

• 工作综述 •



俞光岩 北京大学口腔医院口腔颌面外科教授、博士生导师,中华口腔医学会会长。主要研究方向为唾液腺疾病、口腔颌面部肿瘤以及唾液腺移植治疗重症干眼症。先后承担国家及省部级科研基金项目 40 余项,培养研究生及博士后 80 余名。率先开展腮腺功能性外科,明显减少手术并发症;提出唾液腺肿瘤临床病理新特点,牵头制定《唾液腺肿瘤诊断和治疗指南》;利用多学科交叉优势,创建了下颌下腺移植治疗重症干眼的关键技术体系并推广应用;完成了全世界病例数最多的下颌下腺移植治疗重症干眼的临床和基础研究;提出激活辣椒素受体调控下颌下腺分泌的新机制以及以受体为靶点人工调控移植下颌下腺分泌的新策略,创立了部分下颌下腺移植预防术后泪溢的新术式和诊治慢性阻塞性移植下颌下腺炎的新技术,明显提高了临床疗效;主持制定了《血管化自体下颌下腺移植治疗重症干眼症的指南》;开展下颌下腺功能保存治疗的系列研究,国内率先开展下颌下腺转位预防放射性口干新术式;建立腮腺和下颌下腺 CT 体积测量新方法,为腮腺和下颌下腺肿大的诊断提供客观标准;揭示 IgG4 相关唾液腺炎的临床、病理和影像学特点,建立 IgG4 相关唾液腺炎的诊断和治疗体系。先后发表 SCI 论文 150 余篇,以第一完成人获国家科学技术进步奖二等奖 1 项、省部级科技进步奖一等奖 3 项,获“全国五一劳动奖章获得者”“全国卫生系统先进工作者”“全国优秀科技工作者”等称号,并被中国香港牙医师学院、英国爱丁堡皇家外科医师学院和英国英格兰皇家外科医师学院先后授予“Honorary Fellowship”。

激活毒蕈碱乙酰胆碱受体调控下颌下腺分泌的机制研究

丛馨^{1,2}, 闵赛南³, 吴立玲^{1,2}, 蔡志刚³, 俞光岩^{3Δ}

(1. 北京大学口腔医学院·口腔医院, 唾液腺疾病研究中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心 口腔数字化医疗技术和材料国家工程实验室 口腔数字医学北京市重点实验室, 北京 100081; 2. 北京大学基础医学院生理学及病理生理学系, 北京 100191; 3. 北京大学口腔医学院·口腔医院口腔颌面外科, 北京 100081)

[关键词] 毒蕈碱乙酰胆碱受体; 下颌下腺; 分泌; 水通道蛋白; 紧密连接
[中图分类号] R781.7 [文献标志码] A [文章编号] 1671-467X(2019)03-0390-07
doi: 10.19723/j.issn.1671-467X.2019.03.003

下颌下腺作为三大唾液腺之一,其所分泌的唾液占静止性唾液的 60% ~ 65%,对维持摄食、味觉、抑制或杀灭病菌、保护口腔软组织及牙齿等起重要作用。全身性疾病如舍格伦综合征[又称干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)],IgG4 相关性疾病等,以及局部疾病如慢性下颌下腺炎、下颌下腺放射性损伤等,可引起腺体的分泌功能低下,严重者不仅有明显的口腔黏膜干燥,还可继发猖獗龋和念珠菌感

染等。
2018 年一项流行病学研究显示,唾液低分泌与日本社区老年男性 10 年死亡率呈正相关,可作为一个潜在的健康预测指标^[1]。全面、深入地认识下颌下腺分泌的调控机制对探索有效的干预措施和防治唾液腺分泌功能低下具有重要的意义。
下颌下腺的分泌受交感和副交感神经共同调控,其中副交感神经纤维通过释放乙酰胆碱与腺泡

基金项目: 国家自然科学基金(81671005、81771093) Supported by the National Natural Science Foundation of China (81671005, 81771093)
Δ Corresponding author's e-mail, gyyu@263.net
网络出版时间: 2019-5-23 9:11:32 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20190522.0906.002.html

细胞上的毒蕈碱乙酰胆碱受体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) 结合,在调控水、离子和小分子物质的分泌中发挥着重要作用^[2],因此,以 mAChR 为靶点人工调控下颌下腺的分泌是一个非常具有应用前景的研究领域。近些年来,北京大学口腔医学院俞光岩教授课题组从 mAChR 在下颌下腺的表达、功能、调控下颌下腺分泌的分子机制以及失副交感神经支配对腺体分泌的影响等方面进行了一系列的研究,本文就课题组已取得的研究进展做一工作综述。

1 mAChR 在下颌下腺中的表达和功能

mAChR 属于 G 蛋白偶联受体家族,包括 M1 ~ M5 五个亚型^[3]。根据受体结构和生物学效应的不同,人们把 mAChR 分成两大类:(1) M1、M3 和 M5 型受体主要与 G_{q/11} 蛋白偶联,作用于磷脂酰肌醇系统激活磷脂酶 C,生成 1,4,5-三磷酸肌醇 (inositol triphosphate, IP₃) 和甘油二酯 (diacylglycerol, DAG), IP₃ 可引起内质网释放 Ca²⁺, DAG 可激活蛋白激酶 C; (2) M2 和 M4 型受体主要与 G_i 蛋白偶联,抑制腺苷酸环化酶,延长 K⁺ 通道、非选择性阳离子通道和瞬时感受器电位通道等的开放^[4]。

mAChR 广泛分布于中枢及外周神经、心脏、平滑肌和各种腺体中,参与调控呼吸、循环、运动、体温调节和腺体分泌等多种重要生理功能^[5]。研究表明,在人、大鼠/小鼠及家兔等不同种属的下颌下腺中, M1 ~ M5 型受体几乎都有分布,其中 M3 型受体是表达最丰富的 mAChR 亚型,主要分布在腺泡细胞和血管内皮细胞上^[6-8]。Matsui 等^[9]在 M3 型受体基因敲除小鼠上发现,断乳后小鼠生长迟缓,腹腔注射 mAChR 激动剂匹鲁卡品 (pilocarpine) 几乎不引起刺激性唾液分泌。有研究发现, M3 型受体基因敲除小鼠的唾液分泌量比野生型小鼠减少约 90%,并且该敲除小鼠在进食时需不断饮水以补充唾液的不足,而 M1 型受体基因敲除小鼠则无该表型^[10-11],这提示 M3 型受体是参与调控唾液分泌的主要 mAChR 亚型。

目前,治疗重症干眼症最有效的手段之一是血管化自体下颌下腺移植术,即将患者的下颌下腺移植到颞部,下颌下腺导管转移到穹窿部结膜,以下颌下腺分泌液替代泪液^[12-13]。然而,移植后的腺体因失去神经支配,其分泌功能发生明显改变:术后 5 d 至 3 个月内,腺体分泌量明显减少,进入“休眠期”,易导致导管阻塞,影响手术的成功率;术后 6 个月起,约 40% 患者的腺体分泌过多,进入“泪溢期”,严

重影响生活质量^[14-15]。因此,如果能人工调控移植腺体的分泌将有助于全面提高下颌下腺移植治疗重症干眼症的近、远期疗效。为此,本课题组制备了血管化自体下颌下腺移植的家兔模型,发现在移植术后的“休眠期”(1~7 d)腺体中, M1 和 M3 型受体的 mRNA 和蛋白表达降低,经导管逆向给予 mAChR 激动剂卡巴胆碱可使腺体的分泌量显著增加, M1 和 M3 型受体表达上调^[8]。在家兔下颌下腺移植术后的远期“泪溢”(30~180 d)腺体中,尽管 M1 和 M3 型受体 mRNA 和蛋白的表达水平与对照组无差异,但参与介导 G 蛋白偶联受体激活后内化脱敏的重要分子 β-抑制蛋白 2 (β-arrestin 2) 的蛋白表达显著降低,提示此时的 mAChR 可能处于高敏状态。进一步在移植术后远期移植腺体的皮肤表面涂抹 mAChR 拮抗剂阿托品凝胶可显著降低腺体的分泌量^[16]。此外,我们收集了临床上行血管化自体下颌下腺移植术后远期因泪溢进行移植腺体减量切除手术的标本,发现 M1 和 M3 型受体 mRNA 和蛋白表达均显著高于对照腺体,而 M5 型受体的表达未见明显变化;减量切除标本中 IP₃ 的含量高于对照组,且卡巴胆碱刺激引起的细胞内 Ca²⁺ 反应性更强,提示移植远期泪溢患者移植腺体的 mAChR 处于高敏状态^[17]。

A 型肉毒毒素是一种能与胆碱神经元突触前膜结合从而抑制乙酰胆碱释放的药物,我们发现腺体内注射 A 型肉毒毒素可减轻家兔移植下颌下腺远期的唾液分泌增多现象,还能缓解下颌下腺移植术后患者远期泪溢的发生。这些结果提示, mAChR, 特别是 M1 和 M3 型受体在调控下颌下腺移植术后早期低分泌和远期高分泌中发挥了重要的作用。我们将基础研究的结果应用于临床,提出了一套个性化的术后调控移植下颌下腺分泌的新体系^[18-21],即对于“休眠期”的腺体,由医生间断注射卡巴胆碱起到导管内冲洗的作用,而对于术后远期季节性和机会性泪溢者采用阿托品凝胶或 A 型肉毒毒素局部注射以阻断 mAChR 的激活,目前该治疗体系已写进《血管化自体颌下腺移植治疗重症角结膜干燥症指南》中^[22]。

2 激活 mAChR 促进下颌下腺分泌的分子机制

2.1 调控水通道蛋白介导的跨细胞转运

唾液的成分以水为主,占 99% 以上。在腺泡细胞中,水分泌有两条主要的途径,即经水通道蛋白直接穿过基底膜和顶膜的跨细胞途径和经细胞间紧密连接调控的旁细胞途径^[23]。

水通道蛋白 5 (aquaporin 5, AQP5) 是介导唾液

腺细胞水的快速跨细胞转运的重要蛋白。激活 mAChR 可引起大鼠腮腺中 AQP5 从细胞浆向顶膜的转位,同时增加了唾液的分泌。在放射性损伤的唾液腺以及舍格伦综合征患者活检的唇腺标本中均可检测到 AQP5 的表达量降低和/或分布异常,在糖尿病患者的下颌下腺中 AQP5 蛋白表达较对照者减少,且在腺泡顶侧膜的分布降低^[24-26],这些结果表明,AQP5 的分布和含量是决定水的跨细胞转运的重要因素。

我们在原代培养的乳兔下颌下腺细胞中给予卡巴胆碱刺激可以上调 AQP5 mRNA 的表达,还可增加细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)的磷酸化。只有在非脂筏区(non-lipid raft)内表达的 AQP5 才具有水通道的功能,我们对 AQP5 在人腺泡细胞顶膜上的分布进行了深入探讨,发现卡巴胆碱刺激新鲜的人下颌下腺组织块可引起 AQP5 从脂筏区向非脂筏区的快速转位^[17]。在家兔自体下颌下腺移植术后早期低分泌的腺体中 AQP5 mRNA 和蛋白的含量显著降低,且 AQP5 由顶膜向细胞浆中弥散分布,而导管逆向给予卡巴胆碱可增加移植腺体 AQP5 的表达,引起 AQP5 重新分布在顶膜上,并且增加 ERK1/2 的磷酸化水平^[8]。此外,大鼠下颌下腺腺体内注射 A 型肉毒毒素可引起 AQP5 的含量降低和分布异常。在大鼠下颌下腺腺泡细胞系 SMG-C6 中,A 型肉毒毒素可呈时间依赖性地降低 AQP5 在细胞膜组分上的表达,增加其在细胞浆内的含量^[27]。

以上结果提示, mAChR 可通过改变 AQP5 的表达和分布进而调控下颌下腺腺泡细胞的水转运,而 ERK1/2 可能是激活 mAChR 调控 AQP5 表达和分布的重要细胞内蛋白激酶(图 1A)。

2.2 调控紧密连接蛋白介导的旁细胞转运

紧密连接(tight junction)是位于相邻上皮和内皮细胞间连接最顶端的一种特化结构,通过封闭细胞旁间隙发挥屏障功能。目前已知的构成紧密连接复合物的分子包括跨膜蛋白[如 claudin 家族(claudin-1~27)、闭合素(occludin)和黏附连接分子家族(junctional adhesion molecules, JAMs)]以及胞浆蛋白[如闭锁小带蛋白家族(zonula occludens-1~3, ZO-1~3)]等^[28],其中,同种或异种紧密连接跨膜蛋白的胞外环相互结合,形成一定大小的孔隙可对透过物质的大小和所带电荷进行选择,而胞浆蛋白则作为支架连接跨膜蛋白和细胞骨架蛋白中的纤维状微丝蛋白(filamentous actin, F-actin),由此形成一个完整的紧密连接跨膜蛋白-胞浆蛋白-细胞骨架蛋白网

状结构。多种生理性或病理性因素可通过影响紧密连接复合物的表达、分布或结构,进而改变紧密连接的功能^[29]。

以往文献报道,人下颌下腺中存在 claudin-1~5、7、11、16、occludin 和 ZO-1 的表达;小鼠胚胎下颌下腺中存在 claudin-1、3~8、10~12 和 ZO-1 的表达,但成年小鼠下颌下腺中缺少 claudin-6 和 11 的表达;大鼠下颌下腺中存在 claudin-1、3、5、occludin 和 ZO-1 的表达^[30]。我们在家兔下颌下腺中检测到 claudin-1~5、7、11、16、occludin 和 ZO-1 的表达^[31]。此外,由于啮齿类动物与人的唾液腺差异较大,我们还检测了小型猪下颌下腺中紧密连接分子的表达和分布特征。小型猪的下颌下腺中存在 claudin-1~5、7、11、16、occludin 和 ZO-1 的表达,与人下颌下腺中表达的紧密连接分子一致。免疫荧光染色显示,小型猪除了腺泡细胞不表达 claudin-7 外,其余各分子在浆液和黏液腺泡细胞以及导管细胞中均有表达,且分布与人类类似,而小鼠下颌下腺中 claudin-1 和 3 主要表达在腺泡细胞, claudin-4 主要表达在导管细胞,与人有较明显的差异^[32]。提示当采用不同实验动物进行下颌下腺紧密连接分子的相关研究时,应注意种属间的差异,小型猪下颌下腺的组织学结构、紧密连接分子的表达特点与人非常接近,是理想的实验动物之一。

1994 年有研究利用新鲜的大鼠下颌下腺组织在激光共聚焦显微镜下观察到卡巴胆碱能够增加只经旁细胞途径转运的荧光示踪分子——异硫氰荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的右旋糖酐(FITC-dextran)从腺泡基底侧向腺泡腔内转运,提示激活 mAChR 可增加下颌下腺腺泡细胞的旁细胞途径的通透性。2009 年有研究报道在离体灌流的大鼠下颌下腺上使用冰冻蚀刻技术,发现卡巴胆碱可破坏腺泡细胞顶侧膜上紧密连接分布的连续性,提示激活 mAChR 可能通过改变紧密连接的结构影响旁细胞途径的通透性,从而发挥促分泌的作用,但是,受 mAChR 调控的具体紧密连接分子及相关机制尚未见报道。

我们在 SMG-C6 细胞中发现,给予卡巴胆碱或选择性 M3 型受体激动剂西维美林可降低跨上皮细胞电阻(transsepithelial electrical resistance, TER)、增加相对分子质量为 4 000 的 FITC-dextran 的透过率,而这一作用可被 M3 型受体抑制剂 4-DAMP 所消除,提示激活 mAChR 主要经由 M3 型受体增加旁细胞途径的通透性。卡巴胆碱可选择性下调 claudin-4 蛋白的表达、降低细胞膜上 claudin-4 的含量,但不

影响其他紧密连接蛋白(如 claudin-1、occludin 及 ZO-1 等)的表达。特异性敲低 claudin-4 可使卡巴胆碱降低 TER 值的作用消失,而在过表达 claudin-4 的细胞中,卡巴胆碱仍可降低 TER 值并下调 claudin-4 的表达,表明 claudin-4 是受 mAChR 特异性调控的紧密连接靶分子。在机制方面,卡巴胆碱可促进 claudin-4 丝氨酸位点的磷酸化和 ERK1/2 的活化,ERK1/2 激酶抑制剂可消除卡巴胆碱降低 TER 值、抑制 claudin-4 的磷酸化和表达以及诱导 claudin-4 重分布的作用。点突变实验进一步显示,激活 mAChR 选择性调控 claudin-4 第 195 位丝氨酸的磷酸化,claudin-4 被磷酸化后可与 β -arrestin 2 结合,继而通过 β -arrestin 2 的招募引起 claudin-4 以 clathrin 依赖的方式发生内化,内化后的 claudin-4 在细胞浆中发生泛素化降解,最终导致 claudin-4 的表达降低和旁细胞途径的通透性增加^[33]。以上研究从细胞和分子水平揭示了 claudin-4 在介导 mAChR 调控下颌下腺旁细胞途径通透性中的作用,提出了对激活 mAChR 调控下颌下腺分泌机制的新见解(图 1A)。

此外,在卡巴胆碱灌流的家兔离体下颌下腺以及移植术后远期泪溢的腺体中均可观察到与紧密连接结构相连的 F-actin 发生了重排,电子显微镜下测定相邻腺泡细胞间紧密连接的宽度显著增加,而这些现象可被阿托品预处理所阻断^[16]。在人下颌下腺移植远期因泪溢行减量切除的组织标本中,同样观察到 F-actin 的重排、紧密连接宽度的增加。进一步检测发现,occludin 和 ZO-1 的表达增加,在腺泡细胞顶侧膜上的荧光强度增强,但是 occludin 和 ZO-1 的相互作用减弱,这与酪蛋白激酶 2(casein kinase 2,CK2)的表达增加有关。在离体培养的人正常下颌下腺组织中,卡巴胆碱刺激可降低 occludin 和 ZO-1 的相互作用、增加紧密连接的宽度,使用 CK2 抑制剂预处理可阻断卡巴胆碱的作用^[34-35]。上述这些结果表明,紧密连接表达、结构或功能的改变参与了移植下颌下腺的分泌,以紧密连接为靶点治疗下颌下腺异常分泌具有一定的可行性。

2.3 调控血管内皮紧密连接的开放

下颌下腺的血液供应为原始唾液的生成提供了来源。以往研究发现,激活副交感神经在引起分泌增加的同时,下颌下腺的血流量增加。血管内皮细胞间的紧密连接是决定血管通透性的重要结构,但其在分泌增加时的功能变化尚不清楚。为探讨下颌下腺血管内皮紧密连接在调控唾液分泌中的作用及机制,我们建立了活体观察小鼠下颌下腺旁细胞通透性的方法,发现非刺激状态下的下颌下腺血管内

皮细胞对相对分子质量为 4 000 的 FITC-dextran 通透,而对相对分子质量为 40 000 和 70 000 的 FITC-dextran 不通透;腹腔注射匹鲁卡品可增加相对分子质量为 4 000 和 40 000 的 FITC-dextran 从下颌下腺血管内向腺泡基底侧的流动,但对相对分子质量为 70 000 的 FITC-dextran 无影响。

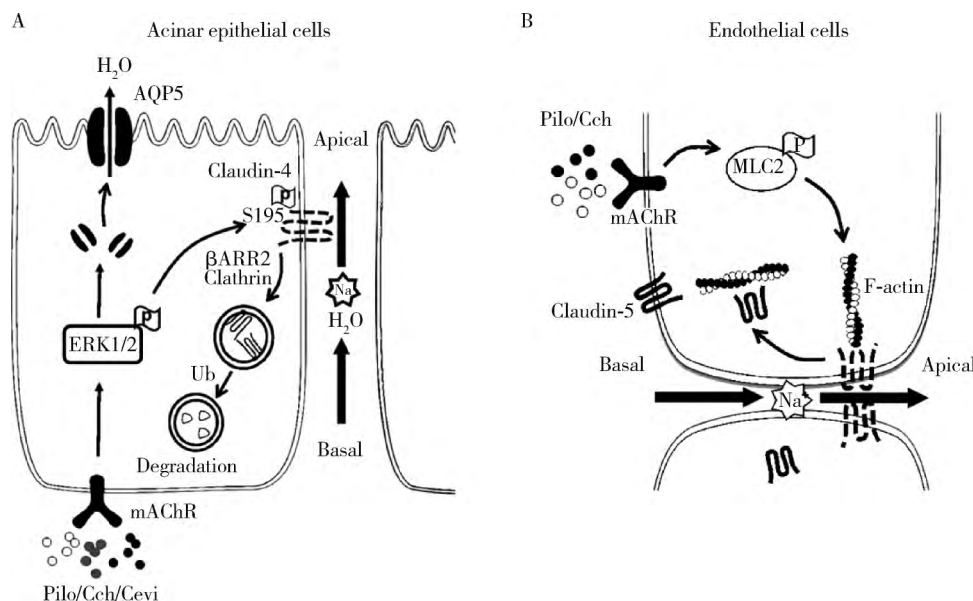
claudin-5 是特异性表达在下颌下腺血管内皮细胞上的紧密连接蛋白,腹腔注射匹鲁卡品后,claudin-5 发生从顶侧膜向基底侧膜以及细胞浆中的重分布,在培养的人正常下颌下腺组织中给予卡巴胆碱刺激以及泪溢患者减量组织标本中也均观察到 claudin-5 的重分布。进一步的机制研究发现,与调控紧密连接分布相关的重要信号分子肌球蛋白轻链 2(myosin light chain 2,MLC2)的磷酸化在匹鲁卡品刺激的小鼠下颌下腺以及泪溢患者减量切除组织标本的血管中均增加,受 MLC2 调控的下游分子 F-actin 也发生从靠近顶侧膜向细胞浆的重排。这些研究结果提示,下颌下腺血管内皮紧密连接的开放以及 claudin-5 的重分布参与了激活 mAChR 引起的促分泌作用,MLC2/F-actin 可能是调控下颌下腺血管内皮紧密连接功能的重要信号分子^[36](图 1B)。我们后续的研究还发现,claudin-5 表达和分布的改变可引起血管内皮屏障功能损伤,进而参与了舍格伦综合征唾液分泌功能降低的发生^[37],激活 mAChR 能否通过调控下颌下腺血管内皮 claudin-5 来干预口干症的发生发展值得进一步研究。

3 失副交感神经支配对下颌下腺分泌的影响

既往研究表明,下颌下腺失副交感神经支配后短期内(4 周内)会发生腺体萎缩和分泌量降低,然而,对下颌下腺失副交感神经支配远期的变化尚缺乏研究。由于在进行自体血管化下颌下腺移植术时,支配下颌下腺的神经被完全离断,未与受植区的任何神经进行吻合,这为我们提供了观察下颌下腺失副交感神经支配远期变化的模型。与失神经支配近期的结果不同,在术后 3 个月和 6 个月,家兔及大鼠下颌下腺的静息性唾液分泌均显著增加,而刺激性唾液分泌显著低于对照组,提示静息性分泌的增加并不是由于神经再支配的结果^[38]。我们又在与人唾液腺更为接近的小型猪上建立了下颌下腺单纯失副交感神经支配的模型,同样发现失副交感神经支配后远期,下颌下腺静息性唾液分泌增加,且干细胞标志分子 SOX2(SRY-related HMG-box 2)等在腺体高表达,提示失副交感神经支配的下颌下腺可自发性进行修复再生。小型猪失副交感神经支配远期

的腺体中 ,M3 型受体表达水平增加 ,AQP5 ,claudin-1、3 和 4 的蛋白表达也显著上调 ,提示 mAChR 及其

调控的跨细胞转运和旁细胞转运均增强^[39] ,这为治疗下颌下腺分泌异常类疾病提供了新思路。



A , the effect of mAChR activation on transcellular and paracellular transport in acinar epithelial cells of submandibular gland; B , the effect of mAChR activation on the opening of endothelial tight junctions in submandibular gland. mAChR , muscarinic acetylcholine receptor; Pilo , pilocarpine; Cch , carbachol; Cevi , cevimeline; AQP5 , aquaporin 5; ERK1/2 , extracellular signal-regulated kinase 1/2; βARR2 , β-arrestin 2; MLC2 , myosin light chain 2; F-actin , filamentous actin.

图 1 激活毒蕈碱乙酰胆碱受体对下颌下腺上皮和内皮细胞物质转运的影响

Figure 1 The effect of mAChR activation on material transport in submandibular gland epithelium and endothelium

4 存在问题及今后工作的展望

紧密连接是由多种分子构成的大分子复合物 ,我们目前只对下颌下腺上皮细胞和血管内皮细胞上的紧密连接分子表达、分布和功能进行了探讨 ,但对同样存在紧密连接表达的导管上皮细胞尚未关注。由于下颌下腺导管系统对于原始唾液的重吸收和离子成分的调节作用非常重要 ,因此紧密连接在导管上皮中的表达种类和具体功能尚需要研究。

据 2012 年全球肿瘤流行病学统计数据 (GLOBOCAN 2012) 显示 ,头颈部鳞状细胞癌在全身常见恶性肿瘤中位列第 7 ,放疗是头颈部鳞状细胞癌重要的治疗手段之一^[40] ,而放射损伤造成的唾液腺功能减退是放疗最常见的并发症之一。有研究表明 ,患者放疗期间口腔干燥症的发病率为 93.0% ,放疗后 2 年以上的发病率仍高居 85.3%^[41]。我们的研究发现 ,失副交感神经支配对大鼠和小型猪下颌下腺远期在静息状态下的分泌均有促进作用 ,那么该方法是否可以应用于防治放射性损伤造成的腺体分泌功能低下值得尝试和深入研究。

(志谢:感谢北京大学口腔医学院、北京大学基础医学院、首都医科大学附属北京同仁医院参与本课题研究的全体

同道的辛勤工作!)

参考文献

[1] Iwasaki M , Borgnakke WS , Yoshihara A , et al. Hyposalivation and 10-year all-cause mortality in an elderly Japanese population [J]. Gerodontology , 2018 , 35(2) : 87 - 94.

[2] Proctor GB , Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves [J]. Auton Neurosci , 2007 , 133(1) : 3 - 18.

[3] Wess J , Blin N , Mutschler E , et al. Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling [J]. Life Sci , 1995 , 56(11 - 12) : 915 - 922.

[4] Hulme EC , Birdsall NJ , Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol , 1990 , 30: 633 - 673.

[5] Wei J , Walton EA , Milici A , et al. m1-m5 muscarinic receptor distribution in rat CNS by RT-PCR and HPLC [J]. J Neurochem , 1994 , 63(3) : 815 - 821.

[6] Giraldo E , Martos F , Gomez A , et al. Characterization of muscarinic receptor subtypes in human tissues [J]. Life Sci , 1988 , 43(19) : 1507 - 1515.

[7] Ryberg AT , Warfvinge G , Axelsson L , et al. Expression of muscarinic receptor subtypes in salivary glands of rats , sheep and man [J]. Arch Oral Biol , 2008 , 53(1) : 66 - 74.

[8] Shi L , Cong X , Zhang Y , et al. Carbachol improves secretion in the early phase after rabbit submandibular gland transplantation [J]. Oral Dis , 2010 , 16(4) : 351 - 359.

[9] Matsui M , Motomura D , Karasawa H , et al. Multiple functional

- defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(17): 9579–9584.
- [10] Gautam D, Heard TS, Cui Y, et al. Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3 muscarinic receptor single- and double-knockout mice [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 66(2): 260–267.
- [11] Nakamura T, Matsui M, Uchida K, et al. M(3) muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice [J]. *J Physiol*, 2004, 558(Pt 2): 561–575.
- [12] Zhang L, Su JZ, Cai ZG, et al. Factors influencing the long-term results of autologous microvascular submandibular gland transplantation for severe dry eye disease [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2019, 48(1): 40–47.
- [13] Yu GY, Zhu ZH, Mao C, et al. Microvascular autologous submandibular gland transfer in severe cases of keratoconjunctivitis sicca [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2004, 33(3): 235–239.
- [14] Su JZ, Cai ZG, Liu XJ, et al. Management of duct obstruction in transplanted submandibular glands [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2018, 46(5): 825–830.
- [15] Su JZ, Cai ZG, Yu GY. Microvascular autologous submandibular gland transplantation in severe cases of keratoconjunctivitis sicca [J]. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 2015, 37(1): 5.
- [16] Yang NY, Ding C, Li J, et al. Muscarinic acetylcholine receptor-mediated tight junction opening is involved in epiphora in late phase of submandibular gland transplantation [J]. *J Mol Histol*, 2017, 48(2): 99–111.
- [17] Ding C, Cong X, Zhang Y, et al. Hypersensitive mAChRs are involved in the epiphora of transplanted glands [J]. *J Dent Res*, 2014, 93(3): 306–312.
- [18] Liu XJ, Li M, Su JZ, et al. Carbachol improves the secretion of transplanted submandibular glands during the latent period after microvascular autologous transplantation for severe keratoconjunctivitis sicca [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2016, 45(10): 1273–1279.
- [19] Cai JR, Shan XF, Cai ZG, et al. A new treatment for epiphora secondary to submandibular gland transplantation: transcutaneous atropine gel [J]. *Ocul Surf*, 2014, 12(3): 221–226.
- [20] Shan XF, Lv L, Cai ZG, et al. Botulinum toxin A treatment of epiphora secondary to autologous submandibular gland transplantation [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2019, 48(4): 475–479.
- [21] 俞光岩, 吴立玲, 蔡志刚, 等. 血管化自体下颌腺移植治疗重症干眼 20 年研究 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2018, 50(1): 1–4.
- [22] 血管化自体颌下腺移植治疗重症角结膜干燥症研究项目组. 血管化自体颌下腺移植治疗重症角结膜干燥症指南 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2010, 45(7): 391–393.
- [23] Kawedia JD, Nieman ML, Boivin GP, et al. Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3621–3626.
- [24] Yoshimura S, Nakamura H, Horai Y, et al. Abnormal distribution of AQP5 in labial salivary glands is associated with poor saliva secretion in patients with Sjögren's syndrome including neuromyelitis optica complicated patients [J]. *Mod Rheumatol*, 2016, 26(3): 384–390.
- [25] Li Z, Zhao D, Gong B, et al. Decreased saliva secretion and down-regulation of AQP5 in submandibular gland in irradiated rats [J]. *Radiat Res*, 2006, 165(6): 678–687.
- [26] Huang Y, Shi X, Mao Q, et al. Aquaporin 5 is degraded by autophagy in diabetic submandibular gland [J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(9): 1049–1059.
- [27] Xu H, Shan XF, Cong X, et al. Pre- and post-synaptic effects of botulinum toxin A on submandibular glands [J]. *J Dent Res*, 2015, 94(10): 1454–1462.
- [28] Tsukita S, Tanaka H, Tamura A. The claudins: from tight junctions to biological systems [J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(2): 141–152.
- [29] 丛馨, 张艳, 俞光岩, 等. 激活辣椒素受体是调控下颌腺分泌的新途径 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2015, 47(1): 8–12.
- [30] Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS. Biology of claudins [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295(4): F867–F876.
- [31] Cong X, Zhang Y, Shi L, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid subtype 1 increases expression and permeability of tight junction in normal and hyposecretory submandibular gland [J]. *Lab Invest*, 2012, 92(5): 753–768.
- [32] Zhang XM, Huang Y, Zhang K, et al. Expression patterns of tight junction proteins in porcine major salivary glands: a comparison study with human and murine glands [J]. *J Anat*, 2018, 233(2): 167–176.
- [33] Cong X, Zhang Y, Li J, et al. Claudin-4 is required for modulation of paracellular permeability by muscarinic acetylcholine receptor in epithelial cells [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(12): 2271–2286.
- [34] Ding C, Zhang Y, Peng X, et al. Proteomic analysis of human transplanted submandibular gland in patients with epiphora after transplantation [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(5): 2206–2215.
- [35] Ding C, Cong X, Zhang XM, et al. Decreased interaction between ZO-1 and occludin is involved in alteration of tight junctions in transplanted epiphora submandibular glands [J]. *J Mol Histol*, 2017, 48(3): 225–234.
- [36] Cong X, Zhang Y, He QH, et al. Endothelial tight junctions are opened in cholinergic-evoked salivation *in vivo* [J]. *J Dent Res*, 2017, 96(5): 562–570.
- [37] Cong X, Zhang XM, Zhang Y, et al. Disruption of endothelial barrier function is linked with hyposecretion and lymphocytic infiltration in salivary glands of Sjögren's syndrome [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(10): 3154–3163.
- [38] Qi W, Cong X, Zhang XM, et al. Parasympathectomy increases resting salivary secretion in normal and irradiated submandibular glands of rats [J]. *Eur J Oral Sci*, 2017, 125(2): 110–118.
- [39] Zhang XM, Huang Y, Cong X, et al. Parasympathectomy increases resting secretion of the submandibular gland in minipigs in the long term [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9515–9524.

- [40] Ferlay J , Soerjomataram I , Dikshit R , et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer* , 2015 , 136(5) : E359 – E386.
- [41] Jensen SB , Pedersen AM , Vissink A , et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence , severity and impact on quality of life [J]. *Support Care Cancer* , 2010 , 18(8) : 1039 – 1060.

(2019-03-31 收稿)

(本文编辑: 任英慧)

Role and mechanism of muscarinic acetylcholine receptor in the regulation of sub-mandibular gland secretion

CONG Xin^{1,2} , MIN Sai-nan³ , WU Li-ling^{1,2} , CAI Zhi-gang³ , YU Guang-yan^{3Δ}

(1. Center for Salivary Gland Diseases , Peking University School and Hospital of Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & National Engineering Laboratory for Digital and Material Technology of Stomatology & Beijing Key Laboratory of Digital Stomatology , Beijing 100081 , China; 2. Department of Physiology and Pathophysiology , Peking University School of Basic Medical Sciences , Beijing 100191 , China; 3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery , Peking University School and Hospital of Stomatology , Beijing 100081 , China)

SUMMARY Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) , including M1 – M5 subtypes , are classic receptors in regulating water , ion , and solute transport in salivary gland. Our work focuses on the studies on the expression pattern and function of mAChR in the submandibular gland (SMG) , and the underlying mechanism involved in the mAChR-regulated secretion , together with the effect of parasympathectomy on the salivary secretion. Microvascular autotransplantation of SMG into the temporal fossa provides a continuous and endogenous source of fluids , and is currently an effective method for treating severe keratoconjunctivitis sicca. By using RT-PCR , Western blotting , and immunofluorescence , our data demonstrated that the expression of M1 and M3 subtypes were decreased in latent period in rabbit SMG autotransplantation model , whereas carbachol stimulation promoted the salivary secretion , as well as M1 and M3 expressions. By contrast , mAChRs were hypersensitive in epiphora SMGs , whereas atropine gel and botulinum toxin A application significantly inhibited the hypersecretion in both animal models and patients. Furthermore , the possible intracellular signal molecules involved in the mAChR-modulated salivary secretion were explored. Activation of mAChR upregulated the expression of aquaporin 5 (AQP5) , the main transporter that mediated water secretion through transcellular pathway , and led to AQP5 trafficking from lipid rafts to non-lipid microdomain. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) was involved in the mAChR-regulated AQP5 content. mAChR activation also modulated the expression , distribution , and function of tight junction proteins , and increased paracellular permeability. ERK1/2/ β -arrestin2/clathrin/ubiquitin signaling pathway was responsible for the mAChR-regulated downregulation of tight junction molecule claudin-4. Cytoskeleton filamentous actin (F-actin) was also involved in the distribution and barrier function of epithelial tight junctions. Besides , endothelial tight junctions were opened by mAChR agonist-evoked salivation in the mice. Furthermore , parasympathetic denervation increased resting salivary secretion in the long terminrats and minipigs. Taken together , our work demonstrated that mAChR regulated saliva secretion *via* transcellular and paracellular pathways in SMG epithelium as well as tight junction opening in SMG endothelium. Modulation of mAChR might be a promising strategy to ameliorate SMG dysfunction.

KEY WORDS Muscarinic acetylcholine receptor; Submandibular gland; Secretion; Aquaporin; Tight junction