

胆酸盐对缝匠肌细胞静息膜电位的效应

李宏钧 李珞玮* 周汉清 李泳棠

(复旦大学生物系, 上海)

胆酸盐作为表面活性剂和净化剂在生理学和生物化学研究中曾得到广泛的应用, 但对其药理效应的细胞和分子机理了解得还很不充分。Doving^[1]曾指出蛙的嗅上皮细胞对胆酸盐有特殊的敏感性。Wu 和 Sides 以及 Narahashi 等人^[2-4]研究乌贼巨纤维时证明, 脱氧胆酸盐(DOC)可以高效率地同膜的钠离子通道结合, 改变动作电位的幅度和时程。我们在皮肤上皮细胞方面的工作^[5], 也发现胆酸盐对蟾蜍的跨皮静息电位(Transepithelial potential)有明显的增强作用, 但由于皮肤的结构比较复杂, 因此本文以蟾蜍缝匠肌为材料, 膜静息电位(RMP)为指标对胆酸盐的生物效应作了进一步考察, 通过胆酸盐对肌细胞透性和电位的影响, 了解它同膜结构成分相互作用特点和有关离子跨膜输运行为等情况。

方法和材料

实验以中华蟾蜍(*Bufo bufo gerganizans*)为材料, 雌雄兼有, 体重一般在 30—60g 之间。缝匠肌的剥制按常规进行, 所得标本置任氏液内平衡 20 分钟以消除损伤电流的干扰。然后将标本按静息长度固定在特制的有机玻璃肌槽内, 肌腹向上并浸没在任氏液中。

肌肉静息膜电位借助微电极进行细胞内记录。电极内灌 3 M KCl 溶液, 尖端直径约 1 μ m, 电阻 7—10 M Ω 。电极动作由微操纵器(Narishige SM-21)控制。电位经盐桥和 Ag-AgCl 电极引出, 并输入数字电压表显示和记录。

实验操作程序按 Moore^[6]和我们先前^[7]采用的方法, 即先测量肌肉处于任氏液内的正常静息电位值作为对照, 随后进行药物处理, 经 10—15 分钟当药物效应明显时测量膜电位的变化。通常微电极穿刺肌肉一次测三至四个细胞, 每只标本平均测 20—30(n) 个细胞, 而每种实验安排的标本总数(N)为 6—10 个。

任氏液成分比例如下: NaCl 104 m M, KCl 2.5 m M, CaCl₂ 2 m M, 葡萄糖 5 m M。溶液 pH 7.5。

实验用牛胆酸盐为包头生化制药厂产品, 质量符合国家检验标准。用这种试剂配成 2.5 m M 贮藏液放冰箱中保存, 使用时再根据实验需要进行稀释。河豚毒素系日本 Sankyo 公司产品, 预先配成 0.4 mg/l 贮存液置冰箱中备用。

实验结果

1. 不同浓度牛胆酸盐对缝匠肌细胞 RMP 的影响

为了确定蟾蜍离体缝匠肌细胞在任氏液环境中膜电位水平, 我们对不同重量(30—60 mg)

本文 1985 年 1 月 3 日收到。

* 现在工作地址: 清华大学近代生物研究所。

肌块和不同温度条件下(15—25℃)进行了测试,结果表明 RMP 值虽然在标本之间存在着差异,但同肌肉的大小无关。在一次历时 1—2 小时的实验过程中,通常环境温度变动不大($1 \pm 0.5^\circ\text{C}$),故电位水平基本上是稳定的。

按前述操作程序在测得处于任氏液内肌肉 RMP 背景水平之后,即分别用含 $20\mu\text{M}$ 和 $200\mu\text{M}$ 的胆酸盐任氏液置换肌槽内原有任氏液,处理十分钟后进行测量。现将测得数据列于表 1。

表 1 不同浓度胆酸盐溶液对蟾蜍离体缝匠肌静息膜电位的影响

对 照 (任 氏 液)			胆 酸 盐 处 理				去极化数值	P
$E_{m1}(\text{mV})$	n	N	浓 度 (μM)	$E_{m2}(\text{mV})$	n	N	$E_{m2}-E_{m1}(\text{mV})$	
-71.14 ± 3.56	66	9	20	-59.44 ± 2.60	136	9	11.70 ± 4.40	<0.02
-67.72 ± 1.68	65	9	200	-55.14 ± 1.73	112	9	12.58 ± 2.41	<0.001

从表 1 中提供的数据可见,胆酸盐处理导致缝匠肌细胞的明显去极化,膜电位减少 11—13 mV,平均下降为对照水平的 16—20%,其中尤以 $200\mu\text{M}$ 胆酸盐的作用最显著。这在一定程度上反映出膜去极化的多少同胆酸盐浓度之间有联系,但两种浓度胆酸盐的效应并非按比例增加。

2. 河豚毒素 (TTX) 对胆酸盐去极化效应的影响 (表 2)

如已指出, Wu 和 Sides 等人曾观察到脱氧胆酸盐 (DOC) 处理乌贼巨纤维产生两种类型的钠电导动力学成分: 快速变化的瞬时成分和缓慢变化的稳定成分,二者可分离出现。可以设想胆酸盐引起肌细胞的去极化作用,不仅与静息钾通道有关,而且也可能对钠通道有影响。为了查明这种关系采用了对钠通道比较专一的抑制剂河豚毒素 (TTX) 对去极化标本进行再处理。实验是在 $200\mu\text{M}$ 胆酸盐作用肌细胞的背景上叠加 $2\mu\text{M}$ TTX 或用含 $200\mu\text{M}$ 胆酸

表 2 TTX 对胆酸盐引起缝匠肌细胞去极化效应的影响

实验编号	对照 (Ringer) $E_{m1} \pm SE(\text{mV})(n)$	胆 酸 盐 处 理 ($200\mu\text{M}$)			胆酸盐 $200\mu\text{M}$ + TTX($2.0\mu\text{M}$)处理		
		$E_{m2} \pm SE(\text{mV})(n)$	$E_{m2} - E_{m1}(\text{mV})$	P	$E_{m3} \pm SE(\text{mV})(n)$	$E_{m3} - E_{m2}(\text{mV})$	P
524	$-80.77 \pm 1.36(12)$	$-78.88 \pm 1.98(10)$	1.98 ± 2.34	0.5	$-86.08 \pm 2.07(10)$	-7.20 ± 2.86	0.05
525	$-82.44 \pm 2.66(10)$	$-61.91 \pm 1.78(7)$	20.53 ± 3.532	0.001	$-68.80 \pm 1.94(8)$	-6.89 ± 2.66	0.05
526	$-84.83 \pm 1.81(8)$	$-60.36 \pm 2.53(10)$	4.47 ± 3.27	0.001	$-62.78 \pm 1.25(9)$	-2.42 ± 2.92	0.3
527	$-81.13 \pm 2.96(9)$	$-57.67 \pm 2.98(11)$	25.46 ± 4.252	0.001	$-69.24 \pm 1.22(9)$	-11.57 ± 3.49	0.01
528	$-73.01 \pm 2.41(8)$	$-51.12 \pm 1.33(10)$	1.89 ± 2.61	0.001	$-61.72 \pm 3.84(9)$	-10.60 ± 3.89	0.02
529	$-80.00 \pm 2.58(12)$	$-65.34 \pm 3.18(8)$	14.66 ± 4.09	0.01	$-73.03 \pm 1.37(9)$	-7.69 ± 3.32	0.05
530	$-78.15 \pm 2.55(8)$	$-60.64 \pm 2.71(9)$	17.51 ± 3.75	0.001	$-65.41 \pm 0.62(12)$	-4.77 ± 2.44	0.1
531	$-73.32 \pm 1.68(11)$	$-63.83 \pm 1.88(12)$	9.49 ± 2.54	0.005	$-79.62 \pm 1.96(9)$	-15.79 ± 2.76	0.001
532	$-71.95 \pm 3.37(11)$	$-57.57 \pm 1.49(9)$	14.38 ± 1.83	0.005	$-58.89 \pm 0.19(12)$	-1.32 ± 1.51	0.5
平均 $\pm SE$	-78.62 ± 1.60	-61.92 ± 2.53	16.70 ± 2.53	0.001	-69.51 ± 2.95	-7.59 ± 1.52	0.001

注: n 为穿刺细胞的数目。

表3 TTX($2.0\mu\text{M}$) 直接作用于缝匠肌细胞对 RMP 的影响

实验编号	对照(任氏液) $E_{m1} \pm SE(\text{mV})(n)$	TTX 处理 $E_{m1} \pm SE(\text{mV})(n)$	RMP 的变化 $E_{m1} - E_{m2}(\text{mV})$	P
601	$-70.12 \pm 1.74(12)$	$-67.09 \pm 3.45(10)$	3.03 ± 3.67	<0.5
602	$-71.43 \pm 1.97(10)$	$-74.95 \pm 4.41(8)$	-3.52 ± 4.49	<0.5
603	$-69.05 \pm 2.87(11)$	$-59.88 \pm 2.13(9)$	9.57 ± 3.72	<0.05
604	$-73.66 \pm 3.44(7)$	$-72.94 \pm 4.09(9)$	0.72 ± 5.34	<0.4
605	$-69.93 \pm 2.22(8)$	$-65.41 \pm 1.59(11)$	4.52 ± 2.65	<0.2
606	$-70.87 \pm 0.98(10)$	$-64.25 \pm 2.35(13)$	6.62 ± 2.83	<0.05
607	$-75.25 \pm 1.89(14)$	$-75.64 \pm 2.29(9)$	-0.39 ± 2.99	<0.1
608	$-76.88 \pm 2.79(9)$	$-75.51 \pm 1.72(10)$	1.37 ± 3.20	<0.5
平均 $\pm SE$	-72.15 ± 1.00	-69.46 ± 2.14	2.74 ± 3.61	<0.5

注: E_{m1} 为 TTX 处理后细胞的 RMP 值。

盐和 $2\mu\text{M}$ TTX 的任氏液置换,处理十余分钟后测量 RMP 的变化。

有关数据表明,由胆酸盐引起的肌细胞 RMP 下降达 16.7mV ,大体相当对照水平的 20%,

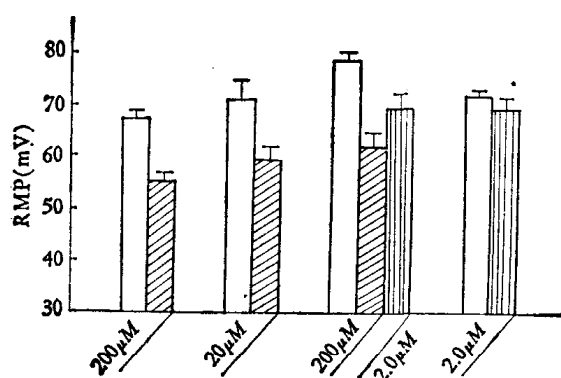


图1 不同浓度胆酸盐溶液对肌细胞 RMP 的影响以及 TTX 对胆酸盐效应的作用

□对照(任氏液); ▨胆酸盐(BS); ▤河豚毒素(TTX)

为超极化,而其余部分则无甚反应。因此就全部实验的 P 值看,可以认为 TTX 对静息肌细胞的电活动无显著影响。

根据表1、表2和表3中提供的实验均值数据绘制的直方图如图1所示。

讨 论

有关净化剂对细胞透性和电活动的影响前人工作曾有报道。例如, Kishimoto 和 Adelman^[8] 研究过不同类型净化剂对乌贼巨纤维电行为的作用,发现阳离子净化剂(如十六烷三甲基氯化铵)或阴离子净化剂(如甲基苯磺酸盐)均对兴奋膜有去极化作用,可以通过降低钠电导和钾电导减弱内向 Na 流和外向 K 流,提高兴奋阈值。

Wu 和 Sides 等人则比较系统地研究了脱氧胆酸盐(DOC)对乌贼神经轴突兴奋过程的影响,认为 DOC 能高效率地同 Na 离子通道,特别是同快通道结合,改变动作电位的幅度和时程。

但上述工作均未深入涉及这些药物对静息膜的作用.我们着重研究了胆酸盐对非兴奋膜(皮肤上皮细胞)^[5]和兴奋膜(肌细胞)静息状态的效应.本文主要报道胆酸盐对蟾蜍缝匠肌细胞 RMP 的影响和机理.实验结果表明:牛胆酸盐对肌细胞膜静息电位有强烈的去极化作用,去极化程度与胆酸盐的浓度有关. $2\mu\text{M}$ 胆酸盐作用的效应很不一致,电位变化的起伏较大(有关数据未列出),而当用 $20\mu\text{M}$ 胆酸盐处理肌肉时,细胞膜即出现稳定的去极化, RMP 值减少达十余毫伏,平均下降率约为对照水平的 10—16%,当浓度提高到 $200\mu\text{M}$ 时膜电位削弱更多,平均下降幅度达 18—20% (表 1);但药物浓度同效应之间不成比例,当胆酸盐浓度增加 10 倍,而 RMP 去极化值只增加 2—4%. 这似乎意味着胆酸盐同膜受体点的结合有一定限度, $20\mu\text{M}$ 胆酸盐浓度作用已趋近饱和.

离子净化剂分子具有各种极性和非极性基团,它在溶液中与脂膜和蛋白质分子之间发生相互联系和相互作用.作为阴离子净化剂的胆酸盐引起肌细胞 RMP 去极化的原因可能主要通过两条途径.一条是由于胆酸盐分子与脂蛋白分子之间的相互作用和联结,在离子通道部位及其邻近区域产生一种屏蔽效应 (Screening effect). 这种局部电场将对离子电导起抑制作用,降低 RMP 数值.另一途径系由于胆酸盐作为一种乳化去垢剂,可以使脂蛋白膜上的孔道发生局部性扩张,增加对各种离子的透性,促进去极化过程发生.事实上有一些电压钳位实验证明,在净化剂的处理下细胞膜的漏电流明显增加^[8].

其次,我们实验结果还表明,由胆酸盐引起的肌细胞去极化现象,经 TTX 的再处理, RMP 可以得到部分的恢复,其机理不妨作以下考虑.

尽管 TTX 是一种比较专一的抑制剂,它对钠通道特别是它的瞬时成分有显著的阻遏作用,但其功能未必是绝对专一的,而仍存在非特异性方面,因此 TTX 在一定程度上也对钠通道的稳定成分起抑制作用,这就有可能防止膜的 RMP 进一步去极化,并有利于细胞膜电位的恢复.当然也可以设想胆酸盐通过与钠通道瞬时成分的结合,使原来在静息状态下对膜电位不起作用的钠通道产生某种“扰动”,导致膜的去极化,而这种“扰动”又受到 TTX 的抑制.

表 3 的统计处理表明, TTX 直接作用于静息标本对细胞的 RMP 水平并无实际影响,只有在胆酸盐处理的背景上才表现出部分复极化功能. 这就意味着 TTX 同胆酸盐之间可能存在某种拮抗作用或竞争效应. 例如,早已知道羧基改变剂可影响 TTX 与钠通道的结合.胆酸盐也是一种含羧基的化合物,在一定程度上也对 TTX 和钠通道的行为起作用,从而改变 Na 电导的方向和大小.显然要完全查明 TTX 复极化的机理,尚有待作进一步探讨,这正是本文下阶段的任务.

参 考 文 献

- [1] Doving, K. B., in *Olfaction and Behaviour in Salmonid*. (Eds. Institute of Zoophysiology, University of Oslo), Norway, 1980, 24—32.
- [2] Wu, C. H., Sides, P. J. and Narahashi, T., *Biophys. J.*, **15**(1975), part 2, 263a.
- [3] Wu, C. H. et al., *Biophys. J.*, **17**(1977), 206a.
- [4] Wu, C. H. et al., *J. Gen. Physiol.*, **76**(1980), 355.
- [5] 李宏钧、周汉清, *生物化学与生物物理进展*, 1984, 1: 53—56.
- [6] Moore, R. D., *Amer. J. Physiol.*, **236**(1979), c249.
- [7] 李咏棠、周汉清、李宏钧, *生物化学与生物物理学报*, **17**(1985), 3: 319—327.
- [8] Kishimoto, U. and Adelman, Jr. W. J., *J. Gen. Physiol.*, **47**(1964), 975.
- [9] Keynes, R. D., *Proc. Roy. Soc., Lond.*, **B220**(1983), 1—30.