

大龄大鼠空肠平滑肌对异丙肾上腺素反应下降的机制

李 敏, 李祖贵, 朱晓博, 冯秀玲, 胡还忠

李敏, 李祖贵, 朱晓博, 胡还忠, 华中科技大学同济医学院生理系
湖北省武汉市 430030
冯秀玲, 华中科技大学同济医学院机能学中心实验室
湖北省武汉市 430030
李敏, 男, 1983-06-07 生, 江苏溧阳人, 华中科技大学同济医学院硕士在读
生, 主要从事消化生理学的研究。
通讯作者: 胡还忠, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院生理系。
huhuanzh@163.com
电话: 027-83630850
收稿日期: 2005-04-20 接受日期: 2005-05-14

Mechanism of decreased response of jejunal smooth muscle to isoproterenol in aged rats

Min Li, Zu-Gui Li, Xiao-Bo Zhu, Xiu-Ling Feng, Huan-Zhong Hu

Min Li, Zu-Gui Li, Xiao-Bo Zhu, Huan-Zhong Hu, Department of Physiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Xiu-Ling Feng, Central Laboratory of Functional Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Huan-Zhong Hu, Department of Physiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. huhuanzh@163.com
Received: 2005-04-20 Accepted: 2005-05-14

Abstract

AIM: To investigate the response of jejunal smooth muscles (JSMs) to nonselective β -adrenoceptor agonist (Isoproterenol, Iso) in rats with different ages and its possible mechanism.

METHODS: The nonselective β -adrenoceptor agonist Iso and nonselective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N^o-nitro-L-arginine (L-NNA) were perfused into the baths of rat JSMs. Muscle force transducer (MFT) was used to measure the tension of JSMs.

RESULTS: The contractive frequency of JSMs was markedly lower in 20-month rats than that in 3-month rats (27.0 ± 2.5 vs 30 ± 3.1 , $P < 0.05$). After perfusion with Iso (Final concentration: 1×10^{-9} - 1×10^{-6} mol/L), the variation rates of contractive amplitude of JSMs in 20-month rats were lower than those in 3-month rats (3×10^{-8} mol/L: -41.4%, $P < 0.05$; 1×10^{-7} mol/L: -34.6%, $P < 0.05$; 3×10^{-7} mol/L: -25.0%, $P < 0.05$; 1×10^{-6} mol/L: -19.5%, $P < 0.05$). After the administration of L-NNA, the relaxation responses of JSMs decreased in 3-month rats, while there was no obvious variation in 20-month rats. Before the adminis-

tration of L-NNA, the pD₂ of β -adrenoceptor decreased in 20-month rats as compared with that in 3-month rats (6.52 ± 0.54 vs 6.98 ± 0.30 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The response of JSMs to Iso in aged rats decreases, and the mechanism may be related to the decreased effect of NOS or nitric oxide.

Key Words: Jejunal smooth muscle; β -adrenoceptor; Soproterenol; Nitric oxide

Li M, Li ZG, Zhu XB, Feng XL, Hu HZ. Mechanism of decreased response of jejunal smooth muscle to isoproterenol in aged rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(15):1852-1855

摘要

目的: 观察不同月龄大鼠空肠平滑肌对 β 受体激动剂异丙肾上腺素(Iso)反应性的变化, 初步探讨其变化的机制。

方法: 采用灌流法加药, 利用张力换能器记录离体空肠平滑肌张力的变化。

结果: 20月龄组大鼠空肠平滑肌收缩频率都低于3月龄组(27.0 ± 2.5 vs 30 ± 3.1 , $P < 0.05$);灌流 10^{-9} - 10^{-6} mol/L 终浓度的 Iso 后, 20月龄组大鼠空肠平滑肌收缩幅度变化的百分率(即舒张反应)都低于3月龄组(3×10^{-8} , -41.4%, $P < 0.05$; 1×10^{-7} , -34.6%, $P < 0.05$; 3×10^{-7} , -25.0%, $P < 0.05$; 1×10^{-6} , -19.5%, $P < 0.05$);加 N^o-nitro-L-arginine(L-NNA)后, 3月龄组对 Iso 的舒张反应降低, 而 20月龄组对 Iso 的舒张反应未见明显变化;抑制 NOS 前, 20月龄组 Iso 的 pD₂ 值比 3月龄组的 pD₂ 值小(6.52 ± 0.54 vs 6.98 ± 0.3 , $P < 0.05$)。

结论: 大龄大鼠空肠平滑肌对 Iso 的反应性下降;NOS 或一氧化氮(NO)的作用降低可能是引起大龄大鼠空肠平滑肌对 Iso 的反应性下降的重要原因之一。

关键词: 空肠平滑肌; β 受体; 异丙肾上腺素; 一氧化氮

李敏, 李祖贵, 朱晓博, 冯秀玲, 胡还忠. 大龄大鼠空肠平滑肌对异丙肾上腺素反应下降的机制. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1852-1855
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1852.asp>

0 引言

随着人口的老齡化, 老年性疾病越来越受到重视, 老年消化道疾病如吞咽困难, 便秘, 腹泻, 以及肠

易激综合征等也越来越常见. 研究发现, 随着年龄的增长, 肠神经系统(ENS)神经元的数量也明显减少^[1]. β 受体在大鼠肠道有着广泛分布, β 受体兴奋后通过 G_s 蛋白激活腺苷酸环化酶(AC), 催化ATP生成cAMP, 再通过使PKA磷酸化, 产生各种生理效应. 已有资料显示, 老年动物模型心肌、膀胱等组织中的 β 受体对异丙肾上腺素(Iso)反应性下降^[2-4]. 但对老年大鼠小肠组织中 β 受体机能活动的变化的研究尚未见报道. 我们观察了不同年龄的SD大鼠空肠平滑肌对Iso舒张反应性的变化, 以及L-NNA(非选择性NOS抑制剂)对Iso浓度-效应曲线的影响, 并初步探讨了其变化的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley 清洁级大鼠 30 只, 山华中科技大学同济医学院实验动物中心提供. 随机分成 2 组, 20 月龄组 15 只, 最初月龄 3 mo, 用同济医学院实验动物中心提供的条形饲料喂养至月龄为 20 mo, 体重 450~550 g. 对照组 15 只, 月龄 3 mo, 体重 150~250 g, 与 20 月龄组的喂养条件相同, 适应性喂养 2 wk. 实验前禁食 18 h, 自由饮水. 异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso) 由上海禾丰有限公司提供, N-硝基-L-精氨酸(N^G -nitro-L-arginine, L-NNA) 由 Sigma 公司提供. KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, NaCl, KH_2PO_4 均为国产分析纯试剂. MedlabU4CS 生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司), JZ100 型肌肉张力换能器(高碑店市新航机电设备有限公司), 超级恒温器(上海市实验仪器厂).

1.2 方法 大鼠击头致昏, 立即打开腹腔分离空肠, 取一段距胃幽门窦 10 cm 处的空肠, 制备成长 0.6 cm 的标本, 将离体空肠标本一端固定于肌槽底部的不锈钢丝固定钩上, 另一端通过挂钩接肌肉张力换能器, 后者与 MedlabU4CS 生物信号采集处理系统连接, 定量记录平滑肌张力的变化. 肌槽内盛 Krebs 液 (mmol/L: NaCl 118.07, KCl 4.69, $CaCl_2$ 2.52, $MgSO_4$ 1.16, NaH_2PO_4 1.01, $NaHCO_3$ 25, glucose 11.10) 10 mL, 持续通以 950 mL/L O_2 和 50 mL/L CO_2 的混合气. pH 7.4, T $37 \pm 0.5^\circ C$. 观察舒张率 = [(加

药前收缩幅度 - 加药后收缩幅度) / 加药前收缩幅度] $\times 100\%$. 收缩频率变化百分率 = [(加药前收缩频率 - 加药后收缩频率) / 加药前收缩频率] $\times 100\%$.

统计学处理 采用 Microsoft Office Excel 2003 软件进行数据统计. 实验数据以 $mean \pm SD$ 表示, 两组间数据比较采用组间 t 检验, 组内比较采用配对 t 检验, 检验水准: $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 大鼠空肠平滑肌自主收缩幅度和频率 将平滑肌标本置于 Krebs 液中平衡 50 min, 自主收缩平稳后记录 and 比较 2 组动物空肠平滑肌的自主收缩频率波幅, 结果显示, 基础状态下的空肠平滑肌自主收缩频率 20 月龄组低于 3 月龄组, 而自主收缩波幅与 3 月龄组相比没有显著性差异(表 1, 图 1).

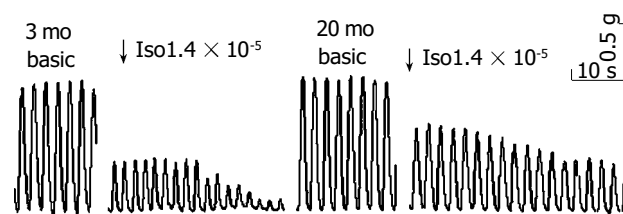


图1 Iso 10^{-7} mol/L 对大鼠空肠平滑肌自主收缩波形曲线的影响.

2.2 大鼠空肠平滑肌对 Iso 的舒张反应 按半对数摩尔浓度法, 加入累积浓度的 Iso, 使灌流槽内 Iso 终浓度依次为 3×10^{-10} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3×10^{-8} , 1×10^{-7} , 3×10^{-7} 和 1×10^{-6} mol/L, 记录灌流不同浓度的 Iso 时平滑肌舒张的百分率. 与 3 月龄组相比, 终浓度高于 3×10^{-8} 时 20 月龄组空肠平滑肌对 Iso 的舒张反应在各浓度点明显降低. 浓度为 3×10^{-8} mol/L 时, 20 月龄组舒张率为 15.9%, 较 3 月龄组降低 41.4% ($P < 0.05$); 在 1×10^{-7} mol/L, 20 月龄组舒张率为 32.1%, 较 3 月龄组降低 34.6% ($P < 0.05$); 在 3×10^{-7} mol/L, 20 月龄组舒张率为 56.7%, 较 3 月龄组降低 25.0% ($P < 0.05$); 在 1×10^{-6} mol/L, 20 月龄组舒张率为 72.8%, 较 3 月龄组降低 19.5% ($P < 0.05$, 图 2). 结果表明 20 月龄组大鼠空肠平滑肌对 Iso 的舒张反应在各个浓度点均较 3 月龄组下降.

表1 Iso 对大鼠空肠平滑肌自主收缩幅度的影响($n = 9$)

分组	基础		加 Iso 后(3×10^{-7} mol/L)		变化百分率(%)	
	张力	频率(次/min)	张力	频率(次/min)	张力	频率(次/min)
3月龄组	1.2 ± 0.5	30.3 ± 3.1	0.16 ± 0.13^c	26.2 ± 3.6^c	84.80 ± 15.1	13.6 ± 10.0
20月龄组	1.3 ± 0.5	27.0 ± 2.5^a	$0.40 \pm 0.22^{a, c}$	26.4 ± 2.4	77.94 ± 15.6^a	2.5 ± 2.6^a

^a $P < 0.05$ vs 3月龄组; ^c $P < 0.05$ vs 基础.

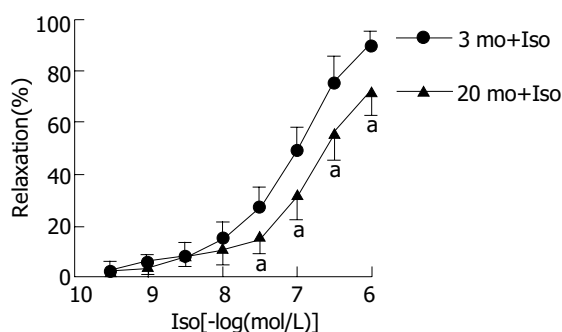


图2 大鼠空肠平滑肌对Iso的舒张反应。° $P < 0.05$ vs 3 mo+Iso.

2.3 Iso 相对 β 受体的 $pD_2(-\log EC_{50})$ 值的比较 3月龄组 pD_2 值为 6.98 ± 0.3 , 20月龄组为 6.52 ± 0.54 , 20月龄组比3月龄组 pD_2 值下降 ($P < 0.05$).

2.4 NOS抑制剂L-NNA对Iso引起的大鼠空肠平滑肌标本舒张反应的影响 标本平衡至收缩平稳后, 加入L-NNA, 终浓度为 5×10^{-5} mol/L, 5 min后, 再按半对数摩尔浓度法, 加入不同浓度的Iso, 记录不同浓度时平滑肌舒张的百分率, 与未加L-NNA(Control)时相同浓度的Iso对平滑肌舒张的百分率进行比较. 加L-NNA后, 3月龄组大鼠空肠平滑肌标本对Iso的舒张反应在各浓度均明显降低. 加入L-NNA后, Iso的为 3×10^{-8} mol/L时, 舒张率为16.0%, 舒张率较加药前降低41.2% ($P < 0.05$); 在 1×10^{-7} mol/L时为27.5%, 较加药前降低44.3% ($P < 0.05$); 在 3×10^{-7} mol/L时为56.4%, 较加药前降低25.4% ($P < 0.05$); 在 3×10^{-6} mol/L时为78.8%, 较加药前降低12.8% ($P < 0.05$, 图3). 结果表明, 3月龄组大鼠空肠平滑肌标本, 在抑制NOS后对Iso的舒张反应在各个浓度点均下降. 而20月龄组大鼠空肠平滑肌对各浓度点对Iso的舒张反应, 加L-NNA前后无明显差异 ($P > 0.05$). 用L-NNA抑制NOS后, 20月龄组同3月龄组空肠平滑肌标本对Iso的舒张反应也无明显差异 ($P > 0.05$).

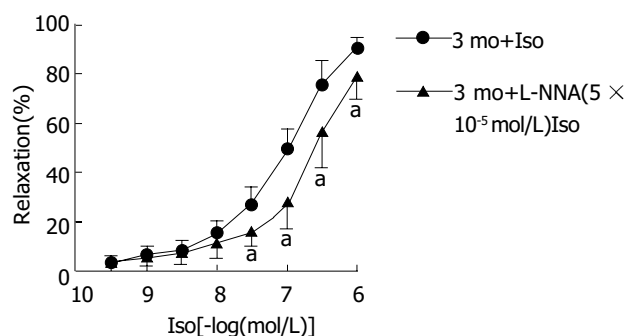


图3 L-NNA对Iso引起的3月龄组空肠平滑肌舒张反应的影响。° $P < 0.05$ vs 3 mo+Iso.

3 讨论

Nishimoto *et al*^[3]的研究表明, 随着年龄的增长, 豚鼠心肌细胞对Iso的收缩反应显著下降, 认为与AC

(腺苷酸环化酶)通路的损伤有关; Birder *et al*^[5]发现, 老年家兔膀胱逼尿肌对Iso的舒张反应显著下降, 可能由 β 受体表达和cAMP生成的减少所致. 我们的实验结果显示, 20月龄大鼠空肠平滑肌自主收缩幅度和频率同3月龄组相比相对下降, 其中频率降低显著; 不同浓度的Iso灌流大鼠空肠平滑肌后, 20月龄组收缩幅度和频率的变化百分率都低于3月龄组, 即20月龄组大鼠空肠对 β 受体激动剂(Iso)的反映性也下降. 同时, 20月龄组Iso对 β 受体的 pD_2 值显著下降, 提示 β 受体对其激动剂的亲和力下降. 说明动物随年龄的增加, 除心脏, 膀胱外, 消化道平滑肌运动功能也有降低趋势, 对 β 受体激动剂的反应性也下降. 组织不同其运动功能减低的机制有可能不一样.

Kanai *et al*^[6]发现心肌细胞 β 受体兴奋时, 可促进NO的生成. Banwait *et al*^[7]和Varghese *et al*^[8]分别观察到兴奋肛门内括约肌及心肌的 β_3 受体, 引起NO的生成增加. Birder *et al*^[5]认为, 兔膀胱内的肾上腺能神经元释放的去甲肾上腺素以及肾上腺髓质释放的儿茶酚胺, 通过兴奋膀胱上皮上的 β 受体后, 促进NO的生成而影响膀胱的功能, 其促进NO的生成机制可能为 β 受体通过AC途径促使细胞内 Ca^{2+} 的释放所致. 消化道平滑肌的运动受到高级中枢神经系统、自主神经系统、内在神经系统、自身及体液等调节. 胃肠道除受交感和迷走神经支配外, 还存在NANC能神经的支配, 其神经递质可能为NO^[1, 9-11]. NO由L-精氨酸经NOS催化合成. NOS是NO产生的限速酶, 有3种类型, 即神经型NOS(nNOS)、内皮型NOS(eNOS)和诱导型NOS(iNOS). 其中nNOS与eNOS合称为结构型NOS(cNOS), 依赖于钙-钙调蛋白而起作用. NO对胃肠道的运动起着重要的调节作用^[6, 8]. 我们以往的工作表明^[12-14], L-精氨酸对小肠平滑肌有抑制作用, 这种作用与NOS的活性有关, 而NOS的活性又受 α 、 β 受体机能状态的影响, 而非NA、Iso的直接作用.

本实验结果表明, 大龄大鼠空肠平滑肌自主收缩幅度和频率下降和对 β 受体激动剂(Iso)的反应减弱与NO有关. NOS抑制剂L-NNA使3月龄组空肠平滑肌对Iso的舒张反应的幅度降低、Iso浓度-效应曲线向右下移动提示, L-NNA阻断NOS后, NO合成减少, 使Iso对空肠平滑肌的舒张作用明显减弱, 说明NO参与了Iso对年轻大鼠空肠平滑肌的舒张作用. Iso对20月龄组大鼠空肠平滑肌标本的舒张作用较小; 给与L-NNA前后Iso对空肠平滑肌标本的舒张作用无明显变化, 对Iso的浓度-效应曲线也无明显影响. 因此, 有理由认为, 20月龄组大鼠空肠平滑肌除 β 受体对其激动剂的亲和力下降外, NOS活性降低或NO的合成减少也可能是引起大龄大鼠空肠平滑肌对Iso的反应性

下降的重要原因之一;还可能与 sGC 的活性降低及其与NO的亲合力下降有关. 此机制可能在老年性胃肠道运动功能障碍的发病中起重要作用. 但老龄大鼠空肠平滑肌对Iso的反应性下降的确切机制和临床意义有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Wade PR. Aging and ceural nontrol of the GI tract I. Age-related changes in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G489-G495
- 2 Gettys TW, Rohlfis EM, Prpic V, Daniel KW, Taylor IL, Collins S. Age-dependent changes in beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase activation in adipocytes from Fischer 344 rats. *Endocrinology* 1995;136:2022-2032
- 3 Nishimoto T, Latifpour J, Wheeler MA, Yoshida M, Weiss RM. Age-dependent alterations in beta-adrenergic responsiveness of rat detrusor smooth muscle. *J Urol* 1995;153:1701-1705
- 4 Ferrara N, O'Gara P, Wynne DG, Brown LA, del Monte F, Poole-Wilson PA, Harding SE. Decreased contractile responses to isoproterenol in isolated cardiac myocytes from aging guinea-pigs. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1141-1150
- 5 Birder LA, Nealen ML, Kiss S, de Groat WC, Caterina MJ, Wang E, Apodaca G, Kanai AJ. Beta-adrenoceptor agonists stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. *J Neurosci* 2002;22:8063-8070
- 6 Kanai AJ, Mesaros S, Finkel MS, Oddis CV, Birder LA, Malinski T. Beta-adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1997;273(4 Pt 1):C1371- C1377
- 7 Banwait KS, Rattan S. Role of nitric oxide in beta3-adrenoceptor activation on basal tone of internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G547-555
- 8 Varghese P, Harrison RW, Lofthouse RA, Georgakopoulos D, Berkowitz DE, Hare JM. beta(3)-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin Invest* 2000;106:697-703
- 9 Teng BQ, Murthy KS, Kuemmel JF, Grider JR, Sase K, Michel KT, Makhlof GM. Expression of endothelial NOS in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;275:G342-G351
- 10 Morin MJ, Karr SM, Faris RA, Gruppuso PA. Developmental variability in expression and regulation of inducible nitric oxide synthase in rat intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G552- G559
- 11 黄颖秋, 张德中, 曹树东. 一氧化氮与消化道动力. 国外医学·消化系统分册 1997;17:23-27
- 12 王晓敏, 胡还忠, 余承高, 马立群, 王长东, 田琴. 去甲肾上腺素对一氧化氮在小鼠十二指肠肌条收缩中作用的影响机制. 世界华人消化杂志 2005;13:358-362
- 13 汪长东, 胡还忠, 刘子龙, 马立群, 田琴, 余承高, 王晓敏. 一氧化氮抑制大鼠空肠平滑肌收缩. 胃肠病学和肝病学杂志 2004;13:588-591
- 14 马立群, 胡还忠, 汪长东, 王晓敏, 田琴. β -肾上腺能受体在一氧化氮抑制小鼠回肠自主收缩中的作用. 中国应用生理学杂志 (待发表)

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览.

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求. 从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范.

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动.

本书论述缜密、案例丰富. 为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次).

编著: 任胜利, 理学博士, 《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇. 出版: 科学出版社. 定价: 28 元 + 2 元(邮费). 邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号. 联系人: 刘俐, 程宇. 联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921. 开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483. (国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)