

麻痹性贝毒毒素研究

I. 塔玛亚历山大藻的麻痹性贝毒毒素对运动神经末梢和全细胞钠离子通道的抑制作用研究^{*}

王云峰 于仁诚 李 钧 颜 天 周名江
(中国科学院海洋研究所)

麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)毒素由石房蛤毒素(saxitoxin, STX)及其衍生物组成,目前已发现 20 余种,在赤潮研究、分子生物学和神经生物学基础研究、医药、军事防化等方面都有应用潜力[其结构、类型和应用见本集刊王云峰等(2003)“麻痹性贝毒毒素的应用研究进展”一文]。由于 PSP 毒素的稀有来源和国际社会对 STX 交易的禁止,限制了国内 PSP 毒素应用及研究的全面深入展开,因此本文作者对 PSP 毒素进行了制备,并采用不同方法对制备的 PSP 毒素进行了研究。

PSP 毒素能够选择性地可逆抑制可兴奋膜的电压依赖钠离子通道的开放,从而阻止神经冲动的发生和传导,使神经、肌肉丧失兴奋性(Frae et al., 1986; Penzotti et al., 1998)。本文利用神经束膜下记录 and 全细胞膜片钳技术,报道了从塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)中提取的 PSP 粗毒素对小鼠运动神经末梢膜电流和 NG108-15 细胞钠离子通道的作用研究结果,并与 STX 标准毒素的作用结果进行了比较。

NG108-15 细胞是由小鼠神经母细胞瘤和大鼠胶质细胞瘤融合的杂交细胞,经分化剂分化后,显示诸如兴奋性、合成和释放乙酰胆碱、与培养肌细胞形成突触联系等多种神经细胞的基本特性(Hamprecht, 1977)和 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 等多种离子通道,已作为神经细胞模型被广泛应用于分析药物对离子通道作用的研究(Enomoto et al., 1992; Docherty et al., 1992; Shi et al., 1993; Hu et al., 1997a; Hu et al., 1997b);发育出具有 Na^+ 内流支持的锋电位(Hamprecht, 1977),该电位是分析作用于膜钠离子通道药物的好材料。

一、材料和方法

1. 对小鼠运动神经末梢钠流的影响

(1) 样本的制备及保养

实验在成年小鼠(昆明小鼠,体重 18~20 g,雌雄皆用)的离体肋间神经胸三角肌标

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4364 号。

国家高技术研究与发展计划, 8638190605 号;国家自然科学基金重大项目, 39790110 号资助;国家自然科学基金项目, 40076030 号, 39950001 号。

本实验得到中国科学院上海生理研究所施玉梁研究员的支持,特此致谢。

收稿日期: 2001 年 6 月 18 日。

本上进行。标本按 McArdle 等(1981)方法制备,由通气(95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体)的改良 Krebs 标准溶液持续灌流,灌流速度为 2~4 mL/min。为防止肌肉收缩,在整个实验过程中,灌流液始终保持一定浓度(50~100 μmol/L)的筒箭毒。该浓度范围内,筒箭毒对钠、钾流均不产生可记录到的影响。实验在室温(18~25 °C)条件下进行。

(2) 末梢膜电流的诱发和记录

用自制的玻璃毛细管吸附电极,对小鼠肋间神经进行刺激,其参数为波宽 100 μs 的阈上刺激,频率通常为 0.1 Hz(除非特别指明)。记录电极系用 GG-17 硬质玻璃管控制的玻璃微电极,内充灌 1 mol/L NaCl 溶液,电阻在 5~10 MΩ 间,用 Ag/AgCl 丝引导,参考电极为嵌入标本槽内的 Ag/AgCl 片,在放大 400 倍显微镜下,将记录电极插至表层神经束近终板的神经束膜下间隙。记录到的神经束膜下信号(perineurial signal)经微电极放大器(MEZ-8201 Nikon-Kohden, Tokyo),一路显示于双线记忆示波器(Tektronix 5113A),另一路经输入/输出(AD/DA)转换板(Digidata 1200, Axon)由计算机采样存储信号,用 Axoscope, CoralDraw 8.0 软件绘图。在 Krebs 标准溶液中记录到的典型信号是一包括朗氏结钠电流和末梢钾电流的双负相波(Brigant et al., 1982; Mallart, 1985; Tabti et al., 1989)。当在 Krebs 溶液中记录到双负峰信号并待信号稳定后,用含 50 μL/10 mL Krebs 液的 PSP 粗毒素(浓度为 1.18 nmol/L STX_{eq})和 STX 标准毒素(浓度为 3.94 nmol/L)灌流标本,观察 PSP 粗毒素及 STX 标准毒素对神经末梢 I_{Na} 的作用。

(3) 溶液和试剂

Krebs 标准溶液组成为 (mmol/L): NaCl 138.0; KCl 5.0; CaCl₂ 2.0; MgCl₂ 1.0; NaH₂PO₄ 1.0; NaHCO₃ 12.0; glucose 10.0, pH 7.2~7.4。

PSP 粗毒素由实验室培养的塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)藻细胞经超声破碎,90 °C 加热 15min 后离心取上清液而制得,其浓度为 234.7 nmol/L STX_{eq},各毒素组成和含量示于表 1;STX 标准毒素购自加拿大海洋生物研究所,作为对照,其浓度为 787 nmol/L。其余试剂均为国产分析纯试剂。

表 1 PSP 粗毒素的组成和含量

毒素组成	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	neoSTX	STX	PSP
毒素含量 nmol/L STX _{eq}	13.87	15.68	111.41	46.67	41.61	5.09	234.70
各毒素在总毒素毒性中所占比例 %	5.91	6.68	47.47	19.89	17.73	2.17	

2 对 NG108-15 细胞的钠流作用

(1) NG108-15 细胞的培养

NG108-15 细胞由日本国立生理研究所惠赠。维持细胞于分裂生长状态的标准培养液为含 10% 小牛血清、100 μmol/L hypoxanthine、1 μmol/L aminopterin、16 μmol/L thymidine 的 Dulbecco's 改良 Eagle's 溶液(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM),维持细胞于分裂生长状态。将细胞接种于细胞培养瓶中,在 37 °C 的 5% CO₂ 和 95% 空气细胞培养箱中培养,每隔 2~3d 换一次培养液,待培养瓶中的细胞长满后,便可用于传代或分化。在标准培养液的基础上,将小牛血清的浓度降为 5%,并增加 1 mmol/L 双丁基

环化单磷酸腺苷(N^6O^2 -dibutyryl adenosine $3',5$ -cyclic monophosphate, dBcAMP)置于培养液中,促使细胞分化。将用于分化的细胞按 $(1\sim4)\times 10^4$ 细胞/培养皿的密度接种于35 mm塑料培养皿中,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 的5% CO_2 和95%空气细胞培养箱中培养,每隔2~3 d换一次培养液。通常用于实验的是分化了5~9 d的细胞。

(2) 全细胞记录

实验在全细胞电压钳下进行。实验系统由倒置相差显微镜、微操纵器、灌流系统、电脑、A/D、D/A 数据输入/输出系统(Scientific Solutions, Inc.)、膜片钳压电位放大器(CBZ2300 Nikon-Kohden, Tokyo)等组成,所有实验在pClamp 5.51程序控制下进行。

灌流系统为自制的Y型灌流装置,Y型管的一个端口为直径约 $100\text{ }\mu\text{m}$ 的塑料毛细管,Y型管的另两个端口,一个浸在烧杯中的灌流溶液中,另一个联通一阀门控制的负压瓶。打开阀门可更换Y型管中的溶液。灌流液靠溶液的位差从毛细管中涌出,流速约为 0.2 mL/min 。用于实验的玻璃微电极阻抗为 $2\sim5\text{ M}\Omega$ 。

实验在室温($18\sim25\text{ }^\circ\text{C}$)下进行,将记录槽固定于倒置相差显微镜的平台上,在标准细胞外液灌流下,使灌有电极内液的电极与细胞表面接触、轻吸,使电极与细胞膜形成高阻抗封接,再吸,将细胞膜吸破,形成全细胞记录模式。观察钠流和钾流,使用的是高钾电极内液和标准细胞外液。实验在pClamp 5.51程序控制下,通过计算机控制膜片钳放大器将细胞钳位于实验所需的钳位电压(holding potential),给予细胞以所需的测试电压(testing potential),可观察测试电压诱发的细胞膜电流。实验结果由微电脑和A/D、D/A数据输入/输出系统采集、存储,作进一步分析。

在得到全细胞记录构型后,用标准细胞外液持续灌流细胞,将细胞膜电位钳于一 80 mV 。施与一组时程为 50 ms 、幅度从 -80 mV 递增至 80 mV (以 10 mV 递增)的指令方波的测试电压时,记录到激活和失活速度都较快的内向电流 I_{Na} 和激活与失活都较慢的外向电流 I_{K} 。用含 $200\text{ }\mu\text{L}/10\text{ mL}$ 细胞外液的PSP粗毒素(浓度为 $4.70\text{ nmol/L STX}_{\text{eq}}$)和STX标准毒素(浓度为 15.74 nmol/L)灌流细胞,观察PSP粗毒素及STX标准毒素对全细胞 I_{Na} 的抑制作用。

(3) 溶液和试剂

灌流细胞的标准细胞外液成分为(mmol/L): KCl , 5.0; NaCl , 145.0; MgCl_2 , 0.8; CaCl_2 , 1.8; glucose, 30.0; HEPES, 20.0。灌注电极的高钾电极内液成分为(mmol/L): KCl , 150.0; MgCl_2 , 0.8; EGTA, 10.0; HEPES, 10.0。上述溶液均以 2 mol/L NaOH 调pH至7.2。EGTA和HEPES为Sigma公司产品。PSP粗毒素和STX标准毒素同上。其余试剂均为国产分析纯试剂。

二、结 果

1. 小鼠运动神经末梢的钠离子通道实验结果

用STX标准毒素(浓度为 3.94 nmol/L)和PSP粗毒素(浓度为 $1.18\text{ nmol/L STX}_{\text{eq}}$)灌流标本,均观察到主要由钠流贡献的第一负相波逐渐减小,立即用Krebs标准溶液冲洗后,抑制可以被部分解除,信号逐渐有所恢复。图1A是用 3.94 nmol/L 的STX标准毒素

灌流下一次实验的连续记录。在 2 min 内记录的波形有明显变化, 第一个负峰明显降低, 表明钠流被明显抑制, 第二个负峰也有降低, 表明钾流也被抑制。立即用 Krebs 标准溶液冲洗 15 min, 抑制可以被部分解除, 信号逐渐有所恢复。图 1B 是用 1.18 nmol/L STXeq 的 PSP 粗毒素灌流下一次实验的连续记录。在 2 min 内记录的波形即有明显变化, 第一个和第二个负峰均明显降低, 表明钠流和钾流均被明显抑制; 在 6 min 内记录的第一个负峰已很低, 表明钠流大部分被抑制; 在 7 min、8 min 钠流已逐渐被完全抑制。钾流受到的抑制亦如此。

2 NG108-15 细胞的钠离子通道实验结果

在得到全细胞记录构型后, 用标准细胞外液持续灌流细胞, 然后用含 200 μ L/10mL 细胞外液的 PSP 粗毒素 (浓度为 4.70 nmol/L STXeq) 和 STX 标准毒素 (浓度为 15.74 nmol/L) 分别灌流细胞, 均观察到细胞的钠流被明显抑制, 而钾流的变化不大; 再用标准溶液灌流可以观察到钠电流有所恢复。图 2 是用 15.74 nmol/L 的 STX 标准毒素灌流下一次实验的连续记录。

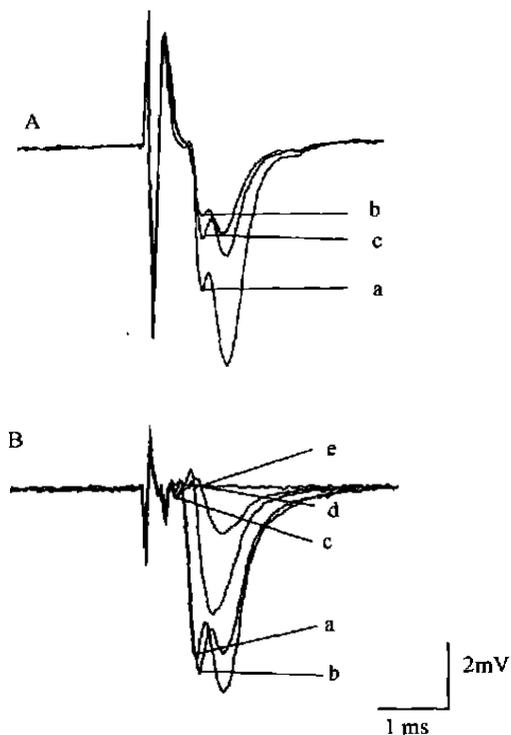


图 1 STX 标准毒素和 PSP 粗毒素对小鼠运动神经末梢钠(钾)流可逆性抑制

A: a 对照; b 加 3.94 nmol/L STX 标准毒素 2 min; c 加 3.94 nmol/L STX 标准毒素 2 min 后立即加 Krebs 标准溶液冲洗 15 min B: a 对照; b、c、d、e 分别为加 1.18 nmol/L STXeq PSP 粗毒素 2、6、7、8 min 第一个负相波代表钠离子电流, 第二个负相波代表钾离子电流

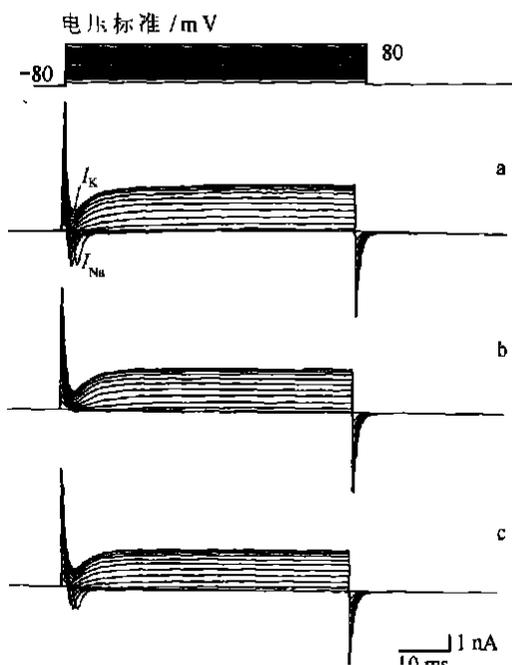


图 2 STX 标准毒素对 NG108-15 细胞钠流的可逆性抑制

a 对照; b 加 15.74 nmol/L 的 STX 标准毒素后 I_{Na} 完全消失, I_K 变化不大; c 冲洗后 I_{Na} 部分恢复

三、讨 论

神经束膜下记录是一种间接研究离子通道的方法。在 PSP 粗毒素和 STX 标准毒素对小鼠神经末梢电流的影响实验中,利用神经束膜下记录,观察到两样品对 I_{Na} 和 I_K 均有抑制。PSP 粗毒素和 STX 标准毒素对 NG108-15 细胞的钠流和钾流均有抑制作用,利用膜片钳全细胞记录,观察到细胞的钠流明显被抑制,而钾流的变化不大,与神经束膜下记录的间接结果相比,该方法直接反映了 PSP 粗毒素和 STX 标准毒素对钠离子通道的抑制作用。而在小鼠运动神经末梢观察到的 PSP 粗毒素和 STX 标准毒素对钾流的抑制,推测可能是由于 PSP 粗毒素和 STX 标准毒素对钠流的抑制导致末梢钾离子通道激活数目减少造成的继发效应。在哺乳动物中有髓纤维,钠离子通道集中于朗氏结,而在末梢的密度很低,通常末梢膜只是由最后几个朗氏结和半结的兴奋引起被动去极化,而无钠离子峰流 (Brigant et al., 1982; Mallart, 1985),因此在神经纤维的正常活动中当钠流受到抑制,势必导致由它激活的末梢钾通道数目减少,从而观察到在神经束膜下记录的第二负相波降低 (Braga et al., 1992)。在两种实验方法中,均观察到冲洗后钠流有所恢复,因而抑制是可逆的。在小鼠运动神经末梢实验中,冲洗后钠流也很难恢复到原幅度,可能是因为整体标本难以冲洗的缘故;而在全细胞实验中,冲洗后钠流比较容易恢复。

实验证明 PSP 粗毒素表现出对钠流特异性的可逆抑制作用,说明本文所述的提取方法能保留 PSP 毒素的活性。PSP 粗毒素对钠离子通道的实验中分别采用对小鼠运动神经末梢和 NG108-15 细胞钠流的抑制,观察到的结果有所差异,这种差异很可能是实验方式的差别造成的,是由于 PSP 毒素对组织和细胞的作用差异所致。

参 考 文 献

- Braga M. F. M., Anderson, A. J., Harvey, A. L., Bowan, E. G., 1992. Apparent block of K^+ currents in mouse motor nerve terminals by tetrodotoxin, μ -conotoxin and reduce external sodium. *Br. J. Pharmacol.*, 106: 91~94.
- Brigant, J. L., Mallart, A., 1982. Presynaptic current in mouse motor endings. *J. Physiol.*, 333: 619~636.
- Docherty, R. J., Robbins J., Brown, D. A., 1992. NG108-15 neuroblastoma \times glioma hybrid cell line as a model neuronal system. In: "Cellular Neurology, A Practical Approach" (Chad Wheak J., H. eds.), Oxford University Press, 75~95.
- Enomoto, K. I., Higashida, H., Maeno, T., 1992. Effects of toli-shakuyaku-san (Tsumura TJ-23) on electrical activity in neuroblastoma \times glioma cells and frog neuromuscular junctions. *Neurosci. Res.*, 15: 81~89.
- Frace, A. M., Hall, S., Brodwick, M. S., et al., 1986. Effects of saxitoxin analogues and ligand competition on sodium currents of squid axons. *Am. J. Physiol.*, 251 (*Cell Physiol.*, 20): C159~166.
- Hamprecht, B., 1977. Structural, electrophysiological, biochemical and pharmacological properties of neuroblastomaglioma cell hybrids in cell culture. *Int. Rev. Cytol.*, 49: 99~170.
- Hu, Q., Huang, F. S., Shi, Y. L., 1997a. Inhibition of tosendanin on the delayed rectifier potassium current in neuroblastoma \times glioma cells. *Brain Res.*, 751: 47~53.
- Hu, Q., Shi, Y. L., 1997b. Ion channels at neuroblastoma \times glioma NG108-15 cell and its application in analyzing the actions of bioactive substances. *Chin. J. Neurosci.*, 4: 188~193.
- Mallart, A., 1985. Electric current flow inside perineurial sheaths of mouse motor nerves. *J. Physiol.*, 368: 565~575.
- McArdle, J. J. et al., 1981. Advantages of the triangularis sterni muscle for investigation of synaptic phenomena.

J. Neurosci. Methods., 4: 109~116.

Penzotti J. L., Fozzard H. A., Lipkind G., et al., 1998, Differences in saxitoxin and tetrodotoxin binding revealed by mutagenesis of the Na⁺ channel outer vestibule *Biophys. J.*, 75(6): 2647~2657.

Shi Y. L., Furuya S., Wang W. P., et al., 1993, Toosendanin-induced Ca²⁺ conductance increase in neuroblastoma × glioma hybrid cells *Chin. Sci. Bull.*, 38: 1489~1493.

Tabti, N., Bourret, C., Mallart, A., 1989, Three potassium currents in mouse motor nerve terminals *Pflugers Arch.*, 413: 395~400.

STUDY ON PARALYTIC SHELLFISH POISONING TOXINS

I. THE INHIBITORY EFFECTS OF PARALYTIC SHELLFISH POISONING TOXINS FROM *ALEXANDRIUM TAMARENSE* ON Na⁺ CURRENTS AT MOTOR NERVE TERMINALS AND WHOLE CELL*

WANG Yunfeng, YU Rencheng, LI Jun, YAN Tian, ZHOU Mingjiang

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences*)

Abstract

Alexandrium tamarense can produce paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins that can selectively block the voltage-gated sodium channel of many excitable membranes. Here we report the effect of PSP toxins, crudely extracted from *A. tamarense*, on Na⁺ current at motor nerve terminals and whole cell. Motor nerve terminals experiments were performed on mouse triangularis sterni nerve-muscle preparations. Presynaptic currents were picked up with a microelectrode inserted into the subendothelial space of the superficial nerve bundle under visual control using a ×400 magnification water immersion objective. Patch-clamp whole cell recording configuration was used to study the effects of PSP toxins on the voltage-gated Na⁺ current of differentiated NG108-15 cells.

The results showed that the PSP toxins clearly inhibited the voltage-gated sodium current of the mouse motor nerve terminals and the whole NG108-15 cell; and that the effects were partially reversible. A dose of 1.15 nmol/L STX_{eq} PSP toxins can reversibly inhibit the voltage-gated sodium current of the mouse motor nerve terminals; a dose of 4.60 nmol/L STX_{eq} PSP toxins can reversibly inhibit the voltage-gated sodium current of the whole NG108-15 cell while no inhibition effect on potassium current was observed. At the same experiment conditions, the reversible inhibitions of our prepared PSP toxins were the same as that of the standard saxitoxin on sodium current of the mouse motor nerve terminals and the whole NG108-15 cell.

* Contribution No. 4364 from the Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences.