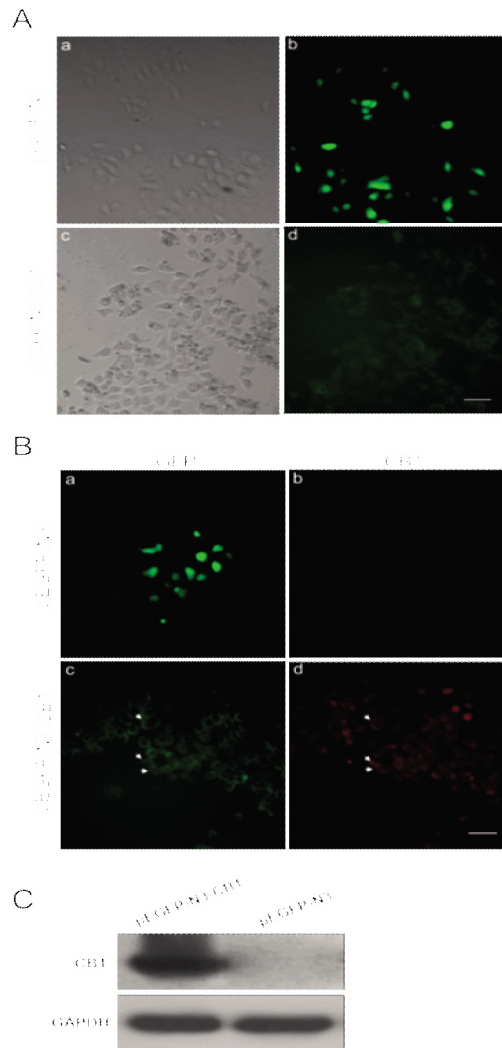


图3 转染 HeLa 细胞的检测结果:A:a.明场下的转染 pEGFP-N3 HeLa 细胞;b.转染 pEGFP-N3 细胞表达绿色荧光蛋白;c.明场下的转染 pEGFP-N3 HeLa 细胞;d.转染 pEGFP-N3 细胞表达绿色荧光蛋白;标尺=30 μ m;B:a.转染 pEGFP-N3 细胞表达绿色荧光蛋白;b.转染 pEGFP-N3 细胞 CB1 免疫荧光结果;c.转染 pEGFP-N3-CB1 细胞表达绿色荧光蛋白;d.转染 pEGFP-N3-CB1 细胞 CB1 免疫荧光结果;标尺=30 μ m;箭头,双标位置示意;C.Western Blot 结果

Fig. 3 The results of the transfection HeLa cells. A: a.The transfection HeLa cells with the pEGFP-N3 vector; b.The expression of GFP protein in the transfection HeLa cells with the pEGFP-N3 vector; c.The transfection HeLa cells with the pCB1-EGFP vector; d.The expression of GFP protein in the transfection HeLa cells with the pCB1-EGFP vector; Bar=30 μ m. B: a. The expression of GFP protein in the transfection HeLa cells with the pEGFP-N3 vector; b.The expression of CB1 protein in the transfection HeLa cells with the pEGFP-N3 vector; c.The expression of GFP protein in the transfection HeLa cells with the pCB1-EGFP vector; d.The expression of CB1 protein in the transfection HeLa cells with the pCB1-EGFP vector; Bar=30 μ m; arrows:The expression of CB1-GFP fusion protein in the transfection HeLa cells with the pCB1-EGFP. C: The result of CB1 protein Western Blot

Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC、HU-210 等),及 CB1^{-/-}小鼠观察其对于各种免疫细胞及其通过内源性大麻素系统对于调解免疫内环境稳态的影响^[9]。最近的研究显示,将 Δ^9 -THC 注射于母本后,CB1 诱导新生鼠胸腺 T 细胞凋亡,而注射 SR141716A 后,作用恰好相反。由此说明,CB1 在 Δ^9 -THC 介导的 T 细胞凋亡中发挥了重

要的作用^[4]。注射 Δ^9 -THC后,CB1^{-/-}鼠脾脏中B细胞IgM降低,提示了CB1在其中可能发挥着重要作用^[16]。有研究显示,CB1可能在大麻素介导的B细胞功能改变中也发挥重要作用^[3]。此外,通过使用CB1特异性拮抗剂AM251和激动剂HU-210,CB1在黑质纹状体抑制小胶质细胞活化和多巴胺能神经元的保护中发挥了重要的作用^[17]。尽管CB1介导大麻素对于T细胞,小胶质细胞,DCs^[18],巨噬细胞,B细胞均会产生不同程度的影响;同时,CB1在大麻素介导的免疫调节中有重要作用^[19,20],包括调节细胞凋亡,细胞因子分泌等^[21,22],但CB1在大麻素介导的免疫调控中的作用机制与作用通路尚不清楚^[3]。因此,构建CB1与报告基因共表达载体无疑为进一步深入研究CB1的功能打下基础。

实验将大鼠CB1基因克隆至pEGFP-N3质粒中,实现CB1与EGFP的融合蛋白表达。并且EGFP为增强型的绿色荧光蛋白,通过荧光显微镜观察荧光可在转染时直接观察到转染的效率,为后续建立稳定表达CB1受体的细胞株奠定了良好的基础。此外,通过构建pCB1-EGFP真核表达载体为进一步研究其调节的靶基因及其作用机制奠定了实验基础。进一步研究CB1对于各类免疫细胞的调控机制不仅能深入理解病理过程的变化机制,而且可能为治疗CB1所引起的免疫系统及神经系统疾病提供一种新思路和新方法。

参考文献(References)

- [1] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA [J]. *Nature*, 1990, 346(6284): 561-564
- [2] Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(2): 199-215
- [3] Kaplan BL. The role of CB1 in immune modulation by cannabinoids [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 137(3): 365-374
- [4] Lombard C, Hegde VL, Nagarkatti M, et al. Perinatal exposure to Delta9-tetrahydrocannabinol triggers profound defects in T cell differentiation and function in fetal and postnatal stages of life, including decreased responsiveness to HIV antigens [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 339(2): 607-617
- [5] Borner C, Martella E, Holtt V, et al. Regulation of opioid and cannabinoid receptor genes in human neuroblastoma and T cells by the epigenetic modifiers trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2012, 19(3): 180-186
- [6] Borner C, Smida M, Holtt V, et al. Cannabinoid receptor type 1- and 2-mediated increase in cyclic AMP inhibits T cell receptor-triggered signaling[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(51): 35450-35460
- [7] Gustafsson K, Sander B, Bielawski J, et al. Potentiation of cannabinoid-induced cytotoxicity in mantle cell lymphoma through modulation of ceramide metabolism [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(7): 1086-1098
- [8] Kaplan BL, Springs AE, Kaminski NE. The profile of immune modulation by cannabidiol (CBD) involves deregulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT)[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(6): 726-737
- [9] Galiegue S, Mary S, Marchand J, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations[J]. *Eur J Biochem*, 1995, 232(1): 54-61
- [10] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids[J]. *Nature*, 1993, 365(6441): 61-65
- [11] Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, et al. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 396(2-3): 141-149
- [12] Buckley NE. The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(2): 309-318
- [13] Rossi S, Buttari F, Studer V, et al. The (AAT)n repeat of the cannabinoid CB1 receptor gene influences disease progression in relapsing multiple sclerosis[J]. *Mult Scler*, 2011, 17(3): 281-288
- [14] Wong BS, Camilleri M, Eckert D, et al. Randomized pharmacodynamic and pharmacogenetic trial of dronabinol effects on colon transit in irritable bowel syndrome-diarrhea [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(4): 358-e169
- [15] Storr M, Emmerdinger D, Diegelmann J, et al. The cannabinoid 1 receptor (CNR1) 1359 G/A polymorphism modulates susceptibility to ulcerative colitis and the phenotype in Crohn's disease [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9453
- [16] Springs AE, Karmaus PW, Crawford RB, et al. Effects of targeted deletion of cannabinoid receptors CB1 and CB2 on immune competence and sensitivity to immune modulation by Delta9-tetrahydrocannabinol[J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(6): 1574-1584
- [17] Chung YC, Bok E, Huh SH, et al. Cannabinoid receptor type 1 protects nigrostriatal dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity by inhibiting microglial activation[J]. *J Immunol*, 2011, 187(12): 6508-6517
- [18] Wacnik PW, Luhr KM, Hill RH, et al. Cannabinoids affect dendritic cell (DC) potassium channel function and modulate DC T cell stimulatory capacity[J]. *J Immunol*, 2008, 181(5): 3057-3066
- [19] Karmaus PW, Chen W, Crawford RB, et al. Deletion of cannabinoid receptors 1 and 2 exacerbates APC function to increase inflammation and cellular immunity during influenza infection [J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 90(5): 983-995
- [20] Buchweitz JP, Karmaus PW, Williams KJ, et al. Targeted deletion of cannabinoid receptors CB1 and CB2 produced enhanced inflammatory responses to influenza A/PR/8/34 in the absence and presence of Delta9-tetrahydrocannabinol[J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(3): 785-796
- [21] McLaughlin PJ. Reports of the death of CB1 antagonists have been greatly exaggerated: recent preclinical findings predict improved safety in the treatment of obesity[J]. *Behav Pharmacol*, 2012, 23(5-6): 537-550
- [22] Seely KA, Brents LK, Franks LN, et al. AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 63(5): 905-915