

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.04.001

牛磺酸对妊娠期小鼠子宫平滑肌收缩的抑制作用*

葛万文¹,李菊香¹,袁国强^{2△},王东萍³

(1. 兰州大学第二医院妇产科,甘肃兰州 730030;2. 兰州大学第二医院神经病学研究所,甘肃兰州 730030;
3. 甘肃省人民医院血液科,甘肃兰州 730000)

[摘要] **目的** 探讨牛磺酸对缩宫素预收缩的妊娠小鼠离体子宫平滑肌收缩作用的影响。**方法** 建立小鼠离体子宫平滑肌收缩模型,观察累积加入不同水平的牛磺酸对缩宫素诱导的小鼠离体子宫平滑肌收缩的影响。高效液相色谱法检测妊娠期、足月临产小鼠子宫平滑肌中牛磺酸水平变化。**结果** 牛磺酸($5\times10^{-3}\sim4\times10^{-2}$ mol/L)对缩宫素(0.005 U/L)诱导的妊娠期小鼠离体子宫平滑肌的收缩有浓度依赖性的抑制作用,其平均最大抑制效应($E_{\max}$)值为(40.72 ± 3.69)%;牛磺酸选择性转运抑制剂β-丙氨酸(7×10^{-2} mol/L)竞争性拮抗牛磺酸对妊娠期小鼠子宫平滑肌收缩的抑制作用。牛磺酸($5\times10^{-3}\sim4\times10^{-2}$ mol/L)对未孕小鼠离体子宫平滑肌的收缩也具有浓度依赖性的抑制作用,其抑制作用弱于妊娠组, $E_{\max}$ 值为(26.63 ± 3.58)%。妊娠期小鼠子宫平滑肌中牛磺酸水平自中孕期开始显著降低,晚孕后期则逐渐回升。**结论** 牛磺酸可能通过抑制电压依赖性钙通道介导的胞外 Ca^{2+} 内流对孕鼠离体子宫平滑肌的收缩有浓度依赖性抑制作用。

[关键词] 牛磺酸;子宫;肌细胞,平滑肌;抑制作用;转运

[中图分类号] R337.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)04-0433-03

Inhibitory effects of taurine on contraction of pregnant mouse uterine smooth muscle*

Ge Wanwen¹,Li Juxiang¹,Yuan Guoqiang^{2△},Wang Dongping³

(1. Department of Gynecology and Obstetrics;2. Research Institute of Neurology,Second Hospital of Lanzhou University,Lanzhou,Gansu 730030,China;3. Department of Hematology, Gansu Provincial People's Hospital,Lanzhou,Gansu 730000,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of taurine on the contraction action of uterine smooth muscle in vitro in pregnant mouse. **Methods** The contraction model of in vitro mouse uterine smooth muscle was established. The influence of accumulated adding different levels of taurine on the oxytocin induced in vitro uterine smooth muscle contraction was observed. The change of taurine levels in isolated uterine smooth muscle was also evaluated by high-performance liquid chromatography(HPLC). **Results** Taurine ($5\times10^{-3}-4\times10^{-2}$ mol/L) had the concentration- dependently inhibiting effect on oxytocin-induced uterine smooth muscle contractions in pregnant mouse. The average maximal inhibiting effect($E_{\max}$) value was (40.72 ± 3.69)%. The taurine selective transport inhibitor beta-alanine(7×10^{-2} mol/L) competitively antagonized the inhibiting effect of taurine on the contraction action of isolated uterine smooth muscle. Taurine ($5\times10^{-3}-4\times10^{-2}$ mol/L) also concentration-dependently inhibited the contractions of isolated uterine smooth muscle from non-pregnant mouse with the $E_{\max}$ value of (26.63 ± 3.58)%,but its inhibiting effect was weaker than that of pregnant mouse. The concentration of taurine in uterine smooth muscle was significantly decreased from middle pregnancy and was gradually increased after late pregnancy. **Conclusion** Taurine has the concentration-dependent inhibiting effect on the contraction of pregnant mouse isolated uterine smooth muscle possibly via the blockage of extracellular Ca^{2+} influx mediated by potential-dependent calcium channel.

[Key words] taurine;uterus;myocytes,smooth muscle;inhibition;transport

牛磺酸(Taurine)是动物体内一种含硫β-氨基酸,它以游离氨基酸形式广泛分布于脑、视网膜、心脏、骨骼肌及子宫等组织和器官中^[1]。牛磺酸对多器官和系统有着相当重要的作用,主要参与调节神经、视觉、心血管、内分泌、免疫及生殖等系统,对维持细胞内 Ca^{2+} 稳态、调节细胞渗透压平衡及清除氧自由基等发挥着重要作用^[2-4]。已有研究证实牛磺酸对小肠、气管平滑肌具有舒张作用^[5],以此为切入点,本实验旨在研究其对缩宫素诱导的妊娠期小鼠离体子宫平滑肌收缩作用的影响,为牛磺酸作为新型保胎药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级C57BL/6小鼠100只,由兰州大学医学院实验动物中心提供。雄鼠30只,雌鼠70只,体质量25~30 g,日龄60~80 d。适应性饲养7 d,按雌(60只):雄(30只)为2:1的比例合笼交配,每晨作阴道涂片,以发现精子当天定为妊娠第0天。早孕期为孕7 d,中孕期为孕12 d,晚孕期为孕18 d,将晚孕期雌鼠用于子宫平滑肌肌张力测定。健康未孕雌鼠(10只)作为对照组。

1.1.2 药品和试剂 牛磺酸(批号TB0926)、β-丙氨酸(批号A6168),纯度大于或等于98%,均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;缩宫素注射液(5 U/mL,批号H34022980),购于安徽宏业药业有限公司;常规试剂,国产分析纯。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81341100);甘肃省自然科学基金资助项目(130RJYA033);兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金资助(861642)。作者简介:葛万文(1984—),实习研究员,硕士研究生,主要从事药物对平滑肌运动的研究。△ 通讯作者,Tel:13893292173;E-mail:yuangq06@163.com。

1.1.3 实验仪器 BL-420F 生物信号采集与分析系统(成都泰盟科技有限公司);HS-4B 精密恒温浴槽(成都仪器厂);JZ100 肌肉张力换能器(高碑店市新航机电设备有限公司);Waters1525 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。

1.2 方法

1.2.1 离体子宫平滑肌的制备 取 C57BL/6 雌性妊娠小鼠,颈椎脱臼处死,暴露腹腔,迅速剪取子宫,沿血供侧小心纵向剖开全层子宫平滑肌,去除胎鼠及胎盘,用 PBS 缓冲液清洗干净。在体视解剖镜下,将子宫内膜与平滑肌分离,制成一段约 3 mm×10 mm 子宫平滑肌肌条,得到的肌条一份立即放入盛有经混合气(95% O₂ + 5% CO₂)饱和的 37.50 °C De-Jalon 液(NaCl 9.40 g、KCl 0.42 g、NaHCO₃ 0.50 g、CaCl₂ 0.06 g、葡萄糖 0.50 g,蒸馏水稀释至 1 000 mL)的培养皿中,另一份生理盐水清洗后立即于液氮冷冻,之后 -80 °C 储存备用。

1.2.2 离体子宫平滑肌收缩模型的制备 将子宫平滑肌肌条用丝线结扎两端,下端系于 L 型通气钩上固定,置于盛有 20 mL De-Jalon 液的恒温浴槽中,上端连接张力换能器。恒温浴槽内的温度保持在(37.00±0.50)°C,并向其中匀速通入混合气体。换能器与 BL-420F 生物信号采集与分析系统相连,肌条负荷 1 g,平衡 30 min,待系统稳定后,向浴槽内加入 0.005 U/L 的缩宫素,待肌条收缩平稳,即出现规律收缩波形时,视为离体子宫平滑肌收缩模型建立成功。

1.2.3 子宫平滑肌肌张力记录 离体子宫平滑肌收缩模型建立成功后,第 1 组以累加的方式加入牛磺酸,使浴槽内药物终浓度分别为 5×10⁻³、1×10⁻²、2×10⁻²、4×10⁻² mol/L,加药间隔 15 min,记录子宫平滑肌收缩情况。第 2 组提前 15 min 添加牛磺酸转运抑制剂 β-丙氨酸(7×10⁻² mol/L),之后添加牛磺酸(4×10⁻² mol/L),记录有拮抗剂存在时子宫平滑肌收缩情况。对照组累积加入相同浓度的生理盐水,记录子宫平滑肌收缩情况。

1.2.4 妊娠期、产后和健康未孕小鼠子宫平滑肌中牛磺酸水平的测定 通过离体子宫制备法获得早孕、中孕、晚孕、产后和健康未孕小鼠的子宫平滑肌,采用柱前衍生法,以邻苯二甲醛为衍生剂,β-巯基乙醇为保护剂,应用高效液相色谱法(HPLC)测定子宫平滑肌中牛磺酸水平。

1.2.5 计算平均最大抑制效应(E_{max})值 以给药前 15 min 缩宫素(0.005 U/L)诱导的子宫平滑肌平均收缩幅度作为基础值,给予每一个药物浓度后,子宫平滑肌平均收缩幅度作为效应值。子宫平滑肌收缩抑制率(%)=(基础值-效应值)/基础值×100%,计算出 E_{max} 值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 牛磺酸对妊娠期小鼠离体子宫平滑肌收缩的影响 牛磺酸(5×10⁻³、1×10⁻²、2×10⁻²、4×10⁻² mol/L)能浓度依赖性地抑制缩宫素(0.005 U/L)诱导的妊娠小鼠子宫平滑肌的持续收缩(表 1),在浓度为 4×10⁻² mol/L 时其抑制效应达到最大,E_{max} 为(40.72±3.69)%。牛磺酸(4×10⁻² mol/L)对妊娠小鼠子宫平滑肌收缩的这种抑制作用能够被牛磺酸转运抑制剂 β-丙氨酸(7×10⁻² mol/L)拮抗,E_{max} 为(9.94±0.46)%。

2.2 牛磺酸对未孕小鼠离体子宫平滑肌收缩的影响 不同浓度牛磺酸(5×10⁻³、10⁻²、2×10⁻²、4×10⁻² mol/L)能剂量依赖性地抑制缩宫素(0.005 U/L)引起的未孕小鼠子宫平滑肌的持续性收缩(表 2),E_{max} 为(26.63±3.58)%。但牛磺酸

对未孕小鼠的这种抑制作用要弱于对妊娠期小鼠子宫平滑肌的抑制,见图 1。

表 1 不同浓度牛磺酸对妊娠期小鼠子宫平滑肌收缩的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 8, \%$)

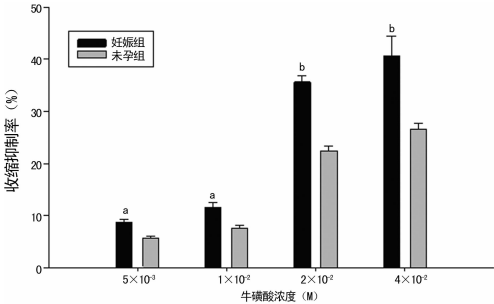
浓度(mol/L)	牛磺酸	生理盐水
5×10 ⁻³	8.66±0.66 ^a	1.11±0.05
1×10 ⁻²	11.60±0.87 ^b	1.25±0.07
2×10 ⁻²	35.69±1.19 ^b	2.18±0.08
4×10 ⁻²	40.72±1.30 ^b	1.36±0.06

^a:*P* < 0.05, ^b:*P* < 0.01,与生理盐水比较。

表 2 不同浓度牛磺酸对未孕小鼠子宫平滑肌收缩的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 8, \%$)

浓度(mol/L)	牛磺酸	生理盐水
5×10 ⁻³	5.60±0.52 ^a	1.02±0.05
1×10 ⁻²	7.55±0.52 ^a	1.17±0.04
2×10 ⁻²	22.45±0.91 ^b	1.73±0.08
4×10 ⁻²	26.63±1.16 ^b	1.56±0.05

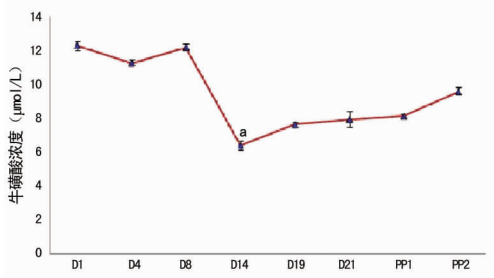
^a:*P* < 0.05, ^b:*P* < 0.01,与生理盐水比较。



^a:*P* < 0.05, ^b:*P* < 0.01,与未孕组比较。

图 1 不同浓度牛磺酸对缩宫素诱导的妊娠期、未孕小鼠子宫平滑肌收缩的影响

2.3 小鼠子宫平滑肌中牛磺酸水平测定 未孕小鼠子宫平滑肌中牛磺酸为(8.94±0.37) μmol/L,而妊娠期小鼠子宫平滑肌中牛磺酸在早孕期变化并不明显,自中孕期开始明显降低(*P* < 0.05),晚孕期后出现缓慢回升,直至足月临产(PP1)及产后(PP2)恢复到正常水平,见图 2。



^a:*P* < 0.05,与 D1~D6 比较。

图 2 牛磺酸在小鼠不同妊娠阶段子宫平滑肌中的水平

3 讨 论

牛磺酸作为人体条件性必需氨基酸,是调节机体正常生理功能、维持机体自稳态的重要细胞保护物质,近年来其研究越来越受到人们的重视^[6]。临床上已将牛磺酸用于预防性治疗心血管疾病、糖尿病等^[7-9]。但是,至今国内外尚未见牛磺酸对子宫平滑肌作用的报道。

牛磺酸通过两种途径集聚于细胞内。(1)机体自身合成,但合成能力较弱,一般不能充分满足机体自身需求;(2)通过细胞膜上牛磺酸转运体将血浆牛磺酸跨膜转运至细胞内,以保证机体所需。牛磺酸通过细胞内外转运调节机体牛磺酸生物“稳态”,以发挥其生物学效应^[10]。牛磺酸转运体(taurine transporter,TAUT)存在于细胞膜上,不同种属间具有同源性,是 Na^+ 、 Cl^- 依赖性的 Na^+ - K^+ -ATPase 供能的转运体。机体内存在多种类型的 TAUT,且各型 TAUT 分布不同,使得各组织细胞的 TAUT 摄入牛磺酸的量不同,以调节机体细胞内外牛磺酸平衡,发挥其生物学作用。目前已克隆出多种 TAUT 亚型,如从大鼠脑 cDNA 库中克隆出牛磺酸/ β -丙氨酸转运体,此转运体可转运牛磺酸和 β -丙氨酸^[11]。本实验表明,牛磺酸对缩宫素诱导的妊娠和未孕小鼠子宫平滑肌的收缩均具有浓度依赖性的抑制作用, β -丙氨酸竞争性拮抗牛磺酸对妊娠小鼠子宫平滑肌收缩的抑制作用,且对妊娠小鼠子宫平滑肌收缩的抑制作用要强于对未孕小鼠子宫平滑肌的作用。在妊娠期内子宫基本处于静息状态,只有在足月临产时才会出现高频率、高强度的收缩,这种状态的转化与子宫平滑肌细胞收缩性和兴奋性相关分子的表达有关。子宫平滑肌细胞兴奋性的高低取决于细胞膜电位,细胞膜表达的钾离子通道对膜电位的维持起着至关重要的作用,大电导钙激活钾通道(BKCa)则是妊娠子宫平滑肌细胞最主要的钾离子通道^[12-14]。缩宫素通过激活子宫平滑肌细胞膜上的电压依赖性钙通道(PDC)使 Ca^{2+} 向肌细胞内流,前列腺素作为 Ca^{2+} 载体与 Ca^{2+} 形成复合体并将其带入肌细胞内。胞内游离 Ca^{2+} 作为肌肉兴奋-收缩偶联的活化剂,与肌动蛋白、肌浆蛋白结合引起子宫收缩^[15]。牛磺酸作为机体内源性 Ca^{2+} 稳态调节剂,维持着细胞内钙稳态。牛磺酸通过激活 BKCa 通道,使 BKCa 活化, K^+ 外流,膜超极化,使电压依赖性钙通道失活,胞内 Ca^{2+} 水平下降,引起肌细胞舒张。 β -丙氨酸作为 TAUT 抑制剂,可与牛磺酸竞争性的结合 TAUT,引起细胞内牛磺酸耗竭。本实验中,预先加入的 β -丙氨酸与子宫平滑肌细胞膜上牛磺酸/ β -丙氨酸转运体相结合,竞争性抑制细胞对牛磺酸的摄取,造成牛磺酸转运障碍,使得胞内牛磺酸水平下降,减弱牛磺酸对 Ca^{2+} 的调节作用。

在不同的妊娠阶段,机体内分泌环境发生显著变化,子宫平滑肌中牛磺酸水平存在差异,早孕期胚胎刚刚形成,子宫平滑肌细胞内牛磺酸水平维持在较高水平,随着妊娠时间的增加,中孕期以后牛磺酸水平显著降低,之后则逐渐缓慢回升,表明在妊娠初期子宫平滑肌细胞通过其胞膜上的 TAUT 将牛磺酸由胞外转运至胞内,胞内高水平的牛磺酸通过抑制平滑肌的收缩为胚胎生长发育提供稳定的内环境,随着妊娠的继续进行,胚胎发育逐渐成熟,牛磺酸又经 TAUT 转运出胞外,牛磺酸水平降低,但仍处于相对稳定的水平,以保证胚胎的正常发育,预防早期流产的发生,直至足月临产后恢复到正常水平。

综上所述,本实验结果提示,牛磺酸对妊娠期小鼠子宫平滑肌的收缩具有浓度依赖性的抑制作用, β -丙氨酸对牛磺酸舒张子宫平滑肌作用的拮抗效应提示牛磺酸的舒张作用与其跨细胞膜转运有关,可能主要通过抑制电压依赖性钙通道介导的胞外 Ca^{2+} 内流实现。牛磺酸几乎无毒性作用,无抗原性,各种给药方式均易吸收,有望成为早期妊娠时保胎的制剂,以减少孕期流产的发生。

参考文献

[1] Ripps H, Shen W. Review: taurine: a "very essential" ami-

no acid[J]. Mol Vis, 2012(18):2673-2686.

[2] Schaffer SW, Jong CJ, Ramila KC, et al. Physiological roles of taurine in heart and muscle[J]. J Biomed Sci, 2010, 17 Suppl 1:S2-5.

[3] Vrachnis N, Malamas FM, Ssifakis S, et al. The oxytocin-oxytocin receptor system and its antagonists as tocolytic agents[J]. Int J Endocrinol, 2011(2011):350546.

[4] Wu JY, Prentice H. Role of taurine in the central nervous system[J]. J Biomed Sci, 2010, 17 Suppl 1:S1-2.

[5] Yao QY, Chen DP, Ye DM, et al. Modulatory effects of taurine on jejunal contractility[J]. Braz J Med Biol Res, 2014, 47(12):1068-1074.

[6] El Idrissi A, Shen CH, L' amoreaux WJ. Neuroprotective role of taurine during aging[J]. Amino Acids, 2013, 45(4):735-750.

[7] Abebe W, Mozaffari MS. Role of taurine in the vasculature: an overview of experimental and human studies[J]. Am J Cardiovasc Dis, 2011, 1(3):293-311.

[8] Yamori Y, Taguchi T, Hamada A, et al. Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies[J]. J Biomed Sci, 2010, 17 Suppl 1:S6-8.

[9] Ito T, Schaffer SW, Azuma J. The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications[J]. Amino Acids, 2012, 42(5):1529-1539.

[10] Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB, et al. Physiological role of taurine—from organism to organelle[J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 213(1):191-212.

[11] Liu QR, Lopez-Corcuera B, Nelson H, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and beta-alanine in mouse brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(24):12145-12149.

[12] Hu XQ, Zhang L. Function and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in vascular smooth muscle cells[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(17/18):974-987.

[13] Sanborn BM, Ku CY, Shlykov S, et al. Molecular signaling through G-protein-coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium[J]. J Soc Gynecol Invest, 2005, 12(7):479-487.

[14] Gao L, Cong B, Zhang L, et al. Expression of the calcium-activated potassium channel in upper and lower segment human myometrium during pregnancy and parturition[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2009(7):27-30.

[15] Arthur P, Taggart MJ, Mitchell BF, et al. Oxytocin and parturition: a role for increased myometrial calcium and calcium sensitization? [J]. Front Biosci, 2007(12):619-633.

(收稿日期:2015-08-11 修回日期:2015-10-12)