

胆酸盐对蟾蜍皮肤静息电位的影响

李宏钧 周汉清

(复旦大学生物系)

近年来一些学者研究了胆酸盐对各种组织和细胞作用的理化效应^[1-3]。他们特别感兴趣的是这种物质对细胞透性、离子通道的影响,及胆酸盐同细胞膜蛋白之间的相互作用和溶解过程的分子特性。这类研究在理论和实践上都具有广泛意义。例如,将胆酸盐作为一种微扰探针,以获得有关离子通道和膜脂肪成分,即蛋白-脂肪相互作用的信息;或者用于膜蛋白的分级分离制备程序,借以提取某些受体^[6]和 Na-KATP 酶^[7]。

本文目的是结合我们原有上皮细胞透性的研究,进一步探索胆酸盐对蟾蜍离体皮肤跨皮静息电位(Transepithelial potential)的影响,并对作用的途径和机理进行讨论。

一、材料和方法

实验以上海郊区产中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)为材料,体重在30—90克之间,雌雄兼有。离体皮肤的制备是:毁动物脑脊髓,从腹部中央分离一块面积约10平方厘米皮肤,浸任氏液内平衡一小时左右,以减少损伤电位的干扰,然后固定在测量小室截面上。实验用测量皮肤电势的装置是根据 Ussing 和 Zerahn^[8](1951)的设计,并略作修改,以适应我们测量跨皮电位的需要。

跨皮电位(以下简称 TEP)系用函数记录仪记录,并以数学电压表监测。为满足本实验需要,特在函数记录仪输入级前加一只源跟随器(输入直流电阻 $\geq 10^9\Omega$,输入电容 $\leq 8\text{pf}$,栅

流 $\leq 5 \times 10^{-11}\text{A}$),以提高系统的输入阻抗值。测量采用自制甘汞电极,极间电势差小于0.5mV。测量时先在任氏液中校测电极电位,然后接入系统测量标本处于任氏液环境的 TEP 对照水平。待电位稳定后,用微型注射器从小室上方小孔注入一定浓度和体积的胆酸盐溶液,同时记录反应至读数恢复或接近原来水平方告一段落。

任氏液成分按下列比例配制: NaCl-115mM, KCl-2.0mM, CaCl_2 -1.1mM, NaHCO_3 -2.4mM, NaH_2PO_4 -0.1mM。室温下 pH 为 6.5—7.0。实验通常在 18—28℃ 条件下进行。

实验用牛胆酸钠试剂为包头生物化学制药厂产品。我们将这种胆酸盐晶体用任氏液配成 1 克/升的贮藏液放冰箱中备用,使用时根据需要稀释成相应浓度。pH6.4—7.0。

二、实验结果

1. 胆酸盐处理蟾蜍皮肤外表面时 TEP 的变化

为了确定施药前蟾蜍皮肤静息电位的正常水平,我们反复测试了处于任氏液内的皮肤标本因性别、年龄和温度差异带来的可能变化。实验结果表明上述因素对 TEP 的基础水平并无明显影响。虽然动物个体之间的 TEP 值存在着差异,但当测试条件一致,且采用自身对照实验方法,则检测的效应规律还是比较满意的。在获得皮肤 TEP 背景值之后,即着手胆酸盐的处理实验。用 $8 \times 10^{-4}\text{M}$ 牛胆酸盐处理蟾

表 1 不同浓度牛胆酸盐处理蟾蜍皮肤内外表面 TEP 变化

处理 方式	胆酸盐 浓度 (mM)	V_b (mV)	V_d (mV)	ΔV_d (mV)	$\frac{\Delta V_d}{V_b}$	T_d		V_i (mV)	ΔV_i (mV)	$\frac{\Delta V_i}{V_b}$	T_i		备 注
						T_1	T_2				T_3	T_4	
外表面 ($n=10$)	8×10^{-4}	21.98 ± 3.1	$*10.65$	$*7.25$	$*0.400$	$*13''$	$*25''$	39.46 ± 3.5	17.48 ± 2.6 $P < 0.001$	0.971	17'	41'	*出现一次 负相
内表面 ($n=7$)	8×10^{-4}	15.85 ± 1.7	—	—	—	—	—	19.88 ± 1.3	3.3 ± 0.6 $P < 0.01$	0.228	22'	40'	
内表面 ($n=7$)	4×10^{-4}	16.40 ± 1.1	$*13.07$	$*3.43$	$*0.400$	$*4'$	$*5'$	18.68 ± 1.1	2.3 ± 1.2 $P < 0.01$	0.144	24'	41'	*出现一次 负相

注: V_b ——TEP 的对照水平; V_d ——牛胆酸盐处理 TEP 的下降水平; $\Delta V_d = V_b - V_d$; $\Delta V_d/V_b$ ——TEP 下降幅度与对照值之比; V_i ——牛胆酸盐处理 TEP 的上升水平; $\Delta V_i = V_i - V_b$; $\Delta V_i/V_b$ ——TEP 上升幅度与对照值之比; T_d ——TEP 下降总时程; T_1-T_d 的下降段; T_2-T_d 的恢复段; T_i ——TEP 上升总时程; T_3-T_i 的上升段; T_4-T_i 的恢复段。

蟾皮肤外表面时,测得 TEP 的变化经过数据处理列在表 1 的第一列。

2. 胆酸盐处理皮肤内表面时 TEP 的变化

采用类似操作程序,我们还以两种不同浓度的胆酸盐对蟾蜍离体皮肤的内表面进行了处理。有关实验结果引在表 1 的下面二列。

根据表 1 中提供的数据,分别绘制成二组 TEP 动态变化曲线如图 1 和图 2。

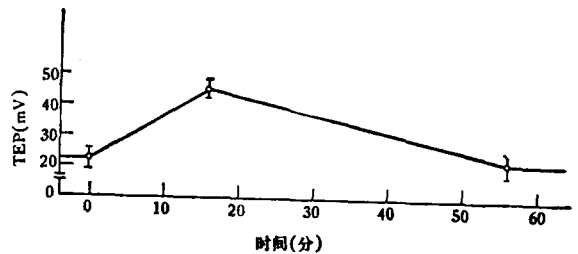


图 1 $8 \times 10^{-4} M$ 牛胆酸盐溶液处理蟾蜍皮肤外表面引起 TEP 的变化。

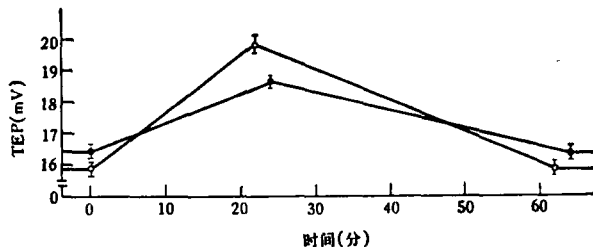


图 2 不同浓度胆酸盐处理皮肤内表面时 TEP 的变化
●——● $4 \times 10^{-4} M$ ○——○ $8 \times 10^{-4} M$

综合以上两部分实验结果,绘制成图 3 的直方图。该三组柱形图中左边的一条均为对照,表示皮肤处于任氏液浸浴条件下的 TEP 值;右边则代表用不同浓度牛胆酸盐溶液分别处理皮肤内、外表面时 TEP 的幅度变化。由图可见,牛胆酸盐对蟾蜍离体皮肤跨皮电位的作用 is 明显的,其中尤以对皮肤外表面的影响更为强烈。

讨 论

以上实验结果表明,牛胆酸盐处理蟾蜍离体皮肤内外表面,上皮细胞的电反应主要表现为 TEP 的升高,特别是当用 $8 \times 10^{-4} M$ 胆酸盐处理外表面时,TEP 上升的幅度相对于对照水平,其比值几乎接近于 1(0.971)。相同浓度的胆酸盐处理皮肤内表面时,TEP 的反应较小,

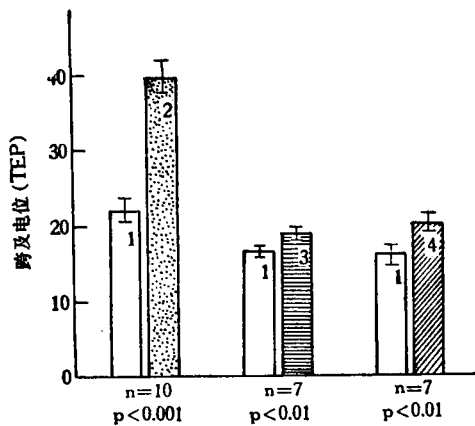


图3 不同浓度牛胆酸盐处理蟾蜍离体皮肤内外表面时 TEP 幅度变化的比较

1. 对照任氏液 2. $8 \times 10^{-4}M$ (外) 3. $4 \times 10^{-4}M$ (内) 4. $8 \times 10^{-4}M$ (内)

大体相当于外表面效应的 $1/4$ (0.228)。当胆酸盐浓度降低到 $4 \times 10^{-4}M$ 时,内表面 TEP 的反应就更低,其效应仅及外表面的 $1/7$ (0.144)。由此可见,蟾蜍皮肤外表面对牛胆酸盐作用的灵敏度大大高于内表面,它反映了上皮极性细胞内、外两侧膜透性的差异,这可能意味着二者受体分布的不对称。

另外,从 TEP 反应的时程看,无论是处理皮肤内、外表面,还是改变胆酸盐的浓度,电位变化的历程均大致接近,即一小时左右;且 TEP 变化的上升速度快,而下降(恢复)过程则较慢,二者之比约为 $1:2$ (表 1 和图 1、2)。

胆酸盐作为净化剂和表面活性剂,在许多生理、生化反应过程中占有重要地位。就其对细胞作用的生物效应而言,前人曾做过不少工作。例如, Doving^[1] 指出微量 ($10^{-6}M$) 胆酸盐作用蛙的嗅上皮,可以诱导出明显的脑电位变化。他认为嗅细胞膜的受体点对胆酸盐及其衍生物的分子构型有特殊敏感性。Wu 和 Sides^[3] 等人在电位钳定条件下研究乌贼巨纤维时查明,脱氧胆酸盐可以高效率地与膜的钠离子快通道结合,削弱动作电位的高度,延长其时程(波宽),但对钾通道则无影响。我们实验室的工作(尚未发表)也发现,胆酸盐对蟾蜍缝匠肌细胞静息电位有明显的去极化作用。这表明胆酸盐与受体结合引起膜的改变,使钠通道部分

开放或扩大,故被动钠离子流亦相应增大。

同单一可兴奋细胞的反应比较,皮肤变动的情况要复杂一些。两栖类皮肤是由多层细胞构成的^[9,10],但对皮肤电位具有意义的是生发层的极性细胞。这种细胞呈连续平行排列,其外侧膜对 Na^+ 的透性很高,对 K^+ 几乎不通;而内侧膜则情况相反,对 K^+ 透性高,对 Na^+ 则甚小。为了说明上述现象的性质, Ussing^[9] 和 Helman^[11,12] 等人曾先后建立了蛙和蟾蜍皮肤输运行为的电学模型。基于这些模型和胆酸盐对可兴奋细胞作用的特点,有可能对胆酸盐处理蟾蜍皮肤时, TEP 变化的规律作出某些分析和估计。

由于上皮极性细胞的外侧膜主要对 Na^+ 通透,该膜上的电位可表为 $V_o = E_{Na} - \frac{I_{Na}}{g_{Na}}$ 。在胆酸盐的作用下, TEP 的变化实际上反映了 V_o 的改变。实验表明, TEP 的变动最终皆表现为升高,即产生正相波(个别标本在正相波之前出现短时负相变化)。这样胆酸盐的作用,因为同钠通道的结合使得 Na 离子电导 (g_{Na}) 增大,而 g_{Na} 的增加必将促使 Na 流 (I_{Na}) 变大。当 $g_{Na} \rightarrow I_{Na}$ 的变化符合 $\frac{\Delta I_{Na}}{g_{Na}} < \frac{\Delta g_{Na}}{g_{Na}}$ 关系时,皮肤总电位 (TEP) 就随 V_o 的增大而上升,并形成正相波;否则即可能出现负相波。 I_{Na} 与 g_{Na} 相互关系的变化不仅对 V_o 的外在表现 (TEP) 具有意义,而且也可能对钠离子流 (I_{Na}) 的主动输运增强作出贡献。

另一方面,当胆酸盐作用于极性细胞内侧膜时, TEP 的上升可从内膜上电位 V_i 的变化予以估计。由于内侧膜类似钾膜的性质,同时膜上存在着 $Na-K$ 泵机构,胆酸盐引起内侧膜 V_i 的上升。与通常细胞膜发生超极化情况一致。膜的超极化,在稳态条件下即意味着膜的主动输运加强。可以设想胆酸盐正是通过提高泵的电导 (g_p) 使 V_i 增高,从而最终表现为 TEP 的上升。不过这是一个耗能过程,它有赖于泵上酶系统(主要是 $Na-K$ ATPase) 活性的提高。Faust^[13] 等人曾证明胆酸盐对 $Na-K$ ATP

(下转第38页)



图3 DABTH-Ile 和 DABTH-Leu; I
为 DABTH-Ile; I/L 为二种物质的混合物。
经盐酸蒸汽薰后显红色斑点

现),遇到这种情况应特别小心辨认新出现的点子,为保证图谱样点 R_f 值的重现性,层析溶剂应时常更新。

4. 我们曾用 6N HCl (110℃24 小时)水解 APG-胰岛素 A 链和肌红蛋白 N-端片段肽,测得氨基酸含量,后者高于前者,这与文献中报道的用 EDC 法固定产率低于 DITC 方法固定产率相一致^[15]。我们还曾选用氨基聚苯乙烯树脂作载体^[13],固定胰岛素 A 链,发现产率更低,

~~~~~

(上接第55页)

酶起激励作用,并因此促进了能源物质的利用。然而细胞内 ATP 的贮量是有限的(特别是在离体条件下),因而泵的运转效率增高也是有限的。所以极性细胞内侧膜  $V_i$  的升高达不到像外侧膜由  $g_{Na}$  的增大而表现出的  $V_o$  上升水平。这也许就是胆酸盐处理蟾蜍皮肤内表面 TEP 上升峰值较低的原因。

### 参 考 文 献

- [1] Doving, K. B. et al: *Olfaction and behaviour in Salmonid fishes*, p. 24. 1980, Institute of Zoophysiology, University of Oslo, Norway.
- [2] Kishimoto, U. et al: *J. Gen. Physiol.*, 47, 975, 1964.
- [3] Wu, C. H., *Biophys. J.* 15(2), Part 2, 263a, 1975; *Ibid.* 17, 206a, 1977.

并且不易操作。

### 参 考 文 献

- [1] Edman, P. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1, 80, 1967.
- [2] Laursen, R. A. *Eur. J. Biochem.*, 20, 89, 1971.
- [2] Chr. Birr Editor *Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis*, Elsevier/North-Holland Press 115 1979.
- [4] Chang, J. Y. et al.: *Biochem. J.*, 153, 607, 1976.
- [5] Chang, J. Y. *Biochem. J.*, 163, 517, 1977.
- [6] Chang, J. Y. et al.: *FEBS Lett.*, 78, 147, 1977.
- [7] Chang, et al.: *FEBS Lett.*, 93, 205, 1978.
- [8] Chang J. Y. *Biochimica et Biophysica Acta*, 578, 188, 1979.
- [9] John Bridgen "Science Tools" Vol. 24, No. 1, 3, 1977.
- [10] 千谷晃一等"蛋白质核酸酵素" Vol 23, No 4, 238, 1978.
- [11] LKB Application Note 251, 3, 1977.
- [12] "Solid-phase sequencing Handbook" LKB Biochrom LTD.
- [13] "Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis" Pub Peirce Chemical Co. 47, 1975.
- [14] Chang J. Y. et al.: *J. Chromatog.*, 140, 125, 1977.
- [15] Chang J. Y. et al.: *J. Chromatog.*, 132, 303, 1977.
- [16] Chang J. Y. et al.: *FEBS Letters* 91, 63, 1978.
- [17] Robinson P. J. et al.: "Biochem. Biophys. Acta" 242, 659, 1971.
- [18] Chr. Birr Editor "Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis" Elsevier/North-Holland Biomedical Press 57, 1980.

[本文于 1983 年 3 月 7 日收到]

- [4] Wu, C. H. et al: *J. Gen. Physiol.*, 76, 355, 1980.
- [5] Tanford, C. et al: *Biochim. Biophys. Acta*, 457, 133, 1976.
- [6] Changeux, J. P. et al: *Mol. Pharmacol.*, 7, 538, 1971.
- [7] Jorgensen, P. L: *Methods in Enzymology*, Vol 32, Biomembrane. Part. B. 277, 1974. Academic press. Inc. N. Y.
- [8] Ussing, H. H.: *Acta Physiol. Scand.*, 23 110, 1951.
- [9] Koefoed-Johnsen, V. et al. *Acta Physiol. Scand.*, 42, 298, 1958.
- [10] Whittembury, G.: *J. Gen. Physiol.*, 47, 795, 1964.
- [11] Helman, S. I. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 74, 105, 1979.
- [12] Helman, S. I.: *Fed. Proc.*, 38, 2743, 1979.
- [13] Faust, R. G. et al.: *J. Cell Physiol.*, 67, 149, 1966.

[本文于 1983 年 3 月 16 日收到]