

过氧亚硝酸阴离子通过鸟苷酸环化酶途径抑制钠电流影响海马神经元兴奋性*

刘朝巍¹⁾ 韩大东²⁾ 杨 茜¹⁾ 徐兰举²⁾ 张 涛^{1)**} 杨 卓^{2)**}

(¹⁾南开大学生命科学学院, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071; ²⁾南开大学医学院, 天津 300071)

摘要 过氧亚硝酸阴离子(ONOO⁻)是一种性质活泼的自由基, 可引起强的氧化性损伤, 介导了一氧化氮(NO)的大部分毒性作用. 应用全细胞膜片钳技术, 探讨 ONOO⁻对脑片海马神经元电压门控钠通道电流(I_{Na})和神经元兴奋性的影响. 结果表明, ONOO⁻供体 SIN-1(10, 500, 2000 μ mol/L)可浓度依赖性抑制 I_{Na} 电流峰值. SIN-1 与 ONOO⁻清除剂尿酸共处理, 并不影响 I_{Na} . 500 μ mol/L 的 SIN-1 可使 I_{Na} 的 I - V 曲线上移, 并可抑制其失活后恢复过程, 但对 I_{Na} 的激活和失活过程无影响. SIN-1 还可抑制动作电位发放频率和幅值. 脑片预处理腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)抑制剂 MDL-12, 330A (25 μ mol/L)和 NEM (50 μ mol/L)对 SIN-1 的作用无影响. 然而, 预处理鸟苷酸环化酶(CG)抑制剂 ODQ 可抑制 SIN-1 对 I_{Na} 的作用. 以上结果提示, ONOO⁻通过 cGMP- I_{Na} -AP 信号级联系统作用于海马神经元, 与 PKA 和蛋白巯基亚硝化途径无关, 这可能是 ONOO⁻神经毒性的机制之一.

关键词 电压门控钠通道电流, 膜片钳, 神经元, 过氧亚硝酸

学科分类号 R338, R971

一氧化氮(NO)可与超氧阴离子快速反应生成过氧亚硝酸阴离子(ONOO⁻), ONOO⁻是一种性质活泼的自由基, 可引起强的氧化性损伤, 介导了 NO 的大部分毒性作用^[1]. ONOO⁻可能是导致细胞损伤、能量耗竭和细胞死亡的重要因素.

ONOO⁻可作为强氧化剂, 作用于酶、蛋白质、脂质及 DNA 等大分子物质, 产生细胞毒性作用, 使细胞的代谢发生障碍及能量耗竭, 导致细胞凋亡、损伤, 甚至死亡. ONOO⁻参与多种神经系统疾病的病理过程, 例如: 阿尔茨海默病、脑缺血和癫痫等.

细胞膜离子通道是某些毒物和药物作用的靶点^[2], 许多神经毒物对中枢神经系统的损伤都是通过干扰电压门控钠通道的功能达到的. 然而, ONOO⁻对海马神经元钠离子通道的作用, 迄今未见报道.

本实验利用全细胞膜片钳技术研究 ONOO⁻对大鼠海马 CA1 区神经元钠离子通道电流的影响, 探讨 ONOO⁻对神经细胞发挥毒性作用的机制.

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生后 14~18 天的雄性 Wistar 大鼠, 购自中国医学科学院动物实验中心.

1.2 试剂药品

SIN-1、尿酸(Urate)、MDL-12, 330A 购自 Alexis 公司. ODQ (1H-[1, 2, 4] oxadiazole [4, 3-a] quinoxalin- 1-one) 为 Canmay 公司产品. NEM (N-ethylmaleimide) 购自 MP BIOMEDICALS 公司. 4-氨基吡啶(4-AP)、氯化四乙胺(TEA-Cl)、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(Hepes)、己二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)、氯化铯(CsCl)、Na₂ATP、河豚毒素(TTX)为 Sigma 公司产品. 其余试剂为国产分析纯. 非水溶性药物溶解于二甲基亚

* 国家自然科学基金资助项目(30640037, 30470453)和天津市应用基础研究项目(06YFJMJC09400).

** 通讯联系人. Tel: 022-23504364

杨卓. E-mail: zhuoyang@nankai.edu.cn

张涛. E-mail: zhangtao@nankai.edu.cn

收稿日期: 2007-06-13, 接受日期: 2007-09-25

砒(DMSO)配制成母液. 所有药物均在使用前用人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)稀释用于灌流, DMSO 的终浓度小于 1%. 灌流速度约 3~4 ml/min, 灌流过程中持续通混合气(含有 5% CO₂ 和 95% O₂)以保证细胞外酸碱度稳定. ACSF 成分(mmol/L): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 1.25 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 1.5 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 16 葡萄糖. 电极内液成分(mmol/L): 120 CsCl, 5 TEA-Cl, 2 MgCl₂, 10 Hepes, 10 EGTA, 2 Na₂ATP, CsOH 调节 pH 至 7.2~7.3.

1.3 脑片制备

实验动物用水合氯醛(400 mg/kg, i.p.)腹腔麻醉. 待麻醉适度后, 迅速断头、剪开颅骨取出全脑, 置于备好的脑脊液中静置 2 min. 分离海马, 使用振动切片机(Leica VT1000M)将其切成厚度为 400 μ m 的脑片. 厚度较均匀的脑片移入 30℃ 已通混合气的人工脑脊液中, 孵育 1 h 以上备用.

1.4 全细胞膜片钳记录

利用全细胞膜片钳技术记录大鼠脑片海马 CA1 神经元 I_{Na} 电流. 电极由 PIP5 型拉制仪(PIP5, HEKA, 德国)分两步拉制而成. 充满电极内液后阻抗为 2~6 M Ω . 将正置显微镜低倍镜的镜头浸入灌流液中, 选准所要记录脑片的位置, 然后换成高倍镜. 将高倍镜头浸入液体, 适当调节焦距就可通过 CCD 摄像机在 TV 监视器屏幕上看到放大的细胞图像. 为使细胞图像更清晰, 用红外光代替普通光, 其 DIC (differential interference contract) 图像在黑白 TV 监视器屏幕上会更有立体感. 选择表面光滑, 形态饱满, 轮廓分明, 折光性好的锥体神经元. 电极尖端与细胞膜形成高阻封接(大于 1 G Ω)后, 负压破膜, 使电极内液与细胞内液相通, 形成全细胞状态, 记录 I_{Na} 电流. 信号采集频率 10 kHz,

滤波频率 3 kHz. 采样后数据由 PULSE 10.0 软件自动记录, 存储于计算机硬盘内供分析. 所有的实验均在室温(22~24℃)下进行.

1.5 数据处理

实验结果用($\bar{x} \pm s$)表示, 数据的分析和处理采用 Pulsefit 和 SPSS11.5 软件完成, 两组间数据用 t 检验或配对 t 检验进行分析, 多重组间比较用 ANOVA, $P < 0.05$ 为有显著差异.

2 结 果

2.1 ONOO⁻对 I_{Na} 的影响

建立全细胞记录模式, 置钳制电位为 -70 mV, 经过 -120 mV 的超极化刺激后, 给予细胞 -30 mV 的刺激, 波宽为 20 ms, 由此引出一内向电流, 由于在灌流液中加入了 TEA-Cl、4-AP, 电极内液中有高浓度的 Cs⁺, 故钾电流可被阻断, 待电流稳定后, 向培养皿中加入钠通道特异阻断剂 TTX 15 μ mol/L, 30 s 内可完全阻断该电流, 且冲洗后电流可部分恢复, 由此证明所记录电流为全细胞钠电流 I_{Na} (图 1a).

SIN-1 是 ONOO⁻的供体, 可同时产生 NO 和超氧阴离子, 本实验 SIN-1 均为实验前新鲜配置, 室温孵育 2 h. 图 1b 显示 SIN-1 (10, 500, 2000 μ mol/L) 可抑制 I_{Na} , 并呈现浓度依赖性. 进一步实验采用 500 μ mol/L 浓度的 SIN-1. 为了确定 SIN-1 对 I_{Na} 电流的影响是通过产生 ONOO⁻来发挥作用, 我们应用 ONOO⁻清除剂 Urate. 同时给予 Urate (100 mmol/L) 和 SIN-1 (500 μ mol/L) 对 I_{Na} 电流无影响(图 1). 500 μ mol/L SIN-1 作用 5 min 后 I_{Na} 的电流峰值为作用前的 (74.50 $\pm$ 1.23)% ($n = 6$, $P < 0.05$, 图 1). 进一步实验 SIN-1 均作用 5 min.

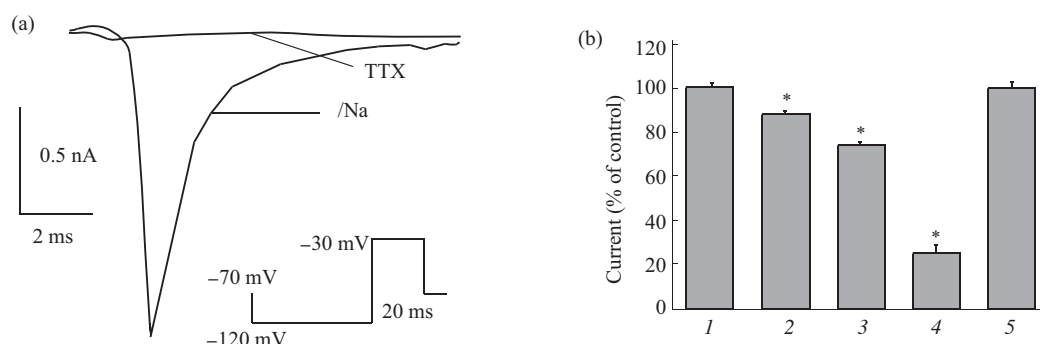


Fig. 1 SIN-1 stimulates I_{Na} currents

A bar graph (b) showing dose-response after 5 min treatment with SIN-1 at 10 μ mol/L, 500 μ mol/L, and 2 mmol/L ($n = 6$ in 500 μ mol/L SIN-1 group) and co-treatment with 500 μ mol/L SIN-1 and 100 mmol/L Urate ($n = 4$ in other groups). Neurons were stimulated by the same parameter which was shown in (a). 1: Control; 2: 10 μ mol/L SIN-1; 3: 500 μ mol/L SIN-1; 4: 2 mmol/L; 5: SIN-1+Urate.

2.2 ONOO⁻对 I_{Na} 的 I - V 曲线和激活动力学的影响

保持电位于 -70 mV, 先给予 -120 mV 持续 120 ms 的超极化刺激, 再给予细胞从 -70 mV 到 $+40$ mV 的去极化刺激, 步幅为 10 mV, 波宽为 20 ms, 记录得到电流图形。

SIN-1 可使 I_{Na} 的 I - V 曲线显著上移, 即减小 I_{Na} (图 2), 然而同时给予 SIN-1 和 Urate 对 I_{Na} 的 I - V 曲线无影响 (数据未出示)。利用公式 $G = I/(V - V_r)$ 将电流值转换为电导值, 其中 G 为电导, V 为膜电位, V_r 为翻转电位。以电导值与最大电导值的

比值(G/G_{max})对应膜电位绘制出给药前后的激活曲线。所得曲线用 Boltzmann 方程 $G/G_{max} = 1/[1 + \exp[(V - V_h)/k]]$ 进行拟合, 式中 G 为电导, V 为膜电位, V_h 为半数激活电压, k 为斜率因子, I_{Na} 的激活曲线均呈 S 形。经拟合得出 SIN-1 给药前后 I_{Na} 的 V_h 分别为 (-44.35 ± 4.29) mV 和 (-40.52 ± 7.81) mV, ($n=6$, $P > 0.05$), k 值分别为 0.25 ± 0.07 和 1.14 ± 1.39 ($n=6$, $P > 0.05$)。说明 ONOO⁻对 I_{Na} 的激活过程无影响 (图 3)。

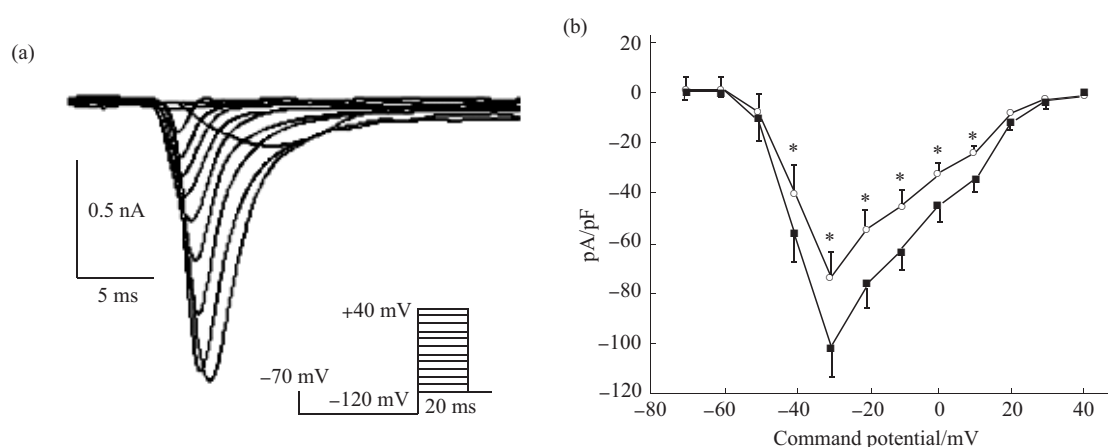


Fig. 2 Effects of $500 \mu\text{mol/L}$ SIN-1 on the I - V curves of I_{Na} ($n = 6$, $P < 0.5$ vs control)

(a) Currents generated by applying depolarizing pulses a 120 ms hyperpolarizing prepulse to -120 mV, and then step depolarized to potential from -70 to $+40$ mV for 20 ms with a 10 mV increment, the holding potential was -70 mV. (b) I - V curves of I_{Na} . ■—■: Control; ○—○: SIN-1.

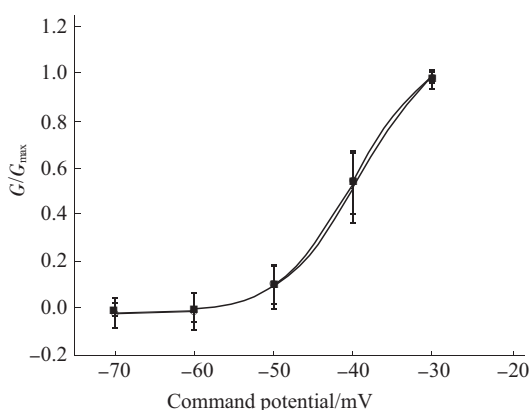


Fig. 3 Effects of SIN-1 ($500 \mu\text{mol/L}$) on the steady-state activation curves of I_{Na}

$n=6$. ■—■: Control; ○—○: SIN-1.

2.3 ONOO⁻对 I_{Na} 的失活动力学的影响

保持电位于 -70 mV, 先给予 -80 mV 至 $+20$ mV

的条件脉冲刺激, 刺激波宽 100 ms, 再给予细胞 -30 mV 的测试脉冲刺激, 记录得到电流图形。以电流峰值与最大电流值的比值对应预脉冲刺激电压绘制给药前后 I_{Na} 的失活曲线, 所得曲线用 Boltzmann 方程 $I/I_{max} = 1/[1 + \exp[(V - V_h)/k]]$ 进行拟合。由此计算出 SIN-1 ($500 \mu\text{mol/L}$) 给药前后 I_{Na} 的 V_h 分别为 (-45.73 ± 1.93) mV 和 (-45.91 ± 4.00) mV ($n=6$, $P > 0.05$), k 分别为 3.05 ± 1.44 和 3.99 ± 1.56 ($n=6$, $P > 0.05$) (图 4)。说明 ONOO⁻对 I_{Na} 失活曲线无影响, 也不改变其斜率因子。

2.4 ONOO⁻对 I_{Na} 失活后恢复的影响

研究通道失活后再激活的恢复时间, 细胞钳制在 -70 mV, 然后给细胞 -30 mV, 12 ms 的条件脉冲(P1)和 -30 mV 20 ms 测试脉冲(P2), 两个刺激间隔保持钳制在 -70 mV, 间隔时程为 $2 \sim 24$ ms, 记录到一系列不同时间间隔的 I_{Na} 电流变化。取 P2 的峰电流与 P1 的峰电流比值对 P1~P2 间期进行作图, 单指数方程 $I/I_{max} = A + B \exp(-t/\tau)$ 拟合 (t 表示 P1

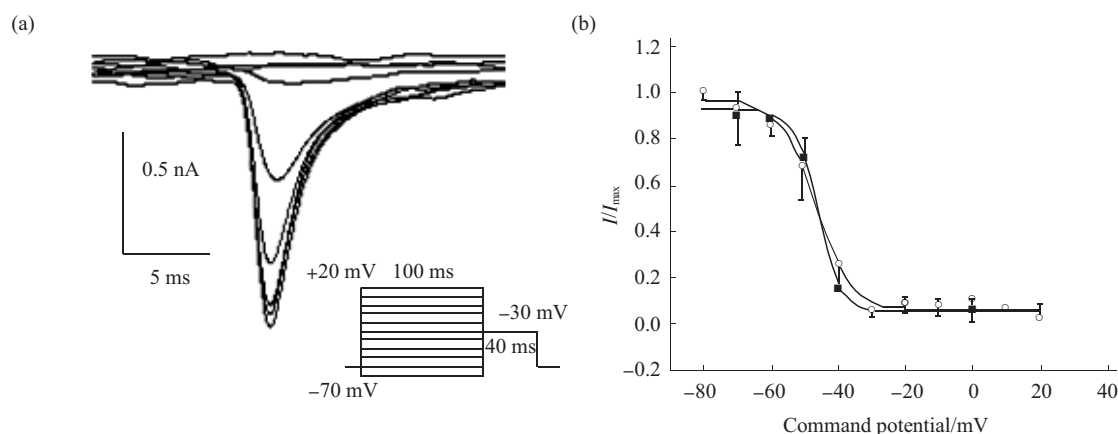


Fig.4 Effects of SIN-1 (500 $\mu\text{mol/L}$) on the steady-state inactivation curves of I_{Na}

$n=6$. ■—■: Control; ○—○: SIN-1.

~P2 的时间间隔, τ 代表恢复时间常数), SIN-1 (500 $\mu\text{mol/L}$) 作用前后失活后 τ 分别为 (2.92 ± 0.49) ms 和 (4.66 ± 1.45) ms ($n=6$, $P < 0.05$) (图 5), 失活后最大 P2 峰电流可再恢复至 P1 峰电流的 90% 以上. 说明 ONOO^- 可抑制 I_{Na} 电流的失活后恢复过程.

2.5 ONOO^- 对动作电位的影响

用 0.5 s 的去极化刺激诱发动作电位 (action potentials, AP) (图 6a). SIN-1 (500 $\mu\text{mol/L}$) 可明显减少 AP 发放频率. 统计刺激所诱发的第一个动作电位的幅值, SIN-1 也降低 AP 峰值 ($n=8$, $P < 0.05$) (图 6b, c).

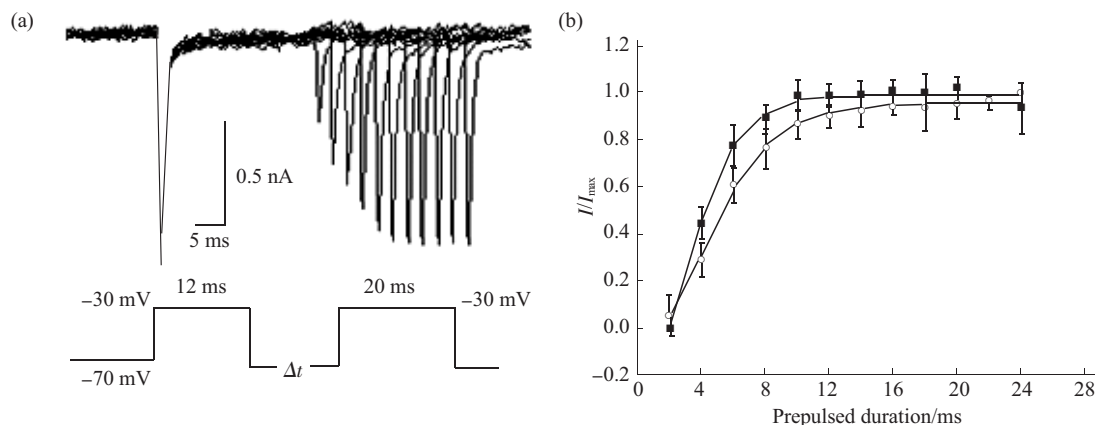


Fig. 5 Representative current traces and protocol used for assessing time-dependent recovery of I_{Na} from inactivation

Currents traces showed are in control (a). Mean data for time course of recovery of I_{Na} from inactivation in the absence of 500 $\mu\text{mol/L}$ SIN-1 (b).

■—■: Control; ○—○: SIN-1.

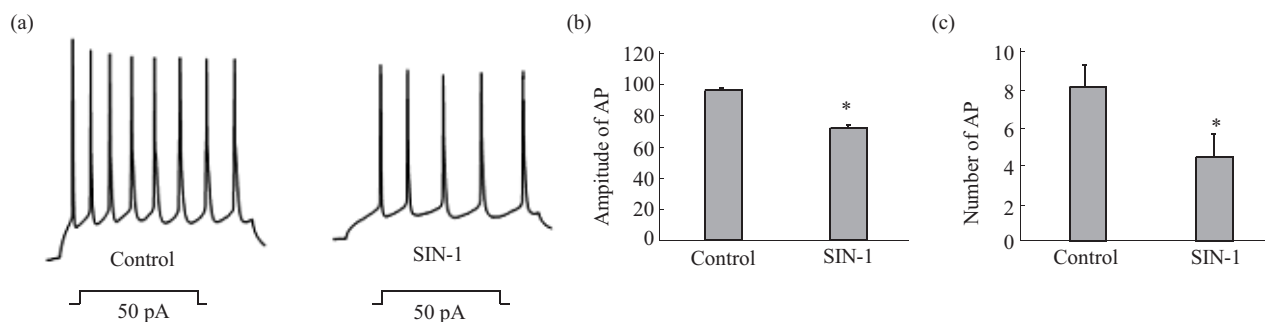


Fig. 6 Effects of SIN-1 (500 $\mu\text{mol/L}$) on repetitive firing and amplitude of action potentials in hippocampal CA1 neurons

The trails of action potentials were evoked by injecting depolarizing 0.5 s current pulses into the cells. The amplitude of action potentials was obtained from the first trails. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=8$).

2.6 SIN-1 通过 CG 途径抑制 I_{Na} 电流与 PKA 和蛋白质巯基亚硝化途径无关

以膜通透的腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)抑制剂 MDL-12, 330A (25 $\mu\text{mol/L}$) 预处理脑片 10 min, 可发现 MDL-12, 330A 对 SIN-1 对 I_{Na} 的抑制作用无影响 (图 7). NEM (50 $\mu\text{mol/L}$, 预处理 10 min) 不影响 SIN-1 对 I_{Na} 的抑制作用. 图 7 显示应用特异性的 CG 抑制剂 ODQ 可抑制 SIN-1 诱导 I_{Na} 电流的改变 ($n = 6$, $P < 0.05$ vs SIN-1). 以上实验皆为电流稳定后加入 SIN-1, 使其终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$.

以上结果表明, SIN-1 通过 CG 途径抑制 I_{Na} 电流与 PKA 和蛋白质巯基亚硝化途径无关.

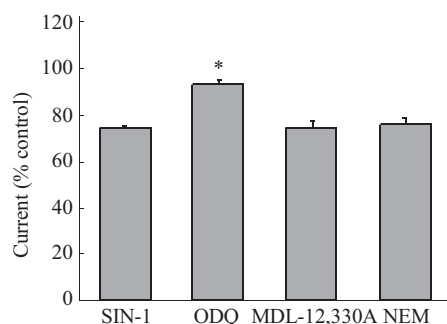


Fig. 7 Bar graph showing summary the variation of I_{Na} in the presence of 500 $\mu\text{mol/L}$ SIN-1, and the effects of pretreatment with ODQ, MDL-12,330A, NEM on the action of SIN-1

Data are presented as $\bar{x} \pm s$ (ANOVA). Significance levels (Turkey's test) are indicated in the Figure. * $P < 0.05$ vs SIN-1 ($n=6$).

3 讨 论

SIN-1 可同时产生超氧阴离子和 NO, 迅速结合生成 ONOO⁻. 为了确定 SIN-1 是否通过产生 ONOO⁻来发挥对 I_{Na} 电流的作用, 或是 SIN-1 本身的作用, 我们应用了 ONOO⁻的清除剂尿酸(Urate), 实验结果证实, SIN-1 和 Urate 共同处理海马 CA1 区神经元, 并不能导致 I_{Na} 电流的变化, 说明 SIN-1 对 I_{Na} 电流的作用是通过产生 ONOO⁻而实现的. ONOO⁻可抑制 I_{Na} 电流, 并呈现剂量依赖性. 实验结果进一步证实 ONOO⁻对 I_{Na} 的激活和失活过程无影响, 但可抑制其失活后恢复.

I_{Na} 电流的改变可参与多种神经系统疾病的病理过程, ONOO⁻对 I_{Na} 电流的抑制作用可能与其神

经毒性有关. 钠通道在神经元电信号的传导中发挥首要作用. 钠通道亚基的修饰能影响动作电位的产生, 动作电位向突触末端的扩布, 和神经元突触前末梢的局部去极化^[3], 所以调节电压门控钠通道性质可对中枢神经系统神经元产生重要影响.

实验结果表明, ONOO⁻可降低动作电位发放频率, 并抑制动作电位幅值. 由于钠通道电流是可兴奋细胞动作电位上升支的最重要组成部分^[4], ONOO⁻对动作电位的抑制作用, 可能与其对 I_{Na} 电流的抑制有关. 有研究表明, 钠通道抑制剂可抑制动作电位的发放^[5]. I_{Na} 电流密度减小, 将导致动作电位去极化幅度及速率下降, 从而使可兴奋细胞传导性降低, 引起传导阻滞. 另外, ONOO⁻抑制 I_{Na} 的失活后恢复过程, 可能也与其降低动作电位发放频率有关. 总之, 抑制钠电流可影响动作电位的产生, 从而影响神经元的信息传递.

ONOO⁻是一种性质活泼的自由基. 已有报道表明 ONOO⁻通过调节蛋白质的氨基酸残基影响通道功能. ONOO⁻可氧化巯基从而抑制上皮细胞的钠通道电流^[6]. NEM 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^[7]. 我们的实验结果表明, 预处理 NEM(50 $\mu\text{mol/L}$) 并不影响 SIN-1 对 I_{Na} 的抑制作用, 说明 ONOO⁻对 I_{Na} 电流的影响与蛋白质巯基的亚硝化无关. 既然 I_{Na} 通道存在 PKA 的调节位点^[8], SIN-1 可能通过 PKA 途径发挥作用. 以膜通透的腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)抑制剂 MDL-12, 330A (25 $\mu\text{mol/L}$) 预处理脑片, 发现 MDL-12, 330A 对 SIN-1 对 I_{Na} 的抑制作用无影响, 说明 ONOO⁻不通过激活 PKA 起作用. 研究表明, ONOO⁻通过鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, CG)信号通路发挥舒张血管的作用, CG 可导致 cGMP 在平滑肌细胞的积累^[9]. 因此, ONOO⁻可能通过 cGMP 依赖的机制调节 I_{Na} 电流. 实验结果表明 CG 的抑制剂 ODQ 可抑制 SIN-1 的作用, 提示 ONOO⁻可能通过 cGMP 信号通路作用于 I_{Na} . 另外 ONOO⁻可能通过其他途径影响 I_{Na} , ONOO⁻可导致蛋白质酪氨酸硝基化, 有报道证实 ONOO⁻可硝基化电压门控钾通道蛋白, 损害其功能^[10].

总之, 本研究表明, ONOO⁻通过 cGMP- I_{Na} -AP 信号级联系统作用于海马神经元, 与 PKA 和蛋白质巯基亚硝化途径无关, 这可能是 ONOO⁻的神经毒性的机制之一.

参 考 文 献

- 1 Brown G C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1411** (2-3):351~369
- 2 付志燕, 杜春云, 姚 扬, 等. 高效氯氰菊酯对大鼠海马 CA3 区神经元电压门控钾通道的影响. *生理学报*, 2007, **59** (1): 63~70
Fu Z Y, Du C Y, Yao Y, *et al.* *Acta Physiol Sin*, 2007, **59** (1): 63~70
- 3 Mackenzie P J, Murphy T H. High safety factor for action potential conduction along axons but not dendrites of cultured hippocampal and cortical neurons. *J Neurophysiol*, 1998, **80**(4):2089~2101
- 4 Evans J R, Bielefeldt K. Regulation of sodium currents through oxidation and reduction of thiol residues. *Neuroscience*, 2000, **101** (1): 229~236
- 5 Matzner O, Devor M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *J Neurophysiol*, 1994, **72** (1):349~359
- 6 Duvall M D, Zhu S, Fuller C M, *et al.* Peroxynitrite inhibits amiloride-sensitive Na currents in *Xenopus* oocytes expressing alpha beta gamma-rENaC. *American Journal of Physiology*, 1998, **274** (5): 1417~1423
- 7 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
- 8 Frohnwieser B, Chen L Q, Schreibmayer W, *et al.* Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J Physiol*, 1997, **498** (Pt 2):309~318
- 9 Tarpey M M, Beckman J S, Ischiropoulos H, *et al.* Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. *FEBS Lett*, 1995, **364**, 314~ 318
- 10 Li H, Gutterman D D, Rusch N J, *et al.* Nitration and functional loss of voltage-gated K⁺ channels in rat coronary microvessels exposed to high glucose. *Diabetes*, 2004, **53** (9): 2436~2442

Peroxynitrite Donor Impairs Excitability of Hippocampal CA1 Neurons by Inhibiting Voltage-gated Sodium Currents *via* cGMP Pathway *

LIU Zhao-Wei¹⁾, HAN Da-Dong²⁾, YANG Xi¹⁾, XU Lan-Jiu²⁾, ZHANG Tao¹⁾**, YANG Zhuo²⁾**

⁽¹⁾Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China;

⁽²⁾College of Medicine Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Nitric oxide (NO) reacts rapidly with superoxide anion and produces speroxynitrite (ONOO⁻), which is a highly reactive free radical that has been shown to mediate much of the toxicity of NO. ONOO⁻ has also been implicated as playing a role in the pathology of various brain disorders. The aim of the study was to investigate the actions of ONOO⁻ on voltage-gated sodium currents and its effect on membrane excitability in hippocampal CA1 neurons. SIN-1, which leads to the simultaneous generation of superoxide anion and NO, and then forms the highly reactive species ONOO⁻, induced a dose-dependent inhibition in amplitudes of transient potassium currents (*I_{Na}*). SIN-1 (500 μmol/L) delayed the recovery of *I_{Na}* from inactivity, but did not have a marked effect on the activation and inactivation parameters of *I_{Na}*. However, co-treatment with SIN-1 and Urate (100 mmol/L), an ONOO⁻ scavenger, had no effect on *I_{Na}* currents. SIN-1 (500 μmol/L) led to the decrease in the amplitude and firing rate of action potential. Pretreatment with adenylate cyclase inhibitor MDL-12, 330A (25 μmol/L) and NEM (50 μmol/L) did not block the effects of ONOO⁻. On the other hand, the responses to ONOO⁻ were inhibited by guanylate cyclase inhibitor ODQ (10 μmol/L). The effects of ONOO⁻ on hippocampal neurons were mediated through activation of cGMP-*I_{Na}*-AP (action potential) signaling cascades and independent from PKA and S-nitrosylation pathway, which maybe one of underlying mechanisms likely related to neurotoxicity of ONOO⁻.

Key words voltage-gated sodium currents, patch, neuron, peroxynitrite

*This work was partly supported by The National Natural Science Foundation of China (30640037, 30470453) and Municipal Science Foundation Research of Tianjin (06YFJMJC09400).

**Corresponding author . Tel: 86-22-23504364

ZHANG Tao. E-mail: zhangtao@nankai.edu.cn

YANG Zhuo. E-mail: zhuoyang@nankai.edu.cn

Received: June 13, 2007 Accepted: September 25, 2007