

可兴奋细胞膜离子通道结构与功能的研究

杨文修 赵明利

(南开大学物理系生物物理室, 天津)

提 要

生物膜离子通道结构与功能关系是当前多学科协同研究的一个“热点”。本文简述了研究的发展进程和主要方法技术, 概述了离子通道主要类型的功能特征, 包括宏观和单离子通道的电学特性、通道活化和失活动力学特征、药物对通道的激活与阻断作用等。进而从分子水平介绍了当前对一些通道蛋白分子构象与门控过程的研究进展。

神经系统、感官、心脏、消化道和骨骼肌等器官和组织, 在生命活动中发挥着重要的生理功能, 其基础是这类组织的细胞在各种刺激作用下能产生电兴奋, 这种电兴奋是由于细胞膜对各种离子暂态通透性变化的结果。因此, 研究膜对各种离子通透的机制, 阐明离子通道结构与功能关系, 了解药物与离子通道相互作用机理, 具有重要的基础研究意义和广泛的应用前景。当前的研究集中于下述问题: 可兴奋细胞膜上的离子通道实体是什么? 各具有什么样的一级和高级结构? 控制通道开关的机制是什么? 外界刺激(包括电的、机械的、化学的等)如何影响通道构象的变化和调节通道开关动力学过程? 选择性地作用于通道的药物与毒素如何与通道上受体相互作用等。

研究发展简述

对离子通道的研究已有数十年历程, 今仅就一些关键性的突破进展作一简介。1952 年, Hodgkin 和 Huxley 利用电压箝位技术, 对乌贼巨神经轴突的离子电流作了定量实验研究^[1], 分析了钠电流和钾电流与膜电位及时间的定量关系, 建立了描述钠和钾电流的数学方程。他们关于钠和钾离子通道门控机构的模型

(H-H 模型)认为, 细胞膜的钾通道受四个带电粒子控制, 在膜电场作用下, 当四个带电粒子同时移到某一区域时钾通道开放。对钠通道, 他们认为有三个带电粒子控制通道的活化, 另一个粒子控制通道的失活, 只有三个粒子同时位于活化位置另一个粒子位于非阻塞位置, 钠通道才开放。Hodgkin 和 Huxley 的研究成果在推动可兴奋细胞膜兴奋机制的研究中起了重要的历史作用。

五十和六十年代, 对不同生物材料细胞膜的离子通透性进行了广泛研究, 并提出了载体、孔洞和离子交换等通透机制假说。同时, Katz 等人^[2]对神经-肌肉接头的突触传递过程进行了细致的研究, 证实突触前膜对乙酰胆碱(Ach)“量子式”释放作用于后膜上受体, 诱发小终板电位和终板电位, 对化学递质活化离子通道的研究作出了重大贡献。

七十年代初, Armstrong、Bazanilla^[3]及 Keynes、Rojas^[4]两组分别在神经轴突上测量到与钠离子通道开关过程相伴随的膜内电荷的运动, 称为门控电流(gating current), 确认了钠通道门控过程与通道组分中带电成分运动的依从性。1976 年, Neher 和 Sakmann^[5]创立了单离子通道电流记录技术, 迅速得到推广应

用,该技术能直接观测各种单个离子通道的开放、关闭具体过程,为深入研究离子通道结构和功能关系提供了许多关于电特性的新资料。

进入八十年代,多学科协同研究离子通道呈现方兴未艾的形势。首先,用生化技术从可兴奋细胞膜上先后分离纯化了有离子通道功能的一些蛋白质,并在人工膜上成功地重现了通道功能,肯定了所谓离子通道,其实体就是膜上一些特殊的蛋白质分子或其复合物。随后,1982和1984年,Noda及其合作者^[6]应用基因重组技术先后测定了N型ACh受体和钠通道蛋白的一级结构,为在分子水平上研究通道构象和功能关系打下了可靠的基础。

研究离子通道的几种方法技术

离子通道结构和功能研究需利用各种方法技术,包括:电生理技术(电压和电流箝位)、电噪声分析、单离子通道电流记录技术、人工膜离子通道重建、通道药物学研究、生化分析、基因重组技术、同位素示踪和一些光谱技术等。

1. 电压箝位技术^[7]

用电子学技术把细胞膜电位固定于不同数值,通过改变胞内外溶液成分或加入不同药物使其他离子通道失效,用插入细胞内微电极可测量被研究离子通道的离子电流,分析电流幅值、动力学过程等与膜电位、溶液成分、离子浓度等因素之关系,可推断出膜电导、活化和失活速率常数、离子选择通透比率等参量,并能测量和分析通道门控电流的特性。

2. 单离子通道电流记录技术^[8]

利用特制的玻璃微吸管吸附于细胞表面,形成10~100GΩ的密封(Giga-seal),被“孤立”的膜片中仅有少量离子通道。对该膜片实行电压箝位,可测量pA(10^{-12} 安培)量级微电流。观测和分析单个离子通道开放和关闭过程中电流的变化,可直接得到单通道各种功能参量。该技术还可把被吸附的膜片从细胞上分离出来,以膜外侧向外(outside-out)或膜内侧向外(inside-out)等方式研究,对膜内外溶液的改变和施用药物提供了极方便的条件。

3. 通道药物学研究^[7]

在传统的电压箝位和单离子通道电流记录中,可分别于不同时间、不同部位(膜内侧或外侧)施用各种浓度的药物或毒素,研究它们对通道功能的可能影响。通过这类研究,一方面可深入了解那些选择性作用于通道的药物和毒素影响人和动物生理功能的分子机理;另一方面,分析各种药物对通道蛋白选择性相互作用的特点,可提供有关通道蛋白亚单位结构与功能关系的信息。

4. 通道蛋白的分离、重建通道和基因重组技术^[6,8]

利用与通道特异结合的毒素标记,用生化技术可把通道蛋白从细胞膜上分离出来,经过纯化并可能降解为数个亚单位多肽,进而测定各亚单位的分子量。然后,可分别把各亚单位或整体蛋白加入人工膜,重建通道功能,借此了解各亚单位的功能。近年建立了用基因重组技术测定通道蛋白氨基酸序列的技术,其程序是:从细胞膜中分离出含有与该种通道蛋白相关的mRNA,移入某种细胞(如大肠杆菌),经逆转录得到cDNA。用限制性内切酶将cDNA切割成特定片段,再用核酸杂交方法钓出特定的DNA并克隆。利用测定阳性克隆DNA的核苷酸顺序,推断出相应的蛋白质氨基酸序列。作为对测定结果的检验,可把已确定的cDNA转录成mRNA,将mRNA移入细胞(如爪蟾的卵母细胞),实现该种通道的功能表达。

离子通道的类型和功能特征

基于活化方式的不同离子通道可分为两类:一类是电压活化(或称电压门控)的通道,即通道的开放受膜电位控制,如钠、钙、氯和一些类型的钾通道。另一类是化学活化(或称化学门控)的通道,即靠特定化学物分子的激活而开放的通道,如乙酰胆碱受体通道、氨基酸受体通道、 Ca^{2+} 激活的钾通道等。

1. 钠通道

可兴奋细胞膜达到去极化阈值后,钠通道大量开放,内向的 Na^{+} 流形成动作电位的上升

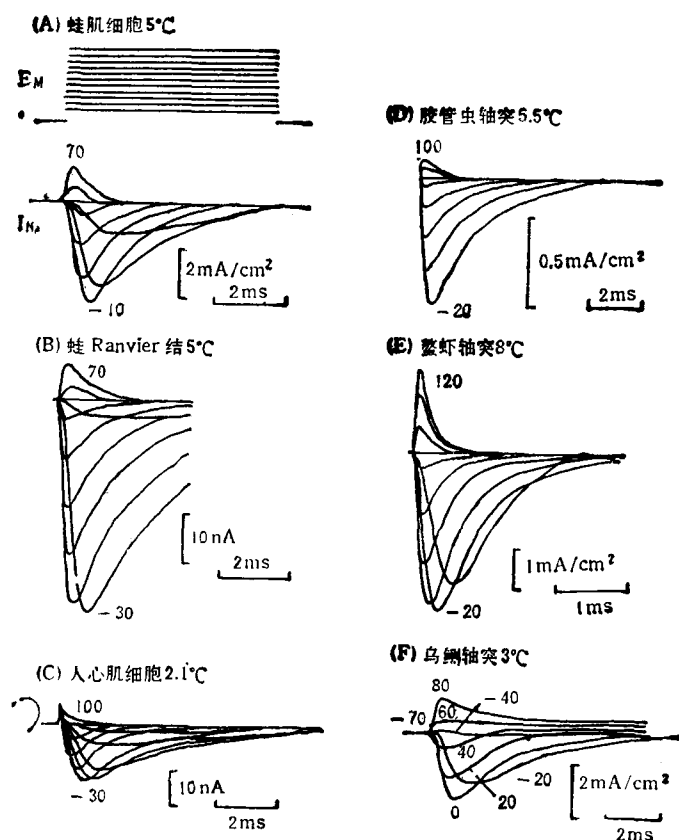


图1 一些可兴奋细胞在不同电压钳位条件下的 I_{Na} 动力学^[7]

时相。迄今的实验结果表明,各种可兴奋细胞膜的钠电流有相似的动力学特征(图1),提示钠通道功能类型可能是单一的。钠电流有较快的活化和失活过程,通道活化时间常数一般小于1毫秒,失活时间常数约数毫秒。钠电流反转电位约+55mV。各种细胞钠通道的离子选择通透性比率大体相同,例如乌鳢巨轴突为: $Li^+ : Na^+ : NH_4^+ : Ca^{2+} : K^+ : Rb^+ : Cs^+ = 1.1 : 1.0 : \frac{1}{4} : \frac{1}{10} : \frac{1}{12} : \frac{1}{40} : \frac{1}{61}$ 。利用单通道记录法测量,不同细胞钠单通道电导在4~20pS范围,平均开放寿命为数毫秒。不同细胞膜上钠通道密度可相差一个数量级,如乌鳢巨轴突为300个/ μm^2 ,而蛙Ranvier结约为2000~3000个/ μm^2 。根据药物和毒素对钠通道功能的不同影响,可分以下类型(图2)^[7,9]:(1)通道阻断剂,如河豚毒素(TTX)、石房哈毒素(STX),

它们在细胞外液中起作用,一些实验提示,它们可特异地与通道的选择性滤器(负电荷基团)相结合而阻塞通道。(2)通道失活抑制剂,如链霉蛋白酶(pronase)、N-溴乙酰胺(N-bromoacetamide, NBA)等,它们一般在细胞内起作用,与通道的失活闸门相互作用使之失效。(3)通道活化增强剂,如 β -蝎毒素(β -ScTX),它在细胞外起作用。另一类脂溶性毒素如箭毒蛙毒素(BTX)、藜芦碱毒素(VER)等,可从膜外进入膜内。该类药可减缓钠电流失活过程,使通道在更低的膜电位开放,即通道门控各参数与膜电位关系向更负电位位移,在单通道记录中可看到通道平均开放寿命显著增大。(4)通道活化抑制剂,包括局麻剂及其衍生物,如普鲁卡因(procaine)、利多卡因(lidocaine)、QX222、QX314等,它们能降低钠电流峰值并加速失活过程,其中在溶液中离子化的药物须

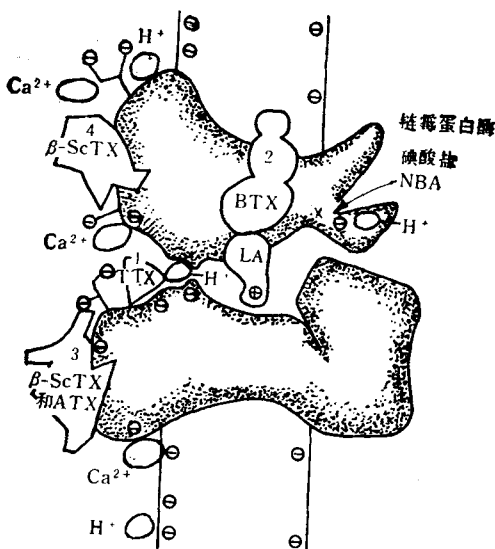


图2 钠通道的药物受体示意图^[7]

TTX: 河豚毒素; NBA: N-溴乙酰胺;
BTX: 箭毒蛙毒素; LA: 局麻剂;
β-ScTX: β-蝎毒素; ATX: 海葵毒素。

在钠通道开放条件下进入通道才起作用。

2. 钾通道^[7,10]

根据不同钾通道的动力学特性和生理功能的差别,可区分为慢(延迟)钾通道(K)、快(暂态)钾通道(A)、 Ca^{2+} 依赖性的钾通道($\text{K}_{(\text{Ca})}$)和内向整流的钾通道等类型。所有类型钾通道都可被四乙胺(TEA)阻断,K、A和 $\text{K}_{(\text{Ca})}$ 型通道对离子的通透性顺序是: $\text{Ti}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+$ 并能被 Cs^+ 所阻断。(1)慢钾通道K,即经典的钾通道,膜去极化时,钠电流达到峰值钾电流才显著增加,是膜复极化时相的主要来源,一些细胞中有高密度的慢钾通道(如神经轴突和一些骨骼肌细胞),以维持高的电兴奋传导速度和快速复极化。不同细胞的单个K通道电导在 $2 \sim 20\text{Ps}$ 范围。(2)快钾通道A,该种通道在膜从静息态到去极化的早期迅速活化,在 -40mV 以上即关闭。通道宏观电流(I_A)动力学特征与钠电流相似,有较快活化和失活速率。较低浓度的4-氨基吡啶(4-aminopyridine)即可阻断该通道。在与感受器相联接的神经末梢中,其动作电位的发放频率应与刺激强度有正相关性,但同时频率又要控制在一定范围内($1 \sim 100\text{Hz}$),A通道的功能可减慢重复发放的频率。这是因为去极化早期的外

向 I_A 可部分抵消内向的 I_Na ,延缓去极化过程,加宽动作电位峰间隔的时程。(3) Ca^{2+} 依赖性钾通道 $\text{K}_{(\text{Ca})}$,有些可兴奋细胞的电兴奋方式是,集簇发放动作电位(爆发波)和较长的安静期相互交替。在集簇中每一动作电位的发放期间,钙通道被瞬时活化,随着动作电位数目增多,细胞内的 $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 也逐渐增加, $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 达到一定数值,可使 $\text{K}_{(\text{Ca})}$ 通道活化,大量外向的 K^+ 流使膜超极化并阻止 Ca^{2+} 再进入胞内,导致细胞可保持一定时间的安静期。随后,是 $\text{K}_{(\text{Ca})}$ 通道的关闭和 $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 利用钙泵被排出胞外。单通道记录表明,单 $\text{K}_{(\text{Ca})}$ 通道电导可高达 200Ps ,并有较长开放寿命。每个通道开放需结合两个 Ca^{2+} ,通道可被N'-四乙酸(EGTA)、奎尼丁及 Ba^{2+} 阻断。(4)内向整流钾通道,该种通道功能意义好象半导体二极管,只在膜超极化时允许 K^+ 进入胞内,其特性有(i)超极化时,通道开放强烈地依赖于膜电位;(ii)通道活化与失活与胞外 $[\text{K}^+]$ 有密切关系;(iii)内向电流由快成分(1ms 内)和慢成分(数毫秒到数百毫秒)两部分组成。单通道电导在 $5 \sim 10\text{Ps}$ 范围。该种通道的可能生理意义是:心肌细胞等需要不断地周期性搏动,且动作电位有较长平台期,内向整流钾通道可在超极化时协同钠-钾泵把 K^+ 输送到胞内,以显著节约细胞的能量消耗。

3. 钙通道

钙通道几乎普遍存在于各种组织的细胞膜中。膜在电压箝位下的内向钙电流动力学与钠电流相似,但有以下特点:活化过程较慢,失活缓慢且不完全,钙通道的活化比钠通道要求更高的去极化电位,且 I_Ca 比 I_Na 峰值要小一个量级以上。钙通道对 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 都有高通透性,但另外一些双价正离子如 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 等在浓度 $0.5 \sim 2.0\text{mmol/L}$ 时即能有效地阻断钙通道,实验表明,阻塞离子与 Ca^{2+} 竞争通道中同一结合位点。在医学临床上应用于治疗心脏、消化道和肌肉疾患的一些药物,常与钙通道有相互作用。(1)通道阻断剂^[11],可分为苯烷基胺类(如异博定、甲基异博定D600)、苯硫氮草类(如硫氮草酮)、双氢吡啶类

(如硝苯吡啶、尼群地平、尼鲁地平)等,它们以不同方式和浓度起作用。例如,异博定对异丙肾上腺素导致的心肌致死效应有明显保护作用,其机理是:异丙肾上腺素能促进 Ca^{2+} 通道开放使大量 Ca^{2+} 进入细胞内,这与病理的心肌缺血、缺氧及心肌坏死时细胞内 Ca^{2+} 大量增加、心肌处于收缩状态相一致。异博定对钙通道的阻断作用,可使心肌的兴奋-收缩过程脱耦联,导致心肌处于舒张状态。异博定治疗心律不齐有较好效果,与它和梗死区结合多而牢固有关,它从细胞膜内侧堵塞钙通道。(2) 通道激活剂,外源性药物双氢吡啶一些化合物如 Bay K8644、CGP28372 和 YC-170 等可激活钙通道。实验表明,动物和人体内的一些递质

或激素如去甲肾上腺素 (NE)、乙酰胆碱、5-羟色胺等亦可增加膜对 Ca^{2+} 的通透性。

近年,对钙通道和钙离子生理功能的重要性和多样性的了解日益深入,对钙通道的生理和药理研究引起各国学者更大的兴趣。1985年, Tsien 等^[12] 对小鸡背根神经节细胞的研究中发现有三种类型钙通道(图 3): (1) L 型,该种通道须去极化到较高电位 ($> -20\text{mV}$) 才能活化,钙电流衰减缓慢,有较大的单通道电导 (25Ps), 20mmol/L 的 Cd^{2+} 即可完全阻断 L 型通道电流。(2) T 型,在弱去极化 ($\sim -60\text{mV}$) 时通道即可活化,膜电位 $-40 \sim -10\text{mV}$ 范围电流幅值不变,随膜电位再升高幅值下降,电流有较快衰减动力学。T 型单通道电

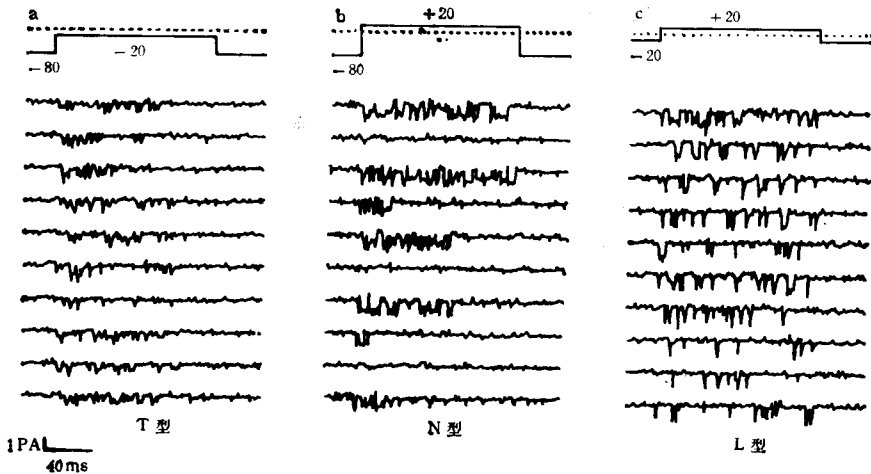


图 3 三种钙通道单通道电流特性

记录方式: 吸附的细胞膜片 (cell-attached patch)

导约 8 Ps。(3) N 型,该种通道的活化要求强的去极化电位 ($\geq -10\text{mV}$),失活后又要求很低的超极化才能去除失活态,故须从约 -80mV 去极化到 -10mV 以上才能得到可观的 N 型电流。电流衰减比 T 型慢但比 L 型快,单通道电导约 13 Ps。三种钙通道的药效也不相同,如激活剂 Bay K8644 可大大增加 L 型通道的 I_{Ca} ,但对 T 型和 N 型无影响。对三种钙通道的生理功能特异性正在研究中,有人认为, L 型和 T 型主要参与递质释放和树突峰电位的形成, T 型可能与神经元节律放电的阈值特性有关。看来,三种钙通道在不同的细胞膜上选择性分布

及其密度不同,将影响各种细胞生理功能的多样性。除了在可兴奋细胞膜动作电位形成中作出贡献外,钙通道可以调节细胞内 Ca^{2+} 浓度,作为第二信使,进一步调节许多细胞功能,重要的有肌肉收缩、递质分泌和对其他通道的门控。

4. 化学活化的通道

对脊椎动物神经-肌肉接头和神经之间突触传导的研究,已证实有多种递质活化的受体通道,包括乙酰胆碱、去甲肾上腺素、多巴胺、谷氨酸、 γ -氨基丁酸和 5-羟色胺等的受体,近年对一些肽的膜受体研究正在发展中。从药理学还可区分乙酰胆碱受体为烟碱样 (N 型) 和

覃毒碱样(M型),及 α_1 -、 α_2 -和 β -肾上腺素受体等。同一种递质,可诱发不同类型的突触后电位,如不同细胞中可看到四种Ach激活的反应^[7]:(1)使正离子通透性增加产生终板电位(epp);(2)使负离子通透性增加产生快抑制性突触后电位(快 ipsp);(3)专一性使 K^+ 通透性增加产生慢抑制性突触后电位(慢 ipsp);(4)专一性使 K^+ 通透性下降产生慢兴奋性突触后电位(慢 epp)。可兴奋细胞可同时与不同的功能拮抗性的神经通路形成突触,故突触后膜上不同区域有对各种递质敏感性各异的受体,如节肢动物肌细胞膜上,与兴奋性轴突间的突触区有谷氨酸活化的正离子通透性的受体通道,而在与抑制性神经轴突间的突触区,有 γ -氨基丁酸活化的负离子通透性通道。

N型乙酰胆碱受体通道是研究最深入的通道类型之一。对爪蟾胚胎期神经-肌肉突触形成过程的研究表明^[13],肌细胞膜上乙酰胆碱受体有一个通过侧向扩散向突触区聚集的过程,同时,富集Ach受体的肌细胞膜区对神经末梢释放Ach有诱导和促进作用。两个Ach分子与受体结合后,诱导正离子通道开放,大量通道开放所产生的终极电流有类似于钠电流的动力学过程。随着膜电位从超极化到去极化,电流幅值衰减速度加快,并在零mV附近电流反向。Ach受体通道对正离子通透选择性差,若以 $P_X/P_{Na} \geq 0.1$ 为下限,则有6种单价金属离子,9种双价碱土和过渡族金属离子及41种有机离子皆可被通透。单通道记录研究表明,电流幅值与膜电位呈线性关系,单通道电导约10~50pS范围,平均开放寿命约数毫秒。许多毒素、局麻剂和有机物对该种通道有阻断或抑制作用, α 银环蛇毒(α -BGTX)是N型Ach受体的特异阻断剂,烷基胍对小鸡肌细胞膜Ach受体通道电流的抑制作用与膜电位有关,且试剂加于胞外比胞内有更强的作用^[14]。

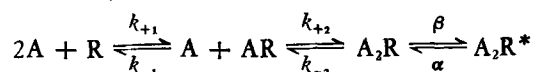
离子通道的分子构象和门控动力学

当前对离子通道结构与功能关系研究的前沿是,从分子和亚分子水平揭示通道蛋白空间

构象及其变化与通道门控动力学间的关系。对Ach受体通道和钠通道的研究已取得新的进展。

1. N型Ach受体通道

纯化后的Ach受体蛋白分子量是250,000,用DNA重组技术已测定了其全部氨基酸序列^[6],确证了该受体由 α_1 、 β 、 γ 和 δ 五个亚基组成,这四种亚基的氨基酸顺序和亲水性基本相似,但只有 α 亚基上有 α -银环蛇毒特异结合位点。一种构象模型是^[15]:五个亚基各有若干 α 螺旋跨膜排列,共同形成五瓣状蛋白复合体,两个 α 亚基间是亲水性的离子通道,通道有直径约25Å的开口,中间是6~7Å的狭窄通路,其中排列有负电性氨基酸残基侧链基团。当两个Ach分子结合于两个 α 亚基的特定位置后,引起受体局部构象变化使通道开放。可用以下模式描述其动力学过程:



A是Ach分子,R是受体, A_2R 和 A_2R^* 分别表示结合两个Ach分子后通道的关闭和开放态, k_{+1} , k_{-1} , $\dots$ 分别表示每一步转变的速率常数。

近年用膜片箝位(patch-clamp)技术发现了Ach受体单通道电流的一些细结构^[7]:(1)一个数毫秒电流脉冲期间,有时出现短暂的数十微秒的关闭态,这提示,在结合于受体的Ach分子失活以前,短寿命的 A_2R 态和长寿命的 A_2R^* 态之间可经历数次态的转换。(2)单次电流脉冲有时出现阶梯式增加或减小现象,即出现一些亚态,提示 AR 和 A_2R 态也可能使通道有不同程度的开放。(3)当Ach达到较高浓度时,单通道电流呈集簇形式发放,中间有一段安静期,被称为通道对Ach分子的“脱敏”(desensitization)作用。这些都反映了Ach与其受体蛋白结合及构象变化的复杂性。

2. 钠通道

用分离纯化技术得到的大鼠脑细胞钠通道蛋白,经测定由一个分子量260,000的大亚单位 α 和两个分子量分别为39,000和37,000的

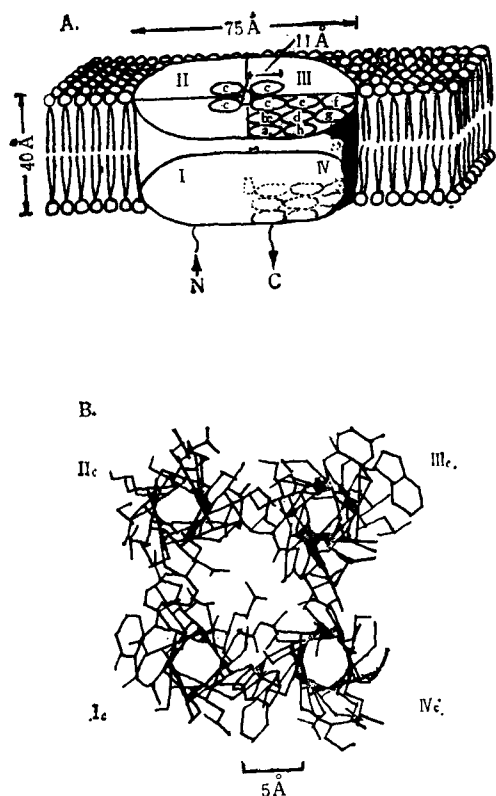


图4 一种钠通道构象模型

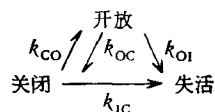
A: 通道的三维结构示意图,四个同性区对称排列;

B: 四个两性螺旋包围形成离子通道。

小亚单位 β_2 、 β_2 组成^[16]。Noda 等^[6]用基因重组技术测定了电鳗电板的钠通道蛋白,是分子量 208,321 的单一蛋白,有 1820 个氨基酸组成的序列。他们发现整个序列可分为四个有相似氨基酸序列的区段,每一区段又可分为六个亚区,认为亚区中分别有疏水性、负电性和正电性的螺旋结构跨膜排列,由四个相似区段的螺旋包围的中心是 Na^+ 通道,由 Greenblatt 等^[17]修正后的一种钠通道构象模型如图 4 所示。

目前已提出多种钠通道构象模型^[18,19]。下述的一些基本特征已得到公认:通道的控制机构由离子选择性滤器、活化闸门和失活闸门三部分组成。滤器和闸门的实体是蛋白质极性氨基酸侧链的离子基团或偶极子,膜电位变化时,电场诱导侧链的离子基团或偶极子位移,导致分子构象发生局部改变,形成通道在关闭、活化和失活各态之间转变。同时,离子基团或偶极

子的运动产生通道的门控电流。用各种方法研究的结果已提供了一些细节资料,例如,钠通道开放过程的门控电流相当于 3~6 个等量电荷的运动;通道入口处的选择性滤器可能是羧基基团,出口处的失活闸门可能是氨基基团,活化闸门有负电性基团等。各种资料表明,通道各态之间的转变是复杂的。一种简化的动力学模式是^[10]:



k_{co} 等分别表示各态之间转变的速率。目前有两种观点:一种认为关闭态必须经由活化态才能转变为失活态(即活化和失活态相偶联);另一种认为通道关闭态可以直接转变为失活态(活化与失活态非偶联),各得到一定的实验事实支持。根据我们提出的模型^[20]得到的推论是:在细胞膜不同去极化条件下,活化与失活态偶联和非偶联方式各有一定的发生几率。

当前,生物物理学、生理学、生物化学、分子生物学和药理学等多种学科对离子通道的研究正在协同“攻关”,可以预期,实现从分子水平阐明离子通道空间构象与门控动力学过程的目标已为期不远了。

参 考 文 献

- [1] Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F.: *J. Physiol.* (London), 1952, **117**, 500.
- [2] Katz, B.: *The Release of Neural Transmitter Substances*, Charles, C. Thomas, Publisher, 1969.
- [3] Armstrong, C. M. and Bezanilla, F.: *J. Gen. Physiol.*, 1974, **63**, 533.
- [4] Keynes, R. D. and Rojas, E.: *J. Physiol.* (London), 1974, **239**, 393.
- [5] Sakmann, B. and Neher, E. (edited): *Single-Channel Recording*, Plenum Press, New York, 1983.
- [6] Noda, M. et al.: *Nature*, 1982, **299**, 793; 1984, **312**, 121.
- [7] Hille, B.: *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Plenum Press, New York, 1984.
- [8] 邹冈:《生物化学与生物物理进展》, 1986, (1), 2.
- [9] Khodorov, B. I.: *Prog Biophys. Mol. Biol.*, 1985, **45**, 57.
- [10] Auerbach, A. and Sachs, F.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1984, **13**, 269.

(下转第 199 页)

测 AC 比活力时, CV 为 12.1%, 测 cAPD 比活力时, CV 为 10.6%^[9]。

结 果

正常鼠肝、BERH-2 宿主肝和 BERH-2 肝癌组织中 AC 与 cAPD 比活力以及 AC/cAPD 比值的结果见表 1。

表 1 AC 与 cAPD 比活力及其比值

组 织	AC 比活力	cAPD 比活力	AC/ cAPD 比 值
(1) 正常鼠肝	0.82± 0.04(16)*	1.90± 0.10(16)	0.44± 0.03(16)
(2) BERH-2 宿主肝	0.87± 0.09(14)	1.48± 0.13(14)	0.66± 0.08(14)
(3) BERH-2 肝癌	0.82± 0.07(14)	0.88± 0.07(14)	0.98± 0.10(14)
P 值**: (1)/(2)	>0.05	<0.01	<0.05
(1)/(3)	>0.05	<0.01	<0.01
(2)/(3)	>0.05	<0.01	<0.01

* 均数±标准误(大鼠数) ** *t* 检验

由表中数值可以看到, 正常鼠肝、BERH-2 宿主肝和 BERH-2 肝癌组织 AC 比活力无显著差异, BERH-2 肝癌组织 cAPD 比活力较正常鼠肝降低 54% ($P < 0.01$), BERH-2 宿主肝 cAPD 比活力较正常鼠肝降低 22% ($P < 0.01$)。AC/cAPD 比值的变化与 cAPD 比活力的变化相反, 即 BERH-2 肝癌组织 AC/cAPD 比值最高, 是正常鼠肝的 2.23 倍 ($P < 0.01$); BERH-2 宿主肝 AC/cAPD 比值是正常鼠肝的 1.50 倍 ($P < 0.05$)。

讨 论

根据测定 cAPD 活力时所用底物 cAMP 浓度为 1mmol/L, 因此所测 cAPD 属于高 K_m 值。我们观察到 BERH-2 肝癌组织中高 K_m 值 cAPD 比活力降低, Clark 等^[7] 和 Hickie 等^[8] 也报道大鼠 Morris 肝癌组织高 K_m 值 cAPD 活力降低。一般说来, 高 K_m 值的酶易受激素等因素的调节, 此与组织的特殊功能有关。因此, 肿瘤组织(如 BERH-2 肝癌组织)中 cAPD 活力的降低很可能是肿瘤组织逃避机体调节的一种方式。

我们观察到 BERH-2 宿主肝 cAPD 比活力介于正常肝与肝癌之间, 可能是宿主肝受肝癌细胞分泌的某种成分的影响处于癌前期, 但也不能排除宿主肝存在肉眼看不见的肝癌转移灶的可能性。从宿主肝 cAPD 活力的降低, 导致 AC/cAPD 比值升高, 提示 cAPD 活力和 AC/cAPD 比值的变化系肝癌的早期生化改变。

参 考 文 献

- [1] 杨东丽等:《国外医学肿瘤学分册》, 1985, 12(4), 193.
- [2] 强家模等:《科学通报》, 1978, 23(6), 374.
- [3] 杨东丽等:《皖南医学院学报》, 1986, 5(3), 163.
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [5] 杨东丽等:《皖南医学院学报》, 1987, 6(2), 141.
- [6] Ramachandran, J.: *Anal. Biochem.*, 1971, 43, 227.
- [7] Clark, J. F. et al.: *Cancer Res.*, 1973, 33(2), 356.
- [8] Hickie, R. A. et al.: *Cancer Res.*, 1975, 35(3), 601.

[本文于 1987 年 6 月 26 日收到]

(上接第 192 页)

- [11] 张惠芸:《生理科学》, 1986, 6, 269.
- [12] Nowicky, M. C. et al.: *Nature*, 1985, 316, 440.
- [13] Poo Mu-ming: *Nature*, 1982, 295, 232.
- [14] Fareley, J. M. et al.: *Pflügers Arch.*, 1986, 406, 629.
- [15] Guy, H. R.: *Biophys. J.*, 1984, 45, 249.
- [16] Hartshorne, R. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 291, 539.
- [17] Greenblatt, R. E. et al.: *FEBS* 3209, 1985, 193, 125.

- [18] Kosower, E. M.: *FEBS* 2369, 1985, 182, 234.
- [19] Guy, H. R. and Seetharamulu, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 508.
- [20] 杨文修等:《生物物理学报》, 1985, 1, 96.

[本文于 1987 年 5 月 29 日收到]