

毒蕈碱受体及其亚型对四磨汤诱发胃窦平滑肌收缩的差异性影响

钱伟^{1#}, 戴迟兵^{2#}, 刘娜¹, 侯晓华^{1*}

1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉 430022

2. 三峡大学附属第二临床医学院/仁和医院, 湖北 宜昌 443000

摘要: 目的 探讨毒蕈碱(M)受体及其亚型对四磨汤(SMD)诱发胃窦纵、环形肌收缩的差异性影响。方法 40只雄性SD大鼠,随机分为5组,每组8只,分别为:单纯SMD组、阿托品(Atropine)+SMD组、加拉明(Gallamine)+SMD组、4-二苯乙酰氧基-N-甲基哌啶甲碘化物(4-DAMP)+SMD组及加拉明+4-DAMP+SMD组。制备胃窦纵、环形平滑肌条,分别采用累积量加入四磨汤,以及阿托品(10^{-6} mol/L)、加拉明(10^{-6} mol/L)、4-DAMP(0.4×10^{-6} mol/L)、加拉明+4-DAMP孵育肌条后再累积加入四磨汤,记录平滑肌等长收缩活动,比较纵、环形肌收缩的差异性。结果 四磨汤诱发胃窦纵、环形肌收缩活动增加,但两者间无明显差异($P > 0.05$),非选择性M受体阻断剂阿托品及选择性M₂受体阻断剂加拉明对四磨汤诱发胃窦环形肌收缩活动的抑制明显强于纵行肌($P < 0.05$),选择性M₃受体阻断剂4-DAMP及加拉明+4-DAMP对四磨汤诱发胃窦纵行肌收缩活动的抑制作用明显强于环形肌($P < 0.05$)。结论 M受体及其亚型参与了四磨汤对胃窦运动的调节,胃窦环形肌收缩更多的依赖于M受体及其M₂亚型的激活,胃窦纵行肌收缩更多的依赖于M₃受体亚型的激活。

关键词: 毒蕈碱受体; 四磨汤; 胃窦; 平滑肌; 收缩活动

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2015)01-0036-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.01.006

Different effects of muscarinic receptor and subtypes on Simo Decoction-induced contraction of gastric antrum smooth muscle

QIAN Wei¹, DAI Chi-bing², LIU Na¹, HOU Xiao-hua¹

1. Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

2. Renhe Hospital of Three Gorges University, Yichang 443000, China

Abstract: Objective To investigate the different effects of muscarinic (M) receptor and its subtype on Simo Decoction (SMD)-induced contraction of antral longitudinal and circular strips. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into five groups including SMD, Atropine + SMD, Gallamine + SMD, 4-DAMP + SMD, and Gallamine + 4-DAMP + SMD groups, the spontaneous contraction of antral longitudinal and circular strips induced by SMD were noted in the organ bath in the presence or absence of atropine, Gallamine, 4-DAMP or Gallamine + 4-DAMP. **Results** SMD induced the contraction of longitudinal and circular strips increasing with no significant difference ($P > 0.05$), SMD-induced contractile activity of longitudinal strips after incubation with non-selective M receptor blocker atropine or selective M₂ receptor blocker gallamine was stronger than circular strips ($P < 0.05$), and after incubation with selective M₃ receptor blocker 4-DAMP or gallamine + 4-DAMP, SMD-induced contractility of circular strips was stronger than longitudinal strips ($P < 0.05$). **Conclusion** SMD-induced contraction of antral circular strips is more dependent on activation of M and M₂ receptor than longitudinal strips. However, SMD-induced contraction of antral longitudinal strips is more dependent on activation of M₃ receptor than circular strips.

Key words: muscarinic receptor; Simo Decoction; antrum; smooth muscle; contraction

四磨汤(SMD)源自明代古方《痘疹金镜录》, 好的疗效,对于非胃肠术后患者胃肠功能的恢复也具有临床证实其对于功能性胃肠疾病动力障碍具有很

具有很好的效应。目前关于四磨汤治疗胃肠动力障

收稿日期: 2014-10-28

基金项目: 国家 973 计划项目(2009CB523002)

作者简介: 钱伟(1963—), 主管技师, 主要从事胃肠动力病研究。Tel: 13907149995 E-mail: qianwei63@126.com

戴迟兵(1976—), 博士, 副教授, 主要从事胃肠动力病研究。Tel: 18694085022

*通信作者 侯晓华(1961—), 博士, 教授, 博士生导师, 从事胃肠动力病研究。Tel: (027)85726057 E-mail: houhx@medmail.com.cn

#共同第一作者

碍的研究不多, 对于其治疗机制方面的研究甚少。本课题组在前期工作的基础上^[1], 探讨不同剂量四磨汤对胃窦纵、环行肌收缩活动的影响及阻断毒蕈碱(M)受体对此影响的差异性, 旨在为四磨汤治疗功能性胃肠疾病动力障碍提供新的理论依据。

1 材料

1.1 动物

雄性SD大鼠40只, 体质量300~350 g, 购自华中科技大学同济医学院动物实验中心。本研究为华中科技大学伦理学委员会同意批准实施, 在整个实验中遵守《实验动物管理条例》, 做到减轻大鼠痛苦, 增加其舒适度。

1.2 药品与试剂

四磨汤, 湖南汉森制药股份有限公司, 批号091245-010; 阿托品(Atropine), 美国Sigma-Aldrich公司, 批号P3794; 加拉明(Gallamine), 美国Sigma-Aldrich公司, 批号G8134; 4-二苯乙酰氧基-N-甲基哌啶甲碘化物(4-DAMP), 美国Sigma-Aldrich公司, 批号SML0255。

1.3 仪器

MYO-BATH组织浴槽, 25 mL, 美国WPI公司; Haake DC10 恒温循环仪, 美国WPI公司; Fort-10 传感器、TBM4M 生物信号放大器, 美国WPI公司; MP-100 信号采集转换系统及生理信号记录软件, 美国BIOPAC system公司。

2 方法

2.1 动物分组及平滑肌条制备

40只SD大鼠, 随机分为5组: 四磨汤组、阿托品+四磨汤组、加拉明+四磨汤组、4-DAMP+四磨汤组及加拉明+4-DAMP+四磨汤组, 每组8只。饲养于动物实验中心(22~24 °C), 予12 h光照, 自由进食水, 适应性喂养一周后开始实验。脱颈椎处死大鼠, 迅速取出全胃, 置于冰(4 °C) Krebs液中, 并持续通95% O₂+5% CO₂混合气体, 沿胃大弯剪开, 并清除胃内容物, 平铺于盛 Krebs液硅胶平皿中, 继续通95% O₂+5% CO₂混合气体, 大头针固定, 采用医用镊及棉签去除黏膜层, 自制间距2.0 mm 双刀延纵、环行肌纤维走向切取胃窦纵、环行肌条(8.0 mm×2.0 mm)。

2.2 平滑肌收缩活动记录

制备好的胃窦纵、环行肌条, 纵向悬挂于盛有25 mL Krebs液的组织浴槽中, 调节张力旋钮, 给予肌条1.0 g前负荷并持续通95% O₂+5% CO₂混合气

体, 在浴槽中平衡约60 min, 每隔20 min更换1次 Krebs液, 选用收缩规则的肌条进行实验。记录平滑肌基线水平收缩5 min, 然后采用以下流程进行实验。

2.2.1 单纯四磨汤组 累积量加入四磨汤(1、5、25、50、100、150、200 μL), 每剂量四磨汤加入后记录平滑肌收缩活动5 min。

2.2.2 阿托品+四磨汤组 10⁻⁶ mol/L阿托品孵育并记录肌条收缩活动5 min, 再累积量加入四磨汤(同上), 每剂量四磨汤加入后记录平滑肌收缩活动5 min。

2.2.3 加拉明+四磨汤组 10⁻⁶ mol/L加拉明孵育并记录肌条收缩活动5 min, 再累积量加入以上剂量四磨汤, 记录每剂量四磨汤加入后肌条收缩活动5 min。

2.2.4 4-DAMP+四磨汤组 0.4×10⁻⁶ mol/L 4-DAMP孵育并记录肌条收缩活动5 min, 再累积量加入四磨汤, 每剂量四磨汤加入后记录平滑肌收缩活动5 min。

2.2.5 加拉明+4-DAMP+四磨汤组 同时给予10⁻⁶ mol/L加拉明及0.4×10⁻⁶ mol/L 4-DAMP孵育肌条, 并记录其收缩活动5 min, 再累积量加入四磨汤, 每剂量四磨汤加入后记录平滑肌收缩活动5 min。

2.3 数据处理

计算肌条收缩曲线下面积(AUC), 以基线水平肌条收缩AUC为对照值(X), 以每剂量四磨汤加入后肌条收缩AUC为效应值(Y), 按以下公式计算肌条收缩AUC变化率。

$$\text{肌条收缩 AUC 变化率} = (Y - X) / X$$

2.4 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS17.0统计软件分析, Two-way ANOVA比较每纵、环行肌之间收缩AUC变化率, 根据Levenson's检验结果进行多重比较, 方差齐性采用LSD进行多重比较, 方差不齐则采用Dunnett's进行多重比较。

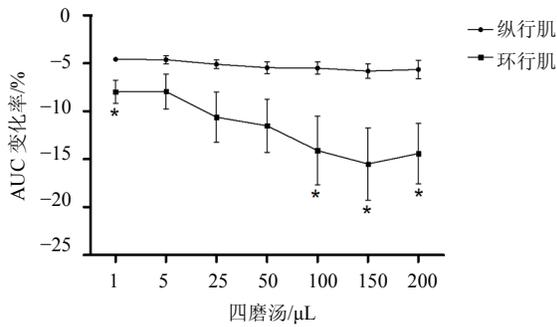
3 结果

3.1 四磨汤对胃窦纵、环行肌的影响

在四磨汤累积量加入后, 随着四磨汤剂量的增加, 胃窦纵、环行肌收缩活动也逐步增加, 但在每剂量四磨汤加入后, 在纵、环行肌之间差异并无显著性, 说明四磨汤对于纵、环行肌收缩活动总体没有差异性。

3.2 非选择性 M 受体阻断对四磨汤诱发胃窦纵、环行肌收缩活动的差异性影响

在非选择性 M 受体阻断剂阿托品孵育肌条后,再由低至高剂量加入四磨汤,胃窦纵、环行肌条收缩活动被完全抑制,且环行肌收缩活动明显弱于纵行肌 ($P < 0.05$)。说明四磨汤作用于环行肌较纵行肌更多的依赖于 M 受体的激活。见图 1。



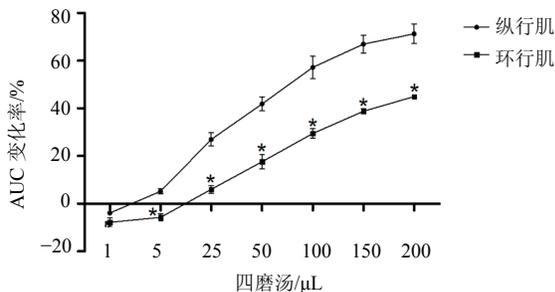
与同浓度四磨汤加入后胃窦纵行肌收缩活动比较: $*P < 0.05$
 $*P < 0.05$ vs contract activity of the longitudinal muscle of gastric antrum after administration of SMD in same concentration

图 1 非选择性 M 受体阻断对四磨汤诱发胃窦纵、环行肌收缩活动的差异性影响

Fig. 1 Different effects of non-selective M receptor blocking on SMD-induced contraction of antral longitudinal and circular strips

3.3 选择性 M₂ 受体阻断对四磨汤诱发胃窦纵、环行肌收缩活动的差异性影响

在选择性 M₂ 受体阻断剂加拉明孵育肌条后,再累积量加入四磨汤,随着四磨汤剂量的增加,胃窦纵、环行肌条收缩活动仍能逐渐增加,但纵行肌的收缩活动要高于环行肌,说明四磨汤诱发环行肌收缩受 M₂ 受体阻断的影响更大,四磨汤作用于环行肌更多的依赖于 M₂ 受体的激活。见图 2。



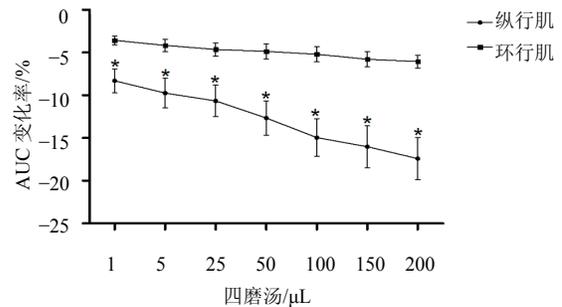
与同浓度四磨汤加入后胃窦纵行肌收缩活动比较: $*P < 0.05$
 $*P < 0.05$ vs contract activity of the longitudinal muscle of gastric antrum after administration of SMD in same concentration

图 2 选择性 M₂ 受体阻断对四磨汤诱发胃窦纵、环行肌收缩活动的差异性影响

Fig. 2 Different effects of selective M₂ receptor blocking on SMD-induced contraction of antral longitudinal and circular strips

3.4 选择性 M₃ 受体阻断对四磨汤诱发胃窦纵、环行肌收缩活动的差异性影响

在选择性 M₃ 受体阻断剂 4-DAMP 孵育肌条后,随着累积量四磨汤的加入,纵、环行肌收缩活动呈下降趋势,胃窦纵、环行肌收缩活动不完全一致,表现为纵行肌收缩活动明显弱于环行肌,说明四磨汤诱发纵行肌收缩较环行肌在 M₃ 受体阻断后被抑制程度更大,四磨汤作用于胃窦纵行肌更多的依赖于 M₃ 受体的激活。见图 3。



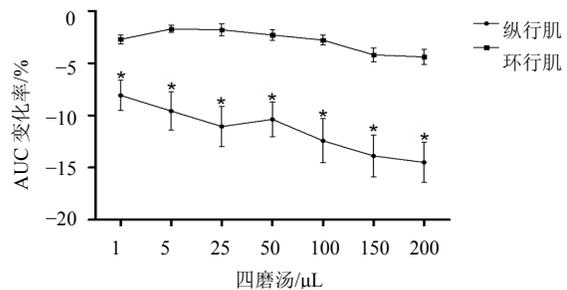
与同浓度四磨汤加入后胃窦纵行肌收缩活动比较: $*P < 0.05$
 $*P < 0.05$ vs contract activity of the longitudinal muscle of gastric antrum after administration of SMD in same concentration

图 3 选择性 M₃ 受体阻断对四磨汤诱发胃窦纵、环行肌收缩活动的差异性影响

Fig. 3 Different effects of selective M₃ receptor blocking on SMD-induced contraction of antral longitudinal and circular strips

3.5 选择性 M₂ 及 M₃ 受体同时阻断对四磨汤诱发胃窦纵、环行肌收缩活动的差异性影响

在采用选择性 M₂ 及 M₃ 受体阻断剂同时孵育肌条后,随着四磨汤剂量的增加,胃窦纵、环行肌收缩活动均无明显增加,且纵行肌收缩活动明显弱于环行肌,说明四磨汤作用于纵行肌更多的依赖于 M₃ 及 M₂ 受体的共同激活。见图 4。



与同浓度四磨汤加入后胃窦纵行肌收缩活动比较: $*P < 0.05$
 $*P < 0.05$ vs contract activity of the longitudinal muscle of gastric antrum after administration of SMD in same concentration

图 4 选择性 M₂ 及 M₃ 受体同时阻断对四磨汤诱发胃窦纵、环行肌收缩活动的差异性影响

Fig. 4 Different effects of selective M₂ and M₃ receptors blocking simultaneously on SMD-induced contraction of antral longitudinal and circular strips

4 讨论

本研究发现,四磨汤主要通过激活 M_3 受体以促进胃窦平滑肌收缩活动增加,而 M_2 受体的激活在其中起到了部分效应。四磨汤诱发纵行肌收缩更多的依赖于 M_3 受体的激活,而环形肌收缩活动的增加虽主要依赖于 M_3 受体的激活,但较纵行肌更多的依赖于 M_2 受体的激活。本实验也发现除了 M_2 或 M_3 受体亚型外,尚可能有其他 M 受体也参与了四磨汤诱发胃窦平滑肌收缩活动的调节。

四磨汤在作者的前期研究中已经显示其可明显增加胃窦平滑肌的收缩活性,其主要机制在于激活 M 受体,且对其主要组分的研究证实,在口服后主要分布于胃肠,显示了四磨汤具有直接作用于胃肠组织的潜能。M 受体有 5 种亚型, $M_1 \sim M_5$ ^[2],经多数研究,目前得出的结论为 M_3 及 M_2 亚型对于胃肠平滑肌收缩活动的影响占主导地位^[3-6],而两者之间比较, M_3 受体亚型兴奋后似乎对平滑肌促收缩效应更为明显^[6],但两者同时也存在着一定的协同性^[7], M_2 受体本身对于平滑肌收缩活动影响不明显,其主要作用在于可加强 M_3 受体兴奋后的促收缩效应,这在作者的研究中得到了部分体现, M_3 受体阻断显示了对平滑肌收缩活动的绝对控制,而 M_2 受体阻断仅部分影响了四磨汤对平滑肌的作用。不同的是在 M_2 受体阻断后,平滑肌收缩活性的下降程度也较大,这说明 M_2 受体对于平滑肌收缩活性也能在一定程度上单独产生影响。

目前尚无 M 受体在胃肠道诱发纵、环形肌活动的比较研究,也缺乏针对胃窦 M 受体的分布研究,但是针对食管的研究发现,在纵肌层及环肌层 M 受体的分布存在着一定的差异性,对收缩起主导作用的 M_3 受体在食管下段环形肌的分布密度显著高于食管中段纵行肌、环形肌及下段食管钩状纤维及套索纤维,而在食管中段环形肌 M_2 受体的分布密度明显高于纵行肌^[8],这也提示可能兴奋剂对于纵、环形肌的调节作用不一定完全一致。

通过本研究发现,当 M_3 受体被阻断后,四磨汤诱发纵、环形肌收缩活动增加的趋势均被完全抑制,这说明 M_3 受体的激活是四磨汤诱发胃窦平滑肌收缩的主要机制。在另一个层面,四磨汤诱发环形肌收缩受 M_2 受体阻断的影响更大,而当 M_2 及 M_3 联合阻断后,并没有显现出对四磨汤诱发环形肌收缩活动的抑制强于纵行肌,这也进一步说明 M_3 受体的激活是四磨汤诱发胃窦平滑肌收缩的主要机

制,而并非 M_2 受体。非选择性 M 受体阻断剂孵育肌条后,四磨汤诱发环形肌收缩受 M 受体的影响更大,而纵行肌受 M_3 及 M_2 联合的影响更大,如果平滑肌的收缩活动仅受到 M_3 及 M_2 受体的影响,那么两者趋势应该一致,均应表现为纵行肌受 M_2 及 M_3 联合阻断或者是总的 M 受体的抑制作用更强,而两者的不一致,则说明尚可能有其他的 M 受体也参与了四磨汤对胃窦平滑肌收缩活动的调节。

综上所述,不同的 M 受体亚型对四磨汤诱发胃窦纵、环形肌收缩具有差异性影响,其中 M_3 受体对于四磨汤的促动力效应起到了主导作用,而 M_2 受体仅起到了部分效应,是否有其他 M 受体的参与尚需要进一步研究。

参考文献

- [1] Dai C B, Liu N, Chen W M, *et al.* Simo Decoction promotes contraction of antral circular smooth muscle mainly via muscarinic M_3 receptor [J]. *J ethnopharmacol*, 2012, 144(2): 270-276.
- [2] So I, Yang D K, Kim H J, *et al.* Five subtypes of muscarinic receptors are expressed in gastric smooth muscles of guinea pig [J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35(1): 46-52.
- [3] Kitazawa T, Hashiba K, Cao J, *et al.* Functional roles of muscarinic M_2 and M_3 receptors in mouse stomach motility: studies with muscarinic receptor knockout mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 554(2-3): 212-222.
- [4] Lin S, Kajimura M, Takeuchi K, *et al.* Expression of muscarinic receptor subtypes in rat gastric smooth muscle: effect of M_3 selective antagonist on gastric motility and emptying [J]. *Dig Dis Sci*, 1997, 42(5): 907-914.
- [5] Stengel P W, Yamada M, Wess J, *et al.* M_3 -receptor knockout mice: muscarinic receptor function in atria, stomach fundus, urinary bladder, and trachea [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002, 282(5): R1443-1449.
- [6] Thomas E A, Ehlert F J. Involvement of the M_2 muscarinic receptor in contractions of the guinea pig trachea, guinea pig esophagus, and rat fundus [J]. *Biochem Pharmacol*, 1996, 51(6): 779-788.
- [7] Yu H L, Xiao Y, Ai J, *et al.* Relationship between muscarinic acetylcholine receptor subtypes [J]. *Yi Chuan*, 2007, 29(10): 1280-1288.
- [8] Braverman A S, Miller L S, Vegesna A K, *et al.* Quantitation of the contractile response mediated by two receptors: M_2 and M_3 muscarinic receptor-mediated contractions of human gastroesophageal smooth muscle [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(1): 218-224.