

·基础研究·

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*

周媛媛¹ 李超彦² 楚宪襄³

摘要

目的:研究A型肉毒毒素(BTX-A)对大鼠食管下括约肌(LES)离体肌条自发性收缩的影响,并观察BTX-A对电场刺激(EFS)引发的肌条收缩是否存在抑制作用。

方法:成年SD大鼠叩击头部致昏后取食管下括约肌制备肌条,随机分为对照(control)组、BTX-A组、EFS组、EFS+BTX-A组,采用Biolap 420E生物机能实验系统记录下括约肌肌条收缩实验数据。

结果:①BTX-A降低食管下括约肌肌条自发性收缩张力及振幅($P<0.05$);②EFS增强食管下括约肌肌条张力及振幅($P<0.01$);③BTX-A抑制EFS对食管下括约肌肌条张力增强效应($P<0.01$)及振幅增大效应($P<0.01$)。

结论:①BTX-A可抑制食管下括约肌肌条自发性收缩;②EFS可增强食管下括约肌肌条收缩能力;③BTX-A可抑制EFS引发的食管下括约肌肌条收缩能力的增强。

关键词 食管下括约肌;离体;A型肉毒毒素;电场刺激

中图分类号:R571 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-1242(2012)-10-932-02

贲门失弛缓症(achalasia of cardia)是一种以食管体部正常蠕动消失及吞咽时食管下括约肌(lower esophageal sphincter, LES)松弛不良为特征的原发性食管运动障碍性疾病^[1]。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,具有抑制骨骼肌神经-肌肉接头乙酰胆碱递质的释放,从而松弛肌肉及解除痉挛^[2]。研究表明,BTX-A注射可降低在体LES张力^[3],但对离体LES是否存在作用尚未见报道。本研究采取大鼠离体LES肌条作为实验对象,观察BTX-A及电场刺激(electrical field stimulation, EFS)对离体LES的作用,并探讨其机制,从而为BTX-A临床应用于治疗贲门失弛缓症提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康Sprague-Dawley大鼠72只,体重250—350g,雌雄不拘,由郑州大学医学院动物实验中心提供。HW-400S恒温平滑肌槽,联想微型兼容计算机内置有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),冻干BTX-A(100U/安瓿,-20℃闭光保存)由兰州生物制品研究所提供,N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME,NO酯酶抑制剂)由Sigma公司

提供。

1.2 方法

实验前禁食18—24h,饮水不限。实验时叩击其头部致昏后剖腹剪取食管下段及部分胃组织,沿长轴切开后剥离黏膜,于食管与胃交界处偏上剪取平滑肌采用自制切割器制备长8mm、宽2mm肌条^[4]。肌条安置于37℃恒温平滑肌槽中(预充满Krebs液并持续供给95%O₂和5%CO₂的混合气体)。铂金电极连接刺激器置于肌条两侧并与其长轴平行。肌条在1g的前负荷下温育30min,以出现自发性收缩为标准作为实验对象。72只SD大鼠依据上述方法剪取LES平滑肌条,共72条并随机均分为4组:对照组以离体平滑肌条自发性收缩的张力及振幅值作为对照;BTX-A组在自发性收缩的条件下,加入BTX-A(10U/ml)后记录30min;EFS组在自发性收缩的条件下,附加EFS(频率4Hz、电压100V、0.5ms波宽、60s持续刺激^[5])并记录30min;EFS+BTX-A组在自发性收缩的条件下,附加EFS(参数同上)同步记录30min,后再加入BTX-A(10U/ml)并连续记录30min。附加EFS之前均预先加入L-NAME抑制NO介导的肌肉松弛作用。采用Biolap 420E生物机能实验系统同步记录各组LES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 统计学分析

所有数据经SPSS13.0软件统计处理,两两比较采用配对

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.10.009

*基金项目:河南省教育厅自然科学研究资助项目(2011C310012)

1 漯河医学高等专科学校解剖教研室,462002;2 漯河医学高等专科学校生理教研室,3 郑州大学基础医学院解剖教研室

作者简介:周媛媛,女,讲师;收稿日期:2011-12-09

t检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

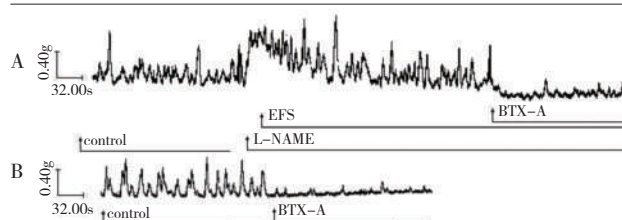
与食管下括约肌自发性收缩组比较,BTX-A组加入BTX-A后5min内食管下括约肌肌条自发性收缩张力及振幅均出现明显下降($P<0.05$),持续记录30min未见收缩张力及振幅回升,提示BTX-A可抑制食管下括约肌的自发性收缩能力;EFS组附加EFS作用后立即引起食管下括约肌快速强烈的收缩,其收缩张力及振幅相比较于食管下括约肌自发性收缩组均显著性增强($P<0.01$);EFS+BTX-A组在施加EFS后增强食管下括约肌的收缩效果同EFS组,温育30min后再加入BTX-A,食管下括约肌的收缩幅度迅速显著下降,提示EFS对食管下括约肌收缩张力增强效应及振幅增大效应均被抑制($P<0.01$),后持续记录30min未见明显变化(表1,图1)。

表1 A型肉毒毒素及电场刺激对食管下括约肌收缩的作用 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	张力	振幅
对照组	18	1.17 ± 0.01	0.30 ± 0.03
BTX-A组	18	1.04 ± 0.01^{①}	0.16 ± 0.02^{①}
EFS组	18	1.45 ± 0.02^{②}	0.94 ± 0.16^{②}
EFS+BTX-A组	18	1.22 ± 0.02^{③}	0.69 ± 0.16^{③}

与对照组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与EFS组比较:③ $P<0.01$

图1 LES在对照组、BTX-A及EFS作用后的收缩变化



A: EFS增强平滑肌收缩张力及振幅,后加入BTX-A抑制其引发的收缩增强效应;B: BTX-A抑制平滑肌自发性收缩。

3 讨论

肠神经系统(enteric nervous system,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系统^[5]。LES紧张度源于并依赖于ENS,并由多种神经递质共同调节及支配LES的松弛^[6]。目前多认为贲门失弛缓症属于神经源性疾病,由于调节LES的抑制性神经元受损,使其分泌的抑制性神经递质减少;ENS释放的兴奋性神经递质相对增多,引起LES的兴奋性占优势,导致LES的痉挛、张力增高^[7]。

研究发现,BTX-A通过蛋白水解过程形成具有活性的双链结构,并选择性地作用于外周胆碱能神经末梢,阻断 Ca^{2+} 介导的含乙酰胆碱(acetylcholine,ACh)囊泡的移动、融合和释放,产生化学去神经作用,导致肌肉松弛麻痹^[8]。BTX-A

注射于在体大鼠胃窦及幽门可导致胃平滑肌肌电慢波振幅明显减弱^[9],BTX-A亦可抑制离体大鼠幽门平滑肌收缩^[10]。已有研究表明BTX-A在降低在体LES张力及改善贲门失弛缓症存在一定效果^[11-12],但机制并不明确。

本研究依据平滑肌的电生理特征及收缩特点,测定其张力、振幅作为平滑肌兴奋收缩变化的指标。结果表明BTX-A抑制了LES肌条的自发收缩;LES的自发性收缩由内源性ENS释放神经递质引起^[5],推测BTX-A可能阻碍SNARE蛋白与突触前膜融合抑制其递质释放^[13],从而对肌条自发收缩产生抑制作用。BTX-A抑制了EFS引发的LES肌条收缩,推测EFS可能激活了ENS神经末梢突触释放兴奋性递质引起肌条的收缩^[10],或直接引起平滑肌兴奋触发放缩。而BTX-A可能是通过突触前膜抑制EFS引发的内源性ENS释放兴奋性神经递质ACh^[3],也可能是直接抑制了EFS引起的LES兴奋过程中的 Ca^{2+} 内流,导致了LES的兴奋-收缩偶联失偶联,其机制尚需进一步研究证实。

参考文献

- [1] Pohl D, Tutuian R. Achalasia: an overview of diagnosis and treatment [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2007, 16(3):297—303.
- [2] James AN, Ryan JP, Parkman HP. Inhibitory effects of botulinum toxin on pyloric and antral smooth muscle[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285(2):291—297.
- [3] 汤志锋,赵琪.小气囊扩张术联合肉毒碱局部注射治疗贲门失弛缓症[J].中国内镜杂志,2006,12:76—81.
- [4] Holzer-Petsche U, Lembeck F, Seitz H. Contractile effects of substance P and neurokinin A on the rat stomach in vivo and in vitro[J]. Br J Pharmacol, 1987, 90(1):273—279.
- [5] Sarna SK, Daniel EE, Waterfall WE. Myogenic and neural control systems for esophageal motility[J]. Gastroenterology, 1977, 73: 1345—1352.
- [6] Farré R, Sifrim D. Regulation of basal tone, relaxation and contraction of the lower oesophageal sphincter: Relevance to drug discovery for oesophageal disorders[J]. Br J Pharmacol, 2008, 153: 858—869.
- [7] Williams VA, Peters JH. Achalasia of the esophagus: a surgical disease[J]. J Am Coll Surg, 2009, 208:151—162.
- [8] Montecucco C, Papini E, Schiavo G. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism [J]. FEBS Lett, 1994, 346(1):92—98.
- [9] Lim EC, Ong BK, Oh VM, et al. Botulinum toxin: a novel therapeutic option for bronchial asthma[J]. Med Hypotheses, 2006, 66(5):915—919.
- [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—2143.
- [11] Gutschow CA, Töx U, Leers J, et al. Botox, dilation, or myotomy? Clinical outcome of interventional and surgical therapies for achalasia[J]. Langenbecks Arch Surg, 2010, 395(8): 1093—1099.
- [12] Kroupa R, Hep A, Dolina J, et al. Combined treatment of achalasia—botulinum toxin injection followed by pneumatic dilatation: long-term results[J]. Dis Esophagus, 2010, 23(2): 100—105.
- [13] Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44:167—193.