

研究论文

硫化氢前体L-半胱氨酸对结肠动力的影响及机制

全晓静¹, 邹百仓¹, 秦斌¹, 戴菲¹, 罗和生², 王进海^{1,*}

¹西安交通大学医学院第二附属医院消化科, 西安 710004; ²武汉大学人民医院消化科, 武汉 430060

摘要: 本文旨在研究硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)前体L-半胱氨酸对大鼠结肠动力的影响, 以阐明其对结肠收缩的调节作用及机制。采用免疫组织化学染色和免疫印迹实验检测内源性H₂S合成酶胱硫醚-γ-裂解酶(cystathionine-γ-lyase, CSE)和胱硫醚-β-合成酶(cystathionine-β-synthase, CBS)在大鼠近端结肠的表达情况; 采用生理记录仪检测结肠平滑肌收缩活动的变化; 利用膜片钳实验检测结肠平滑肌细胞离子通道电流。结果显示, CBS和CSE在大鼠近端结肠黏膜层、平滑肌层及肌间神经丛均有表达; L-半胱氨酸以浓度依赖的方式抑制近端结肠纵行平滑肌收缩, H₂S合成酶抑制剂氨基氧乙酸(aminooxyacetate acid, AOAA)和炔丙基甘氨酸(propargylglycine, PAG)孵育纵行平滑肌后, L-半胱氨酸半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect, EC₅₀)相比对照组显著下降($P < 0.05$); 而L-半胱氨酸对结肠环形肌收缩具有抑制和促进双重调节作用, AOAA和PAG预处理可阻断其对环形肌的兴奋作用; H₂S外源性供体NaHS在低浓度时促进平滑肌细胞L型钙通道开放($P < 0.01$), 而在高浓度时抑制L型钙通道电流($I_{Ca,L}$) ($P < 0.05$); 与NaHS不同, L-半胱氨酸浓度依赖性抑制 $I_{Ca,L}$ ($P < 0.01$); NaHS抑制大电导钙激活钾电流(I_{BKCa}), 而L-半胱氨酸对 I_{BKCa} 无明显作用。以上结果提示, L-半胱氨酸对大鼠结肠平滑肌收缩具有潜在双重调节作用, 其中抑制作用由L型钙通道介导, 而促进作用可能是由内源性生成的H₂S介导。

关键词: L-半胱氨酸; 硫化氢; 离子通道; 膜片钳; 大鼠

中图分类号: R333; Q48

Effect of L-cysteine on colonic motility and the underlying mechanism

QUAN Xiao-Jing¹, ZOU Bai-Cang¹, QIN Bin¹, DAI Fei¹, LUO He-Sheng², WANG Jin-Hai^{1,*}

¹Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ²Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract: The purpose of the present study is to investigate the effect of L-cysteine on colonic motility and the underlying mechanism. Immunohistochemical staining and Western blot were used to detect the localization of the H₂S-generating enzymes cystathionine-β-synthase (CBS) and cystathionine-γ-lyase (CSE). Organ bath system was used to observe the muscle contractile activities. Whole-cell patch-clamp technique was applied to record ionic channels currents in colonic smooth muscle cells. The results showed that both CBS and CSE were localized in mucosa, longitudinal and circular muscle and enteric neurons. L-cysteine had a dual effect on colonic contraction, and the excitatory effect was blocked by pretreatment with CBS inhibitor aminooxyacetate acid (AOAA) and CSE inhibitor propargylglycine (PAG); L-cysteine concentration-dependently inhibited L-type calcium channel current ($I_{Ca,L}$) without changing the characteristic of L-type calcium channel ($P < 0.01$); In contrast, the exogenous H₂S donor NaHS increased $I_{Ca,L}$ at concentration of 100 μmol/L, but inhibited $I_{Ca,L}$ and modified the channel characteristics at concentration of 300 μmol/L ($P < 0.05$); Furthermore, L-cysteine had no effect on large conductance calcium channel current (I_{BKCa}), but NaHS significantly inhibited I_{BKCa} ($P < 0.05$). These results suggest that L-cysteine has a potential dual effect on colonic smooth muscle and the inhibitory effect might be directly mediated by L-type calcium channel while the excitatory effect might be mediated by endogenous H₂S.

Key words: L-cysteine; hydrogen sulfide; ion channel; patch-clamp technique; rat

Received 2019-10-20 Accepted 2020-03-19

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81770540).

*Corresponding author. Tel: +86-29-87679335; E-mail: xhkwjh@126.com

硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 作为新型内源性神经递质, 可由哺乳动物组织通过胱硫醚- γ -裂解酶 (cystathionine- γ -lyase, CSE) 和胱硫醚- β -合成酶 (cystathionine- β -synthase, CBS) 催化底物 *L*-半胱氨酸而生成^[1]。研究显示 H₂S 参与消化道多种生理功能的调节, 其中包括胃肠动力^[2, 3]。ATP 敏感性钾通道、L 型钙通道及蜂毒明肽敏感的小电导钾通道等离子通道已被证实参与 H₂S 对胃肠道动力的抑制作用^[4, 5]。但目前大多数研究采用硫化氢钠 (sodium hydrogen sulfide, NaHS) 作为外源性 H₂S 供体来探讨 H₂S 的生物学功能。*L*-半胱氨酸作为 H₂S 合成的前体, 可生成内源性 H₂S, 理论上其生理作用与外源性 H₂S 供体 NaHS 相似, 然而目前尚无研究报道 *L*-半胱氨酸对消化道动力的确切作用及离子通道机制。本研究拟通过检测内源性 H₂S 合成酶 CSE 和 CBS 在结肠的分布, 观察 *L*-半胱氨酸对结肠平滑肌收缩的影响, 并结合膜片钳实验以探讨内源性 H₂S 供体 *L*-半胱氨酸对肠道动力的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 *L*-半胱氨酸、NaHS、河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX)、炔丙基甘氨酸(propargylglycine, PAG)、氨基氧乙酸(aminooxyacetic acid, AOAA)购自Sigma公司; 兔抗大鼠 CBS多克隆抗体购自Santa Cruz Biotechnology; 兔抗鼠CSE多克隆抗体购自Abcam; GAPDH抗体购自CST; II型胶原酶购自Gibco公司, 胰蛋白酶抑制剂购自Amresco公司。

1.2 实验动物 清洁级雄性成年Wistar大鼠, 体重180~200 g, 购自西安交通大学实验动物中心。饲养温度23~25 °C, 湿度65%~66%, 自由饮食和进水, 由专业饲养员定期更换鼠笼垫料, 保持环境清洁。本动物实验方案通过西安交通大学第二附属医院医学伦理委员会批准。

1.3 实验溶液 (1)台式液(mmol/L): KCl 4.0, NaCl 147.0, CaCl₂ 2.0, NaH₂PO₄ 0.42, Na₂HPO₄ 2.0, MgCl₂ 1.05, 葡萄糖 5.5, 以NaOH调pH值至7.4; (2)无钙生理盐溶液(physiological saline solution, PSS)(mmol/L): NaCl 135.0, KCl 5.0, MgCl₂ 1.2, 葡萄糖 10.0, 羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES) 10.0, 用NaOH调pH值至7.4; (3) L-型钙通道电极内液(mmol/L): 氯化铯135, MgCl₂ 4, HEPES 10, 无水磷酸肌酸二钠盐2, 乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸 10, 四乙胺 20, 用氢氧化铯调pH至7.3; (4)大电导

钙激活钾通道电极内液(mmol/L): 天冬氨酸 110, 三磷酸腺苷镁 5, HEPES 5, MgCl₂ 1, KCl 20, EGTA 0.1, 无水磷酸肌酸二钠盐 2.5, 四水磷酸肌酸二钠盐 2.5, 以KOH调pH至7.3; (5)细胞消化液(质量/体积): II型胶原酶0.15%、胰蛋白酶抑制剂 0.1%、牛血清白蛋白0.25%。

1.4 实验方法

1.4.1 免疫组织化学染色检测结肠CSE和CBS的分布

取近端结肠约0.5 cm, 置于氧饱和的台式液中清洗肠内容物, 然后置于4%甲醛溶液中固定过夜。将固定的肠道标本常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋, 将石蜡块连续切片备用, 厚度4 μ m。切片经过二甲苯脱蜡以及浓度递减乙醇溶液浸泡, 用枸橼酸盐缓冲液修复组织抗原, 经羊血清封闭后加兔抗鼠CBS多克隆抗体(1:250)和兔抗鼠CSE多克隆抗体(1:500), 随后将切片置于4 °C冰箱过夜。第二天用PBS清洗组织切片3次, 每次5 min, 然后加封闭液(5%脱脂奶粉)封闭2 h, 再用PBS洗3次, 每次5 min。冲洗一抗后加二抗, 在37 °C孵育30 min, 随后加DAB显色液在显微镜下观察玻片以控制反应时间, 显色后冲洗玻片, 再经苏木素染色、脱水、干燥以及透明后中性树脂封片, 显微镜下观察。

1.4.2 Western blot检测结肠CSE和CBS表达

取大鼠近端结肠置于持续充95% O₂和5% CO₂的台式液中, 沿肠系膜剪开肠管并清洗内容物, 在正置解剖显微镜(Olympus)下去除肠系膜, 并剥离黏膜及黏膜下层后将保留的肌层放入液氮速冻, -80 °C冰箱保存。实验前取出标本, 液氮研磨, RIPA裂解液及PMSF提取总蛋白, BCA试剂盒测定蛋白浓度后按80 μ g/孔上样电泳, PVDF膜转膜, 5%脱脂牛奶封闭1 h, 一抗(CBS抗体1:250, CSE抗体1:500, GAPDH抗体1:1 000) 4 °C摇床孵育24 h, TBST洗膜5次, 二抗(1:2 000)室温摇床孵育1 h, TBST洗膜后, ECL发光液显影。用Bandscan灰度分析软件处理数据。

1.4.3 结肠平滑肌条制备

为避免麻醉药物对肠道动力的影响, 本研究采用断椎法处死大鼠。将近端结肠迅速取出(近端距回盲部3 cm)置于氧饱和的台式液中, 沿肠系膜剪开肠管, 清洗肠内容物, 将黏膜面朝上固定于道康宁胶板上, 在解剖显微镜下轻轻剥离黏膜层, 保留黏膜下层和肌层。分别沿肠管纵轴及横轴方向制备纵行肌条(longitudinal muscle strip, LM)和环形肌条(circular muscle strip, CM), 宽

度和长度分别为3 mm和10 mm。

1.4.4 恒温浴槽实验 将制备好的肌条一端系于浴槽底部挂钩, 另一端连接张力换能器并传导信号至RM6240多通道生理信号采集处理系统(成都仪器厂)。浴槽温度控制在37 °C, 浴槽容积为6 mL, 肌条前负荷1.0 g, 孵育30 min, 每10 min换1次氧饱和台式液。肌条收缩活动稳定后开始实验, 实验前所有肌条均孵育TTX (1 μmol/L) 10 min以阻断肠神经系统, 加入L-半胱氨酸观察其对肌条收缩的影响。整个实验过程中浴槽内充以含95% O₂和5% CO₂混合气体。

1.4.5 单个平滑肌细胞制备 在解剖显微镜下轻轻剥离近端结肠黏膜层和黏膜下层, 将保留的肌层剪成大小约2 mm × 3 mm的组织块, 然后置于37 °C氧饱和的消化液中消化20 min后, 每2 min取适量组织于含有3 mL氧饱和和无钙PSS的EP管中, 缓缓冲洗3~5次以清除残余的消化酶, 连续取5~6管组织, 待组织块全部取出并冲洗后, 将EP管充满含有牛血清白蛋白的无钙PSS液并置于4 °C冰箱备用。

1.4.6 膜片钳实验 将上述实验中制备好的组织块用吸管轻轻吹打成悬液, 取1 mL悬液滴于底覆载玻片的浴槽内, 待细胞完全贴壁后打开灌流仪, 调整氧饱和的台式液流速为1 mL/min。然后在显微镜下确定目标细胞(折光性好, 细胞膜光滑)。采用水平微电极拉制仪(P-97, 美国Sutter公司)制备电阻为5~7 MΩ的玻璃微电极, 尾端注射电极内液后将电极固定在夹持器上入液, 通过微电极操纵仪将电极调整至目标细胞表面进行高阻封接, 然后补偿电极电容和膜电容, 待波形基线平稳后予负压破膜, 形成全细胞记录模式。打开设好的电流刺激模式, 采用Axon700B放大器及pClamp10.2软件(Axon Instruments, Burlingame, CA, USA)记录平滑肌细胞L型钙通道电流($I_{Ca,L}$)和大电导钙激活钾电流(I_{BKCa})。

1.5 数据处理和分析 采用pClamp 10.2、SPSS 17.0、GraphPad Prism 5.01软件进行数据统计与分析, 结果以mean ± SEM表示。采用GraphPad Prism中Dose-response stimulation进行非线性曲线拟合, 计算半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect, EC₅₀)。L型钙通道激活和失活曲线由Boltzmann方程拟合而成, 激活曲线方程为 $G/G_{max} = 1/[1 + \exp(V_T - V_{1/2}/\kappa)]^{[11]}$, 本研究用 I/I_{max} 代替 G/G_{max} , I/I_{max} 为 $I_{Ca,L}$ 与最大 $I_{Ca,L}$ 比值, V_T 为测试电压, $V_{1/2}$ 为半数激活电压, κ 为斜率因子; 失活曲线方程为 $I/I_{max} = 1/$

$[1 + \exp(V_T - V_{1/2}/\kappa)]^{[11]}$, I/I_{max} 为 $I_{Ca,L}$ 与最大 $I_{Ca,L}$ 比值, V_T 为条件脉冲下的去极化电压, $V_{1/2}$ 为半数失活电压, κ 为斜率因子。自身比较采用配对样本 t 检验, 组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂S合成酶CBS和CSE在大鼠近端结肠的表达

通过免疫组织化学染色观察H₂S合成酶在近端结肠的分布, 结果显示, CBS主要在黏膜层上皮细胞的胞质和肠神经丛表达, 平滑肌细胞胞质有散在表达; CSE在黏膜层、肌间神经丛及平滑肌细胞均表达(图1A)。Western blot进一步证实CBS和CSE蛋白在近端结肠肌层均有表达(图1B)。上述结果说明大鼠结肠全层均表达H₂S合成酶。

2.2 L-半胱氨酸对大鼠近端结肠自发性收缩活动的影响

本课题组前期研究已证实外源性H₂S供体NaHS抑制大鼠近端结肠收缩^[11], 为证实内源性H₂S供体L-半胱氨酸是否具有同样的作用, 本研究首先观察了L-半胱氨酸对大鼠近端结肠平滑肌肌条收缩的影响。如图2A、C和D所示, L-半胱氨酸(3×10^{-4} mol/L ~ 4×10^{-3} mol/L)以浓度依赖的方式抑制LM和CM自发性收缩活动, 但高浓度L-半胱氨酸(8×10^{-3} mol/L和 16×10^{-3} mol/L)增加CM收缩幅度($P < 0.01$), 并使基础张力升高($P < 0.01$)。采用AOAA和PAG(1 mmol/L)孵育肌条以阻断内源性H₂S的生成后, 再观察L-半胱氨酸对LM和CM收缩活动的影响。结果如图2B、C和D所示, LM和CM自发性收缩活动均被L-半胱氨酸(3×10^{-4} mol/L ~ 16×10^{-3} mol/L)浓度依赖性抑制, LM的logEC₅₀为 -2.125 ± 0.425 , 与未孵育AOAA和PAG相比(logEC₅₀为 -2.692 ± 0.269), 差异有统计学意义($n = 8, P < 0.01$); 而且高浓度L-半胱氨酸对CM的促进作用消失。上述结果说明L-半胱氨酸对结肠平滑肌收缩可能具有双向调节作用, 其中兴奋作用可能由内源性生成的H₂S介导。

2.3 L-半胱氨酸对大鼠近端结肠平滑肌细胞 $I_{Ca,L}$ 的影响

为进一步明确内源性H₂S供体对LM收缩的抑制作用和对CM收缩的双向调节作用, 本实验观察了L-半胱氨酸对结肠平滑肌细胞 $I_{Ca,L}$ 的影响, 同时观察了H₂S外源性供体NaHS对 $I_{Ca,L}$ 的作用, 以

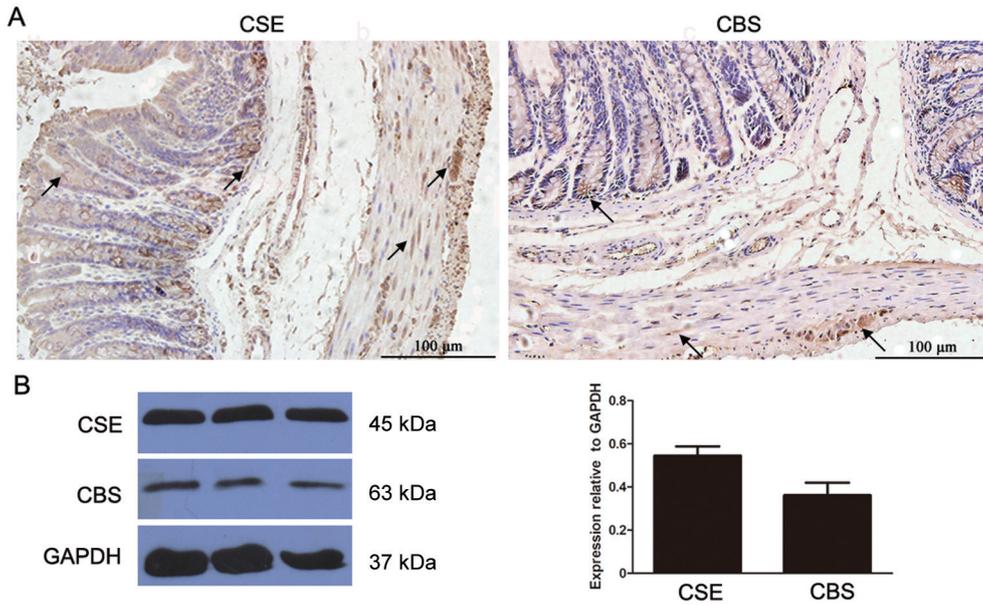


图 1. 内源性H₂S合成酶CBS和CSE在大鼠近端结肠的分布和肌层表达

Fig. 1. The localization and expression of the endogenous H₂S-generating enzymes CBS and CSE in rat proximal colon *A*: The localization of CSE and CBS in the whole layer of the proximal colon. Scar bar 100 μ m. Arrows show the positive expressions of CBS and CSE in the colon. *B*: Protein expression level of CSE and CBS in the proximal colon devoid of mucosa and submucosa detected by Western blot and the summarized quantitative results. Mean \pm SEM, $n = 5$. CSE: cystathionine- γ -lyase; CBS: cystathionine- β -synthase.

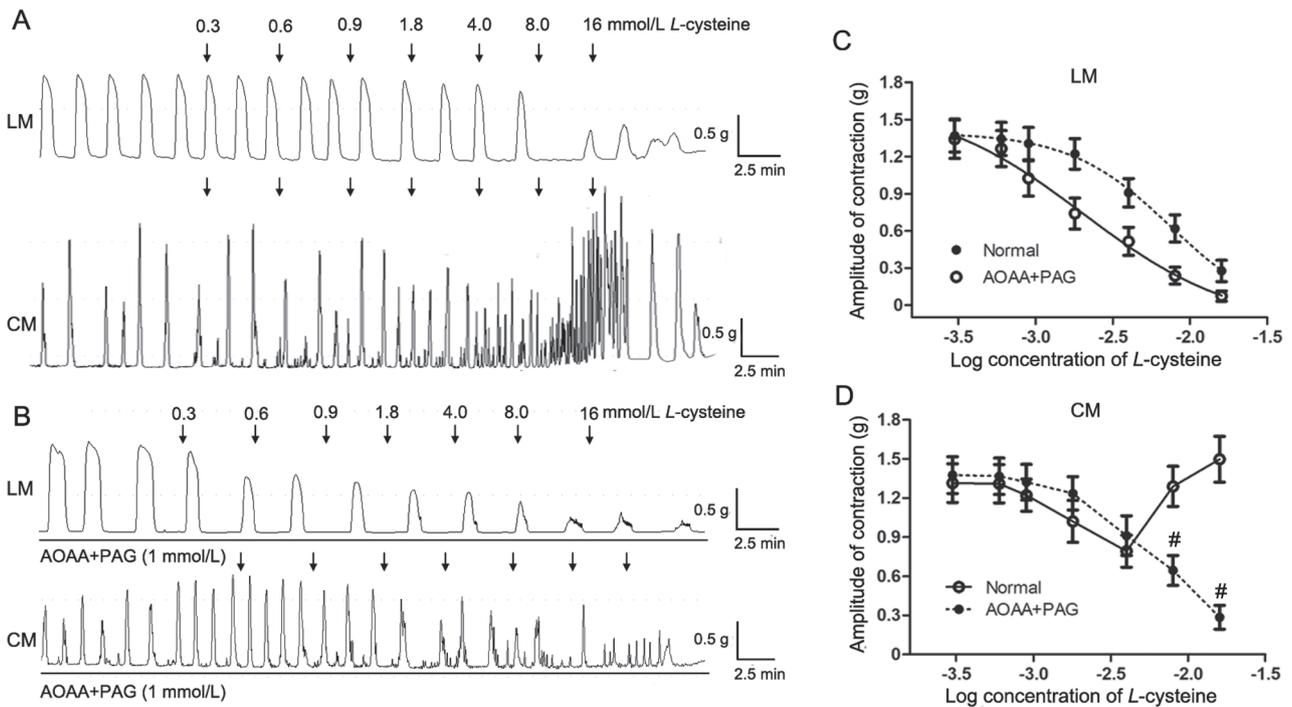


图 2. L-半胱氨酸对大鼠近端结肠自发性收缩活动的影响

Fig. 2. Effect of L-cysteine on spontaneous contraction of colonic muscle strips from rats. *A*: Effect of L-cysteine on spontaneous contractile activity of longitudinal muscle (LM) and circular muscle (CM) of proximal colon. *B*: Effect of L-cysteine on spontaneous contractile activity of LM and CM of proximal colon after incubation with endogenous H₂S synthetase inhibitors AOAA and PAG. *C*: The concentration fitting curve of L-cysteine on LM in the presence and absence of AOAA and PAG. *D*: The concentration curve of L-cysteine on CM in the presence and absence of AOAA and PAG. Mean \pm SEM, $n = 8$, # $P < 0.01$ vs Normal group. AOAA: aminooxyacetate acid; PAG: propargylglycine.

比较两者对 $I_{Ca,L}$ 是否有类似的作用。结果显示 (图 3A、B、C), 与正常对照组相比, 0.1 mmol/L NaHS 不影响 L 型钙通道的电流 - 电压 ($I-V$) 曲线, 但使膜电位 0 mV ($P < 0.01$) 和 20 mV ($P < 0.05$) 处的 L 型钙通道电流密度均增加; 而 0.3 mmol/L NaHS 使 L 型钙通道的 $I-V$ 曲线明显右移, 抑制膜电位 0 mV 处的 $I_{Ca,L}$ ($P < 0.05$), 但增加膜电位 20 mV 处的 $I_{Ca,L}$ ($P < 0.01$)。而内源性 H_2S 供体即 0.9 mmol/L 和 1.8 mmol/L L-半胱氨酸均不影响 L 型钙通道的 $I-V$ 曲线 (图 3E), 但浓度依赖性抑制 0 mV 和 20 mV 处的 $I_{Ca,L}$ ($P < 0.01$) (图 3F)。上述结果说明 L-半胱氨酸对大鼠结肠平滑肌细胞 L 型钙通道具有抑制作用。

2.4 L-半胱氨酸对大鼠近端结肠平滑肌细胞 L 型钙通道特性的影响

如图 4A 所示, 与对照组相比, L-半胱氨酸 (1.8 mmol/L) 作用前后 L 型钙通道激活曲线 $V_{1/2}$ 和 κ 因子差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 NaHS (0.3 mmol/L) 作用后使 $V_{1/2}$ 从 (-17.94 ± 1.00) mV 上升至 (-10.61 ± 2.28) mV ($n = 8, P < 0.05$), κ 差异无统计学意义。

如图 4B 所示, 与对照组相比, L-半胱氨酸作用前后 L 型钙通道失活曲线 $V_{1/2}$ 和 κ 因子差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 NaHS (0.3 mmol/L) 作用后使 $V_{1/2}$ 从 (-31.39 ± 0.43) mV 增加至 (-25.01 ± 1.01) mV ($n = 6, P < 0.01$), κ 差异无统计学意义。0.1 mmol/L NaHS 和 0.9 mmol/L L-半胱氨酸对 L 型钙通道稳态激活和失活曲线均无显著影响 (数据未显示)。上述结果说明 L-半胱氨酸不影响 L 型钙通道的电压依赖特性。

2.5 L-半胱氨酸对大鼠近端结肠平滑肌细胞 I_{BKCa} 的影响

I_{BKCa} 也是调节平滑肌细胞收缩和舒张的重要离子通道, 因此本研究还观察了 L-半胱氨酸对结肠平滑肌 I_{BKCa} 的作用, 并与 H_2S 外源性供体 NaHS 的作用进行对比。结果显示 (图 5), 与正常对照组相比, NaHS 浓度依赖性抑制 I_{BKCa} , 0.1、0.3 mmol/L NaHS 使膜电位 -60 mV 处钙激活钾通道电流密度显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。然而, L-半胱氨酸对 I_{BKCa} 无明显抑制或促进作用 ($P > 0.05$)。上述结果说明

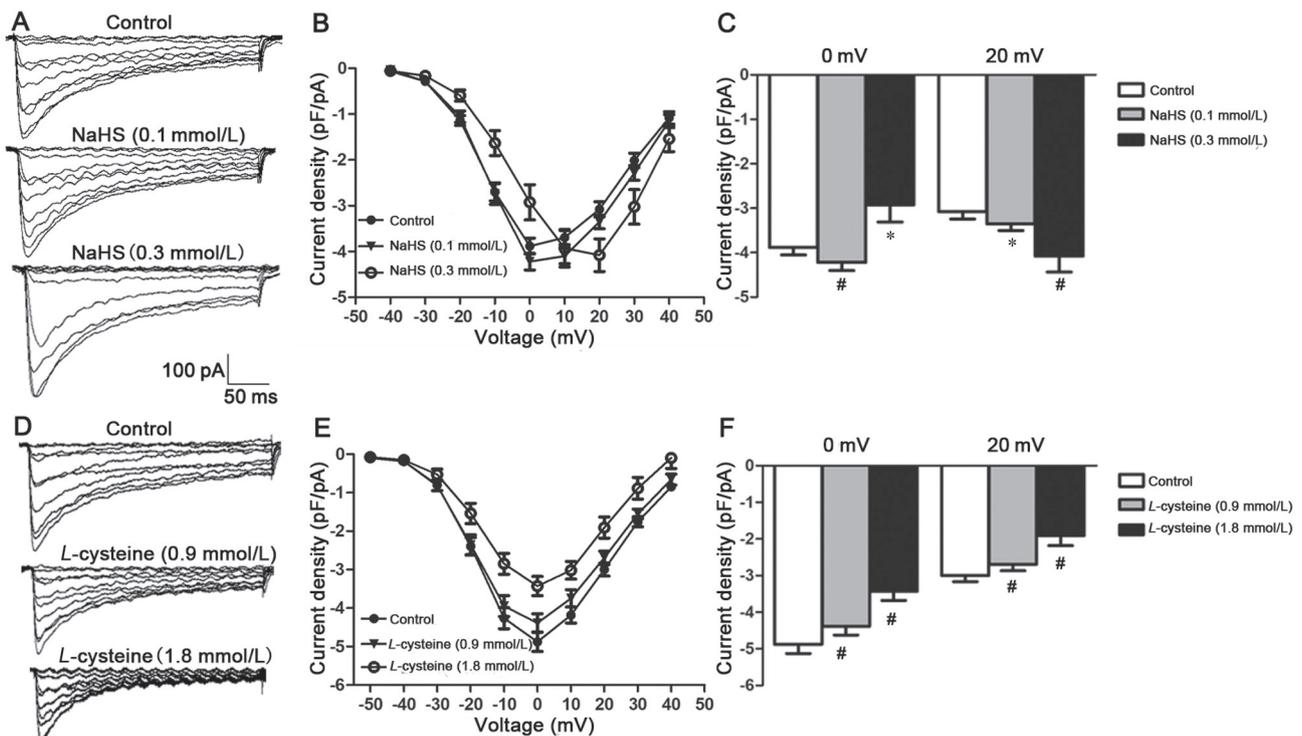


图 3. H_2S 内源性供体 L-半胱氨酸和 H_2S 外源性供体 NaHS 对大鼠结肠平滑肌细胞 L 型钙通道电流作用的比较

Fig. 3. Different effects of L-cysteine and NaHS on L-type calcium channel current ($I_{Ca,L}$) of rat colonic smooth muscle cells. A and D: The original curves of $I_{Ca,L}$ before and after addition of NaHS and L-cysteine. B and E: The current-voltage curves of L-type calcium channel before and after addition of NaHS and L-cysteine. C and F: Comparison of peak current density of L-type calcium channel before and after adding NaHS and L-cysteine at membrane potential of 0 mV and 20 mV. Mean \pm SEM, $n = 16$ for NaHS group, and $n = 13$ for L-cysteine group. * $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.01$ vs control group.

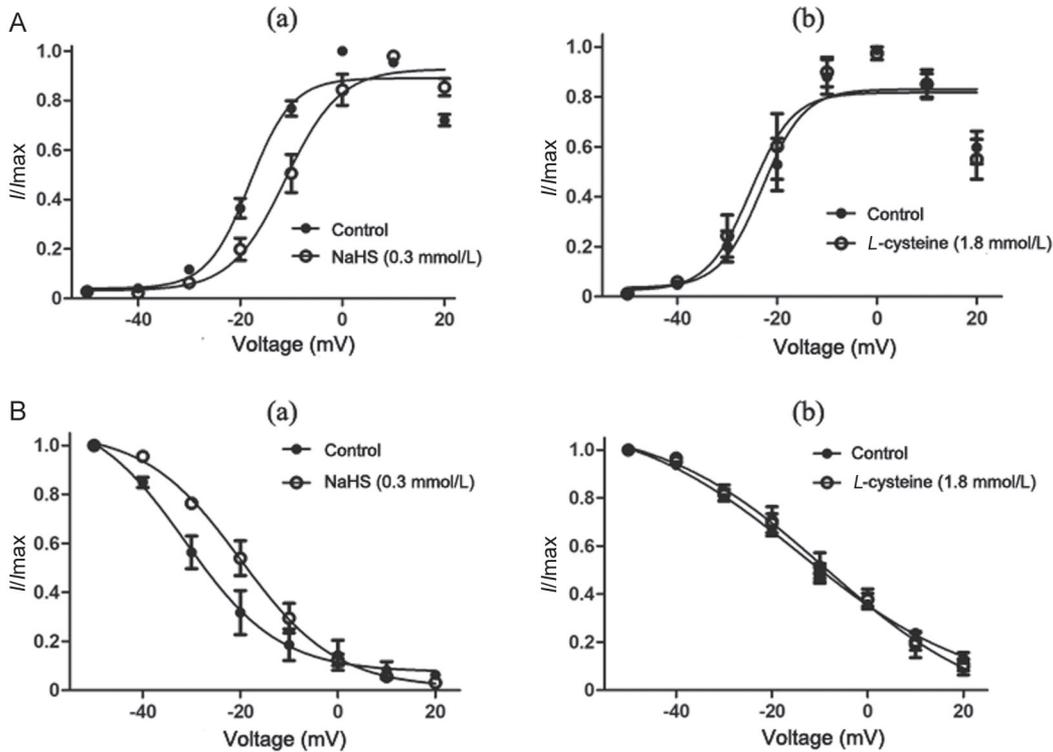


图 4. *L*-半胱氨酸和NaHS对L型钙通道稳态激活和稳态失活曲线的作用比较

Fig. 4. Comparison of the effects of *L*-cysteine and NaHS on characteristics of *L*-type calcium channel. *A*: The effect of NaHS (a) and *L*-cysteine (b) on the steady activation curves of *L*-type calcium channel. *B*: The effect of NaHS (a) and *L*-cysteine (b) on the inactivation curves of *L*-type calcium channel. Mean \pm SEM, $n = 6$.

大电导钙激活钾通道不参与 *L*-半胱氨酸对结肠平滑肌收缩的调控作用。

3 讨论

H₂S 是一种可抑制线粒体细胞色素 C 氧化酶的毒性气体，同时也是一种具有潜在生理功能的内源性气体信号分子^[6]。在血管平滑肌系统，H₂S 作为抑制性内皮衍生因子可导致血管平滑肌舒张和超级化^[7]。而在消化道，尽管普遍研究认为 H₂S 也是一种抑制性神经递质^[8, 9]，但有研究显示低浓度 H₂S (< 0.3 mmol/L) 增加胃窦平滑肌张力、降低收缩幅度，而高浓度 H₂S 则抑制收缩幅度但不影响平滑肌张力^[10]。而且本研究组前期研究显示 H₂S 抑制结肠平滑肌细胞 I_{BKCa}，说明 H₂S 对肠道动力可能有潜在兴奋作用^[11]。然而上述研究均采用 NaHS 作为外源性 H₂S 的供体以探讨 H₂S 对肠道动力的生理作用。*L*-半胱氨酸作为 H₂S 合成的前体，目前仅个别研究报道了其肠道动力的影响。例如，Nagao 等研究报道 *L*-半胱氨酸对兔回肠纵行肌收缩无明显抑制作用^[3]，而 Jimenez 等研究显示 NaHS 抑制大鼠结肠

自发性收缩而 *L*-半胱氨酸促进结肠收缩^[12]。因此，*L*-半胱氨酸是否影响肠道动力以及可能的作用机制有待进一步研究。

如前所述，内源性 H₂S 由 CBS 和 CSE 催化 *L*-半胱氨酸合成，因而本研究首先检测了 CBS 和 CSE 在大鼠结肠全层的分布。结果显示 CSE 在近端结肠纵行和环形平滑肌细胞胞质、黏膜上皮细胞以及肌间神经丛均表达，而 CBS 与 CSE 分布略有不同，CBS 主要表达于黏膜层和肌间神经丛，在平滑肌细胞散在分布。上述结果说明平滑肌细胞、黏膜上皮细胞以及肠神经元均可产生内源性 H₂S，其中 CSE 可能是结肠平滑肌细胞合成 H₂S 的主要酶。为进一步验证 CBS 和 CSE 在肌层的表达水平，本研究还检测了去除黏膜和黏膜下层的结肠组织中 CBS 和 CSE 的蛋白表达水平，也进一步证实了 CBS 和 CSE 在结肠肌层的表达。但有研究报道大鼠结肠肌层主要表达 CBS，CSE 仅散在分布^[13]。此外，还有研究显示肠神经元仅表达 CSE，不表达 CBS^[14]。上述结果均与本研究结果不一致，可能是检测方法以及实验动物种属不同导致。

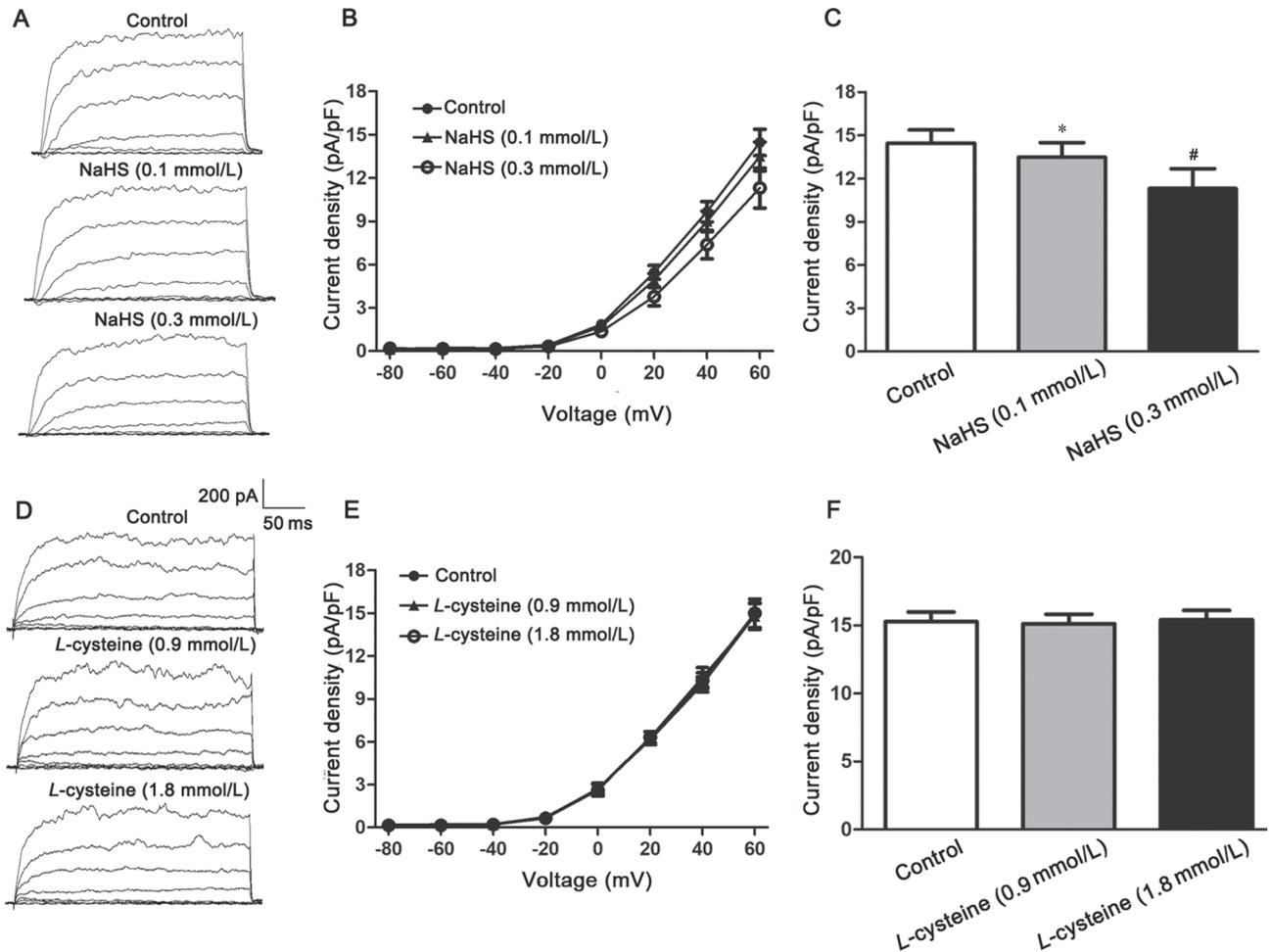


图 5. *L*-半胱氨酸和NaHS对大鼠近端结肠平滑肌细胞大电导钙激活钾通道电流的影响

Fig. 5. The different effect of *L*-cysteine and NaHS on the currents of large conductance calcium activated potassium channel (I_{BKCa}). *A* and *D*: The original current curves of large conductance calcium activated potassium channel before and after the addition of NaHS and *L*-cysteine. *B* and *E*: The current-voltage curve of large conductance calcium activated potassium channel before and after the addition of NaHS and *L*-cysteine with different concentrations. *C* and *F*: The comparison of the current density at membrane potential of 60 mV before and after the addition of NaHS and *L*-cysteine. Mean \pm SEM, $n = 13$ for NaHS group, and $n = 10$ for *L*-cysteine group. * $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.01$ vs control group.

为进一步研究 *L*-半胱氨酸对结肠动力的影响，本研究首先观察了 *L*-半胱氨酸对结肠平滑肌收缩活动的影响。在制备平滑肌肌条过程中剥离黏膜层以避免黏膜源性 H_2S 对结肠动力的影响。因为尽管黏膜层是肠道生成 H_2S 的重要来源之一，但在正常生理情况下，黏膜屏障完整， H_2S 无法跨越黏膜屏障到达肌层从而影响肠道动力^[12]。本研究组前期研究及其他多项研究均已证实 TTX 孵育不能阻断 H_2S 对结肠平滑肌收缩的抑制作用，说明 H_2S 对结肠动力的抑制作用是肌源性的，不依赖肠神经系统^[1, 9, 11, 12]。因此，本研究采用 TTX 孵育肌条以探讨内源性 H_2S 供体 *L*-半胱氨酸对结肠肌源性收缩

的影响。结果显示低浓度的 *L*-半胱氨酸 (3×10^{-4} mol/L ~ 4×10^{-3} mol/L) 以浓度依赖的方式抑制 LM 和 CM 的收缩，但高浓度的 *L*-半胱氨酸 (8×10^{-3} mol/L 和 16×10^{-3} mol/L) 却增加 CM 的收缩幅度和基础张力。上述研究结果与既往研究结果不同^[3, 12]，一方面可能与研究采用的实验动物和肌条制备方法不同有关，另一方面与实验中应用的 *L*-半胱氨酸浓度不同有关。为研究 *L*-半胱氨酸对结肠平滑肌的作用是否由内源性生成的 H_2S 所致，本研究使用 H_2S 合成酶抑制剂 AOAA 和 PAG 孵育肌条以阻断 H_2S 的生成，其中 AOAA 为 CBS 的抑制剂，而 PAG 为 CSE 的抑制剂^[14]。结果显示高浓度 *L*-半胱氨酸

对 CM 的促进作用消失, 以浓度依赖的方式抑制 LM 和 CM 的收缩。上述结果一方面说明 *L*-半胱氨酸对结肠平滑肌收缩的影响不依赖肠神经系统; 另一方面说明 *L*-半胱氨酸本身对 LM 和 CM 具有抑制作用, 对 CM 的促进作用可能由其内源性生成的 H_2S 介导而非 *L*-半胱氨酸。然而, *L*-半胱氨酸本身是否也通过肠神经系统调控结肠平滑肌的收缩有待进一步的研究。

L 型钙通道的开放和关闭不仅与平滑肌细胞收缩和舒张相关, 还参与肠道平滑肌基础张力的调控^[15]。为进一步证实 *L*-半胱氨酸对平滑肌收缩的作用是否直接由平滑肌细胞表面的 L 型钙离子通道介导, 本实验通过全细胞膜片钳实验, 以外源性 H_2S 供体 NaHS 作比较, 发现 *L*-半胱氨酸与 NaHS 作用不同。低浓度 NaHS 促进 $I_{Ca,L}$, 而高浓度 NaHS 抑制 $I_{Ca,L}$, 并使 L 型钙通道的 *I-V* 曲线右移; 而 *L*-半胱氨酸以浓度依赖的方式抑制 $I_{Ca,L}$, 却不影响 *I-V* 曲线。通过观察两者对 L 型钙通道稳态激活和失活曲线的影响, 我们也发现 NaHS 抑制 L 型钙通道激活和失活, 而 *L*-半胱氨酸不影响 L 型钙离子通道特性。上述结果提示 L 型钙离子通道参与 *L*-半胱氨酸对平滑肌的抑制作用, 而高浓度 *L*-半胱氨酸对 CM 的促进作用可能是由内源性生成的 H_2S 所致, 提示 H_2S 对平滑肌收缩具有潜在的双重调节作用, 且具有浓度依赖特性。本研究中 *L*-半胱氨酸对 LM 和 CM 的作用不同, 一方面可能是由于 H_2S 合成酶在 CM 和 LM 分布不同从而导致生成的 H_2S 浓度不同; 另一方面 AOAA 和 PAG 孵育使 *L*-半胱氨酸的 EC_{50} 降低, 说明 *L*-半胱氨酸对 LM 仍有潜在促进作用。除了 L 型钙通道, 大电导钙激活钾通道亦参与平滑肌细胞收缩的调控^[16]。因此, 本研究还观察了 *L*-半胱氨酸和 NaHS 对大电导钙激活钾通道的作用。结果显示 *L*-半胱氨酸对 I_{BKCa} 无明显作用, 而 NaHS 浓度依赖性抑制 I_{BKCa} 。大电导钙激活钾通道的抑制导致细胞膜去极化, L 型钙通道开放, 钙离子内流增加, 从而促进平滑肌收缩^[17]。因而进一步说明 H_2S 具有促进平滑肌细胞收缩的作用。

综上所述, *L*-半胱氨酸对大鼠结肠平滑肌收缩的抑制作用部分可能由 L 型钙通道介导, 而对 CM 的促进作用可能是由内源性生成的 H_2S 所致。因此, 在应用 *L*-半胱氨酸作为 H_2S 供体研究内源性 H_2S 对结肠动力的影响时应考虑 *L*-半胱氨酸本身对结肠动力的抑制作用。

参考文献

- 1 Wang R. Two's company, three's a crowd: Can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002; 16: 1792–1798.
- 2 Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 2006; 131: 259–271.
- 3 Nagao M, Duenes JA, Sarr MG. Role of hydrogen sulfide as a gasotransmitter in modulating contractile activity of circular muscle of rat jejunum. *J Gastrointest Surg* 2012; 16: 334–343.
- 4 Gallego D, Clavé P, Donovan J, Rahmati R, Grundy D, Jiménez M, Beyak MJ. The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1306–1316.
- 5 Gade AR, Kang M, Akbarali HI. Hydrogen sulfide as an allosteric modulator of ATP-sensitive potassium channels in colonic inflammation. *Mol Pharmacol* 2013; 83: 294–306.
- 6 Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32: 109–134.
- 7 Skovgaard N, Gouliaev A, Aalling M, Simonsen U. The role of endogenous H_2S in cardiovascular physiology. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12: 1385–1393.
- 8 Liu Y (刘颖), Liang CB, Quan XJ, Xia H, Luo HS. Actions of endogenous hydrogen sulfide on colonic hypermotility in a rat model of chronic stress. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2015; 67(1): 65–73 (in Chinese with English abstract).
- 9 Nalli AD, Rajagopal S, Mahavadi S, Grider JR, Murthy KS. Inhibition of RhoA-dependent pathway and contraction by endogenous hydrogen sulfide in rabbit gastric smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 308(6): C485–C495.
- 10 Zhao P, Huang X, Wang ZY, Qiu ZX, Han YF, Lu HL, Kim YC, Xu WX. Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 2009; 616(1–3): 223–228.
- 11 Quan X, Luo H, Liu Y, Xia H, Chen W, Tang Q. Hydrogen sulfide regulates the colonic motility by inhibiting both L-type calcium channels and BKCa channels in smooth muscle cells of rat colon. *PLoS One* 2015; 10(3): e0121331.
- 12 Jimenez M, Gil V, Martinez-Cutillas M, Mañé N, Gallego D. Hydrogen sulphide as a signalling molecule regulating physiopathological processes in gastrointestinal motility. *Br J Pharmacol* 2017; 174(17): 2805–2817.
- 13 Martin GR, McKnight GW, Dickey MS, Coffin CS, Ferraz JG, Wallace JL. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Dig Liver Dis* 2010; 42(2):

- 103–109.
- 14 Gil V, Gallego D, Jimenez M. Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility. *Br J Pharmacol* 2011; 164(2b): 485–498.
- 15 Yamane S, Kanno T, Nakamura H, Fujino H, Murayama T. Hydrogen sulfide-mediated regulation of contractility in the mouse ileum with electrical stimulation: roles of L-cysteine, cystathionine β -synthase, and K^+ channels. *Eur J Pharmacol* 2014; 740: 112–120.
- 16 Liang C, Luo H, Liu Y, Cao J, Xia H. Plasma hormones facilitated the hypermotility of the colon in a chronic stress rat model. *PLoS One* 2012; 7(2): e31774.
- 17 Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 2001; 91(3): 1438–1449.