

## 促黄体激素-促卵泡激素释放激素对蟾蜍脊神经节细胞胆碱及肾上腺素能受体敏感性的影响<sup>1</sup>

王阿敬、胡谋先、李之望 (同济医科大学实验医学研究中心, 武汉 430030, 中国)

**Effect of LH-FSH releasing hormone on the sensitivities of cholinergic and adrenergic receptors in toad spinal ganglion neurons**

WANG A-Jing, HU Mou-Xian, LI Zhi-Wang  
(Research Center of Experimental Medicine, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT** Intracellular recordings were performed on 81 neurons from 53 isolated toad spinal ganglia (SG). The effects of LH-FSH releasing hormone on the sensitivities of muscarinic receptors and  $\alpha$ -adrenoceptors located on the soma of SG neurons were observed. Perfusing SG with atropine  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  in Ringer's solution depressed the amplitude of depolarization response induced by acetylcholine (ACh,  $10-100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The depolarization and hyperpolarization induced by norepinephrine (NE,  $10-100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were blocked by  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist prazosin and  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist yohimbine respectively. These results indicated that ACh-induced depolarization was mediated by muscarinic receptors while NE-induced depolarization and hyperpolarization were mediated by  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors respectively. On the other hand, perfusing SG with LH-FSH releasing hormone  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  in Ringer's solution increased the depolarization response caused by ACh or NE, but attenuated NE-caused hyperpolarization response. The above results suggest that LH-FSH releasing hormone may modulate the sensitivities of muscarinic receptors and  $\alpha$ -adrenoceptors on the soma membrane of toad SG neurons.

**KEY WORDS** spinal ganglia; LH-FSH releasing hormone; muscarinic receptors; alpha adrenergic receptors; membrane potentials

Received 1990 Sep 1 Accepted 1991 May 13  
<sup>1</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China No 3860571

**摘要** 应用细胞内记录方法, 在离体蟾蜍脊神经节(SG)观察到: 灌流阿托品减小乙酰胆碱(ACh)引起的去极化反应, 哌唑嗪和育亨宾可分别阻断去甲肾上腺素(NE)引起的去极化和超极化反应。LH-FSH释放激素灌流SG增加ACh和NE引起的去极化幅值, 减小NE的超极化幅值, 提示LH-FSH释放激素对SG细胞膜毒蕈碱及 $\alpha$ -肾上腺素能受体敏感性具有调节作用。

**关键词** 脊神经节; 促黄体激素-促卵泡激素释放激素; 毒蕈碱受体; 肾上腺素能 $\alpha$ 受体; 膜电位

哺乳类及两栖类动物脊神经节(Spinal ganglia, SG)神经细胞膜上相继发现了ACh<sup>(1)</sup>, GABA<sup>(2)</sup>, 5-HT<sup>(3)</sup>等受体, 大鼠SG细胞内存在P物质及胆囊收缩素等免疫反应物<sup>(4,5)</sup>。已证实牛蛙交感神经节细胞缓慢兴奋性突触后电位由促黄体激素-促卵泡激素(LH-FSH)释放激素所介导<sup>(6)</sup>。有报道LH-FSH释放激素对交感神经节烟碱受体敏感性具有调节作用<sup>(7)</sup>, 并可减小肾上腺素引起的超极化反应<sup>(8)</sup>。本文通过观察LH-FSH释放激素对胆碱能及肾上腺素能受体敏感性的影响, 探讨调节SG神经元兴奋性变化的某些因素及其对初级感觉传入过程所起的作用。

### MATERIALS AND METHODS

实验动物为中华大蟾蜍, 雌雄不拘, 行椎板切除术分离出连同脊神经的第8或第9脊神经节, 标本固定于灌流小室, 小室容积0.25 ml, 经微量输液器做表面灌流。灌流任氏液成分为( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): NaCl 114, KCl 2,  $\text{CaCl}_2$  2, Tris 10, Glucose 5.6, 充以纯氧, pH 7.4。用内充醋酸钾  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的玻璃微电极进行细胞内记录, 电极电阻 30-40 M $\Omega$ 。双极刺激电极置于脊神经上, 距SG中心点

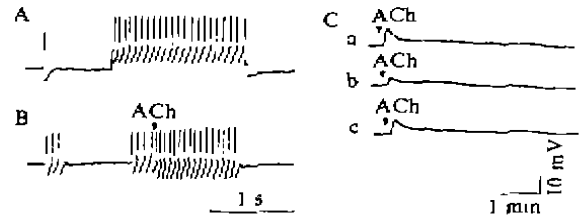
10 mm, 刺激强度 2-10 V, 刺激波宽 0.1 ms, 频率 1 Hz. 细胞膜电位及刺激诱发动作电位由 MEZ-8201 微电极放大器显示于 VC-10 记忆示波器, 并由光电四导生理笔描记录仪进行记录.

所用胆碱及肾上腺素能受体激动剂, 采用滴加方式至灌流小室, 每次 0.01-0.02 ml, 滴加间隔 10 min 以上, 浓度按稀释后瞬间最高浓度计算, 所用试剂有: 氯化乙酰胆碱 (acetylcholine chloride, ACh, 上海试剂三厂), 去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE, 武汉制药厂), 盐酸去氧肾上腺素 (phenylephrine, Phe, 上海第十制药厂), 盐酸可乐宁 (clonidine, Clo, Sigma). 以灌流 SG 方式给药者, 有促黄体生成激素释放激素 (luteinizing hormone releasing hormone, LHRH, 上海东风生化试剂厂), 胆碱及肾上腺素能受体阻断剂, 有硫酸阿托品 (atropine, 武汉制药厂), 氯化筒箭毒 (tubocurarine, 上海第十制药厂), 盐酸哌唑嗪 (prazosin, 北京制药工业研究所), 盐酸育亨宾 (yohimbine, Sigma), 酚妥拉明 (phentolamine, Ciba-Geigy Ltd), 普萘洛尔 (propranolol, 北京制药厂) 等.

**RESULTS**

实验用 53 个 SG 标本, 记录了 81 个神经细胞, 静息膜电位平均值为  $-59.3 \pm 3.2$  mV ( $\bar{x} \pm SD$ , 下同,  $n=81$ ). 根据电刺激脊神经在 SG 细胞内引导的动作电位潜伏期及刺激电极至 SG 中心点的距离, 测得神经元传导速度范围为  $5-12.5$  m · s<sup>-1</sup>, 属 A 类神经元, 一些神经细胞可出现自发放电, 当细胞内输入去极化电流或滴加 ACh 及 NE 引起膜电位去极化时, 可见自发放电增多或频率增加 (Fig 1-2).

**细胞膜的毒蕈碱受体** 滴加 ACh ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 引起 SG 细胞膜产生去极化反应, 去极化幅值  $9.1 \pm 1.2$  mV ( $n=25$ ), 有 3 个神经元对 ACh 无反应. 灌流液中加入毒蕈碱受体



**Fig 1. Effect of ACh on member potential of SG neurons.** A) Depolarization and spontaneous action potentials induced by depolarizing current with an intracellular recording electrode. B) Addition of ACh  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . C) Depolarization induced by ACh was decreased by perfusing atropine  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Cb). Cc) Washing out atropine.

阻断剂阿托品 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可使 ACh 引起的去极化反应幅值减小  $6.8 \pm 1.2$  mV ( $n=10$ ), 与应用阿托品前相比, 二者差别非常显著 ( $P < 0.01$ ).

灌流液中加入烟碱受体阻断剂筒箭毒 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 ACh 引起的去极化反应影响不明显 ( $n=9$ ), 与灌流筒箭毒前相比, 二者差别不显著 ( $P > 0.05$ ).

**细胞膜的  $\alpha$ -肾上腺素能受体** 在 64 个 SG 神经细胞中, 滴加 NE ( $10-100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 引起膜电位去极化者占被测细胞的 64.1%, 去极化幅值  $8.4 \pm 0.7$  mV ( $n=41$ ), 少数细胞可在去极化基础上产生自发放电活动, 相同剂量 NE 引起膜电位超极化者占 26.5%, 超极化幅值  $7.8 \pm 1.1$  mV ( $n=17$ ). 有 6 例对 NE 无反应.

兴奋  $\alpha_1$  受体为主的激动剂 Phe ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可引起 SG 细胞膜去极化反应 ( $n=5$ ), 兴奋  $\alpha_2$  受体为主的激动剂 Clo ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 则产生超极化反应 ( $n=4$ ) (Fig 2).  $\beta$  受体激动剂异丙基肾上腺素 ( $70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 未见引起膜电位反应 ( $n=5$ ).

为进一步证实 SG 细胞膜存在  $\alpha$  受体, 分别应用  $\alpha$  及  $\beta$  受体阻断剂灌流 SG, 观察到:  $\alpha$  受体阻断剂酚妥拉明 ( $3 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可阻断

4.  
★  
9 (225/1)

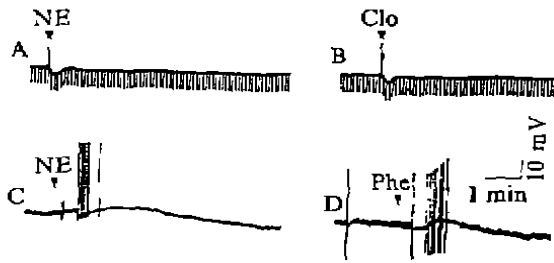


Fig 2. Effect of NE on membrane potential of SG neurons. A) NE  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  induced the hyperpolarization. B) Clonidine  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , in the same neuron. C) Depolarization and spontaneous action potential induced by NE in another neuron. D) Phenylephrine  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , in the same neuron.

NE 引起的去极化或超极化反应 ( $n=8$ ), 而  $\beta$  受体阻断剂普萘洛尔 ( $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 NE 引起的膜电位反应无影响.  $\alpha_1$  受体阻断剂哌唑嗪 ( $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可阻断 NE 引起的去极化反应 ( $n=5$ ).  $\alpha_2$  受体阻断剂育亨宾 ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可阻断 NE 引起的超极化反应 ( $n=6$ ) (Fig 3).

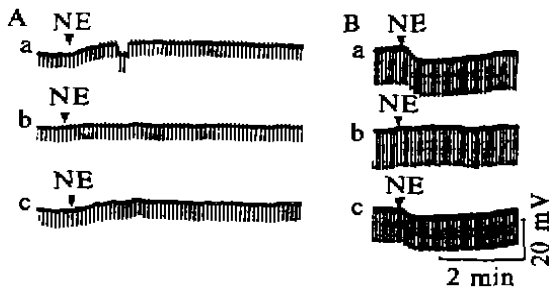


Fig 3. Effect of  $\alpha$ -adrenoceptor blockades on NE-induced depolarization and hyperpolarization. Aa, Ba) NE control. Ab) Prazosin  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  perfusion. Bb) Yohimbine  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  perfusion in another neuron. Ac, Bc) 30 min after washing out prazosin and yohimbine respectively. Downward vertical lines denotes electrotonic potentials caused by intracellular injection of constant current pulses.

LH-FSH 释放激素对 ACh 及 NE 引起膜电位反应的影响 含 LH-FSH 释放激素  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的任氏液灌流 SG, 可使神经细胞

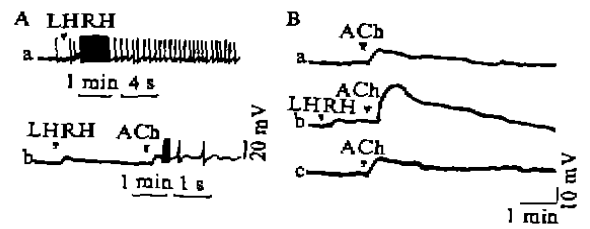


Fig 4. Effect of LH-FSH releasing hormone on ACh-induced depolarization. Aa) LHRH  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  perfusing. Ab) Perfusion with LHRH and addition of ACh  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Ba) ACh control. Bb) LHRH perfusion. Bc) 40 min after washing out LHRH.

产生缓慢去极化反应, 去极化幅值  $4-7 \text{mV}$  ( $n=14$ ), 其中二例在去极化的基础上出现神经元自发放电 (Fig 4A). 相同浓度 LH-FSH 释放激素灌流 SG 后, ACh 引起的去极化幅值较应用前增加  $10.1 \pm 2.2 \text{mV}$  ( $n=8$ ), 二者差别显著 ( $P < 0.05$ ) (Fig 4B). 少数细胞在去极化幅值增加时出现自发放电.

预先灌流 LH-FSH 释放激素 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可使 NE 引起的超极化幅值减小  $6.3 \pm 1.9 \text{mV}$  ( $n=6$ ), 与应用 LH-FSH 释放激素前相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 而灌流相同剂量 LH-FSH 释放激素后, NE 引起的去极化幅值较灌流前平均增加了  $2.5 \text{mV}$  ( $n=5$ ) (Fig 5).

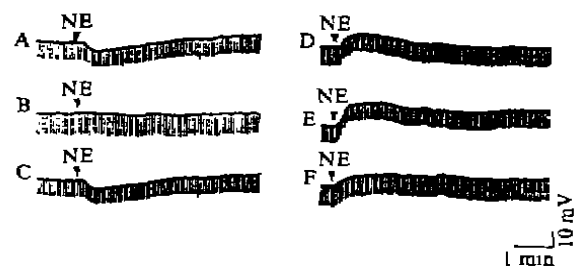


Fig 5. Effect of LH-FSH releasing hormone on NE-induced hyperpolarization and depolarization. A) NE control. B) LHRH  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  perfusion. C) 30 min after washing out LHRH. D) NE control, in another neuron. E) LHRH perfusion. F) 30 min after washing out LHRH.

DISCUSSION

Marita 等<sup>(1)</sup>在牛蛙的 SG 曾证实 ACh 可引起两种膜电位反应, 烟碱受体介导快去极化反应, 毒蕈碱受体介导长时程的去极化反应, 本工作在蟾蜍的 SG 实验表明, ACh 仅引起长时程的去极化反应, 灌流阿托品可减小或阻断 ACh 的此种反应, 而箭毒的阻断作用不明显. 提示蟾蜍 SG 细胞膜存在毒蕈碱受体, 该受体激活可使细胞膜产生去极化反应, 有些细胞可出现自发放电或使原有放电频率增加, 表明毒蕈碱受体激活对 SG 细胞具有兴奋性影响, 并有可能对初级感觉信息的传入产生作用.

有关蟾蜍及大鼠 SG 细胞膜存在  $\alpha_1$  及  $\alpha_2$  受体本室曾有报道<sup>(9,10)</sup>. 本文进一步观察到 NE 引起去极化或超极化反应的细胞所占比例是不同的. 此外, 应用  $\alpha_2$  受体阻断剂育亨宾灌流 SG 可使 NE 引起超极化反应的细胞对 NE 呈现去极化反应, 而灌流  $\alpha_1$  受体阻断剂哌唑嗪后, NE 引起去极化反应的细胞有的呈现出超极化反应. 结果表明 SG 细胞膜可能同时存在不同密度的  $\alpha_1$  及  $\alpha_2$  受体, 它们分别介导 NE 引起的去极化或超极化反应.

细胞膜受体对激动剂的敏感性可受各种因素的影响, 已知一些多肽可调节神经细胞的兴奋性, 其中 LH-FSH 释放激素能否对膜受体敏感性产生影响是值得探讨的问题. 本实验观察到, LH-FSH 释放激素除引起蟾蜍 SG 细胞膜电位低幅值、缓慢去极化反应外, 有的细胞在去极化基础上仍产生自发放电活动. 当应用 LH-FSH 释放激素灌流 SG 后, 观察到可逆地增加 ACh 及 NE 引起的去极化反应幅值, 减小 NE 引起的超极化幅值. 上述结果提示, LH-FSH 释放激素可能作为一种调节物通过对 SG 细胞膜的毒蕈碱受体及  $\alpha$  肾上腺素能受体敏感性的影响而对 SG 神经元产生兴奋性作用, 这种兴奋作用对初级感觉信息的

传入可产生易化影响.

ACKNOWLEDGMENT 本文曾得到同济医科大学药理教研室钱家庆教授指正.

REFERENCES

- 1 Marita K, Katayama Y. Two types of acetylcholine receptors on the soma of primary afferent neurons. *Brain Res* 1984; 290 : 348
- 2 De Groat WC, Lalley PM, Saum WR. Depolarization of dorsal root ganglia in the cat by GABA and related amino acids: antagonism by picrotoxin and bicuculline. *Brain Res* 1972; 44 : 273
- 3 Holziv GG, Shefner SA, Anderson EG. Serotonin depolarizes type A and C primary afferents, an intracellular study in bullfrog dorsal root ganglion. *Brain Res* 1985; 327 : 71
- 4 Hökfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, Schultzberg M. Peptidergic neurones. *Nature* 1980; 284 : 515
- 5 Larsson L-I, Rehfeld JF. Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. *Brain Res* 1979; 165 : 201
- 6 Jan LY, Jan YN. Peptidergic transmission in sympathetic ganglia of the frog. *J Physiol (Lond)* 1982; 327 : 219
- 7 Akasu T, Kojima M, Koketsu K. Lutcinizing hormone-releasing hormone modulates nicotinic ACh-receptor sensitivity in amphibian cholinergic transmission. *Brain Res* 1983; 279 : 347
- 8 Smith PA, Zidichouski JA. Muscarine and luteinizing hormone releasing hormone attenuate adrenaline induced hyperpolarization in amphibian sympathetic ganglia. *Br J Pharmacol* 1985; 84 : 221
- 9 Hu MX, Wang AJ, Leng M, Wang SD, Li ZW. Measurement of electrical characteristics of somatic membrane and its application in dorsal root ganglion neurone *in vitro*. *Acta Univer Med Tongji* 1989; 18 : 173
- 10 Wang AJ, Li ZW, Hu MX, Wang SD, Leng M. Ionic mechanism of noradrenaline-induced membrane potential changes of neurons in toad dorsal root ganglion. *Acta Physiol Sin* 1989; 41 : 145