

and transcription, protecting the DNA sequence from enzymes cleavage, serving as a molecular cleaver.

Key words triple helix nucleic acid, stability, biological function

背景氯离子通道研究进展

张光平 施玉樑

(中国科学院上海生理研究所, 神经生物学开放实验室, 上海 200031)

摘要 综述了目前了解得最为充分的一类电压门控氯通道——背景氯通道, 内容涉及选择性、门控和药理学以及通道蛋白的克隆和分子结构。氯通道广泛存在于细胞膜和细胞器膜, 作为“总管家”参与细胞 pH, 体积, 静息膜电位和兴奋性等多种细胞过程的调节。由于种种原因, 对氯通道的研究起步较晚。目前应用膜片钳和分子生物学技术对氯通道结构功能的研究已经成为一个热点。

关键词 背景氯通道, 选择性, 门控, 药理学, 分子结构

学科分类号 Q73

1 前言

Cl^- 是体内最为丰富和常见的阴离子, 多种生物膜存在着可测出的氯电导。氯通道几乎存在于所有利用膜片钳研究过的细胞质膜和细胞器膜。但由于氯通道不象 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 通道那样对兴奋的发生、传导和传递起直接、明显的作用和跨膜氯流 (I_{Cl}) 时程慢及电压依赖性弱, 分离鉴别困难, 常被视为漏电流而忽视, 从而使氯通道的研究迟迟未受重视, 直到膜片钳技术建立后才起步, 并成为近 10 年通道研究中的一个热点。新发现的氯通道种类与日俱增, 数量之多超过了除 K^+ 通道以外的任何通道。

氯离子的广泛分布和多种细胞存在着跨膜氯浓度梯度, 使氯通道参与细胞体积调节, pH 及静息膜电位和兴奋性的调节, 细胞分泌和激素作用等多种生理过程。

目前研究尚不能对氯通道进行系统分类, 但通常依其门控特性分为电压依赖和配体激活的两大类。前者包括背景氯通道, 双桶氯通道和大电导氯通道; 后者包括 γ -氨基丁酸

(GABA)、甘氨酸、乙酰胆碱 (ACh) 以及 Ca^{2+} 激活的氯通道。也有研究者以调制途径和功能特性将某些通道称为 cAMP 依赖的、G 蛋白偶联的或体积依赖的氯通道。

背景氯通道通常指这样一大类阴离子通道, 在包括静息膜电位在内的大范围膜电位水平即有相当开放几率, 在某些骨骼肌静息氯电导可占总静息电导的 70%~80%, 是 K^+ 电导的数倍。背景氯通道的广泛存在, 在很大的电压范围内激活, 长时间不失活等特性为研究提供了方便, 使它成为研究得最为充分的一类氯通道。

2 通道电导、选择性和离子转运机制

2.1 单位电导、电导亚态和外向整流

单位电导值分布很广, 在对称的 150 mmol/L Cl^- 条件下, 从 0.5 pS 到 1 300 pS^[1,2] 可跨越三个数量级。氯通道常常呈外向整流特征, 这不是正电压下通道开放几率增加的结果, 而象是由通道孔道的电学结构不对称造成的。

背景氯通道的另一个特征是电导亚态的存

在^[3, 4], 即在全开放与全关闭态之间存在着多个电导水平. 这在电鱼电器官, 软体动物神经元, 哺乳动物胶质细胞和淋巴细胞的背景氯通道中都有报告.

2.2 离子选择性不强

可通透的阴离子在 10 种以上, 有些对 Br^- 、 I^- 甚至比对 Cl^- 更通透^[5]. 由通道对疏水性离子通透及可被多种芳香族化合物阻断推测, 在通道的孔道内部存在疏水区.

从通道选择性顺序资料估算, 背景氯通道的孔径约 0.6~0.7 nm, 接近终板通道的值; 对两价离子不通透, 可通透 Na^+ 、 Li^+ 、 K^+ 、 Cs^+ , 这同阳离子通道不通透阴离子的特征形成鲜明对比.

2.3 离子转运机制

在海马的研究表明^[6], 只有在可通透阴离子存在时, 背景氯通道方能通透阳离子, 用不通透的 SO_4^{2-} 代替 Cl^- , 在比预测的逆转电位更负的电压下记录不到内向流. 其次, 膜的通透率与阳离子种类有关, 用 Cs^+ 代替 Na^+ 作为主要胞外阳离子后, 单通道电导增加 20%. 这提示, 通道中阴阳离子流存在着相互作用. Francili 等提出“活化复合物”模型解释这些观察^[6]. 该模型认为, 通道中呈负电性的位点结合阳离子形成偶极子, 再俘获阴离子组成活化复合物, 此活化复合物以两种方式衰变: 解离阴离子形成跨膜阴离子流; 解离阴阳离子对, 从而将阳离子携带至膜的另一侧.

背景氯通道通透一价阳离子与其稳定静息电位的功能相左. 活化复合物模型的解释是: 生理条件下, 由于氯通道不能区分 Na^+ 、 K^+ , 膜内外无阳离子梯度, 阳离子净内流需先与通道位点结合, 再俘获膜内 Cl^- 形成复合物, 但由于 $[\text{Cl}^-]_i$ 低, 这种情况不会发生. 这样, 逆转电位将由 $[\text{Cl}^-]_i$ 决定, 而与阳离子通透性无关.

3 通道门控特性

3.1 电压依赖性

根据电压依赖性, 背景氯通道可分为超极

化激活, 去极化激活和极化失活三种类型.

a. 超极化激活: 首先在海马神经元上观察到^[7], 激活时间常数达数百毫秒; 门控性质类似内向整流 K^+ 流, 依赖于 $[\text{Cl}^-]_o$; 提高 $[\text{Cl}^-]_i$ 降低激活阈值, 加速激活, 这种性质使它具有易化胞内过剩 Cl^- 的排出. 通道有三个电导水平. 在大鼠腮腺细胞^[8] 也发现一种电压和时间依赖性超极化激活、具有强烈内向整流的氯通道.

电鱼电器官的双桶氯通道也由超极化激活^[9]. 将数千个通道重组于平板脂双层, 测定发现稳态电导随膜的超极化而增大, 电压依赖关系近似于 Boltzman 分布, 等效电荷 1.5, 最大半激活电压 -50 mV. 在小鼠胶质细胞上发现的背景氯通道在超极化 -40~-100 mV 范围内开放几率增加, 单位电导 5 pS, 也存在有亚态.

b. 去极化激活: 最广泛存在的背景氯通道, 为去极化激活. 如大鼠大脑皮层和海马神经元上的背景氯通道^[7, 10], 开放几率-电压关系服从 Boltzman 分布. 电压依赖性归因于去极化缩短关闭时间而相对不影响开放时间, 开放与关闭都是电压依赖的, 但开放的电压依赖性更强. 大鼠肌球的背景氯通道也有类似的特征.

c. 极化失活: 通道在静息电位附近开放, 去极化或超极化都使通道失活, 开放几率-V 曲线为钟形. 如兔骨骼肌肌质网的 SCl 氯通道^[4] 开放几率在电压大于 +20 mV 时失活, -40 mV 时达到最大值. 类囊体的 100~110 pS 单位电导的氯通道, 超极化或去极化 40 mV 失活, 该通道可能有两个闸门, 分别在正、负电压时关闭. 在大鼠骨骼肌^[12] 和青蛙骨骼肌上^[2] 也发现过类似的氯通道.

不同氯通道有比阳离子通道弱的、不同的电压依赖性, 但却有相似的选择性. 超极化激活氯通道时间常数可达几百 ms, 门控电荷小于 2; 而 Na^+ 、 K^+ 通道的激活在毫秒量级, 门控电荷接近 6.

3.2 门控动力学

这部分讨论限于两种已有足够资料的氯通

道：肌肉与神经的快氯通道^[10]和电鱼的双桶氯通道^[9]。前者在包括静息膜电位在内的广泛电压水平开放而不失活。通过记录大量开、关事件的时程分布，再确定拟合时程分布的幂数，发现开放时程需用两阶而关闭时程至少用六阶指数函数拟合，由此提出了包括两个开放态和六个关闭态的动力学模型。

对双桶氯通道的动力学分析更为详尽，研究认为这种氯通道由两个相同的原通道组成，有两种门控机制。一种管理通道的激活（排放）和失活，超极化提高排放几率。另一种管理原通道在三个电导水平的转换，去极化增大开放几率，具相反的电压依赖性。

4 药理学性质

背景氯通道阻断剂有三类：芳香族酸，无机离子和质子。第一类包括 9-AC (anthracene-9-carboxylate)、DPC (diphenylamine-2-carboxylate)、NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoate)、SITS (isothiocyanostilbenedisulfonic acid)、DIDS (4, 4'-diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonic acid)、DNDS (dinitrostilbene disulfonic acid)。微摩尔量级于胞外即产生抑制作用，作用部位可能在通道外嘴。抑制的分子机制尚不清楚，由它们都具疏水性推测，通道的疏水域可能是作用位点。主动脉上皮的外向整流氯通道可被 NPPB 可逆地从膜两侧阻断且无浓度依赖性；重组于平板膜的心肌肌质网的氯通道被 NPPB 作用后产生闪烁现象，平均开放时间明显下降，由开放几率- $[NPPB]$ 曲线推测，NPPB 可能与膜脂作用进而改变通道蛋白的构象，从而阻断氯通道^[5]；某些芳香族氨基酸可使哺乳动物产生肌强直，这是氯通道被阻断的结果。从对多种芳香族氨基酸的比较中发现对氯电流的抑制以 9-AC 最强。随 9-AC 浓度的增加，氯通道选择性也逐渐变化，甚至选择顺序颠倒。DIDS 胞内外均有效，可逆地、浓度依赖性地阻遏氯通道，阻遏作用与膜电位无关。

无机阳离子是比芳香族酸弱的阻断剂，

Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 最强^[14]，在青蛙骨骼肌胞浆侧应用 Zn^{2+} ，以电压依赖方式可逆地阻断氯电流，但用于胞外则无电压依赖性。

pH 的影响。青蛙骨骼肌静息膜电导在 pH 9.8 和 5.0 时分别为 7.4 时的 1.8 倍和 1/5。将心肌肌质网膜氯通道重组于脂双层，改变膜两侧的 pH，显著影响通道电导^[5]；分泌上皮顶膜胞内 pH 从 6.0 升到 9.0，氯电导下降 40%；肌球内 pH 从 7.0 到 8.0 可使单通道电导从 505 pS 降低到 257 pS，但 pH 在 4.0 到 7.0 间变化无影响。胞外的酸化降低 CFTR 氯通道的开放几率约 47%，但不影响单位电导。

有报告细胞外施加四乙胺 (TEA) 也阻断龙虾游泳肢神经和大鼠脑神经元氯通道，呈电压和浓度依赖性， IC_{50} 为 10 mmol/L。

5 氯通道的分子克隆

已克隆的氯通道主要有以下几类，跨膜拓扑结构如图 1。

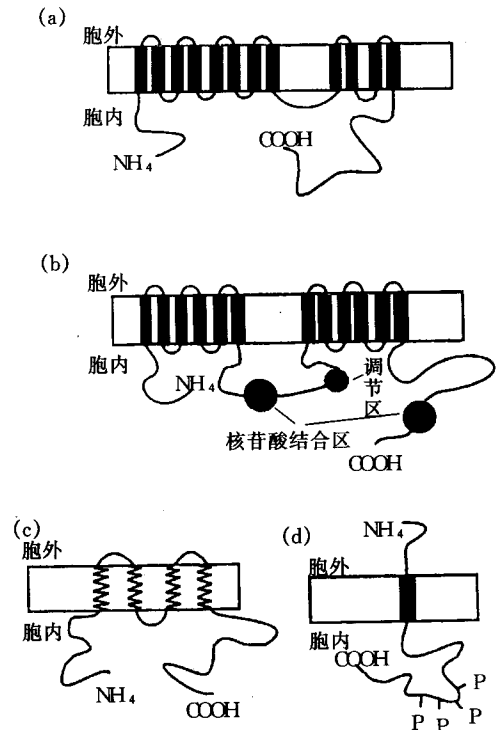


图 1 几种氯通道的拓扑结构图

(a) CLC; (b) CFTR 和 P-糖蛋白; (c) I_{dn} ; (d) phospholemman.

5.1 CLC家族

CLC 蛋白构成一大类氯通道家族, M_w 约 75~110 ku, 均有 12 个跨膜区和相同的离子选择顺序 ($\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$) 及低的单位电导值, 如 CLC-0 为 10 pS, CLC-1 则仅为 1 pS^[15].

在哺乳动物已发现 9 个 CLC 家族基因, 依其同源性可分成三组: 接近电鱼电器官的 CLC-0、CLC-1、CLC-2 和肾特异性的 CLC-Ka、CLC-Kb; CLC-3、CLC-4、CLC-5; CLC-6 和 CLC-7.

CLC-5 的功能缺失导致高钙尿症和低分子质量蛋白尿症的肾结石病^[11]. CLC-1 是哺乳动物骨骼肌的主要氯通道, 功能缺失会使肌膜动作电位复极化延缓, 导致肌强直.

首先从电鱼的电器官中克隆的 CLC-0, 具有快门控特征. 最近有人提出阴离子自身就是 CLC-0 的门电荷, 以解释该类通道电流的氯离子浓度依赖性. CLC-2 可以被强超极化或细胞膨胀激活, 可能参与细胞体积调节, 防止在高于平衡电位时氯离子的积累. CLC-3 的表达范围更广泛, 功能尚不清.

5.2 CFTR

囊性纤维变性 (CF) 是上皮细胞对 Cl^- 不通透引起的疾病. 基因已克隆, 相应的蛋白 CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 是一种氯通道^[16]. CF 是 CFTR 突变引起的. CFTR 还可调节外向整流氯通道、Na 通道, 用 cAMP 刺激 CFTR 会导致上皮细胞 Na 通道的关闭^[20].

CFTR 有两个六次跨膜区 (TMD), 两个核苷酸连接区 (NBD) 和一个调节区. 跨膜区参与孔道的形成. CFTR 门控特征可能受到 ATP 的调节^[13], ATP 在第一个 NBD 上被水解可打开通道; 在第二个 NBD 上结合使通道稳定于开放状态, 水解则使通道关闭. 有趣的是去掉 CFTR 的 C 端 (第二个 TMD 和第二个 NBD) 通道的基本性质不变. 这说明此突变体以二聚体的形式完成其功能, 也说明第一个 TMD 对孔道的形成有关键性的作用. 此外

PKA 可以激活 CFTR.

5.3 Phospholemman、 I_{Cln} 和 P-糖蛋白

均已被克隆和表达, 有证据表明它们是氯通道, 但也可能只是氯通道调节器.

Phospholemman 是一次跨膜的 72 个氨基酸的小肽^[17], 强超极化下缓慢激活, 可通透氯离子, 但一些实验表明它只是氯通道调节器. I_{Cln} ^[18] 在卵母细胞中表达外向整流氯电流, 但由于卵母细胞天然就存在这种电流, 胞内又有大量 I_{Cln} 蛋白, 故又认为它只是通过体积调节打开氯通道的调节器. P-糖蛋白 (P-glycoprotein)^[19] 的结构与 CFTR 的相似, 从而有人认为它是氯通道, 但二者仅在 NBD 相似, TMD 却不相同, 有实验表明它只是其他氯通道的调节器.

6 结 语

近 10 年氯通道的研究进展飞速, 人们开始认识到氯通道的复杂性和多样性, 多种氯通道已被克隆. 但由于尚未找到亲和力的配体, 至今尚未有从纯化氯通道蛋白的方法分析氯通道一级结构的报道. 寻找高亲和力的氯通道配体将是一个重要课题.

参 考 文 献

- 1 Kajita H, Morishima S, Shirakata Y *et al.* A mini Cl^- channel sensitive to external pH in the basolateral membrane of guinea pig parietal cells. *J Physiol*, 1995, **488** (1): 57~64
- 2 Hals G D, Stein P G, Palade P T. Single channel characteristics of a high conductance anion channel in "sarcoball". *J Gen Physiol*, 1989, **93** (3): 385~410
- 3 Fox J A. Ion channel subconductance states. *J Membrane Biol*, 1987, **97** (1): 1~8
- 4 Kourie J I, Laver D R, Junankar P R *et al.* Characteristics of two types of chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Biophys J*, 1996, **70** (1): 202~221
- 5 Townsend C, Rosenberg R L. Characterization of a chloride channel reconstituted from cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Membrane Biol*, 1995, **147** (2): 121~136
- 6 Franciolini F, Nonner W. Anion and cation permeability of a chloride channel in rat hippocampal neurons. *J Gen Physiol*, 1987, **90** (4): 453~478
- 7 Chesnoy-Marchais D, Evans M G. Cl^- channel activated by hyperpolarization in Aplysia neuron. *Pflügers Arch*, 1986,

- 407 (3): 694~ 696
- 8 Arreola J, Park K, Melvin J E *et al.* Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cells. *J Physiol*, 1996, **490** (2): 351~ 362
- 9 Miller C, White M M. Dimeric structure of single chloride channels from *Torped* electroplax. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81** (9): 2772~ 2775
- 10 Blatz A L. Properties of single fast chloride channels from rat cerebral cortex neuron. *J Physiol*, 1991, **441**: 1~ 21
- 11 Lloyd S E, Pearce S H S, Fisher S E *et al.* A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*, 1996, **379**: 445~ 449
- 12 Blatz A L, Magleby K L. Single voltage-dependent chloride selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys J*, 1983, **43** (1): 237~ 241
- 13 Gunderson K L, Kopito R R. Conformational states of CFTR associated with channel gating: the role of ATP binding and hydrolysis. *Cell*, 1995, **82** (2): 231~ 239
- 14 Woll K H, Leibowitz M D, Neumcke B *et al.* A high-conductance anion channel in adult amphibian skeletal muscle. *Pflügers Arch*, 1987, **410** (3): 632~ 640
- 15 Pusch M, Jentsch T J. Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. *Physiol Rev*, 1994, **74** (4): 813~ 827
- 16 Riordan J R. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol*, 1993, **55**: 609~ 630
- 17 Moorman J R, Palmer C J, John III J E *et al.* Phospholemman expression induces a hyperpolarization-activated chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 1992, **267** (21): 14551~ 14554
- 18 Paulais M, Li Y, Wickman K *et al.* New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature*, 1992, **356**: 238~ 241
- 19 Leveille-Webster C R, Arise I M. The Biology of The G-Glycoprotein. *J Membrane Biol*, 1995, **143** (1): 89~ 102
- 20 Stutts M J, Canessa C M, Olsen J C. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*, 1995, **269**: 847~ 850

Progress in the Study of Background Chloride Channels. ZHANG Guang-ping, SHI Yu-liang (*Shanghai Institute of Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract Cl^- channels are found in all of cellular and subcellular membranes which have been determined. As housekeeper, they play vital roles in many different processes, such as regulation of cell volume, pH, resting membrane potential and excitability. Because the classical electrophysiological investigation has not been able to clearly characterize a macroscopic Cl^- current, as was done for Na^+ , K^+ and Ca^{2+} current, Cl^- channel are ignored for many years. The recent explosion in knowledge of Cl^- channel is owing the technical using of single channel recording and molecular biology. The ionic permeation, selectivity, gating and pharmacological properties as well as the molecular clone and structure of background Cl^- channels, the most widely existed Cl^- channel in biomembranes, are reviewed.

Key words background Cl^- channel, selectivity, gating, pharmacology, molecular structure

植物蛋白酶抑制剂在植物抗虫与抗病中的作用

卢晓风 夏玉先 裴 炎

(西南农业大学生物技术中心, 重庆 400716)

摘要 综述了植物蛋白酶抑制剂抗虫与抗病作用的研究进展。蛋白酶抑制剂广泛存在于植物体内, 与植物抗虫抗病密切相关。植物蛋白酶抑制剂能抑制昆虫肠道蛋白酶, 使昆虫生长发育缓慢, 甚至死亡。但取食蛋白酶抑制剂后, 昆虫能迅速分泌对抑制剂不敏感的蛋白酶, 而使蛋白酶抑制剂无效。食物蛋白的含量和质量也影响植物蛋白酶抑制剂的抗虫效果。病原菌的感染能诱导植物产生蛋白酶抑制