

## · 基础研究 ·

 $\mu$  阿片受体在大鼠腹主动脉、心脏和肾脏的分布和定位

白三省, 陈文生, 杨 阳, 金振晓

[摘要]:目的 观察  $\mu$  阿片受体(MOR)在正常大鼠腹主动脉、心脏和肾脏组织中的分布和定位。方法 选用成年 SD 大鼠腹主动脉、心脏和肾脏冰冻切片进行免疫组织化学染色,对 MOR 在大鼠心脏、大动脉和肾脏的分布进行定位分析。结果 MOR 免疫阳性物质主要分布于腹主动脉内皮层和肾小球毛细血管内皮,而在心脏未发现。结论 MOR 在大鼠腹主动脉内皮和肾小球毛细血管内皮有分布。

[关键词]:  $\mu$  阿片受体;内啡肽;免疫组织化学;SD 大鼠

[中图分类号]:R654.1 [文献标识码]: A [文章编号]:1672-1403(2012)04-0239-04

Distribution and localization of  $\mu$  opioid receptor in the abdominal aorta, heart and kidney of rats

Bai San-xing, Chen Wen-sheng, Yang Yang, Jin Zhen-xiao

Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032

Corresponding author: Chen Wen-sheng, Email: chenws@fmmu.edu.cn

[Abstract]: **Objective** To investigate the distribution of  $\mu$  opioid receptor (MOR) in the abdominal aorta, heart and kidney of normal Sprague-Dawley rats. **Methods** Immunohistochemistry (IHC) technique was used to detect the  $\mu$  opioid receptor in the frozen sections of the heart, abdominal aorta and kidney tissues of normal Sprague-Dawley rats. **Results**  $\mu$  opioid receptors were detected in the endothelial cells of abdominal aorta, the capillaries of the glomerulus, but not in the endocardium. **Conclusion**  $\mu$  opioid receptors exist in the abdominal aorta and kidney of rats.

[Key words]:  $\mu$  opioid receptor; Immunohistochemistry; Sprague-Dawley rat

内啡肽包括两种相差一个氨基酸的四肽,内啡肽-1(Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>, EM-1)和内啡肽-2(Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, EM-2)<sup>[1]</sup>。自他们被发现以来,大量的研究显示他们广泛分布于人类、牛和啮齿类动物的中枢神经系统和外周组织<sup>[2-4]</sup>,而这些研究主要集中在其镇痛作用方面,对其心血管作用的机制人们知之甚少。在体动物实验发现静脉注射 EM-1 和 EM-2 可以降低小鼠、大鼠和兔动脉血压和外周阻力<sup>[5-7]</sup>,降低心输出量和减慢心率。离体的实验发现 EM-1 和 EM-2 能够降低苯肾上腺素等缩血管物质诱导的大鼠和兔主动脉血管环张力的上升<sup>[8-9]</sup>,破坏血管内皮结构的完整性和应用  $\mu$  阿片受体( $\mu$  opioid receptor, MOR)特异性阻断剂左旋硝基精氨酸(L-NAME)可以阻断内啡肽的上述作用。所以人们推测内

啡肽可能通过外周血管的 MOR 发挥扩张血管、降低血压的作用。但是到目前为止,心血管系统是否存在 MOR 尚未见报道,所以这些功能学研究结果缺乏相应的形态学证据支持。本实验用免疫组织化学法观察 MOR 在大鼠大血管、心脏和肾脏的分布情况。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SD 大鼠 10 只,体重 200~250 g,雌雄不拘,由第四军医大学实验动物中心提供。

**1.2 取材** 腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉以后,经左心室插管至升主动脉,再以 100 ml 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2~7.4)灌注以冲去血液,然后迅速分离心脏、腹主动脉和肾脏,分离过程中避免过度牵拉造成组织结构破坏。分离好的组织置于 4℃ 预冷含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(PB, pH 7.2~7.4)中固定 24 h(4℃),随后置于含 30% 蔗糖的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液中脱水至其沉底(4℃)。用衡冷箱切片机(CM1900,

作者单位: 710032 西安,第四军医大学西京医院心脏外科

通讯作者: 陈文生: chenws@fmmu.edu.cn

Leica 公司)切片,片厚 12  $\mu\text{m}$ ,裱于经明胶处理的载玻片上。切片随机分为三套,晾干后置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。第一套切片进行 HE 染色,观察大鼠心脏、腹主动脉和肾脏的结构特点。第二套切片进行 MOR 的免疫组织化学染色。第三套切片用于进行阴性对照试验,用正常血清代替一抗进行免疫组化染色。另外取一部分血管组织随机分为两组,其中一组以棉拭子轻轻摩擦血管腔以破坏内皮<sup>[10]</sup>,然后用相同的方法对两组血管进行切片和染色。

**1.3 免疫组化染色** 冰冻切片从 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱拿出后置于室温 30 min,先以蒸馏水稀释的 3% 的双氧水处理切片 10 min,以灭活内源性过氧化物酶。以豚鼠抗 MOR 血清(稀释比例 1:500; Millipore 公司)孵育切片 16~24 h;再以 Biotin 结合的羊抗豚鼠血清(稀释比例 1:200; Vector 公司)孵育切片 16~18 h;然后用 ABC Elite Kit(稀释比例 1:50; Vector 公司)孵育切片 2 h;最后切片在含 0.02% 二甲基联苯胺(DAB)和 0.003% 双氧水( $\text{H}_2\text{O}_2$ )的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)内呈色 10~20 min。上述各步骤之前均用磷酸盐缓冲液洗片 3 次,每次 10 min。上述抗体的稀释液均为含 2% 正常羊血清和 0.3% Triton X-100 的磷酸盐缓冲液,但 ABC Elite Kit 的稀释液仅用磷酸盐缓冲液。最后用苏木素复染细胞核。将 3 套切片裱于载玻片上,干燥、脱水、透明、封片,普通光学显微镜(Olympus BX60)观察。

## 2 结果

**2.1 MOR 在大鼠腹主动脉的分布** 图 1A 为大鼠腹主动脉 HE 染色结果,可见圆形或椭圆形的血管内皮细胞核和梭型的平滑肌细胞核,以及波浪形的中膜弹力纤维;图 1B 为大鼠腹主动脉 MOR 免疫组化染色结果,显示 MOR 阳性着色(棕黑色颗粒)分布于大鼠腹主动脉内皮层,而在内弹性膜、平滑肌和外膜则未见阳性着色;图 1C 为免疫组化的阴性对照结果,未见阳性着色;图 1D 为以棉拭子摩擦血管腔破坏内皮后, MOR 免疫组化染色结果,可见阳性着色遭到破坏,分布不连续。

**2.2 MOR 在大鼠肾脏的分布** 图 2A 为大鼠肾脏 HE 染色结果,可见肾小管和毛细血管腔以及系膜细胞;图 2B 为大鼠肾脏 MOR 的免疫组化染色结果,结果显示 MOR 阳性着色(棕黑色颗粒)分布于肾脏肾小球毛细血管区,而在近曲小管和系膜区则未见阳性着色;图 2C 为免疫组化阴性对照结果,未见 MOR 阳性着色。

**2.3 MOR 在大鼠心肌和心内膜的分布** 图 3A 为

大鼠心脏 HE 染色结果,可见大鼠心肌细胞和心内膜、圆形或椭圆形内皮细胞核以及特征性的心肌细胞;图 3B 为大鼠心脏 MOR 的免疫组化染色结果,未见心肌细胞和心内膜出现阳性着色。

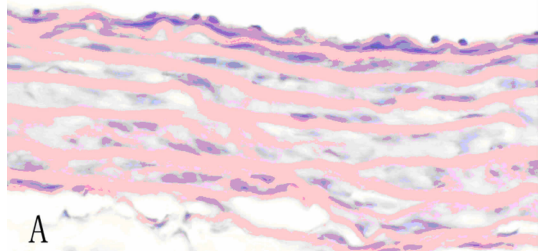


图 1A 大鼠腹主动脉 HE 染色( $\times 400$ )

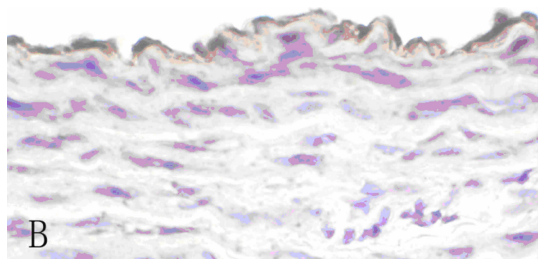


图 1B 大鼠腹主动脉 MOR 免疫组化染色( $\times 400$ )

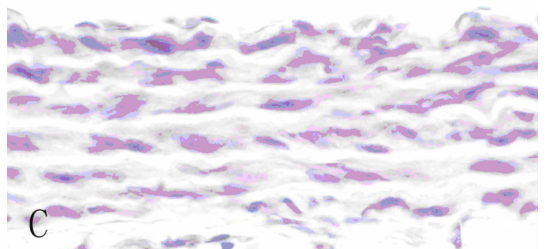


图 1C 免疫组化的阴性对照( $\times 400$ )

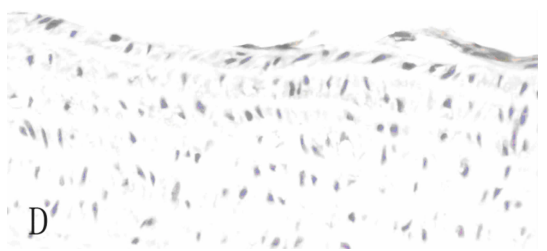


图 1D 破坏内皮后, MOR 免疫组化染色结果( $\times 400$ )

图 1 MOR 在大鼠腹主动脉的分布

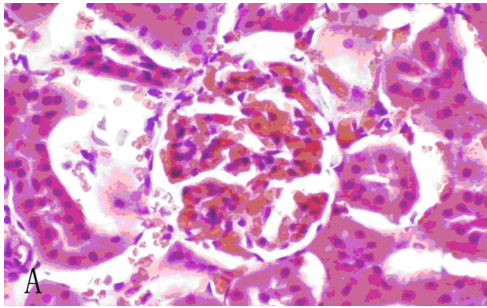


图 2A 大鼠肾组织 HE 染色(×400)

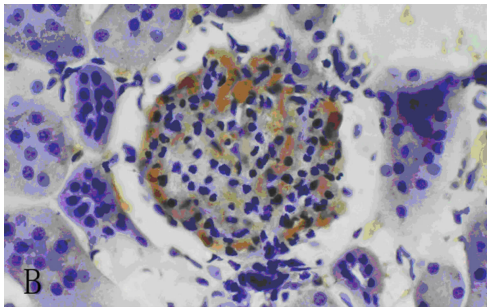


图 2B 大鼠肾组织 MOR 免疫组化染色(×400)

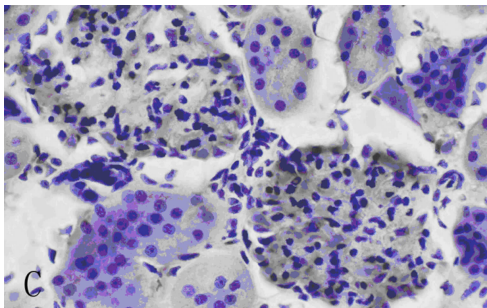


图 2C 免疫组化的阴性对照(×400)

图 2 MOR 在大鼠肾脏的分布



图 3A 大鼠心内膜组织 HE 染色(×400)

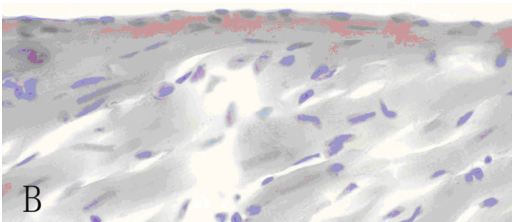


图 3B 鼠心内膜组织 MOR 免疫组化染色(×400)

图 3 MOR 在大鼠心肌和心内膜的分布

### 3 讨论

1954 年 Bskett 和 Casy<sup>[11]</sup> 首次提出阿片受体的存在, Martin 等<sup>[12]</sup> 使用吗啡类似物首次获得阿片受体存在的在体证据。他们确定了由这些药物引起的三种互不相同的症状, 并由此假定是由于激动剂作用于三种各不相同的受体而引起。得益于基因筛选技术, 其分子结构被阐明。这三种阿片受体分别是 MOR、 $\delta$  阿片受体和  $\kappa$  阿片受体, 他们具有相似的结构, 都是高度同源的 G 蛋白耦联的、7 次跨膜受体超家族成员。Chen 等<sup>[13]</sup> 首次利用大鼠脑 cDNA 文库克隆了 MOR, 随后的研究显示 MOR 不但广泛分布于基底核、丘脑等中枢区域<sup>[14]</sup>, 还分布于肺、小肠、大肠、脾脏、肾脏和肾上腺等外周组织<sup>[15]</sup>, 但是在心血管系统分布尚无确切的报道。内啡肽是新发现的内源性的  $\mu$  受体专一性配体, 主要由大脑分泌, 可通过一种可饱和的转运机制通过血脑屏障到达外周循环<sup>[16]</sup>。关于它的研究既往主要集中在其镇痛作用方面, 直到 Champion 的小组进行了大量的动物实验<sup>[5]</sup>, 才发现内啡肽具有调节心血管活动的活性, 但其机制尚存在争议。

MOR 和内啡肽广泛分布在大脑与血压调节有关的区域如延髓腹外侧部、孤束核、下丘脑、室旁核等<sup>[17]</sup>, 直接注射  $\mu$  受体激动剂到这些区域可以导致心率下降和血压的降低<sup>[18]</sup>。切断双侧迷走神经可以导致内啡肽的降压和减慢心律作用消失<sup>[19]</sup>。所以, 有学者认为内啡肽通过激活延髓背角浅表部的孤束核、联合核等中枢部位的 MOR, 降低心脏交感神经的张力, 从而抑制心输出量、减慢心律、降低血压<sup>[20]</sup>。上述实验结果都支持这一理论。另外, 有研究发现自发性高血压大鼠杏仁核、缰核和孤束核  $\mu$  受体的分布密度低于血压正常的大鼠<sup>[21]</sup>。这些结果都提示中枢部位的  $\mu$  受体参与了对血压的调节。然而, Czapl 等<sup>[6]</sup> 发现内啡肽经侧脑室给药时的降压作用不及静脉注射, 因此, 推测内啡肽很可能主要通过作用于外周血管发挥其调节血压的作用。在内皮细胞完整的鼠离体胸主动脉条中, 内啡肽可以浓度依赖性地抑制由缩血管物质肾上腺素、血管紧张素 II 等引起的血管收缩反应, 一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 和  $\mu$  受体拮抗剂纳洛酮可以阻断其降低血管张力的效应, 而内皮细胞完整性遭到破坏之后, 内啡肽则丧失了上述作用<sup>[8,10]</sup>。根据这些实验, 人们推断内啡肽可能是通过激活内皮细胞上的  $\mu$  型阿片受体, 通过与乙酰胆碱相似的通路, 即 G 蛋白耦联的 NO-cGMP 依赖的经典途径

发挥扩张血管的作用<sup>[9]</sup>。

本实验发现 MOR 分布于大鼠大血管内皮,为上述推测提供了形态学证据;而在心肌和心内膜则没有发现 MOR,提示内啡肽引起的心率的变化可能不是内啡肽对心脏的直接作用的结果,与以往实验结果一致<sup>[15]</sup>;由于本实验没有观察 MOR 在冠状动脉的分布情况,尚需进一步研究来弄清其在心脏大血管的分布情况和其对心率和心输出量的影响。另外,我们还发现 MOR 分布于肾脏的血管区,提示肾脏可能介导了内啡肽的血压调节作用。众所周知,肾脏是血压调节的一个重要器官,内啡肽可能作用于肾脏血管的 MOR,调节血管的收缩和舒张,从而影响肾小球滤过率,间接地发挥调节血压的作用,而目前尚未有这方面的报道。

### 参考文献:

- [1] Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, *et al.* A potent and selective endogenous agonist for the mu - opiate receptor [J]. *Nature*, 1997, 386(6624): 499 - 502.
- [2] Pierce TL, Wessendorf MW. Immunocytochemical mapping of endomorphin - 2 - immunoreactivity in rat brain [J]. *J Chem Neuroanat*, 2000, 18(4): 181 - 207.
- [3] Kao SC, Zhao X, Lee CY, *et al.* Absence of mu opioid receptor mRNA expression in astrocytes and microglia of rat spinal cord [J]. *Neuroreport*, 2012, 12(6): 378 - 384.
- [4] Agirregoitia E, Peralta L, Mendoza R, *et al.* Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes [J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 24(5): 550 - 557.
- [5] Champion HC, Zadina JE, Kastin AJ, *et al.* Endomorphin 1 and 2 have vasodepressor activity in the anesthetized mouse [J]. *Peptides*, 1998, 19(5): 925 - 929.
- [6] Czapl MA, Champion HC, Zadina JE, *et al.* Endomorphin 1 and 2, endogenous mu - opioid agonists, decrease systemic arterial pressure in the rat [J]. *Life Sci*, 1998, 62(13): PL175 - 179.
- [7] Champion HC, Zadina JE, Kastin AJ, *et al.* The endogenous mu - opioid receptor agonists endomorphins 1 and 2 have novel hypotensive activity in the rabbit [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 235(3): 567 - 570.
- [8] Huggins SY, Champion HC, Cheng G, *et al.* Vasorelaxant responses to endomorphins, nociceptin, albuterol, and adrenomedullin in isolated rat aorta [J]. *Life Sci*, 2000, 67(4): 471 - 176.
- [9] Liu J, Wu WM, Che JJ, *et al.* Endomorphins restored the endothelium - dependent relaxation of the rabbit aorta rings exposed to high D - glucose condition via NO - cGMP pathway

[J]. *Protein Pept Lett*, 2006, 13(10): 1037 - 1044.

- [10] Qi YM, Yang DJ, Duan X, *et al.* Endomorphins inhibit contractile responses of rat thoracic aorta rings induced by phenylephrine and angiotensin II in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(1): 40 - 44.
- [11] BECKETT AH, CASY AF. Synthetic analgesics: stereochemical considerations [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1954, 6(12): 986 - 1001.
- [12] Martin WR, Eades CG, Thompson JA, *et al.* The effects of morphine - and nalorphine - like drugs in the nondependent and morphine - dependent chronic spinal dog [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1976, 197(3): 517 - 532.
- [13] Chen Y, Mestek A, Liu J, *et al.* Molecular cloning and functional expression of a mu - opioid receptor from rat brain [J]. *Mol Pharmacol*, 1993, 44(1): 8 - 12.
- [14] Wang JB, Imai Y, Eppler CM, *et al.* mu opiate receptor: cDNA cloning and expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(21): 10230 - 10234.
- [15] 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 - 881.
- [16] Kastin AJ, Fasold MB, Smith RR, *et al.* Saturable brain - to - blood transport of endomorphins [J]. *Exp Brain Res*, 2001, 139(1): 70 - 75.
- [17] Pugsley MK. The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system [J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 93(1): 51 - 75.
- [18] Fichna J, Janecka A, Costentin J, *et al.* The endomorphin system and its evolving neurophysiological role [J]. *Pharmacol Rev*, 2007, 59(1): 88 - 123.
- [19] Kwok EH, Dun NJ. Endomorphins decrease heart rate and blood pressure possibly by activating vagal afferents in anesthetized rats [J]. *Brain Res*, 1998, 803(1 - 2): 204 - 207.
- [20] Viard E, Sapru HN. Endomorphin - 2 in the medial NTS attenuates the responses to baroreflex activation [J]. *Brain Res*, 2006, 1073 - 1074: 365 - 373.
- [21] Yin X, Zhu YH, Xu SF. Distributions of mu and delta opioid receptors in central nervous system of SHR rats and normotensive WKY rats [J]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1996, 17(1): 28 - 31.

致谢:感谢第四军医大学解剖学教研室李云庆教授、罗道枢博士以及唐都医院神经外科高昌俊副教授的具体指导和帮助。

(收稿日期: 2012-06-04)

(修订日期: 2012-08-24)