[doi: 10.3969/j.issn.1006-7795.2010.02.016]

· 基础研究 ·

5-$HT_{3/4}$受体在内源性多巴胺调节胃动力中的作用

米新亮 李 蕴 郭 华 徐敬东 郑丽飞 张晓慧 张 悦 朱进霞*
(首都医科大学基础医学院生理学与病理生理学系生理学教研室)

【摘要】 **目的** 研究 5-$HT_{3/4}$受体在内源性多巴胺调节胃动力中的作用,探讨帕金森病(Parkinson's disease PD)胃轻瘫发病的可能机制。**方法** 用 6羟多巴(6-hydroxydopamine 6-OHDA)损毁大鼠中枢黑质多巴胺能神经元,建立此模型。采用实时荧光聚合酶链反应法(Real-time PCR)和蛋白免疫印记法(Western blotting),检测 5-$HT_{3/4}$受体在 6-OHDA处理模型大鼠胃体的表达。采用 Power lab生物信号采集系统记录离体大鼠胃体纵行肌的收缩活动。**结果** 在基础状态下,6-OHDA处理模型组大鼠离体胃体纵行肌的收缩强度明显弱于对照组。加入 5羟色胺(5-hydroxytryptamine 5-HT)后,6-OHDA处理模型大鼠肌条的收缩强度上升幅度明显小于正常对照组。Real-time PCR结果显示 6-OHDA处理模型大鼠胃体 5-$HT_{3/4}$受体的基因表达水平显著高于正常组大鼠。Western blotting结果显示 6-OHDA处理模型大鼠胃体 5-HT_4受体蛋白水平下调,5-HT_3受体蛋白水平变化不明显。**结论** 损毁中枢黑质多巴胺能神经元可引起外周胃肠道内源性多巴胺(dopamine DA)含量升高,胃动力减弱,5-HT_4受体蛋白水平下调。6-OHDA处理模型大鼠胃动力减弱可能与 5-HT_4受体蛋白水平下调有关。

【关键词】 5-$HT_{3/4}$受体;胃动力;6-OHDA处理模型大鼠
【中图分类号】 R 742.5; R 573

The Role of 5-$HT_{3/4}$ Receptor in the Endogenous Dopamine-regulated Gastric Motility in Rats

MI Xin-liang LI Yun GUO Hua XU Jing-dong ZHENG Li-fei ZHANG Xiao-hui ZHANG Yue ZHU Jin-xia*
(Department of Physiology and Pathophysiology School of Basic Medical Sciences Capital Medical University)

【ABSTRACT】 Objective To study the role of 5-$HT_{3/4}$ receptor in the endogenous dopamine-regulated gastric motility in rats and investigate the mechanism of the gastroparesis in Parkinson's disease Methods Substantia nigra dopaminergic neurons of the SD rats were damaged by injecting 6-hydroxydopamine(6-OHDA) in the brain substantia nigra In this 6-OHDA treated rat model the central dopamine content decreased while the endogenous gastrointestinal dopamine content was increased The power lab signal acquisition system was used to record the constriction of the strip of rat gastric longitudinal muscle Semi-quantitative RT-PCR method and Western blotting analysis for 5-$HT_{3/4}$ receptor in the gastric corpus in control and 6-OHDA treated rats were performed Results The basal gastric motility in 6-OHDA treated rats was significantly weaker than the control group 5-HT-evoked motility was significantly reduced in the amplitude of contraction in 6-OHDA treated rats The real-time PCR results showed that the mRNA level of 5-$HT_{3/4}$ receptors in the gastric corpus was significantly enhanced in 6-OHDA treated rats The Western blotting results however showed that the protein level of 5-HT_4 receptor not 5-HT_3 receptor in the gastric corpus was descent in 6-OHDA treated rats Conclusion The 5-HT_4 receptor downregulation may contribute to the decrease of gastric motility in 6-OHDA treated rats

【KEY WORDS】 5-$HT_{3/4}$ receptor gastric motility 6-OHDA treated rats

有统计数据[1-2]显示,70%的帕金森病(Parkinson's disease PD)病人存在胃动力异常,88%的 PD病人有胃固体食物排空延迟症状,但其发病机制尚不清楚。5-HT是胃肠道重要的神经递质和旁分泌分子,通过不同的 5-HT受体调节胃肠道动力和分泌功能。其中 5-$HT_{3/4}$受体在胃肠道中的分布较为广泛:胃肠神经元、胃肠平滑肌细胞、胃肠上皮细胞中均有分布[3],5-HT_3受体介导胃肠反射,5-HT_4受体介导蠕动反射。5-HT_4受体可促进胆碱能系统的神经递质释放,从而导致胃肠道平滑肌收缩[4-5],使胃排空加快[6];而 DA可以抑制胃动力,增加胃黏膜血流量,从而抑制溃疡的形成。临床研究[7]发现在 PD患者中,内源性多巴胺含量变化,胃动力会随之发生变化。在多巴胺转运体(DAT)敲除的小鼠体内,发现 5-HT系

基金项目:国家自然科学基金(30770799),北京市自然科学基金(7063070)资助项目,Supported by National Natural Science Foundation of China(30770799), Natural Science Foundation of Beijing(30770799)
* Corresponding author E-mail zhu_j@ccmu.edu.cn

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

统改变，而在5-HT转运体（SERT）敲除的小鼠体内，DA系统发生改变[8]。这些研究结果表明5-HT和DA之间可能存在相互联系及相互调节作用。PD病人的病理改变是中枢黑质多巴胺能神经元受损，与6-OHDA处理模型大鼠病理改变相同。所以在本实验中采用6-OHDA处理模型大鼠进行相关研究。前期研究发现6羟多巴（6-hydroxydopamine，6-OHDA）损毁大鼠中枢黑质多巴胺能神经元后可引起外周胃肠道DA标记物酪氨酸羟化酶（TH）和多巴胺转运体（DAT）含量升高。而5-HT是调节胃肠动力的主要因素，对6-OHDA处理模型大鼠胃动力的调节作用是否发生改变及相关的5-$HT_{3/4}$受体表达是否变化未知。本研究拟以6-OHDA处理模型大鼠为研究对象，采用Power lab生物信号采集系统记录离体大鼠胃体纵行肌的收缩活动，并应用实时荧光聚合酶链反应（Real-time PCR）法和蛋白免疫印记法（Western blotting），检测5-$HT_{3/4}$受体在6-OHDA处理模型大鼠胃体的表达，分析5-$HT_{3/4}$受体在内源性多巴胺调节胃动力中的作用。

1 材料和方法

1.1 6-OHDA处理模型大鼠的制备

选取60只雄性SD大鼠（首都医科大学实验动物中心提供），动物许可证号：SCXK（京）2006-0009。体质量为210～240 g，经实验动物福利委员会许可，动物在室温条件，正常更替光照，24 h食水供应，采用数字表法将其随机分为实验组和对照组，每组30只大鼠。

模型制备[9]：实验组大鼠30只，用水合氯醛进行麻醉（0.4 g/kg）后，将大鼠头部固定于立体定位仪，颅骨暴露出2点〔坐标：前囟后（AP），－5.6 mm；旁开（ML），±2.0 mm；深度（DV），－7.5 mm〕，从这2点注入6羟多巴（6-hydroxydopamine，6-OHDA）（购自Sigma），每点注入2 μL，浓度为2 g/L，含0.2%抗坏血酸。饲养4周后成模。

1.2 离体胃动力

将模型组和对照组大鼠断颈处死，取胃并分离出胃体，将胃体纵行肌制作成宽2 mm长10 mm左右的肌条。然后将肌条置于盛有10 mL Kreb's液且连续通混合气（含95%氧气和5%二氧化碳）的浴槽中，水浴温度维持在37℃。给肌条施加1 g前负荷，肌条于水浴槽中恢复45～60 min，待基线稳定后加药。所用5-HT（购自Sigma公司）终浓度为10 μmol/L。胃动力变化值为正常组与模型组之间平均每次波动曲线下面积或面积增大之比。

1.3 Real-time PCR

用Trizol一步法提取胃体总RNA，用紫外分光光度计和琼脂糖电泳检测RNA纯度、浓度及完整性。采用Invitrogen试剂盒将总RNA反转录为cDNA，－20℃保存备用。参照Brilliant SYBR Green QPCR mastermix试剂盒说明，建立real-time PCR反应体系。内参β-actin的正向引物序列：5′-TTC AAC ACC CCA GCC ATG-3′，反向引物序列：5′-GTG GTA CGA CCA GAG GCA TAC-3′。5-HT_3受体正向引物序列：5′-TGC ATA CCA TCC AGG ACA TCA-3′，反向引物序列：5′-CTC TTG TCC GAC CTC ACT TCT TC-3′。5-HT_4受体正向引物序列：5′-GCT GGG TCA TTC CCA TGT TT-3′，反向引物序列：5′-CAA CTA TGC CGA TGT TGT TCC A-3′。反应在MP 3000 Real-Time PCR仪上进行，反应条件如下：95℃预变性10 min，1个循环；95℃变性30 s，55℃退火1 min，72℃延伸30 s，40个循环。制作溶解曲线：上述PCR产物进行95℃ 1 min，降至55℃，在55℃～95℃之间梯度升温0.2℃/s绘制溶解曲线。PCR结果以β-actin为内参进行半定量计算并统计分析。

1.4 蛋白样品制备和Western blotting检测

步骤如下：剪下胃体组织20 mg左右，加入300 μL蛋白裂解液盛于Eppendorf管中。机械研磨至组织粉碎，然后超声3次，冰浴中静置30 min，12 000 r/min，4℃，离心5 min。将上清移入另一Eppendorf管中，弃去沉淀。BCA方法蛋白定量。按照《分子克隆》中的标准程序灌制10%分离胶和浓缩胶，取样品置于凝胶加样缓冲液中，沸水煮5 min，电泳槽中充满电泳缓冲液，加入50 μg蛋白样品后连接电源，80 V 30 min，再换成120 V 40～50 min，直至溴酚蓝到达分离胶底部。取出凝胶进行转膜，按以下顺序叠放：阳极 滤纸 硝酸纤维素滤膜 凝胶 滤纸 阴极。恒压转膜，100 V 70 min。取出硝酸纤维素滤膜，置于含5%脱脂奶粉TBST溶液封闭，室温轻摇1 h。加入5-$HT_{3/4}$受体一抗（1∶500）（Santa），Actin一抗（1∶10 000）（Sigma），4℃孵育过夜。次日取出后室温放置30 min，TBST洗膜，加入绿色荧光标记二抗（1∶15 000），室温轻摇1 h，TBST洗膜。放入Odyssey系统扫描成像。

1.5 统计学方法

各组结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，应用

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Prism 4.0软件进行配对 t检验分析及绘图，以 $P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 离体胃动力结果

离体 6-OHDA处理模型大鼠胃体纵行肌收缩强度 (图 1A)与正常对照组大鼠相比较明显减弱 (图 1B)。在加入 5-HT后，6-OHDA处理模型大鼠胃体纵行肌收缩升高程度 (图 1A)较之正常对照组大鼠明显减少 (图 1B)。6-OHDA处理模型大鼠和正常大鼠在基础状况下胃动力之间的差异具有统计学意义 ($t=2.850$, $P=0.0081$, $n=29$)，如图 1C所示，在加入 5-HT后，6-OHDA处理模型大鼠肌条收缩升高幅度小于正常对照组且差异亦有统计学意义 ($t=2.761$, $P=0.032$, $n=7$)，如图 1D所示。

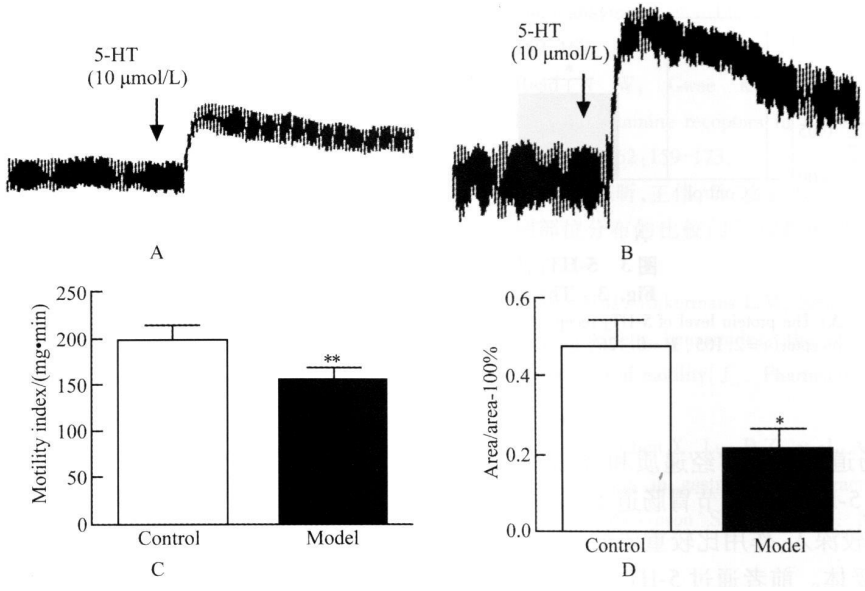

图 1　6-OHDA处理模型大鼠和正常大鼠加入 5-HT后胃动力变化

Fig. 1　The alteration of gastric motility after treatment with 5-HT in 6-OHDA treated rats and Control rats

A: The alteration of gastric motility after pretreatment with 5-HT in 6-OHDA treated rats; B: The alteration of gastric motility after pretreatment with 5-HT in control group; C: The statistical bar of basal gastric motility of the 2 group ($t=2.850$, $P=0.0081$, $n=29$); D: The statistical bar of The alteration area of gastric motility after the 2 group treatment with 5-HT ($t=2.761$, $P=0.032$, $n=7$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control

2.2 Real-time PCR结果

6-OHDA处理模型组大鼠 5-HT$_{3/4}$受体在胃体的表达比正常大鼠高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，如图 2所示。该数据为 5-HT$_{3/4}$受体与内参 β-actin对照相比较之后的相对值。

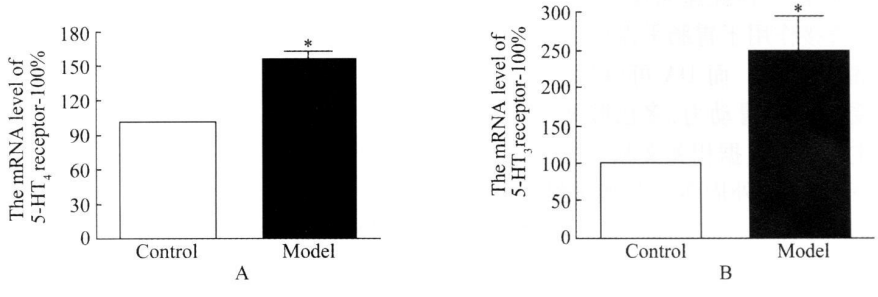

图 2　5-HT$_{3/4}$受体基因水平在大鼠胃体的表达

Fig. 2　The mRNA level of 5-HT$_{3/4}$ receptors

A: The mRNA level of 5-HT$_4$ receptor ($t=5.767$, $P=0.011$, $n=4$); B: The mRNA level of 5-HT$_3$ receptor ($t=3.185$, $P=0.024$, $n=6$); * $P<0.05$ vs control

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 Western blotting分析

将Western blotting结果进行条带灰度扫描分析，将目的蛋白的灰度值除以内参的灰度值以校正误差，所得结果代表目的蛋白的相对含量。结果发现6-OHDA处理模型组大鼠5-HT_4受体在胃体的表达比正常对照组大鼠高（$t=4.327$，$P=0.049$，$n=3$），差异有统计学意义（$t=2.105$，$P=0.126$），如图3A所示，而5-HT_3受体在胃体的表达差异无统计学意义（图3B）。

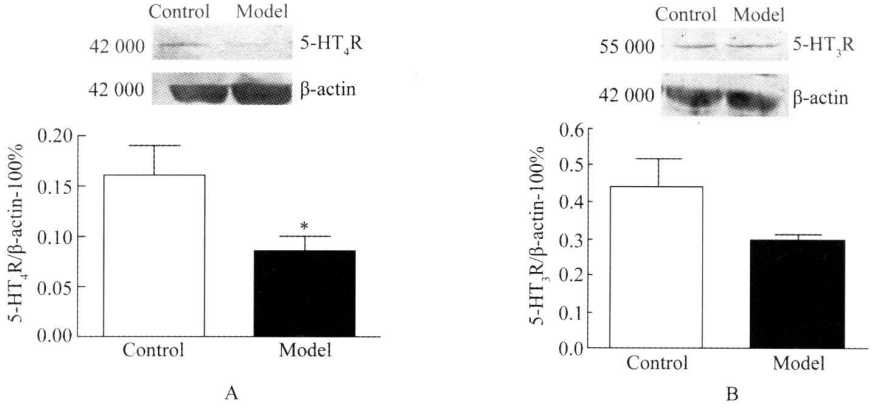

图3 5-$HT_{3/4}$受体蛋白水平在大鼠胃体的表达

Fig. 3 The protein level of 5-$HT_{3/4}$ receptors

A: The protein level of 5-HT_4 receptor ($t=4.327$, $P=0.049$, $n=3$); B: The protein level of 5-HT_3 receptor ($t=2.105$, $P=0.126$, $n=4$); * $P<0.05$ vs control

3 讨论

5-HT是胃肠道重要的神经递质和旁分泌分子，通过功能不同的5-HT受体调节胃肠道动力和分泌功能。其中研究比较深入，作用比较重要的有兴奋性的5-HT_3和5-HT_4受体。前者通过5-HT作用于胃肠道中的5-HT_3受体介导胃结肠反射，5-HT_3受体在调节胃肠感觉和分泌中起着极其重要的作用。后者通过5-HT作用于5-HT_4受体而激活。体外研究[10]证明，5-HT_4受体激动剂可引起结肠近端收缩和远端松弛，由此形成了胃肠道由近端向远端的蠕动反射，此反射称为蠕动反射。5-HT_4受体主要分布在肠神经元，平滑肌细胞和肠上皮细胞，调节胃肠道的动力和分泌等功能。其中5-HT_4受体研究较深入，其可以激活肠神经元释放乙酰胆碱等兴奋性神经递质使胃肠道平滑肌收缩，5-HT也可以直接作用于胃肠平滑肌上的5-HT_4受体使胃肠道平滑肌收缩。而DA可以通过其在胃肠道中的抑制性受体抑制胃动力，多巴胺和5-HT都是影响胃动力的主要因素。据相关文献[11-12]报道，在中枢黑质损毁的情况下，其外周多巴胺能神经元的数量增多，胃肠道多巴胺升高。多巴胺（DA）在消化道使胃体平滑肌松弛，加强胃容受性舒张，减低胃内压，还能抑制胃体及胃窦的推进运动，使幽门收缩胃排空延迟。但在这种情况下5-HT受体如何变化却不得而知？

本研究发现，6-OHDA损毁的大鼠黑质模型胃收缩明显弱于正常大鼠。用6-OHDA损毁中枢黑质多巴胺能神经元制成的大鼠模型其外周多巴胺的检测指标（酪氨酸羟化酶和多巴胺转运体）显著升高[13]。当研究人员用外源性5-HT刺激肌条后，发现正常对照组大鼠肌条收缩的高度明显大于6-OHDA处理模型大鼠。Real-time PCR结果显示6-OHDA处理模型大鼠5-$HT_{3/4}$受体在胃体的表达明显高于正常大鼠，而Western blotting结果显示6-OHDA处理模型大鼠5-HT_4受体蛋白水平明显低于正常对照组，5-HT_3受体的蛋白水平在两者之间差异无统计学意义，可能是由于样本含量不够所导致的。5-HT_3受体在6-OHDA处理模型大鼠胃动力下降过程中是否发挥了作用，还有待于进一步的研究。5-HT_4受体的基因水平上调而其蛋白水平下调，可能是由于mRNA在翻译过程中受到干扰，或者是由于蛋白降解过多，其原因不清，有待于进一步研究。所以6-OHDA处理模型大鼠胃动力不足可能与5-HT_4受体蛋白水平下降有关。

综上所述，6-OHDA处理模型大鼠胃动力下降除与DA在胃肠道的增多有关外，可能还与其5-HT_4受体蛋白水平下降有关。5-HT_4受体可能与PD病人的胃轻瘫发病有关，目前国内外还未有相关报道，本研究可能为探讨PD病人的胃轻瘫发病机制拓展了一条崭新的思路。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4 参考文献

[1] Goetze O, Nikodem A B, Wiezcorek J, et al. Predictors of gastric emptying in Parkinson's disease[J]. Neurogastroenterol Motil, 2006, 18: 369-375.

[2] Soykan I, Lin Z, Bennett J P, et al. Gastric myoelectrical activity in patients with Parkinson's disease: evidence of a primary gastric abnormality[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44: 927-931.

[3] Mader R, Kocher T, Haier J, et al. Investigation of serotonin type 4 receptor expression in human and non-human primate gastrointestinal samples[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18: 945-950.

[4] Matsuyama S, Sakiyama H, Nei K, et al. Identification of putative 5-hydroxytryptamine (4) (5-HT_4) receptors in guinea pig stomach: The effect of TKS159, a novel agonist on gastric motility and acetylcholine release[J]. Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1995, 273: 499-508.

[5] Craig D A, Clarke D E. Pharmacological characterization of a neuronal receptor for 5-hydroxytryptamine in guinea pig ileum with properties similar to the 5-hydroxytryptamine receptor[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1990, 252: 1378-1386.

[6] Mikami T, Komada T, Suqimoto H, et al. In vitro and in vivo pharmacological characterization of PF-01354082, a novel partial agonist selective for the 5-$HT_{(4)}$ receptor[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 609: 5-12.

[7] Fumagalli F, Gainetdinov R R, Valenzano K J, et al. Role of Dopamine Transporter in Methamphetamine-Induced Neurotoxicity: Evidence from Mice Lacking the Transporter[J]. J Neurosci, 1998, 18: 4861-4869.

[8] Hnasko T S, Sotak B N, Palmiter R D. Cocaine-conditioned place preference by dopamine-deficient mice is mediated by serotonin[J]. J Neuroscience, 2007, 27: 12484-12488.

[9] Thomas J, Wang J, Takubo H. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model: further biochemical and bahavioural characterization[J]. Exp Neurol, 1994: 159-167.

[10] Read N W, Gwee K A. The importance of 5-hydroxytryptamine receptors in the gut[J]. Pharmacol Ther, 1994, 62: 159-173.

[11] 田岳民，陈昕，王伟，等. 多巴胺能细胞在大鼠消化道不同部位分布的比较[J]. 首都医科大学学报，2007, 28: 225-228.

[12] Briejer M R, Akkermans L M, Schuurkes J A. Gastrointestinal prokinetic benzamides: the pharmacology underlying stimulation of motility[J]. Pharmacol Rev, 1995, 47: 631-651.

[13] Tian Y M, Chen X, Luo D Z, et al. Alteration of dopaminergic markers in gastrointestinal tract of different rodent models of Parkinson'S Disease[J]. Neuroscience, 2008, 153: 634-644.

(收稿日期：2009-10-30)

编辑　陈瑞芳

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net