

一氧化氮通过巯基亚硝化途径抑制 海马神经元的延迟整流型钾电流*

王春飞¹⁾ 陈明¹⁾ 冯文龙²⁾ 高天明^{1)**}

¹⁾南方医科大学解剖学教研室, 神经生物学教研室, 广州 510515;

²⁾香港大学医学院生理系, 中国香港)

摘要 应用膜片钳全细胞记录模式研究了内源性一氧化氮(NO)对培养海马神经元延迟整流型钾电流的调控作用及其机制. 给予NO合成酶的底物L-精氨酸(L-Arg, 2 mmol/L)可显著抑制海马神经元上的延迟整流型钾电流, 但其同分异构体D-精氨酸(2 mmol/L)对钾电流则无明显影响. 并且, 经一氧化氮合成酶抑制剂L-NAME (nomega-nitro-L-arginine methyl ester, 0.5 mmol/L)预处理后, L-Arg对钾电流的抑制作用消失, 表明L-Arg抑制钾电流是通过产生NO而不是精氨酸本身. 特异性鸟苷酸环化酶抑制剂ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one, 10 μ mol/L)预处理不影响L-Arg对钾电流的抑制作用, 但巯基烷化剂NEM (*N*-ethylmaleimide, 1 mmol/L)预处理可完全阻断L-Arg的抑制效应. 以上结果表明, 内源性NO主要通过巯基亚硝化途径抑制海马神经元的延迟整流型钾电流.

关键词 培养海马神经元, NO, 钾通道, 巯基亚硝化, 膜片钳

学科分类号 Q2

一氧化氮(NO)是一种带自由基特性的气体信号分子, 由一氧化氮合成酶(NOS)催化L-Arg和分子氧合成^[1], 它性质活泼可自由出入细胞膜, 在中枢神经系统和周围神经系统中发挥重要的作用. 已发现NO参与了多种生理、病理过程, 如突触长时程增强(LTP)、神经递质的释放、神经毒性作用等^[2~7]. NO对细胞的作用具有两面性, 在生理状况下发挥第二信使的调节作用, 在氧化应激条件下, 机体产生的活性氧产物堆积, 此时NO就会起毒性作用, 导致细胞损伤或死亡.

传统观点认为NO主要通过cGMP途径来介导各种生理和病理作用. 可溶性鸟苷酸环化酶(GC)的分子结构中含有一个含铁血红素基团, 可与NO特异性结合. NO产生后通过自由扩散与细胞内的可溶性GC结合并激活此酶, 进而调控cGMP的水平及下游反应. 但近年来大量证据表明, NO还可通过非cGMP途径, 直接与靶细胞蛋白质上特定的半胱氨酸上的游离巯基形成共价结合, 即蛋白质巯基的亚硝化, 来调节蛋白质的功能^[8,9]. 这一方式具有高精度的时间和空间分辨率, 并且这种以共价结合的NO基团还可精确地转位到其他特异的靶蛋

白. 到目前为止, 已发现可被NO通过亚硝化修饰调控其功能的蛋白质包括: 离子通道、结构蛋白、蛋白激酶/磷酸酶、代谢酶、信号蛋白、蛋白酶、转录因子等逾百种^[10]. 因此目前的观点认为, 蛋白质巯基的亚硝化是蛋白质翻译后功能调控的一种新的信号转导方式, 与蛋白质磷酸化调控方式相类似.

外向延迟整流型钾通道广泛分布于神经细胞、肌细胞、腺细胞等, 参与动作电位的复极化、动作电位期间的调节等过程, 在维持神经元的兴奋性方面也发挥着重要作用^[11]. 海马不仅参与学习记忆、情绪及内脏活动的调节等重要生理功能, 而且是多种中枢神经系统退行性疾病的主要受损脑区. 海马神经细胞富含延迟整流型钾通道, 但目前尚未见关于NO对海马神经元延迟整流型钾通道调节作用及其机制的报道.

*国家自然科学基金与香港研究资助局联合科研基金(30218004), 国家自然科学基金(30330240、30125013), 广东省自然科学基金团队项目(10717)和教育部长江学者奖励计划资助项目.

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 020-61648216, E-mail: tgao@fimmu.com

收稿日期: 2005-09-05, 接受日期: 2005-11-30

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12(Gibco 公司); 胎牛血清(杭州四季青公司); 四乙基铵(TEA)、河豚毒素(TTX)、L-精氨酸(L-Arg)、D-Arg、L-NAME、ODQ、NEM、DMSO、4-AP、HEPES、多聚赖氨酸、阿糖胞苷(Sigma 公司); paxilline、apamin(Calbiochem 公司).

基础培养基(pH 7.2)组成(1 000 ml): DMEM/F12 培养基干粉 12 g, HEPES 2.7 g, 过滤除菌, 分装 90 ml/瓶, -20°C 备用.

完全培养基组成: DMEM/F12 基础培养基 90 ml, 胎牛血清 10 ml, 200 mmol/L L-谷氨酰胺 1 ml, 7.4% NaHCO_3 调 pH 至 7.2, 分装, 4°C 备用.

1.2 方法

1.2.1 神经元培养. 实验动物用出生 24 h 内的 Sprague-Dawley(SD)大鼠(南方医科大学实验动物中心), 雌雄不限. 无菌条件下断头取脑, 分离双侧海马, 放入基础培养基内, 胰蛋白酶(浓度 0.25%)消化分散细胞, 200 目筛网过滤, 制成单细胞悬液, 800 r/min 室温超速离心 10 min, 去上清液后加 2 ml 完全培养基, 尖嘴吸管吹打分散细胞后, 用完全培养基调整细胞浓度至 $4 \times 10^5/\text{ml}$, 接种于预先包被有多聚赖氨酸的 24 孔培养板, 每孔 0.5 ml, 于 95% 空气、5% CO_2 、 37°C 、饱和湿度条件下培养. 接种 48 h 后加入 1×10^{-5} mol/L 阿糖胞苷作用 48 h, 以抑制胶质细胞增殖. 以后每 2~3 天换液一次, 每次更换原液体的 1/2~2/3. 待细胞生长成熟至 8~16 日用于实验.

1.2.2 全细胞膜片钳记录. 本研究采用了膜片钳技术的全细胞记录模式进行海马神经元的电生理记录. 细胞外液(浴槽液): 140 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 5 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L Hepes, 1 mmol/L 4-AP, 0.001 mmol/L apamin, 0.005 mmol/L glybenclamide, 0.0005 mmol/L TTX, 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.4. 无钙外液为细胞外液中不含 Ca^{2+} 但加入 1 mmol/L EGTA. 细胞内液(电极液): 110 mmol/L K-gluconate, 10 mmol/L KCl, 5 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Hepes, 1 mmol/L ATP, 0.2 mmol/L GTP, 0.1 mmol/L Leupeptin, 1 mol/L KOH 调 pH 至 7.4. 用 $0.22 \mu\text{m}$ 的醋酸纤维微孔滤膜过滤, 以除去灰尘颗粒和细菌, 分装, 0.5 ml/安瓿, -20°C 保存.

每次实验前均用相应记录浴槽内的溶液冲洗带

有细胞的盖玻片, 以洗去细胞上的其他成分, 然后将盖玻片放入盛有溶液的浴槽内. 记录用的玻璃微电极电阻为 $2 \sim 4 \text{ M}\Omega$, 内插泛极化氯化银与膜片钳放大器探头相连. 实验中仅选用密封电阻大于 1 G 的细胞. 本实验用 CEZ-2300 型膜片钳放大器(CEZ-2300, 日本光电), 低通滤波器滤波频率为 1 KHz, 经 TL-125 接口的 Labmaster DMA 数据采集系统采集, 将资料采入计算机以备分析处理. 全细胞纪录时, 钳制电压为 -70 mV , 去极化脉冲持续 480 ms, 每个去极化脉冲之间间隔 10 s. 首个去极化脉冲为 -50 mV , 以 $+20 \text{ mV}$ 的步进去极化到 $+50 \text{ mV}$, 可记录到电压依赖性增大的外向钾电流. 实验在室温下进行($22 \sim 25^{\circ}\text{C}$).

1.2.3 电流资料分析和统计方法. 本实验用作幅度分析的海马神经元全细胞钾电流的实验数据取自从 -70 mV 直接去极化至 $+30 \text{ mV}$ 时激活的电流. 用 PCLAMP8.0 分析程序(美国 Axon Instrument)检测电流幅度. 将用药前后电流幅度的均值作比较, 药物效应通过公式 $[1 - (I_{\text{test}})/(I_{\text{control}})] \times 100$ 计算得出, 实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用配对 t 检验或方差分析及 LSD 法进行检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义.

2 结 果

2.1 延迟整流型钾电流的分离

我们用全细胞膜片钳记录模式记录海马神经元的延迟整流型钾电流. 在细胞外液中加入 TTX 以阻断钠电流, 加入 glybenclamide 和 apamin 分别阻断 ATP 敏感钾电流和小电导钙激活钾电流. 当加入 4-AP 后可阻断 A 型钾电流(图 1a, $n=6$). 当加入广谱的电压依赖性钙通道阻断剂 Cd^{2+} 仍可显著抑制一部分钾电流(图 1a, $n=6$), 表明海马神经元上还存在另一类型的钙激活钾电流(可能是大电导钙激活钾电流). 于是我们在以下的实验将细胞置于无钙外液中以去除钙激活钾电流, 使得记录到的电流为延迟整流型钾电流(图 1b). 记录电流时钳制电压为 -70 mV , 从 -50 mV 开始去极化, 以 $+20 \text{ mV}$ 步进至 $+50 \text{ mV}$. 当去极化脉冲大于 -30 mV 时可激活神经元膜上的外向电流, 此电流幅度随去极化脉冲的增大而增大, 呈现明显的电压依赖性. 电流在 480 ms 持续去极化脉冲内未见明显失活, 并且电流激活达到峰值的速率也较慢(图 1b), 5 mmol/L TEA 可显著抑制此外向电流($n=5$, $P < 0.05$, 图 1b, c). 上述电生理和药理学特性均表明该电流为外向延迟整流型钾电流.

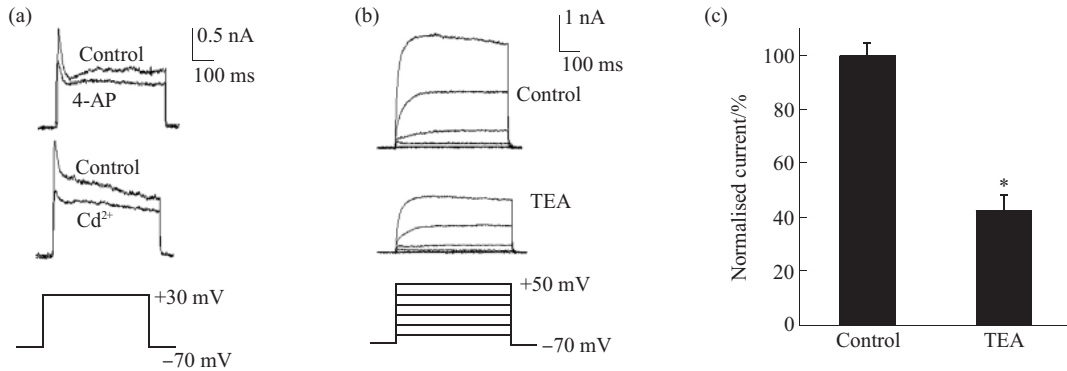


Fig. 1 Identification of the delayed rectifier K⁺ currents in cultured hippocampal neurons

(a) Effect of 4-AP (1 mmol/L) and Cd²⁺ (0.5 mmol/L) on the outward currents recorded from DIV10 neurons in the presence of glybenclamide and apamin in the bath solution. (b) Effect of TEA (5 mmol/L) on the delayed rectifier K⁺ currents. (c) Summary of TEA (5 mmol/L) inhibition on the delayed rectifier K⁺ currents at +30 mV depolarized from a holding potential of -70 mV. * $P < 0.05$ compared with control ($n = 5$, paired t -test).

2.2 内源性 NO 抑制海马神经元的延迟整流型钾电流

我们在以下的实验中应用了 NOS 合成 NO 的天然底物 L-Arg, 研究内源性 NO 对海马神经元延迟整流型钾电流的调节作用. 在无钙外液条件下, 当去极化至 +30 mV 时, 2 mmol/L 的 L-Arg 可显著性地抑制延迟整流型钾电流的(16.7±3.9)% ($n=12$, $P < 0.05$, 图 2a). L-Arg 的抑制作用在给药后 1~2 min 出现, 3~4 min 可达峰值. 其抑制作用较稳定, 但有 2 例在作用 5 min 后表现出轻微的恢复效应, 其余则未发现.

为了确定 L-Arg 是否通过产生 NO 来发挥作

用, 或是精氨酸本身的作用, 我们应用了 NOS 的特异性阻断剂 L-NAME 和 L-Arg 的同分异构体 D-精氨酸 (D-Arg). 用 0.5 mmol/L L-NAME (nomega-nitro-L-arginine methyl ester) 对细胞预处理 10 min 以先阻断 NOS 的作用, 然后再给予 L-Arg 时对电流不再具有明显的抑制作用 ($n=6$, $P > 0.05$, 图 2b). 单独使用 L-NAME 也未观察到对钾电流的影响. 与 L-Arg 的作用不同, 2 mmol/L D-Arg 对钾电流无显著影响 ($n = 6$, $P > 0.05$, 图 2c). 以上结果表明精氨酸本身并不能调节钾电流, L-Arg 是通过 NO 抑制海马神经元的延迟整流型钾电流.

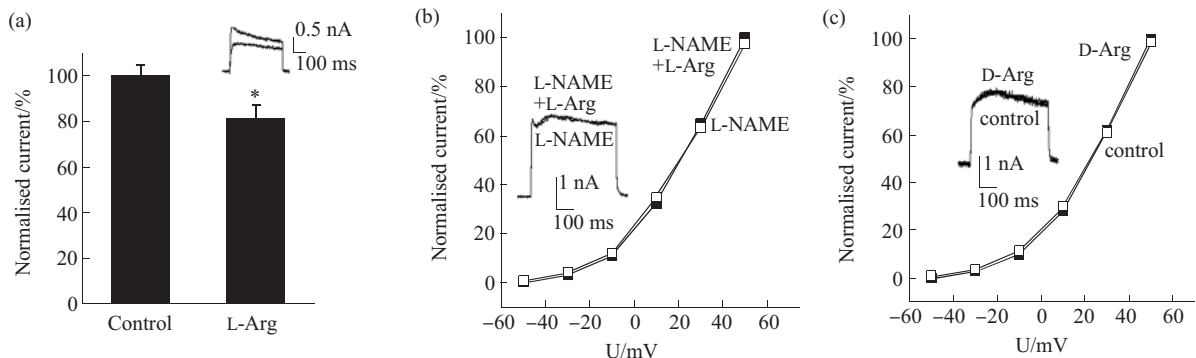


Fig. 2 Inhibitory effect of L-Arg on the delayed rectifier K⁺ currents via NO

(a) L-Arg (2 mmol/L) inhibition on the delayed rectifier K⁺ currents. * $P < 0.05$ compared with control ($n=12$, paired t -test). Inset, superimposed current traces before and after addition of L-Arg. (b) I - V plots showing that L-NAME pretreatment blocked L-Arg-induced inhibition on delayed rectifier K⁺ currents ($n=6$, $P > 0.05$, paired t -test). ■: 0.5 mmol/L L-NAME, □: 0.5 mmol/L L-NAME + 2 mmol/L L-Arg. Inset, superimposed current traces before and after addition of L-Arg in presence of L-NAME. (c) I - V plots showing the effect of D-Arg on the delayed rectifier K⁺ currents. ■—■: Control, □—□: 2 mmol/L D-Arg ($n=6$, $P > 0.05$, paired t -test). Inset, superimposed current traces before and after addition of D-Arg. All currents in (a), (b) and (c) were recorded at +30 mV depolarized from a holding potential of -70 mV.

2.3 NO 经过 cGMP 非依赖性机制抑制延迟整流型钾电流

大量研究报道^[2,5,12,13], NO 通过激活细胞内可溶性 GC, 使细胞内 cGMP 的水平增高而发挥其调控功能. 但是, 近年有证据表明 NO 的作用还可通过不依赖于 cGMP 通路的途径来实现^[8,9]. 因此, 我们首先探讨了 cGMP 依赖性通路是否参与 NO 对延迟整流型钾电流的抑制过程. ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-one) 是可溶性 GC 的特异性抑制剂^[13], 用 10 $\mu\text{mol/L}$ ODQ 预处理细胞 10 min 以先阻断 cGMP 依赖性通路, 然后给予 2 mmol/L L-Arg, 观察其对电流的影响. 在这种条件下, L-Arg 抑制了延迟整流型钾电流的 ($25.3 \pm 5.6\%$) ($n=11$, $P < 0.05$, 图 3a). 但该抑制效应与单独用 L-Arg 的抑制效应(16%)之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 提示 NO 主要是通过 cGMP 非依赖性机

制来调控海马神经元的延迟整流型钾电流.

2.4 NO 经过巯基亚硝化途径抑制海马神经元的延迟整流钾电流

NO 可通过直接修饰靶蛋白上的游离巯基而调控蛋白质功能(即游离巯基的亚硝化修饰)^[6]. NEM (*N*-ethylmaleimide) 可与游离巯基形成共价结合, 从而阻止巯基被亚硝化, 因而它常被用作工具药以鉴别有无亚硝化修饰的参与^[14].

在我们的实验中, 经 1 mmol/L NEM 预处理 10 min 后的细胞, 其延迟整流型钾电流对 2 mmol/L L-Arg 不再具有敏感性, 即此时 L-Arg 对电流的抑制作用消失($n=6$, $P > 0.05$, 图 3 b). 结果表明, 当巯基亚硝化通路被阻断后, L-Arg 不再具有对延迟整流型钾电流的调节作用, 提示 NO 主要是通过巯基亚硝化途径起作用.

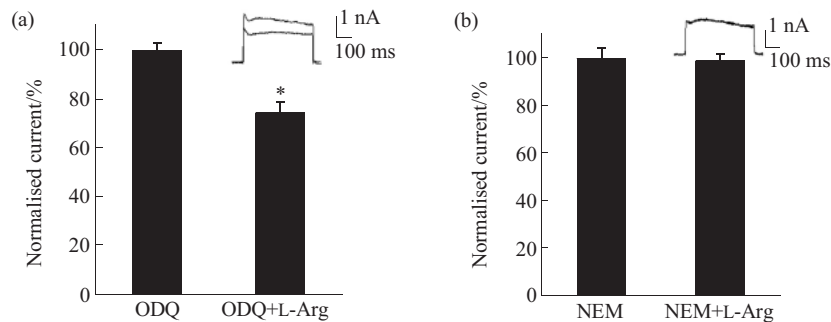


Fig. 3 Inhibition of the delayed rectifier K^+ currents by NO via S-nitrosylation

(a) Pretreatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ ODQ could not block L-Arg (2 mmol/L) induced-inhibition on the delayed rectifier K^+ currents.

* $P < 0.05$ compared with control ($n=11$, paired t -test). Inset, superimposed current traces before and after application of L-Arg in the presence of ODQ. (b) Pretreatment with 1 mmol/L NEM blocked L-Arg (2 mmol/L) induced-inhibition on the delayed rectifier K^+ currents ($n=6$, $P > 0.5$, paired t -test). Inset, superimposed current traces before and after application of L-Arg in the presence of NEM. All currents in (a) and (b) were recorded at +30 mV depolarized from a holding potential of -70 mV.

3 讨 论

在本实验中, 我们研究了 NO 对培养海马神经元延迟整流型钾电流的调控作用及其机制. 结果表明, NO 对该钾电流具有显著的抑制作用. 进一步的机制研究发现, NO 的抑制作用主要是通过 cGMP 非依赖性途径——巯基亚硝化修饰起作用, 而不是经过传统的 cGMP 依赖性途径.

3.1 L-Arg 通过产生 NO 抑制培养海马神经元的延迟整流型钾电流

以前曾有报道低浓度的 L-Arg 即可显著性地抑制成年大鼠海马脑片 CA1 神经元上的钙激活钾电

流^[15], 但在我们的实验中, 甚至 1 mmol/L L-Arg 也未观察到明显的作用. 这其中的差别可能是所用标本不同所造成的. 神经元的密度远远高于培养的神经元, 并且脑片中含有大量的胶质细胞, 这样脑片中 NOS 的浓度将远远高于培养的神经元, 因此, 合成一定量 NO 所需的 L-Arg 的浓度就会与培养的神经元明显不同.

我们观察到用 L-NAME 抑制 NOS 从而阻断 NO 生成后, L-Arg 对钾电流的抑制作用也随之消失. D-Arg 是 L-Arg 的同分异构体, 但不是 NOS 的底物, NOS 不能作用于 D-Arg 产生 NO, 同样我们发现 D-Arg 对钾电流无明显影响. 因而我们认为,

L-Arg 的抑制作用并非是精氨酸本身的作用引起,而是其产生的 NO 可抑制培养海马神经元的延迟整流型钾电流。

3.2 NO 的作用机制

由于钾通道在调控细胞电活动中的重要作用及 NO 这一气体信号分子作用的多样性, NO 对钾通道的调控已受到人们的广泛关注。在 NO 的作用机制研究当中,人们已发现了 NO 的两条主要通路:其一是 NO 可通过改变细胞内 cGMP 水平进而调控钾通道的功能^[2,5,12,13],即 cGMP 依赖性通路。在 Aplysia 神经元,NO 经 cGMP 依赖性通路抑制乙酰胆碱诱导的钾电流^[16]及多巴胺诱导的钾电流^[17]。在 Onchidium 神经元,NO 经 cGMP 依赖性途径抑制谷氨酸诱导的钾电流^[18]。在前庭 I 型毛细胞上,NO 通过增加 cGMP 水平来抑制低电压激活的外向整流钾电流^[19]。

另外,近年又有研究发现还存在 NO 的 cGMP 非依赖性通路。在兔主动脉平滑肌细胞的游离膜片上^[1],用单通道记录方法观察到 NO 以不依赖细胞内成分的 cGMP 非依赖机制直接激活钙依赖性钾电流。Bolotina 等^[20]发现,巯基烷化剂 NEM 能阻止 NO 激活血管平滑肌细胞的钙依赖性钾通道,表明 NO 是直接使通道蛋白的游离巯基亚硝化从而调控通道的功能。在豚鼠的心肌细胞上,ODQ 不能阻断 NO 供体 SNP 对电流的增强作用,进一步证明 NO 是通过直接亚硝化修饰通道蛋白来增强通道活性^[21]。在垂体后叶的神经末梢,NO 可通过巯基亚硝化途径调控钙激活钾通道的活性,从而调节垂体后叶的神经分泌^[22]。同样,在本实验中,NO 对培养海马神经元上延迟整流型钾电流的抑制作用主要是通过 cGMP 非依赖通路实现。经 NEM 预处理后,L-Arg 对延迟整流型钾电流不再具抑制作用,表明 NO 是通过亚硝化修饰通道蛋白的游离巯基抑制海马神经元上的延迟整流型钾电流。

在此需要指出的是,本实验并不能完全排除 cGMP 依赖性通路在生理情况下参与调控钾通道功能的可能性。因为在全细胞记录时,细胞内液与电极内液相通,可能会导致细胞内一些重要小分子和酶的丢失,从而破坏了原本可能的 cGMP 依赖性通路。

3.3 NO 调控作用可能的生理和病理学意义

在生理条件下,NO 被证明参与了海马脑区 LTP 的形成^[23,24],并且认为 NO 是一种逆行信号分子,它通过增强突触前神经末梢的兴奋性而促进

LTP 的形成。本研究显示 NO 可抑制海马神经元的延迟整流型钾电流,因此,NO 可能通过抑制钾通道而增强突触前神经末梢的兴奋性,进而有利于 LTP 的形成。但这是否是 NO 参与 LTP 的机制之一尚需进一步的研究。

在一些病理条件下,如当脑缺血缺氧时,海马组织产生大量的 NO^[25],与此同时,神经细胞膜对离子通透性增加,膜发生去极化,钙过量内流,进而导致神经细胞损伤^[26]。本研究结果表明 NO 可通过巯基亚硝化途径抑制海马神经元的延迟整流型钾电流,NO 的这一作用可能是脑缺血缺氧时神经元去极化的机理之一^[26],从而为脑缺血缺氧时神经细胞兴奋性升高的机理提供了实验依据。

除 NO 外,有研究报道,缺氧^[27]、蛋白激酶 A 通路^[28]、经 AMPA (α -氨基-3-羟基-5-甲基异恶唑-4-丙酸)受体内流的钙^[29]等同样可抑制延迟整流型钾电流,因而,这些信号通路的激活也可能通过抑制钾通道的活动参与了上述生理、病理过程。

参考文献

- 1 Michelakis E D, Reeve H L, Huang J M, *et al.* Potassium channel diversity in vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 1997, **75** (7): 889~897
- 2 Akio M, Karri E C, Limin L, *et al.* Screening for nitric oxide-dependent protein-protein interactions. *Science*, 2003, **301** (5633): 657~661
- 3 Campbell D L, Stamler J S, Strauss H C. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes - Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol*, 1996, **108** (4): 277~293
- 4 Maffei A, Prestori F, Shibuki K, *et al.* NO enhances presynaptic currents during cerebellar mossy fiber-granule cell LTP. *J Neurophysiol*, 2003, **90** (4): 2478~2483
- 5 Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, *et al.* Carruba mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, 2003, **7299** (5608): 896~899
- 6 Samie R J, Hediye E B, Christopher D F, *et al.* Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biol*, 2001, **3** (2): 193~197
- 7 Taylor E L, Megson I L, Haslett C, *et al.* Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2003, **10** (4): 418~430
- 8 Gross S S. Targeted delivery of nitric oxide. *Nature*, 2001, **409** (6820): 577~578
- 9 Stamler J S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 1994, **78** (6): 931~936
- 10 Stamler J S, Lamas S, Fang F C, *et al.* Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, 2001, **106** (6): 675~683
- 11 Gytis B, Tatiana T, James S D. Delayed rectifier currents in rat Globus Pallidus neurons are attributable to Kv2.1 and Kv3.1/3.2 K⁺ channels. *J Neurosci*, 1999, **19** (15): 6394~6404
- 12 Marcello D A, Giovanni M, Gian B A, *et al.* cGMP/Protein Kinase

- G-dependent inhibition of N-Type Ca^{2+} channels induced by nitric oxide in human neuroblastoma IMR32 cells. *J Neurosci*, 2002, **22** (17): 7485~7492
- 13 Snyder S H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science*, 1992, **257** (5069): 494~496
 - 14 Anthony R W, Anthony A. The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity states and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded *in vivo*. *J Neurosci*, 2004, **24** (8): 1924~1935
 - 15 Erdemli G, Krnjevic K. Nitric oxide tonically depresses a voltage- and Ca^{2+} -dependent outward current in hippocampal slices. *Neurosci Lett*, 1995, **201** (1): 57~60
 - 16 Sawada M, Ichinose M. Nitric oxide donor sodium nitroprusside inhibits the acetylcholine-induced K^{+} current in identified Aplysia neurons. *J Neurosci Res*, 1996, **44** (1): 21~26
 - 17 Sawada M, Ichinose M, Stefano G B. Nitric oxide inhibits the dopamine-induced K^{+} current via guanylate cyclase in Aplysia neurons. *J Neurosci Res*, 1997, **50** (3): 450~456
 - 18 Sawada M, Ichinose M, Anraku M. Inhibition of the glutamate-induced K^{+} current in identified Onchidium neurons by nitric oxide donors. *J Neurosci Res*, 2000, **60** (5): 642~648
 - 19 Chen J W, Eatock R A. Major potassium conductance in type I hair cells from rat semicircular canals: characterization and modulation by nitric oxide. *J Neurophysiol*, 2000, **84** (1): 139~151
 - 20 Bolotina V M, Najibi S, Palacino J J, *et al.* Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 1994, **368** (6474): 850~853
 - 21 Bai C X, Takahashi K, Masumiya H, *et al.* Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K^{+} current and the L-type Ca^{2+} current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng. *Br J Pharmacol*, 2004, **142** (3): 567~575
 - 22 Ahern G P, Hsu S F, Jackson M B. Direct actions of nitric oxide on rat neurohypophyseal K^{+} channels. *J Physiol*, 1999, **520** (Pt 1): 165~176
 - 23 Arancio O, Kiebler M, Lee C J, *et al.* Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell*, 1996, **87** (6): 1025~1035
 - 24 Son H, Hawkins R D, Martin K, *et al.* Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell*, 1996, **87** (6): 1015~1023
 - 25 Kojima H, Hirata M, Kudo Y, *et al.* Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia. *J Neurochem*, 2001, **76** (5): 1404~1410
 - 26 Fung M L. Role of voltage-gated Na^{+} channels in hypoxia-induced neuronal injuries. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000, **27** (8): 569~574
 - 27 Hool L C. Differential regulation of the slow and rapid components of guinea-pig cardiac delayed rectifier K^{+} channels by hypoxia. *J Physiol*, 2004, **554** (Pt 3): 743~754
 - 28 Mei Y A, Vaudry D, Basille M, *et al.* PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I_k in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur J Neurosci*, 2004, **19** (6): 1446~1458
 - 29 Jones G, Boyd D F, Yeung S Y, *et al.* Inhibition of delayed rectifier K^{+} conductance in cultured rat cerebellar granule neurons by activation of calcium-permeable AMPA receptors. *Eur J Neurosci*, 2000, **12** (3): 935~944

Nitric Oxide Inhibits Delayed Rectifier Potassium Currents in Cultured Hippocampal Neurons *via* S-Nitrosylation*

WANG Chun-Fei¹⁾, CHEN Ming¹⁾, FUNG Man-Lung²⁾, GAO Tian-Ming^{1)**}

¹⁾Department of Anatomy, Department of Neurobiology, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China;

²⁾Department of Physiology, Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong, China)

Abstract The modulating action and mechanism of endogenous nitric oxide (NO) on the delayed rectifier potassium currents in cultured hippocampal neurons were examined using whole-cell patch clamp techniques. L-arginine (L-Arg, 2 mmol/L), a substrate of NO synthases, significantly suppressed the delayed rectifier K^{+} currents in hippocampal neurons, while its isomer D-arginine (D-Arg, 2 mmol/L) exerted no effect. Moreover, pretreatment with NO synthase inhibitor L-NAME (0.5 mmol/L) completely blocked the suppressing effect by L-Arg, indicating that L-Arg exerted its modulation by producing NO but not by itself. No effect was found on the L-Arg-induced inhibition by 10 min pretreatment of 10 $\mu\text{mol/L}$ ODQ (a specific inhibitor of guanylate cyclase). In contrast, thiol-alkylating agent N-ethylmaleimide (1 mmol/L) completely precluded L-Arg-induced inhibition on the whole K^{+} currents. The results indicate that endogenous NO modulates the delayed rectifier K^{+} currents in cultured hippocampal neurons mostly through S-nitrosylation.

Key words hippocampal neuron, NO, potassium channels, S-nitrosylation, patch clamp

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China and The Research Grants Council of Hong Kong Joint Research Scheme (30218004), The National Natural Science Foundation of China (30330240, 30125013), Team Collaboration Project of Guangdong (10717) and Cheung King Scholars Programme to Tian M. Gao.

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-20-61648216, E-mail: tgao@fimmu.com

Received: September 5, 2005 Accepted: November 30, 2005