

维生素 C 对非洲爪蟾卵母细胞 ATP - 激活电流的增强作用

聂永莉 张玉芹 徐 珍

摘 要 **目的** 研究维生素 C 对非洲爪蟾卵母细胞内源性 ATP 受体激活电流 (I_{ATP}) 的调制作用。**方法** 采用双电极电压钳技术,记录细胞外液中加入不同浓度维生素 C 时,对外加 ATP 所引起的卵母细胞膜 I_{ATP} 的影响。**结果** $10^{-4} \sim 3 \times 10^{-2}$ mol/L 浓度的维生素 C 对 10^{-4} mol/L I_{ATP} 呈增强效应,其中以 3×10^{-3} mol/L 维生素 C 对 I_{ATP} (尤其是 D1 部分) 的增幅最大,可使 $I_{ATP(D1)}$ 幅值增加 $(72.1 \pm 6.5)\%$, 显著高于对照值 ($P < 0.01$); 并使 I_{ATP} 量 - 效曲线左上移,但并不改变反应的最大幅值。**结论** 本实验表明维生素 C 对 ATP - 激活电流的调制作用呈明显的增强效应,这种效应可能是通过对 P2X 受体 - 通道复合体活性调节的结果。而维生素 C 对不同的 ATP 受体亚型分别产生何种影响,还有待于进一步的研究。

关键词 维生素 C ATP - 激活电流 爪蟾卵母细胞 双电极电压钳技术

Augmentation by Vitamin C on ATP - activated Currents in Xenopus Oocytes. Nie Yongli, Zhang Yuqin, Xu Zhen. Medical College of Wuhan University of Science and Technology, Hubei 430065, China

Abstract Objective To study the modulatory effects of Vitamin C on ATP - activated Currents (I_{ATP}) of Xenopus oocytes. **Methods** The two electrode - voltage clamp technique was used to record I_{ATP} in healthy Xenopus oocytes by applying vitamin C in extracellular fluid. **Results** We found that 10^{-4} mol/L I_{ATP} (especially the component D1) could be enhanced by Vitamin C from 10^{-4} mol/L to 3×10^{-2} mol/L. The amplitude of I_{ATP} could be obviously increased by $(72.1 \pm 6.5)\%$ when modulated by 3×10^{-3} mol/L vitamin C, which showed a remarkable difference compared with the control value ($P < 0.01$). Vitamin C could cause the concentration - response relationship curve to move towards up - left direction, while did not change the maximal amplitude. **Conclusion** The modulation of Vitamin C on I_{ATP} in xenopus oocytes is enhancement effect. It is possible that such modulation results from activation of ATP receptor - channel complexes. If vitamin C has different effect on various ATP receptor subtypes, the corresponding questions can be answered in further studies.

Key words Vitamin C; ATP - activated current; Xenopus oocytes; Two - electrode voltage clamp

ATP 受体在嘌呤受体分类中又称 P2 受体,分为 P2X 和 P2Y 受体。其中 P2X 受体属于配体门控离子通道 (ligand - gated ion - channels, LGICs) 受体,介导非选择性阳离子电导的增加,激活后可以产生内向电流;而 P2Y 则属于 G 蛋白偶联受体^[1]。细胞外的 ATP 可通过激活 P2 受体引起跨膜离子流动,产生 ATP 受体激活电流 (I_{ATP}),从而引起细胞发生相应的生物学效应。近年来,P2 受体在心血管系统中发挥的作用也日益受到重视,如参与血管收缩和舒张的调节,炎症反应,血管平滑肌细胞和内皮细胞的生长以及血管的发生、血管重塑、刺激血小板聚集并调节凝

血过程,还参与了心肌梗死的发展和心力衰竭^[2]。维生素 C 是一种氧自由基清除剂,直接参与体内氧化 - 还原及羟化反应,为非酶性抗氧化剂。维生素 C 的抗氧化作用能够保护血管内皮,有利于减缓动脉粥样硬化的发展,对心血管疾病的治疗可能具有潜在的重要意义^[3]。有研究提示氧化还原试剂可能参与了痛觉的发生机制^[4],而越来越多的研究表明 P2X 受体的多个亚型均在痛觉形成的过程中起了重要作用^[5]。本实验旨在研究维生素 C 对非洲爪蟾卵母细胞内源性 ATP 受体激活电流 (I_{ATP}) 的调制作用,为研究维生素 C 对表达在爪蟾卵母细胞上的 ATP - 激活电流的影响奠定基础,同时也为进一步研究维生素 C 对痛觉和某些心血管疾病影响提供电生理实验依据。

材料与方法

1. 卵母细胞标本的制备:实验动物为雌性非洲爪蟾(购于中国科学院生物遗传与发育研究所),体重 100 ~ 200g。碎冰掩埋低温麻醉,30min 后四肢活动消失,将爪蟾背位于冰盘

基金项目:湖北省教育厅重点科研项目 (D20081108)

作者单位:430065 武汉科技大学医学院(聂永莉、张玉芹、徐珍);442700 丹江口,汉江集团汉江医院内一科(聂永莉)

通讯作者:张玉芹,电子信箱:zhangyuqin@wust.edu.cn

内,在下腹部外侧做 0.5 ~ 1cm 的切口,打开腹腔,拉出子宫瓣,剪下 1 ~ 3 个卵叶,移入盛有 Ringer's 液的培养皿中,在体视显微镜下用精细显微镊分离出单个卵母细胞,挑选第 V ~ VI 期细胞孵育 1h 后进行实验。

2. 实验所用药物:ATP (Sigma 公司生产),维生素 C 注射液(湖北天药药业股份有限公司生产),用 Ringer's 液配制,ATP 溶液为 10^{-4} mol/L,用 1mol/L NaOH 将 pH 值调节到 7.4 ~ 7.5,用 Seven Easy pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)测试。采用 8 道灌流系统进行加药作用于细胞。实验温度为 18 ~ 20℃。

3. 电生理记录:采用双电极电压钳记录方法,所用仪器为:电压钳放大器(OC2725C,美国 Warner 公司)、微电极拉制仪(德国 HEKA 公司)、微操纵器(美国 WPI 公司)、8 道灌流系统(美国 WPI 公司)。电压电极和电流电极尖端直径分别为 3 ~ 5 μ m 和 5 ~ 7 μ m,电极内充灌液分别为 0.15mol/L 和 3mol/L 的 KCl 溶液,电极电阻分别为 5 ~ 10M Ω 和 0.1 ~ 1M Ω 。参比电极用 Ag/AgCl 电极与细胞池相连,并用盐桥固定。选取静息膜电位大于 -25mV 的卵母细胞进行实验,实验过程中,用 Ringer's 液(18 ~ 20℃)持续恒速灌流(2ml/min)细胞,通过微操纵器将电压电极和电流电极插入细胞,钳制电压为 -60mV,电流信号输入计算机,使用 pCLAMP 软件记录和分析通道电流。

4. 统计学处理:实验数据用 Excel 进行统计分析,实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, n 表示记录细胞数,显著性检验采用配对 t 检验, $P < 0.01$,差异有统计学意义,用 Origin 75 软件进行统计图形的绘制和拟合。

结 果

1. 卵母细胞 ATP-激活电流:由于 P2X 受体和 P2Y 受体往往共存,ATP 又可同时激活两种受体,由于目前还没有选择性作用于两种受体的工具药,一般根据反应时程判断是否有 P2X 受体参与。外加 ATP 几秒钟内,阳离子通道开放,内向电流产生,表明 P2X 受体激活。我们应用双极电压钳记录技术,在细胞超极化的情况下,外加 ATP 记录带滤泡膜的非洲爪蟾卵母细胞的膜电流反应,包括 3 种电流(图 1):快内向电流(D1)、慢内向电流(D2)和慢外向电流(H)。在所记录的细胞中,3 种电流都出现的细胞约占 75%,仅出现 D1 和 H 的细胞约占 17%,出现 D1 和 D2 的细胞约占 6%,仅出现 D1 的细胞约占 2%。ATP 激活电流具有浓度依赖性。应用 GDP- β -S 进行胞内透析,阻断 G 蛋白偶联的 P2Y 受体的介导作用,对 D1 电流影响不大,D2 电流明显减小。进一步胞内应用 PKC 抑制剂 GF109203 和 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA,D2 成分几乎完全被阻断。表明 D1 电流主要是由 P2X 受体介导的。由 P2X 介导的电流特征是:

在细胞超极化时,细胞外应用 ATP 后,迅速产生内向电流,表现为快速去敏感;以 Na^{+} 为主的非选择性阳离子通透引起;能被 Zn^{2+} 调节:在一定范围内,随着细胞外液的 Zn^{2+} 浓度增加,电流幅值也增加,超过一定浓度($> 30 \mu\text{mol/L}$)则抑制该电流幅值;细胞外应用 PPADS(吡多醛-5-磷酸-6-偶氮苯基-2,4-二磺酸)可明显抑制 P2X 介导的电流;激动剂对该电流的激动效力顺序是:2MeATP $>$ ATP $>$ α , β -MeATP。

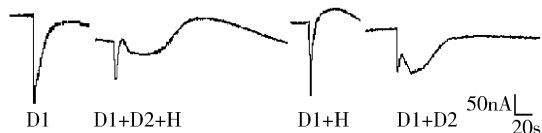


图 1 爪蟾卵母细胞不同类型的 ATP 激活电流
快内向电流(D1)、慢内向电流(D2)和慢外向电流(H)

当细胞外分别加入 10^{-5} mol/L、 3×10^{-5} mol/L、 10^{-4} mol/L、 3×10^{-4} mol/L、 10^{-3} mol/L 的 ATP 时,ATP 激活电流幅值逐渐增加,表现出明显的浓度依赖性(图 2)。

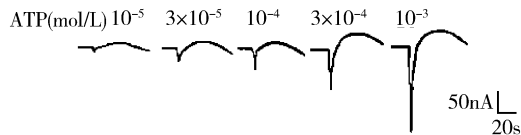


图 2 ATP-激活电流的浓度依赖性

2. 维生素 C 对 I_{ATP} 的增强效应及与维生素 C 浓度的关系:临床上维生素 C 成人每日的用量范围为 0.3 ~ 3.0g,其对应体内浓度范围约为 3×10^{-4} ~ 3×10^{-3} mol/L,故本研究的维生素 C 浓度范围设计为 10^{-4} ~ 3×10^{-2} mol/L。

本实验检测的 56 个细胞全部对 ATP 敏感。细胞外液单独加入维生素 C 未记录到电流。以 10^{-4} mol/L I_{ATP} 为对照,将不同浓度的维生素 C 与 10^{-4} mol/L 的 ATP 同时加入细胞外液,66% (37/56) 的细胞对 I_{ATP} 有增强作用, 10^{-4} ~ 3×10^{-2} mol/L 的维生素 C 分别使 I_{ATP} 的 D1 电流幅值增加的百分比见表 1,其中 3×10^{-3} mol/L 的维生素 C 使 I_{ATP} 的 D1 电流增加幅度最大,比对照值增加 $(72.1 \pm 6.5)\%$ ($n = 6$, $P < 0.01$),再增加维生素 C 的浓度,D1 电流增加的幅度反而减小(图 3),但每一种维生素 C 浓度下的 D1 电流的幅值都高于对照值($P < 0.01$)。维生素 C 浓度为 10^{-4} 、 3×10^{-4} 、 10^{-3} 、 3×10^{-3} 、 10^{-2} 、 3×10^{-2} mol/L 的 $I_{\text{ATP(D1)}}$ 增加的百分比为 $(10.4 \pm 3.6)\%$ 、 $(36.8 \pm$

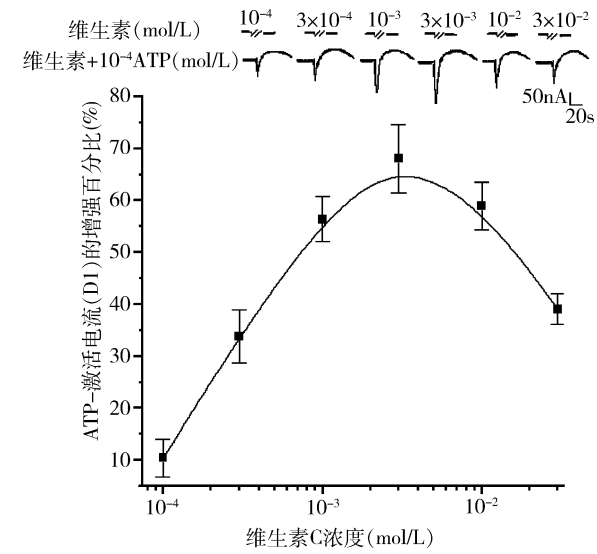


图 3 不同浓度的维生素 C 对 I_{ATP} 的增强作用

表 1 加 10^{-3} mol/L 维生素 C 前后不同浓度 I_{ATP} 的 D1 电流幅值占对照值的百分比 ($\bar{x} \pm s$)

ATP 浓度 (mol/L)	10^{-5}	3×10^{-5}	10^{-4}	3×10^{-4}	10^{-3}
加维生素 C 前的 D1 幅值 (%)	6.4 ± 1.2	22.8 ± 5.2	52.3 ± 6.4	76.6 ± 5.8	100 ± 2.9
加维生素 C 后的 D1 幅值 (%)	$18.4 \pm 2.3^*$	$36.5 \pm 3.2^*$	$80.8 \pm 5.9^*$	$90.6 \pm 5.1^*$	101.4 ± 3.8

* 与加维生素 C 前的 D1 幅值相比, $P < 0.01$, $n = 6$

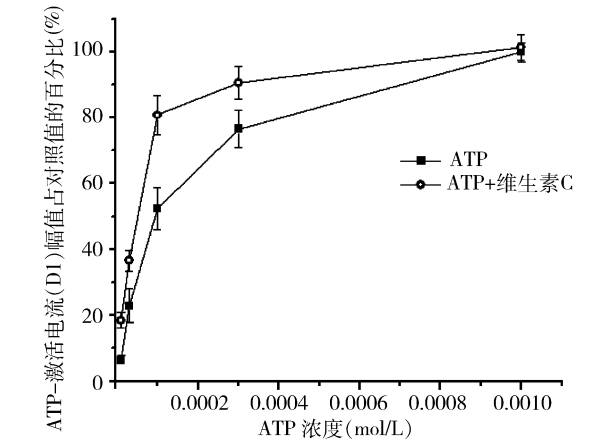


图 4 有/无维生素 C (10^{-3} mol/L) 时 I_{ATP} 浓度 - 反应曲线

依赖性,使 I_{ATP} 的量 - 效曲线向左上移,且不改变反应的最大和最小幅值,与增加 ATP 的浓度相类似。以往有关的研究认为,卵母细胞 I_{ATP} 的内向部分 (D1/D2) 主要由 P2Y 受体介导的 Ca^{2+} 依赖性 Cl^- 电流所引起,外向电流 H 则是由于 P1 受体介导的 K^+ 外流的结果,而我们实验室在既往的研究中,曾用胞内透析的方法证实 D1 电流不仅包括有 P2Y 受体介导的 Ca^{2+} 依赖性 Cl^- 电流,也存在有 P2X 受体介导的以

$5.2) \%^*$ 、 $(58.4 \pm 4.3) \%^*$ 、 $(72.1 \pm 6.5) \%^*$ 、 $(61.9 \pm 4.6) \%^*$ 、 $(45.1 \pm 2.9) \%^*$ (* 与对照值相比, $P < 0.01$, $n = 6$)。

3. 维生素 C 对 I_{ATP} 浓度 - 反应曲线的影响:以饱和浓度 (10^{-3} mol/L) ATP 溶液诱发的 I_{ATP} 的 D1 电流幅值作为对照 (100%),不同浓度的 ATP 溶液诱发的 $I_{ATP(D1)}$ 电流幅值在加维生素 C 前后的百分比如表 1 所示,可见除饱和浓度的 I_{ATP} 外,维生素 C 对 $I_{ATP(D1)}$ 均有明显的增强作用 ($P < 0.01$)。外加 10^{-3} mol/L 的维生素 C 使 ATP - 激活的 D1 电流量 - 效曲线向左上移 ($n = 6$),但 I_{ATP} 最大幅值的变化并不明显,维生素 C 的作用类似于增加 ATP 的浓度 (图 4)。

讨 论

实验的结果表明,毫摩尔浓度的维生素 C 对 $I_{ATP(D1)}$ 有较明显的增强作用,这种增强作用具有浓度

Na^+ 为主的非选择性阳离子电导的增加^[6]。应用 G - 蛋白抑制剂 GDP - β - S 进行胞内透析,阻断 P2Y 受体的作用后,D1 电流变化不大,D2 电流明显减小,而进一步胞内应用 PKC 抑制剂 GF109203 和 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA,D2 成分则几乎完全被阻断。这表明 D1 电流主要是由 P2X 受体介导的。早先的研究表明,抗氧化剂能电压依赖性的增强 NMDA - 激活电流^[7],并推测这种效应是由膜通道的离子电导的变化所介导。Andrey 等^[8]在氧化还原剂对酸敏感通道调制作用的研究中也提出了相似的观点,他们还在实验中发现跨膜电流的翻转电位发生了改变。因此,我们推测维生素 C 对 I_{ATP} 产生增强效应的机制有可能是通过对 P2X 受体 - 通道复合体活性的调节,或者是增加了 P2X 受体对 Ca^{2+} 或 Na^+ 的通透性而实现的。

近年来 ATP 受体在心血管系统和痛觉机制中发挥的作用日益受到重视^[2,5],已有研究表明,在大量的抗氧化剂存在的条件下,大部分感觉神经元的 ATP - 激活电流被增强^[4]。本实验的研究结果与之一致。该研究指出^[4],抗氧化物浓度的增加可能是病理情况下痛觉过敏形成的潜在机制之一,并推想 ATP

(下转第 87 页)