

论著

文章编号:1000-5404(2013)21-2274-04

阿片受体信号调节相关蛋白 RGS4 及 β -arrestin2 在泻剂结肠大鼠结肠中的表达变化

吴劲松^{1,2}, 刘宝华¹, 童卫东¹, 李凡¹, 张安平¹, 付涛¹, 李春穴¹ (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科, 全军便秘诊治中心¹; 050082 石家庄, 白求恩国际和平医院普外二科²)

[摘要] **目的** 探讨泻剂结肠大鼠结肠中阿片受体信号调节相关蛋白 RGS4 和 β -arrestin2 的表达变化及意义。**方法** 7~8 周龄 Wistar 大鼠 16 只, 体质量 (200 ± 20) g, 雌雄各半, 按随机数字表法分为对照组 ($n = 8$) 及泻剂结肠组 ($n = 8$), 饲养环境温度 18~28 °C, 相对湿度 40%~80%。对照组饲以普通软饲料, 泻剂结肠组饲以混有酚酞的饲料, 建立泻剂结肠大鼠模型。通过 RT-PCR 及 Western blot 方法对 RGS4 和 β -arrestin2 在结肠中的表达进行相对定量分析。**结果** 两种阿片受体信号调节蛋白在泻剂结肠组及对照组大鼠结肠内均有不同程度的表达。RT-PCR 结果显示泻剂结肠组 RGS4 和 β -arrestin2 mRNA 相对表达水平均明显高于对照组 [(3.418 3 ± 0.247 4) vs (0.987 6 ± 0.034 1), (2.974 4 ± 0.214 2) vs (0.921 1 ± 0.040 1), $P < 0.01$]。Western blot 检测结果显示 RGS4 和 β -arrestin2 的表达在泻剂结肠组较对照组明显升高 [(0.403 4 ± 0.049 9) vs (0.115 3 ± 0.010 2), (0.913 9 ± 0.061 1) vs (0.467 6 ± 0.043 7), $P < 0.01$]。**结论** RGS4 和 β -arrestin2 在泻剂结肠大鼠结肠中表达均明显增强, 提示其可能增强泻剂结肠大鼠结肠 MOR 信号传导调节功能。

[关键词] 阿片受体; G 蛋白信号调节因子 4; β -抑制蛋白 2; 便秘; 泻剂; 结肠; 表达; 大鼠

[中图分类号] R-332; R394.3; R574.62

[文献标志码] A

Expression profile of RGS4 and β -arrestin 2 in colon of cathartic colon rats

Wu Jinsong^{1,2}, Liu Baohua¹, Tong Weidong¹, Li Fan¹, Zhang Anping¹, Fu Tao¹, Li Chunxue¹ (¹Department of General Surgery, Center of Constipation, Diagnosis and Treatment, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; ²Second Department of General Surgery, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang, Hebei Province, 050082, China)

[Abstract] **Objective** To determine the expression profiles of regulator of G protein signaling-4 (RGS4) and β -arrestin2 in the colon of rats with cathartic colon. **Methods** Twenty Wistar rats of either sex, weighing 200 ± 20 g, were randomly divided into control group ($n = 8$) and cathartic colon group ($n = 8$). Control group were given soft chows, while the rats in cathartic group were given chows premixed with phenolphthalein powder to establish rat model with cathartic colon. RT-qPCR and Western blotting were adopted to detect the expression of RGS4 and β -arrestin2. **Results** Both RGS4 and β -arrestin2 expressed distinctly in the colon of cathartic group and control group. The results of RT-qPCR showed that both RGS4 and β -arrestin2 were expressed more intensively in cathartic colon group than in control group (3.418 3 ± 0.247 4 vs 0.987 6 ± 0.034 1, 2.974 4 ± 0.214 2 vs 0.921 1 ± 0.040 1, $P < 0.01$). The results of Western blot assay showed that RGS4 and β -arrestin2 were expressed more intensively in cathartic colon group than in control group (0.403 4 ± 0.049 9 vs 0.115 3 ± 0.010 2, 0.913 9 ± 0.061 1 vs 0.467 6 ± 0.043 7, $P < 0.01$). **Conclusion** The up-regulated expression of RGS4 and β -arrestin2 in rats with cathartic colon indicate that the 2 proteins may play essential roles in the regulation of signal transduction of opioid receptor.

[Key words] opioid receptor; constipation; regulator of G protein signaling-4; β -arrestin2; cathartic; colon; expression; rats

Supported by the International Cooperation Project of Chongqing (CSTC201110010), the National Natural Science Foundation of China (81100259) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA10061). Corresponding author: Liu Baohua, Tel: 86-23-68757956, E-mail: lbh57268@163.com

[基金项目] 重庆市国际合作计划项目 (CSTC201110010); 国家自然科学基金 (81100259); 重庆市自然科学基金 (CSTC2011jjA10061)

[通信作者] 刘宝华, 电话: (023)68757956, E-mail: lbh57268@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130926.1355.001.html> (2013-09-26)

慢传输型便秘(slow transit constipation,STC)是特发性便秘的严重类型,临床表现为结肠传输功能下降、大便次数减少、腹胀等症状,临床治疗困难。STC病因包括原发性肠道神经及平滑肌功能紊乱、Cajal间质细胞(interstitial cell of Cajal,ICC)变性、自身免疫性疾病、焦虑或抑郁等心理因素、内源性吗啡肽及阿片受体功能异常等,是困扰患者的重度结肠功能障碍性疾病。泻剂结肠(cathartic colon)是STC结肠病理改变的典型表现,其发生原因与STC患者长期服用刺激性泻剂(irritant laxative)导致肠道神经系统及肠壁组织损伤有关。张连阳等^[1]模拟STC患者长期服用刺激性泻剂的特点,建立了大鼠泻剂结肠模型,很好地模拟了STC患者结肠病变的特点,具有重复性强、取材方便、成本低等特点,解决了STC研究所需的标本问题。Li等^[2]也研究证明泻剂结肠大鼠模型可实际应用于STC研究。阿片受体(opioid receptor)在胃肠道广泛表达于肠神经系统^[3],参与对胃肠道生理功能的调节,包括运动方式、胃酸分泌、经上皮细胞的液体流动、改变局部血流、营养物质的消化吸收、与胃肠免疫及内分泌系统相互作用等^[4]。 μ -阿片受体(mu-opioid receptor, MOR)对泻剂结肠平滑肌张力的抑制作用已被证实^[5]。阿片受体属于与G蛋白家族偶联的代谢型膜受体,当阿片受体激活后,随即产生浓度依赖性内吞效应,进入细胞内,通过激活 K^+ 通道、膜超极化、抑制 Ca^{2+} 通道及环磷酸腺苷的生成发挥其生物学效应^[4]。研究表明,RGS-4(regulator of G protein signaling-4)和 β -arrestin2能抑制MOR激活后的细胞内信号传导,从而调节MOR的功能^[6-7]。目前对RGS-4和 β -arrestin2与阿片受体相互作用的研究主要集中在镇痛、药物成瘾性等方面,而对其在便秘患者及泻剂结肠模型动物肠道内变化的研究较少。本实验拟初步对泻剂结肠大鼠结肠中RGS-4和 β -arrestin2的表达水平进行检测,旨在分析泻剂结肠大鼠结肠内阿片受体信号传导通路的变化,希望为便秘治疗的研究提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

7~8周龄Wistar大鼠16只由第三军医大学实验动物中心提供,体质量(200±20)g,雌雄各半,按随机数字表法分为对照组及泻剂结肠组各8只。参照文献^[1]建立模型。各组大鼠单只分笼喂养,饲养环境温度18~28℃,相对湿度40%~80%。对照组饲以普通软饲料,泻剂结肠组饲以混有酚酞的饲料,起始剂量200mg/(kg·d),以后200mg/(kg·d)递增,直至出现半数大鼠粪便变稀,然后每天保持此剂量直至80%的大鼠稀便消失,在此基础上继续给药至半数大鼠粪便变稀。如此循环3次,待最后1次80%的稀便消失1周后停止给药,饲以普通软饲料待处

理。首次腹泻剂量为1200mg/kg,最终药物剂量为3400mg/kg。大鼠禁食24h(自由饮水)后断颈处死,取距回盲部约3cm处长约2cm全层结肠组织,置于-70℃冰箱保存备用。

1.2 主要材料

RGS4(sc-6203)山羊多克隆抗体、 β -arrestin2(sc-13140)鼠单克隆抗体(Santa Cruz,Dalaa,USA),分析纯酚酞(天津方正,批号20120320),Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒,SYBRGreen逆转录试剂盒(TOYOBO,Japan),RNA提取试剂TRNzol,2×PCRMix Taq(北京天根),RIPA裂解液(重庆金麦),蛋白定量仪、PAGE垂直电泳仪、凝胶成像系统、琼脂糖凝胶电泳仪(Bio-Rad),紫外分光光度计(Beckman),PCR仪(ABI)。

1.3 RT-qPCR检测

组织加液氮研碎,总RNA提取使用TRNzol提取试剂,严格按照说明书步骤操作。引物通过Primer Premier 5设计。 β -actin为内参,上游引物:5'-ACCCCGTGTGCTGACCGAG-3',下游引物:5'-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3',片段长度249bp;RGS4上游引物:5'-ATTGGATCCATGTGCAAAGGACTCGACTAGGG-AAG-3',下游引物:5'-ATACTCGAGTTAGGCACACTGAGGGACTAGGGAAG-3',片段长度为198bp; β -arrestin2上游引物:5'-GGGCAACTCAAGCAGCAA-3',下游引物:5'-CCTCGCAAAGTCCTCAAAC-3',片段长度为205bp。逆转录制备cDNA及RT-qPCR反应均在PCR System 7500中进行。2 μ g RNA用于逆转录反应,按照Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒说明进行操作。PCR反应体系:取逆转录的产物cDNA 2 μ L、上下游引物各0.5 μ L、2×PCRMix Taq 10 μ L、ddH₂O 7 μ L,共20 μ L加入RT-PCR扩增反应体系。反应条件:94℃预变性5min,94℃30s,57℃30s,72℃30s,30个循环,最后72℃延伸10min。每个样本取10 μ L按顺序进行琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad凝胶成像仪成像。取逆转录的产物cDNA 2 μ L、上下游引物各0.5 μ L、SYBRGreen 10 μ L、ddH₂O 7 μ L,共20 μ L加入扩增反应体系取逆转录的产物cDNA 2 μ L、上下游引物各0.5 μ L、SYBRGreen 10 μ L、ddH₂O 7 μ L,共20 μ L加入RT-qPCR扩增反应体系。反应条件:94℃预变性5min,94℃30s,57℃30s,72℃30s,40个循环,最后72℃延伸10min。结果以对内参 β -actin相对表达倍数表示。

1.4 Western blot检测

在液氮中研磨结肠组织成微末,收集适量(50~80mg)置于EP管中,每管加适量(100 μ L/10mg)RIPA蛋白裂解液。冰上裂解20~30min,低温离心(4℃,12000r/min,15~20min)。取上清,BCA法测浓度。蛋白样品行SDS-PAGE电泳分离并转至PVDF膜。依次洗膜后一抗孵育稀释,4℃过夜。转至室温摇置30min。TBST洗膜3次,每次10min。根据一抗加二抗,摇床摇2h。TBST洗膜3次,每次10min。 β -actin蛋白作为内参。Bio-Rad凝胶成像系统成像。结果以各受体与 β -actin电泳条带灰度值比值表示。

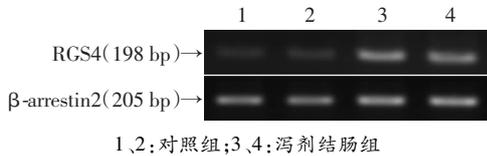
1.5 统计学分析

Quantity One软件处理Western blot及RT-qPCR图片,采集各条带光密度值,以目的条带与内参条带光密度的比值作为相对表达量,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 21.0统计软件,组间差异行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 2组大鼠结肠中RGS4及β-arrestin2 mRNA的表达

RT-qPCR结果显示RGS4及β-arrestin2 mRNA在2组大鼠结肠中均有表达(图1),且在泻剂结肠组大鼠结肠内表达均较对照组明显增高($P < 0.01$,表1)。



1,2:对照组;3,4:泻剂结肠组

图1 RT-qPCR检测RGS4与β-arrestin2 mRNA在2组大鼠结肠中的表达

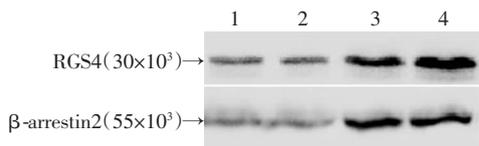
表1 RT-qPCR检测RGS4及β-arrestin2 mRNA表达($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	RGS4	β-arrestin2
对照组	0.987 6 ± 0.034 1	0.921 1 ± 0.040 1
泻剂结肠组	3.418 3 ± 0.247 4 ^a	2.974 4 ± 0.214 2 ^a

a: $P < 0.01$,与对照组比较

2.2 2组大鼠结肠中RGS4及β-arrestin2蛋白的表达

Western blot检测结果显示RGS4及β-arrestin2蛋白在泻剂结肠及正常大鼠结肠中的表达变化与mRNA情况基本一致,RGS4和β-arrestin2在泻剂结肠组表达均明显高于对照组($P < 0.01$,图2、表2)。



1,2:对照组;3,4:泻剂结肠组

图2 Western blot检测RGS4及β-arrestin2蛋白在2组大鼠结肠中的表达

表2 Western blot检测RGS4及β-arrestin2蛋白表达($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	RGS4	β-arrestin2
对照组	0.115 3 ± 0.010 2	0.467 6 ± 0.043 7
泻剂结肠组	0.403 4 ± 0.049 9 ^a	0.913 9 ± 0.061 1 ^a

a: $P < 0.01$,与对照组比较

3 讨论

阿片受体与便秘的关系因阿片类药物的广泛应用而引起人们关注。早在公元1世纪,罗马帝国的 Pedanius Dioscorides 医师就详细描述了从罂粟中提取的阿片类制剂所具有的镇静及麻醉作用^[8]。阿片还被用于治疗痢疾导致的腹泻^[9]。研究发现,吗啡能抑制离体豚鼠回肠乙酰胆碱的释放,从而影响肠道平滑肌的收缩^[9]。进一步的电生理研究发现,阿片类制剂能明显抑制肠神经网络的功能^[10]。在当代,阿片类药物被广泛用于治疗中-重度慢性疼痛。在长期使用阿片类药物进行非肿瘤性疼痛治疗的患者中,约40%的患者有过便秘,而对照组发生便秘的患者仅7.6%;在需要

使用泻剂进行治疗的便秘患者中,仅46%达到满意的疗效^[11]。王金羊等^[12]发现,泻剂结肠大鼠结肠内MOR表达量明显增加。以上研究结果均提示阿片受体在慢传输型便秘的病程中起着不可忽视的作用。

阿片受体属于G蛋白偶联受体家族(GPCRs)。静息状态下,G蛋白由α-GDP亚基、β-亚基及γ-亚基组成,并与受体细胞膜内区域结合。当受体激活时,G蛋白与受体解离,α-GDP亚基转换为α-GTP亚基,并与β-、γ-亚基分离,分别与中下游的胞内信号蛋白相互作用,引起生理反应。α-GTP亚基具有GTP水解酶活性,可将其结合的GTP水解为GDP,形成α-GDP亚基并与β-、γ-亚基重新结合,终止胞内信号传导。RGS4与α-GTP亚基结合后能显著增强其GTP水解酶活性,加快胞内信号传导的终止^[13]。研究表明,G蛋白与阿片受体激活后的各种阿片样反应密切相关,包括止痛、欣快感、便秘及呼吸抑制等^[14]。Wang等^[6]研究发现,阿片激动剂可抑制RGS4的蛋白表达,从而增强阿片受体信号的传导作用。Garnier等^[15]研究发现,在痛觉过敏的动物模型中,RGS4 mRNA表达量明显增高,对吗啡敏感性明显降低,RGS4的过表达能明显降低MOR活性。

β-arrestin2属于arrestin蛋白家族,广泛表达于各组织,在脑和脾中最为丰富。β-arrestin2对阿片受体胞内信号传导的调节主要通过以下途径。首先,β-arrestin2结合在与激动剂结合并被磷酸化的阿片受体和同源性G蛋白间,终止G蛋白效应器的信号传导;β-arrestin2-受体复合物作为衔接蛋白,与胞内网格蛋白(clathrin)内吞小泡结合并进入泡内,实现对受体的“隔离”;进入泡内的受体或快速与β-arrestin2脱离并去磷酸化,再循环回细胞膜参与下一轮信号传导,或与β-arrestin2形成稳定复合物,在泡内累积并被分解^[16]。Kirsten等^[17]发现,β-arrestin2基因敲除小鼠对吗啡的敏感性明显增强,且较少产生耐受性,表明β-arrestin2对阿片受体信号传导起着重要的调节作用。

本研究发现作为MOR受体信号传导负向调节因子的RGS4及β-arrestin2在泻剂结肠组大鼠结肠中的表达均较对照组明显升高($P < 0.01$)。Zhang等^[18]研究发现,β-arrestin2过表达能使阿片受体产生快速脱敏(desensitization)和内吞效应(internalization)。阿片受体信号传导调节机制复杂,包括受体的脱敏、转运、内吞、泛素化(ubiquitination)、受体-受体低聚体形成(receptor-receptor oligomers)、受体-胞内蛋白复合物形成(receptor-cellular protein complexes)及G蛋白磷酸化等^[19]。这些复杂机制的综合作用,产生对阿片受体信号传导的调节效应。β-arrestin2在阿片受体细胞内的转运、内吞及降解方面起着重要的调节作用,而RGS4

的功能则表现在G蛋白磷酸化的过程中,二者在泻剂结肠大鼠结肠内表达上调,提示其对阿片受体信号传导功能的调节发挥着重要作用。

综上所述,本研究显示RGS4及 β -arrestin2在泻剂结肠大鼠结肠内表达上调明显,提示二者可能在泻剂结肠MOR信号传导调节过程中起着重要的调节作用。如对泻剂结肠或慢传输型便秘阿片受体信号传导调节机制进行深入的研究,发现信号调节的关键节点,可能为慢传输型便秘的治疗从细胞信号传导方面提供新的思路。

参考文献:

[1] 张连阳,高峰,童卫东,等.大鼠泻剂结肠模型的建立[J].世界华人消化杂志,1998,6(10):864-866.

[2] Li H Y, Yan X, Xue Q L, et al. Effects of nociceptin/orphanin FQ on rats with cathartic colon[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 141-145.

[3] Poole D P, Pelayo J C, Scherrer G, et al. Localization and regulation of fluorescently labeled delta opioid receptor, expressed in enteric neurons of mice[J]. Gastroenterology, 2011, 141(3): 982-991. e1-e8.

[4] Furness J B. The Enteric Nervous System[M]. Oxford: Blackwell, 2006: 132-198.

[5] Liu B H, Mo P, Zhang S B. Effects of mu and kappa opioid receptor agonists and antagonists on contraction of isolated colon strips of rats with cathartic colon[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(11): 1672-1674.

[6] Wang Q, Traynor J R. Opioid-induced down-regulation of RGS4: role of ubiquitination and implications for receptor cross-talk[J]. J Biol Chem, 2011, 286(10): 7854-7864.

[7] Bohn L M, Gainetdinov R R, Lin F T, et al. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence[J]. Nature, 2000, 408(6813): 720-723.

[8] Holzer P, Lembeck F. Analgesia up to the twentieth century[M]//Parnham M J, Bruinvels J, ed. Discoveries in Pharmacology. Psycho-

and Neuro-pharmacology. Amsterdam: Elsevier, 1983: 357-377.

[9] Holzer P. Opioid receptors in the gastrointestinal tract[J]. Regul Pept, 2009, 155(1/3): 11-17.

[10] Wood J D, Galligan J J. Function of opioids in the enteric nervous system[J]. Neurogastroenterol Motil, 2004, 16(Suppl 2): 17-28.

[11] Camilleri M. Opioid-induced constipation: challenges and therapeutic opportunities[J]. Am J Gastroenterol, 2011, 106(5): 835-842.

[12] 王金羊,严祥,段丽君,等.内啡肽及 μ 阿片受体mRNA在“泻剂结肠”大鼠结肠神经丛中的表达及意义[J].中国老年学杂志,2008,28(15):1475-1477.

[13] Welsby P J, Kellett E, Wilkinson G, et al. Enhanced detection of receptor constitutive activity in the presence of regulators of G protein signaling: applications to the detection and analysis of inverse agonists and low-efficacy partial agonists[J]. Mol Pharmacol, 2002, 61(5): 1211-1221.

[14] Clark M J, Furman C A, Gilson T D, et al. Comparison of the relative efficacy and potency of mu-opioid agonists to activate Galpha(i/o) proteins containing a pertussis toxin-insensitive mutation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317(2): 858-864.

[15] Garnier M, Zaratini P F, Ficalora G, et al. Up-regulation of regulator of G protein signaling 4 expression in a model of neuropathic pain and insensitivity to morphine[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(3): 1299-1306.

[16] Shenoy S K, Lefkowitz R J. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction[J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32(9): 521-533.

[17] Raehal K M, Walker J K, Bohn L M. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 314(3): 1195-1201.

[18] Zhang J, Ferguson S S, Barak L S, et al. Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(12): 7157-7162.

[19] Law P Y, Loh H H. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology[M]. Berlin: Springer, 2006: 357-389.

(收稿:2013-08-14;修回:2013-09-23)

(编辑 龙亮)

(上接 2269 页)

2 讨论

Goltz-Gorlin 综合征是一种少见的中、外胚层起源的多器官先天异常。而泪道系统为外胚层起源。在胚胎发育过程中,外胚层组织在外侧鼻突和上颌突之间下陷成沟,逐渐发育成近端的泪小管、泪囊和远端的鼻泪管^[5]。先天性鼻泪管阻塞多由于鼻泪管系统局部结构发育异常导致。表面上皮外胚层脊的分隔不全和内陷的外胚层异常出芽造成了永久性的异常泪小点和泪小管。泪道系统缺陷和 Goltz-Gorlin 综合征均与外胚层胚胎发育异常相关。这表明并发的多泪道系统缺陷可能是 Goltz-Gorlin 综合征的亚型之一,这一点仍需更多的相似病例支持。该病例报道拓宽了我们对于泪道系统异常的诊断思路,证明了外科手术对改善其局部症状的有效性,但对于多系统异常的改善仍需进一步的基因治疗研究。

参考文献:

[1] Wang L, Jin X, Zhao X, et al. Focal dermal hypoplasia: updates[J]. Oral Dis, 2013, Epub ahead of print.

[2] Murakami C, de-Oliveira-Lira-Ortega A, Guimaraes A S, et al. Focal dermal hypoplasia: a case report and literature review[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011, 112(2): e11-e18.

[3] Maas S M, Lombardi M P, van-Essen A J, et al. Phenotype and genotype in 17 patients with Goltz-Gorlin syndrome[J]. J Med Genet, 2009, 46(10): 716-720.

[4] Martin-Scott I. Congenital focal dermal hypoplasia[J]. Br J Dermatol, 1965, 77: 60-62.

[5] Paulsen F. Anatomy and physiology of efferent tear ducts[J]. Ophthalmologie, 2008, 105(4): 339-345.

(收稿:2013-06-28;修回:2013-08-13)

(编辑 栾嘉)