

目前, 我们已将 MCP 克隆到大肠杆菌表达载体和真核表达载体上, 准备在大肠杆菌, 真核细胞及动物上分别进行表达研究。

参 考 文 献

- 1 Platt J L, Logan J S. Use of transgenic animals in xenotransplantation. *Transplantation Reviews*, 1996, **10** (2): 69~77
- 2 Christopher H H, Karen L S, Hidechika O, *et al.* Complement regulatory proteins at the feto-maternal interface during human placental development; distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). *Eur J Immunol*, 1992, **22** (6): 1579~1585
- 3 Cole J L, Housley G A, Jr Dykman T R, *et al.* Identification of an additional class of C₃-binding membrane protein of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (3): 859~863
- 4 Ayako K, Kazunori I, Tsukasa S, *et al.* Membrane cofactor protein (CD46) protects cells predominantly from alternative complement pathway-mediated C₃-fragment deposition and cytolysis. *J Immunol*, 1993, **151** (3): 1519~1527
- 5 Theodore W P, Liszewski M K, Adams E M, *et al.* Membrane cofactor protein of the complement system: Alternative splicing of Serine/Threonine/Proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J Exp Med*, 1991, **174** (1): 93~102
- 6 Seya T, Hara T, Matsumoto M, *et al.* Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement: High expression of MCP on human Leukemia cell lines, which is down-regulated during cell differentiation. *J Immunol*, 1990, **145** (1): 238~245
- 7 Douglas M L, Liszewski M K, Post T W, *et al.* Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP), evidence for inclusion in the multigene family of complement regulatory proteins. *J Exp Med*, 1988, **168** (1): 181~194
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~23
- 9 Russell S M, Sparrow R L, McKenzie I F C, *et al.* Tissue-specific and allelic expression of the complement regulator CD 46 is controlled by alternative splicing. *Eur J Immunol*, 1992, **22** (6): 1513~1518

Cloning, Sequencing of Human Membrane Cofactor Protein (MCP) and Comparison with Other Isoforms. HUANG Jian, LI Wen-Xin, GOU De-Ming, JIANG Da-He (*College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract MCP is an important membrane protein for protecting host cells from damage by complement because of its wide tissue distribution and cofactor activity. A human MCP cDNA containing full encoding region was obtained by RT-PCR from Chinese human embryo. The target gene was cloned and sequenced. The data indicated that there are forty-five bases deletion compared with the counterparts previously reported, which leads to the deletion of fifteen amino acid residues. The PCR product including 369aa open reading frame was one of the ten isoforms which had been reported before and it was named MCP-C₂.

Key words MCP cDNA, RT-PCR, DNA sequencing, alternative splicing, isoforms

皮层 SI 区伤害感受神经元膜电生理特性研究*

张日辉 滕国玺

(中国医科大学脑研究所, 沈阳 110001)

摘要 用细胞内记录技术, 在 16 只成年健康猫, 研究了皮层第一躯体感觉区 (primary somatosensory cortex area, SI 区) 伤害感受神经元的电生理特性。SI 区伤害感受神经元自发电频率差异大, 放电形式多样。极化电流绝对值 ≤ 1.0 nA 时, 伤害感受神经元 $I-V$ 极相关 ($r = 0.96$), 整流作用不明显; 极化电流绝对值 > 1.0 nA 时, 在两个方向上发生整流, $I-V$ (电流-电压) 曲线表现为“S”型, 其中伤害感受神经元整流作用较非伤害感受神经元明显。伤害感受神经元 R_m 、 τ 、 C_m 明显大于非伤害感受神经元 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果提示 SI 区伤害感受神经元与非伤害感受神经元可能在细胞膜结构、细胞大小等方面存在有意义的差别, 从而反映其不同的生理功能。此电学参数特点也可作为痛觉的特异性学说提供实验资料。

关键词 皮层体感区, 伤害感受性神经元, 细胞内记录, 细胞膜参数

学科分类号 Q424

* 国家自然科学基金资助项目 (39170294)。 收稿日期: 1998-04-07, 修回日期: 1998-10-09

躯体感觉皮层在痛觉感受及调制中的作用日益受到重视。Lamour 等^[1]对麻醉大鼠皮层第一躯体感觉区(primary somatosensory cortex area, SI 区)反应单位进行研究,将 SI 区神经元分为四种。Roos 等^[2]研究了刺激牙髓向中神经,皮层各层神经元的细胞内电位反应。解剖学^[3]和电生理学^[4]研究看到猫躯体感觉皮层的反应特征和皮层神经元的细胞类型不同形态特征有关。但尚缺乏充足的实验资料证明。本文采用玻璃微电极细胞内记录技术,研究皮层 SI 区伤害感受神经元放电特点及膜电学参数,尝试从其电生理特征研究皮层伤害感受神经元机能特点。

1 材料和方法

1.1 实验动物的准备

实验用成年健康猫(体重 2.0~3.5 kg) 16 只雌雄不限。1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg) 静脉麻醉,施行气管插管保证呼吸畅通或备人工呼吸。剥离左后肢隐神经,安放刺激电极。作小脑延髓池引流,在右侧 SI 区位置(AP 25 mm, LR 4 mm) 开颅暴露 SI 区(直径 8 mm),实验过程中将动物四肢悬空,用电热毯维持动物肛温 37~38℃。实验中大部分动物是在不用肌松剂制动的自然呼吸条件下记录 SI 区细胞内电位^[5],必要时静脉补充注射 1% 戊巴比妥钠以控制动物肢体的活动,部分实验在三碘季胺酚(10 mg/kg) 制动,人工呼吸条件下进行以做对照。

1.2 刺激和记录技术

按皮层沟回直观定位,将尖端直径 $\leq 0.5 \mu\text{m}$ (电阻 30~50 M Ω) 内充 3 mol/L KCl 溶液的玻璃微电极经推进器逐渐推入 SI 区隐神经投射区。当微电极插入神经元并稳定后,给予隐神经刺激(单脉冲方波,强度 1.0 mA,波宽 0.5 ms) 必要时用木棒触毛,有齿镊子钳夹后肢皮肤、注入吗啡等检出伤害感受性神经元。伤害感受性神经元,一般静息电位 $\leq -40 \text{ mV}$,对伤害性刺激隐神经产生潜伏期 ($\geq 45 \text{ ms}$) 的伤害性反应 (EPSP 或 IPSP),用木棒轻轻触碰皮毛(即给触觉刺激) 无反应,而钳夹后肢皮肤产生上述伤害性反应,注入吗啡伤害性反应被抑制,否则即为非伤害感受性神经元;特异性伤害感受神经元,诱发反应仅由潜伏期 $\geq 45 \text{ ms}$ 的伤害感受成分组成,而非特异性伤害感受神经元,诱发反应则由短潜伏期 ($\leq 25 \text{ ms}$) 的触觉感受成分和伤害感受成分组成。对部分神经元通

过细胞内微电极给一系列不同强度 ($-5 \text{ nA} \sim +5 \text{ nA}$, 波宽 50 ms) 的直流极化电流。将引导的细胞内电位经 MEZ-8201 生物放大器,输入 VC-10 示波器,同时作磁带记录,再输入 ATAC-350 数据处理机处理,由 X-Y 记录仪描记结果。

2 结 果

2.1 SI 区伤害感受神经元自发放电的特点

本实验观察的神经元静息电位 $\leq -40 \text{ mV}$ 并能维持这一电位水平长达 5 min 以上,不符合条件的舍弃之。

观察 118 个伤害感受性神经元的自发放电,其静息电位平均值为 $(-45.99 \pm 3.21) \text{ mV}$ 。不同的神经元自发放电频率差异很大,放电形式也不同(图 1)。SI 区伤害感受性神经元在同一座标 (AR、LR) 的不同深度,约每 500~800 μm 可找到同一自发放电类型(如紧张性或节律性等形式)的神经元,即在同一柱状结构中自发放电形式、刺激诱发反应均相似,而且不同层间的神经元放电也有差别。自发放电与细胞膜电位水平有关,一般静息电位 $\geq -45 \text{ mV}$ 放电少或无放电,在 $-45 \sim -60 \text{ mV}$ 之间则细胞放电频率较高,而膜电位 $\leq -70 \text{ mV}$ 则放电又减少。

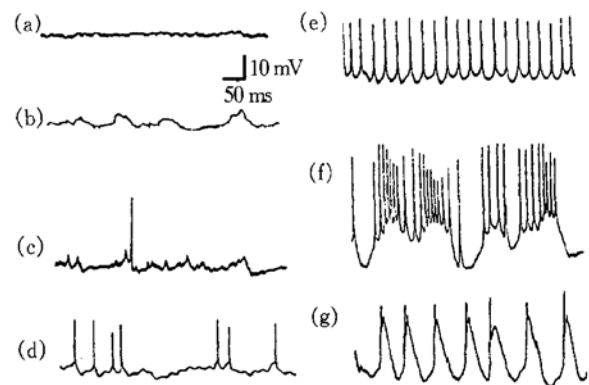


图 1 SI 区伤害感受神经元自发放电形式

(a) 静息无放电; (b) 突触式活动; (c) 偶发性放电;
(d) 位相型放电; (e) 紧张性放电; (f) 节律性放电;
(g) 驼峰式放电。

2.2 SI 区伤害感受神经元膜电学特性

通过细胞内微电极给观察细胞一系列不同强度的极化电流 ($-\Delta I$), 观察到(图 2): 注入超极化电流 -0.2 nA (波宽 50 ms, 以下同) 时膜电位有微小变化缓慢恢复至静息水平, $-0.4 \text{ nA} \sim -1.0 \text{ nA}$ 时, 注入电流停止后可见一返跳性缓慢除极化波, -2.0 nA 时注入电流停止后可在缓慢

除极化波上引发出锋电位, 即阳极阻断兴奋性反应; 细胞内注入去极化电流+ 0.2 nA 只引起局部膜电位变化无放电, + 0.3 nA 时引发锋电位, 随

着去极化电流增强至+ 3.0 nA 时放电逐渐增多, + 3.0 nA 以上时放电又逐渐减少减弱甚至消失.

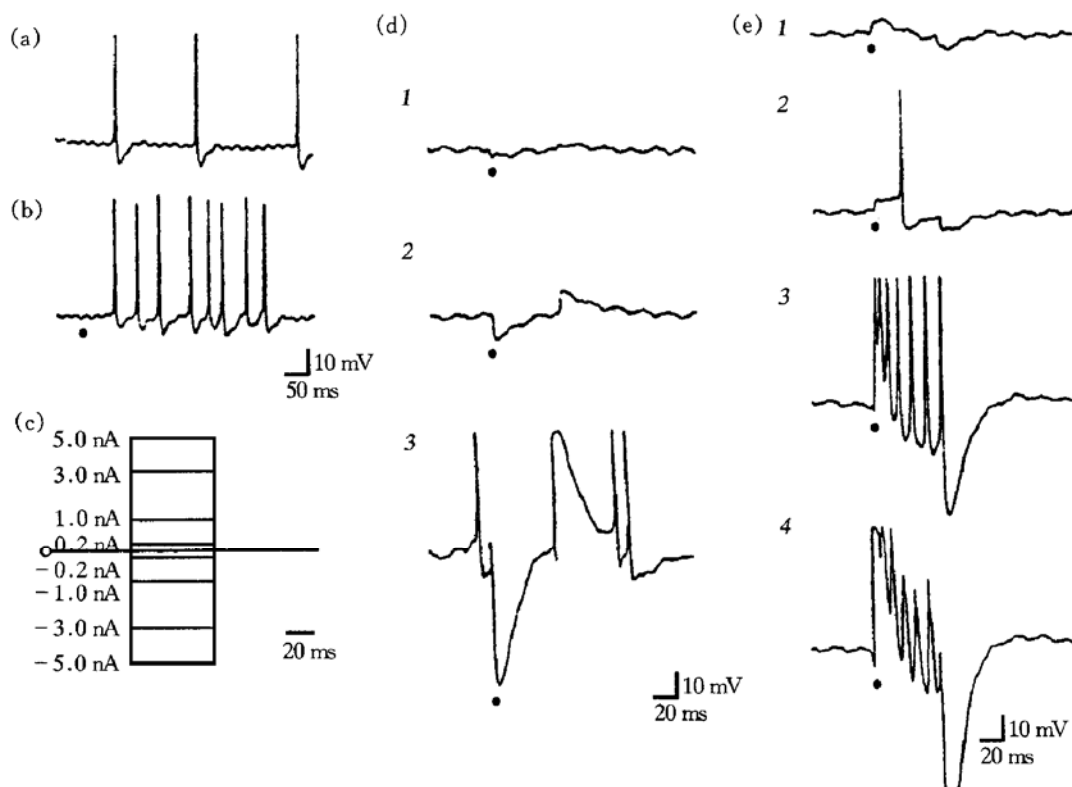


图2 伤害感受神经元内注入电流的效应

(a) 自发放电; (b) 刺激隐神经诱发的兴奋性反应; (c) 注入电流的方向与强度的示意图; (d) 注入超极化电流, I : 0.2 nA, 2: 0.4 nA, 3: 2.0 nA; (e) 注入去极化电流, I : 0.2 nA, 2: 0.3 nA, 3: 2.0 nA, 4: 3.0 nA.

按照欧姆定律计算出膜电阻 ($R_m = \Delta V / \Delta I$), 并由电位变化到最大值的 63% 时所需要的时间得到时间常数 τ , 又根据公式 $C_m = \tau / R_m$ 计算出膜电容, 统计结果: 伤害感受神经元 ($n = 24$) $R_m = (17.98 \pm 2.62) \text{ M}\Omega$ 、 $\tau = (2.17 \pm 0.70) \text{ ms}$ 、 $C_m = (12.78 \pm 3.72) \text{ pF}$, 明显大于非伤害感受神经元 ($n = 11$) $R_m = (14.27 \pm 3.28) \text{ M}\Omega$ 、 $\tau = (1.24 \pm 0.44) \text{ ms}$ 、 $C_m = (9.24 \pm 4.37) \text{ pF}$ ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$).

注入不同强度的极化电流 ($-\Delta I$), 记录一组对应的电紧张电位 ($-\Delta V$). 作图得 $I-V$ 曲线 (图3). 在极化电流绝对值 $\leq 1 \text{ nA}$ 时, 伤害感受神经元 I 与 V 极相关 ($r = 0.96$). 非伤害感受神经元 I 与 V 也呈直线相关 ($r = 0.74$), 整流作用不明显; 在极化电流绝对值 $\geq 1 \text{ nA}$ 时, 可在两个方向上发生整流, 从而 $I-V$ 曲线表现为“S”型, 其中伤害感受神经元整流作用较非伤害感受神经元整流作用明显, R_m 迅速降低.

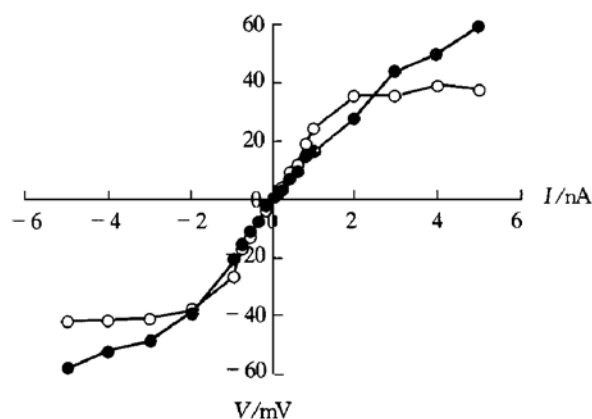


图3 伤害感受神经元与非伤害感受神经元的 $I-V$ 曲线

○—○: NCNs; ●—●: NNCNs.

3 讨 论

3.1 关于中枢神经元放电节律

实验观察到 SI 区伤害感受神经元的自发放电频率差异较大, 放电形式多样, 与文献报道一

致^[6]。受许多条件影响: a. 自发放电与膜电位有关; b. 自发“背景”放电可影响皮层神经元对刺激的反应方式; c. 诱发放电也可影响自发放电^[7]; d. 不同的神经元反应通过不同神经网络表现出不同的生物电活动。关于节律性放电的形成机制有两种主张: 一种认为由于单一神经元细胞膜本身的特性而产生的内在节律性^[8]; 另一种认为是与闭合的神经元环路活动有关^[9]。实验中见到神经元在不同状态下分别具有节律性、紧张性、驼峰、突触式放电各种形式。推测不同放电形式编码不同信息代表不同环路功能活化机制。

3.2 伤害感受神经元的膜电学参数

实验中给观察细胞注入一系列不同强度的去极化电流, 观察结果与 Dichter^[10]曾在大鼠离体培养的皮层神经元实验结果不同, 可能与动物种类及细胞膜自身结构性质有关。但此差异可能更提示离体培养的单个皮层神经元没有形成复杂突触, 而在体细胞内记录时, 神经元间形成复杂的突触, 电流刺激对膜被动性质的影响, 除与细胞自身膜特征有关外, 可能还与其复杂的环境及突触联系有关。此点也从另一侧面证明了膜电阻、电容及时间常数在分析、说明突触电位时有重要意义。

R_m 及 τ 是反映膜被动性质的电学参数。 τ 值越小, 表示膜易于去极化, 则信号扩散的速率越快^[11]。 R_m 与 C_m 的大小与细胞面积有密切关系, 在体研究发现, 胞体较小的细胞趋向于有较大的 R_m ^[12]。本实验测得伤害感受神经元 R_m 、 τ 值、 C_m 均比非伤害感受神经元大 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。而伤害感受神经元中特异性与非特异性伤害感受神经元 R_m 、 τ 值、 C_m 差异不显著 ($P > 0.05$)。实验结果提示 SI 区伤害感受神经元与非伤害感受神经元可能在细胞膜结构、细胞大小等方面存在差异, 从而反映其不同的细胞生理机能。我们认为伤害感受神经元电阻高, 相对地不易兴奋, 信号传导速率也较慢, 特异性伤害感受神经元可能伺服伤害信息的感受; 非特异性伤害感受神经元对痛觉产生的警觉、情绪反应有关^[13]; 而非伤害感受神经元可能受非特异投射系统激活, 对大脑皮层起易化作用, 维持大脑皮层处于觉醒状态^[14]。笔者认为伤害感受神经元的此电学参数特点也可作为痛觉的特异性学说提供实验资料。目前我们尚未看到有关在体皮层伤害感受神经元 R_m 、 τ 、 C_m 等电学参数研究的报道。

致谢 衷心感谢刘素珍老师和蔡葵技师在实验技术

等方面的热情帮助和指导。

参 考 文 献

- 1 Lamour Y, Willer J C, Guilbaud G. Rat somatosensory (Sml) cortex: I. Characteristics of neuronal responses to noxious stimulation and comparison with responses to non-noxious stimulation. *Exp Brain Res*, 1983, **49** (1): 35~45
- 2 Roos A, Rydenhag B, Andersson S. Activity in cortical cells after stimulation of tooth pulp afferents in the cat intracellular analysis. *Pain*, 1983, **16** (1): 49~60
- 3 Dykes R W. The anatomy and physiology of the somatic sensory cortical regions. *Prog neurobiol*, 1978, **10** (1): 33~88
- 4 McKenna T M, Light A R, Whitsel B L. Neurons with unusual response and receptive field properties in upper laminae of cat SI cortex. *J Neurophysiol*, 1984, **51** (5): 1055~1076
- 5 Kang R, Herman D, Macgillis M, *et al.* Convergence of sensory inputs in somatosensory cortex: Interactions from separate afferent sources. *Exp Brain Res*, 1985, **57** (2): 271~278
- 6 袁 斌, 庞天赐, 刘新领 (Yuan B, Pang T C, Liu X L). 大鼠大脑皮层 SI 区神经元对电针和手针的反应特征. 针刺研究 (*Acupuncture Res*), 1991, **16** (2): 79~86
- 7 姚愈忠, 刘甘泉, 陈培熹 (Yao Y Z, Liu G Q, Chen P X). 猫体感皮层神经元放电的功率谱分析. 生理学报 (*Acta Physiologica Sinica*), 1994, **46** (1): 65~68
- 8 Linas R R. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*, 1988, **242** (4486): 1654~1664
- 9 Shepherd G M, Koch C. Introduction to synaptic circuits. In: Shepherd G M, ed. *The synaptic organization of the brain*. 3rd. UK: Oxford University Press, 1990. 1~31
- 10 Dichter M A. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res*, 1978, **149** (2): 279~293
- 11 周绍慈, 翁恩琪, 封茂滋, 等. 神经生理学概论. 上海: 华东师范大学出版社 (Zhuo S C, Wong E Q, Feng M Z, *et al.* *Introduction of Neurophysiology*. Shanghai: East China Normal University Press), 1994. 50~53
- 12 Nagy I, Urban L, Woolf C J. Morphological and membrane properties of young rat lumbar and thoracic dorsal root ganglion cells with unmyelinated axons. *Brain Res*, 1993, **609** (1/2): 193~200
- 13 Craig A D, Jr Kniffki K D. Spinothalamic lumbosacral laminal cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J Physiol (London)*, 1985, **365** (1): 197~221
- 14 周衍椒, 张境如主编. 生理学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社 (Zhuo Y J, Zhang J R. *Physiology*. 3rd. Beijing: People Health Press). 1989: 379~462

Study of Electrical Properties of Membrane in Primary Sensory Cortex Nociceptive Neurons.
ZHANG Ri-Hui, TENG Guo-Xi (*Brain Research Institute, China Medical University, Shenyang 110001, China*).

Abstract In order to study function of the cortical nociceptive neurons (NCNs) on the cell level with intracellular recording and stereotaxic techniques, the electrical properties of their membrane were studied. The frequency of spontaneous discharges of the

neurons were diverse obviously and revealed a variety of mode in discharge. When absolute value of polarization current was lesser than 1.0 nA, the relation of $I-V$ in NCNs was more significant ($r = 0.96$) and the rectification insignificant; when the polarization current larger than 1.0 nA, the rectification occurred on both ends of the curve and then $I-V$ curve showed S-type. The rectification of somatic NCNs was much significant than non-nociceptive ones (NNCNs). R_m , τ and C_m of the NCNs were evidently larger than those of NNCNs ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The materials obtained indicated that

morphology and structural of cell membrane, volume of the soma between NCNs and NNCNs might have meaningful differences. It also means that physiological functions were unlike. The specificity of the electrical parameters in cell membrane might provide experimental materials for specific theory of pain sensation. Reporting to investigate electrical properties (R_m , τ and C_m) of the membrane in primary cortical nociceptive neurons had not found in literatures.

Key words primary sensory cortex (SI), nociceptive neuron, intracellular record, cell membrane parameter

真核生物 mRNA 二级结构与内含子剪接

张 静

(云南大学统计系, 昆明 650091)

刘次全¹⁾

(中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

摘要 对 68 个外显子-内含子-外显子序列片段以及相应的外显子-外显子序列片段的二级结构进行分析后发现, 内含子 5' 端和 3' 端的碱基 G (剪接位点) 中大约 90% 位于二级结构的环区或是茎区的端部并靠近环, 而且位于环区的 G 也多靠近环的基部; 92% 的外显子拼接位点也有类似性质. 约 82% 的分枝点 A 位于环区或环与茎的连接部位. 折叠结构的形成使剪接位点和分枝点在空间上彼此靠近.

关键词 mRNA, 外显子, 内含子, 剪接位点, 分枝点, 二级结构

学科分类号 Q522.2

真核细胞中经转录得到的前体 mRNA, 还要经过一系列的加工过程才能成为合成蛋白质的直接模板, 其中一个重要的加工过程是内含子的剪接. 研究显示, 基因的调控表达很多是在 mRNA 水平上进行的, 内含子的可变剪接即是基因表达调控的一种重要方式^[1]. 因此, 研究内含子的剪接过程以及剪接的方式, 对于了解基因的调控表达具有重要的意义.

实验表明, 内含子两末端的碱基一般是恒定的, 即为 5'-GU...AG-3', 在内含子上游 10 到 50 个核苷之间 (有些在 100 个以上) 存在一个“分枝点” (branch point) A. 内含子的剪接过程包含两个转酯反应. 第一个转酯反应是由分枝点 A 的 2'-羟基进攻 5' 剪接位点 G 与其上游外显子之间的磷酸二酯键, 使磷酸二酯键断开, 释放出 5' 外显子, 并在 A 与 G 之间生成 2'-5' 磷酸二酯键的叉链, 形成一个马套 (lariat) 状中介物. 第二个转酯反应是 5' 外显子的 3'-羟基进攻内含子 3' 剪接位点 G 与其

下游外显子之间的磷酸二酯键, 使其断开, 同时上游的外显子与下游外显子拼接起来, 并释放出“马套”结构的内含子. 内含子的精确切除是在顺式作用元件与反式作用因子的特定相互作用下完成的, 从实验结果看, 这种特定的相互作用除了碱基序列的配对 (事实上, 由于 RNA 中存在大量的碱基错配现象, 所以不排除碱基错配的相互作用) 外, 似乎还涉及到空间结构, 例如酵母中参与外显子拼接的 U5 snRNA 的功能部分是一个保守的发夹环^[2]. 既然是相互作用, 那么反式作用因子的结构特性必然要求顺式元件具有相应的结构特性. 然而目前有关结构特性的研究主要集中在反式作用因子上, 对顺式元件结构的研究还不多见. 注意到 mRNA 分子在活细胞内以折叠形式存在, 于是我们考虑从 mRNA 折叠结构上对顺式元件的结构进行探究.

¹⁾ 云南大学现代生物学中心, 昆明 650091.

收稿日期: 1998-03-18, 修回日期: 1998-07-01