

豚鼠交感神经节非胆碱能迟慢兴奋性突触后电位与蛙皮素、P 物质的关系

刘芳^① 柯道平^② 孔德虎^②

(^①佛山职工医学院生理学教研室 佛山 528000; ^②安徽医科大学生理学教研室 合肥 230032)

摘要: 运用玻璃微电极细胞内记录技术, 观察豚鼠(*Cavia porcellus*)离体肠系膜下神经节(IMG)细胞非胆碱能迟慢兴奋性突触后电位(Is-EPSP)与蛙皮素(BOM)、P物质(SP)的关系, 以探讨肽类神经递质在外周神经系统中的作用。结果显示, SP去极化、BOM去极化与Is-EPSP具有相关性, SP受体脱敏使SP敏感细胞的Is-EPSP减弱或消失, 但不影响BOM引起的去极化; BOM受体脱敏使BOM敏感细胞的Is-EPSP减弱或消失, 但不影响SP引起的去极化。大部分Is-EPSP阳性细胞对SP、BOM敏感, 而对SP、BOM均不敏感的细胞多数不出现Is-EPSP。结果提示, BOM、SP通过IMG细胞膜上相应受体参与了Is-EPSP的形成, 受体间无交互脱敏现象。

关键词: 交感神经节, 迟慢兴奋性突触后电位, 蛙皮素, P物质

中图分类号: R338 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2005)01-27-05

The Relationship between Non-cholinergic, Late Slow-excitatory Postsynaptic Potential and Bombesin or Substance P in Sympathetic Ganglia of Guinea-pig

LIU Fang^① KE Dao-Ping^② KONG De-Hu^②

(^①Physiological Department of Foshan Medical College, Foshan 528000;

^②Physiological Department of Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: In order to investigate the relationship between late slow-Excitatory Postsynaptic Potential(Is-EPSP) and Bombesin(BOM) or Substance P(SP) in sympathetic ganglia, intracellular recording technique was used on isolated inferior mesenteric ganglion(IMG) cells of Guinea-pig. The results showed that the SP-induced depolarization and BOM-induced depolarization were related to Is-EPSP. SP receptor desensitization abolished or markedly attenuated Is-EPSP in SP-sensitive neurons, but had no effect on BOM-mediated depolarization. By contrast, BOM receptor desensitization abolished or markedly attenuated Is-EPSP in BOM-sensitive neurons, while it had no effect on SP-mediated depolarization. The results demonstrate that BOM and SP can produce Is-EPSP via respective receptor on the membrane of IMG synapses and there is no cross desensitization between receptors.

Key words: Sympathetic ganglia, Late slow-excitatory postsynaptic potential, Bombesin, Substance P

椎前交感神经节不是简单的交感节后神经元聚合体, 而是外周神经系统中的“内脏-神经节-内脏反射的中枢”, 对中枢和外周传入冲动有着复杂的整合功能。豚鼠(*Cavia porcellus*) IMG细胞除了可接受不同来源的胆碱能传入纤

维的投射以外, 还有大量非胆碱能传入纤维投

基金项目: 安徽省教育厅科研基金(No. 99J10119);

第一作者介绍: 刘芳, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 植物神经电生理与药理, E-mail: 13131f@sohu.com.

收稿日期: 2004-08-09, 修回日期: 2004-10-28

射,这些起源不同的神经末梢可能含有不同的递质。免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫等方法发现 IMG 细胞体或神经纤维中不同程度的存在血管活性肠肽(VIP)、胆囊收缩素(CCK)、神经肽 Y(NPY)、5-羟色胺(5-HT)、蛙皮素(BOM)、P 物质(SP)等^[1]。以前的研究表明,5-HT、SP 可能是介导豚鼠 IMG 非胆碱能缓慢兴奋性突触后电位(late slow-Excitatory Postsynaptic Potential, ls-EPSP)的神经递质或调质^[2],而近来发现 BOM 可引起 IMG 细胞缓慢去极化^[3],那么 ls-EPSP 的形成中是否有 BOM 的参与、ls-EPSP 与同属于肽类的 SP 和 BOM 间有何关系,国内尚未见报道。本实验旨在通过细胞内微电极记录技术观察 SP、BOM 对 ls-EPSP 的介导作用,并进一步探讨 ls-EPSP 与 SP 和 BOM 的相互关系,为深入了解肽类神经递质在外周神经系统中的作用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及处理 选用成年豚鼠 200 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(hypogastric nerve, HN)、结肠神经(colon nerve, CN)、内脏神经(splanchnic nerve, SN)及节间神经(intermesenteric nerve, IN)移入灌流-记录浴槽妥善固定,神经穿入吸引电极,并以 95%的 O₂ 与 5%的 CO₂ 饱和的 Krebs 液(35.0 ± 0.5 °C; pH 7.4 ± 0.05)持续恒速恒温灌流 IMG(3 ml/min),灌流液成分(单位:mmol/L)如下:NaCl 123.0; KCl 4.7; MgCl₂ 1.2; CaCl₂ 2.5; NaH₂PO₄ 1.8; Glucose 11.5; NaHCO₃ 18.0^[4]。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; MgCl₂ 12.0; CaCl₂ 0.25; NaH₂PO₄ 1.8; Glucose 11.5; NaHCO₃ 18.0。

1.2 细胞内记录 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,由此可测出静息电位(resting potential, 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,经吸引电极予以有效刺激强度重复电刺激(1 ms, 25 Hz, 4 s)与 IMG 相连的突触前神经,生物电信号经微电极引导回输入微电极放大器(WPI-707A)后,分别输出到双线示波器(SBR-1,汕头电子仪器厂)及二导生理记录仪(LMS-2B,成都仪器厂)进行监测与记录^[5]。

1.3 实验试剂 BOM、SP 及相关试剂由美国 Sigma 公司购买。将试剂溶解于克氏液中,通过恒温灌流实验装置系统到达记录细胞。

1.4 数据处理及统计分析 数据以(均数 ± 标准误)表示,计量资料用配对 *t*-检验处理,计数资料用 χ^2 检验和方差分析,显著性标准为 $P < 0.05$ (双侧检验)。

2 结 果

2.1 豚鼠 IMG 细胞的 ls-EPSP 经吸引电极予以有效刺激强度重复电刺激(1 ms, 25 Hz, 4 s)与 IMG 相连的突触前神经,在 60.0%(69/115) IMG 细胞上峰电位发放后可引起缓慢持久去极化电位,这种缓慢去极化电位能被低钙(0.25 mmol/L)高镁(12 mmol/L)液可逆地阻断(图 1),但不受筒箭毒、六羟季胺和阿托品的影响,提示这种缓慢去极化电位即为非胆碱能缓慢兴奋性突触后电位(ls-EPSP)。

2.2 ls-EPSP 与 SP 的关系

2.2.1 SP 去极化反应 持续灌流 SP(10⁻⁶ mol/L, 1 min),62.0%(44/71) IMG 细胞膜电位出现去极化,幅度(8.7 ± 0.7) mV,时程(4.21 ± 0.15) min。

2.2.2 ls-EPSP 与 SP 去极化的相关性 在 150 个细胞中分别观察 SP 去极化及 ls-EPSP 的出现率,结果在 114 个 ls-EPSP 阳性细胞中,有 68 个(59.6%)细胞同时对 SP 敏感(表 1)。

2.2.3 SP 受体脱敏对 ls-EPSP 的影响 观察 15 个可诱发 ls-EPSP 且对 SP 敏感的 IMG 细胞,灌流 SP(10⁻⁶ mol/L, 1 min)可出现明显的去极化反应,但持续灌流外源性 SP(10⁻⁶ mol/L)使 SP 受体脱敏后膜电位不出现去极化反应,再刺

刺激触前神经不引起 I_s -EPSP (细胞数 $n = 6$) 或 I_s -EPSP 明显减小 ($n = 9$) (表 2)。

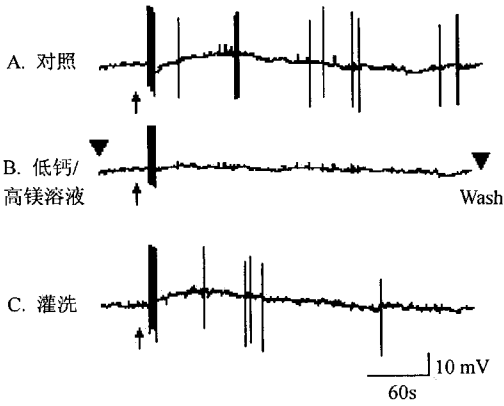


图 1 低钙/高镁溶液对 I_s -EPSP 的阻断作用

Fig.1 The blockage of low Ca^{2+} /high Mg^{2+} solution on I_s -EPSP

A 对照;B:灌注低钙/高镁溶液 20 min 后,顺向 AP 及 I_s -EPSP 消失;C:克氏液冲洗 20 min 后,AP 及 I_s -EPSP 恢复;▼ 灌流;↑ 电刺激 CN(1 ms, 25 Hz, 4 s) [A:control; B: superfusion of low Ca^{2+} /high Mg^{2+} solution for 20 minutes, the action potential disappeared; C:Krebs' solution washed for 20 minutes, the action potential and I_s -EPSP recovered;▼ wash;↑ current-stimulating CN(1 ms, 25 Hz, 4 s)]

表 1 SP 去极化与 I_s -EPSP 出现率相互关系

Table 1 The relationship between SP-induced depolarization and I_s -EPSP

	I_s -EPSP 阳性	I_s -EPSP 阴性	合计
出现 SP 去极化	68	11	79
不出现 SP 去极化	46	25	71
合计	114	36	150

$\chi^2 = 12.15, P < 0.05$

表 2 SP 受体脱敏对 I_s -EPSP 的影响 ($n_i = 9, \bar{X} \pm S$)

Table 2 The effect of SP receptor desensitization on I_s -EPSP

	I_s -EPSP 幅度 (mV)	I_s -EPSP 时程 (s)
对照	6.3 ± 1.10	91.2 ± 11.4
BOM 受体脱敏后	3.9 ± 2.26	$52.4 \pm 7.6^{**}$
<i>t</i>	2.86	2.83
<i>P</i>	< 0.05	< 0.05

2.3 I_s -EPSP 与 BOM 的关系

2.3.1 BOM 去极化反应 持续灌流 BOM (10^{-6} mol/L, 1 min), 66.5% (109/164) IMG 细胞

出现去极化,幅度(6.24 ± 0.2) mV,时程(2.77 ± 0.12) min。

2.3.2 I_s -EPSP 与 BOM 去极化的相关性 在 148 个细胞中分别观察 BOM 去极化及 I_s -EPSP 的出现率,结果在 102 个 I_s -EPSP 阳性细胞中, 82 个 (80.4%) 细胞对 BOM 敏感 (表 3)。

2.3.3 BOM 受体脱敏对 I_s -EPSP 的影响 观察 12 个可诱发 I_s -EPSP 且对 BOM 敏感的 IMG 细胞,灌流 BOM (10^{-6} mol/L, 1 min) 可出现明显的去极化反应,但持续灌流外源性 BOM (10^{-6} mol/L) 使 BOM 受体脱敏后膜电位不出现去极化反应,再刺激突触前神经 I_s -EPSP 明显减小 ($n = 9$) 或消失 ($n = 2$) (表 4)。

表 3 BOM 去极化与 I_s -EPSP 出现率相互关系

Table 3 The relationship between BOM-induced depolarization and I_s -EPSP

	I_s -EPSP 阳性	I_s -EPSP 阴性	合计
出现 BOM 去极化	82	24	106
不出现 BOM 去极化	20	22	42
合计	102	46	148

$\chi^2 = 11.07, P < 0.05$

表 4 BOM 受体脱敏对 I_s -EPSP 的影响 ($n_i = 9, \bar{X} \pm S$)

Table 4 The effect of BOM receptor desensitization on I_s -EPSP

	I_s -EPSP 幅度 (mV)	I_s -EPSP 时程 (s)
对照	6.3 ± 1.10	91.2 ± 11.4
BOM 受体脱敏后	3.9 ± 2.26	$52.4 \pm 7.6^{**}$
<i>t</i>	2.86	2.83
<i>P</i>	< 0.05	< 0.05

2.4 I_s -EPSP 与 BOM、SP 的关系 在 102 个细胞上检测了 I_s -EPSP 及对 BOM 和 SP 的不同反应 (表 5)。根据细胞对 BOM 和 SP 反应的不同, 可将细胞分为三类 (1) 对两者均敏感; (2) 仅对一种递质敏感的细胞; (3) 对两者均不敏感的细胞。 I_s -EPSP 阳性细胞中第一类细胞 (32/68, 47.1%) 显著多于 I_s -EPSP 阴性细胞 (10/40, 25.0%; $P < 0.05$); 而第三类细胞中 I_s -EPSP 阳性细胞 (8/68, 11.8%) 则显著少于 I_s -EPSP 阴性细胞 (12/40, 30.0%; $P < 0.05$)。

2.5 BOM 去极化与 SP 去极化的关系

2.5.1 BOM 去极化与 SP 去极化的关系 观察 IMG 细胞对灌流 BOM 及 SP 的敏感性,99 个对 BOM 敏感的细胞中,66 个对 SP 同时敏感,而 34 个对 BOM 不敏感细胞中,27 个同时对 SP 也不敏感(表 6)。

表 5 $1s$ -EPSP 与 BOM、SP 的相互关系

Table 5 The relationship between $1s$ -EPSP, SP and BOM

	BOM、SP 均敏感细胞	BOM 或 SP 敏感细胞	BOM、SP 均不敏感细胞	合计
$1s$ -EPSP 阳性	32	28	8	68
$1s$ -EPSP 阴性	10	18	12	40
合计	42	46	20	108

表 6 BOM 去极化与 SP 去极化的关系

Table 6 The relationship between SP-induced depolarization and BOM-induced depolarization

	BOM 敏感细胞	BOM 不敏感细胞	合计
SP 敏感细胞	66	7	73
SP 不敏感细胞	33	27	60
合计	99	34	133

2.5.2 SP 受体脱敏与 BOM 受体脱敏 在 4 个同时对 BOM 和 SP 敏感的 IMG 细胞上,持续灌流外源性 SP(10^{-6} mol/L)使突触后膜 SP 受体敏感性降低,SP 去极化明显减小,但对灌流 BOM(10^{-6} mol/L)引起的去极化反应无影响。同样方法使 BOM 受体脱敏后对灌流 SP(10^{-6} mol/L)引起的去极化反应亦无显著性影响。

3 讨论

肠系膜下神经节(inferior mesenteric ganglion, IMG)属于交感神经节中的椎前神经节,位于脊柱前方同名动脉根部。IMG 接受多种神经纤维的传入,细胞体或纤维末梢通常含有一种以上的神经递质,在进行突触传递时发生不同程度的整合作用。已有报道 5-HT、VIP、CCK、NKA 等可能是介导豚鼠 IMG 细胞 $1s$ -EPSP 的神经递质^[6,7];形态学实验证实,在同一 IMG 细胞上同时存在 SP 和 BOM 的相应受体^[8],我们以前的研究也发现分别对 SP 和 BOM 敏感并可被引起去极化反应的细胞^[2,3],本实验观察了 SP、BOM 去极化与 $1s$ -EPSP 的相关性及受体脱

敏对 $1s$ -EPSP 的影响,从而从电生理学角度证明了 IMG 细胞膜上存在 SP、BOM 的相应受体。

对 $1s$ -EPSP 与 BOM、SP 之间关系的研究表明, $1s$ -EPSP 阳性细胞中第一类细胞(32/68, 47.1%)显著多于 $1s$ -EPSP 阴性细胞(10/40, 25.0%; $P < 0.05$);而第 3 类细胞中 $1s$ -EPSP 阳性细胞(8/68, 11.8%)显著少于 $1s$ -EPSP 阴性细胞(12/40, 30.0%; $P < 0.05$),提示了在相当一部分 IMG 细胞上有 SP 受体、BOM 受体的共存。Saria 等^[9]曾报道可能同为 $1s$ -EPSP 递质的 SP 和 NKA 存在着明显的受体交互脱敏现象,预先用 NKA 灌注 IMG 细胞,而后用外源性 SP 或重复刺激腹下神经都不能引出 $1s$ -EPSP。那么,SP 受体和 BOM 受体间是否存在相互作用呢?本实验观察到 SP 受体脱敏对 BOM 去极化、BOM 受体脱敏对 SP 去极化均无影响,提示 SP、BOM 可通过各自的突触后膜受体形成 $1s$ -EPSP,两种递质分别对另一种受体的敏感性无影响,不存在交互抑制或交互脱敏现象,从而显示出神经肽类物质受体间作用方式的多样性,而这种相互作用的复杂性则更加支持 $1s$ -EPSP 不是由某一种单一递质介导,多种神经递质参与了 $1s$ -EPSP 的形成,在其中发挥的作用及贡献的组分大小亦不尽相同。

由于 IMG 同四组神经相连,刺激不同来源的神经可在同一细胞上引起不同幅度、不同时期程的 $1s$ -EPSP,因此推测这些起源不同的神经末梢可能释放不同的神经递质。当受到外界刺激时分别释放各自的神经递质,作用于突触后膜的不同受体或同一受体而共同参与 $1s$ -EPSP 的形成,IMG 细胞在此基础上发挥整合作用,发出交感传出冲动至相应的效应器官,调节肠道的分泌与运动等生理功能。

参 考 文 献

[1] 王刚,黄振信,祝延. 肠系膜下神经节-远端结肠的形态、功能学研究进展. 华北煤炭医学院学报, 2002, 4(2):165~167.

[2] 蔡圣荣,王烈成,孔德虎等. 交感神经节细胞对 P 物质和 5-羟色胺的反应. 生理学报, 1999, 51(5):585~586.

[3] 刘芳,孔德虎,祝延. 蛙皮素对豚鼠肠系膜下神经节细胞

- 的生物电影响. 动物学杂志 2001 **36**(5) 23 ~ 27.
- [4] Wang L C ,Cai S G ,Huang Z X ,*et al.* Serotonin receptor subtypes that depolarize guinea-pig inferior mesenteric ganglion neurons. *Brain Res* ,1999 **839** 23 ~ 34.
- [5] 王烈成 ,何延龙 ,祝延等. 豚鼠肠系膜下神经节细胞的慢自发性去极化电位. 蚌埠医学院学报 2001 **26**(4) :288 ~ 289.
- [6] Schumann M A ,Kreulen D L. Action of cholecystokinin octapeptide and CCK-related peptides on neurons in inferior mesenteric ganglion of guinea-pig. *Pharmacol Exp Ther* ,1986 , **239**(2) :618 ~ 625.
- [7] Love J A ,Szurszewske J H. The electrophysiological effects of vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig inferior mesenteric ganglion. *J Physiol (Lond)* ,1987 **394** 67 ~ 84.
- [8] Wang W ,Ma R C. The role of serotonin in non-cholinergic excitatory transmission in the guinea pig inferior mesenteric ganglion. *Brain Res* ,1990 **531**(1-2) :196 ~ 202.
- [9] Saria A ,Ma R C ,Dun N J ,*et al.* Neurokinin A in capsaicin-sensitive neurons of the guinea-pig inferior mesenteric ganglia : an additional putative mediator for the non- cholinergic excitatory postsynaptic potential. *Neuro Science* ,1987 **21**(3) : 951 ~ 958.