

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2025.09.005

• 论 著 •

Mrgprd 通过 NF- κ B 通路调控阿片类药物所致便秘的机制研究 *

郭琇茜 董海平 纪 运 马冰洁 刘秋利 马 柯[△]

(上海交通大学医学院附属新华医院疼痛科, 上海 200092)

摘 要 阿片类药物引起的便秘 (opioid-induced constipation, OIC) 是临床阿片类药物应用时的常见不良反应, 其机制主要涉及肠道 μ 阿片受体 (μ -opioid receptors, MOR) 的激活和局部神经调控。**目的:** 探讨 Mrgprd (一种特异性表达于背根神经节的 G 蛋白偶联受体) 在 OIC 中的作用机制。**方法:** 通过建立 40 mg/kg 吗啡皮下注射诱导的 OIC 模型, 并结合 Mrgprd 基因敲除 (KO) 小鼠和野生型 (WT) 小鼠, 对便秘相关的行为学指标、肠道组织形态、肠道阿片受体的表达情况等进行检测。**结果:** Mrgprd 缺失显著缓解了 OIC 模型小鼠的便秘症状, 表现为粪便数量和含水量增加, 同时肠道黏膜的淋巴细胞浸润显著减少。此外, Mrgprd 缺失显著降低了肠道白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的上调水平, 这一过程是通过核转录因子 NF- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路实现的。**结论:** Mrgprd 可能通过调控 MOR 表达及肠道神经炎症参与 OIC 的发生, 本研究为靶向调节 Mrgprd 治疗 OIC 提供了新的理论依据。

关键词 Mrgprd; 阿片类药物相关性便秘; 肠道 μ 阿片受体; 神经调控; 炎症; 核转录因子 NF- κ B; 白细胞介素-6

Mechanistic study on Mrgprd regulating opioid-induced constipation via the NF- κ B pathway *

GUO Xiu-qian, DONG Hai-ping, JI Yun, MA Bing-jie, LIU Qiu-li, MA Ke[△]

(Department of Pain Medicine, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract Opioid-induced constipation (OIC) is a common adverse reaction with clinical opioid administration, and its mechanism mainly involves the activation of peripheral μ -opioid receptors (MOR) in the intestine and local neuromodulation. **Objective:** To explore the mechanism of Mrgprd (a G protein-coupled receptor specifically expressed in dorsal root ganglion) in OIC. **Methods:** An OIC model was established in mice through subcutaneous injection of 40 mg/kg morphine, combined with the use of Mrgprd knock-out (KO) mice and wild-type (WT) mice. The constipation-related behavioural indices, intestinal tissue morphology, and the expression of intestinal opioid receptors were examined. **Results:** Mrgprd deletion significantly alleviated constipation symptoms in OIC model mice, as evidenced by an increase in fecal quantity and water content, as well as a significant reduction in lymphocyte infiltration in the intestinal mucosa. In addition, Mrgprd deletion significantly reduced the upregulation of intestinal interleukin-6 (IL-6), a process mediated through the nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway. **Conclusion:** Mrgprd may be involved in the development of OIC by regulating MOR expression and intestinal neuroinflammation. This study provides a new theoretical basis for the targeted regulation of Mrgprd in the treatment of OIC.

Keywords Mrgprd; opioid-associated constipation; intestinal μ -opioid receptor; neuromodulation; inflammation; nuclear factor- κ B (NF- κ B); interleukin-6 (IL-6)

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82371224); 上海交通大学“交大之星”重点项目 (20230103)

[△] 通信作者 马柯 marke72@163.com

阿片类药物是临床治疗中重度疼痛的基础药物，其常见不良反应之一^[1,2]——阿片类药物引起的便秘 (opioid-induced constipation, OIC)^[3]严重影响了阿片类药物的临床使用和病人依从性^[4]。根据最新的 OIC 定义，其临床表现包括排便次数减少、排便费力、直肠排空不完全感或粪便稠度变硬等症状^[5]。OIC 的发生主要归因于阿片类药物激活外周 μ 阿片受体 (μ -opioid receptors, MOR)，抑制胃肠蠕动和分泌功能^[6,7]。然而，MOR 的直接激活不足以完全解释 OIC 的复杂病理机制。近年研究表明，肠道菌群、局部神经炎症和肠道免疫调控在 OIC 发生中起重要作用^[8-10]。

Mrgprd (Mas-related G protein-coupled receptor D) 是一种特异性表达于背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 的 G 蛋白偶联受体，Mrgprd+ DRG 是 DRG 中小直径非肽能神经元的亚类，参与瘙痒、痛觉和炎症反应，同时也被证实神经调控和肠道功能中具有重要作用^[11]。有研究表明，Mrgprd 的基因缺失增强了体内的肠道蠕动，但不会影响小鼠肠道的长度和结构。在结肠中，Mrgprd+ DRG 通过投射到肠道感觉神经元来调节小鼠肠道运动^[12,13]。然而，Mrgprd 是否通过调控肠道 MOR 的表达或炎症状态参与 OIC 尚未被明确。本研究旨在探讨 Mrgprd 在 OIC 中的作用机制，重点分析其对肠道 MOR 表达和局部神经炎症的调控作用，为开发更有效的 OIC 治疗策略提供理论依据。

方 法

1. 实验材料

C57BL/6J 品系小鼠购自上海吉辉实验动物有限责任公司。实验选用 6~8 周龄成年雄性野生型 (WT) 小鼠，体重 20~25 g，共 48 只。此外，Mrgprd 基因敲除 (Mrgprd KO) 小鼠由南京师范大学生命科学学院兰蕾教授实验室惠赠。所有实验用小鼠均饲

养于上海交通大学医学院附属新华医院实验动物中心。繁殖及实验用小鼠饲养于恒温 (22~24℃)、恒湿 (50%~65%) 环境中，12 小时昼夜有序循环光照 (亮灯时间为每日 8:00 am~8:00 pm) 维持动物正常作息节律。实验用小鼠每 5 只一笼，内盛装灭菌玉米芯垫料。小鼠可自由饮水，自由进食标准饲料。鼠笼规格为 320 mm×210 mm×160 mm，动物使用许可证号：XCXK (沪) 2022-0009。本研究中涉及的所有动物实验步骤全部遵循 NIH 实验动物护理和使用指南，并已通过上海交通大学医学院附属新华医院动物护理和使用委员会审核 (伦理审批号 XHEC-F-2024-032)。实验设计与操作均以尽可能减少实验动物的痛苦和减少动物的使用数量为原则。

2. 主要实验仪器和试剂

实时荧光定量 PCR 系统 (Thermo Fisher Scientific, QuantStudio 3); 垂直电泳仪 (天能); 湿式转印槽 (天能); Image Quant AI600 成像仪 (General Electric); Trizol (Thermo Fisher Scientific, 15596026CN); 逆转录试剂盒 (Takara, RR037A); 高特异性 qPCR 试剂 TB green (Takara, RR820); 蛋白分子量 marker (雅酶, WJ101); 蛋白裂解液 (碧云天, P0013K); 蛋白酶抑制剂混合物 (碧云天, P1005); 磷酸酶抑制剂 (碧云天, P1082); 一步法凝胶制备 (雅酶, PG212); SDS-PAGE 上样缓冲液 (碧云天, P0015L); anti-NF- κ Bp65 (CST, 8242T); anti-GAPDH (华安生物, R1210-1); 抗兔 IgG 二抗 (ABclonal, AS014); 化学发光底物 (ECL; biosharp, BL523)。引物序列见表 1。

3. 实验方法

(1) OIC 模型的建立：选取野生型成年小鼠并随机分为 4 组，包括对照组 (ctrl)、吗啡给药 1 天组 (morphine 1 天)、吗啡给药 2 天组 (morphine 2 天)、吗啡给药 3 天组 (morphine 3 天)，每组 6 只。吗啡给药组小鼠每日接受 2 次剂量为 40 mg/kg 的吗啡皮下注射，按照组别连续注射 1 天、2 天及 3 天，

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequences

引物名称 Primers name	引物序列 (5'-3') Primers sequences (5'-3')
Gapdh FP	CCAGCCTCGTCCCCTAGACA
Gapdh RP	CGCTCCTGGAAGATGGTGAT
Oprm1 FP	TCTTCACCTCTGCACCATG
Oprm1 RP	TCTATGGACCCCTGCCTGTA
IL-6 FP	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC
IL-6 RP	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC

以观察不同时间点的效应；对照组小鼠则在相同时间点注射等体积的生理盐水进行平行对照。模型建立过程中，观察小鼠的一般状态以及粪便特征，记录吗啡给药组小鼠粪便产生量并进行统计，以初步判断模型构建是否成功。3天后，4组小鼠统一取材，进行后续分子实验。OIC 模型建立实验流程图见图 1。

以上述吗啡给药组中便秘最严重的组别作为模型组的建立标准，对比野生型 (WT) 小鼠与 *Mrgprd* 基因敲除型 (KO) 小鼠在 OIC 情况下的差异。将小鼠随机分为 4 组，包括野生型对照组 (WT ctrl)、野生型造模组 (WT OIC)、*Mrgprd* 敲除型对照组 (KO ctrl)、*Mrgprd* 敲除型造模组 (KO OIC)，每组 6 只。观察小鼠的一般状态以及粪便特征，记录各组小鼠粪便产生量并进行统计，造模结束后统一取材，以便进行后续分子实验。

(2) 行为学监测及肠道功能学评估：在 OIC 造模期间，将每只小鼠单独放置一笼，每日对其饲料进行称重，不限制饮水量。收集实验期间小鼠每日的粪便排出量，使用电子天平称重，记录干燥前的重量（即湿重）。将收集的粪便在 60℃ 恒温箱烘干至恒重，记录干燥后的重量（即干重），计算含水量公式：粪便含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。造模结束后，处死小鼠取出完整的肠道，将结肠沿生理形态轻轻拉直，用刻度尺测量其总长度。通过对比各组的肠道长度，评估吗啡对肠道蠕动的的影响。

(3) qPCR：小鼠 OIC 造模后，取 1~2 cm 结肠组织以及 T₁₂~L₁ 节段的 DRG 组织放于含有 Trizol 的 EP 管中。用 Trizol 法提取样本的总 RNA，使用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和质量。用 Takara 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。在无菌条件下，将 cDNA 模板、特异性引物（正、反向）、TB Green qPCR 混合液及无 RNA 酶水按比例加入 PCR 管中，保证体系无污染。设置 qPCR 反应程

序，包括初始变性（95℃，30 秒），循环步骤（变性 95℃，15 秒；退火与延伸 58℃，30 秒），总循环 40 次，并在每次循环结束时检测荧光信号。利用 2^{-ΔΔCt} 方法分析目的基因的相对表达量，并进行组间比较。实验结束后，确保熔解曲线无非特异性扩增，以验证扩增的特异性。实验需重复 3 次以确保数据的可靠性。

(4) 蛋白免疫印迹：WT/KO 小鼠 OIC 造模后，收集 1~2 cm 结肠组织保存在液氮中。取出后加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂的混合液和磷酸酶抑制剂以 100:1:2 的比例进行匀浆，冰上孵育 30 分钟，4℃ 下 13,000 rpm 离心 10 分钟，取上清液至 1.5 ml EP 管中，加入 5x 上样缓冲液，金属浴 100℃ 加热 5 分钟变性。样品上样到已制备的 SDS-PAGE 凝胶中，120 V 60 分钟恒压电泳分离。以湿转法转至 PVDF 膜上，400 mA 40 分钟，用 5% 脱脂奶粉室温封闭膜 1 小时，防止非特异性结合。加入核转录因子 NF-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 兔单克隆抗体 (1:1000 稀释) 以及 GAPDH 兔多克隆抗体 (1:5000 稀释)，4℃ 孵育过夜。加入 HRP 标记的兔二抗 (1:10,000 稀释)，室温孵育 1 小时。用 ECL 处理膜，置于成像仪中曝光观察蛋白条带。用 imageJ 软件分析目标蛋白条带灰度值，与内参蛋白进行归一化比较。

(5) HE 染色：在 OIC 造模 3 天后取出小鼠结肠，剪成 1~2 cm 的肠段，将取下的新鲜结肠组织固定于用 4% 多聚甲醛中 24 小时，进行常规的梯度脱水、透明、石蜡包埋后制备 5 μm 厚切片。染色前将切片依次经过二甲苯脱蜡和梯度乙醇 (100%、95%、85%、75%) 逐步水化，最后置于蒸馏水中待染。将切片依次经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化，然后用苏木精染核 5 分钟，自来水冲洗后分化，再经蓝化处理。用伊红染色细胞质 2 分钟，随后用梯度乙醇脱水、二甲苯透明，用中性树胶封片。在显微镜下观察组织结构和细胞形态。

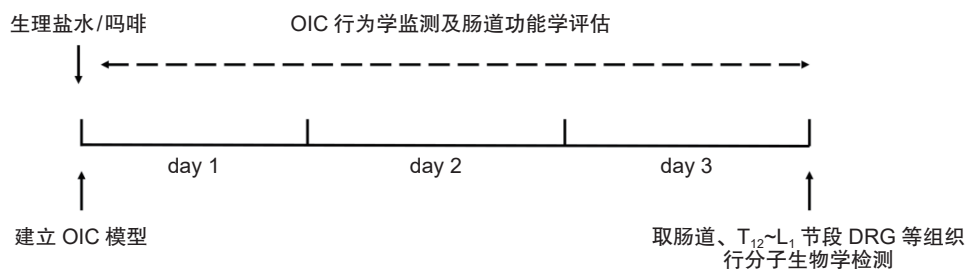


图 1 OIC 模型建立实验流程图

Fig. 1 Flow chart of OIC model building experiment

4. 统计学分析

采用 Graphpad Prism 9.5 软件进行数据统计学分析。计量数据用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示, qPCR 结果采用单因素方差分析, 便秘行为学指标比较采用多因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠 OIC 模型的建立以及验证

为了探究吗啡给药后发生便秘的时间, 在小鼠模型上设置了吗啡给药 1 天组、2 天组、3 天组, 给予皮下给药 40 mg/kg, 每日 2 次。结果发现各给药组 (1 天、2 天、3 天) 的粪便产生量均较对照组显著减少 ($P < 0.0001$), 并且随着给药时间的延长, 粪便产生量逐渐减少 (见图 2A)。与对照组相比, 给药 3 天组的粪便含水量显著降低 ($P < 0.05$, 见图 2B), 且粪便体积变小、质地变硬 (见图 2D)。将

小鼠结肠取出, 观察其长度, 发现吗啡给药后对小鼠的结肠长度无影响, 但在 OIC 模型组中可以明显观察到成形的粪便滞留, 提示吗啡作用后影响了肠道的运动 (见图 2C)。对结肠进行 HE 染色, 可以发现吗啡处理后结肠杯状细胞减少, 黏膜下淋巴细胞浸润, 提示吗啡给药后肠道免疫发生了改变 (见图 2E)。

2. OIC 模型建立后小鼠肠道 MOR 的表达情况

在造模结束后对小鼠回肠、结肠和直肠组织进行取材, 检测肠道 MOR 的相对表达情况。实验结果显示, 与对照组相比, 给药 3 天组 MOR 的 mRNA 水平显著上调 ($P < 0.05$, 见图 3), 而给药 1 天组和 2 天组无显著差异。这一结果在基因表达层面证实了上述模型建立成功。对造模后小鼠 DRG 神经元中 Mrgprd 的相对表达量进行检测, 发现 Mrgprd 在造模后表达量也升高, 给药 2 天组和 3 天组均有显著差异 ($P < 0.01$), 给药 3 天组差异更为明显 ($P < 0.0001$)。

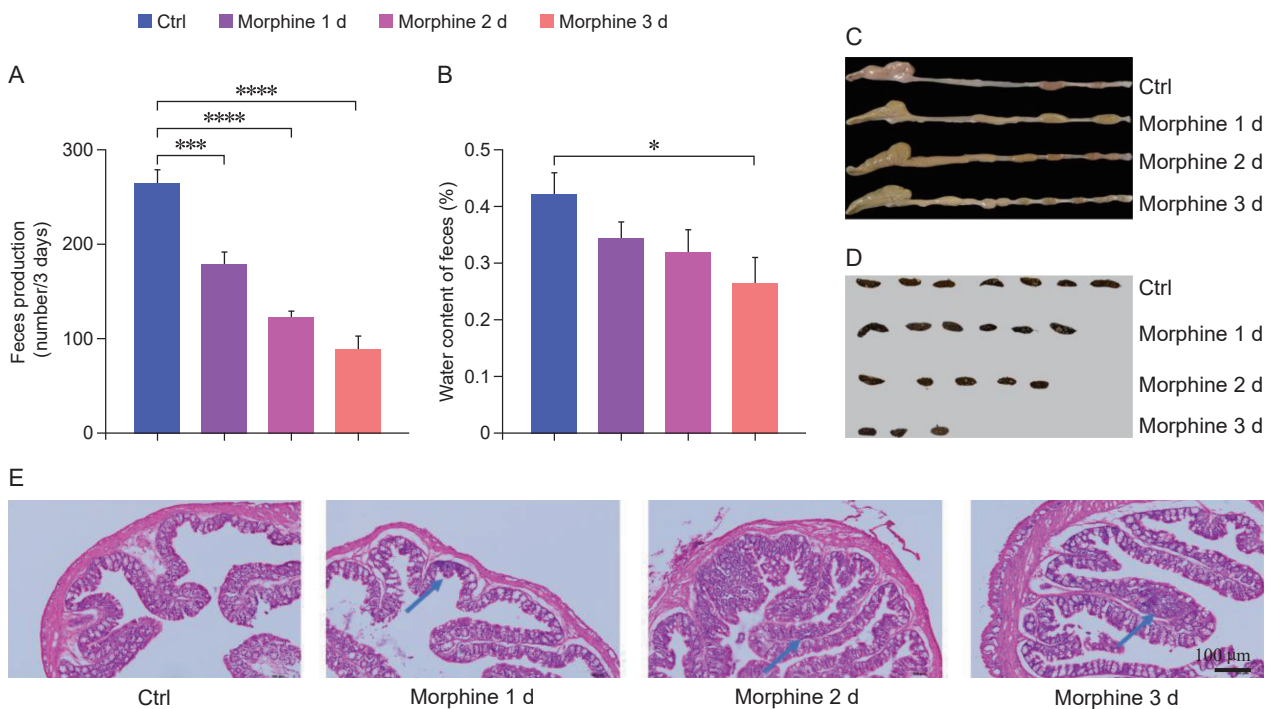


图 2 OIC 模型的建立 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 实验期间小鼠粪便产生量; (B) 粪便含水量的差异; (C) 各组小鼠的结肠形态; (D) 各组小鼠粪便的形态; (E) 结肠 HE 染色代表图, 标尺 = 100 μ m, 箭头所示为黏膜下浸润的淋巴细胞

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 不同时间给药组与对照组相比

Fig. 2 Establishment of the OIC model ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Feces production of mice during the experiment; (B) Differences in fecal water content; (C) Morphology of the colon in different groups of mice; (D) Morphology of the feces in different groups of mice; (E) Representative photos of HE staining of the colon, Scale bar = 100 μ m. The arrows indicate submucosal infiltrating lymphocytes.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, compared with ctrl group, the administration group at different time.

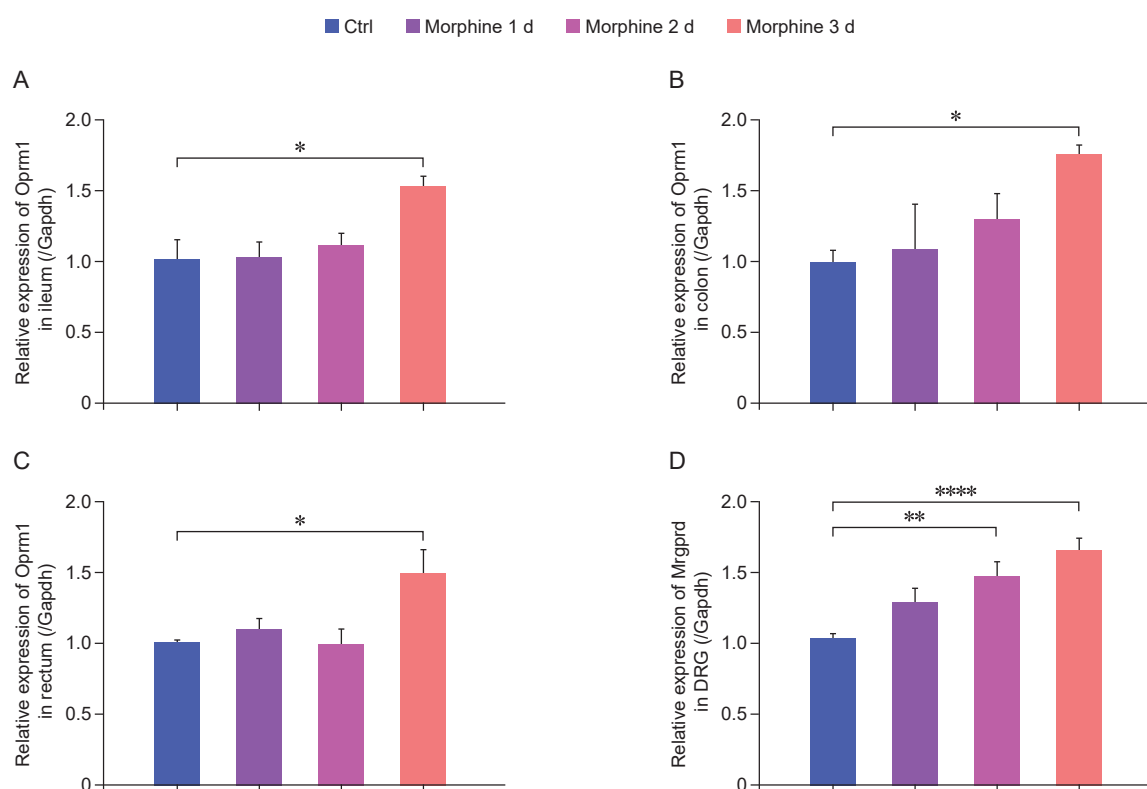


图3 OIC造模后MOR的表达情况 ($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A-C) OIC模型建立后小鼠回肠、结肠和直肠 Oprm1 mRNA 的相对表达情况; (D) 小鼠 DRG 中 Mrgprd mRNA 的相对表达情况

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, 不同时间给药组与对照组相比

Fig. 3 Expression of MOR after modelling of OIC ($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A-C) The relative expression of Oprm1 mRNA in mouse ileum, colon, and rectum after OIC modeling; (D) The relative expression of Mrgprd mRNA in mouse DRG.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, compared with ctrl group, the administration group at different time.

3. Mrgprd 对 OIC 的影响

MAS 相关的 G 蛋白偶联受体在肠道中发挥一定的作用, 为了探究 Mrgprd 是否参与调节吗啡导致的便秘, 将同窝对照的小鼠随机分为 4 组, 分别为野生型对照组 (WT ctrl)、Mrgprd 敲除型对照组 (KO ctrl)、野生型 OIC 造模组 (WT OIC)、Mrgprd 敲除型 OIC 造模组 (KO OIC), 按照前述方式进行造模, 并观察其行为学表现。结果观察到 WT 对照组和 KO 对照组之间粪便产生量无显著差异, 但给予吗啡后, 与各自对照组相比, OIC 组粪便产生量均有所下降, 与 KO OIC 组相比, WT OIC 组粪便产生量也显著降低 ($P < 0.0001$, 见图 4A), WT OIC 组粪便含水量显著降低 ($P < 0.001$), KO OIC 组无明显改变 ($P > 0.05$, 见图 4B), 并且 WT OIC 组粪便形态变小变硬 (见图 4D)。取出小鼠结肠观察其长度, 各组间结肠长度无显著差异。然而, 在 WT OIC 组中可见明显成形的粪便潴留, 而 KO

OIC 组粪便潴留现象较轻, 提示 Mrgprd 敲除抑制了 OIC 的发生 (见图 4C)。对上述 4 组小鼠结肠进行 HE 染色, 发现 WT 对照组与 KO 对照组肠道结构之间无明显差异, 但 KO OIC 组与 WT OIC 组相比, 其黏膜下淋巴细胞浸润减少 (见图 4E)。

4. Mrgprd 对肠道中 MOR 表达水平的影响

研究表明, 阿片类药物通过激活肠道 MOR, 抑制胃肠蠕动和分泌功能, 从而导致便秘的发生。然而, Mrgprd 是否参与调控肠道 MOR 的表达仍不明确。为了探究这一问题, 本研究对 Mrgprd 基因敲除 (KO) 小鼠的肠道 MOR 表达情况进行了检测。选取结果 3 中各组小鼠的不同肠道部位 (包括回肠、结肠和直肠) 进行 qPCR 分析, 检测 MOR 基因的表达水平。实验结果显示, 在回肠、结肠和直肠中, 与 WT 对照组相比, KO 对照组及 KO OIC 组的 MOR 基因表达量均未发生显著变化, 表明 Mrgprd 的缺失并不直接影响肠道 MOR 的基础

表达水平。然而,在 WT 小鼠中,经过 OIC 造模后,回肠、结肠和直肠中 MOR 表达量显著上调 ($P < 0.05$, 见图 5A-C),提示阿片类药物可能通过增强 MOR 表达进一步加重便秘症状。与 WT OIC 组相比, KO OIC 组 MOR 表达量显著下调 ($P < 0.05$, 见图 5A-C),提示 Mrgprd 敲除后 MOR 表达量也相应下调,这一结果表明 Mrgprd 可能通过调节 MOR 的表达直接参与了 OIC 的发生。

5. Mrgprd 通过 NF- κ B 通路调控 IL-6 的释放进而调节肠道炎症

对上述 4 组小鼠结肠组织进行荧光定量 PCR 实验,发现在 OIC 造模后,与 WT 对照组相比,WT OIC 组中的 IL-6 mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.001$),而 KO OIC 组升高不明显,且与 WT OIC 组相比,其 IL-6 mRNA 的表达量显著降低 ($P < 0.001$, 见图 6A)。蛋白免疫印迹显示,与 WT 对照组相比,WT OIC 组 NF- κ B 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$),

而 KO OIC 组无显著变化(见图 6B, 6C)。这表明 NF- κ B 通路在 OIC 中被激活,且 Mrgprd 敲除可抑制该通路的炎症反应。

讨 论

OIC 是一种医源性疾病^[14],也是临床上常见但尚未完全解决的难题,严重影响病人的生活质量,并且随着给药时间延长,便秘逐渐加重^[15]。OIC 的发病机制主要归因于阿片类药物通过激活肠道神经系统的 MOR 影响肠道神经元,导致肠道平滑肌蠕动受阻、分泌功能紊乱^[6,16];同时也会影响到肠道微生物群落^[17],产生免疫、氧化应激反应,引发神经系统和全身性炎症反应^[18],加重便秘症状。尽管 MOR 的相关作用机制已被广泛研究,但近年来的研究发现^[19],神经-免疫相互作用和局部炎症环境在 OIC 的发生中也具有重要作用。最近的一项研究表明^[20],

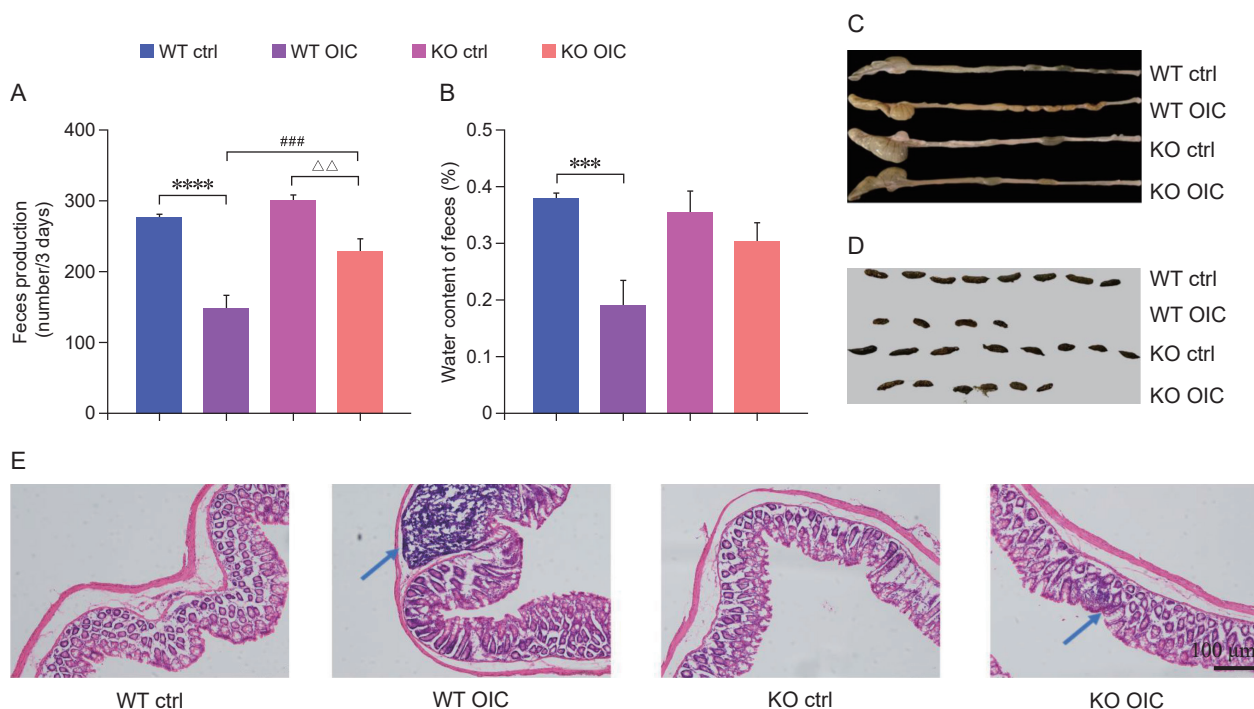


图 4 Mrgprd 对 OIC 的影响 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) 实验期间小鼠粪便产生量; (B) 粪便含水量的差异; (C) 不同组小鼠的结肠形态; (D) 不同组小鼠粪便的形态; (E) 结肠 HE 染色代表图, 标尺 = 100 μ m, 箭头所示为黏膜下浸润的淋巴细胞
*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, WT 造模组与 WT 对照组相比; #### $P < 0.001$, KO 造模组与 WT 造模组相比; $\Delta\Delta P < 0.01$, KO 造模组与 KO 对照组相比

Fig. 4 Effect of Mrgprd on OIC ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) Feces production of mice during the experiment; (B) Differences in fecal water content; (C) Morphology of the colon in different groups of mice; (D) Morphology of the feces in different groups of mice; (E) Representative photos of HE staining of the colon, Scale bar = 100 μ m. The arrows indicate submucosal infiltrating lymphocytes.
*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, WT OIC group compared with WT ctrl group; #### $P < 0.001$, KO OIC group compared with WT OIC group; $\Delta\Delta P < 0.01$, KO OIC group compared with KO control group.

Mrgprd 与其他 Mrgprs (包括 Mrgpra9、Mrgpra2b 等) 在结肠的感觉神经元中表达, 并通过神经-免疫相互作用与引起肠道损伤的刺激物的分泌有一定关系。本研究首次探索了 Mrgprd (一种特异性表达于 DRG 小直径非肽能神经元的 G 蛋白偶联受体) 在 OIC 中的作用, 为理解 OIC 的发生机制提供了新思路。

在本研究中, 通过皮下注射吗啡 (40 mg/kg) 1~3 天, 建立 OIC 小鼠模型, 并探究其病理特征。行为学检测显示, 吗啡给药 3 天组小鼠的粪便数量和含

水量显著减少, 肠道屏障受损, 成功模拟了临床上阿片类药物引起便秘的主要病理特征, 并且后续的 qPCR 结果也表明, 与对照组相比, 吗啡给药 3 天组 MOR 的上调效应显著, 也从侧面印证了模型建立的成功。进一步的实验发现, Mrgprd 基因敲除 (KO) 小鼠 OIC 症状的得到了显著缓解, 行为学指标显示, Mrgprd KO 小鼠在吗啡诱导后, 粪便数量和含水量均较 WT 小鼠显著增加。此外, 组织学结果显示, Mrgprd KO 小鼠的肠道黏膜炎症浸润明显减少,

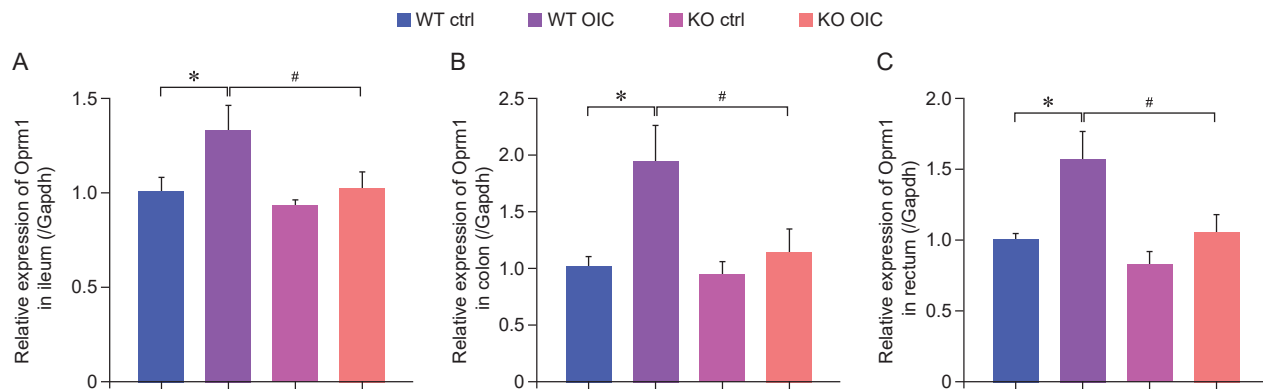


图 5 Mrgprd 对肠道中 MOR 表达水平的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

(A) Mrgprd 对回肠中 MOR 表达水平的影响; (B) Mrgprd 对结肠中 MOR 表达水平的影响; (C) Mrgprd 对直肠中 MOR 表达水平的影响

* $P < 0.05$, WT 造模组与 WT 对照组相比; # $P < 0.05$, KO 造模组与 WT 造模组相比

Fig. 5 Effect of Mrgprd on MOR expression levels in intestine ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

(A) Effect of Mrgprd on MOR expression level in ileum; (B) Effect of Mrgprd on MOR expression level in colon; (C) Effect of Mrgprd on MOR expression level in rectum.

* $P < 0.05$, WT OIC group compared with WT ctrl group; # $P < 0.05$, KO OIC group compared with WT OIC group.

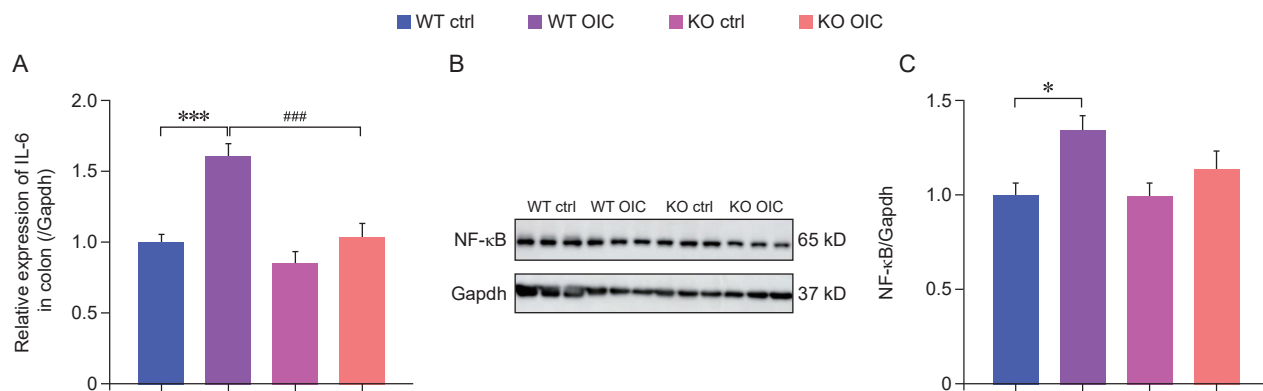


图 6 Mrgprd 通过 NF-κB 通路调控 IL-6 的释放 ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

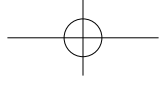
(A) Mrgprd 敲除后对 OIC 造模后小鼠结肠 IL-6 mRNA 的相对表达量的影响; (B, C) Mrgprd 敲除后对 NF-κB 通路激活的影响

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, WT 造模组与 WT 对照组相比; ### $P < 0.001$, KO 造模组与 WT 造模组相比

Fig. 6 Mrgprd regulates IL-6 release through the NF-κB pathway ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

(A) Effect of Mrgprd knockout on the relative expression of IL-6 mRNA in the colon of mice after OIC modelling; (B, C) Effect of Mrgprd knockout on NF-κB pathway activation.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, WT OIC group compared with WT ctrl group; ### $P < 0.001$, KO OIC group compared with WT OIC group.



肠壁结构保持相对完整。这表明 Mrgprd 在 OIC 发展过程中通过调控神经炎症可能起到了重要作用。

如前所述, MOR 是 OIC 发生的核心靶点, 其主要表达在整个消化道的肠肌层和黏膜下层神经元上^[21], 故其在调节胃肠道转运、黏膜转运液体和电解质以及维持胃肠道平衡方面发挥着重要作用^[22,23]。本研究通过 qPCR 技术分析了肠道 MOR 的表达情况, 基因敲除小鼠对照组结果显示, Mrgprd 的缺失对肠道 MOR 的基础表达无显著影响, 说明 Mrgprd 不直接调控 MOR 的表达水平。然而, 在 OIC 模型中, WT 小鼠的肠道 MOR 表达显著上调, 与 WT OIC 组相比, KO OIC 组小鼠中 MOR 的上调效应明显减弱。这提示 Mrgprd 可能对 OIC 中 MOR 的诱导性表达具有一定的抑制作用, 间接参与了 OIC 的发生; 此外, 吗啡作为阿片受体激动剂, 结果中 MOR 的表达上调也可能是吗啡作用的结果。阿片类药物通过促进 MOR 的过表达可加剧肠道神经网络的紊乱, 而 Mrgprd 可能通过神经肽、细胞因子、肠道神经元以及转录因子等机制调控 MOR 的表达, 同时改善肠道功能, 具体机制可能与改善炎症水平有关。

本研究中 Mrgprd KO 小鼠的肠道炎症水平显著降低, 这可能与 Mrgprd 在 DRG 和肠道局部神经网络中的作用有关。HE 染色结果显示, Mrgprd 缺失减少了肠道黏膜下的淋巴细胞浸润, 表明 Mrgprd 可能通过调控神经-炎症相互作用参与 OIC 的发生机制。已有文献报道^[24], Mrgprs 家族与肠道局部免疫反应及其神经支配密切相关, 且肠壁各类自身细胞并不表达 Mrgprd^[25], 而是通过支配肠道的外源性 DRG 神经元来发挥作用, 表明 Mrgprd 在肠道中的作用类似于 Mrgpra3 和 Mrgprc11^[13]。Mrgprd 的缺失可能中断了该神经-免疫环路, 从而减轻局部炎症反应, 并缓解 OIC 症状。本研究结果验证了这一假设, 提示 Mrgprd 可能通过影响肠道局部神经-免疫调控网络, 从而间接参与 OIC 的发生。已有研究表明, Mrgprd 激活后导致 IkB 激酶介导的 NF- κ B 激活以及 IL-6 的释放^[26], 且有研究表明^[27], 肠道中促炎细胞因子 IL-6 的释放可能与吗啡诱导的便秘有关。在本研究中结果显示, 对 Mrgprd KO 小鼠便秘造模后, 其结肠组织中促炎因子 IL-6 的 mRNA 表达水平显著降低, 表明 DRG 中的 Mrgprd 可能通过调控 IL-6 促炎因子的表达, 影响神经炎症过程。通过蛋白免疫印迹实验, 本研究发现在 Mrgprd KO OIC 组小鼠结肠组织中, NF- κ B 的表达显著下调, 从而使其下游的 IL-6 的释放相应减少, 而 WT OIC 组小鼠 NF- κ B 表达显著上调, IL-6 的释放也随之升高, 表明

Mrgprd 可能通过调控 NF- κ B 通路刺激 IL-6 的释放来调节 OIC 过程中的炎症反应。

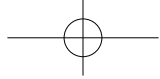
本研究存在的局限性: 第一, 实验中未进一步鉴别肠道浸润淋巴细胞的种类, 以及这些淋巴细胞的募集在 OIC 中发挥的作用, 这可能会限制对 Mrgprd 在肠道炎症中具体作用的理解。且在 Mrgprd 调控 MOR 表达的具体机制以及与其他 Mrgprs 家族成员的相互作用未做深入探讨。其次, 本研究基于小鼠模型开展, 而阿片类药物在人类和小鼠中的代谢和反应可能存在差异, 这可能会对研究结果的临床转化有影响。此外, 脑肠轴、肠道菌群以及神经免疫网络等在 OIC 中的潜在作用机制仍值得深入研究。未来研究应着重于深入研究 Mrgprd 在调控肠道 MOR 表达中的具体分子机制, 并结合流式细胞术或免疫组化等实验, 鉴定肠道黏膜下浸润的淋巴细胞类型。同时, 应增加人类组织或血液样本等临床数据, 验证 Mrgprd 和 NF- κ B 通路在人类中的表达和调控机制, 并结合神经成像技术、基因编辑技术以及 16S rRNA 测序技术, 深入探究 Mrgprd 通过脑肠轴、肠道菌群以及神经免疫网络对 OIC 的调控机制, 同时开发靶向 Mrgprd 的特异性拮抗剂或调节剂, 为临床医师提供更精准的治疗策略, 为病人提供更安全、有效的临床解决方案。

综上所述, 本研究发现 DRG 中 Mrgprd 调控肠道 MOR 的诱导性表达, 并且通过 NF- κ B 通路调节肠道局部炎症环境在 OIC 的发生中发挥重要作用, 提示靶向 Mrgprd 可能为阿片类药物引起的便秘提供一种全新的治疗思路, 并为解决 OIC 的临床问题提供了理论依据。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 王稳, 孙莉. 阿片类药物相关性便秘的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2016, 22(5):378-382.
- [2] 吴鸽, 林沈嫻, 朱奇, 等. 阿片类药物是否穷途末路? [J]. 中国疼痛医学杂志, 2021, 27(3):212-215.
- [3] Farmer AD, Holt CB, Downes TJ, *et al.* Pathophysiology, diagnosis, and management of opioid-induced constipation[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3(3):203-212.
- [4] Müller-Lissner S, Bassotti G, Coffin B, *et al.* Opioid-induced constipation and bowel dysfunction: a clinical guideline[J]. *Pain Med*, 2017, 18(10):1837-1863.
- [5] Candy B, Jones L, Vickerstaff V, *et al.* Mu-opioid antagonists for opioid-induced bowel dysfunction in people with cancer and people receiving palliative care[J].



- Cochrane Database Syst Rev, 2022, 9(9):Cd006332.
- [6] Pergolizzi JV Jr, Christo PJ, LeQuang JA, *et al.* The use of peripheral μ -opioid receptor antagonists (pamora) in the management of opioid-induced constipation: an update on their efficacy and safety[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:1009-1025.
- [7] Ghoshal A. Fentanyl, Morphine, and opioid-induced constipation in patients with cancer-related pain[J]. *Indian J Palliat Care*, 2020, 26(4):535-536.
- [8] Abu Y, Vitari N, Yan Y, *et al.* Opioids and sepsis: elucidating the role of the microbiome and microRNA-146[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3):1097.
- [9] Seguela L, Gulbransen BD. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(8): 571-587.
- [10] Zhang L, Meng J, Ban Y, *et al.* 傅青岳, 富丹妮 (译). 肠道微生态失衡与吗啡耐受: 吗啡耐受在无菌小鼠中减弱并能被益生菌所逆转 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2020, 26(9):645-648.
- [11] Serhan N, Cenac N, Basso L, *et al.* Mas-related G protein-coupled receptors (Mrgprs)-Key regulators of neuroimmune interactions[J]. *Neurosci Lett*, 2021, 749: 135724.
- [12] Xu M, Li J, Zhang Z, *et al.* Mas-related G protein-coupled receptor D is involved in modulation of murine gastrointestinal motility[J]. *Exp Physiol*, 2021, 106(12):2502-2516.
- [13] Bautzova T, Hockley JRF, Perez-Berezo T, *et al.* 5-oxoETE triggers nociception in constipation-predominant irritable bowel syndrome through MAS-related G protein-coupled receptor D[J]. *Sci Signal*, 2018, 11(561): eaal2171.
- [14] Imam MZ, Kuo A, Ghassabian S, *et al.* Intracerebroventricular administration of CYX-6, a potent μ -opioid receptor agonist, a δ - and κ -opioid receptor antagonist and a biased ligand at μ , δ & κ -opioid receptors, evokes antinociception with minimal constipation and respiratory depression in rats in contrast to morphine[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 871:172918.
- [15] Cuménal M, Selvy M, Kerckhove N, *et al.* The safety of medications used to treat peripheral neuropathic pain, Part 2 (opioids, cannabinoids and other drugs): review of double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trials[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2021, 20(1):51-68.
- [16] Hughes PA, Costello SP, Bryant RV, *et al.* Opioidergic effects on enteric and sensory nerves in the lower GI tract: basic mechanisms and clinical implications[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 311(3): G501-513.
- [17] Wang F, Meng J, Zhang L, *et al.* Morphine induces changes in the gut microbiome and metabolome in a morphine dependence model[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):3596.
- [18] Thomas KR, Watt J, Wu CMJ, *et al.* Pain and opioid-induced gut microbial dysbiosis[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(8):1815.
- [19] Bhawe S, Gade A, Kang M, *et al.* Connexin-purinergic signaling in enteric glia mediates the prolonged effect of morphine on constipation[J]. *Faseb J*, 2017, 31(6): 2649-2660.
- [20] Hockley JRF, Taylor TS, Callejo G, *et al.* Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron[J]. *Gut*, 2019, 68(4):633-644.
- [21] DeHaven-Hudkins DL, DeHaven RN, Little PJ, *et al.* The involvement of the μ -opioid receptor in gastrointestinal pathophysiology: therapeutic opportunities for antagonism at this receptor[J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 117(1):162-187.
- [22] Kurz A, Sessler DI. Opioid-induced bowel dysfunction: pathophysiology and potential new therapies[J]. *Drugs*, 2003, 63(7):649-671.
- [23] Sobczak M, Sałaga M, Storr MA, *et al.* Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives[J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(1):24-45.
- [24] Van Remoortel S, Timmermans JP. Mas-related G protein-coupled receptors (Mrgprs) as mediators of gut neuro-immune signaling[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, 1383:259-269.
- [25] Van Remoortel S, Timmermans JP. Presence of MrgprD within the gastrointestinal wall: reality or fake?[J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 378(3):555-558.
- [26] Arora R, Van Theemsche KM, Van Remoortel S, *et al.* Constitutive, Basal, and β -alanine-mediated activation of the human mas-related G protein-coupled receptor D induces release of the inflammatory cytokine IL-6 and is dependent on NF- κ B signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24):13254.
- [27] Gao H, Zhang Y, Li Y, *et al.* μ -Opioid receptor-mediated enteric glial activation is involved in morphine-induced constipation[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(7):3061-3070.