

胃动素受体激动剂对肠肌间神经元内钙的影响

杨侠¹,董蕾¹,杨希恩²(¹西安交通大学医学院第二医院消化科,陕西 西安 710004;²西安市北方医院普外科,陕西 西安 710043)

摘要:目的 探讨胃动素受体激动剂对体外培养大鼠肠肌间神经元内钙的影响。方法 采用免疫荧光标记技术鉴定原代培养的肠肌间神经元;应用钙离子(Ca²⁺)指示剂 Fluo-3/AM 作为细胞内 Ca²⁺ 的荧光探针,对负载培养的神经元,应用激光共聚焦显微镜技术检测胃动素及红霉素引起的单个神经元内 Ca²⁺ 荧光强度(FI)的变化。结果 胃动素和红霉素引起的神经元内 Ca²⁺ 浓度变化为:(1)在 Hank's 液中,胃动素浓度为 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L 时,神经元内 Ca²⁺ 浓度逐渐升高,其峰高(峰值减去静息值)分别为 10.6±2.1、15.9±1.2、30.6±3.7,相邻两组间存在显著性差异(P<0.05)。FI 相对变化百分比分别为(40.1±6.3)%、(63.0±11.2)%、(100.8±18.4)%,相邻两组间存在显著性差异(P<0.05),且呈明显剂量依赖性。(2)在 Hank's 液中,10 μg/ml 红霉素可引起神经元内 Ca²⁺ 浓度升高,其峰高为 23.2±5.6,FI 相对变化百分数为(82.8±13.0)%。(3)当用胃动素受体的抗体孵育后,再加入 10 μg/ml 红霉素,其胞内 Ca²⁺ 浓度的升高几乎完全被抑制。结论 胃动素和红霉素均可引起体外培养肠肌间神经元的功能应答。胃动素可明显升高肠肌间神经元内 Ca²⁺ 浓度,且呈剂量依赖性;红霉素可作用于肠肌间神经元胃动素受体引起胞内 Ca²⁺ 浓度的升高。

关键词:胃动素;胃动素受体;红霉素;肠肌间神经元;钙

中图分类号:R57 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)06-0760-04

Effects of motilin agonists on intracellular calcium mobilization in cultured rat myenteric neurons

YANG Xia¹, DONG Lei¹, YANG Xi-en²

¹Department of Gastroenterology, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ²Department of General Surgery, Xi'an North Hospital, Xi'an 710043, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of motilin agonists on intracellular Ca²⁺ mobilization in primary cultured rat myenteric neurons. **Methods** Motilin-induced and erythromycin-induced intracellular Ca²⁺ signaling was studied in primary cultures of rat myenteric neurons using the radiometric Ca²⁺ indicator Furo3/AM with a laser confocal microscope. **Results** In Hank's solution, 10⁻⁸, 10⁻⁷, and 10⁻⁶ mol/L motilin could elevate intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) to the peak levels of 10.6±2.1, 15.9±1.2, and 30.6±3.7 respectively with their relative percentage change in fluorescent intensity of (40.1±6.3)%, (63.0±11.2)%, and (100.8±18.4)% respectively, indicating the dose-dependent effect of motilin on [Ca²⁺]_i. In Hank's solution, 10 μg/ml erythromycin could induce the elevation of [Ca²⁺]_i to the average peak of 23.2±5.6 with the relative percentage change in fluorescent intensity of (82.8±13.0)%. When pretreated with the antibody against motilin receptor in Hank's solution, the effect of 10 μg/ml erythromycin was almost inhibited completely. **Conclusion** Motilin can increase [Ca²⁺]_i, and erythromycin also has this effect by binding to motilin receptor.

Key words: motilin; motilin receptor; erythromycin; myenteric neuron; Ca²⁺

已知胃动素是调节消化间期胃肠运动至关重要的胃肠激素,其生理作用是依靠胃动素受体来实现的。早期研究证实胃动素在外周可由胃动素受体介导,直接作用于体外培养的结肠平滑肌细胞,使胞内 Ca²⁺ 释放^[1]。近年来的研究发现,中枢神经系统^[2]及肠神经系统^[3]也有胃动素受体的分布,提示胃动素的作

用可能是通过神经通路和对平滑肌的直接作用共同完成的。红霉素及其衍生物被认为是胃动素受体的激动剂,已试用于胃瘫综合症的治疗^[4],为临床提供了一类新型的胃肠道动力药,引起大环内酯类非肽类胃动素受体激动剂(又称胃动内酯)的极大发展。有关肠神经系统胃动素受体方面的报道较少,胃动素和红霉素是否能直接引起肠神经元的功能应答尚未见报道。本实验就此进行研究,期望为胃动素作用的神经通路研究打下基础,并为红霉素治疗胃肠道动力障碍疾病提供理论依据。

收稿日期:2005-10-12

基金项目:国家自然科学基金(30170414)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30170414)

作者简介:杨侠(1977-),女,在读博士研究生,电话:029-81042611,

E-mail:muyirenjia@sohu.com

通讯作者:董蕾,教授,电话:029-87679368, E-mail:doc_donglei@126.com

com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康 1 日龄 SD 大鼠,雌雄不限,购自第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要仪器和试剂 III 型胶原酶、DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司,胰蛋白酶、阿糖胞苷、多聚赖氨酸、神经生长因子(7s-NGF)购自美国 Sigma 公司,小鼠抗 β -III tubulin 单克隆抗体、羊抗小鼠荧光 IgG、Fluo-3/AM 购自美国 Molecular Probe 公司,胃动素购自美国凤凰生物制品有限公司,兔抗胃动素受体多克隆抗体购自美国 ADI 生物制剂公司,红霉素为上海生工生物公司产品,美国 Bio-Rad 公司 MRC-1024 激光共聚焦显微镜。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肠肌间神经元的原代培养 按文献 [5] 的方法培养肠肌间神经元。新生 SD 大鼠 2 只,颈静脉放血处死,取出整段小肠并置于 4 °C D-Hank's 液中,将附带有肠肌神经丛的肠肌层与浆膜层及粘膜层、粘膜下层分离。将肌层剪碎,先在含 0.1% 胰酶的 D-Hank's 液中孵育 20 min,再在含 0.1% III 型胶原酶的 D-Hank's 液中孵育 20 min,离心,弃上清。将沉淀悬浮于 DMEM 培养液中,反复吹打成单细胞悬液,一部分接种于多聚赖氨酸包被过的 24 孔培养板中用作鉴定,一部分直接接种于一种特制的 50 mm 培养皿中(皿下底中央有一直径 1 cm 的小孔,从下方粘贴 1 个盖玻片,玻片上包被有多聚赖氨酸)。每周换 2 次培养液。培养液含 10% 胎牛血清,50 ng/ml 7s-NGF,100 μ g/ml 链霉素,100 U/ml 青霉素,50 μ g/ml 庆大霉素,提高葡萄糖浓度至 30 mmol/L。培养皿置于 37 °C,含 95% O₂、5% CO₂ 的孵箱中。48 h 后加阿糖胞苷以抑制非神经元细胞的增殖。

1.2.2 原代培养的肠肌间神经元的鉴定 培养 5 d 的细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,0.1 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min,1% 牛血清白蛋白封闭 30 min,入小鼠抗 β -III tubulin 单克隆抗体(1:1000),4 °C 过夜。次日入 FITC 标记的羊抗小鼠荧光 IgG(1:300)孵育 2 h。以上各步骤间均用 PBS 充分漂洗,尽量避光,50% 的 PBS 甘油封片。荧光显微镜下观察细胞的免疫组织化学染色情况。对照组不加一抗。

1.2.3 荧光探针 Fluo3/AM 标记细胞内 Ca²⁺ 实验前将各处理组细胞在 D-Hank's 液中清洗 3 次,加入 0.1 ml 10 μ mol/L 的 Fluo3/AM,避光置 37 °C 40 min,然后吸出染液,以 D-Hank's 液清洗 3 次除去培养皿中残余染料,最后加入 D-Hank's 液 0.2 ml 后用于下列各组的各项检测。

1.2.4 胞内钙测量的实验分组及检测方法 (1)胃动素组:将胃动素用 D-Hank's 液稀释为 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L 3 个浓度梯度检测;(2)红霉素组:用 10 μ g/ml 的

霉素(D-Hank's 液稀释)检测;(3)抗胃动素受体多克隆抗体组:预先用抗胃动素受体多克隆抗体(1:50)孵育 10 min 后,加入 10 μ g/ml 的红霉素(D-Hank's 液稀释)进行测量。

测定时将培养皿置于特定载物台上,选取神经元数多、细胞状态好的视野,动态扫描细胞内荧光强度的变化,Fluo3/AM 用 488 nm 光激发,发射波长 522 nm,共聚焦系统由 Bio-Rad 公司提供的软件控制,在 Pentium90 计算机中运行。选取尽可能多的细胞(每组不少于 8 个)进行测试,以平均 FI 变化间接反映细胞内游离钙浓度的相对水平。先检测加药前的 FI 值(静息值),然后加入各组药物,再次测量加药后的 FI 值(峰值)。峰高 = 峰值 - 静息值,代表药物引起的 FI 变化值。FI 相对变化百分数 = 峰高 / 静息值(%),表示以静息值为基数,钙离子浓度变化大小的程度。

1.2.5 数据分析 数据以均值 \pm 标准差表示,统计学分析采用方差分析和 Dunnett *t* 检验 (SPSS10.0 软件),*P* < 0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养肠肌间神经元的生长特点

肠神经元的培养不能完全去除其他非神经元细胞,如胶质细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞。但非神经元细胞胞体扁平,紧贴于培养皿底。相反,神经元胞体相当饱满,呈卵圆形或圆形,周围有明显的光晕,折光性强,突起纤细,柔软,在相差显微镜下很容易区分(图 1、2)。

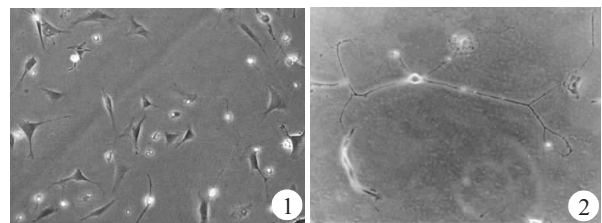


图 1 原代培养第 4 天的肠神经元

Fig.1 Rat myenteric neurons cultured for 4 days

(Original magnification: \times 200)

图 2 原代培养第 12 天的肠神经元

Fig.2 Rat myenteric neurons cultured for 12 days

(Original magnification: \times 200)

2.2 免疫荧光标记组化染色结果

荧光显微镜下,FITC 标记的 β -III tubulin 在 488 nm 波长激光下发绿色荧光,阳性物质位于胞体周边及突起,细胞核不着色(图 3),确定所观察细胞为神经元。阴性对照试验呈阴性反应。

2.3 胃动素对肠肌间神经元内 Ca²⁺ 的影响

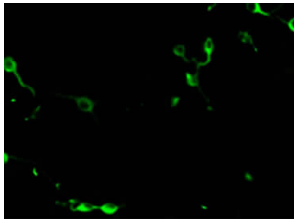


图 3 β -III tubulin 免疫荧光标记原代培养的肠肌间神经元在倒置显微镜下的观察结果
Fig.3 Microscopy of cultured myenteric neurons with β -III tubulin immunofluorescence staining
 (Original magnification: $\times 400$)

将上述用 Fluo3/AM 标记的肠肌间神经元置于 ACAS570 载物台上观察,由于细胞状态的不同,FI 值不同。胃动素可使神经元内 Ca^{2+} 浓度升高(图 4~6)。当胃动素浓度为 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 时,其峰高值逐渐升高,分别为 10.6 ± 2.1 、 15.9 ± 1.2 、 30.6 ± 3.7 ,相邻两组间存在显著性差异($P<0.05$),其 FI 相对变化百分比分别为 $(40.1\pm 6.3)\%$ 、 $(63.0\pm 11.2)\%$ 、 $(100.8\pm 18.4)\%$,相邻两组间也存在显著性差异($P<0.05$),可以看出胃动素对神经元内 Ca^{2+} 浓度的影响呈明显的剂量依赖性。

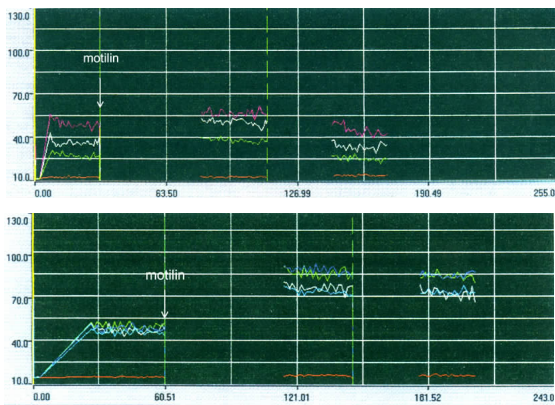


图 5 10^{-7} mol/L 胃动素(Hank's 液稀释)引起胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化
Fig.5 Changes of intracellular Ca^{2+} FI in the neurons induced by 10^{-7} mol/L motilin (in D-Hank's solution)

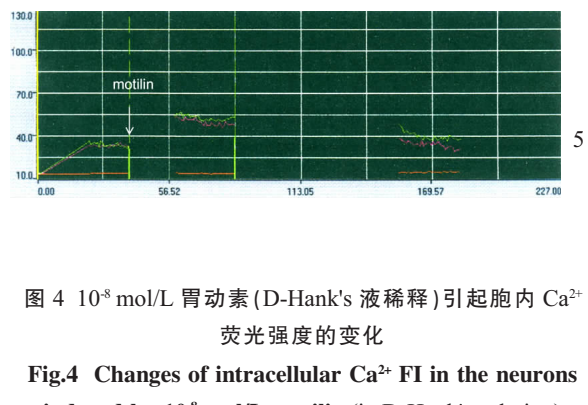


图 4 10^{-8} mol/L 胃动素(D-Hank's 液稀释)引起胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化
Fig.4 Changes of intracellular Ca^{2+} FI in the neurons induced by 10^{-8} mol/L motilin (in D-Hank's solution)

图 6 10^{-6} mol/L 胃动素(Hank's 液稀释)引起胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化

图 6 10^{-6} mol/L 胃动素(Hank's 液稀释)引起胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化
Fig.6 Changes of intracellular Ca^{2+} FI in the neurons induced by 10^{-6} mol/L motilin (in D-Hank's solution)

2.4 红霉素对肠肌间神经元内 Ca^{2+} 的影响

$10 \mu\text{g/ml}$ 的红霉素也可引起神经元内 Ca^{2+} 浓度的升高(图 7),其峰高为 23.2 ± 5.6 ,FI 相对变化百分比为 $(82.8\pm 13.0)\%$ 。

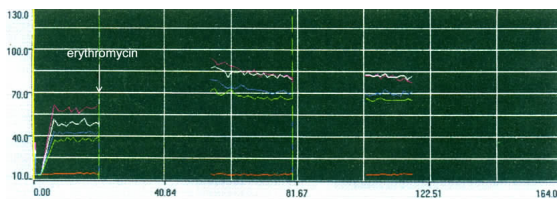


图 7 $10 \mu\text{g/ml}$ 红霉素(D-Hank's 液稀释)引起胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化
Fig.7 Changes of intracellular Ca^{2+} FI in the neurons induced by $10 \mu\text{g/ml}$ erythromycin (in D-Hank's solution)

用抗胃动素受体多克隆抗体在 Hank 液中孵育肠肌间神经元 10 min 后,再加入 $10 \mu\text{g/ml}$ 的红霉素,几乎完全阻断了红霉素升高胞内 Ca^{2+} 的作用(图 8),可间接推断出红霉素是通过作用于胃动素受体引起神经元内 Ca^{2+} 浓度的变化。

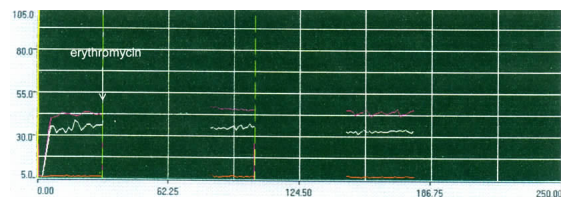


图 8 胃动素受体抗体孵育后, $10 \mu\text{g/ml}$ 红霉素(D-Hank's 液稀释)引起胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化
Fig.8 Changes of intracellular Ca^{2+} FI in the neurons induced by $10 \mu\text{g/ml}$ erythromycin (in D-Hank's solution) after pretreatment with motilin receptor antibody

3 讨论

胃动素是 22 个氨基酸组成的多肽,主要存在于胃肠道的粘膜细胞中。胃动素在消化间期复合肌电(interdigestive myoelectric complex, IMC)的调控中发挥着重要的作用,并能调节胃窦和十二指肠的协调运动。放射自显影等药理学实验表明胃动素的这一作用是通过作用于胃动素受体实现的。1999 年,Feighner 等^[3]克隆并鉴定了一种和促生长激素分泌激素受体

有关的孤儿受体为胃动素受体,并提出胃动素受体至少有神经元和平滑肌两种不同的亚型。以往对胃动素的研究多将研究对象局限于胃肠道平滑肌,有关肠神经系统方面的研究较少。Xu等^[5]应用免疫荧光双标及RT-PCR证实豚鼠结肠肌间神经元上有胃动素受体的高表达。

钙是普遍存在的细胞内第二信使,充当着数不清的生命过程的关键调控者,例如控制细胞生长和分化,保持细胞骨架的完整,膜的兴奋性,胞吐作用,突触活动。钙信号的影响因素包括:(1)细胞外或细胞内钙库的Ca²⁺进入细胞浆;(2)Ca²⁺清除系统:释放至胞外或积聚于内部的钙库;(3)胞浆Ca²⁺的缓冲。这些机制使细胞内Ca²⁺维持在相当低的水平,即使很小的细胞内Ca²⁺变化也可作为一种信号引起明确的生理效应,例如酶的激活或离子通道的开放。很多刺激反应都是通过细胞内Ca²⁺浓度的升高完成的,反之,能引起胞内Ca²⁺浓度升高的物质必定会影响细胞的功能。我们的实验观察了不同浓度胃动素引起原代培养大鼠肠肌间神经元内Ca²⁺浓度的变化。结果显示,胃动素可使肠肌间神经元内Ca²⁺浓度明显升高,且神经元内Ca²⁺浓度的升高在一定范围内与胃动素浓度呈剂量依赖性,各组间比较有统计学意义。本结果证明肠肌间神经元是胃动素作用的靶细胞,这与Xu等^[5]的研究结果具有一致性。我们推测胃动素在调控消化间期胃肠运动的过程中,除了直接作用于胃肠道平滑肌细胞,还可能作为神经递质或神经调质引起肠神经元的功能应答,完成其复杂的生理作用。在后一种作用途径中,神经元内Ca²⁺浓度的精细变化可能发挥着重要作用。胃动素的神经调节机制非常复杂,国内外对神经通路方面的研究都不完善,还没有统一的认识和定论,肠神经元胃动素受体的调节、生理和病理状态下的具体作用均有待进一步研究。

红霉素是一种常用的大环内酯类抗生素,虽然其分子结构与胃动素分子结构有明显差异,但两者电荷分布的空间结构完全一样,所以理论上应能激动相同受体。1984年,Itoh发现红霉素可以诱发与胃动素相似的胃肠收缩活动。1989年,Peeters^[6]提出红霉素是一种胃动素受体激动剂的假说,并用实验证明了在体外可以与胃动素竞争结合受体。Xu等^[7]通过观察胃动素和红霉素对突变胃动素受体的激活作用,发现胃动素和红霉素均通过胃动素受体的第三跨膜区激活

胃动素受体。我们的研究发现,红霉素也能引起肠肌间神经元的功能性应答,其胞内Ca²⁺浓度的升高曲线与胃动素引起的Ca²⁺浓度升高曲线具有相同的走形,但峰高和FI相对变化百分数与不同浓度胃动素组相比均有显著性差异,这可能与其生物学效价不同有关。预先用抗胃动素受体多克隆抗体(1:50)孵育细胞10 min后再加入相同浓度的红霉素进行测量,肠神经元内Ca²⁺浓度的升高几乎被完全阻断,间接证实了红霉素是通过作用于胃动素受体,引起神经元内Ca²⁺浓度的变化。本研究结果提示红霉素等胃动内酯促胃肠动力作用的发挥,除了直接作用于胃肠平滑肌,可能还有肠神经系统的参与,这为进一步研究红霉素治疗胃肠动力障碍疾病开拓了新的思路。

总之,本研究证明胃动素和红霉素均可引起体外培养肠肌间神经元的功能应答。胃动素可明显升高神经元内Ca²⁺浓度,且神经元内Ca²⁺浓度的升高在一定范围内与胃动素浓度呈剂量依赖性;红霉素可作用于神经元胃动素受体引起细胞内Ca²⁺浓度的升高。

参考文献:

- [1] Van Assche G, Depoortere I, Thijs T, et al. Contractile effects and intracellular Ca²⁺ signalling induced by motilin and erythromycin in the circular smooth muscle of human colon[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2001, 13(1): 27-35.
- [2] 刘梅,董蕾,朱文艺.大鼠杏仁核胃动素受体分布及其作用研究[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(9): 1100-5.
Liu M, Dong L, Zhu WY. Distribution and role of motilin receptor in the amygdala of rats[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005, 25(9): 1100-5.
- [3] Feighner SD, Tan CP, McKee KK, et al. Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system[J]. *Science*, 1999, 284(5423): 2184-8.
- [4] Tack J, Janssens J, Vantrappen G, et al. Effect of erythromycin on gastric motility in controls and in diabetic gastroparesis [J]. *Gastroenterology*, 1992, 103(1): 72-9.
- [5] Xu L, Depoortere I, Tomasetto C, et al. Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus[J]. *Regul Pept*, 2005, 124(1-3): 119-25.
- [6] Peeters T, Matthijs G, Depoortere I, et al. Erythromycin is a motilin receptor agonist[J]. *Am J Physiol*, 1989, 257(23): G470.
- [7] Xu L, Depoortere I, Vertongen P, et al. Motilin and erythromycin-A share a common binding site in the third transmembrane segment of the motilin receptor[J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(6): 879-87.

(责任编辑:吴锦雅)