



新乡医学院

科技活动月 研究成果展

多巴胺受体在小肠的分布与定位

背景介绍

多巴胺 (dopamine, DA) 是目前研究最多的儿茶酚胺类神经递质之一, 除大量存在于中枢神经系统外, 肠内DA占全身合成量的50%以上^[1]。DA通过5种受体 (D1~D5) 发挥作用, 一直以来, 围绕D1和D2在胃、十二指肠和结肠的研究较多^[1]。但与DA亲和力更高的D3~D5^[1]在肠道, 尤其是小肠中的分布和功能仍知之甚少。D3~D5广泛存在于外周血及脾内常见的免疫细胞上^[2]。机体内80%以上的免疫球蛋白A阳性浆细胞 (immunoglobulin A positive PC, IgA⁺PC) 位于肠黏膜固有层 (lamina propria, LP) 内^[3], 但IgA⁺PC是否表达D3~D5, 目前未见报道。本实验首先系统观察D3~D5在小鼠、大鼠和恒河猴小肠的分布, 比较物种间的差异, 然后明确D3~D5在IgA⁺PC上的定位, 为深入揭示D3~D5在小肠中的功能提供形态学基础, 为探索小肠相关疾病的发病机制和新型治疗靶点提供理论依据。

作者简介

王志勇, 博士, 副教授, 硕士生导师, 河南省“工匠人才”, 美国UCLA访问学者, 新乡医学院“最美教师”, 新乡医学院人体解剖学与组织胚胎学系主任, 多次获教学竞赛一等奖, 主持并完成国家自然科学基金等科研项目4项。

研究方法

1.1 实验动物

选取8周龄, 体重24±2 g的健康雄性C57BL/6J小鼠10只, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司 (SCXK豫2020-0005); 8周龄, 体重200±20 g的健康雄性SD大鼠10只, 购自北京斯贝福生物技术有限公司 (SCXK京2019-0010); 6~8岁的健康恒河猴2只, 购自新野县新豫野生动物养殖有限公司 (SCXK豫2020-0006)。动物在室温22±1℃下饲养, 昼夜12h循环光照, 自由饮水进食。

1.2 免疫组织化学检测D3~D5蛋白

实验动物使用10%水合氯醛腹腔注射麻醉, 灌注后取空肠 (近十二指肠端) 及回肠 (近盲肠端), 固定、脱水 and 包埋, 制作冰冻切片。抗原热修复, 阻断和封闭, 滴加兔来源D3 (1: 100, Alomone, 以色列)、D4 (1: 400, Proteintech, 中国) 和D5 (1: 100, Alomone, 以色列) 一抗, 过夜。滴加二抗 (PV-9001, 中杉金桥, 中国), DAB显色, 复染, 脱水, 透明和封片。每张切片随机选取3个视野, 光学显微镜 (Nikon E200, 日本) 下观察并拍照, 结果用Image J软件分析。

1.3 免疫印迹检测D3~D5蛋白

分别取小鼠和大鼠空、回肠黏膜层组织的总蛋白, BCA法测定蛋白浓度。蛋白样品经SDS-PAGE电泳和转膜后, 5%脱脂牛奶封闭2h, 分别用兔来源D3 (1: 1000)、D4 (1: 500)、D5 (1: 1000) 和内参GAPDH (1: 5000, Proteintech, 中国), 4℃过夜孵育。TBST漂洗后加入二抗山羊抗兔 (1: 1000, 碧云天, 中国) 孵育1h, TBST充分漂洗, ECL发光显影, 结果用Image J 1.53t软件分析。

1.4 免疫荧光双标检测D3~D5在IgA⁺PC上的定位

切片经0.5% Triton X-100透膜15 min, 山羊血清封闭30 min后, 加入兔来源D3 (1: 50)、D4 (1: 100)、D5 (1: 50) 和山羊抗小鼠IgA (1: 50, Bio-Rad, 美国), 4℃过夜孵育。PBS漂洗后加入山羊抗兔Alexa Fluor 594 (1: 500, Proteintech, 中国) 孵育1.5h, DAPI复染细胞核, 甘油封片, 共聚焦扫描显微镜 (Nikon Ti2, 日本) 下记录图像信息。

研究结果

2.1 D3在小肠黏膜的分布和表达

结果见图1。D3阳性产物分布于不同物种空肠和回肠黏膜的上皮层和LP, 主要位于细胞质。其在小鼠两个肠段黏膜层的表达水平差异无显著性 ($P>0.05$)。免疫印迹结果显示小鼠回肠黏膜层内D3蛋白的表达水平显著低于空肠 ($P<0.05$), 与免疫组化之间的差异可能与剥离黏膜层时带入黏膜下层有关。与空肠比较, D3阳性产物在大鼠回肠黏膜层的表达水平较高 ($P<0.01$); 免疫印迹结果与免疫组化基本一致 ($P<0.05$)。

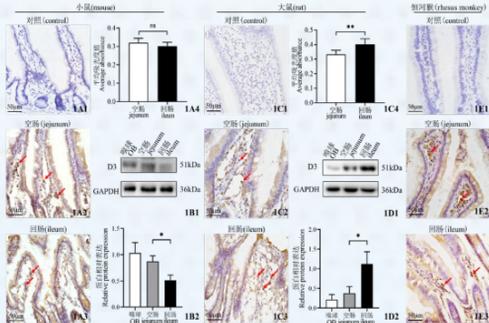


图1 D3在小肠黏膜的分布和表达

A1、C1、E1为阴性对照; A2~A4、C2~C4、E2、E3为D3的免疫组织化学染色及统计分析; B1、B2、D1、D2为D3的蛋白表达及统计分析; 与空肠黏膜层比较, ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 红色箭头示D3阳性细胞; 标尺示50 μm

2.2 D4在小肠黏膜的分布和表达

结果见图2。D4阳性产物分布于不同物种空肠和回肠黏膜的上皮层和LP, 与D3一致。其在两个肠段黏膜层的表达差异无显著性 (小鼠: $P>0.05$; 大鼠: $P>0.05$)。免疫印迹结果与免疫组化一致 (小鼠: $P>0.05$; 大鼠: $P>0.05$)。

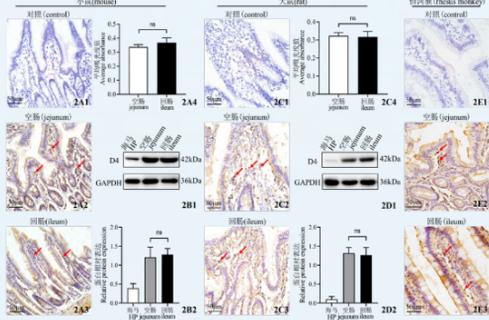


图2 D4在小肠黏膜的分布和表达

A1、C1、E1为阴性对照; A2~A4、C2~C4、E2、E3为D4的免疫组织化学染色及统计分析; B1、B2、D1、D2为D4的蛋白表达及统计分析; 与空肠黏膜层比较, ns $P>0.05$; 红色箭头示D4阳性细胞; 标尺示50 μm

2.3 D5在小肠黏膜的分布和表达

结果见图3。D5阳性产物分布于不同物种空肠和回肠黏膜的上皮层和LP, 与D3和D4一致。其在两个肠段黏膜层的表达水平差异无显著性 (小鼠: $P>0.05$; 大鼠: $P>0.05$)。免疫印迹结果与免疫组化一致 (小鼠: $P>0.05$; 大鼠: $P>0.05$)。

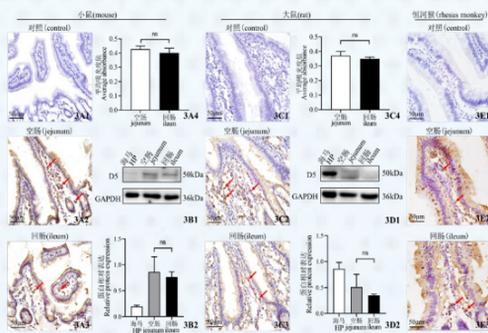


图3 D5在小肠黏膜的分布和表达

A1、C1、E1为阴性对照; A2~A4、C2~C4、E2、E3为D5的免疫组织化学染色及统计分析; B1、B2、D1、D2为D5的蛋白表达及统计分析; 与空肠黏膜层比较, ns $P>0.05$; 红色箭头示D5阳性细胞; 标尺示50 μm

2.4 D3~D5在小肠黏膜下层和肌层的分布和表达

结果见图4。D3和D5阳性产物均分布于不同物种空肠 (结果未显示) 和回肠黏膜下层的黏膜下神经丛 (submucosal plexus, SMP) 和肌层的肌间神经丛 (myenteric plexus, MP) 内。与SMP比较, D3阳性产物在MP内的表达水平较高, 差异具有显著性 (小鼠: $P<0.001$; 大鼠: $P<0.05$)。D4阳性产物在小鼠和恒河猴的SMP和MP内分布; 其在大鼠SMP的表达水平与MP相比差异无显著性 ($P>0.05$)。D4阳性产物在大鼠SMP和MP内未见分布。

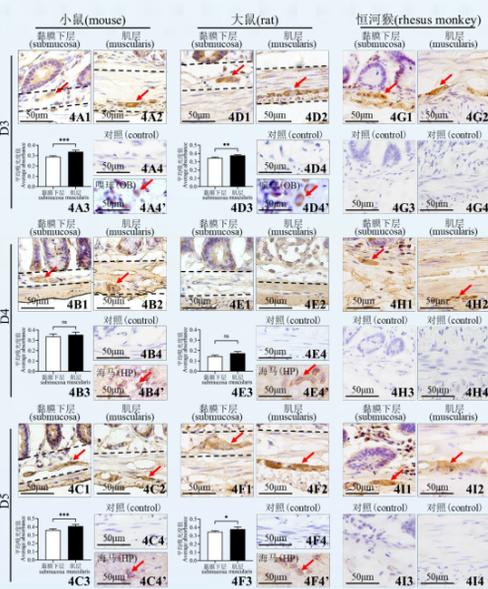


图4 D3~D5在小肠黏膜下层和肌层的分布和表达

A1~A3、B1~B3、C1~C3为D3~D5在小鼠的免疫组织化学染色及统计分析; D1~D3、E1~E3、F1~F3为D3~D5在大鼠的免疫组织化学染色及统计分析; G1、G2、H1、H2、I1、I2为D3~D5在恒河猴的免疫组织化学染色; A4、B4、C4、D4、E4、F4、G4、H4、I4为阴性对照; A4'、B4'、C4'、D4'、E4'、F4'、G4'、H4'、I4'为阳性对照; 与黏膜下层比较, ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 虚线示黏膜下层或肌层; 红色箭头示阳性细胞; 标尺示50 μm

2.5 D3~D5在小肠IgA⁺PC内的表达

IgA⁺PC约占LP内免疫细胞总量的20%^[3]。鉴于不同物种小肠LP均有D3~D5分布, 我们接着探索了D3~D5在IgA⁺PC上的定位情况, 结果见图5。IgA (绿色) 为IgA⁺PC的标志物。D3~D5的免疫阳性反应 (红色) 结果与免疫组化一致。D3和D5均与IgA的荧光有大量橙黄色重叠, 表明D3和D5在IgA⁺PC上均有表达。D4与IgA的荧光未见重叠, 表明D4不在IgA⁺PC上表达 (具体定位的细胞类型尚不清楚)。

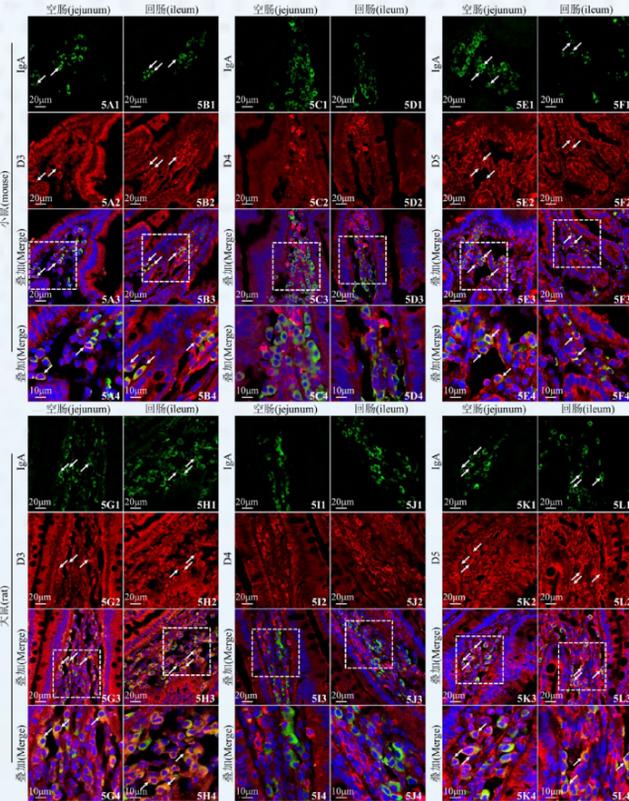


图5 D3~D5在小肠IgA⁺PC内的表达

IgA为FITC标记的绿色; D3~D5为594标记的红色; 细胞核为DAPI标记的蓝色; A1~B3、C1~D3、E1~F3、G1~H3、I1~J3、K1~L3标尺示20 μm ; A4~F4、G4~L4为A1~F3、G1~L3方框的放大, 标尺示10 μm ; 白色箭头示双标记的细胞

结论

综上, 我们发现D3和D5在不同物种小肠具有相似的分布和定位模式, D4则存在物种和品系差异。DA可能参与调节IgA⁺PC的功能。本研究将为阐明DA系统调控小肠上皮屏障、免疫稳态 (尤其是IgA⁺PC的稳态) 和动力等功能, 以及具体的细胞和分子机制提供形态学基础, 为预防和治疗小肠功能紊乱疾病提供了新的思路和靶点。

致谢

特别感谢河南省科技公关项目、河南省高等学校青年骨干教师培养计划、河南省医用组织再生重点实验室开放课题、新乡医学院博士科研启动基金和新乡医学院基础医学院培育项目对本课题的资助和支持。

代表作

1. 陈钧钧, 周立, 苏田, 王现伟, 张海龙, 王志勇*, 多巴胺受体在小肠的分布与定位, 解剖学报, 2024 (已接收) (中文核心);
2. 陈钧钧, 周立, 郑媛升, 韩语欣, 刘高启, 尹悦, 王志勇*, 杏仁核在帕金森病焦虑形成中作用的研究进展, 神经解剖学杂志, 2023,39 (6): 714-718 (科技核心)。