

659-662

乙酰胆碱对人子宫颈平滑肌细胞合成肌醇 1,4,5 三磷酸的影响¹

聂桦, 魏敏杰², 高明奇, 丁小平³, 李智
(中国医科大学基础医学院药理学教研室, 沈阳 110001, 中国)

R 86 2
R 884

Effects of acetylcholine on inositol 1,4,5-triphosphate formation in cervix uteri myometrial cells of human¹

NIE Hua, WEI Min-Jie², GAO Ming-Qi, DING Xiao-Ping³, LI Zhi (Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China)

KEY WORDS cervix uteri; myometrium; atropine; acetylcholine; inositol 1,4,5-triphosphate; oxytocin

ABSTRACT

AIM: To detect inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) formation of pregnant and nonpregnant human myometrial cells induced by acetylcholine (ACh). **METHODS:** [³H] IP₃ competitive protein binding assay. **RESULTS:** Basal levels of IP₃ in pregnant and nonpregnant human myometrial cells were (82 ± 9) and (96 ± 10) nmol · g⁻¹(protein), respectively (n = 6). Incubated with ACh 50 μmol · L⁻¹ for 5 min, IP₃ reached the peak levels (109 ± 11) and (122 ± 15) nmol · g⁻¹(protein), respectively (n = 6), but difference of the increments of IP₃ in pregnant and nonpregnant women was not significant. The increased IP₃ induced by ACh was inhibited by atropine (Atr) 1 μmol · L⁻¹. **CONCLUSION:** The basal IP₃ level in pregnant cervix myometrial cells was higher than that in nonpregnant women. ACh increased the IP₃ formation.

关键词 子宫颈; 子宫肌层; 阿托品; 乙酰胆碱; 肌醇 1,4,5 三磷酸; 缩宫素

目的: 检测乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 对人妊娠与未妊娠子宫颈平滑肌细胞生物合成肌醇 1,4,5 三磷酸 (inositol 1,4,5-triphosphate, IP₃) 的影响. **方法:** [³H]IP₃ 竞争性蛋白结合实验. **结果:** 基础状态下妊娠与未妊娠子宫颈平滑肌 IP₃ 水平分别为 (82 ± 9) 和 (96 ± 10) nmol · g⁻¹(protein). ACh 50 μmol · L⁻¹ 孵育 5 min 时 IP₃ 水平达峰, 分别为 (109 ± 11) 和 (122 ± 15) nmol · g⁻¹(protein), 但对妊娠与未妊娠时的作用差异不显著. 阿托品 (Atr) 1 μmol · L⁻¹ 抑制 ACh 促 IP₃ 生成作用. **结论:** 基础状态时的妊娠妇女子宫颈平滑肌细胞 IP₃ 水平高于未妊娠妇女, ACh 促进子宫颈平滑肌细胞 IP₃ 合成.

INTRODUCTION

子宫肌属自主收缩平滑肌^[1], 深入研究其收缩的调节机制, 对于进一步阐明子宫收缩的生理机制、分娩动因及有效防治痛经、早产、足月生产时子宫乏力等妇产科疾病有重要意义. 豚鼠子宫平滑肌 M 受体激动后, 使细胞内 IP₃ 水平升高, 细胞内 Ca²⁺ 从钙库中释放增加, 从而激活 Ca²⁺ 依赖性钙调蛋白的肌球蛋白轻链激酶, 使其磷酸化, 引起子宫平滑肌收缩^[2], 表明 IP₃ 是子宫平滑肌某些膜受体兴奋引起 [Ca²⁺]_i 增加信号转导过程中重要的第二信使^[3]. 因此, 准确、特异地检测细胞内 IP₃ 生成量是阐明膜磷脂代谢及 [Ca²⁺]_i 调节机制的重要指标. 但迄今为止, 有关人子宫平滑肌 M 受体激动后, 肌醇磷脂信号系统的变化尚未见报道. 本实验室曾对人子宫平滑肌 M 受体的分布、亚型及数目等进行了较系统的研究^[4-6]. 本

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39600178.

² Correspondence to Prof WEI Min-Jie. Phn 86-24-386-3731. Fax 86-24-2387-5539. E-mail zli@iris.cmu.edu.cn

³ Now in No 202 Hospital of the People's Liberation Army of China, Shenyang 110003, China.

Received 1997-10-19

Accepted 1998-12-10

实验拟在此基础上探讨 M 受体激动后膜肌醇磷脂代谢中的重要产物 IP₃ 水平的变化, 并比较妊娠与未妊娠时的异同, 为进一步阐明人子宫平滑肌收缩的作用机制提供实验依据。

MATERIALS AND METHODS

标本 未妊娠子宫平滑肌取自人子宫肌瘤患者手术切除的子宫非瘤体部位。妊娠子宫平滑肌取自人足月妊娠(妊娠 38-42 周)行剖宫产手术产妇, 取时沿手术切口边缘的子宫峡部上缘平行于切口取 10 mm × 30 mm 的肌条。有关妊娠妇女子宫平滑肌标本的临床资料见 Tab 1。

Tab 1. Clinical data.

Pregnant women	Age/a	Gestation/wk
1	25	39
2	29	38
3	24	42
4	30	39
5	33	38
6	26	41

试剂 [³H] 肌醇三磷酸测试系统 {D-myoinositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)-[³H] assay system, code TRK 1000, standard, range 0.19 - 25 pmol/tube, tracer, [³H] IP₃-28 kBq; binding protein and assay buffer}, 缩宫素 (oxytocin, Oxy), 阿托品 (atropine, Atr) 和 N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 购自 Sigma 公司, 氯化乙酰胆碱为上海生化试剂三厂产品, 其它为分析纯试剂。

标本反应过程 按照 Pijuan V^[7] 等实验方法, 在冰浴下, 迅速将子宫平滑肌切成 12 mm × 2 mm × 2 mm 的肌条, 将制备好的标本放入盛有 2 mL Hanks 液的试管中, 试管置于 37 °C 恒温振荡水浴, 向试管内加入终浓度 LiCl 25 mmol · L⁻¹ 稳定 1 h 后, 将阿托品预处理管加入阿托品 1 μmol · L⁻¹ 预处理 10 min, 分别加入 ACh, Oxy, 反应分别于 0, 1, 3, 5, 10 min 时用液氮中止, -70 °C 保存。测 IP₃ 前将上述冷冻保存的标本, 于 0 °C 下机械研磨成粉末, 再加入 15 % (vol/vol) 冰乙酸 2 mL, 旋涡

震荡器充分混匀, 静置 5 min 后, 离心 (2 000 × g, 4 °C, 40 min, 沉淀用 Lowry 法测定蛋白含量), 然后取上清 1 mL, 加入 3 mL 水饱和乙醚, 充分混匀, 离心 (2000 × g, 4 °C, 10 min), 弃上层油相, 再加入水饱和乙醚, 离心重复三次后, 下层水相用 NaHCO₃ 2 mol · L⁻¹ 调节 pH 7.5 后, -20 °C 保存, 以备测定 IP₃ 用。

IP₃ 检测 按照 [³H] IP₃ 测试系统操作要求, 操作按 Tab 2 进行。加样后置于有 10 mL 闪烁液的液闪瓶中暗化过夜, 用 Beckman 液闪仪测放射性, 记录 cpm 值。

Tab 2. Recommended assay protocol (μL).

	TC	NSB	B ₀	Standards	Samples
Buffer	100	100	100	100	100
H ₂ O	200	-	100	-	-
Standard	-	100	-	100	-
Sample	-	-	-	-	100
Tracer	100	100	100	100	100
Binding protein	-	100	100	100	100

Vortex mix and incubate for 15 min on ice. Centrifuge, decant, resuspend pellets and count.

实验数据处理 实验数据以 $x \pm s$ 表示, 采用均数差异 t 检验法进行统计学处理。测得的 cpm 值, 按下述公式计算各标准管及样品管的 %B/B₀, 先绘出标准曲线, 求其直线回归方程。根据其直线回归方程求出各样品管的 IP₃ 浓度 (pmol/tube) 再根据测得的每一样品的蛋白含量, 求出标本中的 IP₃ 含量 (nmol/g protein)。计算各标准管及样品管的 %B/B₀ 公式如下:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Standard or sample (cpm)} - \text{NSB (cpm)}}{B_0 \text{ (cpm)} - \text{NSB (cpm)}} \times 100$$

蛋白测定根据 Lowry *et al* 法, 应用分光光度计测定各样品管的蛋白含量。

RESULTS

ACh 对 IP₃ 合成的影响 基础状态下未妊娠与妊娠子宫平滑肌中的 IP₃ 含量分别为 (82 ± 9) 和 (96 ± 10) nmol · g⁻¹ (protein), 妊娠子宫平滑肌 IP₃ 含量比未妊娠时高 (P < 0.05)。当向液槽内加

入 ACh $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 随着温育时间的延长, 未妊娠及妊娠子宫平滑肌 IP_3 合成均增加, 5 min 时达高峰, 分别增至 (109 ± 11) 和 $(122 \pm 15) \text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{protein})$ 。此时, 妊娠子宫平滑肌 IP_3 水平比未妊娠高 ($P < 0.05$) (Fig 1), 但两者 IP_3 增高的百分数与达峰值时间差异均不显著 ($P > 0.05$) (Tab 3)。

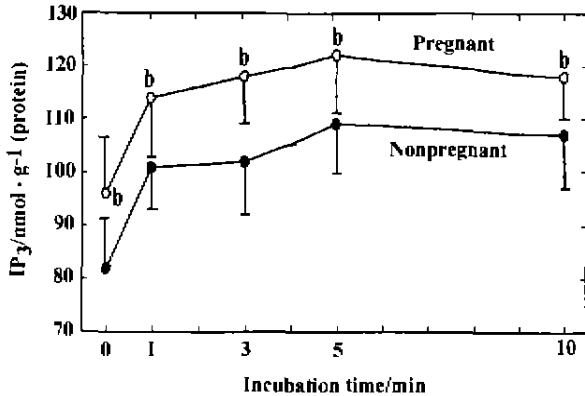


Fig 1. ACh induced accumulation of IP_3 . $n = 6$. $\bar{x} \pm s$. ^b $P < 0.05$ vs nonpregnant.

Tab 3. The increment percentage (%) of IP_3 after incubation with ACh ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). $n = 6$. $\bar{x} \pm s$. ^a $P > 0.05$ vs nonpregnant.

Time/min	Nonpregnant	Pregnant
1	20.1 ± 2.4	18.5 ± 2.1^a
3	25.3 ± 2.7	24.8 ± 2.2^a
5	27.3 ± 3.2	26.6 ± 2.9^a
10	28.6 ± 2.7	26.2 ± 2.9^a

Atr 对 ACh 引起的人子宫平滑肌 IP_3 生成的影响 以 Atr $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理子宫平滑肌标本, 再以 ACh $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 温育标本 5 min, Atr 可抑制 ACh 升高未妊娠与妊娠子宫平滑肌细胞内 IP_3 水平, 但对两者基础状态时的 IP_3 水平几乎没有影响。Oxy $200 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 使妊娠子宫平滑肌细胞内 IP_3 含量增加到 $(168 \pm 27) \text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{protein})$, 而对未妊娠子宫平滑肌细胞内 IP_3 水

平无升高作用 (Tab 4)。

Tab 4. Blocking effect of atropine (Atr) on the increment of IP_3 induced by ACh and Oxy on the accumulation of IP_3 in human myometrium. $n = 6$. $\bar{x} \pm s$. ^a $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs control, ^f $P < 0.01$ vs nonpregnant, ⁱ $P < 0.01$ vs ACh.

	IP_3 levels (nmol/g protein)	
	Nonpregnant	Pregnant
Control	81 ± 9	96 ± 10
ACh	108 ± 11^b	122 ± 15^b
Atr + ACh	83 ± 8^i	98 ± 12^i
Oxy	88 ± 13^a	168 ± 27^{cf}

DISCUSSION

本研究应用竞争性蛋白结合实验, 观察了 ACh 和 Oxy 促进人子宫平滑肌生成 IP_3 的作用, 结果表明, 基础状态下妊娠子宫平滑肌 IP_3 的含量高于未妊娠时 ($P < 0.05$)。ACh 可使子宫平滑肌中的 IP_3 升高, Atr 可阻断其 IP_3 生成作用, 说明 M 受体激动后, 子宫平滑肌 IP_3 水平升高。虽然未妊娠与妊娠相比 IP_3 水平增高百分数差异不显著, 但由于基础状态时妊娠子宫平滑肌 IP_3 水平高于未妊娠时, 所以, ACh 作用后, 妊娠子宫平滑肌 IP_3 水平高于未妊娠时。妊娠时, 调控子宫平滑肌活动的某些生理机制发生变化。如: 雌激素水平升高, 可增加 Oxy 受体数目及敏感性^[8]。Oxy 与受体结合使 IP_3 水平升高, 基础状态下, 妊娠子宫平滑肌 IP_3 水平高于未妊娠时, 可能与上述原因有关。此外, 妊娠时子宫平滑肌细胞膜 M 受体总数增加, 且敏感性升高^[9], 当胆碱能神经兴奋时, 通常在未妊娠或妊娠早中期不能引起子宫平滑肌收缩的神经冲动, 却可导致妊娠末期时的子宫平滑肌收缩, 使胎儿压迫子宫颈反射性地引起 Oxy 分泌增加, 从而启动子宫平滑肌的规律性收缩, 这与本实验的 ACh 作用后妊娠子宫平滑肌 IP_3 水平高于未妊娠时的结果一致。有关人子宫平滑肌 M 受体激动后对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响及其作用机制有待进一步探讨。

REFERENCES

- 1 Fuchs AR, Fuchs F. Spontaneous motility and oxytocin response of the pregnant and nonpregnant human uterine muscle *in vitro*. *J Obstet Gynaecol Br Commonwealth* 1963; 70; 658-64.
- 2 Marc S, Leiber D, Harbon S. Carbachol and oxytocin stimulate the generation of inositol phosphates in the guinea pig myometrium. *FEBS Lett* 1986; 201; 9-14.
- 3 D'Ocon MP, Anselmi E, Villar A. Role of stored Ca^{2+} in contractions of rat uterus induced by acetylcholine; effects of preincubation with Mg^{2+} -free solution. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1987; 236; 162-70.
- 4 Wei MJ, Guo ZD, Zhang QL, Cong H, Li Z, Shang T, *et al*. The determination of subtypes of muscarinic in isthmus smooth muscle of nonpregnant human uterus. *J Chin Med Univ* 1996; 25; 118-21.
- 5 Wei MJ, Guo ZD, Nie H, Cong H, Li Z, Shang T. The study of muscarinic receptor subtypes in isthmus smooth muscle of the nonpregnant human uterus (II). *J Chin Med Univ* 1996; 25; 447-8.
- 6 Guo ZD, Wei MJ, Cong H, Zhao SH, Li Z. Distribution of muscarinic receptor of different affinities in smooth muscle of human nonpregnant uterus. *J Chin Med Univ* 1996; 25; 449-51.
- 7 Pijuan V, Litosch I. Norepinephrine stimulates the production of inositol trisphosphate and inositol tetrakisphosphate in rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156; 240-5.
- 8 Calixto JB, Rae GA. Effects of endothelins, Bay K8644 and other oxytocics in nonpregnant and late pregnant rat isolated uterus. *Eur J Pharmacol* 1991; 192; 109-16.
- 9 Nie H, Wei MJ, Guo ZD, Shang T, Cong H, Li Z. Identification of human pregnancy uterine cervix smooth muscle muscarinic receptor. *J Chin Med Univ* 1996; 25; 452-4.

(责任编辑 朱倩蓉)

Papers are welcome

Acta Pharmacologica Sinica publishes monthly original researches on all life sciences, both experimental and clinical. Reviews based primarily on the author's own research of international importance with 3-10 key words are also welcome. Manuscripts in English of full-length articles from any part of the world are welcome.

The article should be prepared in accordance with the "Information for authors" in *Acta Pharmacol Sin* 1999 Jan; 20 (1); I-VIII or the "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals" in *Ann Intern Med* 1997 Jan 1; 126 (1); 36-47.

KEY WORDS (3-10) should be selected from the latest Medical Subject Headings (MeSH) list of Index Medicus when possible. A structured abstract (no more than 250 words) contains 4 parts (AIM, METHODS, RESULTS, and CONCLUSION). Mean values must be accompanied by s (SD, not SEM). Do not include more digits in the data than are justified. Use Système International d'Unités (SI units). The statistical significance is indicated by $^aP > 0.05$, $^bP < 0.05$, $^cP < 0.01$.

Send manuscripts to Acta Pharmacologica Sinica, 294 Tai-yuan Road, Shanghai 200031, China.

<http://www.simm.ac.cn>

<http://www.chinainfo.gov.cn/periodical/zgylxb>

E-mail aps@server.shnc.ac.cn

Fax 86-21-6474-2629 or 86-21-6437-0269

Phn 86-21-6474-2629 (direct) or 86-21-6431-1833, ext 200.