



NO-cGMP通路对下丘脑钙激活钾通道的调控研究

继G蛋白的研究之后,目前关于细胞信息与调控的研究焦点是NO-cGMP信号转导系统。NO作为一种新型的、不典型递质和理想的时空信使,在神经、心血管系统和免疫系统中发挥着重要作用[1]。NO既是第一信使,又有第二信使的作用,它的作用面广,包括激活离子通道、调控磷酸二酯酶和环鸟苷酸依赖的蛋白激酶(GPK)等[2]。离子通道本身可视为相对独立的信号转导系统,它与NO-cGMP通路又有着不可分割的联系,因此,探讨这两种信号传递途径的相互作用与关联对揭示细胞信号转导机制有着重要的意义。本研究采用膜片钳技术研究NO对下丘脑神经元上钙激活钾(KCa)通道的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 新生大鼠下丘脑神经元的急性分离

1~3 d SD大鼠,雌雄不限,迅速断头取脑,分离下丘脑,切成约400~500 μm 厚的脑片,移入盛有经氧充分饱和的人工脑脊液(ACSF)中,通氧平衡30 min后,将脑片移入新鲜配置的2.5%胰蛋白酶-ACSF 3 ml中消化,15 min后取出脑片,用针头将其分离成丝状,加入2 ml ACSF液吸入离心管中,用不同管径的Pasteur管连续吹打,使细胞分散,取上部悬液加到已涂有0.1%的多聚赖氨酸盖玻片上静置30 min后,进行通道记录[3]。

1.2 溶液配制

ACSF的成分(mmol/L)为:NaCl 125、KCl 5、 NaHCO_3 20、 NaH_2PO_4 1、 CaCl_2 2、 MgSO_4 2、Glucose 10、Hepes 10;电极液与高钾浴槽液成分(mmol/L):KCl 140、NaCl 10、Hepes 10。溶液中不同自由 Ca^{2+} 浓度由不同浓度的 CaCl_2 和乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)配制,当溶液中含0.5 mmol/L EGTA, CaCl_2 为55.7、279.0、435.0和467.0 $\mu\text{mol/L}$ 时自由 Ca^{2+} 浓度分别为0.01、0.10、0.50和1.00 $\mu\text{mol/L}$,当溶液中含2 mmol/L EGTA, CaCl_2 为670.0 $\mu\text{mol/L}$ 和1.9 mmol/L时,自由 Ca^{2+} 浓度分别为0.05 $\mu\text{mol/L}$ 和5.00 $\mu\text{mol/L}$,10.00 $\mu\text{mol/L}$ 自由 Ca^{2+} 溶液由 CaCl_2 直接配制。NO提供剂为硝普钠(SNP),亚甲蓝(MB)为鸟嘌呤环化酶(GC)抑制剂。

1.3 单通道记录和资料分析

实验在倒置显微镜下进行,用微电极液压操纵器(NARISIGE)控制电极接近细胞,选取直径较小、形态一致、大小均匀、有突起的神经元进行记录,记录用玻璃微电极阻抗为8~12 $\text{M}\Omega$,封接阻抗大于5 $\text{G}\Omega$,电极分两步拉制,内灌电极液。采用内面向外式或细胞贴附式,电流经CEZ-2400型膜片钳放大器(NIHON KOHDEN0, Japan)放大,经125 kHz Labmaster DMA数据采集系统后直接输入计算机, PCLAMP电信号处理软件(Axon instrument, USA)对数据进行采样、分析和测量。

1.4 统计分析

利用SPSS 8.0统计软件进行统计学处理,用药前后之间进行自身配对t检验。I-V关系绘回归直线图,直线方程为: $y=0.169x+0.350$ 。

2 结果

2.1 KCa通道电导及电压依赖性

在急性分离的SD乳鼠下丘脑神经元上可记录到一种大电导KCa通道，在一系列不同的钳制电压下测量了单通道的电流幅度，然后将这些单通道电流幅度进行直线拟合(图1)，通道电导由拟合直线的斜率来决定，在对称高钾液中(140 mmol/L)电导为(171±14) pS(n=10)，且不存在整流现象，通道动力学分析表明通道开放概率具有轻度电压依赖性，而开放时间明显呈电压依赖性(图2)。

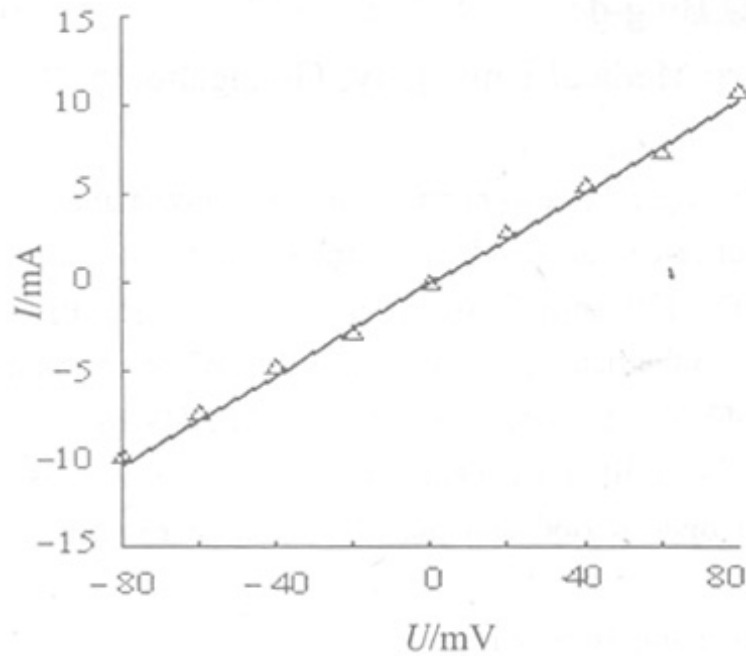


图1 浴槽液中含0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 时KCa通道的电流-电压曲线

Fig.1 I-U curve of unitary current in KCa channels in the presece of 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} in the bathing solution

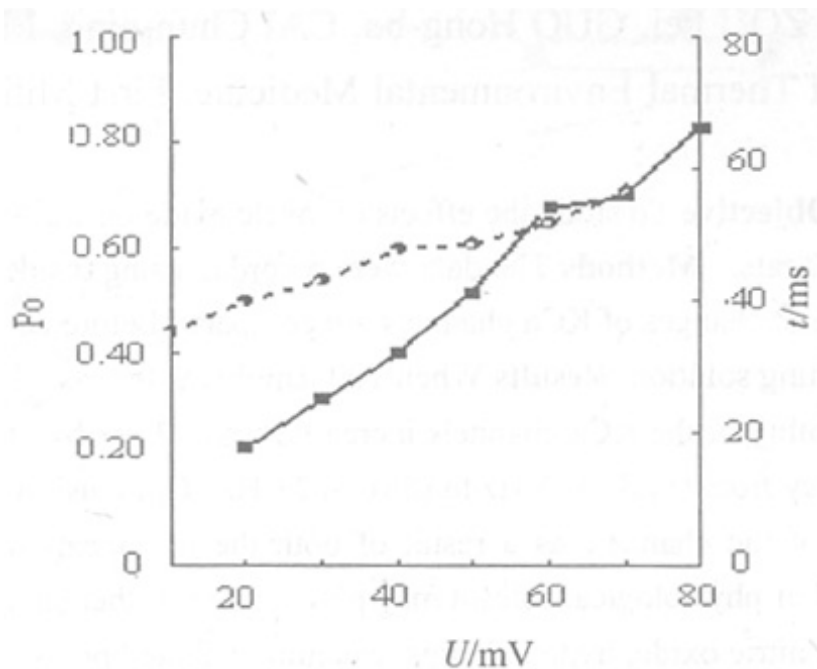


图2 浴槽液中含2 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 时开放概率(●)及开放时间(■)的电压依赖性

Fig.2 Curves of open probability(●) and open time(■) of KCa channels vs voltage in the presence of 2 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} in the bathing solution

2.2 KCa通道的 Ca^{2+} 敏感性

在内面向外式膜片的胞浆面给予不同的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ，进行记录，结果表明此KCa通道在膜电位不变的情况下，开放概率随着 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增大而增加，在膜电位为+20 mV时，随着 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 从0.01 $\mu\text{mol/L}$ 上升至10 $\mu\text{mol/L}$ ，KCa通道的开放概率由 $(1.3 \pm 1.1)\%$ ($n=10$) 上升至 $(75.2 \pm 5.8)\%$ ($n=10$) (图3)，说明此通道对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 具有高度的敏感性。

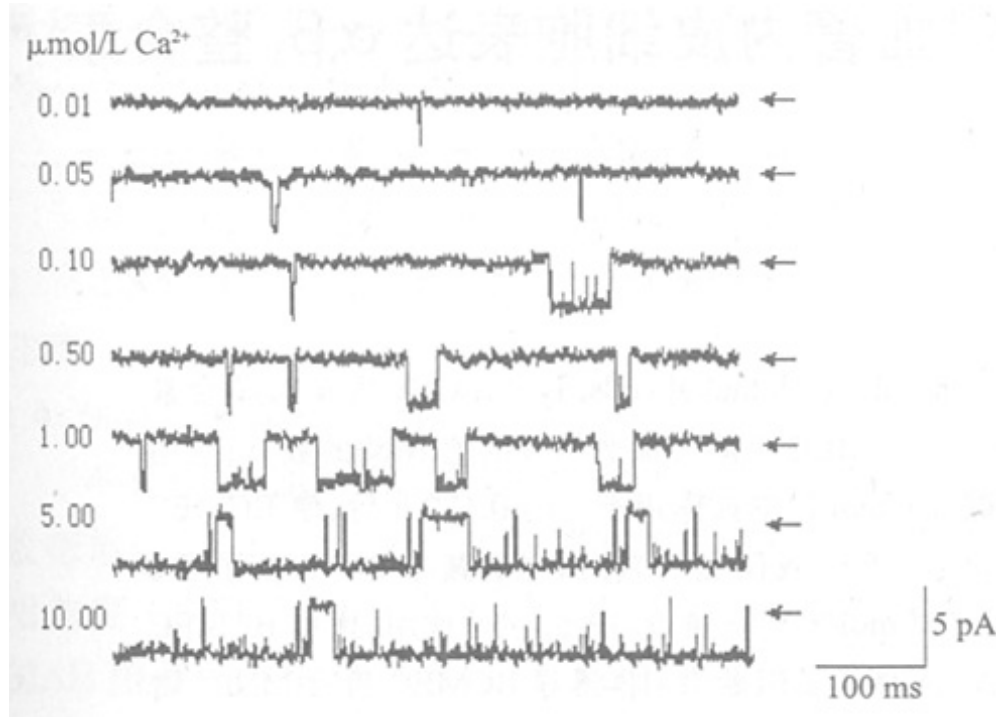


图3 膜电位为+20 mV时不同 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 对KCa通道的影响

Fig.3 Effects of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ on the channel activity at the membrane potential of +20 mV

2.3 NO对KCa通道的作用

当 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、钳制电压为+20 mV时，内面向外式时KCa的PO为 $(7.1 \pm 1.5)\%$ ，向浴槽液中加入100 $\mu\text{mol/L}$ SNP，PO为 $(7.5 \pm 2.1)\%$ ($n=10, P>0.2$)，表明NO不能直接激活KCa通道(图4B)。同样条件在细胞贴附式，100 $\mu\text{mol/L}$ SNP加入后通道PO由 $(7.3 \pm 1.5)\%$ 上升为 $(40.2 \pm 6.5)\%$ (图4C，图5) ($n=7.1 \pm 1.8$)%及 $(7.9 \pm 1.6)\%$ ($n=10, P>0.2$)，通道PO无明显改变。这说明NO对通道的激活作用是通过升高cGMP来实现的。

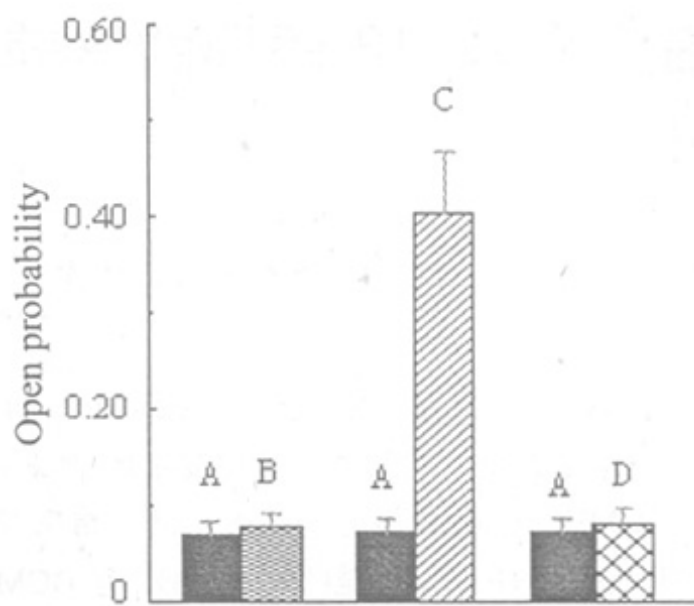


图 4 NO对通道开放概率的影响

Fig.4 Effects of NO on the open probability of the channel A: Control; B: SNP was adopted in inside-out configuration; C: SNP was adopted in cell-attached configuration; D: GC+SNP were adopted in cell-attached configuration

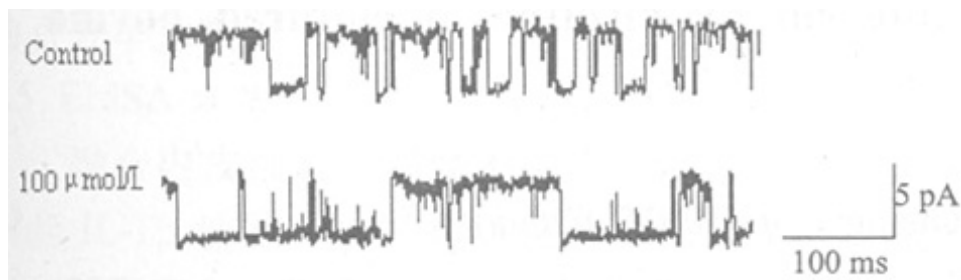


图 5 NO对通道活动的作用

Fig.5 Effects of NO on the channel activities

3 讨论

NO在神经系统作为一种神经递质并可能是神经元到突触的逆行信使，NO合酶(NOS)在神经系统中广泛分布，包括大脑皮层、海马、纹状体、下丘脑等。下丘脑是调节内脏活动的高级中枢，调节体温改变、营养摄取、水平衡、内分泌、情绪反应、生物节律等重要生理过程[4]。KCa参与神经元动作电位的复极化及后超极化[5]，它的功能变化会改变动作电位持续时间及发放频率，继而对神经系统起到调制作用而调节人体的生理功能。NO-cGMP通路对KCa的影响在多种组织平滑肌、腺体中已有报道，结果却不尽一致。Cetiner等[6]发现在培养的鸟类睫状神经节的节后神经元上，NO可通过升高cGMP抑制KCa的活动；Terluk等[7]的试验说明在大鼠主动脉平滑肌细胞上NO通过cGMP-GPK 激活KCa使平滑肌舒张；Mistry等[8]则证实NO可直接激活鼠肠系膜动脉平滑肌细胞上的KCa通道。这些实验结果说明在不同组织中两种信号通路相互作用方式可能也不相同。本试验发现在下丘脑神经元中，NO不能直接激活KCa而是通过升高cGMP来实现的，这可能是由于GPK对通道丝氨酸或苏氨酸进行了磷酸化修饰[9]。NO-cGMP通路对下丘脑KCa的激活作用机制还有待于进一步研究。

参考文献：

[1] 刘景生. 细胞信息与调控[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1998. 272-

3.

[2] Abdullah K, Docherty JR. Comparison of the effects of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and potassium channel inhibition on vascular contractions in vitro in the rat[J]. *J Auton Pharmacol*, 1999, 19(5): 263-6.

[3] 邹飞, 高天明, 陈培熹. 适用于膜片钳研究的成年大鼠脑神经元急性分离法[J]. *中国应用生理学杂志*, 1995, 11(1): 79-82.

[4] Quigg M, Clayburn H, Straume M, et al. Hypothalamic neuronal loss and altered circadian rhythm of temperature in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy[J]. *Epilepsia*, 1999, 40(12): 1688-96.

[5] Hicks GA, Marrion NV. Ca^{2+} -dependent inactivation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channels in rat hippocampal neurones produced by pore block from an associated particle[J]. *J Physiol Lond*, 1998, 508(Pt3): 721-34.

[6] Cetiner M, Bennett MR. Nitric oxide modulation of calcium-activated potassium channels in postganglionic neurones of avian cultured ciliary ganglia[J]. *Br J Pharmacol*, 1993, 110(3): 995-1002.

[7] Cetiner M, Bennett MR. Nitric oxide modulation of calcium-activated potassium channels in postganglionic neurones of avian cultured ciliary ganglia. *Br J Pharmacol*, 1993, 110(3): 995-1002.

[8] Mistry D, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery[J]. *Br J Pharmacol*, 1998, 124(6): 1131-40.

[9] Tian L, Knaus HG, Shipston MJ. Glucocorticoid regulation of calcium-activated potassium channels mediated by serine/threonine protein phosphatase[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(22): 13531-6.

参考文献:

[1] 刘景生. 细胞信息与调控[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 272-3.

[2] Abdullah K, Docherty JR. Comparison of the effects of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and potassium channel inhibition on vascular contractions in vitro in the rat[J]. *J Auton Pharmacol*, 1999, 19(5): 263-6.

[3] 邹飞, 高天明, 陈培熹. 适用于膜片钳研究的成年大鼠脑神经元急性分离法[J]. *中国应用生理学杂志*, 1995, 11(1): 79-82.

[4] Quigg M, Clayburn H, Straume M, et al. Hypothalamic neuronal loss and altered circadian rhythm of temperature in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy[J]. *Epilepsia*, 1999, 40(12): 1688-96.

[5] Hicks GA, Marrion NV. Ca^{2+} -dependent inactivation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channels in rat hippocampal neurones produced by pore block from an associated particle[J]. *J Physiol Lond*, 1998, 508(Pt3): 721-34.

[6] Cetiner M, Bennett MR. Nitric oxide modulation of calcium-activated potassium channels in postganglionic neurones of avian cultured ciliary ganglia[J]. *Br J Pharmacol*, 1993, 110(3): 995-1002.

[7] Cetiner M, Bennett MR. Nitric oxide modulation of calcium-activated potassium channels in postganglionic neurones of avian cultured ciliary ganglia. *Br J Pharmacol*,

1993, 110(3):995-1002.

[8] Mistry D, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery[J]. Br J Pharmacol, 1998, 124(6): 1131-40.

[9] Tian L, Knaus HG, Shipston MJ. Glucocorticoid regulation of calcium-activated potassium channels mediated by serine/threonine protein phosphatase[J]. J Biol Chem, 1998, 273(22): 13531-6.

[回结果列表](#)