

· 论著 ·

兴奋性氨基酸受体所介导细胞钙电流特征及其中 L-SOP 的作用途径

张 浚, 王 晖, 金 星 (广州军区药检所, 广东 广州 510500)

摘要 目的: 研究兴奋性氨基酸受体各亚型所介导非洲爪蟾卵母细胞跨膜电流的特征及其中 III 型受体激动剂 L-SOP 的作用途径。方法: 用异硫氰酸胍-酚-氯仿法从成年大鼠脑中提取总 RNA, 以寡聚脱氧胸苷酸纤维素亲和层析法分离出 mRNA 并注射入非洲爪蟾卵母细胞使表达, 以全细胞双电极电压钳位法灌流此卵母细胞。结果: 100 μM KA (kainate) (离子型) 产生一主峰电流后缓慢下行, 成为一稳定电流平台, 最终脱敏, 脱敏时间平均为 37.57 min。2 μM QA (quisqualate) (代谢 I 型) 产生一峰值电流后转为一持续性钙振荡或直接出现钙振荡, 振荡维持时间为 (6.72 \pm 1.33) min, 脱敏时间均随激动剂浓度的增加而缩短。0.8 mM L-SOP (L-phosphoserine) (代谢 III 型) 灌流产生规律性电流振荡, 振荡时间为 (20.17 \pm 8.47) min。此振荡电流可被代谢 I 型受体拮抗剂 L-AP₃ 所拮抗。结论: 离子型、代谢 I 型及代谢 III 型受体均产生各自特征电流模型; L-SOP 不仅是 III 型受体的激动剂, 而且是 I 型受体的弱的激动剂, 即细胞振荡电流是 L-SOP 通过 I 型受体的作用途径而产生。

关键词 非洲爪蟾卵母细胞; 信使 RNA; 兴奋性氨基酸受体; 离子型谷氨酸受体; 代谢型谷氨酸受体; KA; QA; L-SOP; Carb

中图分类号: Q25

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2008)04-0258-04

Characteristics of membrane current induced by excitory amino acid receptors and the acting way of L-SOP

ZHANG Jun, WANG Hui, JIN Xing (Institute for drug control of Guangzhou Military Area, Guangzhou 510500, China)

ABSTRACT Objective: To study the characters of membrane current of types of excitory amino acid and the acting way of Type III mGluR (metabotropic glutamate receptor) agonist — L-SOP among them. Methods: A total receptor RNA was isolated from adult rat brain by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) method. mRNA was isolated from the total RNA by oligo(dT)-cellulose chromatography, and was then micro-injected into *Xenopus* oocytes to express, through a two-microelectrode voltage clamp technique. The oocytes were refused with varieties of types of excitory amino acid. Results: 100 μM KA (kainate) (ionic glutamate receptor) induced first a peak current and then a slowly descending current, which desensitized at last. The mean maintained time was 37.57 min. 2 μM QA (quisqualate) (TYPE I mGluR) induced regulary calcium oscillation with a maintained time of (6.72 \pm 1.33) min. Both of the maintained time were shortened the agonist concentration increased. 0.8 mM L-SOP of TYPE III mGluR agonist induced a kind of disciplinary oscillation with a maintained time of (20.17 \pm 8.47) min which was also shortened with an increasing concentration, while the oscillation could be antagonized by TYPE I mGluR antagonist — L-AP₃. Conclusion: Each of these three types of glutamate amino acid receptors has its speuniquencial current mode when irritated; L-SOP is not only an agonist of TYPE III mGluR, but also a weak agonist of TYPE I, that is, its acting way of producing oscillation is through TYPE I receptor.

KEY WORDS *Xenopus* oocytes; mRNA; excitory amino acid; ionic glutamate receptors; metabotropic glutamate receptors; KA; QA; L-SOP; Carb

谷氨酸是脑神经系统中的主要兴奋性氨基酸递质, 介导许多神经系统正常活动 (如学习与记忆活动^[1]) 及疾病 (如脑缺血缺氧损伤^[2])。兴奋性氨基酸受体分为离子型与代谢型^[3]。离子型直接与离

子通道偶联介导快速兴奋, 激动剂主要有 NMDA, AMPA 及 kainate (KA); 代谢型偶联 G 蛋白, 通过细胞内信使物质的变化介导生理效应, 它又分为三型, 代谢 I 型受体偶联 G_q 蛋白, 激活 PLC, 使 PIP₂ 水解成 DG 及 IP₃, 后者引发钙振荡。主要激动剂为 1s, 3r-ACPD, quisqualate (QA), ibotenate (IBO), 拮抗剂为 L-AP₃。代谢 II 型及 III 型受体均偶联抑制性 G 蛋

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (39570827)。

作者简介: 张浚 (1970-), 女, 主管药师, 硕士研究生。E-mail: silverch@tom.com.

白(即 G_i 蛋白),前者主要激动剂有 L-CCG, ACPD, 拮抗剂为 LY307452, 后者主要激动剂有 L-phosphoserine(L-SOP), ibotenate, L-AP₄, 拮抗剂为 MAP4^[3]。

许多谷氨酸受体激活后可使细胞产生一跨膜电流,此跨膜电流由一主峰电流及随后的一稳定平台或者振荡电流组成。随着激动剂持续作用,此电流逐渐消失,即受体脱敏^[4]。为了进一步深入了解兴奋性氨基酸受体各亚型介导细胞跨膜钙电流的特征,从而为阐明兴奋性氨基酸受体钙动员机制及脱敏机制提供实验依据,为临床药物开发提供新思路,我们拟通过在非洲爪蟾卵母细胞上表达出谷氨酸受体各亚型,来达到这一研究目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 非洲爪蟾,雌性,购自中国科学院生物发育研究所, Wistar 大鼠,雌雄各半, (200 ± 20) g, 中国人民解放军第一军医大学动物实验中心提供,动物合格证号:A990301。

1.1.2 试剂 焦碳酸二乙酯(DEPC), 异硫氰酸胍, 十二烷基硫酸钠(SDS), 8-羟基喹啉, 胶原酶 A, 氨甲酰胆碱, L-phosphoserine(L-SOP) L-AP₃, Quisqualate(QA), Kainate(KA): 美国 Sigma 公司; β -巯基乙醇: 瑞士 Fluka 公司; 寡聚脱氧胸苷酸纤维素: 德国 Boehringer Mannheim 公司; 青霉素(80 万 U/支, 批号: 981209), 链霉素(100 万 U/支, 批号: 980826): 哈尔滨第三制药厂; 马血清: 购自军事医学科学院, 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 溶液 Bath 液[88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.82 mM MgCl₂, 0.33 mM Ca(NO₃)₂]; Ringer 液(5 mM Tris, 115 mM NaCl, 1 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 双蒸水配制, HCl 调 pH 至 7.6); 洗脱缓冲液[10 mM Tris-HCl(pH7.5), 1 mM EDTA, 0.05% SDS]; 载样缓冲液[20 mM Tris-HCl(pH7.5), 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS]。

1.1.4 仪器设备 电压钳仪: MVA-2 型, 中国科学院上海生理所, 示波器: V-252 型, 日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 非洲爪蟾卵母细胞的制备 将成熟的非洲爪蟾置于约 2 °C 水浴中麻醉, 下腹部切口取出卵母细胞, Barth 液洗涤 2~3 次, 置于 1 mg/mL 胶原酶 A 的 Barth 液中, 室温(约 25 °C) 孵育约 30 min, 用 Barth 液洗涤卵母细胞至少 6 次洗去胶原酶, 在连续变倍显微镜下选择成熟健康的卵母细胞, 以人工剥去卵泡细胞层, 得到单个的卵母细胞备用。

1.2.2 非洲爪蟾卵母细胞 mRNA 的注射与表达

经大鼠脑提取总 RNA 再以寡聚脱氧胸苷酸纤维素亲和层析柱分离而得的 mRNA 溶液, 通过微量注射装置倒吸入玻璃微电极(尖端口径约 20 μ m)中, 在显微镜下, 每个卵母细胞注射 mRNA 溶液 30~40 nL。注射后的卵母细胞置于含 100 u/mL 青霉素, 50 μ g/mL 链霉素和 1% 马血清的 Barth 液中, 18 °C 培养进行表达, 每天换液一次。

1.2.3 非洲爪蟾卵母细胞的药物灌流 将卵母细胞置于灌流槽中。所有用于灌流卵母细胞的药物均溶解于 Ringer's 液中, 通过底部一个 200 μ m 直径小孔的不锈钢 U 型管给药^[5]。

1.2.4 卵母细胞跨膜电流和钙振荡的检测 参照文献^[6]的方法进行。以全细胞双电极电压钳位法测定卵母细胞的跨膜电流。测定时, 所有的细胞膜电位均以双电极电压钳仪的电压电极固定膜电位于 -80 mV, 以电流电极测定跨膜电流, 经放大后, 以自动平衡记录仪记录结果。

而细胞内钙振荡的检测则采用近年来正兴起的以测定 Ca²⁺ 诱发 Cl⁻ 电流的方法^[7]来测定。由于很多细胞(包括卵母细胞)膜上都有 Ca²⁺ 敏感性 Cl⁻ 通道, 细胞内 Ca²⁺ 的变化操纵着 Cl⁻ 通道的开闭。因此 Cl⁻ 电流的振荡即代表了细胞内的钙振荡^[8]。此方法具有灵敏度高, 重现性好, 所需设备简单, 易操作, 结果可靠等优点。所以我们选用此方法来研究卵母细胞的钙振荡。

1.2.5 数据处理 以均数 ± 标准差统计有关数据。

2 实验结果

2.1 离子型谷氨酸受体介导非洲爪蟾卵母细胞膜电流的一般特征 以 100 μ M KA 连续灌流已注射 mRNA 并表达受体后的卵母细胞产生的膜电流于给药后立即出现一主峰, 随后缓慢恢复, 即脱敏, 脱敏分两相, 快速脱敏相和缓慢脱敏相, 平均经过 37.57 min 回到基线($n=16$), 脱敏时间随 KA 浓度的增加而缩短($n=16$)。见图 1-A。

2.2 代谢型谷氨酸 I 型受体所介导非洲爪蟾卵母细胞膜电流的一般特征 以 2 μ M QA 连续灌流表达受体后的卵母细胞产生的膜电流于给药后快速出现, 一般情况是, 首先出现一大主峰, 随后为相对平稳的反复振荡电流, 振荡电流逐渐减小, 最后消失(脱敏), 2 μ M QA 的平均脱敏时间为 (6.72 ± 1.33) min($n=10$)。振荡电流维持时间随 QA 浓度的增加而缩短($n=16$)。另外, 个别情况下, QA 灌流产生的膜电流没有明显的主峰, 而是直接出现相对平稳的反复振荡电流, 电流逐渐减小, 直至脱敏($n=16$)。见图 1-B。

2.3 代谢型谷氨酸 III 型受体介导非洲爪蟾卵母细胞膜电流的一般特征

2.3.1 0.8 mL-SOP 连续灌流已表达受体的卵母细胞后先出现一小的尖峰或不出现尖峰,并在 3 ~ 15 min 后出现一明显的振荡电流,电流随着 L-SOP 的不断灌流逐渐减小,最后消失(脱敏),电流模型类似于 QA 的电流图,脱敏时间一般为 $(20.17 \pm$

8.47) min ($n = 15$)。作为对照实验,我们同时观察了同一细胞分别对 Ringer's 液灌流的反应及未注射 mRNA 的细胞对 0.8 mM L-SOP 的反应,结果均无反应($n = 15$)。同一细胞稳定一段时间后,再给药,依然在一定时间后产生振荡,振荡出现时间不一定相同。振荡电流的维持时间随 L-SOP 浓度的增加而缩短($n = 12$)。见图 1-C。

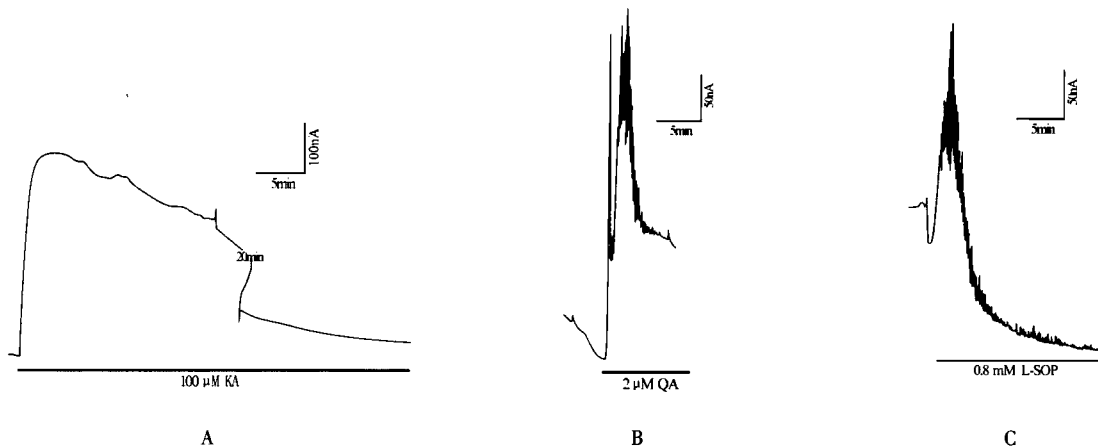


图 1 100 μ M KA (A), 2 μ M QA (B), 0.8 mM L-SOP (C) 灌流产生的电流

2.3.2 为了分析 L-SOP 引起的振荡电流是否是通过作用于 I 型受体所致,我们用 L-AP₃ 与 L-SOP 一起灌流有表达的卵母细胞。L-AP₃ 是代谢型谷氨酸 I 型受体拮抗剂,可结合于 I 型受体,拮抗 QA 的激动作用^[3]。结果是,可由 L-SOP 激发产生振荡的细胞,在 L-AP₃ 的作用下,并不产生振荡电流(图 2, $n = 16$)。见图 2。

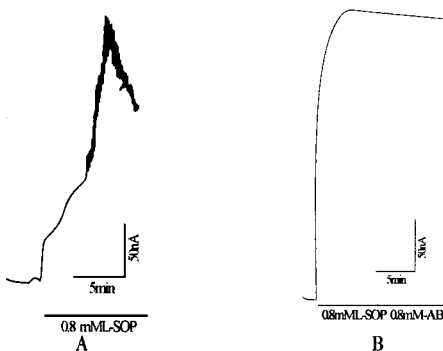


图 2 表达受体后的细胞在 L-SOP 作用下产生振荡电流 (A) 而在会同拮抗剂 L-AP₃ 时 (B) 无振荡电流

3 讨论

3.1 离子型及代谢型谷氨酸 I 型受体所介导的非洲爪蟾卵母细胞膜电流的特征 实验表明,离子型谷氨酸受体所介导的非洲爪蟾卵母细胞的跨膜电流为出现一主峰后缓慢回复到基线,即产生脱敏,而代谢型谷氨酸 I 型受体被激活后所介导的非洲爪蟾卵

母细胞的跨膜电流为一主峰后产生持续性电流振荡直至最后振荡消失,即脱敏。从而证实兴奋性氨基酸受体的这两类亚型所介导非洲爪蟾卵母细胞跨膜电流的一般特征,为进一步研究其作用机制和受体间相互作用以及更实用的药物研究打下基础。

3.2 代谢型谷氨酸 III 型受体激动剂 L-SOP 所激发非洲爪蟾卵母细胞膜电流的一般特征及 L-AP₃ 对其影响 L-SOP 为代谢型谷氨酸 III 型受体激动剂,III 型受体所耦联的蛋白为 G_i 蛋白,此种蛋白没有激活 PLC 产生钙振荡的功能^[3]。而我们的实验观察到, L-SOP 灌流一段时间后,出现一很明显的振荡电流,此电流随着 L-SOP 的灌流逐渐减弱,最后消失,即脱敏。脱敏随激动剂浓度的增加而加快,符合受体脱敏的一般规律。此振荡电流是 III 型受体本身激活所致,还是 L-SOP 同时激活 I 型受体的结果? 我们用代谢型谷氨酸 I 型受体的拮抗剂 L-AP₃ 来阻断 I 型受体的激活。结果,原来可由 L-SOP 引发振荡电流的细胞在 L-SOP 与 L-AP₃ 的共同作用下,并不产生振荡。这说明 L-AP₃ 可拮抗 L-SOP 的电流振荡作用,此外,因为此振荡产生的时间较晚,而且低浓度的 L-SOP 只产生电流峰而无振荡。所以我们初步认为, L-SOP 所产生的振荡可能是因其激活了 I 型受体的结果,即 L-SOP 可能同时也是 I 型受体的弱的激动剂,即细胞钙振荡是 L-SOP 通过 I 型受体的作用途径而产生的。 (下转第 296 页)

有机相比比例较高时测定盐酸丁卡因的含量。另外,根据资料^[5],在水相中还加入 0.2% 三乙胺作为扫尾剂以改善峰形,减少脱尾。实验表明,在“2.1”项下的梯度条件下测定盐酸丁卡因和盐酸麻黄碱的含量,盐酸麻黄碱的出峰时间可在 5 ~

6min,盐酸丁卡因的出峰时间可在 30 ~ 32 min,保留时间适宜,分离度较好,空白辅料不干扰。此方法可较好地同时测定盐酸丁卡因和盐酸麻黄碱的含量,适用于有蜂蜜干扰的制剂的含量测定,在方法和技术上都有所创新。

表 2 回收率试验结果

	盐酸丁卡因					盐酸麻黄碱				
	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
	20.23	20.43	101			20.7	20.67	99.87		
80%	19.67	19.44	98.82	100.11	1.13	21.09	20.8	98.62	99.60	0.88
	20.12	20.23	100.5			20.32	20.38	100.3		
	25.69	25.89	100.8			24.59		99.94		
100%	25.69	25.89	100.8	100.66	0.19	26.33	26.1	99.13	100.05	0.98
	24.68	24.79	100.5			25.38	25.65	101.1		
	30.64	30.41	99.26			29.09	29.06	99.89		
120%	30.67	30.65	99.95	99.97	0.72	29.64	29.07	98.09	99.05	0.91
	30.4	30.61	100.7			30.17	29.92	99.18		

表 3 含量测定结果

批号	盐酸丁卡因标示含量 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	盐酸麻黄碱标示含量 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
20060828	96.09			99.48		
20061128	95.37	95.43	0.66	100.7	99.73	0.87
20061204	94.83			99.01		

参考文献:

- [1] 徐红,陆志华.复方蜂蜜滴眼液的制备和质量控制[J].中国医院药学杂志,2006,26(4):482.
- [2] 王兆龙.反相高效液相色谱法测定风寒感冒颗粒中盐酸麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J].中南药学,2006,4(4):289.
- [3] 林凯.RP-HPLC法测定麻黄中麻黄碱、伪麻黄碱和甲基麻黄碱[J].中草药,2006,37(2):283.
- [4] 徐华.高效液相色谱法快速测定疱疹灵中甲硝唑与盐酸丁卡因含量[J].中国医院药学杂志,2001,21(10):629.
- [5] 张国阳,王利.反相高效液相色谱法测定哮喘灵口服液中麻黄碱的含量[J].江苏药学与临床研究,2005,13(1):25.

收稿日期:2008-07-08

(上接第 260 页)

这是本实验对于代谢型谷氨酸 III 型受体激动剂 L-SOP 的作用方式的新发现,使我们对于其作用途径及机理有一个新认识,为其作用机制的进一步研究打下基础,并为今后关系到 L-SOP 的兴奋性氨基酸受体系列研究提供实验依据。

参考文献:

- [1] Vickery RM, Morris SH, Bindman LJ. Metabotropic glutamate receptors are involved in long-term potentiation in isolated slices of rat medial frontal cortex [J]. J Neurophysiol, 1997, 78 (6): 3039.
- [2] 袁芳,王天佑.代谢型谷氨酸受体在脑缺血缺氧损伤中的作用[J].基础医学与临床,1998,18(2):20.
- [3] Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions [J]. Neuropharmacology, 1995, 34(1): 1.
- [4] Guatteo E, Mercuri NB, Bernardi G, et al. Group I metabotropic glutamate receptors mediate an inward current in rat substantia nigra dopamine neurons that is independent from calcium mobilization [J]. J Neurophysiol, 1999, 82(4): 1974.
- [5] 陈厚昌, Gerge P HESS. 烟碱受体在非洲爪蟾卵母细胞的表达及特征 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8(2): 110.
- [6] Dascal N, Gillo B, Lass Y. Role of calcium mobilization in mediation of acetylcholine-evoked chloride currents in *Xenopus laevis* oocytes [J]. J Physiol, 1985, 366: 299.
- [7] 陈厚昌, 蒋毅萍, 陈中玉. 电压钳位法检测细胞内钙振荡 [J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(6): 504.
- [8] Parker I, Miledi R. Changes in intracellular calcium and in membrane currents evoked by injection of inositol trisphosphate into *Xenopus* oocytes [J]. Proceeding of Royal Society, 1986, 288: 307.

收稿日期:2007-07-02