

· 论 著 ·

染料木素抑制大鼠离体胃肠平滑肌收缩活动的研究*

李长兴¹, 李红芳^{2△}, 张立雪³, 豆兴成², 田治峰²

(1. 青海大学医学院人体解剖学教研室, 青海西宁 810001; 2. 兰州大学基础医学院生理学教研室, 甘肃兰州 730000; 3. 西北民族大学医学院, 甘肃兰州 730000)

摘要:目的 观察染料木素对大鼠离体胃肠平滑肌收缩活动的影响,并探讨其作用机制。方法 取大鼠胃肠平滑肌条安置在恒温灌流肌槽中,记录其收缩活动,同时做 CaCl_2 的量效曲线。结果 染料木素能降低胃肠平滑肌条的张力,减小其收缩波平均振幅。酚妥拉明、左旋-NG-硝基精氨酸、格列本脲、SQ22536 可部分阻断染料木素对大鼠离体胃肠收缩活动的抑制作用。1.00 mol/L 的染料木素对 CaCl_2 的量效曲线无影响,50.0 mol/L 染料木素使 CaCl_2 的量效曲线右移。结论 染料木素对大鼠胃肠平滑肌条收缩活动具有抑制作用。

关键词:染料木素;肌,平滑;胃肠活动;酚妥拉明;左旋-NG-硝基精氨酸;格列本脲;SQ22536

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)13-1543-03

Inhibitory effects of genistein on contractile activity of isolated gastrointestinal smooth muscle in rats*

Li Changxing¹, Li Hongfang^{2△}, Zhang Lixue³, Dou Xingcheng², Tian Zhifeng²

(1. Department of Human Anatomy, College of Medicine, Qinghai University, Xining Qinghai 810001, China;

2. Department of Physiology, College of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou

Gansu 730000, China; 3. School of Medicine, the Northwest National University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of genistein(Gen) on contractile activity of gastrointestinal smooth muscle of rat and explore its underlying mechanisms. Methods Gastrointestinal smooth muscle strips were taken out from rat. Each isolated muscle strip was put in a tissue chamber which contains 5 mL krebs solution and the motility of muscle strips was recorded simultaneously. At the same time the CaCl_2 concentration-response curves were done. Results Genistein reduced the resting tension of gastrointestinal smooth muscle strips and decreased mean contractile amplitude of gastrointestinal smooth muscle strips, which were dose-dependent. Phentolamine, L-NG-nitroarginine, glibenclamide, SQ22536 partially blocked the inhibition of puerarin on the contractile activity of the rat gastric body. Genistein(1.00 $\mu\text{mol/L}$) had no significant effect on calcium-dependent contraction, while genistein(50.00 $\mu\text{mol/L}$) markedly prevented contractile effects of CaCl_2 on body of stomach. Conclusion Genistein has inhibitory action on the isolated gastrointestinal smooth muscle strips of rats.

Key words: genistein; muscle, smooth; gastrointestinal motility; Phentolamine; L-NG-nitroarginine; Glibenclamide; SQ22536

胃肠运动是受神经和体液调节的一种复杂而高级的运动,是消化道发挥正常生理功能的重要前提,胃肠运动障碍是胃肠道疾病的一个重要引发因素。研究发现中草药对胃肠运动障碍有较好的效果,且不良反应小。植物雌激素是来源于植物和中草药的一种包含多种化合物的物质,它可以发挥雌激素样作用^[1-2],具有抗炎、抗骨质疏松、抗动脉粥样硬化、缓解经期综合征等作用^[3-6]。近年来,有大量文献报道植物雌激素染料木素(genistein, Gen)对血管平滑肌的影响^[7-8],但其对离体胃肠平滑肌收缩活动影响的报道比较少。本文观察染料木素对大鼠离体胃肠平滑肌收缩活动的影响,并探讨其机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 Gen, 格列本脲(glibenclamide, Gli), SQ22536、酚妥拉明(phentolamine, Phe), 左旋-NG-硝基精氨酸(L-NG-nitroarginine, L-NNA), 上述药物溶媒为二甲亚砜(Dimethylsulfoxide, DMSO), 药品均购自 Sigma 公司。

1.2 动物及肌条制备 选用健康雌性 SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 实验前禁食 24 h, 饮水不限。实验时猛击其头部致昏后立即取出胃和十二指肠, 放置于含有 Krebs 液(NaCl 120.6

mmol/L, KCl 5.9 mmol/L, CaCl_2 2.5 mmol/L, NaH_2PO_4 1.2 mmol/L, NaHCO_3 15.4 mmol/L, 葡萄糖 11.5 mmol/L, MgCl_2 1.2 mmol/L, pH 7.4) 的培养皿中, 培养皿中持续供应 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体, 切取胃体、胃窦和十二指肠纵行肌条, 将肌肉标本分别置于含 37 °C Krebs 液的恒温灌流肌槽中, 给予 1 g 质量的前负荷。每 20 分钟更换 1 次 Krebs 液, 37 °C 温浴平衡 20~30 min, 待肌肉标本活动稳定后进行实验。

1.3 加药及分组 Gen 采用累积加药法, 加药间隔为 2 min, 累积浓度分别为 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、50.00 $\mu\text{mol/L}$ 。实验分为 6 组, (1) Gen 组: 累积加入不同浓度的 Gen; (2) Phe+Gen 组: 加入 1×10^{-5} mol/L 的 Phe 后 2 min 累积加入不同浓度的 Gen; (3) L-NNA+Gen 组: 加入 1×10^{-5} mol/L 的 L-NNA 后 2 min 累积加入不同浓度的 Gen; (4) Gli+Gen 组: 加入 1×10^{-5} mol/L 的 Gli 后 2 min 累积加入不同浓度的 Gen; (5) SQ22536+Gen 组: 加入 1×10^{-5} mol/L 的 SQ22536 后 2 min 累积加入不同浓度的 Gen; (6) DMSO 组(对照组): 累积加入不同浓度的 DMSO。

1.4 统计学处理 计算给药前各平滑肌条的张力和收缩波的

* 基金项目:青海大学医学院中青年科技基金资助项目(2013-RY-6);甘肃省科技厅自然科学基金资助项目(1010RJZA111)。 作者简介:

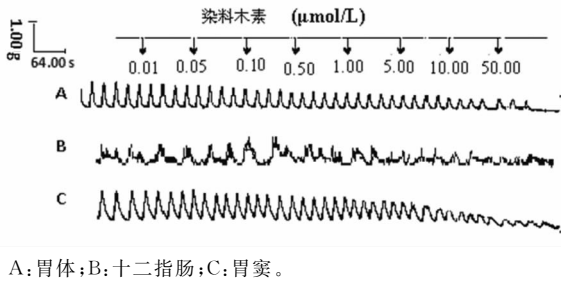
李长兴(1980—), 讲师, 硕士, 主要从事高原植物药材对脑神经功能的影响研究。 △ 通讯作者, Tel: (0931)8289109; E-mail: lihlf@lzu.edu.cn。

平均振幅作为对照值,以每次给药后的数值为效应值。结果用变化百分数来表示,变化百分数=(效应值-对照值)/对照值 $\times 100\%$ 。采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间各参数比较用单因素方差分析和 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

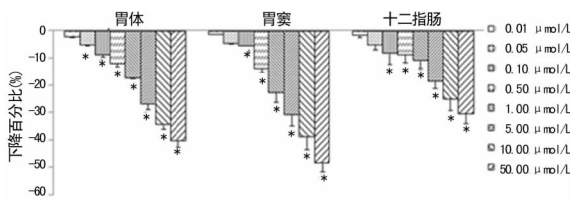
2.1 Gen 对大鼠离体胃肠平滑肌条自发收缩活动的影响

Gen 呈浓度依赖性地抑制胃肠平滑肌条的收缩张力,减小其收缩波的平均振幅,见图 1、2。



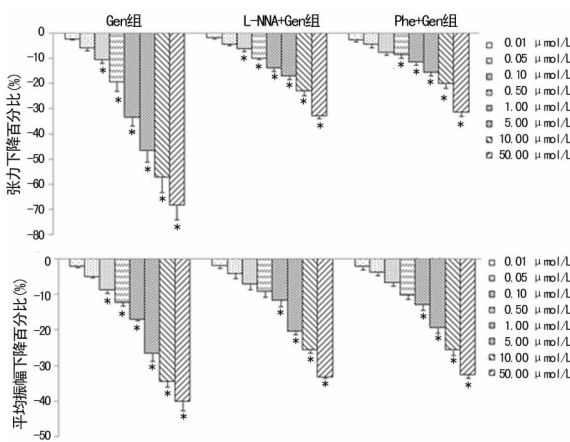
A:胃体;B:十二指肠;C:胃窦。

图 1 Gen 对大鼠离体胃肠平滑肌条收缩活动的影响



*: $P < 0.05$, 与 DMSO 组相比较。

图 2 Gen 对大鼠离体胃肠平滑肌条收缩张力及收缩波的平均振幅的影响



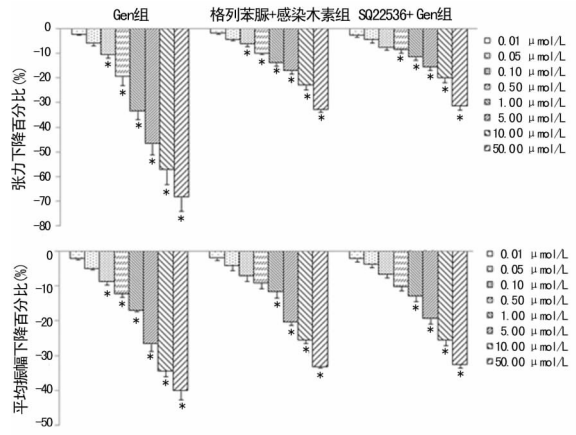
*: $P < 0.05$, 与 DMSO 组相比; *: $P < 0.05$, 与 Gen 组相比。

图 3 Phe 和 L-NNA 对 Gen 抑制大鼠离体胃肠平滑肌条收缩张力及收缩波的平均振幅的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 Phe 和 L-NNA 对 Gen 抑制大鼠离体胃体自发收缩活动的影响 单独加入阻断剂 Phe(1×10^{-5} mol/L)、L-NNA(1×10^{-5} mol/L)对胃体平滑肌条的收缩活动无影响,2 min 后再累积加入各浓度的 Gen,当 Gen 的浓度达到 $1.00 \mu\text{mol/L}$ 时 Phe+Gen 和 L-NNA+Gen 组肌条的收缩张力、振幅均减小,且有剂量依赖关系,但比单独加入同一浓度的 Gen 降低幅度小,见图 3。

2.3 格列苯脲和 SQ22536 对 Gen 抑制大鼠离体胃体自发收缩活动的影响 单独加入阻断剂格列苯脲(1×10^{-5} mol/L)、

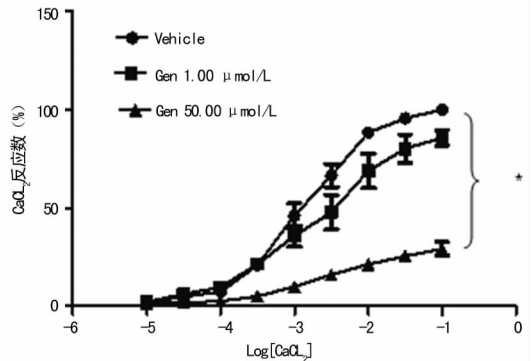
SQ22536(1×10^{-5} mol/L)对胃体平滑肌条的收缩活动无影响,2 min 后再累积加入各浓度的 Gen,当 Gen 的浓度达到 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 时 Gli+Gen 和 SQ22536+Gen 组肌条的收缩张力、振幅均减小,且有剂量依赖关系,但比单独加入同一浓度的 Gen 降低幅度小,见图 4。



*: $P < 0.05$, 与 DMSO 组相比较; *: $P < 0.05$, 与 Gen 组相比较。

图 4 格列苯脲、SQ22536、ICI182780 和他莫昔芬对 Gen 抑制大鼠离体胃肠平滑肌条收缩张力及收缩波的平均振幅的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.4 Gen 对 CaCl_2 所致大鼠离体胃肠收缩的影响 制作 CaCl_2 (1×10^{-5} mol/L $\sim 1 \times 10^{-1}$ mol/L)的量效曲线,标本在无钙液(用 EGTA 代替 Ca^{2+})中稳定 30 min 后,换无 Ca^{2+} 高 K^+ (8×10^{-2} mol/L)克氏液使其除极化,20 min 后,以累积浓度法制作 CaCl_2 (1×10^{-5} mol/L $\sim 1 \times 10^{-1}$ mol/L)量效曲线,然后用无 Ca^{2+} 液冲洗 3 次,重新平衡后,再给予不同浓度的 Gen ($1.00 \mu\text{mol/L}$ 、 $50.00 \mu\text{mol/L}$)。结果表明 $50.00 \mu\text{mol/L}$ Gen 使 CaCl_2 的量效曲线非平行右移,最大效应降低。随着 CaCl_2 的浓度增加, $50.00 \mu\text{mol/L}$ Gen 对 CaCl_2 所致离体大鼠胃肠平滑肌收缩的抑制作用越明显,呈浓度依赖性抑制作用。但 $1.00 \mu\text{mol/L}$ Gen 对 CaCl_2 所致大鼠离体胃肠平滑肌收缩活动无作用,结果见图 5。



*: $P < 0.05$, 与对照组相比较。

图 5 Gen 对 CaCl_2 所致离体大鼠胃肠收缩的影响

3 讨论

本文研究表明,Gen 可以呈剂量依赖性地抑制大鼠离体胃肠平滑肌的收缩活动。现拟从受体、离子通道、信号转导等角度阐释其作用机制。

第 1,在胃肠道上存在肾上腺素能 α 和 β 受体、组胺受体、5-HT 受体;各种离子通道,如 Ca^{2+} 、 K^+ 通道;还有多种胃肠道激素受体,如胃动素、血管活性肠肽。生物体内的许多激素,如

肾上腺素、促肾上腺皮质激素等与靶细胞膜上的特异性受体结合,形成激素-受体复合物而激活受体。活化的受体可催化 GTP 转化为 cGMP,cGMP 使胞浆内 Ca^{2+} 浓度降低,引起胃肠平滑肌细胞的超级化及舒张作用。王雨秧等^[9]报道半夏泻心汤亦能拮抗盐酸肾上腺素引起的肠运动功能抑制。陈多等^[10]报道,小半夏汤能拮抗左旋麻黄碱、多巴胺引起的小肠推进功能减慢,但对芬氟拉明引起的小肠推进功能减慢无效。表明小半夏汤促进小肠运动的作用与阻断多巴胺系统或抑制肠交感神经作用有关,与 5-羟色胺系统关系不密切。本研究结果显示,给予肾上腺素能 α 受体阻断剂 Phe 后,葛根素对胃肠的抑制作用得到缓解,提示其作用途径可能有肾上腺素能 α 受体的参与。

第 2,文献报道 NO 位于包括胃底在内的肌间神经丛,其释放可以使近端胃舒张^[11]。左旋精氨酸(L-arg)和 O_2 在一氧化氮合酶(Nitric Oxide Synthetase, NOS)的作用下生成 NO,是其体内唯一来源。胃肠道 50% 的肠神经系统中含有 NOS。NO 作用机制主要是通过结合到胞浆内 sCG(可溶性鸟苷酸环化酶)血红素基序上,使酶发生变构效应而被激活,催化 Mg^{2+} -GTP 生成 cGMP,由 cGMP 介导发挥作用。cGMP 进一步激活 GPK,GPK 阻止 Ca^{2+} 内流或促进 Ca^{2+} 跨膜转运出细胞,又可选择性抑制肌浆网释放 Ca^{2+} 或促进钙泵将 Ca^{2+} 泵回到肌浆网引起胞浆内 Ca^{2+} 降低,从而使平滑肌舒张。本研究结果显示 NO 合成抑制剂 L-NNA 可缓解葛根素对胃肠收缩活动的抑制作用,提示其作用可能有神经递质 NO 的参与。

第 3,Gli 是最重要的 ATP 敏感性钾通道之一,当 Gli 的浓度大于 $30 \mu\text{mol/L}$ 时,它能阻断 K^+ 通道^[12]。本研究发现,Gli 能阻止 Gen 引起的胃肠平滑肌的舒张作用。因此,作者推测 ATP 敏感性钾通道可能参与 Gen 舒张胃肠平滑肌的过程。这与 Wang 等^[13]报道的一致。Gli 可以缓解白藜芦醇引起的豚鼠豚鼠心房的舒张作用。但这与 Gojkovic-Bukarica 等^[14]的报道相反。

第 4,环磷酸腺苷是调节肌浆网 Ca^{2+} 动员和肌丝 Ca^{2+} 敏感性的中心信号分子。cAMP 可以激活蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA),PKA 磷酸化 L 型钙通道,然后增加细胞内 Ca^{2+} 的浓度和肌浆网钙离子的释放,进而产生平滑肌收缩活动。Okumura 等^[15]报道,cAMP 可以促进细胞内钙离子的动员以及肌丝钙离子的敏感性。本研究表明,SQ22536 是一种 cAMP 合成阻断剂,可以部分阻断 Gen 的作用,提示可能有 cAMP 途径参与该过程。

本研究发现,未使用 Gen 时, CaCl_2 浓度依赖性地加强大鼠离体胃肠平滑肌的收缩活动。这一加强效应可以被 $50.00 \mu\text{mol/L}$ 的 Gen 阻断,但 $1.00 \mu\text{mol/L}$ 的 Gen 却没有该作用。这表明 Gen 部分经由电压依赖式通道阻断 CaCl_2 引起的平滑肌收缩, $1.00 \mu\text{mol/L}$ 的 Gen 不能完全竞争性的与电压依赖式通道结合,而随着浓度的升高, $50.00 \mu\text{mol/L}$ 的 Gen 可以与 CaCl_2 完全竞争性的占据电压依赖式通道,阻止 Ca^{2+} 内流,进而阻止平滑肌的收缩。

综上所述,Gen 抑制胃肠平滑肌的收缩活动的机制,可能是由肾上腺素能 α 受体、NO 途径、电压依赖式钙通道及 ATP 敏感性甲通道、cAMP 途径所介导。

参考文献:

[1] Valeri A,Fiorenzani P,Rossi R,et al. The soy phytoestro-

gens genistein and daidzein as neuroprotective agents against anoxia-glucopenia and reperfusion damage in rat urinary bladder[J]. *Pharmacol Res*,2012,66(4):309-316.

[2] Rajah TT,Peine KJ,Du N,et al. Physiological concentrations of genistein and 17β -estradiol inhibit MDA-MB-231 breast Cancer cell growth by increasing BAX/BCL-2 and reducing pERK1/2 [J]. *Anticancer Res*,2012,32(4):1181-1191.

[3] Ji G,Feldman M,Doran R,et al. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release through localized Ca^{2+} uncaging in smooth muscle [J]. *J Gen Physiol*,2006,127(3):225-235.

[4] 徐海珊,戴顺龄,孙仁宇. 植物雌激素的心血管效应[J]. *中国医学科学院学报*,2005,27(2):258-261.

[5] Eden JA. Phytoestrogens for menopausal symptoms:a review[J]. *Maturitas*,2012,72(2):157-159.

[6] Zhu H,Cheng H,Ren Y,et al. Synergistic inhibitory effects by the combination of gefitinib and genistein on NSCLC with acquired drug-resistance in vitro and in vivo [J]. *Mol Biol Rep*,2012,39(4):4971-4979.

[7] 胡志萍,黄志华,吴亮亮,等. 染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系[J]. *中国实验方剂学杂志*,2011,17(13):164-167.

[8] 程海林,陶春蕾,陈卫东,等. 红车轴草异黄酮药理作用研究进展[J]. *安徽中医学院学报*,2011,30(4):76-80.

[9] 王雨秧,陈德兴. 半夏泻心汤对大鼠肠外运动的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*,2007,15(1):7-10.

[10] 陈多,吴春福,宁卓,等. 小半夏汤对小鼠小肠推进运动的影响[J]. *中药药理与临床*,2003,19(2):6-8.

[11] 李小兰,任光荣. 胃肠神经递质及其受体信号传导与胃肠动力及中药干预研究进展[J]. *上海中医药大学*,2012,3(2):202-204.

[12] Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K^+ channels in smooth muscle [J]. *J Physiol*,2006,572(Pt 3):617-624.

[13] 王桂英,宋翠森,张丽男,等. 白藜芦醇对豚鼠离体心房肌收缩力和心率的影响[J]. *中国中药杂志*,2007,32(13):1317-1319.

[14] Gojkovic-Bukarica L,Novakovic A,Kanjuh V,et al. A role of ion channels in the endothelium-independent relaxation of rat mesenteric artery induced by resveratrol [J]. *J Pharmacol Sci*,2008,108(1):124-130.

[15] Okumura S,Vatner DE,Kurotani R,et al. Disruption of type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of cyclic adenosine monophosphate signal and increases Akt signal with chronic catecholamine stress [J]. *Circulation*,2007,116(16):1776-1783.

(收稿日期:2013-12-18 修回日期:2014-02-10)