

A 型肉毒素抑制电场刺激及乙酰胆碱引发的大鼠胃体胃底离体平滑肌收缩

周媛媛^{1*}, 李超彦², 侯一平³

- (1. 漯河医学高等专科学校解剖教研室,河南 漯河 462002;
2. 漯河医学高等专科学校生理教研室,河南 漯河 462002,
3. 兰州大学基础医学院神经生物研究室,兰州 730000)

[摘要] **目的:**观察大鼠胃体、胃底离体平滑肌条自发性收缩及电场刺激(EFS)、乙酰胆碱(ACh)和 A 型肉毒素(BTX-A)对肌条收缩的影响,并探讨其机制。**方法:**取大鼠胃体胃底平滑肌制备肌条,肌条随机分为对照组、EFS 组、BTX-A (10 U·mL⁻¹)组、BTX-A(10 U·mL⁻¹) + EFS 组、ACh(100 μmol·L⁻¹)组、ACh(100 μmol·L⁻¹) + BTX-A (10 U·mL⁻¹)组、ACh (100 μmol·L⁻¹) + 阿托品(1 μmol·L⁻¹)组,采用 Biolap 420E 生物机能实验系统记录肌条收缩数据。**结果:**EFS 引发胃体平滑肌张力增强($P<0.05$)及振幅增大($P<0.01$),引发胃底平滑肌张力增强($P<0.01$)及振幅增大($P<0.05$);BTX-A 降低胃体平滑肌自发性收缩张力及振幅($P<0.01$),引发胃底平滑肌自发性收缩张力下降($P<0.05$);BTX-A 可抑制 EFS 引发的胃体平滑肌张力增强及振幅增大效应($P<0.01$),对 EFS 引发的胃底平滑肌张力增强($P<0.01$)及振幅增大($P<0.05$)也产生抑制;BTX-A 降低 ACh 引发的胃体胃底平滑肌收缩张力增强及振幅增大($P<0.01$)。**结论:**EFS 可增强胃体胃底平滑肌收缩能力;EFS 对 BTX-A 作用后胃体胃底平滑肌收缩不产生增强作用;BTX-A 可抑制胃体胃底平滑肌自发性收缩及 ACh 引发的收缩。

[关键词] A 型肉毒素;胃体;胃底;乙酰胆碱;电场刺激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0240-04

Inhibitory Effect of Botulinum Toxin Type A on Gastric Body and Gastric Fundus Smooth Muscle Contractility Induced by EFS and ACh-induced in Rats *in vitro*

ZHOU Yuan-yuan^{1*}, LI Chao-yan², HOU Yi-ping³

- (1. Department of Anatomy, Luohe Medical College, Luohe 462002, China;
2. Department of Physiology, Luohe Medical College, Luohe 462002, China;
3. Laboratory of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of botulinum toxin type A (BTX-A), electrical field stimulation (EFS) and acetylcholine (ACh) on spontaneous contractility in gastric body and gastric fundus smooth muscle. **Method:** Muscle strips in gastric body and gastric fundus were prepared, and subdivided randomly into control group, EFS group, BTX-A (10 U·mL⁻¹) group, BTX-A (10 U·mL⁻¹) + EFS group, ACh (100 μmol·L⁻¹) group, ACh (100 μmol·L⁻¹) + BTX-A (10 U·mL⁻¹) group, ACh (100 μmol·L⁻¹) + Atropine (1 μmol·L⁻¹) group. The data were recorded by physiological experimental system of BL-420. **Result:** EFS enhanced the tension ($P<0.05$) and amplitude ($P<0.01$) in gastric body contractility, and similar results was observed in gastric fundus contractility; BTX-A decreased spontaneous contractile tension and amplitude ($P<0.01$) in gastric body and tension ($P<0.05$) in gastric fundus; BTX-A inhibited EFS-induced smooth

[收稿日期] 20120314(003)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究项目(2011C310012);兰州大学医学基金项目(LZUYY200605)

[通讯作者] *周媛媛,硕士,讲师,从事解剖学教学及胃肠功能研究,Tel:13721382504,E-mail: manping0603@126.com

muscle contractility including tension and amplitude ($P < 0.01$) in gastric body, tension ($P < 0.01$) and amplitude ($P < 0.05$) in gastric fundus, BTX-A inhibited ACh-induced smooth muscle contractility including tension and amplitude ($P < 0.01$) in gastric body and gastric fundus. **Conclusion:** EFS enhances smooth muscle spontaneous contractility in gastric body and gastric fundus; BTX-A inhibits gastric body and gastric fundus smooth muscle spontaneous contractility; BTX-A inhibits EFS and ACh-induced smooth muscle contractility in gastric body and gastric fundus.

[**Key words**] botulinum toxin A; gastric body; gastric fundus; acetylcholine; electrical field stimulation

A型肉毒毒素(BTX-A)可通过抑制骨骼肌神经-肌肉接头乙酰胆碱的释放,从而松弛肌肉及解除痉挛^[1],临床用于治疗痉挛性脑瘫及面肌痉挛所致肌张力增高效果显著^[2-3]。已有研究表明BTX-A对平滑肌的收缩同样具有抑制作用^[4],但对其作用机制尚不明确。本研究以大鼠胃体胃底离体平滑肌条为研究对象观察BTX-A对肌条内、外源性因素所致收缩的影响,并探讨机制,从而为BTX-A临床应用于胃肠动力学相关疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 选用Sprague-Dawley大鼠,动物许可证号SCXK-(甘)20050007,体重280~320 g,由兰州大学实验动物中心提供。

1.2 仪器 HW-400S恒温平滑肌槽(四川成都泰盟科技有限公司);Biolap 420E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)。

1.3 试剂 冻干BTX-A,兰州生物制品研究所,批号20061001(100 U/安瓿, -20℃闭光保存);N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME, NO酯酶抑制剂),碧云天生物技术研究,批号N5751;乙酰胆碱(ACh),Sigma公司,批号A6625;阿托品(Afropine),Sigma公司,批号A0132。

2 方法

2.1 肌条制备及收缩力测定 实验前禁食18~24 h,饮水自由。叩击大鼠头部致昏后剖腹分别剪取其胃体、胃底环形平滑肌,采用自制切割器制备长8 mm、宽2 mm平滑肌条。肌条在1 g的前负荷下温育于37℃恒温平滑肌槽中,由Kreb氏液孵育,肌槽内持续供给95% O₂和5% CO₂混合气体,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标准作为实验对象,随机分为7组:对照组,以离体平滑肌条自发性收缩作为对照;BTX-A组,在自发性收缩的条件下,加入BTX-A(10 U·mL⁻¹);EFS组,在自发性收缩的条件下,附加EFS(频率4 Hz,电压100 V,0.5波宽,60 min持续

刺激^[2]);BTX-A + EFS组,在自发性收缩的条件下,加入BTX-A(10 U·mL⁻¹),再附加EFS(参数同上,附加EFS之前均预先加入L-NAME抑制一氧化氮(NO)介导的肌肉松弛作用);ACh组,在自发性收缩的条件下,加入ACh(100 μmol·L⁻¹);ACh + BTX-A组,在自发性收缩的条件下,加入ACh(100 μmol·L⁻¹),再加入BTX-A(10 U·mL⁻¹);ACh + Atropine组,在自发性收缩的条件下,加入ACh(100 μmol·L⁻¹),再加入Atropine(1 μmol·L⁻¹)。采用Biolap 420E生物机能实验系统记录平滑肌条收缩数据。

2.2 统计学处理 采用SPSS 13.0软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 BTX-A抑制EFS引发的肌条收缩增强 EFS增加胃体平滑肌、胃底平滑肌自发性收缩张力及振幅($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);BTX-A降低胃体平滑肌、胃底平滑肌自发性收缩张力并降低胃体平滑肌振幅($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);BTX-A抑制EFS引发的胃体平滑肌、胃底平滑肌张力增强及振幅增大($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(表1,图1)。

3.2 BTX-A抑制ACh引发的肌条收缩增强 ACh增加胃体平滑肌自发性收缩张力及振幅($P < 0.01$)、胃底平滑肌自发性收缩张力($P < 0.01$);Atropine降低ACh引发的胃体、胃底平滑肌自发性收缩张力及振幅($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);BTX-A降低ACh引发的胃体、胃底平滑肌自发性收缩张力及振幅($P < 0.01$)(表1,图2)。

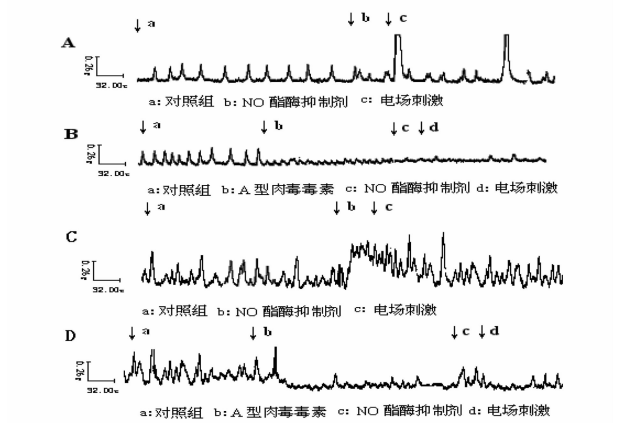
4 讨论

肠神经系统(ENS)是由胃肠道壁内神经元组成,产生并维持胃肠平滑肌的次级蠕动,具有独立调节控制胃肠道功能的系统^[5-6]。ENS通过肌间神经丛的神经元和神经纤维释放兴奋性神经递质,如ACh, P物质, 5-羟色胺,胃动素等,其中ACh起主要作用,促进胃肠蠕动^[7-8]。在豚鼠幽门离体平滑肌条两侧放置的平行铂电极,通过电极产生EFS,可激

表 1 BTX-A,EFS 对胃体胃底收缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	胃体		胃底	
	张力/g	振幅/mm	张力/g	振幅/mm
对照	1. 01 ± 0. 002	0. 31 ± 0. 008	1. 17 ± 0. 010	0. 71 ± 0. 003
电场刺激	1. 19 ± 0. 020 ¹⁾	0. 55 ± 0. 008 ²⁾	1. 45 ± 0. 002 ²⁾	0. 94 ± 0. 016 ¹⁾
A 型肉毒素	0. 84 ± 0. 001 ²⁾	0. 11 ± 0. 003 ²⁾	1. 01 ± 0. 012 ¹⁾	0. 65 ± 0. 080
A 型肉毒素 + 电场刺激	0. 95 ± 0. 004 ⁴⁾	0. 08 ± 0. 001 ⁴⁾	1. 02 ± 0. 022 ⁴⁾	0. 69 ± 0. 016 ³⁾
乙酰胆碱	1. 21 ± 0. 02 ²⁾	0. 98 ± 0. 15 ²⁾	2. 07 ± 0. 11 ²⁾	0. 56 ± 0. 04
乙酰胆碱 + 阿托品	0. 81 ± 0. 01 ⁶⁾	0. 11 ± 0. 02 ⁶⁾	1. 02 ± 0. 02 ⁶⁾	0. 34 ± 0. 06 ⁵⁾
乙酰胆碱 + A 型肉毒素	0. 97 ± 0. 01 ⁶⁾	0. 13 ± 0. 02 ⁶⁾	1. 20 ± 0. 02 ⁶⁾	0. 25 ± 0. 05 ⁶⁾

注:与对照比较¹⁾ $P < 0. 05$, ²⁾ $P < 0. 01$;与电场刺激组比较³⁾ $P < 0. 05$, ⁴⁾ $P < 0. 01$;与乙酰胆碱组比较⁵⁾ $P < 0. 05$, ⁶⁾ $P < 0. 01$ 。

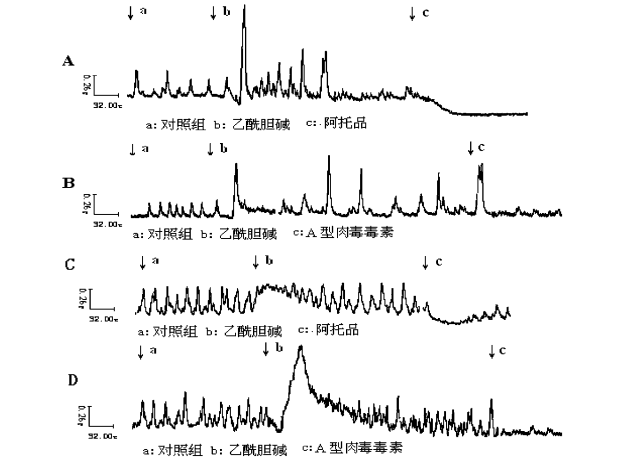


A,B. EFS 增强胃体平滑肌收缩张力及振幅,BTX-A 抑制胃体平滑肌收缩的张力振幅及 EFS 对肌条的收缩作用;
C,D. EFS 增强胃底平滑肌收缩张力及振幅,BTX-A 抑制胃底平滑肌收缩的张力及 EFS 对肌条的收缩作用($\bar{x} \pm s, n = 12$)

图 1 BTX-A,EFS 对胃体、胃底平滑肌收缩的影响

活内源性神经而增强肌条的收缩^[1]。NO 在胃肠神经介导平滑肌松弛中起中介作用,故在附加 EFS 之前预先加入 L-NAME 抑制其释放,排除 NO 作用的干扰。已有研究表明在大鼠胃窦及幽门注射不同剂量 BTX-A 可导致胃肌电慢波振幅明显减弱^[4],并可抑制大鼠幽门胃窦离体平滑肌的收缩^[9-10]。也有研究表明 BTX-A 抑制 EFS 引发的大鼠幽门平滑肌收缩^[11],临床应用于治疗贲门失弛缓症^[12],以上研究都提示 BTX-A 对平滑肌收缩存在抑制作用,但其作用机制尚未明确。

本研究中,BTX-A 抑制了大鼠离体胃体、胃底平滑肌自发收缩及 EFS 引发的收缩作用,推测平滑肌条自发收缩及 EFS 引发的收缩都有可能与激活 ENS 内源性递质释放而引起^[13],而 BTX-A 的抑制作用可能与其对骨骼肌作用机制相似,即通过阻碍突触前膜胞吐,抑制 ACh,P 物质释放实现。BTX-A 还抑制了 ACh 引发的胃体胃底平滑肌的收缩作用,这与阿托品作用相似,阿托品通过阻断外源性 ACh



A,B. ACh 增强胃体平滑肌收缩张力及振幅,阿托品及 BTX-A 均抑制胃体平滑肌收缩的张力振幅;
C,D. ACh 增强胃底平滑肌收缩张力,阿托品及 BTX-A 均抑制胃底平滑肌收缩的张力振幅($\bar{x} \pm s, n = 12$)

图 2 ACh,BTX-A 对胃体、胃底平滑肌收缩的影响

与突触后膜受体结合阻碍其收缩效应^[1]。BTX-A 的阿托品样效应与 James A N 在豚鼠离体幽门肌条上所示结果相似,由此推测 BTX-A 有可能同样抑制突触后膜,阻碍了 ACh 与突触后膜受体结合而发挥抑制作用,但其是否对突触后膜作用尚需进一步实验证实。

[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(2):291.
[2] 杨中良, 郑锦志, 黄鉴政. A 型肉毒毒素治疗面肌痉挛 86 例疗效研究 [J]. 中华神经科杂志, 2004, 37(2):98.
[3] 敖丽娟, 钱菁华, 王文丽, 等. 非肌电引导下 A 型肉毒毒素注射治疗儿童痉挛型脑瘫的疗效观察 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(12):915.

平胃散水煎液对湿困脾胃证大鼠疲劳状态的改善作用

刘瑶¹, 刘伟², 焦豪妍¹, 沈小钟¹
(1. 广东省中药研究所, 广州 510520; 2. 东方药林药业有限公司, 广州 510510)

〔摘要〕 目的:探讨平胃散对湿困脾胃证大鼠疲劳状态的改善作用及其机制。方法:将大鼠随机分为空白对照组、模型组、平胃散高、中、低剂量组。造模第 8 天平胃散各剂量组分别灌胃平胃散水提液 1.5,3,6 g·kg⁻¹。空白对照组、模型组灌胃等量生理盐水,给药 7 d 后观测大鼠力竭游泳时间;检测血浆乳酸(LA)、血清乳酸脱氢酶(SLDH)、血清尿素氮(SUN)、肝糖原含量、血红蛋白(Hb)的含量。结果:平胃散高、中、低剂量组均能不同程度地改善模型大鼠的行为学表现,提高大鼠力竭游泳时间。与模型组比较,高剂量组肝糖原含量显著增高($P<0.01$),高、中剂量组 SUN 含量显著降低($P<0.05$)。各组大鼠 Hb, LA,SLDH 水平未见明显差异。结论:平胃散改善湿困脾胃证疲劳状态的作用可能与减少在运动负荷下的蛋白质与氨基酸的分解,提高肝糖原的含量有关。

〔关键词〕 平胃散; 湿困脾胃证; 疲劳状态

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)20-0243-04

Antifatigue Effect of Pingwai San on Rats of the Spleen and Stomach being Stranded by Dampness

LIU Yao¹, LIU Wei², JIAO Hao-yan¹, SHEN Xiao-zhong¹
(1. Guangdong Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510520, China;
2. Orient Pharmaceutical, Guangzhou 510510, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the antifatigue effect of Pingwei San (PWS) on rats of the spleen and stomach being stranded by dampness. **Method:** Rat models of the spleen and stomach being stranded by dampness

〔收稿日期〕 20120424(007)
〔基金项目〕 2010 年广东食品药品职业学院自然科学研究项目(2010YZ001)
〔第一作者〕 刘瑶,硕士,讲师,从事中药复方药理研究,Tel:020-28854995,E-mail:liuy@gdyzy.edu.cn

[4] 张福康,张延武,侯一平,等. A 型肉毒毒素降低大鼠胃平滑肌收缩及 P 物质含量[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(2):314.

[5] Aoki K R. Evidence for antinociceptive activity of botulinum toxin A in pain management[J]. Headache, 2003, 43(Suppl 1):9.

[6] 何前松,冯泳,赵云华,等. 小半夏加茯苓汤及其拆方对家兔离体胃肠运动的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(6):192.

[7] Metzger M. Neurogenesis in the enteric nervous system [J]. Arch Ital Biol, 2010, 148(2):73.

[8] 高杰,曹春雨,贺蓉,等. 大黄、苍术对正常大鼠胃肠激素水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(9):220.

[9] 任银祥,廉会娟,宋焱峰,等. 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, 2008,22(6):452.

[10] 周媛媛,郭芙莲,李超彦,等. 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(11):2142.

[11] 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(4):775.

[12] Bakhshipour A, Rabbani R, Shirani S, et al. Comparison of pneumatic dilation with pneumatic dilation plus botulinum toxin for treatment of achalasia [J]. Acta Med Iran, 2010, 48(2):107.

[13] Metzger M. Neurogenesis in the enteric nervous system [J]. Arch Ital Biol, 2010, 148(2):73.

[责任编辑 李玉洁]