

半夏凝集素对神经末梢乙酰胆碱量子释放的易化^{1,2}

施玉梁、徐幼芬、王文萍、徐科、郭钰³、王克夷³
 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031, 中国)

R 965.2

Facilitatory effect of *Pinellia ternata* lectin on quantal release of acetylcholine from nerve terminals

SHI Yu-Liang, XU You-Fen, WANG Wen-Ping, XU Ke, GUO Meng³, WANG Ke-Yi³
 (Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT *Pinellia ternata* lectin (PTL) extracted from the rhizome of *Pinellia ternata* Briet by porcine thyroglobuline-Sepharose 4B column exhibits hemagglutination activity and carbohydrate binding specificity for mannan. Here we reported the effects of PTL on the resting membrane potential of muscle fiber and on the release of acetylcholine (ACh) from the motor nerve terminals in the phrenic nerve diaphragm preparations of mice. The results showed that PTL increased the frequency of miniature end-plate potential (MEPP). In 30 min after the treatment of the preparation with lectin $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, the frequency of MEPP reached 20 times higher than that of the control. Addition of mannan $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ restored the raised discharge of MEPP to its control level immediately. Similar to the effect of PTL on MEPP frequency, the amplitude and mean quantal content of end-plate potential also increased after PTL. At $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, the lectin depolarized the muscle membrane slightly, while at $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ no effect on the membrane potential was found. These results were interpreted as the intracellular Ca^{2+} elevation due to a permeability increase of the nerve terminal to ions after PTL.

KEY WORDS *Pinellia ternata*, lectins; neuromuscular junction; electrophysiology

提要 用细胞内微电极记录法, 在小鼠膈神经膈肌标本上观察了半夏凝集素(PTL)对神经肌肉接头传递的作用。PTL $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 可易化神经末梢乙酰胆碱自发和诱发的量子释放, 提高小终板电位发放频率和终板电位的量子含量, 使肌细胞膜产生轻度去极化, 但终板电位振幅仍有增大。此 PTL 的接头前作用可为其专一结合糖, 甘露聚糖 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 所拮抗。

关键词 半夏; 外源凝集素; 神经肌肉接头; 电生理学

中药半夏用于镇咳祛痰等多种疾患, 用结晶法从半夏(*Pinellia ternata* Breit)的块茎鲜汁中分离出的半夏蛋白(pinellin)^[1]具有抗早孕作用, 凝集素活性和很特异的对甘露聚糖的结合专一性^[2]。半夏凝集素(*pinellia ternata* lectin, PTL)是用猪甲状腺球蛋白-Sepharose 4B 柱从半夏块茎的硫酸铵糊中分离得到的, 经鉴定, 它和半夏蛋白很可能是同一蛋白^[3]。本文利用细胞内微电极记录方法, 在小鼠膈神经膈肌标本上, 研究 PTL 对骨骼肌细胞膜静息电位和运动神经末梢的乙酰胆碱(ACh)量子释放的作用, 以及甘露聚糖对这些作用的影响。

MATERIALS AND METHODS

成年小鼠取自动物中心, 体重 $25 \pm s 2 \text{ g}$, ♀♂皆用, 膈神经膈肌标本的制备, 保养与在大鼠实验时相同^[4,5]。标本溶液为通气(95% O_2 和 5% CO_2 的混和气体), 保温(33-35℃)的 Krebs 溶液。

按通常的细胞内记录方法, 以 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液灌充的玻璃微电极, 记录肌细胞膜的静息电位和代表 ACh 从运动神经末梢自发量子式释放的小终板电位(MEPP)^[4-6]。利用筒箭毒碱($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)处

Received 1991-06-12

Accepted 1992-06-11

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 8388013.

² Presented at the Shanghai Neurosciences Society, 1990 Sep 24-25, Shanghai, China. Abstract published in *Chin J Physiol Sci* 1991; 7: 79

³ Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China.

理的标本观察 PTL 对终板电位的影响, 在高 Mg^{2+} ($12 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$) 溶液中记录神经末梢 ACh 诱发释放的终板电位(EPP), 并由 EPP 的脱落率计算 EPP 的平均量子含量^[10]。

PTL, 天花粉蛋白(trichosanthin, or tianhuafen) 和豌豆凝集素(pea lectin)是我们分别按王克夷的报道(王克夷, 徐继华, 俞鹤年, 半夏凝集素的分离和鉴定 上海市生化学会 1989 年年会论文摘要汇编 1989; 49-50)文献(7)制备的。

RESULTS

肌细胞膜的静息电位 当 PTL 的浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 未观察到小鼠膈神经膈肌接头的兴奋传递和肌细胞膜的静息膜电位产生有意义的变化, 但当 PTL 浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时即观察到它对静息膜电位的作用, Tab 1 表示于 4 个标本的肌肉中的 27 个终板区所记录的结果, 在 PTL 的浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 作用 30 min 后, 静息膜电位由对照的 74 mV 降低至 69 mV ($P < 0.01$), 即出现了轻度的去极化, 我们所试的另外两种凝集素, 天花粉凝集素和豌豆凝集素虽同为植物凝集素, 但在 $50-200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的浓度范围内, 却未发现对肌细胞膜的静息电位有明显作用(Tab 1), 这与在人工膜上亦未观察到它们形成通道的结果(施玉梁等未发表资料)是一致的。

MEPP 的发放频率 PTL 浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时无明显作用, 但当高于 $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时 PTL 增加 MEPP 的发放频率, 如 Tab 2 所示, 在 4 块肌肉的 40 个神经肌肉接头, 加入 PTL ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 30 min 后, MEPP 的发放频率由对照的每秒 0.5 次增加至每秒 10.9 次, 与之同时, 同样浓度范围的天花粉凝集素和豌豆凝集素却对 MEPP 的发放频率无明显影响, PTL 的专一结合糖, 甘露聚糖对 PTL 的这种易化 MEPP 发放频率的作用有明显的拮抗效应, 即当加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的甘露聚糖后, MEPP 的发放频率立即下降, 恢复到标

本的对照发放水平(Tab 1)。

Tab 1. Actions of pinellia ternata lectin (PTL), trichosanthin and pea lectin (all were $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) on resting membrane potential and frequency of miniature end-plate potential (MEPP) recorded from diaphragm of mice. $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$, * $P < 0.01$ vs control.**

	PTL	Trichosanthin	Pea lectin
Resting membrane potentials (mV)			
End-plates / Muscles	27 / 4	15 / 2	15 / 2
Control	74 ± 6	74 ± 8	70 ± 8
After 30 min	$69 \pm 6^{***}$	$73 \pm 7^*$	$70 \pm 4^*$
Frequency of MEPP (s^{-1})			
End-plates / Muscles	40 / 4	30 / 3	20 / 2
Control	0.5 ± 0.3	1.0 ± 0.6	0.7 ± 0.4
After 30 min	$10.9 \pm 2.5^{***}$	$1.1 \pm 0.8^*$	$0.6 \pm 0.5^*$
Mannan / $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	$0.8 \pm 0.4^*$		

将记录电极固定于一个终板区作连续记录, 便可观察到 MEPP 的发放频率在 PTL 加入之后的变化时程, PTL $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的易化作用, 一般在加入 20 min 后出现, 30 min 后达峰值, 50 min 时又降至接近对照值(Fig 1), 在不同标本, 不同接头, PTL 易化 MEPP 的自发发放频率的增加幅度可以有很大的差异, 在有些接头, 加入 PTL 30 min 后, 甚至可以记录到超过每秒 200 次的高频发放。

EPP 的平均量子含量 先将标本浸泡于高 Mg^{2+} 低 Ca^{2+} 溶液中, 至少稳定 45 min 后, 统计 EPP 的失败率, 并以此计算出 EPP 的平均量子含量, 经这样数次测试, 量子含量稳定后, 开始测定对照值, 然后加入 PTL, 再在同样刺激参数下, 统计 EPP 失败率, 观察平均量子含量的变化, 我们在用 PTL 100 和 $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 观察的数次实验中均发现 PTL 明显改变 EPP 的量子含量, 如 Fig 2 所示的二例, 其作用时程与 PTL

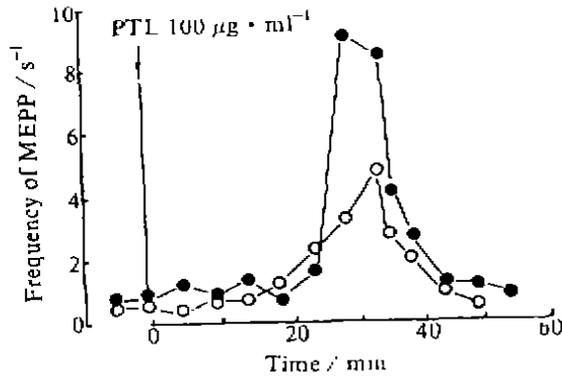


Fig 1. Effect of PTL $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ on frequencies of miniature end plate potential (MEPP) at 2 end plate regions.

对 MEPP 发放频率的易化时相一致, 亦在加药后 20 min 开始, 30 min 后达峰值, 50 min 时又下降至对照 (Fig 2).

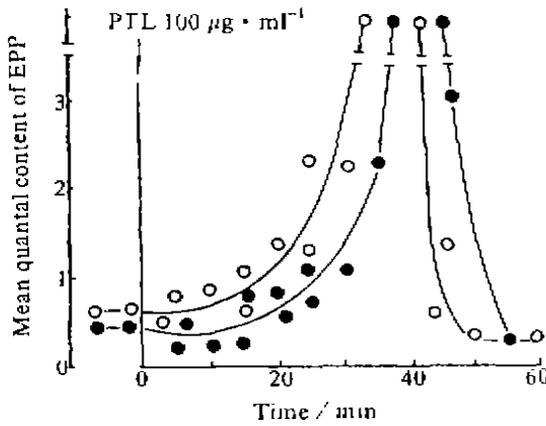


Fig 2. Effects of PTL $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ on mean quantal content of end-plate potential (EPP) in 2 experiments.

EPP 在经筒箭毒碱处理 40-60 min 后的标本, 记录到振幅大小稳定的 EPP 后, 加入 PTL, 连续记录观察 EPP 振幅和波形的变化. PTL 虽然使肌细胞膜产生轻度去极化, 但在 $50-200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度时, 我们却未观察到 EPP 振幅的下降. Fig 3 给出二例的结果. $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ PTL 作用 20 min 后, EPP 振幅由对照的 $0.95 \pm 0.09 \text{ mV}$ 增大至 1.18 ± 0.12

mV ($P < 0.01$), 另一实验中, $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ PTL 的结果是, 对照 $1.23 \pm 0.09 \text{ mV}$, 作用 40 min 后为 $1.36 \pm 0.12 \text{ mV}$ ($P > 0.5$). 从 Fig 3 看来, $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 比 $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时增大更明显.

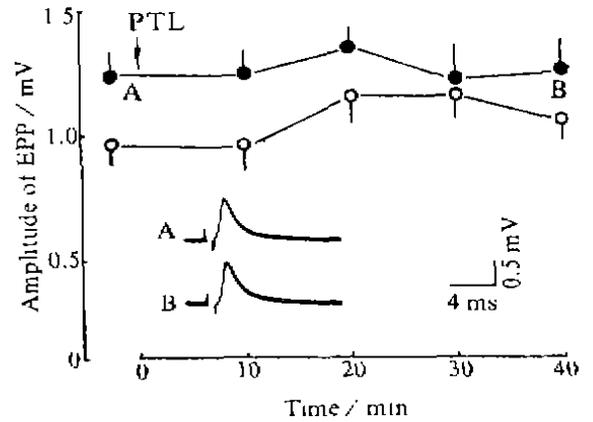


Fig 3. Effect of PTL on EPP. Each point was 8-15 end-plate potentials. PTL $100 (\square)$ and $200 (\bullet) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Insert: EPP oscillogram at A and B.

DISCUSSION

本文首次报告了一个植物来源的凝集素 PTL, 对运动神经末梢 ACh 的量子释放的易化作用和对肌细胞膜的轻度去极化效应.

ACh 从运动神经末梢的量子释放是一个依 Ca^{2+} 过程. MEPP 发放频率的增加反映末梢内自由 Ca^{2+} 浓度的升高; 终板电位平均量子含量的增大, 提示在神经冲动诱发下神经末梢内 Ca^{2+} 浓度的瞬时增加量升高. 神经末梢内自由 Ca^{2+} 浓度, 主要受控于两个过程: 末梢内的 Ca^{2+} 缓冲系统和末梢膜的离子通透性. 如果在 PTL 作用下, 神经末梢膜的离子通透性增加, 则细胞外的 Ca^{2+} 将顺其电-化学梯度流入神经末梢, 从而引起末梢内的 Ca^{2+} 升高和递质释放的易化. 目前虽尚无直接资料证明 PTL 增大神经末梢膜的离子通透性, 但以下两个结果: 1) PTL 使肌细胞膜产生轻度去

极化; 2) PTL 在人工脂双层形成阳离子通道, 从而增大膜电导⁽⁸⁾, 对 PTL 增大神经末梢膜的离子通透性, 从而易化递质释放的解释, 提供了间接支持。

当然, 尚存在着另一种可能性, 即 PTL 阻断了接头前膜上的早期钾离子通道, 从而延长神经末梢动作电位的时程, 导致 Ca^{2+} 内流和 MEPP 发放频率的增加。因为 β -银环蛇毒素(β -bungarotoxin)和 β -蠍蛇毒素(β -agkistrotoxin)等突触前毒素对 MEPP 发放频率的作用都是先增加, 然后再降低直至停止发放, 而绿曼巴蛇毒(dendrotoxin)则只是引起 MEPP 频率的增加。据近年的研究结果, 这些毒素引起 MEPP 发放频率的上升被认为是它们阻遏了神经末梢膜的早期电压门控钾离子通道的结果⁽⁹⁾。

甘露聚糖是 PTL 的专一结合糖, 在先前的琼脂扩散实验中曾发现, 只有甘露聚糖能与 PTL 形成沉淀带⁽²⁾。本文观察到, PTL 对神经末梢 ACh 释放的易化作用可被甘露聚糖所取消的结果表明, 如果这种易化作用来源于 PTL 在膜上形成了离子通道, 则甘露聚糖一定会以某种方式抑制 PTL 的通道活动。这在人工脂双层做的研究已得到证实⁽⁸⁾。

REFERENCES

- 1 Tao ZJ, Xu QY, Wu KZ, Lian SH, Sun D. Isolation, crystallization, biological activities and some chemical characteristics of pinellin. *Acta Biochim Biophys Sin* 1981; 13: 77-82.
- 2 Wang KY, Tao ZJ, Wu KZ, Mo HQ, Lee SY, Sun D, et al. The carbohydrate binding specificity of pinellin lectin. *Acta Biochim Biophys Sin* 1981; 13: 423-6.
- 3 Lee SY, Wang KY, Wu KZ. Procine thyroglobuline-p-aminobenzylsulfonylethyl (ABSE)-cross-linked agar - An affinity absorbent to purify a variety of lectins of different specificities. *Acta Biochim Biophys Sin* 1983; 15: 271-7.
- 4 Shih YL, Shen KF. Some observation on miniature end-plate potential of rat neuromuscular junction paralyzed by botulinum toxin. *Kexue Tongbao* 1975; 20: 97-100.
- 5 Shi YL, Yan SQ, Wang WP, Xu K. Effects of dielsin B on nerve-muscle preparations. *Acta Pharmacol Sin* 1983, 4: 166-9.
- 6 del Castillo J, Katz B. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol (Lond)* 1954; 124: 560-73.
- 7 Xu JH, Wang KY. A study of hydrophobic binding properties of lectins. *Acta Biochim Biophys Sin* 1991; 23: 169-73.
- 8 Shih YL, Wang WP, Zhang H, Guo M, Wang KY. Cation channels formed in lipid bilayer by *Pinellia ternata* lectin, a protein. *Acta Physiol Sin* 1992; 44: 142-8.
- 9 Dolly JO, Poulain B, Maisey EA, Breeze AL, Wadsworth JD, Ashton AC et al. Neurotransmitter release and K^+ channels probed with botulinum neurotoxins and dendrotoxin. In: Dolly JO, editor. *Neurotoxins in neurochemistry*. Chichester: Ellis Horwood, 1988: 79-99.

《药理学报》1993 年征订启事

《药理学报》由中国药学会主办, 国内外公开发行人。本刊内容包括药理学、天然药物化学、合成药物化学、药物分析、药剂、生药学与抗生物素等方面的研究论文、研究简报、学术动态、综述与述评等。

本刊为月刊, 每期 80 页, 每期定价国内本 3.50 元, 国外本 10.00 元。国内读者请到当地邮局订阅, 也可直接汇款寄本刊编辑部。国内期刊代号: 2-233; 国外读者请向中国国际图书贸易公司(中国国际书店, 北京 399 信箱) 订阅, 国外期刊代号: M 105。编辑部地址: 100050 北京市先农坛街 1 号。