

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00164

· 论 著 ·

# A型肉毒毒素抑制外源性乙酰胆碱及P物质引发的大鼠离体食管下括约肌收缩增强

李超彦<sup>1</sup>, 于海英<sup>1</sup>, 周媛媛<sup>1</sup>, 任亮<sup>1</sup>, 楚宪襄<sup>2\*</sup>

1. 漯河医学高等专科学校基础医学部, 漯河 462002

2. 郑州大学基础医学院解剖学教研室, 郑州 450000

**[摘要]** **目的** 观察A型肉毒毒素(BTX-A)对大鼠食管下括约肌离体肌条自发性收缩及乙酰胆碱(ACh)、P物质(SP)引发的收缩增强是否存在抑制作用,并探讨其作用机制。**方法** 剪取食管下括约肌制备肌条并随机分为对照组、BTX-A组、ACh组、ACh+BTX-A组、ACh+阿托品组、SP组、SP+NK<sub>1</sub>受体拮抗剂(APTL)-SP组、SP+BTX-A组,采用Biopac420E生物机能实验系统记录肌条在不同条件下的收缩变化。**结果** BTX-A降低食管下括约肌自发性收缩张力及振幅( $P<0.05$ ); ACh可增强食管下括约肌收缩张力及振幅( $P<0.01$ ),而BTX-A、阿托品均可抑制ACh的增强效应( $P<0.01$ ); SP可增强食管下括约肌收缩张力( $P<0.01$ ),其增强效应均可被BTX-A、APTL-SP所抑制( $P<0.01$ )。**结论** ACh、SP可增强食管下括约肌的收缩能力,而BTX-A可抑制其引发的收缩增强效应。

**[关键词]** A型肉毒毒素;乙酰胆碱;P物质;食管下括约肌**[中图分类号]** R 333.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0164-03

## Inhibitory effect of botulinum toxin type A against exogenous ACh- and substance P-induced contraction of rat lower esophageal sphincter *in vitro*

LI Chao-yan<sup>1</sup>, YU Hai-ying<sup>1</sup>, ZHOU Yuan-yuan<sup>1</sup>, REN Liang<sup>1</sup>, CHU Xian-xiang<sup>2\*</sup>

1. School of Basic Medical Sciences, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan, China

2. Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan, China

**[Abstract]** **Objective** To study whether botulinum toxin type A (BTX-A) can inhibit the spontaneous and acetylcholine (ACh)- or substance P (SP)-induced contraction of rat lower esophageal sphincter *in vitro*, and to discuss the related mechanism. **Methods** The lower esophagus muscle strips were taken from Sprague-Dawley rats and were randomly divided into control group, BTX-A group, ACh group, ACh+BTX-A group, ACh+Atropine group, SP group, SP+APTL-SP group and SP+BTX-A group. The contractile graph of the muscle strips was recorded by physiological experimental system Biopac-420E. **Results** BTX-A significantly decreased the spontaneous contractile tension and amplitude in the lower esophageal sphincter ( $P<0.05$ ). ACh significantly enhanced the contractile tension and amplitude in the lower esophageal sphincter ( $P<0.01$ ), which could be significantly inhibited by both BTX-A and Atropine ( $P<0.01$ ). SP significantly enhanced the contractile tension in the lower esophageal sphincter ( $P<0.01$ ), which could be significantly inhibited by both BTX-A and APTL-SP ( $P<0.01$ ). **Conclusion** ACh and SP can enhance the spontaneous contractility of lower esophageal sphincter. BTX-A can inhibit ACh- and SP-induced enhancement of lower esophageal sphincter contraction.

**[Key words]** botulinum toxin type A; acetylcholine; substance P; lower esophageal sphincter

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2):164-166]

A型肉毒毒素(botulinum toxin type A, BTX-A) 是由肉毒杆菌在厌氧环境下产生的一种神经毒素,已

**[收稿日期]** 2012-11-28 **[接受日期]** 2013-01-04**[基金项目]** 河南省教育厅自然科学研究课题(2011C310012), 漯河医学高等专科学校自然科学研究课题(2010S11). Supported by Natural Science Research Program of The Education Department of Henan Province (2011C310012) and Natural Science Research Program of Luohe Medical College (2010S11).**[作者简介]** 李超彦, 硕士, 讲师. E-mail: lichao2010@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0371-67781959, E-mail: nanshan2008@126.com

有研究表明 BTX-A 可抑制食管下括约肌(lower esophageal sphincter, LES)的自发性收缩及电场刺激引发的收缩增强<sup>[1-2]</sup>。乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、P物质(substance P, SP)均参与调节 LES 收缩,可导致食管体部正常蠕动消失及吞咽时 LES 松弛不良<sup>[3-4]</sup>。本实验拟研究 BTX-A 对 ACh、SP 引发的 LES 收缩是否存在抑制作用,并探讨其可能的机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 96 只,体质量 280~320 g,雌雄不拘,由郑州大学医学院实验动物中心提供。ACh、阿托品(Atropine)、SP 和 NK<sub>1</sub> 受体拮抗剂 [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>]-SP(APTL-SP)均购自美国 Sigma 公司;冻干 BTX-A(100 U/安瓿,兰州生物制品研究所, -20℃ 闭光保存);其余试剂均为国产分析纯。HW-400S 恒温平滑肌槽、Biopac420E 生物机能实验系统(四川成都泰盟科技有限公司);JH-2 型张力传感器(北京航天医学工程研究所)。

1.2 方法 实验前大鼠禁食 18~24 h,饮水自由。实验时叩击其头部致昏后剖腹,剪取食管下段及部分胃底组织,沿长轴切开后剥离黏膜及结缔组织,于食管和胃交界处偏上采用自制切割器剪取食管下括约肌制备长 8 mm、宽 2 mm 的肌条。肌条在 1 g 的前负荷下温育于预充满 37℃ Krebs 液的恒温平滑肌槽中,肌槽内持续供给 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气体。肌条温育 30 min 后,以出现自发性收缩为标准作为实验对象。以上述方法制备 96 条 LES 肌条并随机分为 8 组,每组 12 条:(1)对照组,以离体平滑肌条自发性收缩张力及振幅作为对照;(2)BTX-A 组,在自发性收缩的条件下,加入 BTX-A(10 U/mL)后记录 30 min;(3)ACh 组,在自发性收缩的条件下,加入 ACh(100 μmol/L)后记录 30 min;(4)ACh+BTX-A 组,在自发性收缩的条件下,加入 ACh(100 μmol/L)记录 30 min 后,再加入 BTX-A(10 U/mL)记录 30 min;(5)ACh+Atropine 组,在自发性收缩的条件下,加入 ACh(100 μmol/L)记录 30 min 后,再加入 Atropine(1 μmol/L)记录 30 min;(6)SP 组,在自发性收缩的条件下,加入 SP(1 μmol/L)后记录 30 min;(7)SP+APTL-SP 组;(8)SP+BTX-A 组,在自发性收缩的条件下,加入 SP(1 μmol/L)记录 30 min 后,分别加入 APTL-SP(1 μmol/L)或 BTX-A(10 U/mL)再连续记录 30 min。采用 Bio-

pac420E 生物机能实验系统同步记录各组平滑肌条收缩曲线,并测量收缩曲线对应的张力及振幅值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 BTX-A 抑制 ACh 引发的 LES 平滑肌收缩增强 与对照组比较,BTX-A 组在加入 BTX-A 后 5 min 内 LES 自发性收缩张力及振幅均出现降低( $P < 0.05$ ),持续记录 30 min 未见收缩张力及振幅回升;ACh 组 LES 平滑肌收缩张力及振幅增加( $P < 0.01$ )。与 ACh 组比较,ACh+BTX-A 组在加入 BTX-A 后 LES 平滑肌收缩迅速而持久地下降,表现为收缩张力及振幅的下降( $P < 0.01$ );ACh+Atropine 组在加入 ACh 的拮抗剂 Atropine 后 LES 平滑肌收缩张力及振幅也均下降( $P < 0.01$ ),类似于 ACh+BTX-A 组加入 BTX-A 后的作用效果。见表 1。

表 1 BTX-A、ACh 对大鼠 LES 平滑肌收缩的作用

Tab 1 Effect of BTX-A and ACh on spontaneous contraction of rat smooth muscle strips of lower esophageal sphincter *in vitro*

<i>n</i> = 12, $\bar{x} \pm s$ , m/g		
Group	Tension	Amplitude
Control	1.21 ± 0.03	0.65 ± 0.05
BTX-A	1.07 ± 0.02*	0.46 ± 0.04*
ACh	2.13 ± 0.06**	1.07 ± 0.07**
ACh+BTX-A	1.27 ± 0.02△△	0.51 ± 0.11△△
ACh+Atropine	1.19 ± 0.05△△	0.50 ± 0.04△△

BTX-A: Botulinum toxin type A; ACh: Acetylcholine; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group; △△  $P < 0.01$  vs ACh group

2.2 BTX-A 抑制 SP 引发的 LES 平滑肌收缩增强 在 LES 平滑肌自发性收缩状态下,BTX-A 组在加入 BTX-A 后 LES 自发性收缩张力及振幅与对照组比较下降( $P < 0.05$ ),持续记录 30 min 收缩波形未见明显改变,提示 BTX-A 可抑制 LES 自发性收缩。与对照组比较,SP 组 LES 平滑肌收缩张力增加( $P < 0.01$ ),而振幅变化不明显,连续记录 30 min 内波形未见明显变化;再加入 SP 特异性拮抗剂 APTL-SP 后,LES 平滑肌收缩波形幅度降低,表现为收缩张力下降( $P < 0.01$ )。SP+BTX-A 组与 SP 组比较,LES 平滑肌收缩张力及振幅均降低( $P < 0.01$ ),且持续记录 30 min 内 LES 收缩波形未见变化。见表 2。

表 2 BTX-A、SP 对大鼠 LES 平滑肌收缩的作用

Tab 2 Effect of BTX-A and SP on spontaneous contraction of rat smooth muscle strips of lower esophageal sphincter *in vitro*

*n* = 12,  $\bar{x} \pm s$ , m/g

Group	Tension	Amplitude
Control	1.21 ± 0.03	0.65 ± 0.05
BTX-A	1.07 ± 0.02*	0.46 ± 0.04*
SP	1.69 ± 0.04**	0.72 ± 0.07
SP+APTL-SP	1.18 ± 0.06 $\Delta\Delta$	0.64 ± 0.04
SP+BTX-A	1.24 ± 0.03 $\Delta\Delta$	0.43 ± 0.03 $\Delta\Delta$

BTX-A: Botulinum toxin type A; SP: Substance P; APTL-SP: [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>]-substance P. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs control group;  $\Delta\Delta$  *P* < 0.01 vs SP group

### 3 讨论

贲门失弛缓症是以食管体部正常蠕动功能丧失及 LES 不能松弛或松弛不完全为特征的食管运动功能障碍性疾病,目前多认为贲门失弛缓症属于神经源性疾病<sup>[5]</sup>。LES 紧张度源于并依赖于肠神经系统(enteric nervous system,ENS)的调控协调作用,LES 的兴奋主要是由 ACh 介导,SP 同样参与了 LES 的兴奋,而 LES 的松弛是由多种神经递质相互影响而产生的<sup>[3,5]</sup>。ENS 内抑制性神经元受损,导致其分泌的抑制性神经递质减少<sup>[6]</sup>;而 ENS 释放的兴奋性神经递质 ACh、SP 则相对增多,LES 的兴奋性占优势,导致 LES 的松弛不良、痉挛<sup>[7]</sup>。

研究发现,BTX-A 既可选择性地作用于横纹肌外周胆碱能神经末梢,抑制其 ACh 释放而产生肉毒效应<sup>[1]</sup>,还可抑制大鼠离体 LES、胃体、胃底平滑肌自发性收缩及电场刺激引发的收缩增强<sup>[2,8]</sup>。BTX-A 对胃肠平滑肌收缩的机制目前尚不明确,推测可能与 BTX-A 通过肉毒效应破坏或阻断突触前膜囊泡释放 ACh、SP 有关。本研究以外源性 ACh、SP 作用于 LES 平滑肌的收缩,观察 BTX-A 是否抑制 ACh、SP 引发的 LES 收缩增强,同时以 ACh、SP 特异性的拮抗剂 Atropine、APTL-SP 作为对比,结果显示 BTX-A 可抑制 ACh、SP 引发的 LES 收缩增强,拮抗效果类似 Atropine、APTL-SP 的作用。

外源性 ACh 可扩散到达突触后膜,与其特异性 M 型胆碱受体结合而发挥增强平滑肌收缩的作用,Atropine 可竞争性地与 M 型胆碱受体结合而阻断 ACh 增强 LES 收缩的效用<sup>[9]</sup>;本研究发现 BTX-A 同样可抑制 ACh 的兴奋作用,与 Atropine 效用类似,推

测 BTX-A 对平滑肌突触后膜同样存在抑制效用,作用类似于 Atropine 与 M 型胆碱受体的竞争性结合,或通过肉毒效用直接破坏突触后膜上的 M 型胆碱受体空间结构。外源性 SP 经扩散通过突触间隙与突触后膜上的 NK<sub>1</sub>受体结合,进而激活 Ca<sup>2+</sup>通道,促进 Ca<sup>2+</sup>内流,引发平滑肌收缩增强,APTL-SP 通过竞争性地与 NK<sub>1</sub>受体结合阻断 SP 作用<sup>[9]</sup>。在 SP+BTX-A 组,SP 增强 LES 收缩能力被抑制,推测 BTX-A 作用可能类同于 APTL-SP 竞争性地阻断 SP 与后膜 NK<sub>1</sub>受体的结合而发挥效用,或通过肉毒效应直接破坏 NK<sub>1</sub>受体空间结构而发挥抑制作用。BTX-A 的效用类似 Atropine、APTL-SP,提示其可抑制后膜的去极化而发挥作用,但其作用机制尚需进一步证实。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] James A N, Ryan J P, Parkman H P. Inhibitory effects of botulinum toxin on pyloric and antral smooth muscle [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285:G291-G297.
- [2] 周媛媛,李超彦,楚宪襄. A 型肉毒毒素抑制大鼠离体食管下括约肌收缩的实验研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2012, 27:932-933.
- [3] Metzger M. Neurogenesis in the enteric nervous system [J]. *Arch Ital Biol*, 2010, 148:73-83.
- [4] Shahbazian A, Holzer P. Differences in circular muscle contraction and peristaltic motor inhibition caused by tachykinin NK<sub>1</sub> receptor agonists in the guinea-pig small intestine [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2000, 12:197-204.
- [5] Pohl D, Tutuian R. Achalasia: an overview of diagnosis and treatment [J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2007, 16: 297-303.
- [6] 张晓艳,谢鹏雁. 食管肠神经系统调控的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17:790-797.
- [7] Williams V A, Peters J H. Achalasia of the esophagus: a surgical disease [J]. *J Am Coll Surg*, 2009, 208:151-162.
- [8] 周媛媛,李超彦,侯一平. A 型肉毒毒素对 P 物质所致大鼠胃体、胃底离体平滑肌收缩的抑制作用[J]. *第二军医大学学报*, 2012, 33:1074-1076.
- [9] Zhou Y Y, Li C Y, Hou Y P. Inhibitory effect of botulinum toxin type A on SP-induced rat smooth muscle contractility of gastric body and gastric fundus *in vitro* [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2012, 33:1074-1076.
- [9] 杨宝峰. 药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:72-75.

[本文编辑] 周燕娟,尹 茶