

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

周媛媛^{1,2}, 李超彦¹, 侯一平^{2*}

1. 漯河医学高等专科学校基础医学部, 漯河 462002

2. 兰州大学基础医学院神经生物学研究室, 兰州 730000

[摘要] **目的** 观察A型肉毒毒素(botulinum toxin type A, BTX-A)对P物质(substance P, SP)所致肌条收缩的影响, 探讨BTX-A在SP与NK₁受体结合过程中可能存在的机制。**方法** 取大鼠胃体、胃底平滑肌制备肌条并随机分为对照组、SP组、SP+APTL-SP(NK₁受体拮抗剂)组、BTX-A组、BTX-A+SP组、SP+BTX-A组, 采用Biolap420E生物机能实验系统记录肌条收缩数据。**结果** SP增加胃体平滑肌自发性收缩张力及振幅、胃底平滑肌自发性收缩张力(P 均 <0.01); APTL-SP降低SP引发的胃体、胃底平滑肌收缩张力($P<0.01$); BTX-A作用后的胃体、胃底平滑肌条振幅降低(P 均 <0.01)。BTX-A降低SP引发的胃体($P<0.05, P<0.01$)、胃底(P 均 <0.01)平滑肌自发性收缩张力及振幅; SP对BTX-A作用后的胃体、胃底平滑肌收缩能力未产生增强作用。**结论** SP可增强胃体、胃底平滑肌收缩能力, 而BTX-A可抑制SP对胃体、胃底平滑肌的收缩作用。

[关键词] A型肉毒毒素; P物质; 胃体; 胃底; 平滑肌**[中图分类号]** R 333.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)10-1074-03

Inhibitory effect of botulinum toxin type A on SP-induced rat smooth muscle contractility of gastric body and gastric fundus *in vitro*

ZHOU Yuan-yuan^{1,2}, LI Chao-yan¹, HOU Yi-ping^{2*}

1. Department of Basic Medicine, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan, China

2. Laboratory of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of botulinum toxin type A (BTX-A) on the SP-induced smooth muscle contractility of gastric body and gastric fundus, so as to investigate the role of BTX-A in the binding between SP and NK₁ receptor. **Methods** Muscle strips were prepared from gastric body and gastric fundus and were randomly divided into control group, SP group, SP+APTL-SP (NK₁ receptor antagonist) group, BTX-A group, BTX-A+SP group, and SP+BTX-A group. The contractility data were recorded by physiological experimental system of Biolap420E. **Results** SP significantly enhanced the tension and amplitude of gastric body contractility and the tension of gastric fundus contractility ($P<0.01$). APTL-SP significantly inhibited SP-induced smooth muscle contractility tension in gastric body and gastric fundus ($P<0.01$). BTX-A significantly inhibited the smooth muscle contractility amplitude in gastric body and gastric fundus ($P<0.01$). BTX-A significantly inhibited SP-induced smooth muscle contractility, including the tension ($P<0.05, 0.01$) and amplitude ($P<0.01$) in the gastric body and gastric fundus. After BTX-A treatment, SP did not enhance the smooth muscle contractility of the gastric body and gastric fundus *in vitro*. **Conclusion** SP can enhance the spontaneous contractility of smooth muscle in the gastric body and gastric fundus; BTX-A can inhibit SP-induced smooth muscle contractility of both gastric body and gastric fundus.

[Key words] botulinum toxin A; substance P; gastric body; gastric fundus; smooth muscle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10):1074-1076]

我们前期研究表明A型肉毒毒素(botulinum toxin type A, BTX-A)对大鼠幽门及胃窦离体平滑肌自发性收缩和P物质(substance P, SP)引发的收

缩存在抑制作用^[1-2],但也有BTX-A未抑制SP引起的豚鼠幽门部离体平滑肌的收缩的报道^[3]。本研究通过外源性SP加入大鼠胃体、胃底离体平滑肌,观

[收稿日期] 2012-05-11 **[接受日期]** 2012-07-05**[基金项目]** 河南省教育厅自然科学研究项目(2011C310012), 兰州大学医学基金资助项目(LZUYX200605)。Supported by Natural Science Research Program of Education Department of Henan Province(2011C310012) and Project of Medical Research of Lanzhou University(LZUYX200605)。**[作者简介]** 周媛媛, 硕士, 讲师。E-mail: manping0603@126.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 0931-8915868, E-mail: houyping@lzu.edu.cn

察 BTX-A 对外源性 SP 所致平滑肌收缩的影响,并探讨其可能机制,为临床应用 BTX-A 治疗胃肠道动力学相关疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 SD 大鼠 72 只,体质量 280~320 g,雌雄不限,由兰州大学实验动物中心提供。SP、NK₁ 受体拮抗剂 [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-substance P (APTL-SP, 美国 Sigma 公司); 冻干 BTX-A (每安瓿 100 U, -20℃ 闭光保存, 兰州生物制品研究所); HW-400S 恒温平滑肌槽, Biolap420E 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 大鼠实验前禁食 18~24 h, 自由饮水。叩击大鼠头部致昏后剖腹剪取胃体、胃底环形平滑肌各 1 条(长 8 mm、宽 2 mm)。肌条在 1 g 的前负荷下于恒温平滑肌槽中温育 30 min, 铂金电极连接刺激器置于肌条两侧并与其长轴平行, 以出现自发性收缩为入组标准。将胃体、胃底平滑肌条均随机分为 6 组, 每组各 12 条: 对照组, 以离体平滑肌肌条的自发性收缩张力及振幅为对照; SP 组在自发性收缩的条件下, 加入 SP (1 μmol/L) 后记录 30 min; SP+BTX-A 组及 SP+APTL-SP 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 BTX-A (10 U/ml) 或 APTL-SP (1 μmol/L) 再连续记录 30 min; BTX-A 组在自发性收缩的条件下, 加入 BTX-A (10 U/ml) 并记录 30 min; BTX-A+SP

组, 在自发性收缩的条件下, 加入 BTX-A (10 U/ml) 记录 30 min 后, 再加入 SP (1 μmol/L) 并连续记录 30 min。采用 Biolap420E 生物机能实验系统同步记录各组平滑肌肌条收缩曲线。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 SP 及 APTL-SP 对大鼠胃体、胃底平滑肌自发性收缩的影响 平滑肌肌条出现自发性收缩且波形平稳约 30 min 后, 加入 SP 后立即引起胃体平滑肌自发性收缩张力及振幅增加 ($P < 0.01$, 表 1, 图 1A1), 但胃底平滑肌仅出现自发性收缩张力增加 ($P < 0.01$, 表 1, 图 1B1)。平滑肌肌条继续温育 30 min 后加入 APTL-SP, 胃体、胃底平滑肌收缩力均下降 ($P < 0.01$, 表 1, 图 1A1, 1B1), 但未见其对 SP 作用后胃体、胃底收缩振幅幅度产生影响。

2.2 BTX-A 抑制 SP 引发的大鼠胃体、胃底平滑肌收缩增强作用 在胃体、胃底平滑肌自发性收缩状态下加入 BTX-A 后, 胃体、胃底平滑肌收缩振幅幅度出现了降低 ($P < 0.01$, 表 1, 图 1A2、图 1B2); 持续记录 30 min 后加入 SP, 胃体、胃底平滑肌条收缩张力及收缩振幅均未见明显变化。胃体、胃底平滑肌在自发性收缩状态下加入 SP 后出现收缩增强, 记录 30 min 后再加入 BTX-A, 发现胃体、胃底平滑肌收缩张力及收缩振幅均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表 1, 图 1A3、1B3)。

表 1 SP、BTX-A 对大鼠胃体、胃底离体平滑肌收缩的作用

Tab 1 Effect of SP and BTX-A on *in vitro* contraction of gastric body and gastric fundus smooth muscle in rats

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

Group	Gastric body		Gastric fundus	
	Tension	Amplitude	Tension	Amplitude
Control	1.07±0.01	0.24±0.03	0.96±0.08	0.35±0.03
SP	1.35±0.06**	0.51±0.04**	1.59±0.02**	0.33±0.03
SP+APTL-SP	0.85±0.02△△	0.36±0.02	1.11±0.03△△	0.34±0.01
BTX-A	0.96±0.03	0.10±0.02**	0.99±0.03	0.14±0.04**
BTX-A+SP	0.95±0.01	0.11±0.01	1.01±0.01	0.16±0.02
SP+BTX-A	1.17±0.01△	0.12±0.02△△	0.95±0.02△△	0.13±0.01△△

SP: Substance P; APTL-SP; NK₁ receptor antagonist [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-SP; BTX-A: Botulinum toxin type A. ** $P < 0.01$ vs control group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs SP group

3 讨论

SP 能神经胞体存在于肠肌间神经丛内, 产生的 SP 对胃肠道平滑肌具有兴奋作用, SP 通过与突触后膜适宜受体 NK₁ 的结合, 激活 Ca²⁺ 通道, 促进 Ca²⁺ 内流、cAMP 增加, 引起平滑肌收缩^[4]。BTX-A 与受体结合, 通过内吞进入突触前膜, 其重链在内

吞体膜形成通道, 将轻链导入胞浆, 轻链裂解质膜蛋白 (syntaxin)、突触相关蛋白 (synaptosomal associated protein 25 000, SNAP-25) 及囊泡膜蛋白, 阻断胞吐发生, 从而抑制突触前膜乙酰胆碱 (ACh) 释放, 导致平滑肌松弛或麻痹^[5-6]。

研究发现大鼠胃窦及幽门注射 BTX-A 可导致胃肌电慢波振幅减弱^[7], 并可抑制大鼠幽门、胃窦离体

平滑肌的自发性收缩及 SP 引发的平滑肌收缩^[1-2]。临床上 BTX-A 常用于贲门失弛缓症^[8]、奥狄括约肌痉挛^[9]、糖尿病胃轻瘫^[10-11]等平滑肌疾病的治疗,提示 BTX-A 可通过对平滑肌收缩的抑制作用达到治疗效应,但目前机制不明。BTX-A 对平滑肌收缩的抑制可能存在与骨骼肌相似的作用机制,如通过抑制突

触前膜或改变后膜受体/离子通道活性实现。我们前期实验发现 BTX-A 可抑制大鼠幽门、胃窦离体平滑肌的自发性收缩及电场刺激引发的平滑肌收缩^[12],说明可能存在类似骨骼肌的前膜抑制作用;本实验通过观察 BTX-A 对外源性 SP 所致胃体、胃底平滑肌收缩的影响,探讨其可能存在的对后膜的作用。

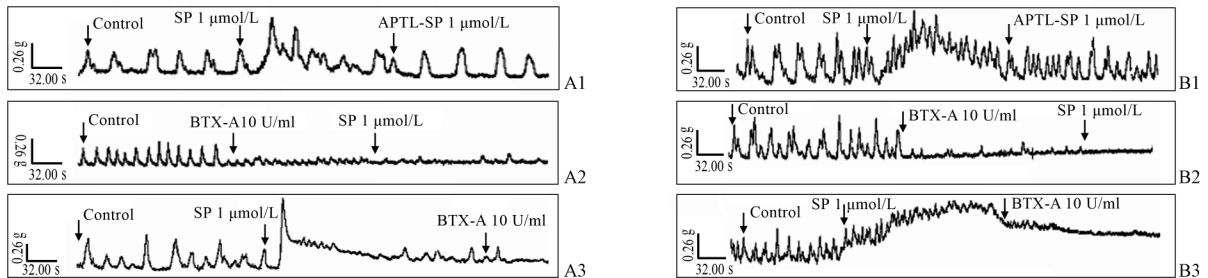


图 1 胃体平滑肌(A1-A3)和胃底平滑肌(B1-B3)加入 SP、BTX-A 后的收缩变化

Fig 1 Smooth muscle contraction of gastric body (A1-A3) and gastric fundus (B1-B3) in response to SP and BTX-A

A1,B1: SP+APTL-SP group; A2,B2: BTX-A+SP group; A3,B3: SP+BTX-A group; SP: Substance P; APTL-SP: NK₁ receptor antagonist [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-SP; BTX-A: Botulinum toxin type A

本研究结果表明,加入外源性 SP 可显著增加胃体、胃底平滑肌自发性收缩力,APTL-SP 与 BTX-A 均可抑制 SP 引发的胃体、胃底平滑肌收缩增强;而先加入 BTX-A 抑制平滑肌条的收缩后,再加入 SP 并未观察到平滑肌收缩增强,推测 BTX-A 可能既具有类似于抑制神经横纹肌突触前膜的胆碱能末梢释放 ACh 的作用,又具有阻断平滑肌突触后膜去极化的作用,表现为 SP 丧失了增强平滑肌收缩的能力。其机制可能为 BTX-A 通过竞争性结合 NK₁ 受体或直接破坏 NK₁ 受体空间结构,导致外源性 SP 无法与 NK₁ 受体结合而发挥作用;或 BTX-A 直接破坏了突触后膜上的相关离子通道导致后膜去极化能力下降而发挥抑制作用。在 SP+BTX-A 组,加入外源性 SP 后平滑肌收缩能力增强,但加入 BTX-A 后出现胃体、胃底平滑肌的收缩力及振幅均较加入前降低,证实了 BTX-A 可阻断或降低 SP 引发的平滑肌收缩能力增强。James 等^[3]发现 BTX-A 并未抑制 SP 引起的豚鼠幽门部离体平滑肌的收缩,而本研究在成年 SD 大鼠离体胃体、胃底平滑肌均记录到 BTX-A 抑制 SP 引起的收缩增强,推测可能为种间差异或平滑肌取材部位不同所致,幽门与胃体、胃底平滑肌的生理特性有一定的差异性。但在 SP+BTX-A 组,BTX-A 作用后平滑肌收缩力及振幅仍高于对照组,提示其对突触后膜 NK₁ 受体功能的阻断并不完全,其详细作用机制有待于进一步研究探讨。

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] 任银祥,廉会娟,宋焱峰,张雪平,侯一平. A 型肉毒毒素对 P 物质引发的大鼠离体幽门平滑肌收缩的抑制作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2008,6:452-456.
- [2] 周媛媛,郭芙莲,李超彦,侯一平. A 型肉毒毒素对 P 物质引发的胃离体平滑肌收缩的抑制作用[J]. 现代预防医学,2010,37:2142-2143.
- [3] 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.
- [4] Shahbazian A,Holzer P. Differences in circular muscle contraction and peristaltic motor inhibition caused by tachykinin NK₁ receptor agonists in the guinea-pig small intestine[J]. Neurogastroenterol Motil,2000,12:197-204.
- [5] Simpson L L. Identification of the major steps in botulinum toxin action[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol,2004,44:167-193.
- [6] Montecucco C,Papini E,Schiavo G. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism[J]. FEBS Lett,1994,346:92-98.
- [7] 张永平,侯一平,宋焱峰,郝瑞生. A 型肉毒毒素抑制大鼠平滑肌收缩的放射免疫测定[J]. 中国临床康复,2003,7:392-393.
- [8] Lozano-Lanagrán M, Lavín-Castejón I, Alcáin-Martínez G. Treatment of achalasia with botulinum toxin injection guided by endoscopic ultrasonography in a patient with esophageal varices[J]. Rev Esp Enferm Dig,2012,103:663-664.
- [9] Sand J,Nordback I,Arvola P,Pörsti I,Kaloo A,Paasricha P. Effects of botulinum toxin A on the sphincter of Oddi:an *in vivo* and *in vitro* study[J]. Gut,1998,42:507-510.
- [10] Lacy B E,Crowell M D,Schettler-Duncan A,Mathis C,Paasricha P J. The treatment of diabetic gastroparesis with botulinum toxin injection of the pylorus[J]. Diabetes Care,2004,27:2341-2347.
- [11] Thomas M P,Wilson C H,Nayar M,Manus D M,Walker M,Shaw J,et al. Endoscopic botulinum toxin injection for the treatment of diabetic gastropathy in pancreas and islet-cell transplant patients[J]. Exp Clin Transplant,2012,10:168-171.
- [12] 周媛媛,侯一平. A 型肉毒毒素抑制电场刺激引发的胃离体平滑肌收缩[J]. 现代预防医学,2008,35:775-777.

[本文编辑] 周燕娟,邓晓群