基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1171-04

CL 316243 对孕大鼠离体子宫平滑肌收缩的作用

晏 飞[1],董 志[1],傅洁民[2],曾凡新[2]

(1. 重庆医科大学生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016; 2. 重庆医药工业研究院,重庆 400061)

【摘 要】目的:探讨 β_3-肾上腺素受体(Adrenoreceptor,AR)激动剂 CL 316243 对孕大鼠离体子宫平滑肌收缩的作用及其受体选择性。方法:以 β_2-AR 激动剂沙丁胺醇(Salbutamol)作阳性对照,观察累积加入 CL 316243 和沙丁胺醇对未预处理和经美托洛尔(Metoprolol),ICI 118.551 或 SR 59230A 预处理后的缩宫素诱导的孕大鼠子宫平滑肌收缩的影响。放射免疫法检测 CL 316243 和沙丁胺醇对平滑肌中 cAMP 和 cGMP 浓度的影响。结果:CL 316243 对缩宫素诱导的收缩幅度具有浓度依赖性松弛作用。其松弛作用的 E_{max} 值(48.13% ± 5.61%)显著高于沙丁胺醇(35.52% ± 5.15%)($P < 0.05$)。CL 316243 的松弛作用能被 SR 59230A 拮抗而不被美托洛尔或 ICI 118.551 拮抗,沙丁胺醇则是被 ICI 118.551 拮抗而不被美托洛尔或 SR 59230A 拮抗。相比空白对照组,CL 316243 和沙丁胺醇能增加子宫平滑肌 cAMP 浓度,但 cGMP 浓度增加不显著。结论:CL 316243 激活 β_3-AR,增加细胞内 cAMP 浓度,进而松弛孕大鼠离体子宫平滑肌。

【关键词】β_3-肾上腺受体;CL 316243;沙丁胺醇;cAMP

【中国图书分类法分类号】R71 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-13

Effects of CL 316243 on isolated term-pregnant rat myometrial strips in vitro

YAN Fei, et al

(*Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of the selective β_3-adrenoreceptor (AR) agonist, CL 316243, on the contractions and levels of cAMP and cGMP of myometrial strips isolated from term-pregnant rats. *Methods*: Salbutamol, an agonist of β_2-AR, was chosen as positive control. We evaluated the effect of increasing concentrations of CL 316243 and salbutamol on oxytocin-induced myometrial contractions with or without metoprolol, ICI 118.551 and SR 59230A. Effects of CL 316243 and salbutamol on cAMP and cGMP levels in isolated myometrial strips were also evaluated by

作者介绍:晏 飞(1983-),男,硕士,研究方向:新药开发与研究。

通讯作者:董 志,男,教授,E-mail:zhidong073@hotmail.com。

gy,1993,24(1):1-3.

[7] Kondo T,Ohshima T.The Dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound:a preliminary study for possible wound age determination[J].Int J Legal Med,1996,108(5):231-236.

[8] Kulkami A B,HuH C G,Becker D,et al.Transforming growth factor null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death [J].Proc Nail Acad Sci USA,1993,90 (2):770-774.

[9] 谢举临.转化生长因子-β 在创伤愈合过程中的研究进展[J]. 国外医学(创伤与外科问题分册),1999,20(2):76-79.

[10] 付小兵,王德文.创伤修复基础[M].北京:人民军医出版社.1997.121-132.

[11] Schroder J M.Cytokine networks in the skin[J].Invest Dermatol,1995,105(s1):20-24.

[12] 李学锋,李道萍.小鼠皮肤创伤愈合过程中 VEGF、TGF-β、bFGF 表达的免疫组织化学研究[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2003,12(4):367-371.

[13] Chomczynski P,Sacchi N.Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thioeyanate-phenol-chloroform extraction[J].Anal Biochem,1987,162(1):156-159.

[14] 王慧君,杨木兰.超生反应阶段骨骼肌机械性损伤的形态学研究[J].中国法医学杂志,1997,12(4):193-197.

[15] 王慧君.丁云川.RT-PCR 检测不同时间大鼠皮肤切创 TGF-β1mRNA 表达[J].中国法医学杂志,2003,18(2):67-69.

[16] 王慧君,李 东,杨木兰,等.在大鼠皮肤切创愈合过程中 TGF-β1 基因及蛋白表达变化与损伤时间关系的实验研究[J].中国法医学杂志,2001,16(4):193-197.

[17] 李学锋,王慧君,罗 红.皮肤创伤愈合过程中 TGF-β1mRNA 表达与损伤时间关系的实验研究[J].南方医科大学学报,2006,26(1):59-61.

[18] Takamiya M,Saigusa K,Aoki Y.Immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression for age determ inationof cutaneous wounds[J].Am J Forensic Med Pathol,2002,23(3):264-267.

[19] 周建清,王永忠.大鼠创伤皮肤内血管内皮生长因子表达的免疫组化研究[J].江苏大学学报(医学版),2003,13(5):421-424.

[20] Corral C J,Siddiqui A,Wu L,et al.Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing[J].ArchSurg,1999,134(2):200-205.

(责任编辑:关蕴良)

radioimmunoassay. *Results*: CL 316243 concentration-dependently decreased the amplitude of oxytocin-induced contractions with E_{max} value (48.13% ± 5.61%) of CL 316243, which was significantly larger than E_{max} value (35.52% ± 5.15%) of salbutamol ($P<0.05$). The inhibition of contraction amplitude by CL 316243 was antagonized by SR 59230A but not by metoprolol or ICI 118.551; on the contrary, only ICI 118.551 antagonized effect of salbutamol. CL 316243 and salbutamol increased cAMP levels, compared with control, but the cGMP levels were not increased. *Conclusion*: CL 316243 induced relaxation of myometrial contractions in term-pregnant rat myometrial contractions through activation of β_3-AR, and its effect was mediated through increaseing cAMP level.

【Key words】β_3-adrenoreceptor; CL 316243; Salbutamol; cAMP

早产是引起新生儿致病和死亡的主要原因[1]。目前,用于治疗早产的药物包括已批准药物如 β_2- 肾上腺素受体(Adrenoreceptor, AR)激动剂沙丁胺醇、催产素/抗利尿激素 V1a 受体拮抗剂阿托西班以及一些仿单核准使用的药物如钙离子拮抗剂、硫酸镁和非甾体类抗炎药[1]。但这些药物都不能达到预期的治疗效果并伴发很多严重的副反应(尤其在心血管方面[2]),其用于治疗早产的有效性及安全性都存在着广泛争议。

β_3-AR 在不同的人体组织包括胃肠道、泌尿道、呼吸道、血管平滑肌系统等具有松弛平滑肌的作用。Bardou M 等[3]研究发现,在人体子宫平滑肌中也存在功能性的 β_3-AR。本实验主要以抗早产药物 β_2-AR 激动剂沙丁胺醇作为阳性对照物,研究 β_3-AR 激动剂 CL 316243 对缩宫素诱导孕大鼠离体子宫平滑肌的收缩功能、β-AR 亚型选择性以及 cAMP、cGMP 浓度的影响,旨在探讨 β_3-AR 激动剂 CL 316243 治疗早产的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠(重庆市中药研究院实验动物研究室),体重 200 ~ 270 g,SPF 级,许可证:SYXK(渝)2007-0004。按 2:1 与有生育力的雄性大鼠合笼交配,每晨作阴道涂片,以发现精子的当天作为妊娠 0 d。妊娠 19 ~ 21 d 的大鼠作为实验对象。

1.2 药物和试剂

CL 316243(批号 059K4627)、硫酸沙丁胺醇(批号 134K 2368)、SR 59230A(批号 087K4636)、美托洛尔(批号 116K 1851)、ICI 118.551(批号 048K4609),纯度 ≥98%,均购于 sigma 公司;缩宫素注射液(10 U/ml,批号 0709131),购于河南辅仁怀庆制药有限公司;^{125}I 放射免疫 cAMP(批号 2008 0423)/cGMP(批号 20080419)含量测定试剂盒购于上海中医药大学同位素室。上述药品用蒸馏水稀释成不同浓度,实验中出现的浓度为加入浴槽内的终浓度。

1.3 实验仪器

RM6280C 多道生理信号采集系统 (成都仪器厂);JZ101 型张力换能器(北京新航兴业科贸有限公司);HSS-1B 数字式超级恒温浴槽(成都仪器厂);SN-682 型放射免疫 γ 计数器(上海核福光电仪器有限公司)。

1.4 孕大鼠离体子宫平滑肌制备

大鼠颈椎脱臼处死,打开腹腔,迅速从子宫角和子宫颈部剪取子宫,分离周围血管、脂肪,游离出两侧子宫,沿血供侧小心纵向剖开全层子宫平滑肌,去除胎鼠及胎盘,用 De-Jalon 平衡液(氯化钠 9.4 g、氯化钾 0.42 g、氯化钙 0.06 g、碳酸氢钠 0.5 g、葡萄糖 0.5 g 稀释至 1 000 ml)。洗去表面血迹后,立即置于盛有经混合气(95%O_2,5%CO_2)饱和的De-Jalon 平衡液中,制成约 4 mm × 10 mm 的全层子宫肌条。

1.5 缩宫素诱导的孕大鼠离体子宫平滑肌收缩张力的测定

将 4 条肌条分别置于 20 ml De-Jalon 平衡溶液的浴槽内,一端固定在通气钩,另一端与张力换能器相连。保持槽内温度(31 ± 0.5)℃,通入混合气(95%O_2,5%CO_2),标本前负荷 0.5 g。每隔 15 min 更换 1 次新鲜的平衡液,标本平衡 1 h。向浴槽内加入 0.001 U/L 的缩宫素,待肌条收缩平稳后,第 1 组累积加入 CL 316243(10^{-8}~10^{-4}mol/L);第 2、3、4 组分别加入美托洛尔、ICI 118.551 和 SR 59230A(各 10^{-7} mol/L,分别为 β_1、β_2、β_3- 肾上腺受体拮抗剂)至浴槽内,孵育 20 min,再分别累积加入 CL 316243(10^{-8}~10^{-4} mol/L)。用 RM6280C 多道生理信号采集系统记录子宫平滑肌收缩活动。阳性对照物沙丁胺醇(10^{-8}~10^{-4} mol/L)重复上述实验。药物在浴槽中的浓度每隔 15 min 增加 1 个浓度。以给药前 15 min 缩宫素引起的子宫平滑肌收缩幅度作为基础值,给予每一个浓度后,子宫平滑肌收缩幅度作为效应值。药物对子宫平滑肌收缩抑制率 = (基础值—效应值)/基础值 × 100%。比较药物抑制子宫平滑肌的平均最大抑制效应(E_{max})值。

1.6 孕大鼠离体子宫平滑肌中 cAMP、cGMP 浓度的测定

将 5 条肌条分别置于 20 ml De-Jalon 平衡液中,保持槽内温 31℃ ± 0.5℃,通入混合气(95%O_2,5%CO_2),平衡 1 h。然后加入 0.001 U/L 缩宫素,孵育 20 min。第 1 组为空白对照组;第 2 组加入 CL 316243(10^{-6} mol/L),孵育 20 min;第 3、4、5 组分别加入美托洛尔(10^{-7} mol/L)、ICI 18.551(10^{-7}mol/L)、SR 59230A(10^{-7}mol/L)预处理 20 min,再加入 CL 316243(10^{-6} mol/L)孵育 20 min。阳性对照物沙丁胺醇(10^{-6} mol/L)重复上述实验。孵育完毕后,肌条迅速放入液氮中速冻,准确称取重量,置 2 ml 50 mmol/L 的醋酸缓冲液(pH = 4.75)中,4℃条件下磨成匀浆,然后用 2 ml 无水乙醇清洗匀浆器并与匀浆混合成悬浮液,静置 5 min,10 000 g 离心 15 min,收集上清液,

60℃水浴吹干待测。参照放射免疫试剂盒说明书测定 cAMP 和 cGMP 浓度。

1.7 统计学分析

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据处理采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素的方差分析，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CL316243 对缩宫素诱导的孕大鼠离体子宫平滑肌收缩张力的影响

β_3-AR 激动剂 CL 316243(10^{-8} ~10^{-4} mol/L；图 1)能够浓度依赖性松弛缩宫素诱导的孕大鼠子宫平滑肌的收缩幅度(图 2，表 1)。在浓度为 10^{-4} mol/L 的时候，CL 316243 获得最大抑制效应(图 2)。CL 316243 抑制效应的 E_{max} 值(48.13 ± 5.61%)比阳性对照药物沙丁胺醇(E_{max} 35.52 ± 5.15%)要大($P<0.05$，表 1)。

经过 β-AR 拮抗剂(美托洛尔、ICI 118551、SR 59230A，分别为 10^{-7} mol/L)20 min 预处理后，平滑肌的收缩幅度无明显变化。CL 316243 对平滑肌收缩幅度的抑制作用能被 SR 59230A(E_{max} 34.58% ± 8.92%，图 2 和表 1)拮抗，但美托洛尔和 ICI 118551 对其作用无明显影响(图 2 和表 1)。沙丁胺醇对孕大鼠子宫平滑肌收缩幅度抑制作用能被 ICI 118.551(E_{max} 21.47% ± 7.43%，图 3 和表 1)拮抗。

2.2 CL316243 对孕大鼠离体子宫平滑肌中 cAMP，cGMP 浓度的影响

相比空白组，CL 316243 和沙丁胺醇能明显增加孕大鼠离体子宫平滑肌中 cAMP 的浓度(图 4)。CL 316243 对 cAMP 浓度的影响不能明显被美托洛尔和 ICI 118.551 所改变，但能明显被 SR 59230A 拮抗($P<0.05$；图 4)。相反，沙丁胺醇不能明显被美托洛尔和 SR 59230A 所改变，但能明显被 ICI 118.551 拮抗($P<0.05$；图 4)。相比空白组，CL 316243 和沙丁胺醇对 cGMP 浓度无明显影响(数据未显示)。

表 1 CL 316243 和沙丁胺醇对缩宫素诱导的孕大鼠子宫平滑肌收缩抑制作用的 E_{max} 值($\bar{x} \pm s$，n=6)

	CL 316243	沙丁胺醇
—	48.13% ± 5.61%	35.52% ± 5.15%
美托洛尔	46.81% ± 5.73%	27.64% ± 4.62%
ICI 118.551	49.09% ± 6.31%	21.47% ± 7.43%[b]
SR59230A	34.58% ± 8.92%[a]	34.58% ± 5.69%

[a]：经 SR 59230A 预处理后，CL 316243 的 E_{max} 值明显下降($P<0.05$)；[b]：经 ICI 118.551 预处理后，沙丁胺醇的 E_{max} 值明显下降($P<0.05$)

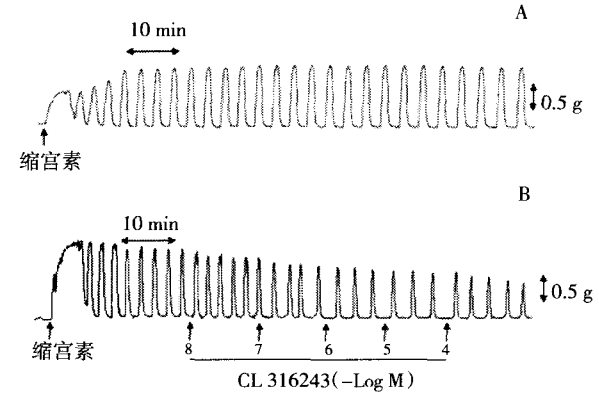


图 1 CL 316243 对缩宫素(0.001 U/L)诱导的孕大鼠离体子宫平滑肌收缩幅度影响的曲线记录 (B) 和 空白对照(A)

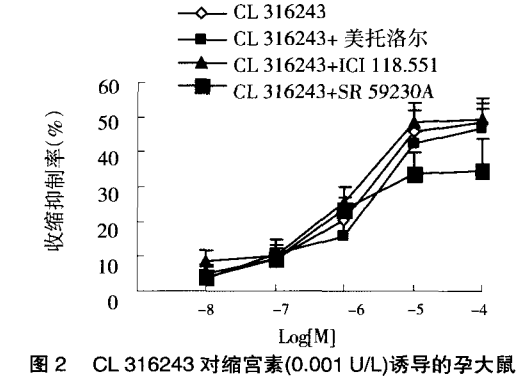


图 2 CL 316243 对缩宫素(0.001 U/L)诱导的孕大鼠离体子宫平滑肌收缩幅度的影响($\bar{x} \pm s$，n=6)

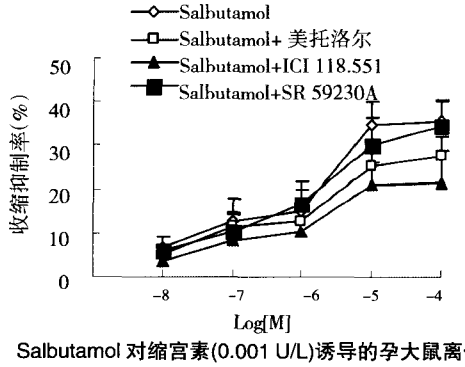
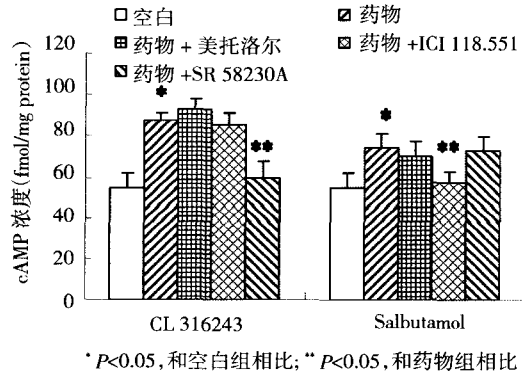


图 3 Salbutamol 对缩宫素(0.001 U/L)诱导的孕大鼠离体子宫平滑肌收缩幅度的影响($\bar{x} \pm s$，n=6)



* $P<0.05$，和空白组相比；** $P<0.05$，和药物组相比

图 4 CL 316243 和沙丁胺醇对缩宫素诱导的离体子宫平滑肌中 cAMP 浓度的影响($\bar{x} \pm s$，n=6)

3 讨 论

β-AR 起初只分为 β_1 和 β_2 两个亚型。β_2-AR 激动剂(如沙丁胺醇)被广泛用于治疗早产,但疗效低以及对母体和胎儿严重的副作用限制了它们的使用。一些受体结合[4]和功能[5]实验表明,许多组织中都存在 β_3-AR。体内实验[6]表明,β_3-AR 激动剂具有较强的非血管平滑肌收缩抑制效应,而对血管平滑肌收缩抑制效应较低,提示 β_3-AR 激动剂可作为抑制非血管平滑肌收缩的治疗药物,且心血管副作用较低。本实验结果显示,选择性的 β_3-AR 激动剂 CL 316243 对缩宫素诱导的孕大鼠离体子宫平滑肌收缩幅度有浓度依赖性松弛作用。受体亚型选择性实验表明,CL 316243 主要通过激活 β_3-AR 产生松弛效应,对 β_1-AR 和 β_2-AR 无明显激动作用。

同 β_2-AR 相比,β_3-AR 在子宫平滑肌中占主导地位,且在妊娠末期的表达还会上调[7]。由于 β_3-AR 胞内第三环和 C 端缺乏蛋白激酶 A(Protein kinase A,PKA)和 β 肾 -AR 激酶(β-adrenoceptor kinase,β-ARK)的磷酸化位点,使得 β_3-AR 可抵制激动剂短期刺激作用导致的脱敏,或抵制激动剂长期刺激导致的下调。相反,β_2-AR 在妊娠末期表达下调或不变,而且在激动剂刺激下容易脱敏。本实验结果表明,在抑制子宫平滑肌收缩作用方面,CL 316243 的 Emax 值明显比沙丁胺醇大,这与文献是一致的。本实验结果提示 CL 316243 对缩宫素诱导的子宫平滑肌收缩的松弛作用比沙丁胺醇具有更高的效能。

环核苷酸对保持妊娠子宫处于静息期的作用目前尚不清楚。各项实验[8]表明,兴奋妊娠子宫平滑肌的 β_2-AR,能提高 cAMP 浓度,抑制子宫平滑肌收缩,而 cGMP 在松弛平滑肌所发挥的作用则有待证明。但也有一些不同结果的实验[9]表明,在人体心脏平滑肌细胞中,激动 β_3-AR,可激活 NO 合酶途径提高 cGMP 浓度产生负性肌力作用。本实验结果显示,CL 316243 和沙丁胺醇均明显增加 cAMP 的浓度,但对 cGMP 浓度无明显影响。β_3-AR 拮抗剂 SR 59230A 明显拮抗 CL 316243 对 cAMP 浓度的影响,美托洛尔和 ICI 118.551 则不能,提示 CL 316243 主要通过激活 β3-AR 增加 cAMP 浓度。CL 316243 对子宫平滑肌收缩的抑制和 cAMP 浓度的增加都是通过激活 β_3-AR,提示 CL 316243 主要通过增加 cAMP 浓度,达到抑制子宫平滑肌收缩的作用。除此之外,美托洛尔和 SR 59230A 预处理并不拮抗沙丁胺醇对 cAMP 浓度的影响,而用 ICI 118.551 预处理则明显拮抗其影响,则证明沙丁胺醇主要通过激活 β_2-AR 增加 cAMP 浓度,达到抑制子宫平滑肌收缩的作用。

综上所述,本实验表明选择性 β_3-AR 激动剂 CL 316243 对孕大鼠子宫平滑肌收缩幅度有抑制作用。CL 316243 也许能用于子宫收缩相关的疾病治疗,且比 β_2-AR 激动剂具有更高的安全性。尽管如此,β_3-AR 在人体子宫肌层的生理学作用以及运用于临床的有效性和安全性(特别在治疗早产方面)还需要做更深入的研究。

参 考 文 献

[1] Berkman N D,Thorp J M J,Lohr K N,et al. Tocolytic treatment for the management of preterm labor: a review of the evidence[J]. Am J Obstet Gynecol,2003,188(6):1648-1659.

[2] Gyetvai K,Hannah M E, Hodnet E D,et al. Tocolytics for preterm labor:a systematic review[J].Obstet Gynecol,1999,94(5 pt 2):869-877.

[3] Bardou M, Loustalot C, Cortijo J, et al. Functional,biochemical and molecular biological evidence for a possible β_3-adrenoceptor in human near-term myometrium[J]. Br J Pharmacol,2000,130(8):1960-1966.

[4] Arch J R, Kaumann A J. Beta 3 and atypical beta-adrenoceptors[J]. Med Res Rev, 1993, 13(6):663-729.

[5] Strosberg A D,Pietri-Rouxel F. Function and regulation of the beta3-adrenoceptor [J]. Trends Pharmacol Sci,1996,17(10):373-381.

[6] Shinkai, N,Takayama,S.Tocolytic effects of a long-acting beta2-adrenoceptor agonist,formoterol,in rats[J].J Pharm Pharmacol,2000,52(11):1417-1423.

[7] Rouget C,Bardou M,Breuiller-Fouche M,et al. β_3-adrenoceptor is the predominant β-adrenoceptor subtype in human myometrium and its expression is up-regulated in pregnancy[J].J Clin Endocrinol Metab,2005,90(3):1644-1650.

[8] Berg G,Andersson R G,Ryden G. Beta-adrenergic receptors in human myometrium during pregnancy: changes in the number of receptors after beta-mimetic treatment[J].Am J Obstet Gynecol,1985,151(3):392-396.

[9] Gauthier C,Leblais V,Kobzik L,et al. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle[J]. J Clin Invest,1998,102(7):1377-1384.

(责任编辑:冉明会)