

# $\mu$ -阿片受体在心内神经节的表达分布及其激动剂对房颤的作用

刘海帆,谢雨杉,万法萍

(徐州医科大学人体解剖学教研室,徐州 221004)

**摘要** 目的 研究  $\mu$ -阿片受体(MOR)在心内神经节(ICG)的表达分布,并探讨 MOR 激动剂对心房颤动(AF)的影响。方法

① 通过免疫荧光单标染色法研究正常雄性 SD 大鼠 ICG 的化学解剖学特性;采用免疫荧光双标染色、Western blot 和 RT-PCR 法检测 MOR 在 ICG 的表达分布。② 40 只 250~300 g SD 雄性大鼠随机分为正常组(Normal 组)、AF 模型组(AF 组)、溶剂对照组(AF-NS 组)、MOR 特异性激动剂内啡肽 2(EM2)药物组(AF-EM2 组)和 DAMGO 药物组(AF-DAMGO 组),采用尾静脉注射乙酰胆碱-氯化钙混合液方法制备 AF 模型,造模同时给予药物干预;采集心电图并监测给药前后 AF 持续时间,采用 Western blot 和 qRT-PCR 法检测各组大鼠 ICG 中 MOR 以及心房组织提取物中连接蛋白 43(CX43)的蛋白及 mRNA 表达。结果 ① ICG 中含有乙酰胆碱转移酶阳性的副交感神经元、酪氨酸羟化酶阳性的交感神经元以及 P 物质和降钙素基因相关肽阳性的肽能神经纤维;心房后壁组织表达 MOR mRNA 转录物和蛋白;MOR 免疫阳性产物主要分布于 ICG 神经元的胞体内,且以副交感和交感神经元为主。② 与 Normal 组相比,AF 组大鼠 ICG 中 MOR mRNA 以及蛋白表达量均降低( $P < 0.05$ );与 AF-NS 组相比,AF-EM2 组和 AF-DAMGO 组 AF 持续时间均缩短,CX43 表达量均升高( $P < 0.05$ )。结论 MOR 主要表达于 ICG 的交感和副交感神经元中;AF 大鼠 ICG 中 MOR 表达量降低,MOR 激动剂能缓解 AF。

**关键词**  $\mu$ -阿片受体;心内神经节;房颤; $\mu$ -阿片受体激动剂;CX43

**中图分类号** R 322.85

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2162-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.014

阿片物质作为一种经典的镇痛药物在临床疼痛治疗中占有重要地位。研究<sup>[1]</sup>表明阿片肽和阿片类药物能缓解心肌梗死造成的疼痛,降低心律失常的发生,在治疗心血管疾病中发挥重要作用。体内主要分布三种阿片受体: $\kappa$ -阿片受体( $\kappa$ -opioid receptor, KOR)、 $\delta$ -阿片受体( $\delta$ -opioid receptor, DOR)和  $\mu$ -阿片受体( $\mu$ -opioid receptor, MOR),KOR 和 DOR 表达于心肌细胞和血管内皮细胞,且其激动剂均具有心脏保护作用<sup>[2-3]</sup>,关于 MOR 在心脏的表达分布及其对心传导和心功能的影响仍具有争议。有研究<sup>[4]</sup>认为,心肌细胞的胞膜不表达 MOR,MOR 可表达于大鼠神经纤维、交感、副交感和感觉神经元

中,阿片类药物可作用于心脏的自主神经末梢对心功能发挥负性调控作用。

心脏神经包括心外和心内两部分,心内神经是调节心脏活动的最后神经公路,在心脏水平形成调控心脏活动的“心-脑”系统,其功能紊乱可引起心律失常、心肌缺血等多种心血管疾病<sup>[5-6]</sup>。心房颤动(atrial fibrillation, AF)是最常见的心律失常之一,具有极高的发病率和病死率,与心内神经元的过度活动有关<sup>[7]</sup>。因此,该实验使用形态学、分子生物学和心脏生理学等方法,研究 MOR 在心脏的表达和分布,进一步研究 MOR 在 AF 大鼠心内神经节(intracardiac ganglia, ICG)中的表达变化,并探讨 MOR 特异性激动剂对 AF 的影响,为阿片类药物治疗 AF 提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物 SPF 级正常 SD 大鼠,雄性,250~

2024-09-12 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81801104)

作者简介:刘海帆,女,硕士研究生;

万法萍,女,讲师,硕士生导师,通信作者,E-mail:fapingwan@163.com

**Key words** copper-gadolinium; nanomaterials; nuclear shell structure; antibacterial; *E. coli*; L929 cells

**Fund programs** Key Research and Development Program of Anhui Province (No. 201904a07020062); Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2022a012); Collaborative Innovation Project of Anhui Universities (No. GXXT-2021-056); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2020xkj022)

**Corresponding author** Wang Yuanyin, E-mail: wyy1970548@sohu.com

300 g,共 53 只,购自徐州医科大学实验动物中心。动物提前 7 d 饲养于适宜环境(温度保持 22 ~ 26 °C、湿度 40% ~ 70%、光照 - 黑暗循环 12 h),饲养过程中,动物可自由饮水、饮食。实验操作符合徐州医科大学动物伦理委员会的要求和规定(伦理批号:202208S027)。

## 1.2 主要仪器与试剂

**1.2.1 主要仪器** 恒冷箱冰冻切片机(型号:CM1950)、激光扫描共聚焦显微镜(型号:STELLARIS 5)购自德国 Leica 公司;BL-420N 信号采集与处理系统购自成都泰盟软件有限公司;研究级正置荧光显微镜(型号:BX53)购自日本 Olympus 公司;双红外激光成像系统(型号:9142-00)购自美国 LI-COR 公司。

**1.2.2 主要试剂** MOR 抗体、蛋白基因产物 9.5 (protein gene product 9.5, PGP9.5) 抗体、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH) 抗体、P 物质(substances P, SP) 抗体、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP) 抗体(美国 Abcam 公司,货号: ab10275 和 ab17934, ab10410, ab6211, ab10353, ab36001), GAPDH 抗体(中国艾比玛特生物医药有限公司,货号: P60037), 胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT) 抗体和连接蛋白 43(connexin 43, CX43) 抗体(中国博奥森生物技术有限公司,货号: bs-1833R, bs-0651R), 山羊抗兔 IRDye 800CW 二抗(徐州微科曼得生物工程有限公司,货号: V926-32211), Alexa488 驴抗豚鼠 IgG(美国 Jackson 公司,货号: 706-545-148), Alexa594 驴抗兔 IgG(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号: 8889s), MOR 特异性激动剂内吗啡肽 2(endomorphin-2, EM2) 和 DAMGO(美国 MedChemExpress 公司,货号: 1276124-00-5, 78123-71-4), BCA 蛋白检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号: P0010), HiScript II Q<sup>RT</sup> SuperMix for qPCR 试剂盒(中国诺唯赞生物科技股份有限公司,货号: R223-01)。

## 1.3 方法

**1.3.1 组织样本处理与收集** 7 只正常雄性 SD 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,经左心室、升主动脉灌注生理盐水,再灌注 4% 多聚甲醛,取出心脏后固定,用于后续免疫荧光组织化学染色实验(单标染色 3 只,双标染色 4 只)研究 ICG 的化学解剖学特性;正常大鼠 6 只(用于 Western blot 和 RT-PCR 法检测正常大鼠 MOR 在 ICG 的表达分

布), Normal 组、AF 组、AF-NS 组、AF-EM2 组和 AF-DAMGO 组大鼠各 8 只常规麻醉后经生理盐水灌注后取出心脏,沿房室沟去除心室,分离并去除主动脉和肺动脉,保留左右心房、左前腔静脉、上下腔静脉、肺静脉根部和心房后壁脂肪垫,取心室肌,再取出脊髓腰段用作于阳性对照组织,于 -80 °C 冰箱保存,用于分子生物学实验,探讨 MOR 激动剂对心房颤动(atrial fibrillation, AF)的影响。

**1.3.2 Western blot 实验** 取出组织,加入适量裂解液和蛋白酶抑制剂混合液(100 : 1),剪碎组织,匀浆,冰上静置 30 min。4 °C、12 000 r/min,离心 30 min,吸取上清液。用 BCA 蛋白检测试剂盒定量蛋白浓度,煮沸变性待用。将样品使用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳并将蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,分别置于一抗中: MOR 抗体(1 : 5 000)、CX43 抗体(1 : 800)或 GAPDH 抗体(1 : 5 000),4 °C 摇床过夜。用 TBST 漂洗 3 次,每次 8 min。将膜置于相应二抗(1 : 15 000)中,于室温摇床避光反应 2 h。TBST 漂洗 3 次,每次 8 min。用双红外激光成像系统扫描成像。Western blot 结果使用 ImageJ 进行灰度值分析。

**1.3.3 免疫荧光组织化学染色** 取出固定好的心脏,经 30% 蔗糖溶液沉糖后,沿房室沟去除心室,分离主动脉和肺动脉,保留左右心房、左前腔静脉、上下腔静脉、肺静脉和脂肪垫,再沿上下腔静脉主干长轴剖开静脉,沿心耳和静脉窦交汇处去除左右心耳,平铺心房后壁行冰冻切片(片厚 40 μm)。切片在含 0.3% Triton X-100、10% 驴血清的 0.01 mol/L PBS 中封闭 30 min 后置于一抗中反应:免疫荧光单标染色抗体: ChAT 抗体(1 : 200)、TH 抗体(1 : 1 000)、CGRP 抗体(1 : 500)或 SP 抗体(1 : 200);免疫荧光双标染色抗体: MOR 抗体(1 : 500)/PGP9.5 抗体(1 : 200)、MOR 抗体(1 : 500)分别与 ChAT 抗体(1 : 200)、TH 抗体(1 : 1 000)、CGRP 抗体(1 : 500)、SP 抗体(1 : 200)双标,其中 PGP9.5 作为外周神经元、ChAT 作为副交感神经元、TH 作为交感神经元、CGRP 和 SP 作为感觉神经元标记物,抗体用含 10% 胎牛血清、0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 的抗体稀释液稀释,4 °C 孵育 24 ~ 48 h;与二抗反应: Alexa 488 驴抗兔 IgG(1 : 500)与 Alexa 594 驴抗豚鼠 IgG(1 : 500),室温避光孵育 3 h。各个步骤之间用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。防淬灭荧光封片剂封片后,采用荧光共聚焦显微镜拍照采

集图像。

**1.3.4 qRT-PCR 实验** 于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱取出组织,使用 TRIzol 一步法提取总 RNA,参照试剂盒说明进行逆转录,得到 cDNA。以此模板进行实时荧光定量 PCR 扩增,20  $\mu\text{l}$  PCR 反应体系:cDNA 模板 2  $\mu\text{l}$ ,RNase-free ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu\text{l}$ ,2  $\times$  ChamQ SYBR Qpcr Master Mix 10  $\mu\text{l}$ ,上游引物 0.4  $\mu\text{l}$ ,下游引物 0.4  $\mu\text{l}$ ,PCR 反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  3 min,1 个循环;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,45 个循环;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,95  $^{\circ}\text{C}$  保持,1 个循环;40  $^{\circ}\text{C}$  30 s。所用引物序列为:MOR,上游 GACCGTTTCCTGGCACTTCT,下游 TAGGGCAATGGAGCAGTTTCT,产物大小为 255 bp;GAPDH,上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC,下游 TTTAATGTCACGCACGATTTC。使用大鼠 GAPDH 基因作为内参,反应结束后分别确认扩增曲线和溶解曲线,保存数据,记录各组各指标的 C<sub>T</sub> 值,并按照公式  $\Delta C_T = C_T(\text{目的基因}) - C_T(\text{内参基因})$  和  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{研究组}) - \Delta C_T(\text{对照组})$  计算出  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  值,计算出基因相对表达水平。

**1.3.5 RT-PCR 实验** 取 1.3.4 实时荧光定量 PCR 反应结束后的 DNA 样本进行琼脂糖凝胶电泳:琼脂糖 0.65 g,1  $\times$  TAE 缓冲液 25 ml,染料 2.5  $\mu\text{l}$ ,DNA 样本 6  $\mu\text{l}$ ,恒压 110 V,电泳 45 min,于凝胶成像系统中成像。

**1.3.6 实验分组和 AF 模型制备** 大鼠随机分为正常组(Normal 组)、AF 模型组(AF 组)、溶剂对照组(AF-NS 组)、EM2 药物组(AF-EM2 组)和 DAMGO 药物组(AF-DAMGO 组),每组 8 只。除 Normal 组外,其余四组分别按 0.1 ml/100 g 的剂量标准连续尾静脉注射 Ach-CaCl<sub>2</sub> (Ach 66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、CaCl<sub>2</sub> 10 mg/ml) 混合液建立 AF 模型,每天注射 1 次,连续注射 7 d。AF-NS 组、AF-EM2 组和 AF-DAMGO 组在注射第 4 天,尾静脉注射 Ach-CaCl<sub>2</sub> 混合液前 10~20 min,分别尾静脉注射生理盐水(1 ml/kg)、EM2(1 mg/kg)、DAMGO(1 mg/kg),每天 1 次,连续 4 d,剂量选择参考其他已发表的文章<sup>[3]</sup>以及课题组的初步研究。

**1.3.7 心电图记录与分析** 注射造模液前,对大鼠进行麻醉后,连接 BL-420N 信号采集与处理系统,描计标准 II 导联心电图,持续记录 5 min,采集大鼠基础心率,并排除心律失常大鼠。尾静脉注射的第 7 天,待大鼠麻醉后,描计标准 II 导联心电图 5 min,

按实验设计顺序注射造模液和药物,持续记录大鼠心电图,待心率恢复至正常水平再稳定记录 3~5 min。以出现典型的 P 波消失、f 波出现、R-R 间期不等心电图为 AF 诱发成功的标志。

**1.4 统计学处理** 使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,GraphPad Prism 软件做图,实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,当数据符合正态分布,且满足方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),事后两两比较采用 Tukey 法,否则采用非参数检验,两两比较采用独立样本 *t* 检验,以  $\alpha = 0.05$  为检验标准, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ICG 的化学解剖学特性** 免疫荧光染色结果显示:ICG 中细胞胞体直径在 16~50  $\mu\text{m}$  之间,形态多样,呈圆形、椭圆形或多角形,核大而圆,常偏于一侧,主要呈 ChAT 或 TH 阳性,ChAT 阳性神经元以直径 20~50  $\mu\text{m}$  的主细胞为主。TH 阳性标记物可表达于直径 20~50  $\mu\text{m}$  的主细胞,也可表达于直径 7~15  $\mu\text{m}$  的强荧光细胞,也称为小强荧光细胞。在 ICG 中可观察到 ChAT、TH、CGRP 和 SP 等标记物阳性的神经纤维,纤维可分布于神经元胞体之间,部分神经纤维末梢围绕在胞体周围(图 1)。

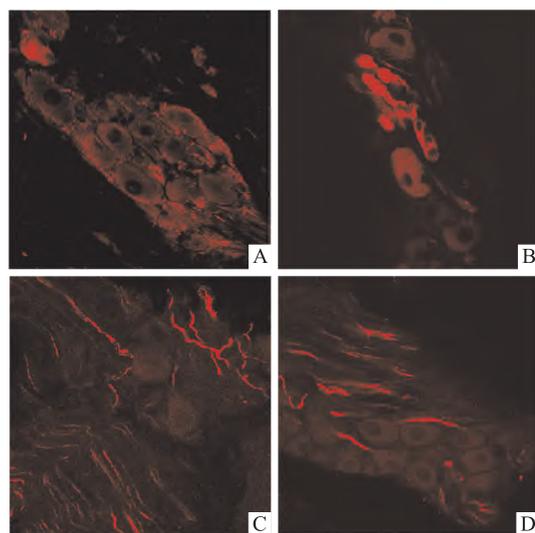


图 1 正常大鼠 ICG 不同类型神经元标记物的免疫荧光染色  $\times 400$

Fig. 1 Immunofluorescent staining images of different types of neurons in normal rat ICG  $\times 400$

A: ChAT; B: TH; C: CGRP; D: SP.

**2.2 MOR 在 ICG 中的表达和分布** MOR 与神经

元标记物 PGP9.5 免疫荧光染色结果显示, MOR 免疫阳性产物主要分布于神经元胞体中, 偶见于神经纤维内。取脊髓作为阳性对照、心室肌作为阴性对照, RT-PCR 和 Western blot 法在心房后壁组织提取物中检测到目的片段为 255 bp 的 MOR mRNA 转录物和 MOR 特异性蛋白的免疫反应条带(分子量为 55 ku)(图 2)。MOR 免疫反应阳性(MOR-immunoreactive, MOR-ir)细胞主要与 ChAT 免疫反应阳性和 TH 免疫反应阳性细胞共标, MOR-ir 细胞周围可见 ChAT 免疫反应阳性的神经纤维末梢, 且末梢处的免疫荧光强度高于神经元胞体(图 3A1、B1、C1), 神经节内几乎未见 MOR/TH 双标的神经纤维末梢(图 3A2、B2、C2)。在神经节内可见 SP 和 CGRP 阳性纤维分布于神经节细胞之间, 且部分神经纤维末梢围绕在 MOR-ir 细胞的胞体周围(图 3A3、B3、C3、A4、B4、C4)。

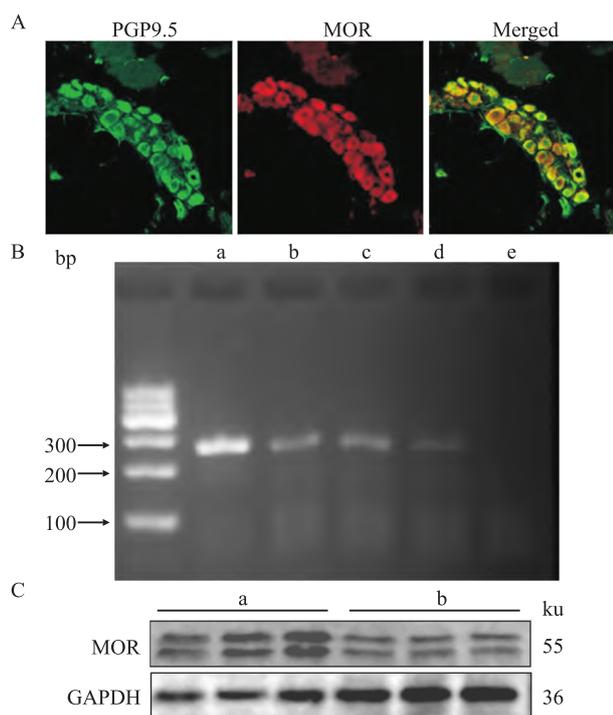


图 2 正常大鼠 ICG 中 MOR 的表达

Fig. 2 The expression of MOR in normal rat ICG

A: Immunofluorescent double staining of PGP9.5 and MOR in normal rat ICG  $\times 400$ ; B: The expression of MOR mRNA in normal rat ICG detected by RT-PCR; C: The expression of MOR protein in normal rat ICG detected by Western blot; a: Spinal cord; b-d: Atria; e: Ventricle.

**2.3 大鼠 AF 模型的建立** Ach 激活钾通道可诱发 AF,  $\text{CaCl}_2$  浓度的快速增加可导致严重的高钾

血症, 引起钙内流, 因此, Ach 与  $\text{CaCl}_2$  联合使用可导致传导部分阻断, 冲动扩散不一致, 诱发 AF。本实验用尾静脉注射 Ach- $\text{CaCl}_2$  混合液的方法建立 AF 模型, 正常 SD 大鼠代表性心电图如图 4B-a 所示; 窦性心律心电图 P 波规则, R-R 间期规则; 注射 Ach- $\text{CaCl}_2$  混合液后大鼠心电图由窦性心律转为 AF 心律, 即典型的 P 波消失、f 波出现、R-R 间期不等(图 4B-b)。

**2.4 MOR 在 AF 大鼠 ICG 中的表达变化** 为研究 MOR 在 AF 中的作用, 该实验采用 qRT-PCR 法、Western blot 法检测 MOR 在 AF 大鼠 ICG 中的表达变化。结果显示, AF 组大鼠 ICG 中 MOR 的 mRNA 转录物是 Normal 组的 29.85% ( $t = 7.54$ ,  $P < 0.01$ ), MOR 的蛋白表达量是 Normal 组的 54.49% ( $t = 3.82$ ,  $P < 0.05$ )(图 5), 表明 AF 大鼠 ICG 中 MOR 的 mRNA 和蛋白表达量均降低。

**2.5 MOR 激动剂对 AF 持续时间的影响** 大鼠尾静脉注射 Ach- $\text{CaCl}_2$  混合液后, 心电图由首个 AF 波形出现至波形恢复为正常波形的时间为 AF 持续时间, 是判断 AF 建立是否成功以及干预手段是否有效的重要指标。本实验通过尾静脉注射 MOR 的特异性激动剂 EM2 和 DAMGO 探讨其对 AF 的影响。单因素方差分析结果显示多组之间差异有统计学意义( $F = 23.68$ ,  $P < 0.001$ ); 多重比较分析结果显示 Normal 组无 AF 发生, 其他 4 组与 Normal 组大鼠 AF 持续时间相比差异有统计学意义(均  $P < 0.001$ ); AF-NS 组 AF 持续时间( $14.52 \pm 3.18$ )s 与 AF 组( $14.54 \pm 3.95$ )s 相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与 AF-NS 组相比, AF-EM2 组和 AF-DAMGO 组 AF 持续时间分别缩短为( $9.35 \pm 3.18$ )s 和( $8.98 \pm 3.13$ )s, 差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 6), 提示 MOR 激动剂可以缩短 AF 持续时间。

**2.6 MOR 激动剂对 AF 大鼠 CX43 表达的影响**

心房电重构是 AF 的一个重要特征, 间隙连接蛋白(gap junctional proteins, GJPs)介导心肌细胞的电偶联, 在心房电重构过程中发挥重要作用。单因素方差分析结果显示多组之间差异有统计学意义( $F_{EM2} = 20.34$ ,  $F_{DAMGO} = 19.56$ , 均  $P < 0.01$ ); 多重比较分析结果显示, 与 Normal 组相比, AF 组与 AF-NS 组大鼠组织提取物中 CX43 表达量均降低( $P < 0.01$ )。AF 组与 AF-NS 组表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。AF-EM2 组和 AF-DAMGO 组组织提取物中

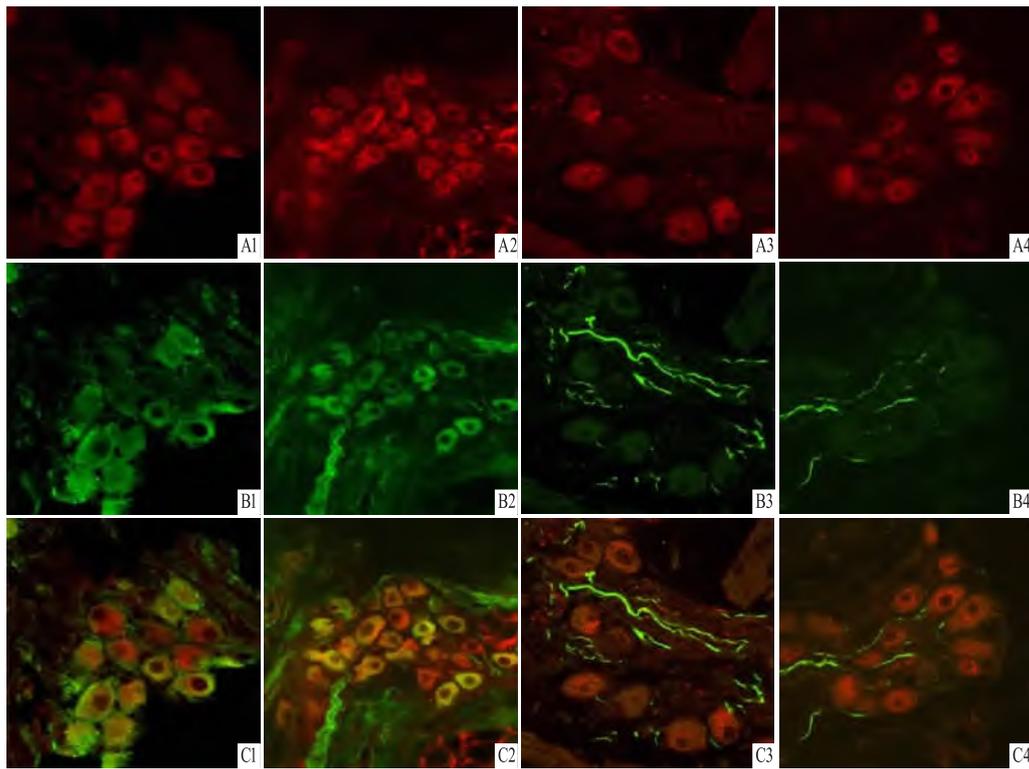


图3 正常成年大鼠 ICG 中 MOR 与不同类型神经元标记物免疫荧光双标染色 ×400

Fig. 3 Immunofluorescent double-labeling images of MOR with different neuronal markers in the normal adult rat ICG ×400

A1 – A4; MOR; B1: ChAT; B2; TH; B3: CGRP; B4: SP; C1 ~ C4: Merged images of MOR with ChAT, TH, CGRP, and SP.

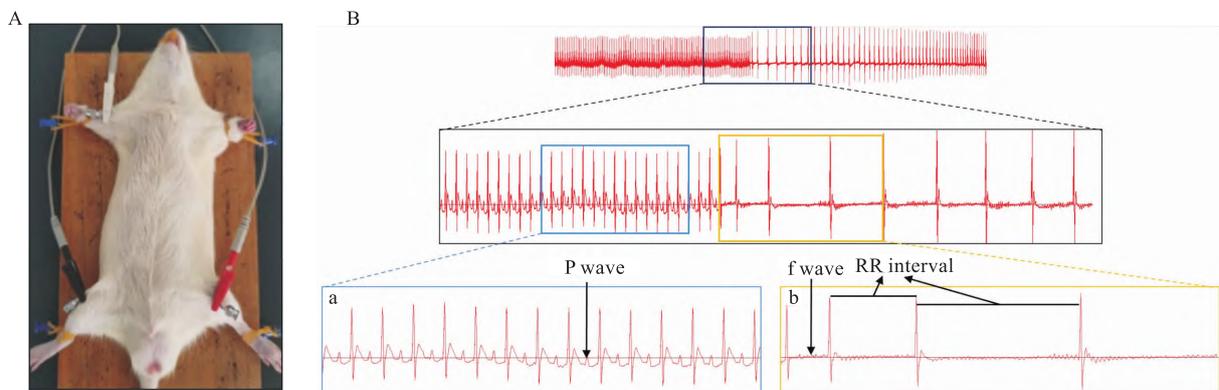


图4 大鼠 AF 模型建立前后心电图变化情况

Fig. 4 The changes in electrocardiogram before and after establishing the AF model in rats

A: Rat connected to the BL-420N signal acquisition and processing system in order to record standard lead II electrocardiogram; B: Following tail vein injection of a mixture of Ach and CaCl<sub>2</sub>, rat electrocardiogram transitions from sinus rhythm (a) to AF (b); Starting from the first QRS wave, P waves disappeared and were replaced by continuous f waves, with irregular R-R intervals.

CX43 表达量分别是 AF-NS 组的 2.07 和 2.06 倍, 差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ ) (图 7), 提示 MOR 激动剂能够促进 CX43 的表达。

### 3 讨论

ICG 由排列复杂的心内神经元构成, 这些神经

元根据形态、结构和功能分为许多亚群, 其位置、形态、数量、大小在种属之间有所不同<sup>[8]</sup>, 在大鼠和小鼠等啮齿类动物中, ICG 主要分布于心外膜脂肪垫, 尤其是心房后壁大血管围成的“心门”处<sup>[9-10]</sup>。ICG 细胞根据功能和含有递质的不同, 可分为以下 4 类: ChAT 阳性的胆碱能神经元, TH 阳性的肾上腺素能

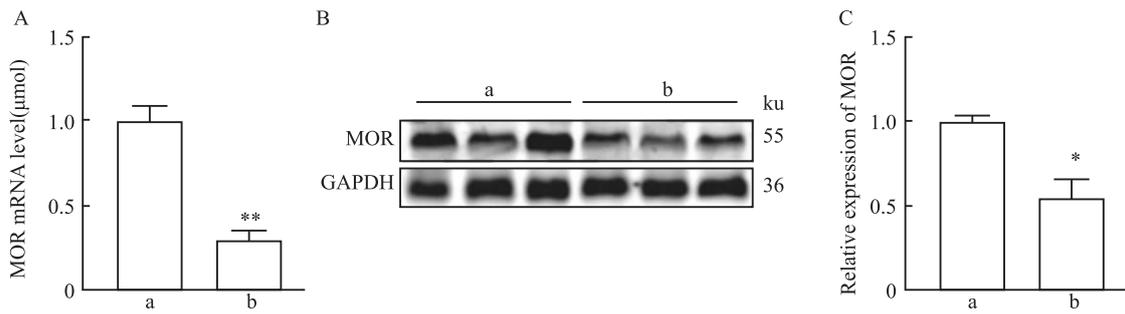


图5 MOR在AF大鼠ICG中的表达变化

Fig. 5 Changes of MOR expression in ICG of AF rats

A: MOR mRNA expression levels in two groups of rat ICG detected by qRT-PCR ( $n=3$ ); B: MOR protein expression in two groups of rat ICG detected by Western blot; C: Comparison of relative MOR protein expression levels between two groups of rats ( $n=3$ ); a: Normal group; b: AF group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Normal group.

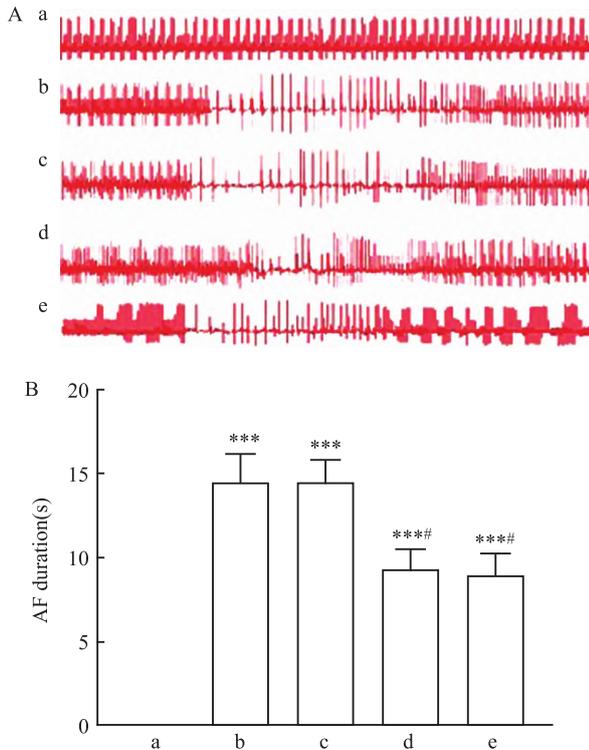


图6 MOR激动剂对AF持续时间的影响

Fig. 6 Effect of MOR agonists on the duration of AF

A: Representative electrocardiograms from each group, scale = 3.2 s; B: Statistical analysis graph of the duration of AF in each group; a: Normal group; b: AF group; c: AF-NS group; d: AF-EM2 group; e: AF-DAMGO group; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Normal group; #  $P < 0.05$  vs AF-NS group.

神经元,表达SP和CGRP等肽类递质的感觉神经元,直径6~15 μm的TH强阳性的强荧光细胞。这些神经元在协调交感神经和副交感神经对心脏功能的调节过程中发挥着重要作用。

为了研究MOR在心脏的表达与分布,本研究

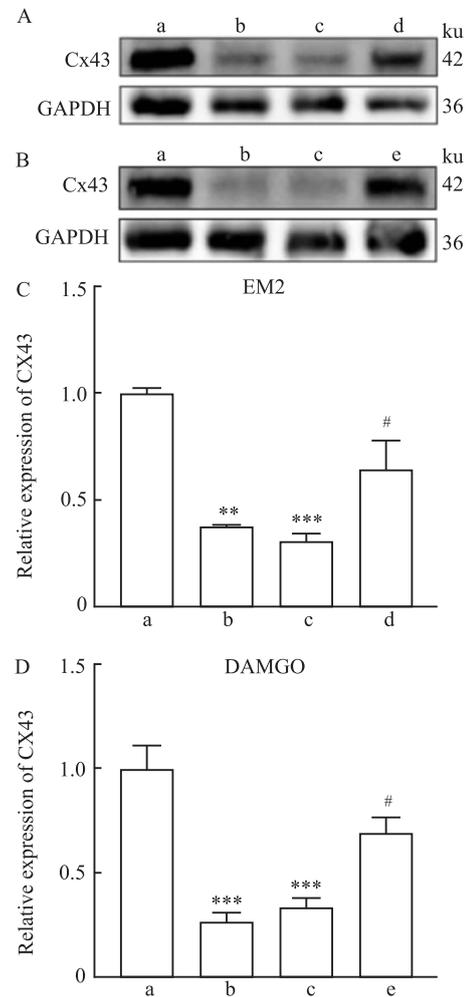


图7 MOR激动剂对AF大鼠CX43表达的影响

Fig. 7 Effect of MOR agonists on CX43 expression in AF rats

A, B: CX43 protein expression in tissue extracts from each group of rats detected by Western blot; C, D: Statistical analysis of Western blot results ( $n=3$ ); a: Normal group; b: AF group; c: AF-NS group; d: AF-EM2 group; e: AF-DAMGO group; \*\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.001$  vs Normal group; #  $P < 0.05$  vs AF-NS group.

首先采用 RT-PCR 和 Western blot 方法证明了 MOR 的 mRNA 和总蛋白主要表达于心房后壁组织中, 心室组织中几乎无表达。该结果与 Wittert et al<sup>[11]</sup> 在大鼠心肌的研究结果一致, 但 Treskatsch et al<sup>[12]</sup> 发现 MOR 表达于新生大鼠心肌和人心脏组织中, 这可能是心脏中 MOR 的表达在不同发育阶段和不同物种之间具有差异性。Mousa et al<sup>[4]</sup> 报道 MOR 在成年大鼠心肌细胞胞膜、神经纤维、交感、副交感和感觉神经元中表达, 交感和副交感神经属于心内神经网络的重要组成部分, ICG 是该网络的核心, 因此本研究进一步采用免疫荧光染色方法证明了 MOR 在大鼠 ICG 中表达, 且主要分布在副交感和交感神经元的胞体中。心脏自主神经系统已成为近年来研究 AF 神经治疗领域的热点, MOR 是阿片类药物在心衰期间诱导心脏保护作用的主要治疗靶点<sup>[13]</sup>。该实验使用 Ach-CaCl<sub>2</sub> 混合液诱导 AF 模型, 发现 AF 组大鼠 ICG 中 MOR mRNA 和蛋白表达量均降低, 提示 ICG 中 MOR 可能通过自主神经系统调节心脏的传导功能。

内源性和外源性阿片受体激动剂通过与特定的阿片受体结合发挥其生理和药理作用。体内和体外实验研究<sup>[3]</sup>均发现 MOR、DOR 和 KOR 激动剂预处理均具有心脏保护作用, 静脉注射选择性 MOR 激动剂芬太尼可提高冠状动脉闭塞犬的心室颤动阈值<sup>[14]</sup>, DOR 激动剂 deltorphin II 可降低缺血性心律失常的梗死面积, KOR 激动剂 U50,488 可预防缺血性和再灌注性心律失常<sup>[3,15]</sup>。CX43 是心脏重要的 GJP 蛋白, 在 AF 动物模型和 AF 患者心房组织中显著下调<sup>[16]</sup>。本研究结果显示 MOR 激动剂 EM2 和 DAMGO 能降低 AF 持续时间, 并促进 AF 相关蛋白 CX43 的表达, 提示阿片类药物可能是开发抗心律失常药物的潜在候选者。但其具体作用机制还需要进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Headrick J P, See Hoe L E, Du Toit E F, et al. Opioid receptors and cardioprotection-‘opioidergic conditioning’ of the heart [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(8): 2026–50. doi:10.1111/bph.13042.
- [2] Maslov L N, Mukhomedzyanov A V, Tsibulnikov S Y, et al. Activation of peripheral  $\delta_2$ -opioid receptor prevents reperfusion heart injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 907: 174302. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174302.
- [3] Maslov L N, Khaliulin I, Oeltgen P R, et al. Prospects for creation of cardioprotective and antiarrhythmic drugs based on opioid receptor agonists [J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(5): 871–923. doi:10.1002/med.21395.
- [4] Mousa S A, Shaqura M, Schäper J, et al. Identification of mu- and kappa-opioid receptors as potential targets to regulate parasympathetic, sympathetic, and sensory neurons within rat intracardiac Ganglia [J]. *J Comp Neurol*, 2010, 518(18): 3836–47. doi:10.1002/cne.22427.
- [5] Aksu T, Gopinathannair R, Gupta D, et al. Intrinsic cardiac autonomic nervous system: what do clinical electrophysiologists need to know about the “heart brain”? [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2021, 32(6): 1737–47. doi:10.1111/jce.15058.
- [6] Pauziene N, Ranceviene D, Rysevaite-Kyguoline K, et al. Neurochemical alterations of intrinsic cardiac ganglionated nerve plexus caused by arterial hypertension developed during ageing in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats [J]. *J Anat*, 2023, 243(4): 630–47. doi:10.1111/joa.13877.
- [7] Scherschel K, Hedenus K, Jungen C, et al. Impact of the ablation technique on release of the neuronal injury marker S100B during pulmonary vein isolation [J]. *Europace*, 2020, 22(10): 1502–8. doi:10.1093/europace/eaal159.
- [8] Durães Campos I, Pinto V, Sousa N, et al. A brain within the heart: a review on the intracardiac nervous system [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 119: 1–9. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.04.005.
- [9] Shen M J, Zipes D P. Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias [J]. *Circ Res*, 2014, 114(6): 1004–21. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.302549.
- [10] Shen M J. The cardiac autonomic nervous system: an introduction [J]. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*, 2021, 32(3): 295–301. doi:10.1007/s00399-021-00776-1
- [11] Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 218(3): 877–81. doi:10.1006/bbrc.1996.0156.
- [12] Treskatsch S, Shaqura M, Dehe L, et al. Evidence for MOR on cell membrane, sarcoplasmic reticulum and mitochondria in left ventricular myocardium in rats [J]. *Heart Vessels*, 2016, 31(8): 1380–8. doi:10.1007/s00380-015-0784-8.
- [13] He S F, Jin S Y, Yang W, et al. Cardiac  $\mu$ -opioid receptor contributes to opioid-induced cardioprotection in chronic heart failure [J]. *Br J Anaesth*, 2018, 121(1): 26–37. doi:10.1016/j.bja.2017.11.110.
- [14] Kunecki M, Oleksy T, Martynów J, et al. Remifentanyl but not sufentanyl induces cardioprotection in human ischemic heart muscle *in vitro* [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2023, 24(1):25. doi:10.1186/s40360-023-00660-3.
- [15] Mukhomedzyanov A V, Tsibulnikov S Y, Maslov L N. Comparative analysis of infarct size limiting activity of  $\kappa$ -opioid receptor agonists in *in vivo* reperfused heart [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2021, 170(5): 594–7. doi:10.1007/s10517-021-05113-7.

- [16] Lv X, Li J, Hu Y, et al. Overexpression of miR-27b-3p targeting Wnt3a regulates the signaling pathway of Wnt/ $\beta$ -catenin and attenuates atrial fibrosis in rats with atrial fibrillation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5703764. doi: 10.1155/2019/5703764.

## Expression and distribution of $\mu$ -opioid receptors in intracardiac ganglia and effects of its agonists on atrial fibrillation

Liu Haifan, Xie Yushan, Wan Faping

(Dept of Human Anatomy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004)

**Abstract Objective** To explore the expression and distribution of  $\mu$ -opioid receptors (MOR) in intracardiac ganglia (ICG) and the effect of its agonists on atrial fibrillation (AF). **Methods** ① The chemical anatomical characteristics of ICG in normal SD rats were studied by immunofluorescence single staining. The expression and distribution of MOR in ICG were detected by using immunofluorescence double staining, Western blot, and RT-PCR. ② Forty male SD rats weighing 250 – 300 g were randomly divided into 5 groups: normal group, AF model group (AF group), solvent control group (AF-NS group), MOR-specific agonist endomorphin-2 (EM2) drug group (AF-EM2 group) and DAMGO drug group (AF-DAMGO group). The AF model was established by tail vein injection of acetylcholine (Ach) and  $\text{CaCl}_2$ , and drug intervention was given during modeling. The duration of AF before and after drug administration was monitored by collecting electrocardiograms. The protein and mRNA expression of MOR in ICG and connexin 43 (CX43) in atrial tissue were detected by the method of Western blot and qRT-PCR. **Results** ① Peptide nerve fibers positive for substance P and calcitonin gene-related peptide were found in the ICG, along with parasympathetic neurons positive for acetylcholine transferase and sympathetic neurons positive for tyrosine hydroxylase. The mRNA transcripts and protein of MOR were expressed in the atrial posterior wall tissue. MOR immunoreactive products were mainly distributed in the cell bodies of ICG neurons, primarily in parasympathetic and sympathetic neurons. ② Compared with the Normal group, the expression of MOR mRNA and protein in ICG of the AF rat decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the AF-NS group, the duration of AF was shortened in the AF-EM2 group and AF-DAMGO group, and the expression of CX43 increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** MOR is mainly expressed in sympathetic and parasympathetic neurons in ICG. The expression of MOR decreases in AF rats. MOR agonists alleviate AF.

**Key words**  $\mu$ -opioid receptor; intracardiac ganglia; atrial fibrillation;  $\mu$ -opioid receptor agonists; CX43

**Found program** National Natural Science Foundation of China(No. 81801104)

**Corresponding author** Wan Faping, E-mail: fapingwan@163.com