

研究论文

Forskolin 抑制大鼠胃窦环行平滑肌自发性收缩运动

姜京植, 孙倩, 许东元, 张默函, 朴丽花, 蔡英兰*, 金政*

延边大学医学院组织学与胚胎学教研室, 延吉 133002

摘要: 本文旨在探讨环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)对胃窦环行平滑肌功能的调节作用。分离大鼠胃窦环形肌条, 用多道生理记录仪观察腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)直接激活剂Forskolin对胃平滑肌自发性收缩活动的影响, 并用ELISA法测定灌流液中cAMP生成量的变化。结果显示, Forskolin浓度依赖性地抑制胃窦环形肌条自发性收缩活动, 降低肌条的收缩振幅和频率, 使收缩运动基线明显下移。Forskolin浓度依赖性地提高灌流液中的cAMP含量, 且灌流液中cAMP含量与肌条收缩振幅呈显著负相关。Forskolin对大鼠胃窦环行肌自发性收缩活动的抑制作用可被cAMP依赖性的蛋白激酶(cAMP-dependent protein kinase, PKA)抑制剂H-89所阻断。以上结果提示, Forskolin可通过增加cAMP含量激活PKA途径, 从而抑制大鼠胃窦环行平滑肌的自发性收缩活动。

关键词: Forskolin; cAMP; 胃平滑肌; 自发性收缩活动**中图分类号:** R333

Forskolin inhibits spontaneous contraction of gastric antral smooth muscle in rats

JIANG Jing-Zhi, SUN Qian, XU Dong-Yuan, ZHANG Mo-Han, PIAO Li-Hua, CAI Ying-Lan*, JIN Zheng*

Department of Histology and Embryology, Medical College of Yanbian University, Yanji 133002, China

Abstract: The aim of the present study was to investigate the effects of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) on rat gastric antral circular smooth muscle function. Forskolin, a direct activator of adenylyl cyclase (AC), was used to observe the influences of cAMP. Multi-channel physiological recorder was used to record spontaneous contraction activity of gastric antral circular muscle from Wistar rats. And ELISA method was used to detect the change of cAMP production in perfusate. The results showed that forskolin concentration-dependently suppressed the amplitude and frequency of the spontaneous contraction of the gastric antral muscle, and lowered the baseline of contraction movement significantly. Forskolin concentration-dependently increased the production of cAMP in the perfusate, which showed a significant negative correlation with the contraction amplitude of gastric antral ring muscle. The inhibitory effect of forskolin on spontaneous contraction activity of rat gastric antral circular muscle could be blocked by cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibitor H-89. These results suggest forskolin increases cAMP production and then activates PKA pathway, resulting in the inhibition of the spontaneous contraction activity of rat gastric antral circular smooth muscle.

Key words: Forskolin; cAMP; gastric smooth muscle; spontaneous contraction activity

胃肠道是在体内自分泌、旁分泌等活性细胞最为丰富的器官。1991年Komatsu等^[1]首次发现, 在胃肠道有C型钠尿肽(C-type natriuretic peptide, CNP)存在, 而后来2001年Gower等^[2]在大鼠的

胃窦黏膜和肌组织中发现有三种钠尿肽受体(natriuretic peptide receptor, NPR)存在, 分别为NPR-A、NPR-B、NPR-C。2003年Guo等^[3]报道在胃肠道NPs主要通过NPs-NPR-B/鸟苷酸环化酶(guanylate

Received 2012-08-23 Accepted 2012-12-04

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81060036).

*Corresponding author. Tel: +86-433-2435122; Fax: +86-433-2435104; E-mail: ylcai@ybu.edu.cn

cyclase, GC)- 环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 信号转导通路对豚鼠、大鼠和人胃平滑肌自发性收缩运动均起着抑制性调节。细胞内 cGMP 的水平是通过被 GC 激活而生成和被磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 分解的两个过程达到动态平衡以维持细胞内适当浓度, 而 PDE 自身也受 cGMP 和 cAMP 的调节。已有报道显示, cGMP 通过其依赖性的 cGMP- 兴奋性 PDE2 和 cGMP- 抑制性 PDE3 而发挥其细胞内效应^[4,5]。Karnam 等^[6]的研究也表明, 在胃平滑肌 cGMP 和 cAMP 之间存在交叉调节, cGMP 通过抑制 PDE3 增加 cAMP。因此, Karnam 等^[6]推测 NPs 有可能通过调节细胞内 cGMP 浓度的途径影响 PDE 的活性, 以调节细胞内 cAMP 浓度, 最终对胃平滑肌自发性收缩运动起调节作用。但是关于, cAMP 对平滑肌收缩运动的调节作用, 因平滑肌种类不同, 存在着不同的实验结果。在支气管平滑肌和输精管平滑肌, cAMP 激活 L- 型钙通道, 起到使平滑肌收缩的作用^[7,8], 而 Kim 等^[9]研究报道在胃平滑肌, cAMP 通过激活 PKA 抑制 L- 型钙通道, 抑制平滑肌的收缩。由此可见, 尽管 cAMP 是公认的第二信使, 对于它在调节平滑肌收缩运动方面的作用, 仍存在不同的实验结果。为了明确 cAMP 对胃平滑肌收缩运动的调节作用, 本研究观察了腺苷酸环化酶 (adenylyl cyclase, AC) 直接激活剂 Forskolin 对离体大鼠胃平滑肌收缩运动的作用, 并初步探讨了其机制。

1 材料与方法

1.1 动物、药品与试剂 Wistar 大鼠, 雌雄不拘, 体重 200~220 g, 由延边大学医学部实验动物科提供。动物实验方案经过延边大学医学院伦理委员会批准。Forskolin 购于美国 BioVision 公司; H-89 购于美国 BioVision 公司; Krebs's 液 (mmol/L): NaCl 118、KCl 4.75、CaCl₂ 2.54、KH₂PO₄ 1.19、MgSO₄ 1.19、NaHCO₃ 25、葡萄糖 10, 充以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体, 用 HCl 调节 pH 至 7.2~7.4; cAMP Direct Immunoassay Kit 购于美国 BioVision 公司。

1.2 离体肌条的制备 取大鼠击后枕部致昏, 剪开颈静脉放血后, 平放于实验台上, 沿中线剖腹取全胃, 立即放入 4 °C 的氧饱和的 Krebs's 液中, 沿胃小弯侧剪开, 漂洗出胃内容物。去除黏膜层, 在距幽门近口端 5 mm 处沿胃窦环行肌纤维走向剪取 2 mm × 12 mm 的环行肌条。取下的肌条放置于

Krebs's 液垂直灌流槽中, 一端固定在铂丝钩上, 另一端与张力换能器 (JZJOI-H- 型肌张力换能器, 中国新航机电设备有限公司) 相连, 槽内温度利用恒温水浴器维持在 37 °C, 持续供给 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体。

1.3 肌条收缩活动记录 实验时, 肌条要在氧饱和的 Krebs's 液灌流槽中孵育 40 min, 待肌条自发性收缩活动稳定后, 通过四道生理信号记录系统 (RM6240 型多道生理信号采集处理系统, 成都仪器厂) 记录大鼠胃窦平滑肌收缩活动。实验一: 在灌流液中加入不同浓度的 Forskolin (1×10^{-8} 、 3×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L), 观察加入 Forskolin 前后 5 min 肌条收缩活动的收缩振幅、频率及张力变化并记录。实验二: 在灌流液中先加入 1×10^{-4} mol/L 的 PKA 抑制剂 H-89 预处理 5 min, 再加入 1×10^{-7} mol/L 的 Forskolin, 观察加入 Forskolin 前后 5 min 肌条收缩活动的收缩振幅、频率及张力变化并记录。以上记录过程中, 避免肌条贴壁并且要持续供氧。

1.4 灌流液中 cAMP 含量的测定 每次肌条收缩活动记录结束后, 将肌条灌流液收集, 置于液氮, 后转入 -80 °C 冰箱保存备用。测定前, 将冻存的灌流液在 4 °C 下缓慢解冻, 加入 4 °C 预冷水合氯醛 (终浓度为 6%), 再用水饱和的乙醚萃取, 重复萃取三次, 然后将样品利用真空冻干器 (美国) 冻干。冻干后用 cAMP Direct Immunoassay Kit 结合酶标仪 (MK-3, 芬兰) 测定各组灌流液中 cAMP 含量。

1.5 数据处理和分析 以给药前 5 min 平均每分钟收缩的振幅、频率为对照值, 给药后 5 min 平均每分钟收缩的收缩振幅、频率记为效应值, 效应值用相应的对照值标准化; 基线下移程度以基线下移幅度 (g)/ 肌条重量 (g) 表示, 以减少误差。收缩抑制率 = (对照值 - 效应值) / 对照值 × 100%。所有统计数据用 mean ± SEM 来表示。实验结果应用 SPSS 软件进行分析, 采用有序变量的相关分析及单因素方差分析 (两两比较采用 SNK 法), $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Forskolin 对大鼠胃窦环行平滑肌的自发性收缩活动的影响

灌流液加入不同浓度 Forskolin (1×10^{-8} 、 3×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L) 后, 胃窦环行平滑肌的自发性收缩振幅明显缩小, 其收缩振幅分别为对照值的

($86.7 \pm 1.3\%$)、($80.0 \pm 1.6\%$) 以及 ($73.0 \pm 2.5\%$) (均 $P < 0.05$, 图 1A), Forskolin 对平滑肌的自发性收缩

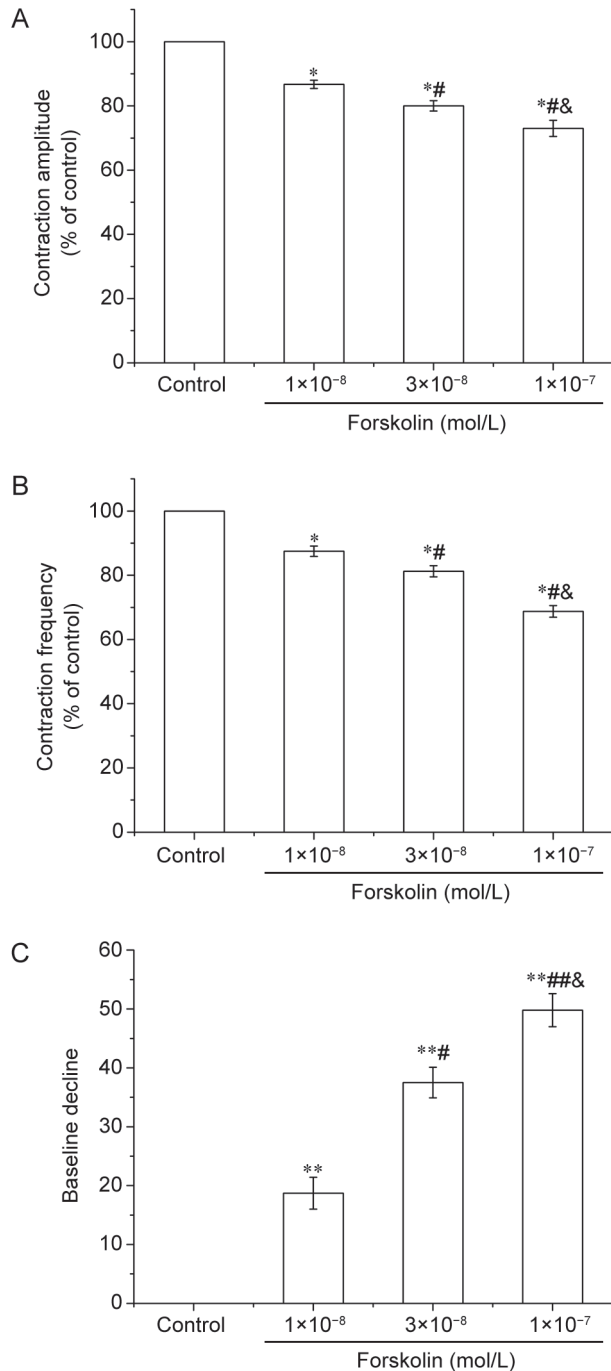


图 1. Forskolin对大鼠胃窦环形平滑肌的自发性收缩活动的影响

Fig. 1. Effects of forskolin on the spontaneous contractions of gastric antral circular smooth muscle in rats. A: Contraction amplitude. B: Contraction frequency. C: Baseline decline. Mean $\pm$ SEM, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 1×10^{-8} mol/L forskolin; & $P < 0.05$ vs 3×10^{-8} mol/L forskolin.

振幅的抑制作用具有剂量效应关系 (图 1A); 胃窦环形平滑肌的自发性收缩频率明显下降, 加入各浓度 Forskolin 后的收缩频率分别为对照值的 ($87.5 \pm 1.6\%$)、($81.3 \pm 1.8\%$) 以及 ($68.8 \pm 1.8\%$) (均 $P < 0.05$, 图 1B), Forskolin 对平滑肌的自发性收缩频率的抑制作用具有剂量效应关系 (图 1B); 胃窦环形平滑肌收缩运动基线下移程度明显下降, 加入各浓度 Forskolin 后其基线下移程度分别为 18.7 ± 2.6 、 37.5 ± 2.6 以及 49.8 ± 2.8 (均 $P < 0.01$, 图 1C), Forskolin 对平滑肌的自发性收缩基线的下移作用具有剂量效应关系 (图 1C)。

2.2 加入Forskolin后大鼠胃窦环形平滑肌灌流液中生成的cAMP量及其与平滑肌收缩之间的关系

相对对照值, 加入 1×10^{-8} 、 3×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L Forskolin 后灌流液中生成的 cAMP 量显著增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 分别为 (0.156 ± 0.009)、(0.282 ± 0.011)、(0.358 ± 0.005) pmol/ μ L, 具有剂量依赖关系 (图 2); 相关分析结果显示, 加入不同浓度 Forskolin 后, 灌流液中生成的 cAMP 量和胃窦环形肌条收缩振幅呈显著负相关 ($r = -0.7$, $P < 0.01$)。

2.3 PKA抑制剂对Forskolin抑制大鼠胃窦环形平滑肌自发性收缩活动的影响

在灌流液中先加入 PKA 抑制剂 H-89, 再加入 Forskolin, 后者对平滑肌收缩活动的抑制程度明显降低。单独 1×10^{-7} mol/L 的 Forskolin 对平滑肌收

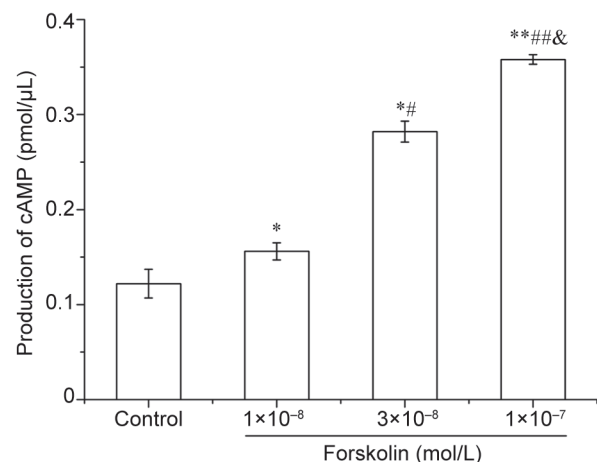


图 2. Forskolin刺激后胃平滑肌灌流液中生成的cAMP量

Fig. 2. The production of cAMP in gastric antral smooth muscle perfusate stimulated by different concentrations of forskolin. Mean $\pm$ SEM, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 1×10^{-8} mol/L forskolin; & $P < 0.05$ vs 3×10^{-8} mol/L forskolin.

缩振幅的抑制率为 $(27.13 \pm 0.56)\%$, H-89 预处理后再加入 1×10^{-7} mol/L 的 Forskolin, 抑制率下降为 $(23.97 \pm 0.53)\%$, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)(图 3A); 单独 1×10^{-7} mol/L 的 Forskolin 对收缩频率的抑

制率为 $(29.85 \pm 1.72)\%$, H-89 预处理后再加入 1×10^{-7} mol/L 的 Forskolin, 抑制率下降为 $(20.27 \pm 1.65)\%$, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)(图 3B); 单独 1×10^{-7} mol/L 的 Forskolin 处理, 平滑肌收缩的基线下移程度为 47.6 ± 2.7 ; H-89 预处理后再加入 1×10^{-7} mol/L 的 Forskolin, 基线下移程度下降为 32.7 ± 2.7 , 差异具有显著性 ($P < 0.01$)(图 3C)。

3 讨论

本实验所用的 Forskolin 可结合细胞膜上的 AC 并活化酶功能, 通过激活 AC 使细胞受体敏感化, 提高 cAMP 在细胞内的水平。细胞内 cAMP 的水平是通过被 AC 激活而生成和被 PDE 分解的两个过程达到动态平衡以维持细胞内适当浓度。生成的 cAMP 作为第二信使通过调控离子通道、激活 PKA 与 PKG 的交叉作用实现生理功能。

本实验的结果显示, Forskolin 处理后胃平滑肌的自发性收缩振幅明显缩小、频率明显下降, 同时基线下移程度明显, 灌流液中生成的 cAMP 量和胃窦环形肌条收缩振幅呈显著负相关, 说明 Forskolin 通过增加 cAMP 抑制胃平滑肌位相性自发收缩的同时, 也明显抑制胃平滑肌的张力。本实验接着通过 PKA 抑制剂 H-89 观察了 cAMP 作用途径。结果显示 PKA 抑制剂 H-89 明显阻断了 cAMP 的抑制胃平滑肌自发性收缩作用。此结果与 Kim 等学者^[9] 研究报道相一致。

胃肠道中存在 NPs-cGMP 信号转导通路。Wen 等^[10] 研究表明在心肌细胞 CNP 生成的 cGMP 主要通过 cGMP-PDE3-cAMP 途径而增加 cAMP 水平, 参与调节心脏收缩和舒张功能, cGMP-PDE2-cAMP 途径作用非常微弱。因此, 在胃平滑肌细胞 cGMP-PDE 系统中可能存在两种机制, 即 cGMP 兴奋 PDE2 使 cAMP 水平降低的机制及 cGMP 抑制 PDE3 使 cAMP 水平升高的机制。在本研究中, cAMP 明显抑制胃平滑肌自发性收缩活动, 提示 NPs 很有可能通过调节细胞内 cGMP 浓度的途径影响 PDE 的活性, 以调节细胞内 cAMP 浓度, 最终对胃平滑肌自发性收缩运动起调节作用。

总之, 本研究表明, Forskolin 通过增加 cAMP 含量激活 PKA, 抑制平滑肌的自发性收缩运动, 提示胃肠道中存在的 NPs 生成的 cGMP 不仅通过 PKG 途径和钙敏感钾通道, 而且很有可能通过 PDE 调节 cAMP 的水平, 起到调控胃平滑肌自发性收缩运

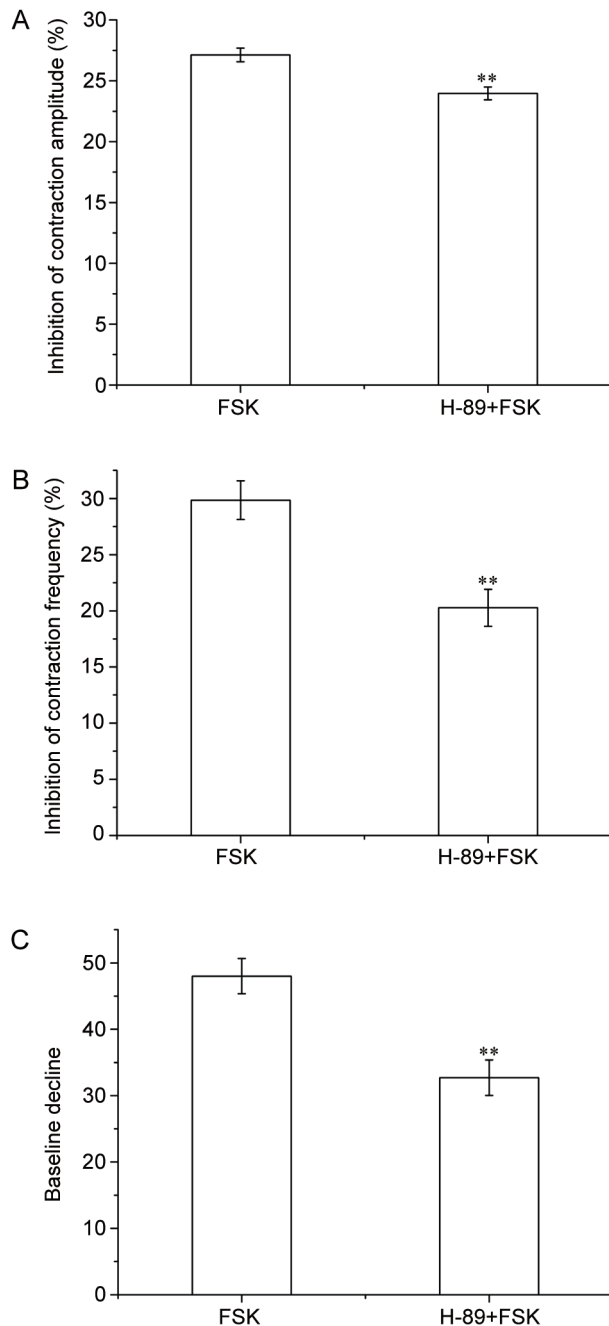


图 3. PKA抑制剂H-89对Forskolin抑制大鼠胃窦环形平滑肌的自发性收缩活动的影响

Fig. 3. Effects of forskolin (FSK) on contractile responses in the presence of H-89, a PKA inhibitor. A: Inhibition of contraction amplitude. B: Inhibition of contraction frequency. C: Change of baseline decline. Mean ± SEM, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs FSK.

动的作用, 其具体作用及其机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Komatsu Y, Nakao K, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Arai H, Shirakami G, Hosoda K, Nakagawa O, Hama N, Kishimoto I, Imura H. C-type natriuretic peptide (CNP) rats and humans. *Endocrinology* 1991; 129(2): 1104–1106.
- 2 Gower WR Jr, Salhab KF, Foulis WL, Pillai N, Bundy JR, Vesely DL, Fabri PJ, Dietz JR. Regulation of atrial natriuretic peptide gene expression in gastric antrum by fasting. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278(3): R770–R780.
- 3 Guo HS, Jin Z, Jin ZY, Li ZH, Cui YF, Wang ZY, Xu WX. Comparative study in the effect of C-type natriuretic peptide on gastric motility in various animals. *World J Gastroenterol* 2003; 9(3): 547–552.
- 4 Mery PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R. Nitric oxide regulates cardiac Ca^{2+} current involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 1993; 268: 26286–26295.
- 5 Vandecasteele G, Verde L, Ruecker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R. Cyclic GMP regulation of the L-type Ca^{2+} channel in human atrial myocytes. *J Physiol* 2001; 533: 329–340.
- 6 Karnam S, Murthy KS, Zhou H, Makhoul GM. PKA-dependent activation of PDE3A and PDE4 and inhibition of adenylyl cyclase V/VI in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 282: C508–C517.
- 7 Kamimura N, Suga S, Wada J, Mio Y, Suzuki T, Wakui M. Excitatory and inhibitory actions of norepinephrine on the Ba^{2+} current through L-type Ca^{2+} channels of smooth muscle cells of guinea-pig vas deferens. *J Cell Physiol* 1996; 169(2): 373–379.
- 8 Lin CC, Chen JL, Ko WC. Relaxation of isolated guinea pig trachea by genistein via inhibition of phosphodiesterase. *Planta Med* 2007; 73(4): 323–329.
- 9 Kim YC, Choi W, Sung R, Kim H, You RY, Park SM, Youn SJ, Kim MJ, Song YJ, Xu WX, Lee SJ, Yun HY. Relaxation patterns of human gastric corporal smooth muscle by cyclic nucleotides producing agents. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009; 13: 503–510.
- 10 Wen JF, Cui X, Jin JY, Kim SM, Kim SZ, Lee HS, Cho KW. High and low gain switches for regulation of cAMP efflux concentration: distinct roles for particulate GC- and soluble GC-cGMP-PDE3 signaling in rabbit atria. *Circ Res* 2004; 94: 936–943.