

文章编号:1005-6947(2006)11-0845-04

· 基础研究 ·

内皮素对 Oddi 括约肌功能影响的实验研究

葛春林¹, 罗晓光², 李智³, 孙树⁴

(中国医科大学附属第一医院 1. 普通外科 2. 神经内科 4. 烧伤科, 辽宁 沈阳 110001; 3. 沈阳医学院奉天医院 普通外科, 辽宁 沈阳 110025)

摘要:目的 研究内皮素(ET)对离体 Oddi 括约肌收缩的直接影响,并对其进行传导通路进行探讨。

方法 (1)按累积加药法在 K-H 液中加入各浓度(0.1~100.0 nmol/L)的 ET-1,观察 Oddi 括约肌收缩频率及振幅的变化;(2)加入 ET-1 抗血清、尼卡地平、BQ-123 后,再加入 ET-1,测定三者对 Oddi 括约肌收缩的影响;检测 Oddi 括约肌 PKC 的活性。**结果** ET 能收缩静息状态下的 Oddi 括约肌,其作用强度随 ET 浓度的增加而增强。随着 ET-1 浓度的增高,Oddi 括约肌细胞胞浆蛋白激酶(PKC)活性也呈增高趋势。尼卡地平对 ET 所致的 Oddi 括约肌收缩反应无明显抑制作用,ET 抗血清及 BQ-123 能显著抑制 ET 所致的 Oddi 括约肌的收缩。**结论** ET-1 能明显收缩离体 Oddi 括约肌,其收缩强度与 ET 存在量效关系。ET 抗血清和 ET 受体拮抗剂(BQ-123)对 ET-1 有较强的拮抗作用。PKC 参与 ET-1 引起的 Oddi 括约肌收缩的信号传导。

关键词: 内皮素/药理学; Oddi 括约肌/药物作用; 受体, 内皮素

中图分类号: Q592.1; R322.4 **文献标识码:** A

Study in the effect of endothelin-1 on the contraction of Oddi sphincter

GE Chun-lin¹, LUO Xiao-guang², LI Zhi³, SUN Shu⁴

(1. Department of General Surgery, 2. Department of Neurology; 4. Department of Burn Injury, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 3. Department of General Surgery, Rengtian Hospital, Shenyang Medical College Shenyang 110025, China)

Abstract: Objective To investigate the direct effect of endothelin-1 on the contraction of Oddi sphincter, and study its signal transduction pathway. **Methods** By cumulative increase method, ET-1 was given in K-H solution up to the final concentration (0.1~100.0 nmol/L), and the contraction amplitude and frequency of Oddi sphincter were observed. Anti-ET serum, nifedipine, and BQ-123 were added to detect their effects on the contraction of Oddi sphincter, and PKC activity in Oddi sphincter were also detected.

Results ET addition resulted in the contraction of resting Oddis sphincter, and the contraction intensity increased with the rising ET concentration. No obvious inhibition effect on Oddis sphincter contraction was induced by nifedipine, while anti-ET serum and ET receptor antagonist reduced the Oddi sphincter contraction significantly. The PKC activity in cytoplasm of Oddi sphincter enhanced with the rising ET-1 concentration, and the contraction of Oddis sphincter increased at the same time. **Conclusions** ET-1 results in the significant contraction of the vivo Oddi sphincter, and the magnitude of contraction is dose-effect related to ET concentration. Anti-ET serum and ET receptor antagonists strongly offset the function of ET. PKC is involved in the signal transduction pathway of the Oddi sphincter contraction induced by ET-1.

Key words: Endothelin/pharm; Oddi Sphincter/drug eff; Receptor, Endothelin

CLC number: Q592.1; R322.4 **Document code:** A

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科学研究项目资助(202013616)。

收稿日期: 2005-03-10; **修订日期:** 2006-07-05。

作者简介: 葛春林,男,辽宁沈阳人,中国医科大学附属第一医院教授,主要从事胆道、胰腺外科方面的研究。

通讯作者: 葛春林 E-mail: chunlinge@yahoo.com.cn。

Oddi 括约肌是胆总管末端与十二指肠连接处的环形平滑肌,能控制和调节胆总管和胰管的排放,其收缩功能的障碍会导致胆汁和胰液的逆流,在胆胰疾病的病理生理过程中起重要作用。内皮素(ET)具有广泛的生物学效应,不仅可收缩血管及升高血压,对胃肠道平滑肌也有兴奋作用。但关于ET对Oddi括约肌收缩功能的影响少有报道。本研究拟探讨ET对家兔离体Oddi括约肌收缩的直接影响,并对其传导通路进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

ET-1及尼卡地平(nikadipine)、BQ-123(ET受体拮抗剂)、抑蛋白酶肽、胃酶抑素、亮肽素、苯甲基磺酰氟(PMSF)均购于Sigma化学公司(美国);ET抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;Krebs-Henseleit(K-H)液由中国医科大学药理实验室提供;[γ -32P]-ATP(活性 >185 TBq/mmol)购于北京亚辉生物工程公司。

1.2 实验方法

1.2.1 离体兔Oddi括约肌的制备及张力测定^[1-2] 家兔10只由中国医科大学动物室提供。雌雄不限,体重3.0~3.5 kg。实验前10h禁食,不禁水。实验时将动物处死,固定于手术台上。上腹正中切口进腹,沿胆囊向下找到胆总管及胆总管十二指肠结合部;剖开十二指肠,沿十二指肠大乳头向胆管方向迅速剪取一小段,置于冷的通有混合气体(95% O₂, 5% CO₂)的K-H营养液中;剪除十二指肠大乳头及其周围的脂肪组织,可见成环状的Oddi括约肌;将其剪成3块宽3~5 mm左右的肌环,用2个小钩将其悬挂于盛有10 mL K-H液的浴管中,保持温度(37±0.5)℃并持续通入混合气体。Oddi括约肌环的张力变化可通过其上端相连的力-位移换能器记录在台式平衡记录仪上。标本初始负荷为1 g,灵敏度为40 U/g,走纸速度为8 mm/min。每20 min换营养液1次。平衡60~90 min后向浴管中加入实验药物。在平衡期间,加入60 mmol/L的KCL溶液。此时收缩力为100%,以此作为ET收缩的对照。

1.2.2 ET及其抗体等对Oddi括约肌张力的影响

用新鲜K-H液冲洗标本使其回至基线。当Oddi括约肌出现节律性收缩时,按累积加药法加入各浓

度(0.1~100.0 mmol/L)的ET,观察括约肌收缩频率及振幅的变化。完毕后用K-H液冲洗标本3次,平衡60 min,使其回至基线。

再分别在K-H液中加入的ET-1抗血清(终浓度为1/5 000)、nicardipine(5 μ g/mL)、BQ-123(1 mmol/L)孵育5 min后,加入ET-1(终浓度为 3×10^{-8} mol/L),测定3者对Oddi括约肌收缩的影响。

1.2.3 Oddi括约肌蛋白激酶(PKC)活性测定用改良Takai方法^[3]进行PKC活性测定。将Oddi括约肌置于粉碎缓冲液中[0.32 mol/L蔗糖溶于20 mmol/L HEPES缓冲液(pH 7.5)中,后者含10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),2 mmol/L 乙二醇四乙酸(EGTA),5 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT),1 mmol/L 苯甲基磺酰氟化物(PMSF),10 mg/L 亮肽素,10 mg/L 胃抑酶素,10 mg/L 抑蛋白酶肽],超声粉碎(50次/管),离心(100 000 g, 60 min),取出25 μ L混悬液测定蛋白含量。剩余混悬液分2个平行管,每管取20 μ L,与30 μ L [γ -32P]-ATP的反应液(25 mmol/L 醋酸镁 10 μ L, 1 mmol/L ATP 2.5 μ L, 1% 鱼精蛋白 2 μ L, 1 Tris-HCL 1 μ L, H₂O 14.5 μ L)混合,于30℃反应8 min,从反应物中取出25 μ L,点于Whatman P81强阳离子交换滤纸上,在75 mmol/L磷酸溶液中洗3次,每次3 min;装入液闪瓶,进行液体闪烁测定(cpm)计数。

1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件包进行数据处理。实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验行组间差别的显著性分析。 $P < 0.05$ 为具有显著性。

2 结果

2.1 ET对离体兔Oddi括约肌张力的影响

向浴管中加入ET后,标本出现缓慢而持久的收缩反应。加药后至括约肌收缩,其潜伏期平均为(5.2±3.1) min;从括约肌开始收缩至明显收缩历时(4.5±2.4) min,然后收缩力稳定(30.8±10.6) min。

当ET处于低浓度时,括约肌表现为收缩频率加快,张力增强。随着浓度的增高,收缩逐渐加强;当浓度达到 3×10^{-8} mol/L时,出现强直状态,再增加浓度也无反应。

ET致Oddi括约肌收缩的量效曲线(图1)显示:ET能收缩静息状态下的Oddi括约肌,其作用强

度随 ET 浓度的增加而增强。当 ET 浓度为 3×10^{-8} mol/L 时,收缩力最强。

2.2 ET 抗体, BQ-123 及 nicardipine 对 Oddi 括约肌的影响

结果表明, nicardipine ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 对 ET 所致的

括约肌收缩反应无明显抑制作用; ET 抗血清 ($1/5000$) 及 BQ-123 ($1 \mu\text{mol}/\text{L}$) 能显著抑制括约肌的收缩; 分别降低至对照组收缩的 (63 ± 13.4)% 和 (47 ± 9.1)% (均 $P < 0.01$)。以 ET 受体拮抗剂抑制效果最为明显(图2)。

图1 内皮素致离体兔 Oddi 括约肌收缩的量效曲线

2.3 ET-1 对 Oddi 括约肌的 PKC 活性的影响

随着 ET-1 浓度增高,括约肌细胞胞浆 PKC 活性也呈增高趋势,并伴随括约肌收缩的增强;但当 ET-1 浓度达到 3×10^{-9} mol/L 后,PKC 活性达到饱和,不再增高(图3)。

图3 ET-1 对 Oddi 括约肌中 PKC 活性的影响

3 讨论

ET 是目前发现的最强的缩血管物质,主要通过靶细胞膜上的 ET 受体结合发生效应。研究表明,除心血管系统外,ET 还与消化系统、呼吸系统、神经系统疾病的发生发展有密切关系。关于 ET 是否能收缩 Oddi 括约肌少见报道。本研究显示,ET-1 能明显收缩离体 Oddi 括约肌,且其收缩强度存在量效关系。ET 在 10^{-10} mol/L 时引起 Oddi 括约肌收缩,此后随 ET 浓度升高,收缩逐渐增强,至浓度 10^{-7} mol/L 时,收缩程度达到饱和,即呈强直收缩状态。本组 ET 引起 Oddi 括约肌收缩

注: + 与 ET 组相比 $P < 0.05$

图2 ET-1 抗体、nicardipine 及 BQ-123 对 ET 致 Oddi 括约肌收缩的影响

的潜伏期为 (5.2 ± 3.1) min,反映了从 ET-1 与括约肌上受体结合到 Ca^{2+} 聚集引起收缩效应的整个信号传导过程所经历的时间,而 ET-1 与受体达到稳定结合所需要的时间则等同于 Oddi 括约肌达到收缩稳定所需的时间,本实验平均为 4.5 min。在 ET-1 浓度达到 $10^{-8} \sim 10^{-7}$ mol/L 后,Oddi 括约肌收缩最强,不再随 ET-1 浓度的进一步增高而加强。说明此时 ET-1 与受体的结合达到饱和。

ET-1 引起 Oddi 括约肌收缩由受体结合开始,经过系列信号传导使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高引发肌纤维收缩;而细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高可以源于细胞内钙动员或细胞外钙内流。实验表明,低浓度 ET ($10^{-12} \sim 10^{-9}$ mol/L) 引起的离体气管平滑肌的收缩主要通过细胞外钙内流实现^[4]。nicardipine 是钙离子通道阻滞剂,可以阻止钙离子从细胞外进入细胞内。nicardipine 并未减弱高浓度 ET-1 (10^{-7} mol/L) 所引起的 Oddi 括约肌的收缩 ($P > 0.05$)。提示该浓度的 ET-1 引起离体 Oddi 括约肌的收缩与细胞外钙内流无明显关系。与此相反,ET 抗血清与 ET 受体拮抗剂 BQ-123 均能显著降低 Oddi 括约肌的收缩程度。BQ-123 对 ET-1 有较强的拮抗作用^[5]。实验发现: $1 \mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度的 BQ-123 不能完全阻止括约肌的收缩(给予 BQ-123 后,收缩降低 53%)。除了因为 BQ-123 浓度不够其拮抗作用而未达到饱和外,另一可能原因

是 ET-1 受体存在 ET-A, ET-B, ET-C 等多种亚型^[6], ET 有可能通过 ET-A 以外的受体发挥收缩作用, 而选择性拮抗 ET-A 的 BQ-123 只能部分拮抗 ET-1 的收缩效应。

ET-1 与受体结合后可通过多种途径进行信息传递而产生生物学效应, 其中最重要的是磷酸肌醇系统。ET 与受体结合后通过 G 蛋白激活磷脂酶 C (PLC), 使 4, 5 二磷酸肌醇酯分解 (PIP₂), 产物之一是二酯酰甘油 (DAG), 后者可激活蛋白激酶 C (PKC) 促进蛋白质磷酸化, 提高细胞反应性。此外 PKC 还可促进钠氢交换, 增加细胞钙离子浓度。故认为 PKC 在 ET-1 受体结合引起的信号传导中有重要作用。本实验发现随 ET-1 浓度的增高, PKC 活性也在增高, 并同时有 Oddi 括约肌收缩的增强。提示 PKC 参与了 ET-1 引起的 Oddi 括约肌收缩的信号传导。但当 ET-1 浓度达到 3×10^{-9} mol/L 时, PKC 活性达到最高并饱和, 不再随 ET-1 浓度增高而增高。然而此时 Oddi 括约肌收缩仍然继续增高, 并在 ET-1 浓度 3×10^{-8} mol/L 时饱和。这提示 ET-1 浓度在 3×10^{-8} mol/L ~ 3×10^{-9} mol/L 之间时, 有除 PKC 之外的传导通路被激活并参与了括约肌的收缩。至于 Oddi 括约肌上 ET-

1 受体数量及功能是否随各种生理或病理情况的改变而有所变化尚不明了, 值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 857 - 859. [2] Sand J, Nordback I, Arvola P, *et al.* Effects of botulinum toxin A on the sphincter of ODDI: An in vivo and invitro study [J]. Gut, 1998, 42(4): 507 - 510.
- [3] Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, *et al.* Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids [J]. J Biol Chem, 1979, 254(1110): 3692 - 3695.
- [4] Hay DW, Luttmann MA, Muccitelli RM, *et al.* Endothelin receptors and calcium translocation pathways in human airways [J]. J Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999, 359(5): 404 - 410.
- [5] Kirchengast M, Munter K. Endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in cardiovascular remodeling [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1999, 221(4): 312 - 325.
- [6] Giannesi D, del Ry S, Vitale RL. The role of endothelins and their receptors in heart failure [J]. Pharmacol Res, 2001, 43(2): 111 - 126.

《国际病理科学与临床杂志》征稿、征订启事

《国际病理科学与临床杂志》是由教育部、中南大学主办的国家级医学学术期刊。原刊名《国外医学·生理、病理科学与临床分册》，更名后，本刊在保持特色，致力于介绍国外医学研究领域的新动态、新技术、新经验的基础上，加强了对国内研究成果和现状的报道。主要栏目有：研究论著、专家论坛、综述、重点实验室、成果报道等。本刊为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”，并被美国《化学文摘》(CA)等国内外多家重要数据库和检索系统收录。欢迎投稿，特别欢迎并优先刊发高水平的研究论著。

本刊具有学术水平高、指导性强、信息时效快等特点。本刊已实现“投稿 - 审稿 - 编辑”全程网上处理，敬请登陆本刊网站投稿。

网址: www.gjbl.net; gjbl.csu.edu.cn

本刊为双月刊, 逢双月末出版, 大 16 开, 国内外公开发行。期定价 10 元, 全年定价 60 元, 国内统一刊号: CN 43 - 1458/R, 国际标准刊号: ISSN 1673 - 2588; 国内邮发代号: 42 - 35, 国外邮发代号: BM6564; 各地邮局(所)均可订阅。

来稿、征订请寄: 湖南省长沙市湘雅路 110 号湘雅医学院 50 号信箱《国际病理科学与临床杂志》编辑部收, 邮政编码: 410078; 编辑部电话: 0731 - 4805495, 4805496; 传真: 0731 - 4804351; E-mail: gwyxxy@126.com; gwyx@xysm.net