

神经肽受体 Y5 亚型在大鼠胃的表达

王志刚* 郑起 秦新裕¹ 周燕南²

(上海交通大学附属第六人民医院普外科, 上海 200233; ¹ 复旦大学附属中山医院普外科, 上海 200032;

² 复旦大学附属中山医院病理科, 上海 200032)

摘要 应用 RT-PCR、Western 印迹和免疫组化技术研究神经肽受体亚型 Y5 在正常大鼠和胃轻瘫大鼠胃的表达, 并进行组织学定位。发现 Y5 受体在大鼠胃存在着表达, 主要表达定位在胃窦的黏膜层, 可能与胃动力的调控有关。半定量分析显示胃轻瘫大鼠较正常大鼠表达水平下调。

关键词 神经肽; 受体亚型; 胃动力

神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 是哺乳动物脑内广泛分布的一种神经递质, 它参与了多种重要的生理过程的调节, 如摄食、胃肠道分泌、血压调节、记忆、生物节律等。目前已经克隆了 NPY 的 5 个受体亚型: Y1、Y2、Y4、Y5 和 Y6, 其中 Y5 亚型是近年从大鼠下丘脑克隆成功的^[1]。研究发现 Y5 受体可能参与了摄食行为的调节^[2]。在胃肠动力方面的研究结果还提示这一受体可能与胃动力的调控也有一定关系。但有关该受体在外周靶器官的研究报道很少。本实验主要研究该受体在大鼠胃中是否存在表达, 及其组织学定位, 并结合其他相关研究结果, 分析该受体在大鼠胃存在的意义。

1 材料与方

1.1 大鼠胃标本准备

Sprague-Dawley(S-D)大鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。参考以前的研究结果, 我们曾经制备了 STZ 胃轻瘫 S-D 大鼠的模型。随机选取正常和成模的胃轻瘫 S-D 大鼠各 5 只(上述 10 只大鼠在造模前也是随机入组的)。处死该大鼠, 切取胃标本, 分为胃底、胃体、胃窦, 每例标本分别置于液氮冷冻保存和石蜡包埋。

1.2 大鼠胃窦组织 Y5 受体的 Western 印迹检测

在冰浴中, 将液氮冷冻的大鼠胃窦组织块用匀浆器研碎匀浆, 加入细胞膜裂解液 II(参照《分子克隆使用手册》第三版配制)裂解大鼠胃窦组织, 4 °C 旋转 3 h。然后同上用 4 号针头抽打, 1500 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取上清液, 4 °C 100 000 g 超速离心 30 min, 弃上清液, 加入膜裂解液 II 溶解沉淀, 即为待检测之膜蛋白, 即大鼠胃窦组织膜

蛋白^[3]。

然后用 Bradford 法进行蛋白质定量。取等量膜蛋白, 加上样缓冲液上样, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜, 牛奶封闭后分别上一抗(Y5 多抗由美国 Oregon Health Sciences University K.L.Grove 博士惠赠)和二抗(羊抗兔生物素化二抗), 然后 ECL 显色法观察有无特异性条带出现, 如果杂交膜上显示阳性条带, 用洗脱缓冲液(50 °C)洗涤硝酸纤维素膜 30 min, 洗去抗体, 然后用同样的方法进行免疫印迹, 显示相应的 β -肌动蛋白条带, 以此作为样本蛋白表达水平的内参照。X 线片上的条带用图像分析系统(上海复日科技有限公司)读其密度值, 并进行半定量分析。以目的条带密度值/ β -肌动蛋白条带密度值的比值来纠正上样量的偏差。用密度比值的高低表示 Y5 受体量的多少, 比较胃的不同部分表达丰度。

1.3 免疫组织化学检测大鼠胃组织中 Y5 受体的表达及定位

取大鼠胃石蜡包埋标本, 应用间接免疫组化染色法行免疫组织化学检测。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。每个标本切 10 μ l 厚的石蜡组织切片, 置于 80 °C 烤箱内 30 min 烤干, 经二甲苯脱蜡和抗原修复, 然后进行免疫组化染色。将稀释好的一抗 100 μ l 滴加于切片组织上, 置切片于湿盒内, 过夜; PBS 液洗 3 次, 每次 2 min, 擦去样品周围的液体; 加 100 μ l 稀释好的羊抗兔生物素化二抗, 置切片于湿盒内, 室温下 30 min; PBS 液洗 3 次,

收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-01-31

国家自然科学基金资助项目 (No.30070738)

* 通讯作者。Tel: 021-64369181-8410, E-mail: surlab@hotmail.com

每次 2 min, 擦去样品周围的液体; 加 400 μ l DAB 溶液至切片上, 室温下 10 min; 除去 DAB 溶液, 蒸馏水洗 3 次; 苏木素复染; 逐级脱水, 烘干, 封片。

1.4 Y5 受体 mRNA 的 RT-PCR 半定量检测

选择胃窦组织为研究对象。抽提大鼠胃窦的总 RNA, 用 Dnase I 处理后反转录成 cDNA 第一链, PCR 扩增 Y5 受体, 以 β -肌动蛋白作为内参照。引物序列参考文献[4]: NPY-Y5 上游引物为 5'-CCAGGCAAAAACCCCCAGCAC-3', 下游引物为 5'-GGCAGTGGATAAGGGCTCTCA-3', 扩增长度 524 bp; β -肌动蛋白上游引物为 5'-AAGAGAGGCA-TCCTCACCT-3', 下游引物为 5'-TACATGGCTG-GGGTGTGAA-3', 扩增长度 218 bp。所有引物由上海基康生物技术有限公司合成。

50 μ l PCR 扩增体系包含等体积的 cDNA、每对引物、2.5 U Hotstar polymerase(Qiagen)。通过预实验绘制扩增曲线确定每个基因理想的循环数, 保证扩增终止在扩增曲线的线形上升期而未达平台期, 以保证扩增后的分子数与起始分子数呈线性关系。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 64 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 28(Y5)/25(β -肌动蛋白)个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 10 μ l PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。为排除样品中基因组 DNA 的污染, 用 Rnase 处理的 RNA 和 ddH₂O 为模板进行扩增, 作为阴性对照。用凝胶扫描软件(上海复日生物技术有限公司)对电泳条带进行密度定量, 以每个样品中靶片段与同一样品中的 β -肌动蛋白电泳条带密度的比值进行统计分析。

1.5 统计学处理

所有数据以均数士标准差表示, 统计学处理采用 *t* 检验(ANOVA, SPSS 11.0, SPSS Inc)。 $P < 0.05$ 作为有统计学意义判定标准。

2 结果

2.1 Western 印迹和免疫组化鉴定(定性和定位)

在大鼠的膜蛋白组织中, 应用 Western 印迹定性检测到了 Y5 受体只在胃窦部分的膜蛋白组织中表达, 而胃体仅有微弱表达, 胃底幽门部分的膜蛋白组织未见有表达, 见图 1。从免疫组化的染色可以看出, 该受体的表达主要定位在胃窦, 而且主要在黏膜上皮层细胞, 胞膜和胞浆都有阳性染色, 见图 2。

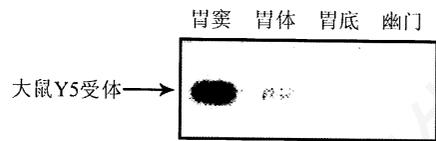


图 1 Western 印迹检测大鼠胃 Y5 受体的表达



图 2 免疫组化检测 Y5 受体在大鼠胃窦的表达(HE \times 200)

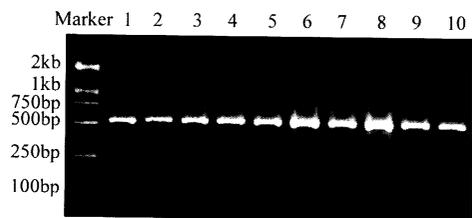


图 3 大鼠胃窦 Y5 受体 RT-PCR 检测

1~5 为胃轻瘫组, 6~10 为正常组。

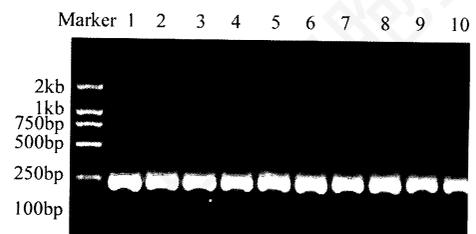


图 4 RT-PCR 检测大鼠胃窦中 β -肌动蛋白的表达

1~5 为胃轻瘫组, 6~10 为正常组。

2.2 RT-PCR 扩增(半定量)

成功扩增了 Y5 受体基因的 524 bp 的片段, 见图 3。内参照 β -肌动蛋白的表达见图 4。将两组大鼠 RT-PCR 的电泳条带进行半定量, *t* 检验统计分析显示有统计学差异, 即胃轻瘫组大鼠胃组织中的 Y5 受体的 mRNA 的表达水平低于正常大鼠组, $P = 0.02$ 。

3 讨论

我们以往研究中发现, 临床应用红霉素治疗胃轻瘫时, 发现红霉素的疗效具有显著的个体差异。

通过研究红霉素对糖尿病胃瘫大鼠胃排空的作用, 用基因芯片初步筛选与红霉素促动力作用易感性相关的 10 个候选基因^[5]。在这 10 个基因中, 我们选取理论上可能与胃动力有一定关系的神经肽受体亚型 Y5 做进一步研究。

神经肽 Y 具有调节消化系统某些生理过程的功能, 因此实际上是一种脑肠肽。已知脑肠肽大都是通过受体而发挥其生理调节作用的, 而且多数具有神经受体和平滑肌受体两种亚型, 即在靶器官多数有特异性的受体与配基结合。研究提示它发挥这一作用可能是通过 Y1 和 Y5 两种受体亚型, 但关于 Y5 受体亚型的参与, 一直是研究的热点和争论的焦点。有作者报告, 应用 Y5 受体基因的反义寡核苷酸可以显著抑制 Y5 受体激动剂所介导的大鼠的摄食行为; 动物实验表明应用 Y5 受体特异性的拮抗剂 GW438014A 可以抑制动物的摄食行为并明显减轻体重^[6]; 甚至有作者认为该类拮抗剂有望开发成为一类减肥药^[7]; 然而意外的是 Y5 基因剔除的小鼠并未表现出摄食行为的显著减弱和体重的改变^[8]。我们认为, 目前关于 Y5 受体的研究大都是局限于中枢神经系统, 如果将视野拓展到外周靶器官, 也许会对回答这一争议问题提供新的证据。那么胃肠道是否具有神经肽的 Y5 受体呢?

本实验通过多种方法从 mRNA 和蛋白质水平都证实了 NPY Y5 受体在大鼠胃的表达, 尤其在胃窦的黏膜上皮细胞高表达。这与我们的另一项研究结果是一致的: 我们应用基因芯片同样在大鼠的胃壁发现了 Y5 受体的存在和相似的组织分布, 并提示 Y5 高表达组大鼠对大环内酯类药物促动力作用的反应较低表达组敏感^[5]。

本实验通过对 RT-PCR 半定量结果统计分析, 显示 Y5 受体在胃轻瘫组大鼠的表达较正常组大鼠下调, 这进一步提示该受体具有参与胃动力调控的可能性。近年来研究发现, 某些胃动力相关肽受体表达状态的改变的确影响了胃肠动力的改变, 例如降钙素基因相关肽(CGRP)受体缺失的大鼠胃动力明显减退, 胆囊收缩素(CCK)受体表达下调的大鼠对 CCK 缺乏反应等。但胃轻瘫模型鼠为何会出现该受体的表达下调, 尚需进一步研究。

已知胃的动力主要依赖胃窦平滑肌的收缩和幽门括约肌的协调运动, 而数种脑肠肽及其受体已被证实参与了这个过程的调控, 例如 CCK, 胃动素(motilin), CGRP^[9]等, 提示这一过程可能是多种递质共同调控的, 每种递质可能通过其特异性的受体亚型在其中某一环节上起了调控作用, 至于不同递质的分工和相互间的关系是否具有协同作用目前还是未知数。如上所述, 有研究提示 Y5 受体参与了摄食行为的调控, 摄食行为是一种受中枢调控的活动, 而外周靶器官的生理反馈机制是导致中枢活动的重要原因, 比如胃的排空、血糖的变化、视觉和嗅觉的刺激等都可能引起摄食行为的改变。胃动力的状态可以通过中枢系统影响动物的摄食行为。所以我们猜测, Y5 受体很有可能是通过介导胃的动力调节而参与了摄食行为的调控。

但是胃的平滑肌细胞未显示 Y5 受体的阳性着色, 似乎难以解释。文献报告也有类似的发现: Feighner 等^[10]通过分子生物学方法首次克隆并证实了胃动素受体在胃的表达, 也未能证实平滑肌细胞上该受体的存在, 而事实上此前有大量药理学实验证明了这一受体存在神经受体和平滑肌受体两种亚型。而且胃动素受体仅存在于胃的黏膜上皮层, 不能排除该受体参与其他生理活动的可能性, 如胃酸的分泌等。我们推测, 神经肽的生物学效应可能是通过旁分泌作用发挥的, 调节细胞和靶细胞之间具有特异的细胞-细胞联系的结构, 是介于内分泌和神经分泌之间的过渡调节方式。这需要设计新的实验加以证实或否定。

参考文献 (References)

- [1] Coppola JD et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, **287**: R69
- [2] Lecklin A et al. *Br J Pharmacol*, 2003, **139**: 1433
- [3] Mercer LD et al. *Neurosci Lett*, 1997, **225**: 97
- [4] Goumain M et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **247**: 52
- [5] Qin XY et al. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 2003, **35**: 811
- [6] Daniels AJ et al. *Regul Pept*, 2002, **106**: 47
- [7] Levens NR et al. *Curr Opin Investig Drugs*, 2003, **4**: 1198
- [8] Kanatani A et al. *Endocrinology*, 2000, **141**: 1011
- [9] L'Heureux MC et al. *Peptides*, 2000, **21**: 425
- [10] Feighner SD et al. *Science*, 1999, **284**: 2184

Expression of Neuropeptide Y5 Receptor in Rat Stomach

Zhi-Gang Wang*, Qi Zheng, Xin-Yu Qin¹, Yan-Nan Zhou²

(Department of General Surgery, Shanghai Jiaotong University Affiliated No.6 Hospital, Shanghai 200233, China;

¹Department of General Surgery, Fudan University Affiliated Zhongshan Hospital, Shanghai 200032, China;

²Department of Pathology, Fudan University Affiliated Zhongshan Hospital, Shanghai 20032, China)

Abstract We investigated mRNA and protein expression of Y5 receptor in the stomach of normal and gastroparetic rats by using RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry methods. NPY-Y5 receptor expression was found mainly in the epithelial cells of rat antrum, and the expression level was down-regulated in gastroparetic rats as compared to normal rats. The results indicate that NPY-Y5 receptor is possibly involved in the regulation of gastric motility.

Key words neuropeptide; receptor; gastric motility

Received: December 27, 2004 Accepted: January 31, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30070738)

*Corresponding author. Tel: 86-21-64369181-8410, E-mail: surlab@hotmail.com