

μ 阿片受体在大鼠结肠平滑肌细胞中的表达

任晓洁¹,贾冰涵¹,李金钊¹,罗慧娟¹,李 媛²,李军平¹

摘要 目的 通过培养大鼠结肠原代平滑肌细胞,探索 μ 阿片受体(MOR)在结肠平滑肌细胞中的表达特性。**方法** 分离、培养和鉴定结肠平滑肌细胞;运用免疫荧光组织化学双重标记法观察 MOR、内啡肽 2(EM2)、钙调蛋白(CaM)在结肠平滑肌细胞的分布特性;施加乙酰胆碱(ACh)(1×10^{-3} mol/L)或 EM2(2 μ mol/L)后,Western blot 技术检测 CaM 蛋白表达变化;单独或依次施加 ACh(1×10^{-3} mol/L)和 EM2(2 μ mol/L)后,钙离子成像法观察平滑肌细胞内钙离子浓度的变化。**结果** 鉴定结肠平滑肌细胞; α -肌动蛋白(α -SMA)标记的阳性细胞占细胞总数的 95% 以上;免疫荧光组织化学双重标记显示,在结肠平滑肌细胞有 MOR 和 EM2 的分布,且所有 MOR 和 EM2 阳性细胞均与 α -SMA 有共存;Western blot 检测发现,施加 ACh 10 min 后,CaM 表达升高($P < 0.05$);施加 EM2 10 min 后,CaM 表达降低($P < 0.05$);钙离子成像结果显示,单独施加 ACh,平滑肌细胞内钙离子浓度明显升高($P < 0.05$);单独施加 EM2,结肠平滑肌细胞内钙离子浓度下调($P < 0.05$),依次施加 ACh 和 EM2 后,EM2 显著抑制了 ACh 诱发的钙离子浓度升高($P < 0.05$)。**结论** MOR 和 EM2 在结肠平滑肌细胞有表达,且 EM2 可通过 MOR 抑制 CaM 的表达与降低钙离子浓度。

关键词 结肠平滑肌细胞; μ 阿片受体;内啡肽 2

中图分类号 Q 291

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0772-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.012

阿片类制剂如吗啡是临床常用的强效镇痛剂,在缓解慢性顽固性疼痛,比如癌性痛等方面有非常好的效果^[1]。研究^[2]证实,吗啡主要经 μ 阿片受体(μ -opioid receptor, MOR)介导发挥镇痛效应。MOR 是阿片类受体的一种,相较于其它阿片类受体, MOR 在胃肠道的分布尤为丰富,在结肠分布更为密集^[3]。在结肠内, MOR 广泛分布于肠神经细胞中^[4-5],但在胃肠道平滑肌细胞的分布未见报道。

该课题组前期研究^[6]发现,给体外培养的平滑肌细胞施加内啡肽 2(endomorphin-2, EM2)后,可直接诱发平滑肌细胞的功能活动。EM2 是 MOR 的高亲和性内源性配体,在体内与 MOR 的分布基本相似。该研究拟通过培养大鼠结肠原代平滑肌细胞,利用免疫荧光组织化学双重标记、Western blot 和钙成像等技术,观察 MOR 和 EM2 在结肠平滑肌细胞内的表达特性,为探索 MOR 在结肠平滑肌细胞内作用机制的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取体质量 100~120 g 的 SD 雄性大鼠 50 只,SPF 级,由宁夏医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 实验试剂 澳洲胎牛血清、DMEM 高糖、无 HEPES 培养基(美国赛默飞世尔科技有限公司);雅酶配胶试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司);全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);蛋白含量检测试剂盒、超灵敏化学发光检测试剂盒(美国赛默飞世尔科技有限公司);胰蛋白酶消化液(北京索莱宝科技有限公司);胶原酶 II(上海西格玛奥德里齐贸易有限公司);PBS 磷酸盐缓冲液(美国 HyClone 公司);4% 多聚甲醛(北京博奥拓达科技有限公司);苏木精-伊红染色(北京九州柏林生物科技有限公司);钙离子荧光探针 Fluo-4, AM(北京索莱宝科技有限公司)。一抗:兔抗 MOR 多克隆抗体(美国 Abcam 公司),兔抗钙调蛋白(calmodulin, CaM)单克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司),小鼠抗 α -SMA 单克隆抗体、兔抗 EM2 单克隆抗体、豚鼠抗 MOR 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);荧光素标记二抗:Alex488 标记山羊抗兔血清、Alex594 标记山羊抗兔血清、Alex488 标记山羊抗小鼠血清、Alex594 标记山羊抗豚鼠血清(美国 Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠结肠原代平滑肌细胞的分离、培养和鉴定

2022-12-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31860275)

作者单位:宁夏医科大学¹基础医学院人体解剖与组织胚胎学系、
²临床医学院,银川 750004

作者简介:任晓洁,女,硕士研究生;

李军平,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:lijp7221@163.com

1.2.1.1 结肠平滑肌细胞的提取与分离 大鼠禁食不禁水 24 h, 离断颈椎处死, 用 75% 乙醇消毒。无菌条件下剖开腹部, 快速截取肛门上 2 cm 远段结肠。用生理盐水反复灌肠, 冲洗结肠内部残余粪便。沿着肠系膜对侧剪开, 将其转移到含青霉素 100 U/ml 和链霉素 0.1 mg/ml 的 Krebs 液中。浸泡 15 min 后, 移入超净台, 镜下撕去浆膜, 去除黏膜层及黏膜下层, 即为大鼠结肠平滑肌层。用显微剪将组织层剪至 1~2 mm³ 体积后, 将组织碎块加入 10 ml 胰酶消化液中, 37 °C 恒温震荡, 转速 90 次/min, 消化 30 min, 在显微镜下观察发现, 组织块周围有散在的圆形透亮的细胞分布, 量取 12 ml 完全培养液终止消化, 吸除胰酶消化液和培养液。加入 10 ml 胶原酶 II 消化液, 37 °C 震荡 120 min, 吹打分散细胞, 加入 10 ml 完全培养液终止消化。过 100 目细胞筛网, 收集细胞悬液, 将其转移至 15 ml 离心管中, 在离心机中设定转速参数为 1 000 r/min, 离心 5 min。弃掉残存消化液和培养液, 继续加入完全培养液, 缓慢吹打, 1 000 r/min 离心 5 min, 重悬细胞。用细胞计数仪计数, 按 5 × 10⁵ 个/ml 种植到 25 cm² 培养瓶中, 将培养瓶放置于培养箱中, 在 37 °C 培养 24 h 后, 细胞贴壁生长, 待生长到致密单层后传代。

1.2.1.2 结肠平滑肌细胞培养 大鼠结肠平滑肌细胞原代培养 7 d 后, 覆盖培养瓶底 90% 以上。弃掉原培养基, 用 PBS 液冲洗 3 次, 加入 1 ml 胰酶消化液, 在 37 °C 培养箱中消化 2 min。镜下观察, 变圆形的细胞占比为 90%, 继续加入 2 ml 完全培养基, 终止消化, 反复吹打细胞混匀, 将其转移到 15 ml 离心管内。在离心机中设定转速参数为 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去残存消化液和培养基, 用细胞计数仪计数, 根据细胞的数量按照 1:2 或 1:3 传代, 吹打混匀, 加入培养瓶内, 镜下观察细胞呈圆形, 胞质透亮, 转移到培养箱中继续培养, 胰酶消化后平滑肌细胞可传 5 代, 传代结肠平滑肌细胞贴壁早、生长快。

1.2.1.3 结肠平滑肌细胞鉴定 提取第 2 次传代的结肠平滑肌细胞, 按照 1 × 10⁵ 个/ml 密度接种于 24 孔细胞培养板, 细胞长到 95% 以上, 利用免疫荧光组织化学技术标记细胞内 α -SMA 进行细胞鉴定。弃掉原培养基, 用 PBS(4 °C) 清洗细胞 3 次, 加入 4% 多聚甲醛固定, 每孔加入 500 μ l, 常温下固定 30 min。继续用 PBS(4 °C) 清洗 3 次, 每个孔内加入 100 μ l 0.5% Triton X-100, PBS 漂洗 3 次, 每孔加入 100 μ l 5% 羊血清封闭 30 min 后, 加入一抗: 小鼠抗

α -SMA 单克隆抗体(1:200), 常温孵育 1 h 后置于 4 °C 过夜孵育。复温 20 min 后, 用 PBS(4 °C) 洗 3 次, 每次 10 min。加入对应的荧光素标记的二抗: Alex594 标记山羊抗小鼠血清(1:200), 室温避光条件下静置 1 h 后, 用 PBS(4 °C) 洗 3 次, 每次 10 min。用 DAPI 染核封片, 用荧光显微镜观察并拍照。

1.2.2 HE 染色 结肠平滑肌细胞按照 1 × 10⁵ 个/ml 密度接种于 24 孔细胞培养板, 待细胞长到致密单层后进行 HE 染色。弃掉原培养基, 用 PBS(4 °C) 洗 3 次, 每次 5 min。加 4% 多聚甲醛 500 μ l, 室温下固定 30 min 后, 移出细胞间, 用 PBS(4 °C) 洗 3 次。加入不同浓度梯度乙醇, 无水乙醇 I 5 min, 无水乙醇 II 5 min, 95% 乙醇 5 min, 90% 乙醇 5 min, 80% 乙醇 5 min, 70% 乙醇 5 min, 流水冲洗 2 min。苏木精染色 5 min, 在流水下冲洗 5 min, 转移到盐酸乙醇中分化 3 s, 继续流水冲洗 15 min, 用伊红染色 5 min。脱水: 70% 乙醇 3 s, 80% 乙醇 3 s, 90% 乙醇 3 s, 95% 乙醇 5 min, 无水 100% 乙醇 I 5 min, 无水 100% 乙醇 II 5 min。透明: 分别加入 1 ml 二甲苯 I 和二甲苯 II 各 5 min, 用中性树脂封片后在普通光镜下观察。

1.2.3 免疫荧光组织化学双重标记 取第 2 次传代细胞, 按照 1 × 10⁵ 个/ml 密度接种于 24 孔细胞培养板, 细胞在载玻片上生长融合到 95% 以上进行实验。弃掉原培养基, 用 PBS(4 °C) 洗 3 次, 每孔加入 500 μ l 4% 多聚甲醛, 室温下固定 30 min。用 PBS(4 °C) 洗 3 次, 每个孔内加入 100 μ l 0.5% Triton X-100 孵育 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 10 min。用 5% 羊血清封闭 30 min 后, 分别加入对应的一抗: 兔抗 MOR 多克隆抗体(1:200) 和小鼠抗 α -SMA 单克隆抗体(1:200)、兔抗 EM2 多克隆抗体(1:100) 和小鼠抗 α -SMA 单克隆抗体(1:200)、兔抗 CaM 单克隆抗体(1:200) 和豚鼠抗 MOR 多克隆抗体(1:200), 室温孵育 1 h 后, 置于 4 °C 孵育 48 h。复温 20 min 后, 用 PBS(4 °C) 洗 3 次, 每次 10 min, 分别加入荧光素标记的二抗: Alex594 标记山羊抗兔血清(1:200) 和 Alex488 标记山羊抗鼠血清(1:200)、Alex594 标记山羊抗豚鼠血清(1:200) 和 Alex488 标记山羊抗兔血清(1:200)。室温孵育 1 h 后, 用 PBS(4 °C) 洗 3 次, 每次 10 min, 用 DAPI 染核封片, 5 min 后用荧光显微镜观察并采集图片。

1.2.4 Western blot 检测 取第 2 次传代的大鼠结肠平滑肌细胞, 弃掉培养基, 用 PBS 清洗细胞 3 次,

施加干预措施,将结肠平滑肌细胞分为三组,正常对照组(CON)、乙酰胆碱组(ACh,浓度 1×10^{-3} mol/L)、内啡肽-2组(EM2,浓度 $2 \mu\text{mol/L}$),分别孵育结肠平滑肌细胞1、5、10、15 min后提取蛋白。按Lysis buffer 1 ml,磷酸酶抑制剂 $10 \mu\text{l}$,蛋白酶抑制剂 $1 \mu\text{l}$,PMSF $5 \mu\text{l}$ 配置细胞裂解液,摇匀置于冰面上,用无菌细胞刮将细胞推向培养瓶的一侧,于冰上裂解30 min。不断摇晃培养瓶使细胞充分裂解,将细胞碎片和裂解液移置1.5 ml离心管内,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下12 000 r/min离心5 min。将离心后的上清转移到0.5 ml离心管中于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。用二喹啉甲酸(BCA)法测量蛋白质浓度,分别取样品蛋白、纯水和 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液($5 \times$ loading buffer)配平,分装保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$,避免反复冻融。各样品蛋白取 $30 \mu\text{g}$ 上样, 80 V 电压电泳30 min后,切换至 120 V 电压继续进行, 200 mA 恒流湿转,MOR蛋白(60 min)、EM2蛋白(20 min)、CaM(30 min)、GAPDH(40 min)分别转印到PVDF膜上。5%的脱脂牛奶室温封闭2 h后,将含有EM2蛋白、MOR蛋白、CaM蛋白、GAPDH蛋白的PVDF膜浸入到对应的兔抗EM2单克隆抗体(1:1 000)、兔抗MOR多克隆抗体(1:1 000)、兔抗CaM单克隆抗体(1:1 000)和小鼠抗GAPDH单克隆抗体(1:2 000),室温孵育1 h后置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。用含0.1%吐温20的Tris缓冲盐溶液(tris buffered saline with tween 20, TBST)洗膜3次,每次10 min。加对应的HRP-山羊抗兔IgG(1:3 000)和HRP-山羊抗小鼠IgG(1:3 000)室温孵育1 h, TBST洗膜3次,每次10 min,超灵敏化学发光试剂使蛋白条带可视化,通过化学图像系统(Amersham Image 600)曝光采集图像。

1.2.5 钙离子成像检测 取第2次传代的大鼠结肠平滑肌细胞,弃去培养液,用HBSS液(不含钙镁,不含酚红)冲洗细胞3次,加入钙离子荧光探针Fluo-4, AM $1 \mu\text{l}$, pluronic F-127 $1 \mu\text{l}$,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的培养箱中孵育30 min后,在荧光显微镜下观察负载情况。将孵育的细胞置于显微镜下,打开加药通道,第一通道加入5 ml ACh(1×10^{-3} mol/L),第二通道加入5 ml EM2($2 \mu\text{mol/L}$),第三通道先加入5 ml ACh(1×10^{-3} mol/L)观察200 s后接着加入5 ml EM2($2 \mu\text{mol/L}$),打开氮气阀门,排空管内空气,选择中等密度的细胞层,在激光显微镜下进行持续动态扫描,钙离子与Fluo-4, AM结合在488 nm的波长和526 nm的发射波长处被激发,通过计算机记录钙离子荧光强度的变化。实验结果以给药前后单个细胞的荧

光强度变化表示细胞内游离钙离子浓度的相对变化,实验结果用 $\Delta F/F_0$ 表示, $\Delta F = F - F_0$, F :钙离子荧光强度值; F_0 :基线水平。

1.3 统计学处理 采用SPSS 22.0软件进行数据分析,Western blot实验结果使用单因素方差分析,钙成像结果使用配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠平滑肌细胞的培养与鉴定

2.1.1 结肠平滑肌细胞的培养 光镜下观察可见,结肠平滑肌细胞在未贴壁前,细胞大小不一,生长密度不均;培养24 h后细胞开始贴壁生长,细胞长度各异,外形多样,多为长梭形或多边形,呈放射性生长,胞质透明(图1A~C)。7 d后可见平滑肌细胞呈多层重叠或单层,高低起伏,胞质丰富,有分枝状突起(图1D~F)。14 d后结肠平滑肌细胞密度增大,融合成片,细胞突起相互接触交错(图1G~I)。

2.1.2 结肠平滑肌细胞的鉴定 荧光显微镜下观察可见大量 α -SMA标记阳性细胞, α -SMA标记阳性细胞外形呈条索状,大小不一。 α -SMA标记的阳性细胞占培养细胞总数的95%以上(图2)。

2.2 HE染色 光镜下观察可见,培养24 h后细胞形态大小不一,多呈长梭形,细胞核嗜碱性呈蓝色,胞质嗜酸性呈粉红色(图3A~C)。7 d后平滑肌细胞胞质丰富,呈粉红色,染色较浅,核位于细胞中央,呈长椭圆形,染色较深(图3D~F)。14 d后结肠平滑肌细胞密度增大,相互交错,密集排列,细胞核卵圆形居中呈蓝色,胞质呈粉红色(图3G~I)。

2.3 MOR和EM2分别与 α -SMA在结肠平滑肌细胞的分布特点 荧光显微镜下观察可见,在平滑肌细胞内有大量MOR的阳性标记物分布,细胞外形呈长梭形,大小不一,所有MOR标记阳性细胞均呈 α -SMA标记阳性,说明MOR和 α -SMA在平滑肌细胞有共存(图4A~D)。在平滑肌细胞内也可见EM2的阳性标记物,EM2阳性细胞呈长梭形或三角形,大小不一,所有EM2标记阳性细胞均呈 α -SMA标记阳性,说明EM2和 α -SMA在平滑肌细胞内也有共存(图4E~H)。

2.4 观察MOR与CaM在结肠平滑肌细胞的分布特点 荧光显微镜下观察可见,MOR的阳性标记物在平滑肌细胞有大量分布,细胞外形呈长梭形,大小不一(图5A),在MOR阳性的平滑肌细胞内也可见CaM的阳性标记物,CaM阳性细胞呈长梭形或三角

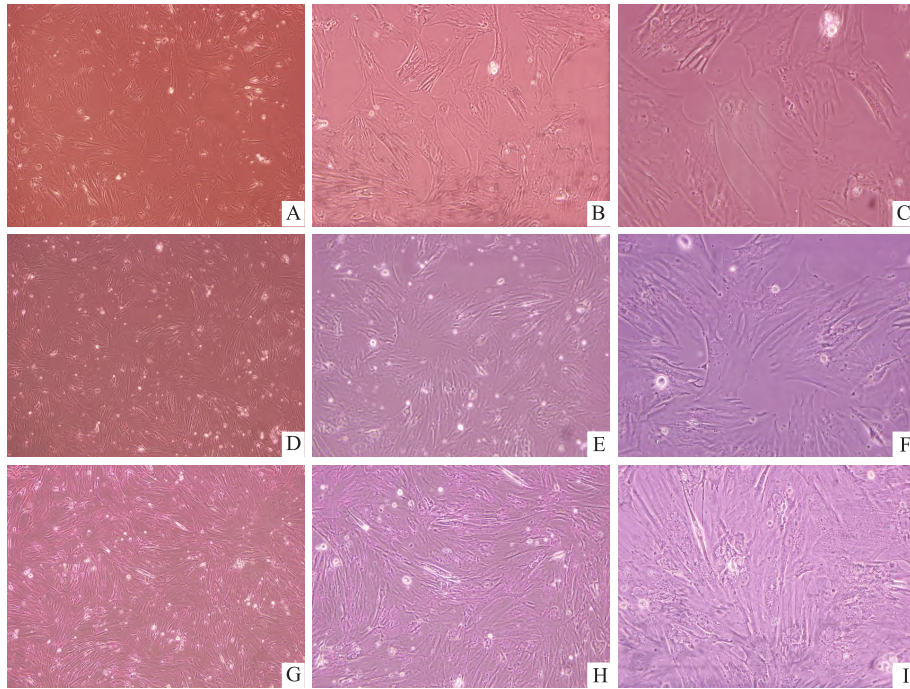
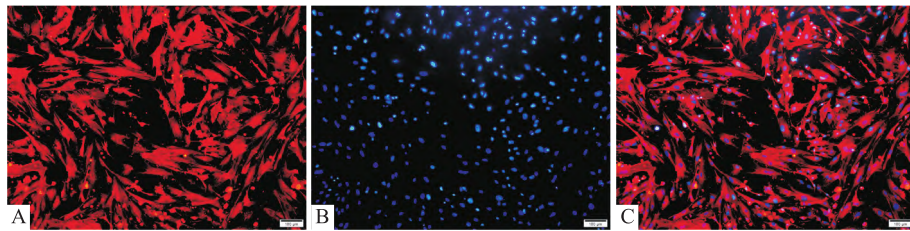


图1 培养的大鼠结肠平滑肌细胞

A~C:培养24 h的结肠平滑肌细胞;D~F:培养7 d的结肠平滑肌细胞;G~I:培养14 d的结肠平滑肌细胞;A、D、G: $\times 10$;B、E、H: $\times 20$;C、F、I: $\times 40$

图2 大鼠结肠平滑肌细胞免疫荧光鉴定 $\times 10$

A: α -SMA 标记的阳性平滑肌细胞;B:DAPI 标记的细胞核;C: α -SMA 标记和 DAPI 标记的共表达

形,大小不一(图 5B),说明 MOR 和 CaM 在平滑肌细胞有共存(图 5C)。

2.5 EM2 和 MOR 在结肠平滑肌细胞中的表达

Western blot 结果显示,在结肠平滑肌细胞内有 EM2 和 MOR 的表达(图 6)。

2.6 施加不同干预措施后,不同时间点结肠平滑肌细胞内 CaM 蛋白的表达

施加 ACh(1×10^{-3} mol/L)或 EM2($2 \mu\text{mol/L}$)后 1、5、15 min,与 CON 组比较,ACh 组和 EM2 组 CaM 蛋白表达无变化($P > 0.05$)。施加 ACh(1×10^{-3} mol/L)或 EM2($2 \mu\text{mol/L}$)10 min 时,与 CON 组比较,ACh 组 CaM 蛋白表达升高($P = 0.037 2$),但 EM2 组 CaM 蛋白表达下降($P = 0.018 4$),见图 7。

2.7 施加不同干预措施后,平滑肌细胞内钙离子浓度的变化 施加 ACh(1×10^{-3} mol/L),与给药前

(Base)比较,400 s 后平滑肌细胞内钙离子荧光强度增强($t = 3.101, P = 0.021 1$),700 s 时达到高峰(图 8A、B)。施加 EM2($2 \mu\text{mol/L}$)后,与给药前(Base)比较,400 s 后平滑肌细胞内钙离子荧光强度降低($t = 2.187, P = 0.030 5$,图 8C、D)。施加 ACh(1×10^{-3} mol/L)后,与给药前(Base)比较,平滑肌细胞内钙离子荧光强度增强($P = 0.028 6$),观察 200 s 后接着施加 EM2($2 \mu\text{mol/L}$),与单纯施加 ACh(1×10^{-3} mol/L)比较,平滑肌细胞内钙离子荧光强度下降($F = 24.20, P = 0.000 2$,图 8E、F)。

3 讨论

原代结肠平滑肌细胞是从大鼠远端结肠组织提取和分离后获得的,遗传特征与体内细胞非常相似,适合于细胞形态、功能和分化方面的研究,排除了机

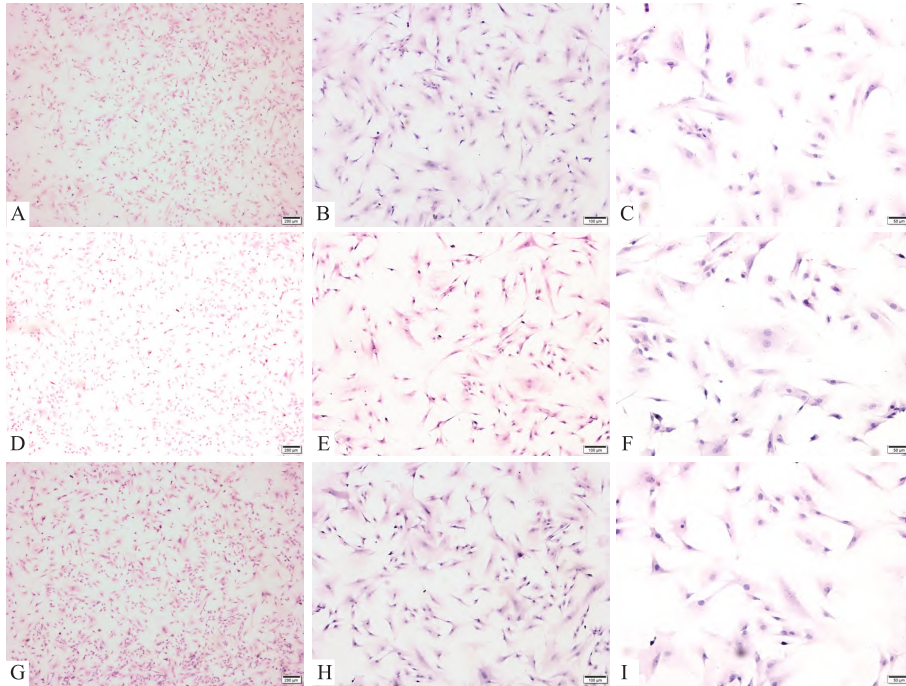


图3 大鼠结肠平滑肌细胞 HE 染色

A ~ C: 培养 24 h 的结肠平滑肌细胞; D ~ F: 培养 7 d 的结肠平滑肌细胞; G ~ I: 培养 14 d 的结肠平滑肌细胞; A、D、G: ×4; B、E、H: ×10; C、F、I: ×20

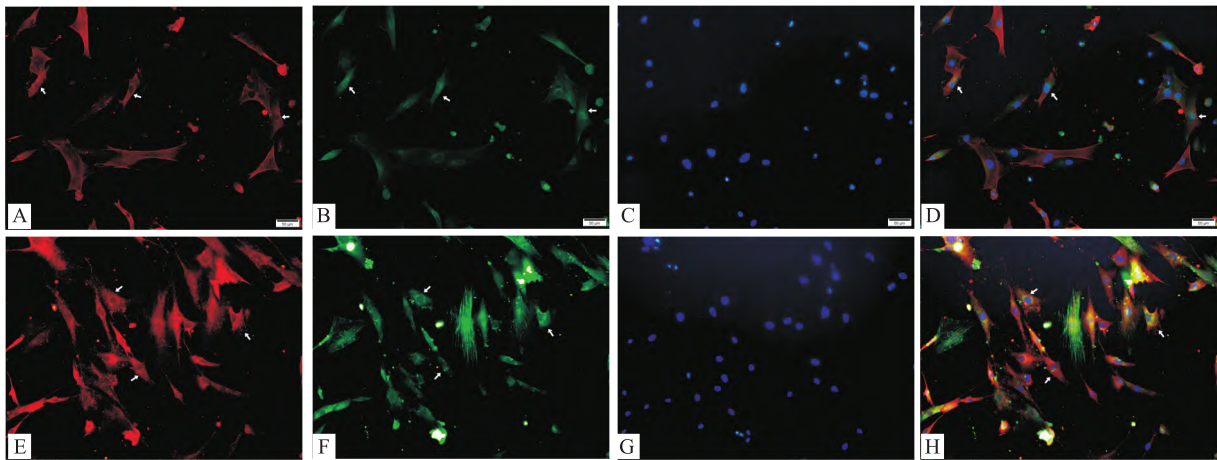


图4 免疫荧光组织化学双重标记 ×20

A: MOR 阳性标记的平滑肌细胞; B: α-SMA 阳性标记的平滑肌细胞; C: DAPI 标记的细胞核; D: MOR 和 α-SMA 阳性标记物在平滑肌细胞中的共表达; E: EM2 阳性标记的平滑肌细胞; F: α-SMA 阳性标记的平滑肌细胞; G: DAPI 标记的细胞核; H: EM2 和 α-SMA 阳性标记物在平滑肌细胞中的共表达; 箭头代表免疫荧光标记的阳性细胞

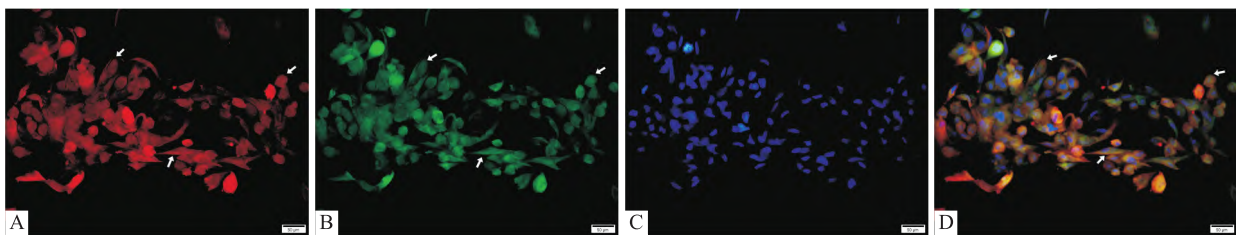


图5 免疫荧光组织化学双重标记 ×20

A: MOR 阳性标记物在结肠平滑肌细胞中的表达; B: CaM 阳性标记物在结肠平滑肌细胞中的表达; C: DAPI 标记的细胞核; D: MOR 和 CaM 阳性标记物在平滑肌细胞中的共表达; 箭头代表免疫荧光标记的阳性细胞

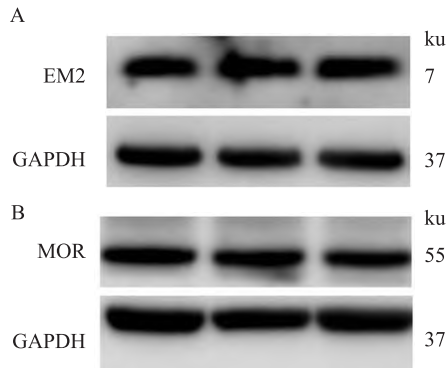


图6 Western blot 技术检测 EM2 和 MOR 在结肠平滑肌细胞的表达
A: EM2 在结肠平滑肌细胞中的蛋白表达; B: MOR 在结肠平滑肌细胞中的蛋白表达

体内其他因素的干扰^[7]。 α -SMA 存在于胃肠道肌层等各种肌组织内,构成了平滑肌细胞的骨架,参与平滑肌细胞许多重要的功能活动,包括平滑肌细胞的舒缩活动^[8]。因此,本研究通过标记 α -SMA 用于鉴定结肠平滑肌细胞是可行的。

课题组前期研究^[9]发现,EM2 在结肠神经细胞也有大量分布。然而,MOR 和 EM2 在结肠平滑肌细胞的分布未见文献报道。本研究免疫荧光组织化学结果显示,在原代培养的平滑肌细胞内有 MOR 和 EM2 的分布,且 MOR 与 CaM 在培养的平滑肌细胞内也有共存。

CaM 是平滑肌细胞内的钙离子受体蛋白,其本身没有活性,但对钙离子有高度依赖性。钙离子与 CaM 结合形成 Ca^{2+} -CaM 复合物, Ca^{2+} -CaM 复合物是一种重要的兴奋-收缩耦联调节因子^[10],通过平滑肌细胞内信号传导通路,调控平滑肌收缩和舒

张^[11],当胞内钙离子浓度升高时,钙离子与 CaM 形成的 Ca^{2+} -CaM 复合物作用于胞质中的肌球蛋白轻链激酶,使肌球蛋白轻链激酶活化,从而触发平滑肌收缩。因此,CaM 在钙离子依赖性信号转导过程中起到关键作用^[12]。本研究结果显示,在施加干预措施 ACh 或 EM2 大约 10 min 后平滑肌细胞反应明显。施加 ACh 后平滑肌细胞内的 CaM 表达增加,但是施加 EM2 后 CaM 的表达下降。有文献^[13]报道,EM2 和吗啡在缓解癌性痛方面,其止痛时效完全不同,吗啡起效时间大约在 40 ~ 100 min,而 EM2 的镇痛作用起效快、时间短,在 10 min 时药效最强,这与本研究结果相似。CaM 的活性高度依赖平滑肌细胞内钙离子的浓度。说明 EM2 经 MOR 介导后可能对钙离子的释放有抑制作用。

有文献^[14]报道,平滑肌细胞的收缩活动主要受胞质内钙离子的调控。而胃肠道平滑肌的舒缩主要与钙离子依赖途径相关。在钙离子依赖途径中胞内钙离子来源主要有两方面:外钙内流和内钙池释放。外钙内流是通过电压依赖型和受体依赖型等膜通道^[15],引起细胞外钙离子进入细胞内。内钙池释放是指肌浆网中钙离子通过释放和再摄取对胞内钙离子浓度进行调节^[16]。ACh 可通过平滑肌细胞表面的毒蕈碱受体 M3 介导,激活平滑肌细胞膜电压依赖性钙通道和受体操纵性钙通道,促使钙离子内流,同时也可通过耦联细胞膜上的 G 蛋白,激活磷脂酶 C,该酶可水解 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇生成三磷酸肌醇和二酰甘油,三磷酸肌醇作为第二信使,作用于肌浆网膜上的三磷酸肌醇受体,导致肌浆网储存的钙离子释放,使细胞内钙离子浓度短暂升高, Ca^{2+} -

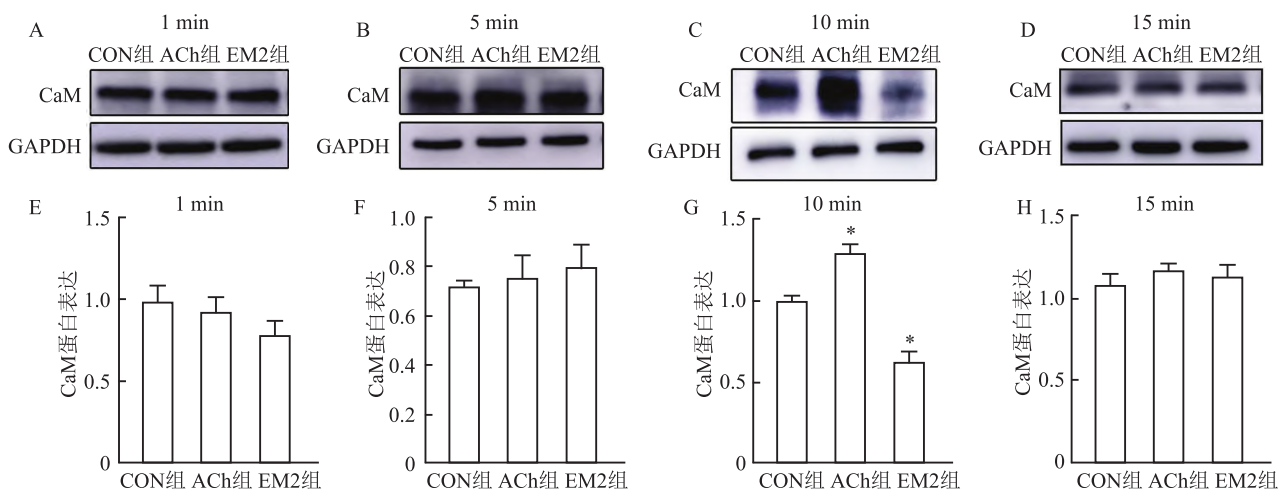


图7 Western blot 技术检测不同时间点结肠平滑肌细胞内 CaM 蛋白的表达

A ~ G: 分别为干预后 1、5、10、15 min CaM 蛋白表达及其定量结果;与 CON 组比较: * $P < 0.05$

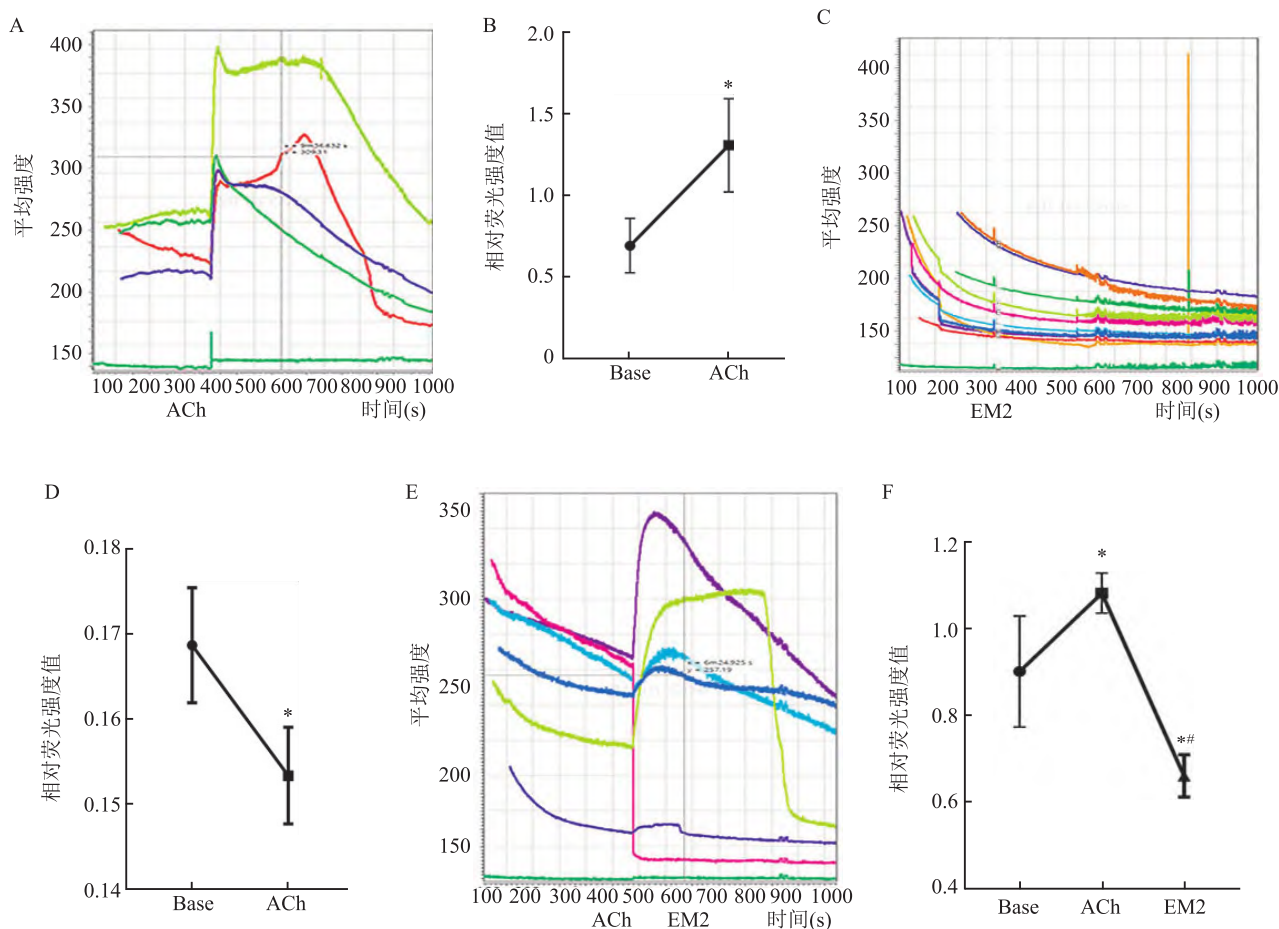


图8 钙成像技术检测平滑肌细胞内钙离子浓度的变化

A、B:施加 ACh 后,平滑肌细胞中钙离子的荧光强度;C、D:施加 EM2 后,平滑肌细胞中钙离子的荧光强度;E、F:施加 ACh 后,平滑肌细胞中钙离子的荧光强度;与给药前(Base)比较: * P < 0.05 ;与 ACh 组比较: # P < 0.05

CaM 复合物增加,激活肌球蛋白轻链激酶,引起胃肠道平滑肌细胞收缩^[17]。

有文献^[18]报道,在体外培养的细胞中通过施加 ACh,在 240 s 细胞内钙离子浓度达到最大值,在本研究钙离子成像实验中,为排除细胞外钙内流对平滑肌细胞功能的影响,特意使用了无钙离子缓冲液。单纯施加 ACh 后,钙离子浓度在 700 s 内升高达到最大值,与文献报道基本一致。但单纯施加 EM2 后,钙离子浓度明显下降。施加 ACh 后观察 200 s,接着施加 EM2,EM2 明显抑制了 ACh 的作用。据此推测,EM2 经结肠平滑肌细胞表面的 MOR 介导后,可能对细胞内肌浆网钙离子的释放有调节作用。

综上所述,平滑肌细胞内 EM2 或肠神经细胞分泌的 EM2,经平滑肌细胞表面的 MOR 介导后,可能通过调节胞内肌浆网钙离子释放,反馈性的参与到平滑肌细胞的收缩抑制过程中,并且此过程也可能受到肠神经系统的正向调控。对于平滑肌细胞表面

的 MOR 在平滑肌细胞功能活动中的具体作用机制和功能,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Seya M J, Gelders S F, Achara O U, et al. A first comparison between the consumption of and the need for opioid analgesics at country, regional, and global levels[J]. J Pain Palliat Care Pharmacother, 2011, 25(1): 6-18.
- [2] Nam M H, Won W, Han K S, et al. Signaling mechanisms of mu-opioid receptor (MOR) in the hippocampus: disinhibition versus astrocytic glutamate regulation [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(2): 415-26.
- [3] Bagnol D, Mansour A, Akil H, et al. Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract[J]. Neuroscience, 1997, 81(2): 579-91.
- [4] Feng B. New insights on expression and function of mu and delta opioid receptors in mouse gastrointestinal tract[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020, 9(3): 553-4.
- [5] Di Cello J J, Carbone S E, Saito A, et al. Mu and delta opioid re-

- ceptors are coexpressed and functionally interact in the enteric nervous system of the mouse colon [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 9(3):465–83.
- [6] La Vigne J, Keresztes A, Chiem D, et al. The endomorphin-1/2 and dynorphin-B peptides display biased agonism at the mu opioid receptor [J]. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(2):465–71.
- [7] Brun P, Akbarali H I. Culture of neurons and smooth muscle cells from the myenteric plexus of adult mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1727:119–25.
- [8] Vallin J, Grantham J. The role of the molecular chaperone CCT in protein folding and mediation of cytoskeleton-associated processes; implications for cancer cell biology [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(1):17–27.
- [9] Li J P, Zhang T, Gao C J, et al. Neurochemical features of endomorphin-2-containing neurons in the submucosal plexus of the rat colon [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(34):9936–44.
- [10] Durrvanger Z, Harmat V. Structural diversity in calmodulin-peptide interactions [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(11):1102–11.
- [11] Zhang M, Abrams C, Wang L, et al. Structural basis for calmodulin as a dynamic calcium sensor [J]. *Structure*, 2012, 20(5):911–23.
- [12] Tong L, Ao J P, Lu H L, et al. Tyrosine kinase Pyk2 is involved in colonic smooth muscle contraction *via* the RhoA/ROCK pathway [J]. *Physiol Res*, 2019, 68(1):89–98.
- [13] Chen L, Wang K, Yang T, et al. Downregulation of spinal endomorphin-2 correlates with mechanical allodynia in a rat model of tibia cancer [J]. *Neuroscience*, 2015, 286:151–61.
- [14] Gutierrez L G, Hernandez-Morales M, Nunez L, et al. Inhibition of polyamine biosynthesis reverses Ca²⁺ channel remodeling in colon cancer cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(1):83.
- [15] Catterall W A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16:521–55.
- [16] Ji G, Feldman M, Doran R, et al. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release through localized Ca²⁺ uncaging in smooth muscle [J]. *J Gen Physiol*, 2006, 127(3):225–35.
- [17] Harnett K M, Cao W, Kim N, et al. Signal transduction in esophageal and LES circular muscle contraction [J]. *Yale J Biol Med*, 1999, 72(2/3):153–68.
- [18] Epikin A V, Voronina S G, Gallacher D V, et al. Acetylcholine-evoked increase in the cytoplasmic Ca²⁺ concentration and Ca²⁺ extrusion measured simultaneously in single mouse pancreatic acinar cells [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(6):3569–72.

Expression of μ opioid receptors in rat colonic smooth muscle cells

Ren Xiaojie¹, Jia Binghan¹, Li Jinzhao¹, Luo Huijuan¹, Li Yuan², Li Junping¹

¹*School of Basic Medicine, Dept of Human Anatomy, Histology and Embryology,*

²*School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004*

Abstract Objective To investigate the expression characteristics of mu opioid receptor (MOR) in rat colon smooth muscle cells by cultured rat primary colonic smooth muscle cells. **Methods** colonic smooth muscle cells were isolated, cultured and identified; immunofluorescence double labeling method was used to observe the distribution characteristics of MOR, Endomorphin-2 (EM2), and calmodulin (CaM) in colonic smooth muscle cells; Western Blot method was used to detect the expression of MOR and EM2 in smooth muscle cells of the colon. After the intervention measures Acetylcholine (ACh) (1×10^{-3} mol/L) and EM2 (2 μ mol/L) were applied, the changes of CaM protein expression were observed; The calcium imaging method was used to detect the changes of calcium concentration in smooth muscle cells. **Results** The colonic smooth muscle cells were cultured and identified. The positive cells labeled with α -smooth muscle actin (α -SMA) accounted for more than 95% of the total number of cells. Immunofluorescence double labeling showed that there were MOR and EM2 distributions in colonic smooth muscle cells, and all MOR and EM2 positive cells coexisted with α -SMA. Western Blot results showed that there were MOR and EM2 expressions in colonic smooth muscle cells. CaM in the ACh group significantly increased at 10 minutes ($P < 0.05$), CaM in the EM2 group significantly decreased ($P < 0.05$); The calcium imaging results showed that alone applied ACh, the calcium concentration in smooth muscle cells significantly increased ($P < 0.05$); Alone applied EM2, the calcium concentration in colonic smooth muscle cells was down-regulated ($P < 0.05$); Applied ACh and EM2 sequentially, EM2 significantly reduced the increase of the calcium concentration in smooth muscle cells induced by ACh ($P < 0.05$). **Conclusion** MOR and EM2 are expressed in colonic smooth muscle cells, and EM2 may inhibit the expression of CaM and reduce the concentration of calcium ions through MOR.

Key words colonic smooth muscle cells; μ opioid receptor; endomorphin-2