

硬枝碱蓬多糖通过肠肌间神经丛 抑制家兔离体十二指肠收缩及机制*

沙爱龙^{1,2}, 郝海燕³

1. 重庆三峡学院教师教育学院, 重庆 404120
2. 重庆三峡学院生物与食品工程学院 / 重庆市渝东北特色生物资源开发利用工程技术研究中心, 重庆 404120
3. 重庆三峡学院环境与化学工程学院 / 三峡库区水环境演变与污染防治重庆市重点实验室, 重庆 404120

摘要: 研究了不同剂量的硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠收缩活动的影响, 并探究其作用机制。利用 Medlab 生物信号采集处理系统记录用药前后各组家兔离体十二指肠的收缩活动, 观察硬枝碱蓬多糖低、中、高三个剂量组对肠收缩频率和幅度的影响。分别选取 Ach、CaCl₂ 与高剂量硬枝碱蓬多糖共同孵育, 观察对十二指肠收缩的影响。用 ELISA 法检测不同剂量的硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠中亮氨酸脑啡肽 (Leu-enk)、甲硫氨酸脑啡肽 (Met-enk) 含量和酪氨酸羟化酶 (TH) 活性的影响。结果显示, 与给药前相比, 硬枝碱蓬多糖 3 个剂量组对家兔离体十二指肠收缩频率和幅度均具有抑制作用, 其中低剂量组抑制不显著 ($P>0.05$)、中剂量组抑制显著 ($P<0.05$)、高剂量组抑制极显著 ($P<0.01$), 均呈现一定的剂量依赖效应。高剂量硬枝碱蓬多糖均能极显著 ($P<0.01$) 抑制 Ach、CaCl₂ 分别对肠收缩频率和幅度的促进作用, 抑制效果分别与硫酸阿托品和盐酸维拉帕米相当。ELISA 实验表明, 与正常对照组相比, 硬枝碱蓬多糖 3 个剂量组家兔离体十二指肠中 Leu-enk 和 Met-enk 含量均不同程度减少, TH 活性均不同程度升高。上述结果提示, 硬枝碱蓬多糖能抑制家兔离体十二指肠收缩, 作用机制可能是通过肠肌间神经丛抑制 G 蛋白耦联 M 受体介导的 AC- cAMP- PKA 和 PLC-IP₃- Ca²⁺ 信号转导通路及 Ca²⁺ 信号系统 (如抑制肌膜 I_{Ca-L} 进而抑制 Ca²⁺- CaM 信号通路); 可能通过抑制肌间神经丛运动神经元释放 Leu-enk 和 Met-enk, 从而抑制 G 蛋白耦联 δ 受体介导的 GTP-cAMP- (PKK 或 PKC) 信号通路及 Ca²⁺ 信号系统; 并可能通过促进肌间神经丛运动神经元释放 TH 引起 NE 增多, 再激活 G 蛋白耦联 β 受体介导的 AC- cAMP- PKA 信号转导通路。

关键词: 硬枝碱蓬多糖; 十二指肠平滑肌; 肌间神经丛; 神经递质

中图分类号: R965; R285.5; Q955 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2021) 04-0019-07

The mechanism of *Suaeda rigida* polysaccharides inhibiting the isolated duodenal contraction in rabbits through the myenteric plexus

SHA Ailong^{1,2}, HAO Haiyan³

1. School of Teacher Education, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China
2. School of Biology and Food Engineering / Chongqing Research Center for the Development and Utilization of Northeast Chongqing Characteristic Biological Resources, Chongqing Three Gorges

* 收稿日期: 2020-05-12

录用日期: 2020-07-23

网络首发日期: 2020-10-28

基金项目: 国家自然科学基金 (31360635); 重庆市教育委员会科学技术研究项目 (KJQN201901235, KJQN202001226); 重庆市渝东北特色生物资源开发利用工程技术研究中心开放基金项目 (19sgxyjdzz12); 重庆三峡学院人才引进科研启动金项目 (20190002)

作者简介: 沙爱龙 (1981年生), 男; **研究方向:** 胃肠及内分泌生理学、神经药理学; E-mail: lyshaailong@163.com

University, Chongqing 404120, China

3. School of Environmental and Chemical Engineering / Chongqing Key Laboratory of Water Environment Evolution and Pollution Control in Three Gorges Reservoir Area, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China

Abstract: The study aims to investigate the effect of different dosages of *Suaeda rigida* polysaccharides on the contractile activity of the isolated rabbit duodenum and explore its mechanism. The contractile activity of the isolated duodenum was recorded by Medlab biological signal acquisition and processing system before and after administration, and the effects of *Suaeda rigida* polysaccharides-treated groups of the low, medium, and high doses on the contractile frequency and amplitude of the intestines were observed. Acetylcholine (ACh) and CaCl_2 were selected respectively to be co-incubated with the high dose of *Suaeda rigida* polysaccharides to observe the effects on the duodenal contraction. The effects of different doses of *Suaeda rigida* polysaccharides on the contents of Leu enkephalin (Leu-enk), met enkephalin (Met-enk) and the activity of tyrosine hydroxylase (TH) in the isolated rabbit duodenum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the three dose groups of *Suaeda rigida* polysaccharides had inhibitory effects on the contractile frequency and amplitude of the isolated duodenum in rabbits compared with those before administration. Among them, the inhibition of the low dose group was not significant ($P>0.05$), the medium dose group was significant ($P<0.05$), and the high dose group was very significant ($P<0.01$), showing a dose-dependent effect. The high dose of *Suaeda rigida* polysaccharides could significantly ($P<0.01$) inhibit the promotion effects of ACh and CaCl_2 on the frequency and amplitude of intestinal contraction, and the inhibitory effects were similar to those of atropine sulfate and verapamil hydrochloride, respectively. The results of ELISA showed that compared with the control group, the contents of Leu-enk and Met-enk in the isolated rabbits duodenum in the three groups of *Suaeda rigida* polysaccharides were decreased in varying degrees, and the activity of TH was increased in varying degrees. These results indicated that *Suaeda rigida* polysaccharides can inhibit the contraction of the isolated rabbit duodenum. The mechanism may be that it can inhibit the signal transduction pathways of AC-cAMP-PKA and PLC-IP₃-Ca²⁺ and Ca²⁺ signaling systems mediated by G protein-coupled M receptor through the intestinal myenteric plexus; it may inhibit the GTP-cAMP-(PKK or PKC) signaling pathways and Ca²⁺ signaling systems mediated by G protein-coupled δ receptor by inhibiting the release of Leu-enk and Met-enk from the motor neurons of the myenteric plexus; it may also cause the increase of NE by promoting the release of TH from the motor neurons of the myenteric plexus and reactivate the AC-cAMP- PKA signaling pathway mediated by the G protein-coupled β receptor.

Key words: *Suaeda rigida* polysaccharides; duodenal smooth muscle; myenteric plexus; neurotransmitter

硬枝碱蓬 *Suaeda rigida* Kung et G. L. Chu, 属石竹目 Caryophyllales 藜科 Chenopodiaceae 碱蓬属 *Suaeda* 中最高大的双子叶植物, 为塔里木盆地特有种^[1], 主要分布于新疆阿克苏-巴楚一线地区, 生活力强、生物量大、营养成分含量高, 当地居民常采集其嫩叶以作野菜食用。因为硬枝碱蓬分布范围狭窄, 其分布区人口密度低, 科研院所、高校少, 故目前国内外对其研究报道很少。本课题组前期对硬枝碱蓬的化学成分及药理作用进行了初步研究, 结果表明硬枝碱蓬含有多糖、生物碱、挥发油、黄酮、皂甙等化学成分^[2], 具有抗

氧化^[3]、促进机体生长及抗病能力等药理作用^[4]。笔者曾研究硬枝碱蓬多糖对免疫抑制小鼠血清中 NO 含量及 NOS 活性的影响, 结果表明, 硬枝碱蓬多糖可通过显著抑制 NOS 并最终抑制 NO 的细胞毒性作用而对正常组织细胞发挥保护作用, 并进一步增强小鼠的免疫力^[5], 由此可推断多糖可能是硬枝碱蓬重要活性成分之一。目前有关硬枝碱蓬多糖其他药理作用的研究尚未见报道。已有研究表明植物多糖可影响小肠收缩^[6-7], 本实验拟通过硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠平滑肌收缩性的影响及其作用机制, 研究硬枝碱蓬中抑制胃肠

运动的有效成分, 以期为新药的研发提供新思路, 也可用于治疗胃肠运动功能亢进和硬枝碱蓬的开发利用提供新的理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康成年家兔, 体质量2.0~2.5 kg, 雌雄不拘, 由塔里木大学动物科学学院动物实验站提供。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 硬枝碱蓬, 采自新疆生产建设兵团第一师阿拉尔市十二团, 经课题组鉴定。蛋白酶抑制剂购自Sigma公司, 氯化乙酰胆碱(Ach)、硫酸阿托品、盐酸维拉帕米均购自国药集团化学试剂有限公司, 亮氨酸脑啡肽(Leu-enk) ELISA试剂盒、甲硫氨酸脑啡肽(Met-enk) ELISA试剂盒均购自上海晶抗生物工程有限公司, 酪氨酸羟化酶(TH) ELISA试剂盒购于美国ProSci公司, 乐氏液(KCl 0.42 g, NaCl 9 g, CaCl₂ 0.24 g, NaHCO₃ 0.2 g, 葡萄糖1.0 g, 蒸馏水1 000 mL; 所用试剂均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司), 磷酸盐缓冲液(PBS)购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2.2 仪器 MedLab-U/4C501型生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司), JZ101型张力换能器(北京新航兴业科贸有限公司), HW-400E恒温平滑肌槽(成都泰盟科技有限公司), PowerWave XS全波长酶标仪(美国Bio-Tek宝特), 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), 精密电子天平(上海精科天平), 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 硬枝碱蓬多糖的提取方法 按照课题组先前的研究方法制备硬枝碱蓬多糖^[5]。将制备得到的灰白色固态絮状硬枝碱蓬多糖2.00 g, 置于100 mL容量瓶中用蒸馏水溶解, 即得高质量浓度硬枝碱蓬多糖溶液(20 mg/mL)。后稀释2次, 各稀释1倍, 分别得到10、5 mg/mL中、低质量浓度的硬枝碱蓬多糖溶液。

1.3.2 家兔离体十二指肠平滑肌标本的制备及收缩活动记录 家兔禁食24 h后, 采用颈椎脱臼处死, 迅速剖开上腹, 剪取靠近胃幽门端的十二指肠段约2 cm, 轻轻剥离附着其上的脂肪组织, 而后置于37℃乐氏液中。稳定10 min后, 用棉线将十二指肠段一端连张力换能器并连接MedLab生物信号采集处理系统, 另一端系于恒温平滑肌槽试

验片底端L型钩上, 试验片置于盛有18 mL乐氏液的试验管内, 调节棉线刚好垂直, 使离体肠段悬浮于实验管中央。设定恒温平滑肌槽水温37℃, 每秒钟通过内置气泵通入1~2个气泡。记录肠段收缩曲线, 稳定10 min后, 开始实验, 记录指标包括收缩频率和收缩幅度。

1.3.3 不同质量浓度硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的影响 实验采用分别加入的方法, 即加入一种质量浓度的硬枝碱蓬多糖并观察其效果后, 用37℃乐氏液冲洗2~3次, 再加入另一质量浓度硬枝碱蓬多糖。按照低(5 mg/mL)、中(10 mg/mL)、高(20 mg/mL)质量浓度的顺序依次进行实验, 各质量浓度硬枝碱蓬多糖加入试验管后分别观察记录6 min, 以加药前1 min的肠段收缩曲线作为对照, 记录3个质量浓度组的硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的影响, 并计算收缩频率和幅度的变化率

$$\text{变化率} = \frac{\text{加药后平均值} - \text{加药前平均值}}{\text{加药前平均值}} \times 100\%$$

为了研究硬枝碱蓬多糖对十二指肠平滑肌收缩影响的作用机制, 按照“1.3.4~1.3.6”所述方法继续设计了如下实验。

1.3.4 硬枝碱蓬多糖对ACh诱导的家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的影响 待十二指肠段收缩曲线稳定后, 向试验管内加入ACh(0.1 μmol/L), 作用3 min后加入高质量浓度硬枝碱蓬多糖(20 mg/mL), 此期间观察记录家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的变化。另设一组用硫酸阿托品(1 μmol/L)作为阳性对照。

1.3.5 硬枝碱蓬多糖对CaCl₂诱导的家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的影响 待肠段收缩曲线稳定后, 向试验管内加入CaCl₂(0.1 mol/L), 作用3 min后加入高质量浓度硬枝碱蓬多糖(20 mg/mL), 此期间观察记录家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的变化。另设一组用盐酸维拉帕米(0.1 μmol/L)作为阳性对照。

1.3.6 硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠中Leu-enk、Met-enk含量和TH活性的影响 将36只家兔随机分为4组, 即正常对照组(乐氏液组), 低、中、高质量浓度硬枝碱蓬多糖组(n=9)。制备各组家兔离体十二指肠平滑肌标本, 分别取乐氏液和低、中、高质量浓度硬枝碱蓬多糖浸浴各组离体十二指肠段, 6 min后, 将肠段剪碎, 置于9倍的磷酸盐缓冲液(PBS)中, 加入蛋白酶抑制剂后用冰水浴匀浆10 min制成10%组织匀浆, 经反

复冻融 3 次后, 5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书分别测定各组 Leu-enk、Met-enk 含量和 TH 活性。

1.3.7 数据统计分析 实验结果数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 数据分析在 SPSS 19.0 软件上进行。组间数据采用 t 检验或单因素方差分析, 进一步组间比较选用 Dunnett- t 检验。 $P<0.05$ 为统计学差异显著, $P<0.01$ 为统计学差异极显著。

表 1 硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠收缩频率的影响¹⁾($n=9$)

Table 1 Effects of *Suaeda rigida* polysaccharides on the contractile frequency of the isolated duodenum in rabbits($n=9$)

组别	$w/(\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	收缩频率/(次 $\cdot\text{min}^{-1}$)		抑制率/%
		给药前	给药后	
低剂量组	0.10	13.28 \pm 0.75	12.57 \pm 0.78	5.35
中剂量组	0.20	13.14 \pm 0.89	12.00 \pm 0.81 [*]	8.68
高剂量组	0.40	13.14 \pm 0.69	11.71 \pm 0.75 ^{**}	10.89

1) 给药后与给药前比较, ^{**} $P<0.01$, ^{*} $P<0.05$ 。

2.2 硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠收缩幅度的影响

由表 2 可知, 与给药前相比, 硬枝碱蓬多糖 3 个剂量组对家兔离体十二指肠收缩幅度均具有抑

2 结果

2.1 硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠收缩频率的影响

与给药前相比, 硬枝碱蓬多糖 3 个剂量组对家兔离体十二指肠收缩频率均具有抑制作用, 其中低剂量组抑制不显著 ($P>0.05$)、中剂量组抑制显著 ($P<0.05$)、高剂量组抑制极显著 ($P<0.01$), 抑制率也随剂量升高而逐渐增强, 呈现一定的剂量依赖效应。

制作用, 其中低剂量组抑制不显著 ($P>0.05$)、中剂量组抑制显著 ($P<0.05$)、高剂量组抑制极显著 ($P<0.01$), 其抑制率随剂量升高而逐渐增强, 呈现一定的剂量依赖效应。

表 2 硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠收缩幅度的影响¹⁾($n=9$)

Table 2 Effects of *Suaeda rigida* polysaccharides on the contractile amplitude of the isolated duodenum in rabbits($n=9$)

组别	$w/(\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	收缩幅度/g		抑制率/%
		给药前	给药后	
低剂量组	0.10	7.34 \pm 0.04	7.07 \pm 0.30	3.68
中剂量组	0.20	7.11 \pm 0.05	6.74 \pm 0.28 [*]	5.20
高剂量组	0.40	7.02 \pm 0.03	5.20 \pm 0.04 ^{**}	11.68

1) 给药后与给药前比较, ^{**} $P<0.01$, ^{*} $P<0.05$ 。

2.3 硬枝碱蓬多糖对 ACh 诱导的家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的影响

由表 3 可知, 与给药前相比, 单独应用 ACh 极显著增加了家兔离体十二指肠收缩频率和幅度 ($P<0.01$)。加入硬枝碱蓬多糖 (20 mg/mL) 后, 收缩频率和幅度均明显下降, 作用效果与硫酸阿托品相当, 与 ACh 相比差异均极显著 ($P<0.01$)。

2.4 硬枝碱蓬多糖对 CaCl_2 诱导的家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的影响

由表 4 可知, 与给药前相比, 单独应用 CaCl_2 极显著增加了家兔离体十二指肠收缩频率和幅度

($P<0.01$)。加入硬枝碱蓬多糖 (20 mg/mL) 后, 与 CaCl_2 相比, 收缩频率和幅度均极显著降低 ($P<0.01$), 作用效果与盐酸维拉帕米相当。

2.5 硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠 Leu-enk、Met-enk 含量和 TH 活性的影响

硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠组织中 Leu-enk、Met-enk 含量和 TH 活性的影响结果见表 5。与正常对照组相比, 硬枝碱蓬多糖 3 个剂量组家兔离体十二指肠组织中 Leu-enk、Met-enk 含量均减少, 其中低剂量组差异不显著 ($P>0.05$), 而高剂量组差异均极显著 ($P<0.01$); 中剂量组的

表3 硬枝碱蓬多糖对ACh诱导的家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的影响¹⁾(n=9)Table 3 Effects of *Suaeda rigida* polysaccharides on the frequency and amplitude of contraction of the isolated rabbit duodenum induced by ACh (n=9)

项目	给药前	Ach	硬枝碱蓬多糖(高)	硫酸阿托品阳性对照
收缩频率/(次·min ⁻¹)	13.14±0.69	17.36±1.25**	14.49±0.83##	13.65±0.70##
收缩幅度/g	7.02±0.03	13.27±1.08**	8.02±0.61##	7.49±0.58##

1) **表示给药前后相比较, $P<0.01$; ##表示与ACh干预后相比较, $P<0.01$ 。

表4 硬枝碱蓬多糖对CaCl₂诱导的家兔离体十二指肠收缩频率和幅度的影响¹⁾(n=9)Table 4 Effects of *Suaeda rigida* polysaccharides on the frequency and amplitude of contraction of the isolated rabbit duodenum induced by CaCl₂ (n=9)

项目	给药前	CaCl ₂	硬枝碱蓬多糖(高)	维拉帕米阳性对照
收缩频率/(次·min ⁻¹)	13.11±0.65	16.81±1.19**	13.52±0.71##	13.04±0.76##
收缩幅度/g	6.97±0.03	13.42±1.23**	8.34±0.64##	8.15±0.63##

1) **表示给药前后相比较, $P<0.01$; ##表示与CaCl₂干预后相比较, $P<0.01$ 。

Leu-enk 差异不显著 ($P>0.05$), 但 Met-enk 差异却极显著 ($P<0.01$)。硬枝碱蓬多糖3个剂量组家兔离体十二指肠中TH活性均高于正常对照组, 且

呈现一定的剂量依赖效应趋势, 其中低剂量组差异不显著 ($P>0.05$), 而中、高剂量组差异均极显著 ($P<0.01$)。

表5 硬枝碱蓬多糖对家兔离体十二指肠Leu-enk、Met-enk含量和TH活性的影响(n=9)

Table 5 Effects of *Suaeda rigida* polysaccharides on the contents of Leu-enk and Met-enk and the activity of TH in the isolated duodenum of rabbit (n=9)

组别	ρ / (mg·mL ⁻¹)	ρ (Leu-enk) / (pg·mL ⁻¹)	ρ (Met-enk) / (pg·mL ⁻¹)	ρ (TH) / (pg·mL ⁻¹)
正常对照组	-	6.10±0.89	7.59±1.03	632.25±17.39
低剂量组	5	6.03±1.46	7.16±0.98	663.28±26.51
中剂量组	10	5.26±0.94	6.01±0.30**	973.19±25.16**
高剂量组	20	3.15±0.41**	4.38±0.32**	1394.17±46.72**

3 讨论

与骨骼肌类似, 十二指肠平滑肌收缩也是在肌膜动作电位触发下发生兴奋-收缩耦联, 触发因子也是Ca²⁺, 不同处在于Ca²⁺浓度的调控存在电-机械耦联和药物-机械耦联两条途径^[8]。电-机械耦联使肌膜中的I_{Ca-L}将细胞外Ca²⁺释放进胞质内; 药物-机械耦联是外源性药物通过激活G蛋白耦联受体-磷脂酶C(PLC)-三磷酸肌醇(IP₃)信号通路生成IP₃, 最终介导肌质网内Ca²⁺释放进胞质中引起的^[8]。

十二指肠的活动受神经和体液因素的影响。体液因素包括十二指肠平滑肌细胞膜上存在的多种离子通道和受体, 当信使分子激活离子通道时

或神经递质、外源药物与膜上受体结合时会引起平滑肌细胞信号转导通路发生变化, 由此调控其运动。神经因素包括外来神经(交感和副交感)和肠神经系统的调节, 家兔十二指肠离体后虽失去外来神经的支配, 但肠神经系统仍存在^[9]。肠神经系统由胃肠道壁内两层神经结构组成, 内含大量神经元和神经纤维, 可分为肌间神经丛和黏膜下神经丛, 其中黏膜下神经丛主要调节上皮细胞和腺细胞功能, 而位于环形肌和纵行肌之间的肌间神经丛则主要支配平滑肌的活动^[8]。十二指肠平滑肌运动主要受肌间神经丛调节和支配, 构成肌间神经丛的神经元通过释放不同的神经递质调节十二指肠运动, 这些神经递质可分为两类, 兴奋性神经递质如ACh、脑啡肽(Enk)、P物质等

可促进十二指肠运动^[10], 抑制性神经递质如肾上腺素、去甲肾上腺素 (NE)、生长抑素等则起抑制作用^[11]。

Ach 是十二指肠运动的兴奋性神经递质, 与肠肌膜上的 G 蛋白耦联 M 受体结合后激活腺苷酸环化酶 (AC), 使细胞内的环磷酸腺苷 (cAMP) 浓度升高, 激活蛋白激酶 A (PKA), 进而激活 I_{Ca-L} 使细胞外 Ca^{2+} 内流增多^[12]。Ach 还可以通过与 M 受体结合后激活 G 蛋白亚型耦联受体, 再激活 PLC, 产生 IP_3 和二酰甘油 (DG), 再激活肌浆网膜中的 IP_3 受体, 肌质网内 Ca^{2+} 释放进胞质中, 从而导致十二指肠平滑肌收缩增强^[13]。由本实验结果可知, 硬枝碱蓬多糖能极显著 ($P < 0.01$) 抑制 Ach、 $CaCl_2$ 分别对肠收缩频率和幅度的促进作用, 抑制效果分别与硫酸阿托品和盐酸维拉帕米相当, 而硫酸阿托品和盐酸维拉帕米分别为常用的 M 胆碱受体阻断药和 I_{Ca-L} 阻断药。故此说明, 硬枝碱蓬多糖可能通过抑制 G 蛋白耦联 M 受体介导的 AC-cAMP-PKA 和 PLC- IP_3 - Ca^{2+} 信号转导通路及 Ca^{2+} 信号系统 (如抑制肌膜 I_{Ca-L} 进而抑制 Ca^{2+} -CaM 信号通路), 从而抑制离体十二指肠平滑肌收缩。

Enk 也是十二指肠运动的兴奋性神经递质, 属内源性阿片神经肽家族的一员, 主要包括 Leu-enk、Met-enk 两种, 本课题组前期研究表明 Enk 是 δ 阿片受体的内源性配体^[14]。通过与 G 蛋白耦联 δ 受体结合, Enk 可激活肠肌膜上 GTP 结合蛋白^[15], 使细胞内 cAMP 浓度升高, 激活蛋白激酶 K (PKK) 和 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶 C (PKC)^[16], 进而激活 Ca^{2+} 信号系统^[17], 导致十二指肠平滑肌收缩增强。TH 是 NE 合成的限速酶, 可作为 NE 能神经元活性的

标志, TH 表达升高直接引起 NE 合成增多^[18], 而 NE 属于肾上腺素能 β 受体激动药, 可通过激活 G 蛋白耦联 β 受体介导的 AC-cAMP-PKA 信号转导通路, 从而松弛十二指肠平滑肌。ELISA 实验中, 硬枝碱蓬多糖 3 个剂量组家兔离体十二指肠组织中 Leu-enk 和 Met-enk 含量均不同程度减少, TH 活性均不同程度升高, 表明硬枝碱蓬多糖可能通过调节肌间神经丛运动神经元的活动而影响十二指肠运动。硬枝碱蓬多糖可能通过降低 Leu-enk 和 Met-enk 含量, 抑制 G 蛋白耦联 δ 受体介导的 GTP-cAMP-(PKK 或 PKC) 信号通路及 Ca^{2+} 信号系统, 从而抑制离体十二指肠收缩; 并可能通过升高 TH 活性引起 NE 增多, 再激活 G 蛋白耦联 β 受体介导的 AC-cAMP-PKA 信号转导通路, 从而松弛离体十二指肠平滑肌。

综合本研究结果可得知, 多糖为硬枝碱蓬中抑制十二指肠运动的有效成分, 作用机制可能是通过肠肌间神经丛抑制 G 蛋白耦联 M 受体介导的 AC-cAMP-PKA 和 PLC- IP_3 - Ca^{2+} 信号转导通路及 Ca^{2+} 信号系统 (如抑制肌膜 I_{Ca-L} 进而抑制 Ca^{2+} -CaM 信号通路); 可能通过抑制肌间神经丛运动神经元释放 Leu-enk 和 Met-enk, 从而抑制 G 蛋白耦联 δ 受体介导的 GTP-cAMP-(PKK 或 PKC) 信号通路及 Ca^{2+} 信号系统; 并可能通过促进肌间神经丛运动神经元释放 TH 引起 NE 增多, 再激活 G 蛋白耦联 β 受体介导的 AC-cAMP-PKA 信号转导通路。硬枝碱蓬多糖有望在胃肠运动功能亢进等疾病的新药研发中发挥作用, 本研究也为拓展硬枝碱蓬临床新用途提供了基础理论依据。

参考文献:

- [1] 冯纓, 严成, 尹林克. 新疆植物特有种及其分布[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 263-273.
FENG Y, YAN C, YIN L K. The endemic species and distribution in Xinjiang [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2003, 23(2): 263-273.
- [2] 郝海燕, 沙爱龙. 硬枝碱蓬化学成分的定性分析及生物碱含量的测定[J]. 食品科技, 2013, 38(1): 244-247.
HAO H Y, SHA A L. The qualitative determination of chemical constituents and alkaloids in *Suaeda rigida* [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(1): 244-247.
- [3] 郝海燕, 沙爱龙, 骆春敏. 硬枝碱蓬对卡拉库尔羊血清中谷胱甘肽及其相关酶活性的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2017, 40(1): 20-24.
HAO H Y, SHA A L, LUO C M. Effects of *Suaeda rigida* on glutathione and its related enzymes in the serum of karakul sheep [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2017, 40(1): 20-24.
- [4] 沙爱龙, 李继兴, 葛建军, 等. 硬枝碱蓬对卡拉库尔羊生长性能和血液生理生化指标的影响[J]. 西北农业学报, 2013, 22(3): 16-22.
SHA A L, LI J X, GE J J, et al. Effects of *Suaeda rigida* on growth performance and hematological and bio-

- chemical parameters of karakul sheep [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2013, 22 (3) : 16-22.
- [5] 沙爱龙,杨雪萍,王伟,等. 硬枝碱蓬多糖对免疫抑制小鼠血清中NO含量及NOS活性的影响[J]. *四川动物*,2013,32(1):90-92.
SHA A L, YANG X P, WANG W, et al. Effects of the *Suaeda rigida* polysaccharides on NO content and NOS activity in the serum of immunosuppressed mice [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2013, 32(1): 90-92.
- [6] 王东,袁昌鲁,林力,等. 车前子多糖对小肠运动障碍小鼠的影响[J]. *中华中医药学刊*,2008,26(6): 1188-1189.
WANG D, YUAN C L, LIN L, et al. Effects of the polysaccharides in seeds of plantaginis on small intestinal motility disturbance in mice [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2008, 26 (6) : 1188-1189.
- [7] 李兰城. 锁阳多糖对小鼠胃排空、小肠推进功能的影响[J]. *北方药学*, 2013,10(9):43-44.
LI L C. Effect of cynomorium songaricum polysaccharide on mice of gastric emptying and intestinal propulsion [J]. *Journal of North Pharmacy*, 2013, 10(9): 43-44.
- [8] 王庭槐. 生理学[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社, 2018:51-56,177-180.
WANG T H. *Physiology* [M]. 9th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018: 51-56, 177-180.
- [9] SANDERS K M. A case for interstitial cells of cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract [J]. *Gastroenterology*, 1996, 111: 492-512.
- [10] 王聪,赵盼,周亚男,等. 黄酒通过肠肌间神经丛抑制大鼠离体小肠的收缩[J]. *食品科学*,2019,40(9):173-178.
WANG C, ZHAO P, ZHOU Y N, et al. Chinese rice wine inhibits contraction activity of the isolated rat small intestine through intestinal myenteric plexus [J]. *Food Science*, 2019, 40(9): 173-178.
- [11] FURNESS J B. Integrated neural and endocrine control of gastrointestinal function[M]// BRIERLEY S, et al. *The enteric nervous system*. Berlin: Springer International Publishing, 2016: 159-173.
- [12] 黄崇生,吴辉雨,李阳友,等. 火麻仁水煎液对兔离体小肠平滑肌收缩活动的影响及机制探究[J]. *中医药临床杂志*,2019,31(7):1312-1316.
HUANG C S, WU H Y, LI Y Y, et al. Effect of huomaren decoction on contraction mechanism of rabbit small intestinal smooth muscle [J]. *Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 31 (7) : 1312-1316.
- [13] WALLACE J A, LI F, BALAKRISHNAN S, et al. Ets2 in tumor fibroblasts promotes angiogenesis in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8) : e71533.
- [14] SHA A L, SUN H S, WANG Y Y. Immunohistochemical observations of methionine-enkephalin and delta opioid receptor in the digestive system of *Octopus ocellatus* [J]. *Tissue Cell*, 2013, 45(1): 83-87.
- [15] CHAKRABARTI S, WANG L, TANG W J, et al. Chronic morphine augment sadenylyl cyclase phosphorylation: relevance to altered signaling during tolerance/dependence [J]. *Mol Pharmacol*, 1998, 54 (6) : 949-953.
- [16] HEAGY W, TENG E, LOPEZ P, et al. Enkephalin receptors and receptor-mediated signal transduction in cultured human lymphocyte [J]. *Cell Immunology*, 1999, 191(1): 34-48.
- [17] MARTIN K I, GABRILOVAC J. The effect of δ -opioid agonists on intracellular calcium level in MOLT-4 T-cell line [J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 1999, 12(3): 113-119.
- [18] ARMAZ A, ADAMA B, JEFFREY A, et al. Angiotensin II mediates the axonal trafficking of tyrosine hydroxylase and dopamine β -hydroxylase mRNAs and enhances norepinephrine synthesis in primary sympathetic neurons [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2019, 150 (6): 666-677.

(责任编辑 张冰)