

- 9 Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; **16**: 359-64.
- 10 Zhao ZD, Li A, Yang ZC, Dong YL. A new method for determination of superoxide dismutase activity-alkaline dimethylsulfoxide-luminol chemiluminescence method. *Prog Biochem Biophys* 1987; (6): 55-9.
- 11 Szeleenyi I, Brune K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 1988; **33**: 665-71.
- 12 Ogiuo K, Oka S, Okazaki Y, Takemoto T. Gastric mucosal protection and superoxide dismutase. *J Clin Gastroenterol* 1988; **10** (Suppl 1): S129-S132.
- 13 Sato N, Kawano S, Tsuji S, Kamada T. Microvascular basis of gastric mucosal protection. *J Clin Gastroenterol* 1988; **10** (Suppl 1): S13-S18.

(浙江医科大学药理教研室, 杭州310006, 中国)

目的: 研究地尔硫草(Dil)抗大鼠实验性胃粘膜损伤的作用, **方法:** 胃粘膜损伤由吲哚美辛、束缚应激、结扎幽门和无水乙醇引起, Dil ig, 一日2次, 共5次. **结果:** Dil 5, 25, 50 mg \cdot kg⁻¹ ig 能抑制大鼠胃粘膜损伤, 抑制胃酸分泌及胃蛋白酶分泌和活性, 减少胃粘膜中 Mal 含量(自 9.3 \pm 3.7 至 6.5 \pm 1.9 μ mol/g wet wt), 提高胃粘膜中 SOD 活性(自 6.1 \pm 5.6 至 12.8 \pm 2.8 kU/g protein). **结论:** Dil 抗实验性胃溃疡作用与抑制胃液分泌、减少胃粘膜 Mal 含量和提高 SOD 活力有关.

地尔硫草抗大鼠胃溃疡作用

雍定国, 耿宝琴, 李阳, 毕胜

关键词 地尔硫草; 胃溃疡; 胃酸; 胃蛋白酶 A; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 自由基

BIBLID: ISSN 0253-9756

Acta Pharmacologica Sinica

中国药理学报

1995 Nov; 16 (6): 520-523

大鼠颈上神经节培养神经元烟碱电流及美加明的使用依赖性阻滞¹

刘青松, 何湘平, 刘传绩 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京100850, 中国)

Nicotinic currents of cultured rat superior cervical ganglion neurons and use-dependent block by mecamylamine

LIU Qing-Song, HE Xiang-Ping, LIU Chuan-Gui (Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

AIM: Comparison of action of nicotinic agonists and antagonists on nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) in superior cervical ganglion (SCG) neurons. **METHODS:** Whole-

cell recordings were made from cultured neonatal rat SCG neurons. Cholinergic drugs were applied by local pressure perfusion. **RESULTS:** The neurons were activated by nicotinic agonists and peak current were acetylcholine (ACh), 443 \pm 183 pA; nicotine, 1175 \pm 377 pA; dimethylphenylpiperazinium (DMPP), 2946 \pm 358 pA, respectively. The nicotinic responses were blocked by mecamylamine (Mec), hexamethonium and curare, the efficacies were 435 \pm 154 pA, 725 \pm 320 pA, 887 \pm 214 pA, but not by α -bungarotoxin. The block by Mec was use-dependent, i.e. it was dependent on repeated presentation of the agonists. The first 6 peak currents were expressed as percentage of the first

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39130090.

Received 1994-10-18

Accepted 1995-03-20

520-523

R 965.2

11

response as following: $100, 64 \pm 3, 50 \pm 3, 41 \pm 4, 36 \pm 4, 32 \pm 3\%$. **CONCLUSION:** The present data suggest that nAChR of SCG neurons have different pharmacological characteristics from that of muscle or central neurons.

KEY WORDS mecamlamine; nicotinic receptors; sympathetic ganglia; electrophysiology; cultured cells

目的: 比较几种烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)激动剂及拮抗剂对颈上神经节(SCG)培养神经元nAChR的作用和SCG培养神经元nAChR的药理特征。**方法:** 用全细胞膜片钳技术结合局部压力喷射给药观察培养的新生大鼠SCG神经元对胆碱能药物的反应。**结果:** 所测试的交感神经元均可被nAChR激动剂所激动,激动剂在相同浓度下诱发的电流峰值分别为:乙酰胆碱(ACh), 443 ± 183 pA; 烟碱, 1175 ± 377 pA; 碘化1,1-二甲基-4-苯基哌嗪(DMPP), 2946 ± 358 pA。在几种nAChR拮抗剂中,美加明(Mec),六烃季胺,箭毒在相同浓度下拮抗DMPP引起的全细胞电流的峰值分别为: 435 ± 154 pA, 725 ± 320 pA, 887 ± 214 pA, 但 α -银环蛇毒对之无影响。Mec对DMPP电流的拮抗具有使用依赖性。当Mec $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与DMPP $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合向SCG神经元压力喷射时,前6次电流分别为第一次的%; $100, 64 \pm 3, 50 \pm 3, 41 \pm 4, 36 \pm 4, 32 \pm 3\%$ 。**结论:** SCG神经元的nAChR与骨骼肌及中枢nAChR有不同的药理特征。

关键词 美加明; 烟碱型受体; 交感神经节; 电生理学; 培养的细胞

烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)参与颈上神经节(superior cervical ganglion, SCG)神经元之间的快兴奋性突触传递,在机体自主功能调节中起重要作用。为此在分散培养的新生大鼠SCG交感神经元标本上,我们用全细胞

膜片钳技术观察分析了nAChR的电生理及药理学性质,特别是美加明(Mec)对神经节型nAChR的使用依赖性阻滞作用。

MATERIALS AND METHODS

交感神经元培养 参照Wakshull等的方法^[1],选当日生Wistar大鼠,在无菌条件下取颈上神经节,剪成3-4小块,在含0.25%胰蛋白酶的L-15培养基中消化30-40 min,将上述组织块用玻璃吸管吹打成单细胞悬液,按每个神经节种两皿的密度接种在预先涂有鼠尾胶的35-mm培养皿中,在36°C, 5% CO₂/95%空气中培养。每周半量换液2次。培养基成分为10%马血清,90% MEM,葡萄糖 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaHCO₃ $31 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, HEPES $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,青霉素 $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$,链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,另加1:20神经生长因子(NGF)粗制剂^[2]。

电生理记录 采用高阻封接全细胞膜片钳技术^[3]记录电信号。膜片钳放大器为Axopatch1-D,附加CV-4 1/100探头。信号首先采集到数字式磁带记录仪(DTC-75ES, Unitrade)贮存,然后由计算机通过pClamp 5.5.1及TL-I接口采入,采样频率为1-2 kHz。电极内液为CsCl 140, egtazic acid 10, HEPES $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KOH调pH至7.2。细胞外溶液为NaCl 150, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, glucose 10, HEPES $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaOH调pH至7.4。电极电阻1-3 M Ω ,封接电阻 $\geq 1 \text{ G}\Omega$ 。

给药 药物用细胞外液配成所需要的浓度并充灌于开口为2-3 μm 的玻璃微电极中。用BH-2压力注射仪(Medical Systems Corp. USA)对记录神经元加压喷射(50-200 ms, 70-100 kPa)^[4]。电极与细胞相距约10 μm 。

α -银环蛇毒(α -bungarotoxin, α -BTX)由广西蛇毒研究所出品,其余药品均购自Sigma。

统计 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验或方差分析(ANOVA)。

RESULTS

nAChR激动剂的作用 所有被测试的交感神经元均对外源性nAChR激动剂乙酰胆碱(ACh),烟碱和碘化1,1-二甲基-4-苯基哌嗪

(DMPP)敏感。预实验观察发现 nAChR 激动剂引起的电流随培养天数增加(0-5 d)逐渐增大,到 d 5-10时相对稳定。因此下面的记录结果均出自培养5-10 d 的交感神经元。

当膜电位钳制在-60 mV 时,加压喷射各 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 nAChR 激动剂 ACh, 烟碱及 DMPP 引起内向电流的峰值分别为: ACh, 443 \pm 183 pA ($n=12$); 烟碱, 1175 \pm 377 pA ($n=10$); DMPP, 2946 \pm 358 pA ($n=10$)。方差分析表明, 各组峰值之间均有显著差异($P<0.05$, Tab 1)。因此在相同剂量下, 三种激动剂对交感神经元作用强度顺序为 DMPP>烟碱>ACh。在下面的实验中以 DMPP 为代表来研究 nAChR 的性质。

nAChR 拮抗剂对 DMPP 电流的作用 以加压喷射 DMPP 引起的全细胞电流做对照, 观察几种 nAChR 拮抗剂对 DMPP 电流的作用。Mec, 箭毒及六烃季胺以 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度, α -BTX 以 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度分别与 DMPP 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 混合压力喷射。在检测 α -BTX 的作用时, 除将 α -BTX 与 DMPP 混合压力喷射外, 还将 α -BTX 以 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度预先(10-120 min)加入细胞外液中。除 α -BTX 外, 其它三种拮抗剂对 DMPP 电流均有显著的拮抗作用, 表现为在拮抗剂存在时 DMPP 电流峰值减少。配对 t 检验表明, 这三种拮抗剂组与 DMPP 组之间电流峰值差别具有显著意义($P<0.01$, $n=6-8$), 而 α -BTX 组与 DMPP 之间差别无显著意义($P>0.05$, $n=5$)。另外, 我们还观察了 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下这三种拮抗剂的作用。在 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时这三种拮抗剂对 DMPP 电流已有拮抗效应, 并且随浓度增加拮抗效应加强, 但在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时仍不能完全取消 DMPP 电流(Tab 1)。

Mec 对 DMPP 电流的使用依赖性阻断

当重复喷射 DMPP 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 如果喷射的频率大于 0.1 Hz, DMPP 电流幅度逐渐变小, 出现失敏现象; 但以 0.03 Hz 的频率喷射

Tab 1. Peak currents induced by nicotinic agonists and effects of various nicotinic antagonists on DMPP-activated currents. A one-way ANOVA of peak currents induced by nicotinic agonists revealed significant difference ($P<0.05$) between each group and other two groups. * $P>0.05$, † $P<0.01$ vs DMPP. α -BTX = α -bungarotoxin; Hexa = hexamethonium.

Drug/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cells	Peak current/pA
ACh (100)	12	443 \pm 183
Nicotine (100)	10	1 175 \pm 377
DMPP (100)	10	2 946 \pm 358
DMPP (100) + α -BTX (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	5	2 626 \pm 560*
DMPP (100)+Curare (10)	6	887 \pm 314†
DMPP (100)+Hexa (10)	8	725 \pm 320†
DMPP (100)+Mec (10)	8	435 \pm 154†

时, DMPP 电流幅度保持不变。我们选定以每分一次的频率喷射 DMPP 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DMPP 所引起的电流次与次之间无显著差别, 电流幅值较为恒定; 而将 Mec 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 DMPP 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 混合压力喷射时, 最初 5-6 次喷射所产生的电流幅值逐渐减小, 随后电流幅值趋于稳定(Fig 1)。观察了 5 例交感神经元对单独压力喷射 DMPP 以及 DMPP 与 Mec 混合压力喷射的反应, 所产生的全细胞电流均以第一次喷射产生电流的百分数来表示。Mec 组前 6 次电流分别为第一次的%: 100, 64 \pm 3, 50 \pm 2.8, 41 \pm 4, 36.2 \pm 3.8, 32.1 \pm 3.7%。将 Mec 减至 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, DMPP 电流递减更为缓慢; 当增至 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 第 2 次压力喷射便达到稳态值。而箭毒及六烃季胺对 DMPP 电流的阻断程度则不随重复注射而改变。可见 Mec 对 nAChR 通道的阻断发生于受体通道不断被激动剂打开“使用”的过程中, 属使用依赖性阻断(use-dependent block)。

第一次压力喷射 Mec 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与

DMPP $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引起的电流幅度也比单独喷射 DMPP $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 所引起的电流幅度要小 (Fig 1), 说明美加明对 DMPP 电流的拮抗有一部分产生于神经元与 DMPP 接触之前或接触的过程中。

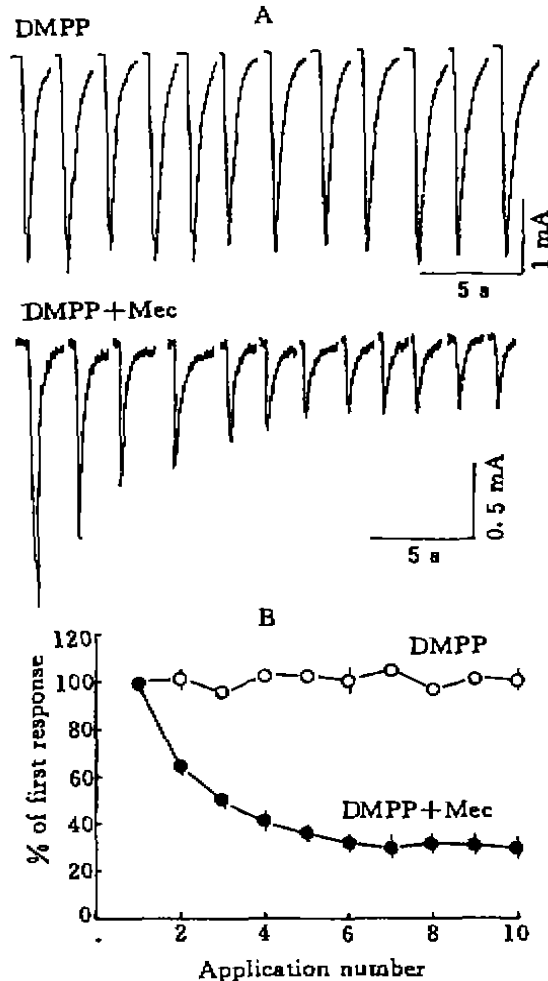


Fig 1. Effects of mecamylamine (Mec) on DMPP-activated currents. A) DMPP $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ was applied alone or co-applied with Mec $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ by pressure injections at 1-min intervals. B) peak currents were expressed as percentages of the first responses. $n=5$.

DISCUSSION

ACh 对大鼠僵核 nAChR 作用比 DMPP

更强^[5]。骨骼肌 nAChR 对 α -BTX 高度敏感^[6]。本实验结果显示, 在培养的 SCG 神经元上, DMPP 作用比 ACh 强, 而 α -BTX 对 DMPP 电流无拮抗作用, 表明神经节型 nAChR 与骨骼肌及中枢 nAChR 有不同的药理特性。

Mec 对 DMPP 电流的拮抗需激动剂持续存在, 属使用依赖性阻断。其产生是因为随着激动剂将受体通道打开, 拮抗剂分子不断落入受体通道的“陷阱”^[7]。本实验结果, Mec 产生使用依赖性阻断的前提是 Mec 与开放通道的结合与解离比通道的开关速率慢, 而且解离的速率更慢。这样随着 nAChR 通道的开放, Mec 不断进入通道, 阻止了通道的继续开放, 出现了使用依赖性阻断。

REFERENCES

- 1 Wakshull E, Johnson MI, Burton H. Postnatal rat sympathetic neurons in culture. I. A comparison with embryonic neurons. *J Neurophysiol* 1979; **42**: 1410-25.
- 2 Bocchimi V, Angeletti PU. The nerve growth factor: purification as a 80,000-molecular-weight protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; **64**: 787-94.
- 3 Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981; **391**: 85-100.
- 4 Dingle R, editor. *Brain slices*. London: Plenum, 1984; 381-432.
- 5 Mulle C, Vidal C, Benoit P, Changeux JP. Existence of different subtype of nicotinic acetylcholine receptor in the rat habenulo-interpeduncular system. *J Neurosci* 1991; **11**: 2588-97.
- 6 Galzi JL, Revah F, Bessis A, Changeux JP. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annu Rev Pharmacol* 1991; **31**: 37-72.
- 7 MacDonald JF, Miljkovic Z, Pennefather P. Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. *J Neurophysiol* 1987; **58**: 251-66.