

倍他福林对大鼠离体子宫平滑肌收缩作用的影响研究

晏飞^{1*},董志²,胡月³,傅洁民⁴,曾凡新^{4#}(1.武警重庆总队第一支队卫生队,重庆 401329;2.重庆医科大学药理学教研室,重庆 400016;3.重庆江北区妇幼保健院,重庆 400020;4.重庆医药工业研究院,重庆 400061)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3096-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.09

摘要 目的:研究倍他福林对大鼠离体子宫平滑肌收缩作用的影响。方法:制备未孕和妊娠大鼠离体子宫平滑肌标本,分别设为未孕空白(NPC)组、妊娠空白(PC)组、倍他福林未孕(BNP)组、倍他福林妊娠(BP)组、利托君未孕(RNP)组和利托君妊娠(RP)组($n=6$)。采用累积加药的方法,每隔15 min加药1次,BNP组和BP组分别加入倍他福林至 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L,RNP组和RP组分别加入利托君至 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 3×10^{-5} mol/L,NPC组和PC组不加任何药物。记录各组平滑肌105 min内的收缩幅度,计算收缩率、半数抑制浓度(IC_{50})的 $-\lg$ 值($P_{IC_{50}}$)和最大抑制效应(E_{max})。结果:与NPC组和PC组比较,BNP组和BP组对应模型平滑肌累积加入倍他福林 $10^{-10} \sim 10^{-5}$ mol/L后的收缩率明显降低($P < 0.05$),且浓度间差异有统计学意义($P < 0.05$);倍他福林对BNP组和BP组平滑肌收缩作用的 $P_{IC_{50}}$ 分别为 7.74 ± 0.12 和 7.92 ± 0.07 , E_{max} 分别为 $(80.32 \pm 5.49)\%$ 和 100% 。与NPC组和PC组比较,RNP组和RP组对应模型平滑肌累积加入利托君 $10^{-9} \sim 3 \times 10^{-5}$ mol/L后的收缩率明显降低($P < 0.05$),且浓度间差异有统计学意义($P < 0.05$);利托君对RNP组和RP组平滑肌收缩作用的 $P_{IC_{50}}$ 分别为 7.28 ± 0.16 和 6.98 ± 0.13 , E_{max} 分别为 $(63.63 \pm 6.28)\%$ 和 $(65.48 \pm 6.93)\%$ 。结论:倍他福林和利托君均能浓度依赖性抑制未孕和妊娠大鼠离体子宫平滑肌的自发性收缩,倍他福林的抑制作用强于利托君。

关键词 倍他福林;利托君;大鼠;未孕;妊娠;子宫收缩

Effects of Betaphrine on Smooth Muscle Contraction of Rats Isolated Uterus

YAN Fei¹, DONG Zhi², HU Yue³, FU Jie-min⁴, ZENG Fan-xin⁴(1. Health Team, First Detachment, Chongqing Corps of Chinese People's Armed Police Force, Chongqing 401329, China; 2. Dept. of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Chongqing Jiangbei District Maternal and Child Care Service Centre, Chongqing 400020, China; 4. Chongqing Pharmaceutical Research Institute, Chongqing 400061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of betaphrine on smooth muscle contraction of rat isolated uterus. METHODS: The isolated uterine smooth muscles samples of non-pregnant and pregnant rats were prepared. They were divided into non-pregnant blank (NPC) group, pregnant blank (PC) group, betaphrine non-pregnant (BNP) group, betaphrine pregnant (BP) group, ritodrine non-pregnant (RNP) group and ritodrine pregnant (RP) group ($n=6$). The concentration of medicine was accumulated every 15 min in those groups; by adding betaphrine, the concentration of medicine was accumulated to 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , and 10^{-5} mol/L in BNP group and BP group, respectively; by adding ritodrine, the concentration of medicine accumulated to 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 3×10^{-5} mol/L in RNP group and RP group, respectively; no medicine was given to NPC and PC group. The range of myometrial contraction was recorded within 105 min. Myometrial contraction rate, $-\lg IC_{50}$ ($P_{IC_{50}}$) and E_{max} were measured. RESULTS: Compared with NPC group and PC group, the contraction rate of smooth muscles decreased significantly in BNP group and BP group after $10^{-10} \sim 10^{-5}$ mol/L betaphrine was added in smooth muscles of corresponding model ($P < 0.05$), there was significant difference among different concentrations of betaphrine ($P < 0.05$); $P_{IC_{50}}$ of betaphrine in BNP group and BP group were 7.74 ± 0.12 and 7.92 ± 0.07 , and E_{max} of betaphrine were $(80.32 \pm 5.49)\%$ and 100% , respectively. Compared with NPC group and PC group, the contraction rate of smooth muscles decreased significantly in RNP group and RP after $10^{-9} \sim 3 \times 10^{-5}$ mol/L ritodrine was added in smooth muscles of corresponding model ($P < 0.05$), there was significant difference among different concentrations of ritodrine ($P < 0.05$); $P_{IC_{50}}$ of ritodrine in RNP group RP group were 7.28 ± 0.16 and 6.98 ± 0.13 , and E_{max} of ritodrine were $(63.63 \pm 6.28)\%$ and $(65.48 \pm 6.93)\%$, respectively. CONCLUSIONS: Betaphrine and ritodrine can inhibit spontaneous contraction of isolated uterine smooth muscle in non-pregnant and pregnant rats, in concentration-dependent manner, and inhibitory effect of betaphrine is better than that of ritodrine.

KEY WORDS Betaphrine; Ritodrine; Rats; Non-pregnant; Pregnant; Myometrial contraction

倍他福林是一种苯乙醇胺衍生物,前期研究^[1]发现,倍他

* 药师,硕士。研究方向:药理学。电话:023-68810616。E-mail: yanfei831014@qq.com

通信作者:高级工程师,博士。研究方向:新药筛选与临床前药理毒理。电话:023-62505956-875。E-mail: zfx2806@126.com

福林与转染有荧光素酶报告基因的 β_3 -中国仓鼠卵巢细胞[稳定转染了人 β_3 -肾上腺素能受体(β_3 -Adrenergic receptor, β_3 -AR)基因的中国仓鼠卵巢细胞]共孵育,可显著提高荧光素酶报告基因的活性,其作用与异丙肾上腺素的作用相当,表明倍他福林是一种 β_3 -AR激动药。本实验以临床上常用的子宫收缩抑制

剂利托君为阳性对照药,通过研究倍他福林对大鼠离体子宫平滑肌收缩作用的影响,为将其开发成一种新型早产治疗药物提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

RM6280C多道生理信号采集处理系统、HSS-1B数字式超级恒温浴槽(成都仪器厂);JZ-101型张力换能器(高碑店市新航机电设备有限公司);CP64型电子分析天平(德国Sartorius公司);显微镜(日本奥林巴斯公司);微量移液器(美国Thermo公司)。

1.2 药品与试剂

倍他福林原料药[美国Syntech(SSPF)国际公司,批号:B101205,纯度: $\geq 98\%$];利托君原料药(美国Sigma公司,批号:68H1058,纯度: $\geq 98\%$);己烯雌酚注射液(上海通用药业股份有限公司,批号:01080202,规格:2 mg:1 ml),其余试剂为国产分析纯。

1.3 动物

SPF级Wistar大鼠,体质量200~270 g,重庆中药研究院实验动物中心提供,许可证号:SYXK(渝)2007-0004。未孕大鼠于实验前48 h皮下注射己烯雌酚2 mg/kg,人工促使大鼠处于动情前期或动情期,以提高子宫对药物的敏感性。妊娠大鼠系怀孕19~21 d的大鼠。

2 方法

2.1 De-Jalon液的配制

氯化钠9.4 g、氯化钾0.42 g、氯化钙0.06 g、碳酸氢钠0.5 g、葡萄糖0.5 g溶解至1 000 ml制成De-Jalon液;氯化钠9.4 g、氯化钾0.42 g、氯化钙0.18 g、碳酸氢钠0.5 g、葡萄糖0.5 g溶解至1 000 ml制成改良De-Jalon液。

2.2 离体子宫平滑肌标本的制备^[2]

实验时颈椎脱臼处死未孕(妊娠)大鼠,打开腹腔,迅速从子宫角和子宫颈部剪取子宫,分离周围血管、脂肪,游离出两侧子宫,沿血供侧小心纵向剖开全层子宫平滑肌(妊娠大鼠去除胎鼠及胎盘),用改良De-Jalon液洗去表面血迹后,立即置于盛有经混合气(95% O₂, 5% CO₂)饱和的改良De-Jalon液(妊娠大鼠用De-Jalon液)中。取子宫中段制成约4 mm×10 mm的全层子宫肌条3段,将标本的一端固定在标本板小钩上,置于20 ml改良De-Jalon液(妊娠大鼠用De-Jalon液)的浴槽内,另一端与肌肉张力换能器相连。恒温浴槽保持槽内温度(37±0.5)℃,不断通入混合气,标本前负荷1 g。

2.3 分组及处理

标本分为6组,分别设为未孕空白(NPC)组、妊娠空白(PC)组、倍他福林未孕(BNP)组、倍他福林妊娠(BP)组、利托君未孕(RNP)组和利托君妊娠(RP)组。NPC组、BNP组和RNP组分别为6根未孕大鼠离体子宫平滑肌条,PC组、BP组和RP组分别为6根妊娠大鼠离体子宫平滑肌条。待子宫平滑肌条出现节律性收缩15 min后,并以此时间段内平均收缩幅度作为基础值。采用累积加药的方法,每隔15 min从高浓度到低浓度向浴槽中累积加入药物。BNP组和BP组分别累积加入倍他福林至浴槽内浓度为 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L, RNP组和RP组分别累积加入利托君至浴槽内浓度为 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 3×10^{-5} mol/L, NPC组和PC组不加入任何药物。记录105 min内各时间段的收缩幅度,并以此计算给药后肌条的收缩率、半数抑制浓度(IC₅₀)的-lg值(P_{IC₅₀})和最大抑制效应(E_{max})。其中,以加药后每个时间段的平均收缩

幅度作为效应值,收缩率=效应值/基础值×100%; E_{max}=(基础值-最大浓度效应值)/基础值×100%。

2.4 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用Origin 7.5统计软件进行分析。方差分析采用t检验, $\alpha=0.05$ 。P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 倍他福林和利托君对平滑肌自发性收缩曲线的影响

结果显示,NPC组和PC组平滑肌105 min内在浴槽中保持生理活性,并呈节律性收缩。与NPC组和PC组比较,随着药物浓度的增加,倍他福林和利托君均能浓度依赖性降低未孕和妊娠大鼠离体子宫平滑肌的收缩幅度。作用于未孕大鼠子宫平滑肌条时,当倍他福林和利托君的浓度分别达到 10^{-5} mol/L和 3×10^{-5} mol/L时,子宫平滑肌仍然在收缩;而作用于妊娠大鼠子宫平滑肌条时,当倍他福林浓度达到 10^{-5} mol/L时,肌条已经停止收缩,而利托君(3×10^{-5} mol/L)作用的肌条仍然在收缩。各组大鼠平滑肌的自发性收缩幅度-时间曲线见图1。

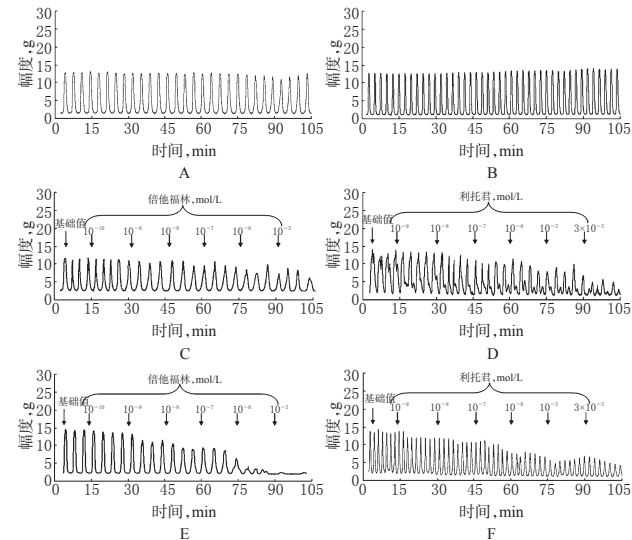


图1 各组大鼠平滑肌的自发性收缩幅度-时间曲线

A.NPC组;B.PC组;C.BNP组;D.RNP组;E.BP组;F.RP组

Fig 1 Spontaneous contraction-time curve of smooth muscle in rats of each group

A. NPC group; B. PC group; C. BNP group; D. RNP group; E. BP group; F. RP group

3.2 倍他福林和利托君对大鼠离体子宫平滑肌自发性收缩率的影响

结果显示,与NPC组和PC组比较,BNP组和BP组平滑肌累积加入倍他福林 10^{-10} ~ 10^{-5} mol/L后的收缩率明显减小(P<0.05),且浓度间差异有统计学意义(P<0.05);RNP组和RP组平滑肌累积加入利托君 10^{-9} ~ 3×10^{-5} mol/L后的收缩率明显减小(P<0.05),且浓度间差异有统计学意义(P<0.05)。提示加入倍他福林和利托君能浓度依赖性降低子宫平滑肌的收缩幅度。倍他福林对未孕和妊娠大鼠平滑肌收缩率的作用比较见表1,利托君对未孕和妊娠大鼠平滑肌收缩率的作用比较见表2。

3.3 倍他福林和利托君对大鼠离体子宫平滑肌自发性收缩抑制作用的比较

结果显示,倍他福林对未孕大鼠和妊娠大鼠子宫平滑肌收缩作用的P_{IC₅₀}分别为 7.74 ± 0.12 和 7.92 ± 0.07 , E_{max}分别为

表1 倍他福林对未孕和妊娠大鼠平滑肌收缩率的作用比较
($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Comparison of the effects of betaphrine on smooth muscle contractions in non-pregnant and pregnant rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

倍他福林浓度, mol/L	收缩率, %			
	NPC组	PC组	BNP组	BP组
	100	100		
1×10^{-10}			95.27 ± 5.37*	95.31 ± 3.24 [#]
1×10^{-9}			85.49 ± 4.75*	83.65 ± 4.29 [#]
1×10^{-8}			65.07 ± 3.68*	48.91 ± 5.27 [#]
1×10^{-7}			38.64 ± 6.09*	18.24 ± 7.85 [#]
1×10^{-6}			21.34 ± 7.52*	0 [#]
1×10^{-5}			19.68 ± 5.49*	0 [#]

与NPC组比较: * $P < 0.05$; 与PC组比较: [#] $P < 0.05$

vs. NPC group: * $P < 0.05$; vs. PC group: [#] $P < 0.05$

表2 利托君对未孕和妊娠大鼠平滑肌收缩率的作用比较
($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Comparison of the effects of ritodrine on smooth muscle contractions in non-pregnant and pregnant rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

利托君浓度, mol/L	收缩率, %			
	NPC组	PC组	RNP组	RP组
	100	100		
1×10^{-9}			94.07 ± 3.58*	94.27 ± 5.41 [#]
1×10^{-8}			85.24 ± 6.49*	87.04 ± 7.97 [#]
1×10^{-7}			58.54 ± 6.37*	64.18 ± 4.74 [#]
1×10^{-6}			46.31 ± 5.51*	47.52 ± 6.27 [#]
1×10^{-5}			38.09 ± 7.63*	34.79 ± 5.78 [#]
3×10^{-5}			36.37 ± 6.28*	34.52 ± 6.93 [#]

与NPC组比较: * $P < 0.05$; 与PC组比较: [#] $P < 0.05$

vs. NPC group: * $P < 0.05$; vs. PC group: [#] $P < 0.05$

(80.32 ± 5.49)%和100%,倍他福林对妊娠大鼠子宫平滑肌的作用要强于其对未孕大鼠子宫平滑肌收缩的作用($P < 0.05$)。而利托君对未孕大鼠和妊娠大鼠子宫平滑肌收缩作用的 $P_{IC_{50}}$ 分别为7.28 ± 0.16和6.98 ± 0.13, E_{max} 值分别为(63.63 ± 6.28)%和(65.48 ± 6.93)%。倍他福林对大鼠子宫平滑肌的作用强于利托君($P < 0.05$)。根据 IC_{50} 计算表明倍他福林的效价强度分别只有倍他福林的35%和11%。

4 讨论

利托君可用于治疗早产,虽然其疗效低且对母体和胎儿有严重的副作用^[3],但由于目前尚无其替代药物,故仍是临床常用药物。国外一些实验表明, β_3 -AR在不同的人体组织包括胃肠道、泌尿道、呼吸道、血管平滑肌系统^[4]等具有松弛平滑肌的作用。Bardou M等^[5]研究发现,在人体子宫平滑肌中也存在功能性的 β_3 -AR。倍他福林则是一种选择性 β_3 -AR激动药。本实验利用预试得到在 10^{-10} mol/L和 10^{-5} mol/L 2个剂量之间拟出等比的6个剂量组,观察倍他福林($10^{-10} \sim 10^{-5}$ mol/L)对未孕和妊娠大鼠子宫平滑肌条的作用。结果显示,倍他福林可浓度依赖性抑制未孕和妊娠大鼠离体子宫平滑肌自发性收缩幅度。

同 β_2 -AR相比, β_3 -AR在子宫平滑肌中占主导地位,且在妊娠末期的表达还会上调^[6]。由 E_{max} 结果表明,倍他福林对妊娠大鼠离体子宫平滑肌收缩的抑制作用要大于对未孕大鼠离体子宫平滑肌收缩的抑制作用,提示可能是 β_3 -AR在妊娠子宫平滑肌中的表达上调造成了这种差异。

本实验中,倍他福林对大鼠子宫平滑肌收缩作用的效价强度和 E_{max} 均大于利托君,说明倍他福林对离体子宫收缩抑制作用大于利托君。由于 β_3 -AR细胞内第三环和C端缺乏蛋白激酶A (Protein kinase A, PKA)和 β -AR激酶(β -AR kinase, β -ARK)的磷酸化位点,使得 β_3 -AR可抵抗激动药短期刺激作用导致的脱敏^[7],或抵抗激动药长期刺激导致的下调^[8]。相反, β_2 -AR在妊娠末期表达下调^[9]或不变^[10],而且在激动药刺激下容易脱敏^[11]。提示 β_3 -AR在调节子宫平滑肌舒张中所起作用可能比 β_2 -AR更大,这与本实验结果一致。

综上所述,倍他福林可抑制大鼠子宫平滑肌的自发性收缩,从而可能具有抗早产作用;其作用机制可能是由于倍他福林可激动 β_3 -AR所引起,还需作进一步深入的研究进行确证。

参考文献

- [1] 曾凡新,董志,傅洁民,等.基于报告基因检测的 β_2 肾上腺素受体激动剂筛选模型的建立与应用[J].药学服务与研究,2010,10(4):275.
- [2] Cetin A, Kaya T, Demirkoprulu N, et al. YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits the spontaneous contractions of isolated pregnant rat myometrium[J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 94(1): 19.
- [3] López Bernal A, TambyRaja RL. Preterm labour[J]. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000, 14(1): 133.
- [4] Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, et al. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta[J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 128(1): 69.
- [5] Bardou M, Loustalot C, Cortijo J, et al. Functional, biochemical and molecular biological evidence for a possible β_2 -adrenoceptor in human near-term myometrium[J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 130(8): 1 960.
- [6] Rouget C, Bardou M, Breuille-fouche M, et al. β_3 -adrenoceptor is the predominant β -adrenoceptor subtype in human myometrium and its expression is up regulated in pregnancy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(3): 1 644.
- [7] Nantel F, Bonin H, Emorine LJ et al. The human β_2 -adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization[J]. *Mol Pharmacol*, 1993, 43(4): 548.
- [8] Gauthier C, Langin D, Balligand JL. β_3 -Adrenoceptors in the cardiovascular system[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 21(11): 426.
- [9] Chanrachakul B, Matharoo-ball B, Turner A, et al. Reduced expression of immunoreactive β_2 -adrenergic receptor protein in human myometrium with labor[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(10): 4 997.
- [10] Gsell S, Eschenhagen T, Kaspereit G, et al. Apparent up-regulation of stimulatory G-protein alpha subunits in the pregnant human myometrium is mimicked by elevated smoothelin expression[J]. *FASEB J*, 2000, 14(1): 17.
- [11] Berg G, Andersson RG, Rydén G. In vitro study of phosphodiesterase-inhibiting drugs: a complement to beta-sympathomimetic drug therapy in premature labor?[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1983, 145(7): 802.

(收稿日期:2012-11-14 修回日期:2013-01-19)