

P物质对大鼠星状神经节细胞的影响

Effect of Substance P on Rat Stellate Ganglion Neurones

莫宁 王鲁 陈家欢 陈美芳
Mo Ning Wang Lu Chen Jiahuan Chen Meifang

(广西医科大学药理教研室 南宁市滨湖路6号 530021)

(Dept. of Pharmacology, Guangxi Medical College, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 应用细胞内生物电记录方法,观察神经肽 P物质 (SP)对大鼠星状神经节细胞的影响,用灌流或用加压向细胞周围施加 SP可使部分细胞发生膜除极反应。用低钙或用含河豚毒素克氏液灌流神经节,并不影响 SP引起的除极反应的幅度和时程。SP引起除极反应的同时常伴有膜电阻增大。当膜电位增大时,除极化反应幅度变小,反转电位为 -80 mV 至 -100 mV ,研究表明,SP对部分星状神经节细胞具有直接兴奋作用。并且,SP对细胞膜的除极作用是由于其引起细胞膜钾导降低所致。

关键词 P物质 交感神经节 星状神经节细胞 细胞内生物电记录

Abstract Intracellular recordings were made from neurones of the isolated rat stellate ganglia. Substance P (SP) applied by superfusion or by pressure ejection elicited a slow depolarization in portion of stellate ganglion cells studied in vitro. The depolarization which persisted in a low Ca^{2+} solution or the solution containing TTX, was often associated with a increase in neuronal input resistance, and the response was reduced by membrane hyperpolarization and reversed their polarities between -80 mV and 100 mV . Our results suggest that SP is excitatory to stellate ganglion cells directly, and a reduction of membrane K^+ conductance constitutes the primary ionic mechanism underlying the depolarizing action of SP.

Key words substance P, sympathetic ganglion, stellate ganglion neurone, intracellular recording

中图法分类号 R 338.1; R -332

神经系统的信息传递是借助突触前神经末梢释放化学递质,并以兴奋或抑制的方式作用于突触后神经元来实现的。近年来发现,中枢和外周神经系统中存在多种肽类物质。它们也可能是一类中枢递质,肽类物质与经典递质可以并存于同一细胞中,P物质(SP)是最早被考虑为中枢递质的神经肽类物质之一。免疫组织化学研究表明,在交感神经节特别是在豚鼠的肠系膜下神经节含大量 SP神经纤维。在内脏神经节中也有非致密的 SP阳性纤维围绕的胞体。结扎或切断实验表明,位于脊髓背根神经节中含 SP的细胞发出轴突侧支,经过腰内脏神经与肠系膜下神经节的神经元形成突触联系存在^[1]。电生理学与药理学

研究表明,SP是哺乳动物某些交感神经节非胆碱能性缓慢兴奋性突触后电位(LSEPPS)的递质^[1,2],SP可使部分脊髓侧角细胞除极化和对快兴奋性突触后电位(FEPSP)具有易化作用^[3]。大鼠整体实验表明鞘内注射 SP,可引起血压升高和心率加快^[4,5]。星状神经节是支配心脏的交感神经节,形态学研究表明,星状神经节中部分神经元发出轴突进入从星状神经节发出的支配心脏的心脏神经^[6,7]。但是 SP对星状神经节细胞具有什么作用还不清楚。本研究是将 SP直接施加于神经节细胞,从而探索 SP对细胞的作用及其作用机理

1 方法

1.1 标本制作与灌流

实验用体重 250 g~300 g 成年大鼠。将动物急性

处死,在显微镜下将星状神经节离体并将标本迅速移至记录小室。用金属小针将神经节固定在小室底的硅胶块上。用95% O₂和5% CO₂混合气体饱和, pH值为7.4 ± 0.0的克氏液恒温(34°C ± 0.05°C),恒速(4.5 mL/min)灌流标本。克氏液的成分如下(mM): NaCl 117, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, NaH₂PO₄ 1.2, 葡萄糖 11.5^[6,8,9]。在一些实验中,使用的低钙克氏液的制备为将以上成分中的钙由2.5 mM降至0.25 mM。

1.2 细胞内生物电记录

将内充3 mM KCl,尖端阻抗30 MΩ~40 MΩ玻璃微电极固定在微电极操纵器上,用于刺入神经节细胞内作生物电记录。借电子刺激器,刺激分离器提供方波或直流电。膜电位信号经桥式前置放大器输入示波器监视,同时送笔描记录仪记录,送电子计算机存贮。

SP物质(SP),或其他化合物溶于克氏液配成所需浓度向神经节灌流。此外,在一些细胞,SP充灌于玻璃微电极(0.1 mM)用加压方法(压力为280 kPa,时程为10 ms~100 ms)向细胞周围施加。SP与其他实验用的化合物来自 Sigmar 公司。

实验数用均数 ± 标准误统计。

2 结果

2.1 SP的膜除极作用

用SP(1 μM~10 μM)灌流神经节(1 min~5 min)或用加压方法向神经周围施加,均可引起细胞膜的除极反应。在6个细胞的实验中,对这两种方法进行了比较,用加压方法引起的除极反应出现快,细胞对SP敏感性恢复较快。因此,在以下实验中,SP均用加压方法向细胞周围施加。在对35个稳定记录细胞(来自30个神经节,)加压施加SP,有25个细胞出现膜除极反应(71.4%)并常伴细胞阵发放电,除极反应幅度为3 mV~15 mV(平均6.0 mV ± 0.8 mV),除极反应时程为1 min~5 min(平均2.8 min ± 0.8 min)(图1)其余10个细胞对SP不敏感,用灌流方法对这10个细胞施加SP也不出现除极反应。在这里应指出,这10个细胞与对SP敏感的细胞具有类似的膜电位,它们分别是-50 mV ± 6.4 mV (n = 10)与, -51 mV ± 8.6 mV (n = 25)。

用低钙克氏液(n = 5)或用含河豚毒素(TTX, 1 μM, n = 4)灌流神经节的情况下,SP除极反应并未受到影响。

2.2 SP膜除极的离子基础

为了进一步探索SP膜除极的机理,我们进行了以下两组实验。第一组实验是向细胞连续输入超极化

电流脉冲,从而测量当SP除极反应时膜电阻的改变。在13个细胞的实验中,有10个细胞膜电阻在SP除极反应时可见有增加,其增加平均值为21% ± 8% (n = 10)。

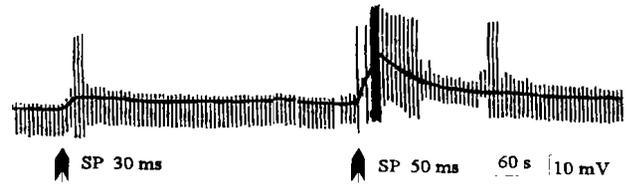


图1 加压施加SP引起的膜除极反应。用30 ms与50 ms时程施加SP引起的膜除极均引起细胞自发放电(该图取自同一细胞)。

Fig. 1 Depolarization induced by pressure application of SP. The depolarization induced by 30 ms and 50 ms ejection of SP were accompanied by intense cell discharge (both records from same cell).

第二组实验为通过前置放大器向细胞内输入直流电,使膜电位暂时改变和控制不同水平,观察SP除极反应幅度与电位的关系。在10个细胞的试验中,有8个细胞看到,SP引起的除极的幅度随着膜电位的增大而减小,随着膜电位的减小而增大,并且膜电位与除极幅度的这种关系基本上是成直线关系。反转电位为-80 mV至100 mV(平均为91.2 mV ± 3.5 mV, n = 8)图2反应某一细胞,在不同膜电位时,SP的除极幅度。其余2个细胞SP的除极反应随膜电位增大而增大。

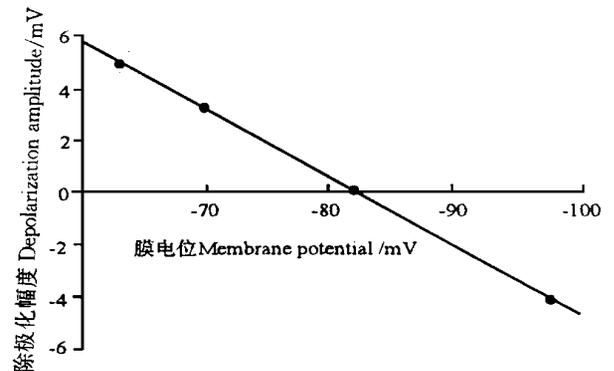


图2 膜电位与SP引起除极反应幅度的关系。该细胞的静息膜电位为-70 mV。图中可见反转电位为-83 mV。

Fig. 2 Relationship between membrane potential and the amplitude of SP-induced depolarization. The membrane potential of this cell is -70 mV. A reversal potential of -83 mV is indicated by the graph.

3 讨论

本研究观察到 SP引起细胞除极反应并起细胞放电, SP除极反应出现的时间, 除极反应的时程, 幅度与 SP和其他肽类在其他细胞引起的除极反应相似, 属缓慢除极反应^[2, 3, 10, 11, 12]。但在实验观察的细胞中, 约有三分之一的细胞对 SP不敏感。说明 SP受体只存在部分星状神经节细胞中。

SP引起的除极反应并不受低钙溶液影响, 钠通道阻断剂 TTX也不能抑制 SP的除极反应, 说明 SP是直接作用于细胞而不是通过引起其他递质的释放引起除极反应的, 因为在低钙溶液中, 递质的释放受到抑制, TTX能阻断钠孔道, 使内向钠电流消失, 从而使动作电位上升支不能形成, 冲动的传导受到抑制。

SP引起除极反应时常伴有膜电阻增大, 并当膜电位增大时除极反应的幅度变小, 当膜电位增大到 -80 mV 至 -100 mV 时 SP的除极反应消失, 并在一些细胞除极反应反转成为超极化反应, 以上结果说明 SP引起细胞膜除极的离子基础是其使细胞膜钾导降低, 而使钾外向电流减少所致, 这与 SP在其他神经元引起除极反应的离子基础相似^[1~3], 我们知道, 交感神经节细胞存在多种电压依从性钾电流^[13], 到底是使哪一种钾电流(持续钾外向电流? 瞬时电流或是非失活性钾外向电流即 M 电流?) 还需在今后实验中进一步探索。在 2 个细胞, SP除极反应随膜电位增大除极反应的幅度也增大, 而在某些细胞, SP除极反应虽随膜电位增大而减小, 但看不到反转为超极化, 这说明除钾外, SP除极时, 细胞膜对钠, 钙等其他离子通透性也可能改变。

SP引起细胞除极反应有什么生理意义呢? 在形态学上, 已发现在交感神经节中存在 SP 因而 SP 内源释放可引起细胞膜除极, 从而使细胞膜电位更接近阈电位, 而除极持续时间较长(几十秒至几分钟); 除极反应时膜电阻增大, 又使得同样的突触后膜电流可产生较大的突触后膜电位(欧姆定律), 这些因素均使得进入细胞的冲动更易叠加, 使阈下的冲动达到阈值而至细胞放电。

综上所述, 我们认为, SP能使部分星状神经节细胞兴奋, 且这一作用是 SP使细胞膜对钾离子的通透性降低所致。

- 1 Koonishi S, Tsunoo A, Otsuka M. Substance P and non-cholinergic excitatory synaptic transmission in guinea pig sympathetic ganglia. *Proc Japan Acad*, 1979, 55: 525~530.
- 2 Dun NJ, Jiang ZG. Non-cholinergic excitatory transmission in inferior mesenteric ganglia of the guinea-pig: possible mediation by substance P. *J Physiol*, 1982, 325: 145~159.
- 3 Dun NJ, Mo N. In vitro effects of substance P on neonatal rat sympathetic preganglionic neurones. *J Physiol*, 1988, 399: 321~333.
- 4 Yashpal K, Gauthier S, Heary JL. Substance P given intrathecally at the spinal T9 level increases arterial pressure and heart rate in the rat. *J Auto Nerv Syst*, 1987, 18: 93~103.
- 5 Hassessian H, Couture R, Champlain J. Sympathoadrenal mechanisms underlying cardiovascular responses to intrathecal substance P in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1990, 15: 736~774.
- 6 Mo N, Wallis DL, Watson A. Properties of putative cardiac and non-cardiac neurones in the rat stellate ganglion. *J Auto Nerv Syst*, 1994, 47: 7~22.
- 7 Wallis DL, Watson A, Mo N. Cardiac Neurones of Autonomic Ganglia. *Micros Res Techn*, 1996, 35: 69~79.
- 8 莫宁. 敌百虫对豚鼠离体颈上神经节突触烟碱传递的影响. *中国药理学报*, 1991, 2: 15~127.
- 9 Mo N, Li D. Adrenoceptor agonists inhibit calcium-dependent potentials in rat stellate ganglion neurons. *Acta Pharmacol. Sinica* 1997, 18: 124~127.
- 10 Mo N, Dun NJ. Cholecystokinin octapeptide depolarizes guinea pig inferior mesenteric ganglion cells and facilitates nicotinic transmission. *Neurosci Letters*, 1986, 64: 263~268.
- 11 Dun NJ, Mo N. Calcitonin gene-related peptide evokes fast and slow depolarizing response in guinea pig coeliac neurones. *Neurosci Letters* 1988, 87: 157~162.
- 12 Lai CC, Wu SY, Lin HH, Dun NJ. Excitatory action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on rat sympathetic preganglionic neurones in vivo and in vitro. *Brain Res*, 1997, 748: 189~194.
- 13 马如纯, 莫宁. 交感节后神经元的电压依从性离子电流. *生理科学进展*, 1987, 18: 58~61.

(责任编辑: 蒋汉明)