

# 蛙皮素对豚鼠肠系膜下神经节细胞的生物电影响\*

刘芳 孔德虎 祝延

(安徽医科大学生理学教研室 合肥 230032)

**摘要:** 应用离体细胞内记录技术,观察了蛙皮素(BOM)对豚鼠离体肠系膜下神经节(IMG)细胞膜电位和膜电阻的影响。结果表明,181个IMG细胞在压力注射BOM( $10^{-5}$  mol/L, 1~15 pulse, 3~15 ms)时呈现缓慢去极化(84.0%)、先超极化后去极化(8.3%)和无明显反应(7.7%)。在10个细胞上灌注BOM( $10^{-7}$  ~  $10^{-6}$  mol/L, 60 s)时,90%的细胞亦缓慢去极化。该去极化反应受低钙/高镁溶液的影响,但不为胆碱和肾上腺素受体阻断剂所阻断;膜电阻表现为减小(60.0%)、不变(35.0%)和增大(5.0%)。说明BOM可能存在于豚鼠IMG细胞上且发挥易化作用。

**关键词:** 蛙皮素;豚鼠;肠系膜下神经节;去极化

**中图分类号:** Q425 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2001)05-23-05

## The Electrophysiological Effects of Bombesin on the Cells of Inferior Mesenteric Ganglion of Guinea-pig *in Vitro*

LIU Fang KONG De-Hu ZHU Yan

(Physiological Department of Anhui Medical University Hefei 230032, China)

**Abstract:** Intracellular recordings were used on the cells of isolated guinea-pig inferior mesenteric ganglion(IMG) to investigate the effects of bombesin(BOM) on the membrane potential and membrane resistance( $R_m$ ). The results were as follows: BOM( $10^{-5}$  mol/L) applied by pressure ejection induced dose-dependent slow depolarizations in 84.0% of 181 IMG cells. The depolarizations were affected by Low  $Ca^{2+}$  /High  $Mg^{2+}$  solution but not blocked by cholinergic and adrenergic receptor-antagonist. The  $R_m$  could be increased in 5.0%, decreased in 60.0% and nearly unchanged in the rest 35.0% of 80 depolarizations. In 8.3% of 181 IMG cells, BOM( $10^{-5}$  mol/L) evoked biphasic response consisting of an initial hyperpolarization followed by a slow depolarization. 7.7% of 181 IMG cells showed nearly no reaction to BOM. Applied by superfusion, BOM ( $10^{-7}$  ~  $10^{-6}$  mol/L, 60 seconds) also induced depolarizations in 90% of 10 IMG cells. The results above demonstrate BOM or its receptor may exist on guinea-pig IMG cells and BOM depolarize most cells.

**Key words:** Bombesin; Guinea-pig; Inferior mesenteric ganglion; Depolarization

蛙皮素(bombesin, BOM)又称“铃蟾肽”,70年代初从两栖类动物皮肤中被分离,后运用放射自显影(RIA)及免疫组织化学(ICC)等技术发现它既存在于哺乳动物脑内,如下丘脑、大脑皮质、中脑、视交叉上核等处,亦存在于外周,如

胃、小肠、结肠、肝、脾、胰腺等组织内,对体温、

\* 安徽省教育厅科研基金资助课题(No.99JL0119);

第一作者介绍 刘芳,女,27岁,硕士,助教;研究方向:植物神经电生理;

收稿日期:2000-11-11,修回日期:2001-06-25

代谢、昼夜节律、动物摄食行为及学习记忆具有广泛的调节作用<sup>[1-3]</sup>。有报道蛙皮素样免疫活性纤维(BLIF)存在于交感神经节内,并运用 ICC、RIA、电镜等方法研究了其含量、分布及纤维投射<sup>[4,5]</sup>,但均系形态学方面的研究。本工作旨在应用离体神经节细胞内记录技术,观察 BOM 对 IMG 细胞膜电位和膜电阻的影响及其初步机制,以期从电生理学角度探讨 BOM 在 IMG 内的存在及作用。

### 1 材料与方 法

选用成年豚鼠(*Cavia porcellus*)105 只,雌雄不拘,体重 200 ~ 300 g。经颈总动脉放血处死动物,迅速摘取 IMG 及相连的腹下神经,移入灌流-记录浴槽妥善固定,并以 95% 的 O<sub>2</sub> 与 5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和的 Krebs 液(35.0 ± 0.5℃, pH 7.4 ± 0.05)持续恒速灌流 IMG(3 ml/min),成分(单位:mmol/L)如下:NaCl 123.0, KCl 4.7, MgCl<sub>2</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8, Glucose 11.5, NaHCO<sub>3</sub> 18.0<sup>[6]</sup>。部分标本用低钙/高镁溶液灌流以阻断突触传递过程,成分(单位:mmol/L)为:NaCl 114.0, KCl 4.7, MgCl<sub>2</sub> 12.0, CaCl<sub>2</sub> 0.25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8, Glucose 11.5, NaHCO<sub>3</sub> 18.0。

借助解剖显微镜将内充 3 mol/L KCl 溶液、尖端直流阻抗为 30 ~ 60 MΩ 的玻璃微电极刺入 IMG。当微电极刺入细胞的瞬间,示波屏上扫描光束突然下降,微电极回抽时又跃升至原来位置,表明细胞膜内外存在内负外正的电位差,由此可测出静息电位(RP)。由三通道刺激器(SS-8301,南通电声总厂)提供方波电或直流电,输入微电极放大器(WPI-707A),经微电极向细胞输入跨膜电流,当方波电刺激强度达到阈值可引起动作电位,方波电刺激强度低于阈值可引起电紧张电位,生物电信号经微电极引导回输入微电极放大器后,分别输出到双线示波器(SBR-1,汕头电子仪器厂)及二道生理记录仪(LMS-2B,成都仪器厂)进行监测与记录。

蛙皮素、筒箭毒、阿托品、心得安、酚妥拉明由美国 Sigma 公司提供。将 BOM 用生理盐水

稀释成 1 mmol/L 的母液,冰冻保存。BOM 采用压力注射和灌流途径给药,压力注射时将 BOM (10<sup>-5</sup> mol/L)注入尖端直径 10 ~ 20 μm 的玻璃微电极内,通过压力注射装置定量地将药物注入记录细胞周围,注射压力为 60 磅/平方英寸(PSI),压注次数为 1 ~ 15 次(pulse),压注时程为 3 ~ 15 ms。其它试剂分别溶解于克氏液中,通过灌流给药。

实验数据以均数 ± 标准误表示;计量资料自身前后对照,用配对 *t*-检验处理,显著性标准为 *P* < 0.05(双侧检验)。

### 2 结 果

**2.1 豚鼠 IMG 细胞的膜电位和膜电阻** 当示波屏上扫描光束突然下降并出现动作电位时可确定微电极已刺入细胞,而扫描光束下降的幅度即 RP 值。观察 181 个细胞 RP 值为(-52.0 ± 0.3)mV,凡 RP 值低于 -50 mV 或不稳定者予以摒弃。向细胞内输入超极化方波电流(0.05 ~ 0.4 nA, 100 ms, 图 1:A)可引起超极化电紧张电位(图 1:B),在二道生理记录仪上记录该超极化电紧张电位(V)和电流强度(I),根据欧姆定律  $R = V/I$  即可计算出膜电阻(R<sub>m</sub>),本实验计算 80 个细胞 R<sub>m</sub> 值为(111.9 ± 3.5)MΩ。由于膜电阻是膜电导的倒数,故膜电阻的测定有助于观察膜电导的变化。

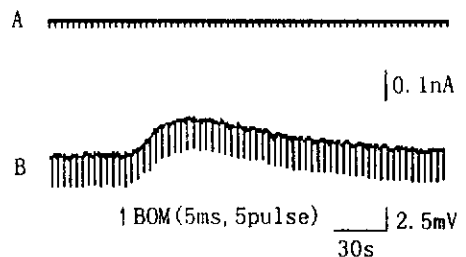


图 1 膜电阻的计算方法

A. 向细胞内重复输入超极化方波电流(1, 100 ms); B. 在细胞上引起相应的超极化电紧张电位(V),竖线条所示, A、B 为同一细胞

### 2.2 BOM 对 IMG 细胞膜电位的影响

**2.2.1 压力注射法** 181 个细胞当压力注射 BOM(10<sup>-5</sup> mol/L, 1 ~ 15 pulse, 3 ~ 15 ms)时,

84.0%的细胞表现缓慢去极化(图 2:A),幅度为 0.75 ~ 15.0 mV,均值(4.01 ± 0.21) mV,持续时间为 0.4 ~ 8.0 min 不等,均值(3.14 ± 0.78) min,其中 26.3%的细胞在去极化时伴锋电位发放。有 8.3%的细胞出现先超极化后去极化的双相反应(图 2:C),超极化相的幅度和时程分别为(-1.24 ± 0.13) mV 和(0.27 ± 0.08) min;去极化相的幅度和时程分别为(4.34 ± 0.90) mV 和(1.93 ± 0.19) min。其余 7.7%的 IMG 细胞对 BOM 反应不明显(图 2:B),增加压注时程(ms)或次数(pulse),部分细胞出现极微弱的去极化,幅度不超过 0.5 mV,时程小于 1 min,我们认为对该浓度的 BOM,这些细胞不敏感。

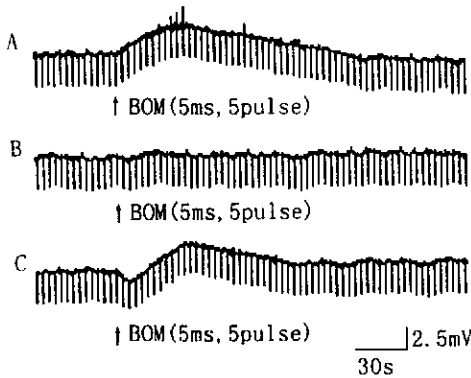


图 2 BOM 对 IMG 细胞膜电位的影响

压力注射 BOM(10<sup>-5</sup> mol/L, 5 ms, 5 pulse, 由竖箭头表示), IMG 细胞可出现 3 种不同的反应:A. 缓慢去极化反应; B. 无反应; C. 双相反应; A、B、C 为不同细胞

对 BOM 敏感细胞,当增加压注次数(时程不变)或增加压注时程(次数不变)时,去极化反应的幅度增大、持续时间延长、锋电位发放频率加快,提示去极化反应与剂量相关(表 1)。

表 1 去极化反应的剂量相关性

	对照 (5 ms, 5 pulse)	增加压注次数 #1 (5 ms, 10 pulse)	增加压注时程 #2 (5 pulse, 10 ms)
幅度(mV)	2.22 ± 0.24	4.28 ± 0.99**	---
时程(min)	1.52 ± 0.31	2.75 ± 0.54**	---
幅度(mV)	1.31 ± 0.27	---	2.96 ± 0.42**
时程(min)	1.71 ± 0.29	---	2.51 ± 0.17*

#1 细胞数 n = 13, #2 细胞数 n = 7, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

2.2.2 灌流法 持续灌流 BOM(10<sup>-7</sup> ~ 10<sup>-6</sup> mol/L, 60 s), 10 个细胞中有 9 个细胞缓慢去极

化,幅度为(5.49 ± 0.97) mV,持续时间为(2.96 ± 0.46) min;另有 1 个细胞对该浓度 BOM 不敏感。灌流 BOM 产生去极化的 6 个细胞对压注 BOM 产生同样反应,提示两种给药方法作用基本一致(图 3)。

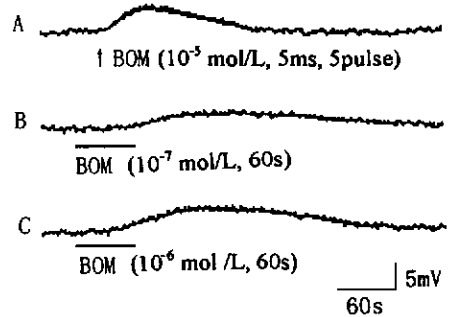


图 3 两种给药方法引起 IMG 细胞的去极化

A. 压力注射 BOM(10<sup>-5</sup> mol/L, 5 ms, 5 pulse)引起的去极化; B. 灌流 BOM(10<sup>-7</sup> mol/L, 60 s)引起的去极化; C. 灌流 BOM(10<sup>-6</sup> mol/L, 60 s)引起的去极化; A、B、C 为同一细胞

### 2.3 去极化反应的初步机制

2.3.1 低钙/高镁溶液 低钙/高镁溶液可以阻断突触传递, BOM 引起的去极化在低钙/高镁溶液持续灌流 10 min 后受到不同程度的影响: 16 个细胞中 31.3% 的去极化反应被完全阻抑, 56.2% 被部分阻抑, 12.5% 的去极化不受影响(图 4), 提示 BOM 通过多种途径影响 IMG 细胞膜电位水平。

2.3.2 阻断剂 在 BOM 引起去极化反应的 5 个细胞上灌流胆碱受体阻断剂筒箭毒和阿托品(10<sup>-3</sup> mol/L) 10 min 后, 去极化的幅度、时程无显著改变; 5 个细胞灌流肾上腺素受体阻断剂酚妥拉明和心得安(10<sup>-3</sup> mol/L) 10 min 后, 去极化反应也不受影响(表 2), 提示 BOM 通过非胆碱非肾上腺素能途径产生去极化作用。

2.3.3 膜电阻 去极化反应中记录 BOM 作用前后的 R<sub>m</sub> 值, 80 个细胞中 60.0% 的细胞 R<sub>m</sub> 降低, 且 R<sub>m</sub> 减小的幅度具有显著性, 提示膜电导增大, 去极化可能与胞外阳离子内流增多有关, 其余细胞 R<sub>m</sub> 可不变(35.0%)或增大(5.0%)(表 3)。

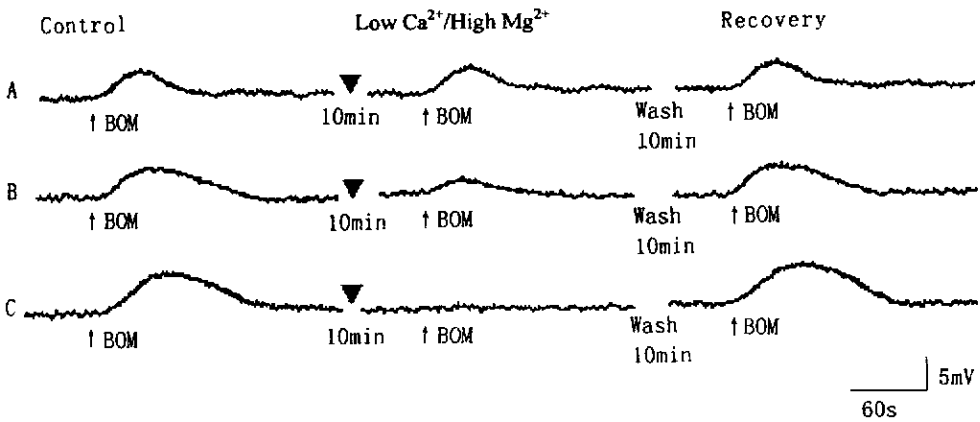


图4 低钙/高镁溶液对 BOM 引起的去极化反应的影响

压力注射 BOM( $10^{-5}$  mol/L), 在 IMG 细胞上引起缓慢去极化; 持续灌流低钙/高镁溶液(由“▼”表示)10 min 后, 再压注同样浓度 BOM, 去极化反应被完全(C)、部分(B)阻断或不受影响(A); 灌洗 10 min 后恢复; A、B、C 分别为不同细胞

表 2 阻断剂对去极化反应的影响

实验项目		对照	予阻断剂后	P 值
胆碱受体阻断剂 #1	幅度 (mV)	4.70 ± 0.90	3.90 ± 0.58	0.3058
	时程 (min)	2.18 ± 0.21	2.16 ± 0.16	0.7780
肾上腺素受体阻断剂 #2	幅度 (mV)	4.88 ± 1.48	4.88 ± 1.48	-
	时程 (min)	2.95 ± 0.37	2.38 ± 0.55	0.3172

#1 细胞数 n = 5, #2 细胞数 n = 5

表 3 去极化反应所伴随的 Rm 变化

细胞数	对照 (MΩ)	给予 BOM 后 (MΩ)	改变率 (%)	
Rm 减小	48	113.7 ± 5.1	95.5 ± 4.9	-16.2 ± 1.2*
Rm 不变	28	104.5 ± 4.9	104.5 ± 4.9	0
Rm 增大	4	109.2 ± 4.9	128.8 ± 5.0	+17.9 ± 6.4**

\* P < 0.05, \*\* P > 0.05

### 3 讨论

实验采用两种方法给药。压力注射法的优点是药物作用范围局限, 离靶细胞距离较近, 可迅速出现效应。灌流法的优点是可以控制药物的浓度, 以获得精确的量效关系<sup>[7]</sup>。本工作应用这两种方式给药, 使结果更为可靠。

BOM 作为一种在两栖类动物皮肤、哺乳动物消化道和脑内发现并分离的神经肽, 在植物神经系统内广泛存在。Dalsgaard 曾运用免疫组化方法分析豚鼠 IMG 内 BLIF 的投射通路<sup>[4]</sup>; Schultzberg 报道大鼠 IMG 内未见 BLIF, 而豚鼠 IMG、腹腔-肠系膜上神经节(CG-SMG)内可见大量 BLIF 存在<sup>[8]</sup>, 提示有 BLIF 存在于豚鼠交感

神经节。本工作提示, IMG 细胞膜上可能存在 BOM 相应受体, BOM 与之结合引起膜的缓慢去极化, 使膜电位接近或达到阈电位, 从而更容易引发锋电位。尽管 BOM 在交感神经节突触传递中的作用尚未明确, 这种易化作用无疑提高了节内神经元的兴奋性。

神经肽的作用方式一直是人们感兴趣的问题, 因为它打破了经典的“神经递质”的概念, 扩大了信息传递物质的范畴。有资料表明 BOM 可以作为一种神经递质参与突触传递, 如在有 Ca<sup>2+</sup> 存在时, 用 KCl 处理突触体后, BOM 及其相关肽类的释放明显增加<sup>[1]</sup>。Pinnock 等研究背根神经元时亦发现 BOM 去极化作用不受低钙/高镁溶液的影响, 可以直接作用于突触后膜上的受体, 发挥生理作用<sup>[9]</sup>。但 BOM 可刺激胆囊收缩素(CCK)的释放<sup>[10]</sup>及 BOM 通过增加胆碱能神经对乙酰胆碱(ACh)的释放而影响胃肠道的活动<sup>[11]</sup>等则提示 BOM 可以作为一种神经调质发挥作用。本工作提示 BOM 可能直接作用于突触后膜相应受体, 也可能易化中间神经

元或刺激了其它物质的释放而发挥其易化作用。运用受体阻断剂显示 BOM 通过非胆碱非肾上腺素能途径发挥作用,这与 BOM 在中枢及外周其它组织内的作用方式似有所不同<sup>[1]</sup>。在发生机制方面,由于膜电阻的变化呈多样性,可能涉及多种离子参与,如钠电导( $G_{Na}$ )增加或钾电导( $G_K$ )降低等,有待深入研究。

此外我们注意到, BOM 引起的去极化与刺激突触前神经在突触后膜引起的非胆碱迟缓兴奋性突触后电位(1s-EPSP)极为相似。有资料表明血管活性肠肽(VIP)、CCK 等是豚鼠 IMG 1s-EPSP 的介导递质<sup>[12,13]</sup>,而 IMG 内 VIP、CCK 与 BOM 三者可以共存<sup>[5]</sup>, BOM 是否参与介导 1s-EPSP、在 IMG 对胃肠功能的初步整合中有何意义,尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 王仁鹏. 蛙皮素样肽及其作用. 生理科学进展, 1982, 13(1): 54 ~ 58.
- [2] Mai, L. M., J. T. Pan. Bombesin acts in the suprachiasmatic nucleus to affect circadian changes in tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity and prolactin secretion. *Endocrinology*, 1995, 136(10): 4 136 ~ 4 137.
- [3] Williams, C. L., J. L. McGaugh. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by posttraining infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.*, 1994, 654: 251 ~ 256.
- [4] Dalsgaard, C. J., T. Kokfelt, M. Schultzberg *et al.* Origin of peptide-containing fibers in the inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to

substance P, enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide, cholecystokinin and bombesin. *Neuroscience*, 1983, 9(1): 191 ~ 211.

- [5] Simmon, M. A. The complexity and diversity of synaptic transmission in the prevertebral sympathetic ganglia. *Prog. Neuro. Biol.*, 1985, 24(1): 43 ~ 93.
- [6] Wang, L. C., S. G. Cai, Z. X. Huang *et al.* Serotonin receptor sub-types that depolarize guinea-pig inferior mesenteric ganglion neurons. *Brain Res.*, 1999, 839: 23 ~ 34.
- [7] Wang, W., R. C. Ma. The role of serotonin in non-cholinergic excitatory transmission in the guinea-pig inferior mesenteric ganglion. *Brain Res.*, 1990, 531: 196 ~ 202.
- [8] Schultzberg, M. Bombesin-like immunoreactivity in sympathetic ganglia. *Neuroscience*, 1983, 8(2): 363 ~ 374.
- [9] Pinnock, R. D., G. N. Woodruff. Bombesin excites a subpopulation of 5-hydroxytryptamine-sensitive neurons in the rat dorsal raphe nucleus *in vitro*. *J. Physiol. (Lond)*, 1991, 440: 55 ~ 65.
- [10] Cuber, J. C., F. Vilis, N. Charles *et al.* Bombesin and nutrients stimulate release of CCK through distinct pathways in the rat. *Am. J. Physiol.*, 1989, 256 (Gastrointest Liver Physiol, 19): G989 ~ G996.
- [11] Kantoh, M., T. Takahashi, T. Yamamura *et al.* Bombesin evoked acetyl-choline release from the guinea-pig antrum. *Life Science*, 1985, 36: 2 445 ~ 2 452.
- [12] Schumann, M. A., D. L. Kreulen. Action of cholecystokinin octa-peptide and CCK-related peptides on neurons in inferior mesenteric ganglion of guinea-pig. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 1986, 239(2): 618 ~ 625.
- [13] Love, J. A., J. H. Szurszewskie. The electrophysiological effects of vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig inferior mesenteric ganglion. *J. Physiol. (Lond)*, 1987, 394: 67 ~ 84.