

μ 型阿片类受体高表达对血管内皮细胞增殖及迁移影响的研究

姚 力¹, 辛伽伦¹, 张娟利¹, 刘 清¹, 郭 强¹, 张 霞^{1*}

¹西电集团医院神经内科, 陕西省引进国外智力示范基地 陕西省西安

【摘要】目的 研究 μ 型阿片类受体 (Mu opioid receptors, MOR) 高表达对血管内皮细胞增殖及迁移的影响。**方法** 收集颅内动脉狭窄 (intracranial arterial stenosis, ICS) 大鼠模型颅内狭窄动脉及侧支动脉, 提取蛋白并通过 Western blotting 法检测 MOR 的表达; 利用质粒高表达 MOR, 通过微管形成实验、集落形成实验、Transwell 实验观察血管内皮细胞增殖及迁移情况。**结果** Western blotting 显示: 与正常对照组相比, ICS 大鼠侧支中 MOR 表达显著升高。微管形成实验显示与对照组相比, MOR 高表达组显著促进了血管内皮细胞的微管形成。血管内皮细胞集落形成实验表明与对照组相比, MOR 高表达组显著促进了血管内皮细胞增殖。Transwell 实验证实与对照组相比, MOR 高表达组显著促进了血管内皮细胞的迁移。**结论** ICS 大鼠的侧支动脉中 MOR 高表达, MOR 表达升高可显著促进血管内皮细胞的增殖及迁移。

【关键词】 μ 型阿片类受体; 血管内皮细胞; 颅内动脉狭窄; 侧支循环

【基金项目】 陕西省自然科学基金基础研究计划一般项目 (2024JC-YBMS-781); 环球医疗集团 2022 年度科研扶持基金 (UM0122002)

【收稿日期】 2024 年 6 月 4 日 **【出刊日期】** 2024 年 7 月 5 日 **【DOI】** 10.12208/j.jmbr.20240006

Effect of μ-type opioid receptor on proliferation and migration of vascular endothelial cells

Li Yao¹, Jialun Xin¹, Juanli Zhang¹, Qing Liu¹, Qiang Guo¹, Xia Zhang^{1*}

¹Department of neurology, Shaanxi Province introduced foreign intelligence demonstration base, XD Group Hospital, Xi'an, Shaanxi

【Abstract】Objectives: Study the effects of high expression of Mu opioid receptors (MOR) on the proliferation and migration of vascular endothelial cells. **Methods:** Collect intracranial stenotic arteries and collateral arteries from intracranial arterial stenosis (ICS) rat model, extract proteins and detect the expression of MOR through Western blotting method; use plasmid to highly express MOR, and conduct microtubule formation experiments. Colony formation assay and Transwell assay were used to observe the proliferation and migration of vascular endothelial cells. **Results:** Western blotting showed that MOR expression in the collateral branches of ICS rats was significantly increased compared with the normal control group. The microtubule formation experiment showed that compared with the control group, the MOR high expression group significantly promoted the formation of microtubules in vascular endothelial cells. The vascular endothelial cell colony formation experiment showed that compared with the control group, the MOR high expression group significantly promoted the proliferation of vascular endothelial cells. Transwell experiments confirmed that compared with the control group, the MOR high expression group significantly promoted the migration of vascular endothelial cells. **Conclusion:** MOR is highly expressed in the collateral arteries of ICS rats, and increased MOR expression can significantly promote the proliferation and migration of vascular endothelial cells.

【Keywords】 Mu opioid receptors (MOR); vascular endothelial cells; intracranial artery stenosis; collateral circulation

*通讯作者: 张霞

颅内动脉狭窄(ICS)是一种常见的血管病理变化, 斑块形成、血管内膜增厚等可引起血管内径缩小、血管狭窄, 也可能导致血管闭塞^[1]。由于颅内动脉狭窄的存在, 脑血流量降低, 狭窄位置易形成血栓, 或是出现斑块脱落性栓塞等。流行病学研究显示, 在美国约有 10% 的缺血性卒中是由颅内动脉狭窄引起, 在亚洲一些国家, 这个数据接近 50%。侧支循环建立对颅内动脉重度狭窄或者闭塞患者的临床症状及预后至关重要, 但是颅内动脉侧支循环的形成机制目前仍不明确^[2-4]。 μ 型阿片类受体(MOR)是 G 蛋白偶联的受体, 既往研究表明, MOR 受体对于调控机体血管舒缩具有重要作用, 其机制主要涉及对神经系统(神经元氧/能量代谢、交感/副交感神经张力等)的调控^[5,6]。近期的研究还发现, 在外周动脉的内皮细胞及平滑肌细胞表达有 MOR, 并具有促进钙离子内流的作用^[7]。研究还证实 MOR 能调节内皮细胞的增殖和迁移, 进一步表明阿片类药物及受体信号在调节血管功能中的重要作用^[8]。为此, 本实验设计探讨 MOR 高表达是否对血管内皮细胞的增殖及迁移有影响作用。

1 材料与方法

1.1 材料

抗体购置于 Biolegend 公司; pcDNA3.1-FLAG-MOR 质粒, Lipofectamine® 2000 转染试剂等购置于 Thermo Fisher Scientific; 实验动物购于西安交通大学医学部实验动物中心, 所有动物均饲养于西安交通大学医学部 SPF 级动物房, 饲养条件和实验方案均参考《实验动物护理原则》。该实验已获得西安交通大学医学部伦理管理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 ICS 大鼠模型制备

参考线栓法制备大脑中动脉栓塞大鼠模型: 4% 异氟烷诱导麻醉大鼠, 1.5% 异氟烷维持麻醉。将大鼠固定后, 颈正中切口, 分离皮下组织, 充分暴露右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉, 结扎大鼠颈外动脉远心端, 在颈外动脉距离颈总动脉 2~3 mm 处用 4 号缝合线打一虚结, 血管夹夹闭颈总动脉和颈内动脉。用眼科剪在颈外动脉结扎处和虚结之间剪一小口, 插入栓线, 系紧虚结, 松开动脉夹, 无出血后, 剪断颈外动脉, 将栓线从颈内动脉送至大脑中动脉起始处, 插入深度为 18 mm, 同时有轻微阻力感。

之后缝合、消毒。90 min 后将栓线撤出恢复灌注。假手术组仅充分暴露右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉, 但不插入栓线。手术后, 将大鼠置于保温箱监测 2.5 h。在麻醉后给予青霉素 5 万 U 单次肌肉注射以预防感染。4 周后处死大鼠, 生理盐水及 4% 多聚甲醛前后心脏灌流后取出颅脑。

1.2.2 Western Blotting

收集 ICS 组及假手术对照组大鼠颅内狭窄动脉及侧支动脉, 提取蛋白, 测定蛋白浓度后, 制备蛋白样品; 然后依次进行制胶, 上样, 电泳, 转膜, 封闭; 孵育一抗(1:1000 稀释), 4℃过夜; 孵育二抗(1:500 稀释)室温 1h; 最后充分洗膜后, 配置好化学发光液滴至膜表面反应 2 分钟后放入化学发光仪内显影, 采集图片。

1.2.3 构建稳定高表达 MOR 的血管内皮细胞系

应用 Lipofectamine® 2000 转染试剂(Life Technologies)转染 pcDNA3.1-FLAG-MOR 质粒至 HUVEC 及 HMEC 细胞中, 48 小时后利用新霉素进行 2 周的筛选以获得稳定高表达 MOR 的血管内皮细胞系, 同时利用 pcDNA3.1-FLAG 空载体质粒构建阴性对照(Negative Control, NC)细胞系。

1.2.4 微管形成实验观察 MOR 高表达对血管内皮细胞微管形成的影响

选用 24 孔板, 10 μ L 浓度为 10mg/mL 的去除生长因子 Matrigel(BD)包裹, 4×10⁵ 个细胞/mL 时用含 10% 血清的培养基重悬, 每个孔中加入 300 μ L 的细胞悬液(1.2×10⁵ 个细胞, 在 37℃、5% CO₂ 浓度的条件下将培养 16-18 小时, 观察细胞管长度、细胞管面积或分支点。

1.2.5 血管内皮细胞集落形成实验观察 MOR 高表达对血管内皮细胞增殖的影响

培养细胞至对数期生长, 吸弃旧培养基, 用 PBS 洗 3 次, 用胰酶消化细胞, 将细胞悬液离心 3 min (1000 rpm), 弃除上清; 将细胞悬液进行稀释, 按 500 个细胞每孔接种于六孔板中; 培养一周左右, 观察到细胞集落形成时, 终止培养; 将溶解好的纳米颗粒加入 6 孔板中, 共同育 4h; 弃除培养基, 用 PBS 洗 3 次; 使用 4% 多聚甲醛固定液固定 20 min, 用 PBS 洗 3 次; 使用 500 μ L 结晶紫染色液染色 10 min; 用 PBS 洗净多余染液; 数细胞形成的集落数, 结果统计分析。

1.2.6 Transwell 实验观察 MOR 高表达对血管内皮细胞迁移的影响

选用 8 μm 的 Transwell (Corning Inc) 小室, 小室透明聚酯膜外侧包裹 10 μL 浓度为 0.1 mg/mL 的 collagen I 蛋白, 细胞漂洗后上层 Transwell 小室中加入 0.3 mL 含 5×10^4 个细胞培养基, 下层 24 孔板中加入 0.3 mL 含有或不含抑制剂的培养基, 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 4 h 后甲醇固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min, 用清水洗 3 遍以上, 高倍显微镜下随机五个视野观察细胞并计数。

1.3 统计学方法

所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS26.0 进行统计分析。组间差异采用 t 检验, $p < 0.05$ 被认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 侧支血管中 MOR 的表达情况

收集大鼠 ICS 模型颅内狭窄动脉及侧支动脉, 提取蛋白, Western Blotting 检测 MOR 表达, 侧支中 MOR 表达显著升高 (见图 1)。

2.2 MOR 高表达对血管内皮细胞微管形成的影响

利用质粒高表达 MOR, 观察血管内皮细胞增殖及迁移能力的改变, 结果显示, MOR 显著促进了血管内皮细胞的微管形成 (见图 2)。

2.3 MOR 高表达对血管内皮细胞增殖的影响

利用质粒增加 MOR 表达, 观察血管内皮细胞集落形成实验, 结果显示, MOR 高表达显著促进了血管内皮细胞增殖 (见图 3)。

2.4 MOR 高表达对血管内皮细胞迁移的影响

利用质粒增加 MOR 表达, 观察血管内皮细胞迁移情况, 结果显示, MOR 高表达显著促进了血管内皮细胞的迁移 (见图 4)。

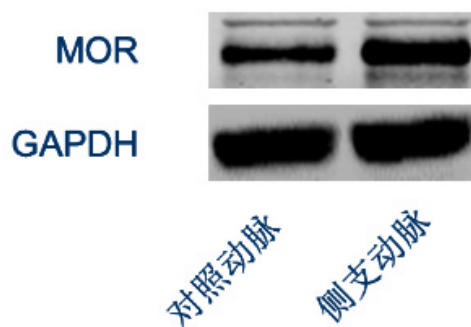


图 1 CS 大鼠侧支动脉中 MOR 高表达

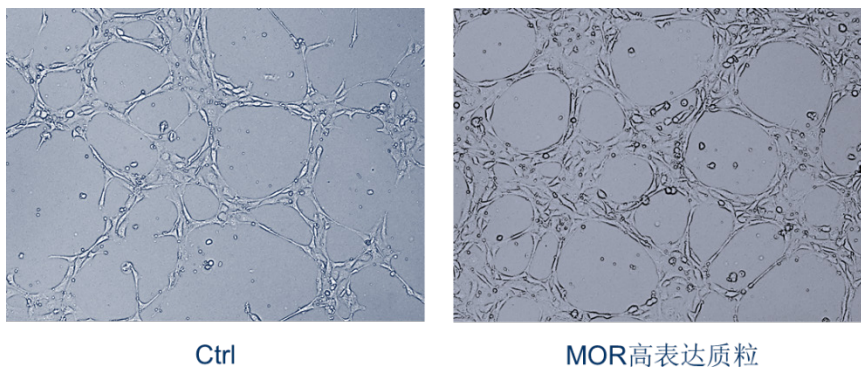


图 2 MOR 高表达促进血管内皮细胞管形成

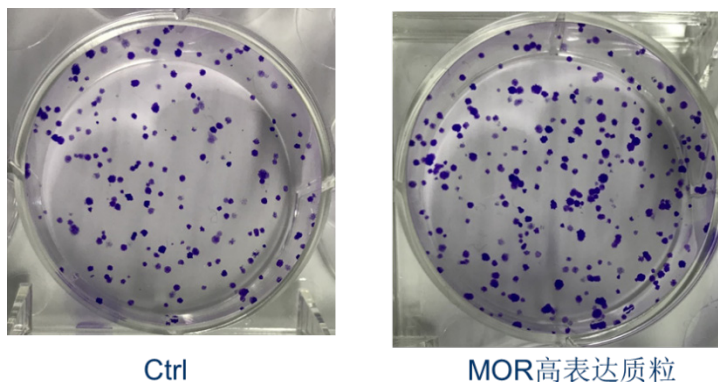


图 3 MOR 高表达显著促进了血管内皮细胞增殖

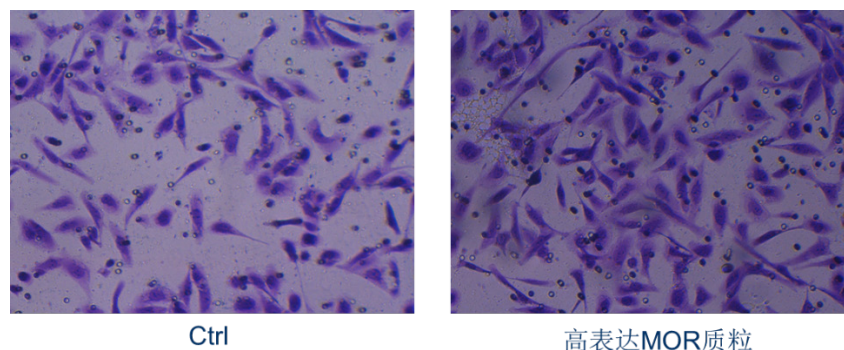


图4 MOR 高表达显著促进了血管内皮细胞迁移

3 讨论

已有研究表明颅内动脉狭窄是缺血性脑卒中发生的主要因素,而脑缺血后侧支循环的建立至关重要。形成具有功能的侧支循环需要以“动脉生成”为代表的一系列动脉血管形态变化,即在内皮细胞形成的初级管腔(毛细血管)或原有侧支小动脉的基础上,血管平滑肌细胞增殖、迁移、募集,结合辅助细胞(周细胞、单核/巨噬细胞、神经细胞等)功能及细胞外基质的改变,形成具有相对完整结构的动脉侧支。现有研究显示,颅内动脉狭窄所致缺氧可以激活并能够诱导活性氧(ROS)、血管内皮生长因子(VEGF)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达的增加,从而触发促进侧支血管形成和重建的分子级联机制。尽管近年来,大量的机制研究探索侧支循环是如何建立的,但是仍然有很多未知或尚未完全明确之处。近期的研究发现,在外周动脉的内皮细胞及平滑肌细胞表达有MOR,并具有促进钙离子内流的作用。更为有趣的是,研究还证实MOR能调节内皮细胞的增殖和迁移,进一步表明阿片类药物及受体信号在调节血管功能中的重要作用。那么,在侧支循环建立的过程中MOR信号是否也参与其中?为此设计本实验来探讨MOR在ICS侧支动脉中的表达以及对血管内皮细胞增殖及迁移的影响。

本实验首先在构建的大鼠ICS模型侧支动脉中发现MOR的表达显著升高,提示MOR可能对侧支形成具有促进作用。进一步研究发现,在血管内皮细胞系中升高MOR的表达,显著促进了细胞的增殖和迁移。

虽然在本实验中已发现MOR对血管内皮细胞增殖和迁移有影响,但其具体作用机制尚不明确。研究显示,神经元限制性沉默因子(NRSF)基因敲除后,可通过上调 μ -和 δ -阿片受体(MOR/DOR)的表

达,促进脑缺血后神经功能的恢复。MOR拮抗剂甲基纳曲酮(MNTX)可对VEGF诱导的人肺微血管内皮细胞增殖和迁移以及体内血管生成产生抑制作用,而VEGF在血管重建中具有重要的作用。因此,激活MOR可以作为促进ICS侧支循环建立的新策略,并对ICS患者脑缺血后神经功能的恢复具有重要作用。本课题组已计划进一步研究其作用的具体分子调控机制,从而明确MOR在侧支循环建立中的作用,为ICS侧支循环形成的后续研究开辟新的方向,为MOR作为治疗ICS的药物靶点提供新的理论依据。

4 致谢

该文章得到陕西省自然科学基金基础研究计划一般项目(2024JC-YBMS-781);环球医疗集团2022年度科研扶持基金(UM0122002)的资助。

参考文献

- [1] Hurford R, Wolters FJ, Li L, Lau KK, Küker W, Rothwell PM. Prognosis of asymptomatic intracranial stenosis in patients with transient ischemic attack and minor stroke [J]. JAMA neurology. 2020, 77(8): 947-54.
- [2] Carvalho M, Oliveira A, Azevedo E, Bastos-Leite AJ. Intracranial arterial stenosis. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases [J]. 2014, 23(4): 599-609.
- [3] Holmstedt CA, Turan TN, Chimowitz MI. Atherosclerotic intracranial arterial stenosis: risk factors, diagnosis, and treatment [J]. The Lancet Neurology. 2013, 12(11): 1106-14.
- [4] Al Kasab S, Nguyen TN, Derdeyn CP, Yaghi S, Amin-Hanjani S, Kicieliński K, Zaidat OO, de Havenon A. Emergent Large Vessel Occlusion due to Intracranial

- Stenosis: Identification, Management, Challenges, and Future Directions [J]. *Stroke*. 2024, 55(2): 355-65.
- [5] Cuitavi J, Hipólito L, Canals M. The life cycle of the mu-opioid receptor [J]. *Trends in Biochemical Sciences*. 2021, 46(4): 315-28.
- [6] Zhang L, Zhang JT, Hang L, Liu T. Mu opioid receptor heterodimers emerge as novel therapeutic targets: recent progress and future perspective [J]. *Frontiers in pharmacology*. 2020, 11: 551365.
- [7] Sturaro C, Malfacini D, Argentieri M, Djeujo FM, Marzola E, Albanese V, Ruzza C, Guerrini R, Calo' G, Molinari P. Pharmacology of kappa opioid receptors: Novel assays and ligands [J]. *Frontiers in Pharmacology*. 2022,13: 873082.
- [8] Townsend Jr P, Pernomian L, Moura K, Waigi E, Wilson E, McCarthy C, Wenceslau C. Fentanyl disrupts autoregulation and leads to exacerbated vasodilation in resistance arteries independent of mu-opioid receptor activation [J]. *Physiology*. 2023, 38:5795773.