

硫化氢对小鼠背根神经节河豚毒素敏感型钠电流的影响

鲜文颖,徐鲁杰,张广钦*

(中国药科大学临床药学教研室,南京 210009)

摘要 研究硫化氢(H_2S)对小鼠背根神经节(DRG)细胞河豚毒素敏感型(TTX-S)钠电流的影响。急性分离小鼠DRG细胞,应用全细胞膜片钳技术,观察 H_2S 供体NaHS对TTX-S钠电流的影响。结果显示,NaHS浓度依赖性地增加TTX-S钠电流,其半数最大激活浓度(EC_{50})为119 $\mu\text{mol/L}$,Hill系数为1.105;100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS可使TTX-S钠电流激活曲线向去极化移动约9.8 mV,稳态失活曲线向去级化方向移动约10.4 mV,但对恢复曲线无明显影响。因此, H_2S 能增加TTX-S钠通道电流,并改变TTX-S钠通道稳态激活和失活动力学特征,这可能是 H_2S 参与疼痛发生发展的机制之一。

关键词 硫化氢;背根神经节;TTX敏感型钠电流

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2014)01-0097-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140118

Effects of H_2S on tetrodotoxin-sensitive sodium currents in mouse dorsal root ganglion neurons

XIAN Wenying, XU Lujie, ZHANG Guangqin*

Department of Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The effects of hydrogen sulfide (H_2S) on tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) sodium currents in mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons, were studied by use of the whole-cell patch clamp technique. NaHS (a donor of H_2S) increased TTX-S sodium currents in a concentration-dependent manner; the EC_{50} was 119 $\mu\text{mol/L}$ and Hill coefficient was 1.105. NaHS 100 $\mu\text{mol/L}$ markedly shifted the steady state activation and inactivation curves of TTX-S sodium currents towards more positive potential to 9.8 and 10.4 mV, respectively, yet with no significant difference on recovery from inactivation of TTX-S sodium channels. Therefore, H_2S increased the TTX-S sodium currents and altered the activation and the inactivation kinetics of TTX-S sodium channel, which may contribute to one of its mechanisms in pain.

Key words hydrogen sulfide; dorsal root ganglion; tetrodotoxin-sensitive sodium current

在哺乳动物体内,胱硫醚-β-合成酶(CBS)和胱硫醚-γ-裂解酶(CSE)裂解半胱氨酸产生硫化氢(H_2S)^[1],其生物活性无论是在生理条件还是病理条件下已越来越受到重视。 H_2S 作用于不同的离子通道和受体,调节神经递质传递、免疫反应、细胞凋亡、炎症反应、疼痛等过程^[2]。对于 H_2S 在炎症和疼痛中发挥的生理作用目前还存在争议。有研究表明 H_2S 对内脏疼痛有增敏作用^[3];也有研究证明 H_2S 有镇痛的作用^[4],在病理条件下甚至会有双向调节(镇痛和增敏)作用^[5]。

背根神经节(DRG)细胞是周围神经系统中重

要的初级感觉神经元,其兴奋性的改变与疼痛的发生发展密切相关^[6]。根据对河豚毒素(TTX)敏感性的不同,将DRG细胞上的钠通道分为两种:TTX不敏感型(TTX-R)和TTX敏感型(TTX-S)^[7]。TTX-R钠通道电流主要由两种钠通道亚型Nav1.8和Nav1.9介导,而TTX-S钠通道电流则主要由Nav1.1、Nav1.6和Nav1.7介导^[8]。有研究表明,在成熟的神经元细胞中,TTX敏感型钠通道(如Nav1.7)优先表达,并且与生理和病理性疼痛有着密切联系^[9]。本文旨在研究 H_2S 供体NaHS对TTX-S钠通道电流的影响,探讨 H_2S 在疼痛中的作

用机制。

1 材 料

1.1 試 剂

胶原酶Ⅱ、胰蛋白酶、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES)、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)、NaHS、牛磺酸、L-谷氨酸和硝苯地平均购自美国Sigma公司,其他试剂均为市售分析纯。

溶液配制参考文献[7],并根据实验要求改进。无钙台式液(mmol/L):NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.33, 葡萄糖 10, HEPES 10, 用NaOH调pH至7.4。台式液:无钙台式液中加1 mmol/L CaCl₂。记录钠电流电极内液(mmol/L):CsCl 140, CaCl₂ 1, MgCl₂·6H₂O 5, Na₂ATP 2, EGTA 5, HEPES 10, 用CsOH调pH至7.4;细胞外液(mmol/L):NaCl 55, Choline-Cl 80, KCl 5.4, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, Glucose 10, HEPES 10, 硝苯地平0.005,用NaOH调pH至7.40,溶液均用纯氧饱和。

1.2 仪 器

TE2000-U倒置显微镜(日本Nikon公司);EPC-10膜片钳放大器(德国Heka公司);PCS-5000三维操作手(美国Burleigh公司);P-97微电极拉制仪(美国Sutter公司);MF-830电极抛光仪(日本Micro Forge公司);Model 330 pH计(美国Thermo Orion公司);BS 110s电子天平(美国Sartorius公司)。

1.3 动 物

昆明种小鼠,雌雄不限,体重(20~25 g),清洁级,由南京市青龙山动物中心提供,合格证号:SCXK(苏)2012-0008。

2 方 法

2.1 分离单个DRG细胞

参考文献[10]并加以改进,小鼠后颈椎脱臼断离脊髓处死,分离脊柱,放入4℃生理盐水中。沿椎孔正中央剪开,暴露脊髓,从椎间孔中取出DRG,小心去除DRG两端的脊神经干,将DRG放入1 mg/mL胶原酶Ⅱ中,剪碎,恒温振荡(37℃,每分钟80次),孵育50~60 min。离心,弃上清,再加入2.5 mg/mL胰蛋白酶在相同条件下孵育5~10 min。显微镜下出现单个DRG细胞后,立即停

止酶解,用台式液洗2~3遍。反复吹打成细胞悬液,将细胞悬液加入到细胞池中,静置1~1.5 h,待细胞贴壁后进行膜片钳实验。

2.2 全细胞膜片钳记录

保持室温22~25℃,待细胞贴壁后,吸出细胞池中的台式液,加入细胞外液,将细胞池置于倒置显微镜载物台上,观察DRG神经元的形态、大小、状态的特征。选取胞膜完整、胞质清晰的DRG细胞进行记录。采用全细胞膜片钳技术记录细胞钠电流。Pulse软件收集并存储产生的电流信号于计算机中。玻璃微电极(1.0 mm内径)经水平微电极拉制仪拉制,充灌电极内液后电阻为2~3 MΩ,封接电阻达 1×10^9 Ω以上,补偿快电容,以-60 mV钳制电压钳制细胞,破膜,慢电容补偿,形成全细胞模式,串联电阻补偿70%~80%。

在全细胞电压钳模式形成后,记录小鼠DRG细胞钠电流^[11]。观察给予NaHS(H₂S外源性供体)后,对TTX-S钠电流及其通道动力学的影响。TTX-S电流在大直径DRG细胞中表达较多,因此本研究选择大直径细胞($\geq 35 \mu\text{m}$)作为实验标本。加入0.5 μmol/L TTX以验证电流对TTX的敏感性。

2.3 实验数据处理

实验数据经过Igor Pro 3.31及Origin 8.0软件分析处理,分析结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据分别进行t检验,以 $P < 0.05$ 作为显著性检验的标准。

3 结 果

3.1 小鼠单个DRG细胞的形态特征

显微镜下单个DRG细胞呈圆形,大小不一。状态好的DRG神经元,胞膜清晰边缘光滑,折光性好,透明,完整,隐约可见细胞核(图1)。

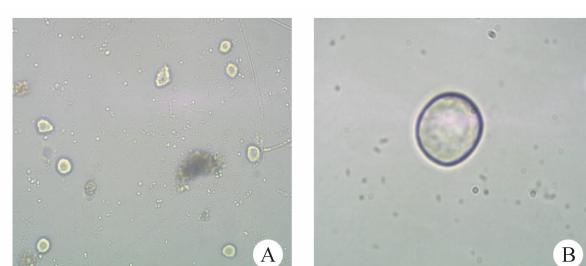


Figure 1 Dorsal root ganglion (DRG) neurons isolated using enzymes
A: DRG neurons ($\times 40$); B: DRG neurons ($\times 400$)

3.2 NaHS 对 TTX-S 钠电流浓度依赖性的影响

在 -60 mV 的钳制电压下,从 -50 mV 开始,每隔 5 mV 连续去极化至 $+50$ mV,持续时间为 200 ms,激活钠电流。如图 2 所示,给予 $0.5 \mu\text{mol/L}$ TTX 能明显抑制该电流,证明所激发的电流为 TTX-S 通道钠电流。分别取给药前后实验中由去极化脉冲刺激所诱发的最大电流,计算不同浓度 NaHS 对 TTX-S 电流的影响。实验结果表明,给予 NaHS $30, 50, 100, 300 \mu\text{mol/L}$ 浓度依赖性的增加 TTX-S 电流 ($n=7$)。用 Hill 方程拟合,得公式(1):

$$(I_t - I_c) / I_c = 1 / [1 + ([A] / EC_{50})^H] \quad (1)$$

式中, I_c 为对照组电流, I_t 为 NaHS 给药组电流, $[A]$ 为 NaHS 浓度, H 为 Hill 系数, 得到 NaHS 对 TTX-S 钠电流的半最大激活浓度 (EC_{50}) 为 $119 \mu\text{mol/L}$, Hill 系数为 1.105 (图 3)。

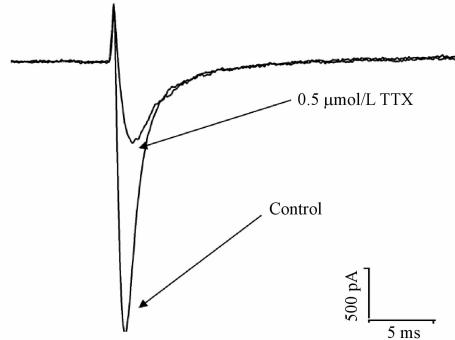


Figure 2 Identification of TTX-S sodium currents in mouse DRG neurons. The current was elicited by 200 ms depolarization from holding potential of -60 mV to $+10$ mV

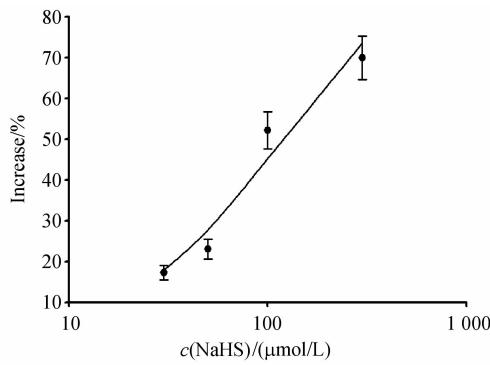


Figure 3 Concentration-dependent curve of NaHS on TTX-S sodium currents in mouse DRG neurons ($\bar{x} \pm s, n=7$)

3.3 NaHS 对 TTX-S 钠电流电流-电压 (I-V) 曲线的影响

在 -60 mV 的钳制电位下,从 -50 mV 开始,以 5 mV 步阶去极化,持续时间为 200 ms, 激活 TTX-S 电流。以电压 (mV) 为横轴, TTX-S 钠通道

电流密度 (pA/pF) 为纵轴,绘制给药前后 I-V 曲线。结果显示, $100 \mu\text{mol/L}$ NaHS 明显增加钠电流的幅度(图 4-A)。I-V 曲线可见(图 4-B), TTX-S 钠通道在 -25 mV 开始激活,在 $+15$ mV 达到最大激活,反转电位大约在 $+75$ mV。给予 $100 \mu\text{mol/L}$ NaHS 后,在 -25 mV 时 TTX-S 钠通道开始激活,最大激活电压右移到 $+20$ mV ($P < 0.05, n = 8$), 反转电位右移至大约 $+80$ mV 左右(无统计学差异)。NaHS 能显著增加 TTX-S 钠通道的电流密度,对照组的最大电流密度为 (172.37 ± 10.29) pA/pF, 给予 NaHS 之最大电流密度增加到 (238.40 ± 16.41) pA/pF, 增加幅度达 $(43.18 \pm 4.51)\%$ ($P < 0.05, n = 7$)。因此, NaHS 明显增加 TTX-S 钠电流的电流密度,改变 TTX-S 钠电流的 I-V 曲线。

3.4 NaHS 对 TTX-S 钠电流稳态激活动力学的影响

根据 I-V 曲线数据, TTX-S 钠电流的稳态激活曲线可用 Boltzmann 方程拟合获得公式(2):

$$G/G_{\max} = 1 / \{1 + \exp[(V_{1/2} - V_m)/k]\} \quad (2)$$

式中, G 为 V_m 电压时的电导, G_{\max} 为最大电导, V_m 为不同的去极化脉冲电压, $V_{1/2}$ 为通道激活 50% 时的脉冲电压, k 为斜率因子。

如图 5 所示, $100 \mu\text{mol/L}$ NaHS 能使 TTX-S 钠电流的稳态激活曲线明显右移, 给药前后 TTX-S 钠电流的半激活电压 ($V_{1/2}$) 分别为 $-(4.2 \pm 2.0)$ mV 和 $+(5.6 \pm 1.9)$ mV ($P < 0.05, n = 8$), 但斜率因子无明显变化, 分别为 (5.2 ± 0.18) 和 (5.1 ± 0.44) 。因此, NaHS 能明显影响 TTX-S 钠通道的激活。

3.5 NaHS 对 TTX-S 钠电流稳态失活动力学的影响

稳态失活曲线应用双脉冲刺激参数获得。保持电压 -60 mV, 条件脉冲从 -90 mV, 每隔 5 mV 连续去极化至 $+30$ mV, 持续时间 100 ms, 然后再给予去极化至 $+10$ mV, 持续时间 100 ms 的测试脉冲。以测试脉冲刺激所激活的电流相对值 (I_{Na}/I_{\max}) 对条件脉冲电压作图, 用 Boltzmann 方程拟合, 得公式(3):

$$I_{\text{Na}}/I_{\max} = 1 / \{1 + \exp[(V_m - V_{1/2})/k]\} \quad (3)$$

式中, I_{Na} 和 I_{\max} 分别为不同测试脉冲下电流和最大电流, V_m 和 $V_{1/2}$ 分别为不同的条件脉冲电压和通道失活 50% 时的条件脉冲电压, k 为斜率因子。

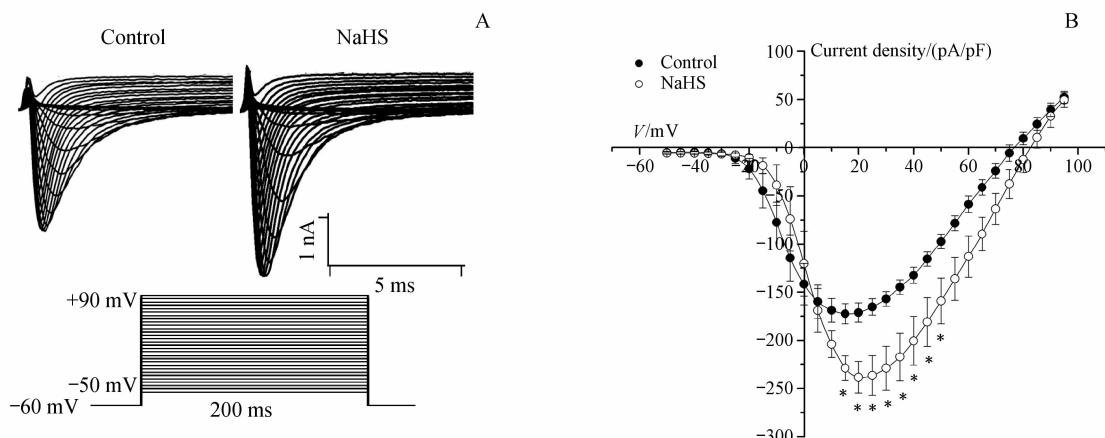


Figure 4 Effect of 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS on the TTX-S sodium current

A: Current curves were elicited by 200 ms depolarizing pulses from -50 mV to +90 mV in 5 mV increments, with a holding potential of -60 mV; B: I - V relationship of TTX-S sodium currents before and after application of 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

* $P < 0.05$ vs control group

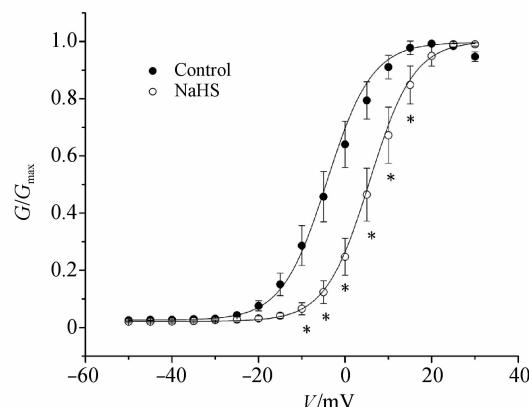


Figure 5 Effect of 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS on the activation curves of TTX-

S sodium current ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

* $P < 0.05$ vs control group

如图 6 所示,100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 能使 TTX-S 钠电流稳态失活曲线向去极化方向偏移。给药前后 TTX-S 钠电流的半失活电压($V_{1/2}$)和斜率因子分别为 $-(35.6 \pm 3.2)$ mV, (6.4 ± 0.30) 和 $-(25.3 \pm 3.0)$ mV, (9.4 ± 0.38) ($P < 0.05$, $n = 8$)。结果显示,NaHS 明显影响 TTX-S 钠通道的失活。

3.6 NaHS 对 TTX-S 钠通道失活后恢复动力学的影响

失活后恢复曲线应用双脉冲刺激参数获得,两个相同的刺激脉冲在保持电压 -80 mV 基础上,去极化至 +10 mV,持续时间 100 ms,两个刺激脉冲之间的时间间隔以 0.4 ms 的步阶递增,激发电流。

以条件脉冲的电流峰值为 1,对测试脉冲电流峰值进行标准化处理,得到 I_{Na}/I_{\max} 。以 I_{Na}/I_{\max} 为纵坐标,通道恢复的时间为横坐标作图,数据经指数方程 $I_{\text{Na}}/I_{\max} = 1 - \exp(-\tau/t)$ (τ 为通道恢复的时间常数, t 为恢复时间) 拟合。如图 7 所示,100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 对 TTX-S 钠通道恢复曲线没有明显的影响。给药前后恢复的时间常数 τ 分别为 (0.81 ± 0.014) ms 和 (0.94 ± 0.037) ms ($n = 5$)。因此,NaHS 对 TTX-S 钠通道恢复没有明显的影响。

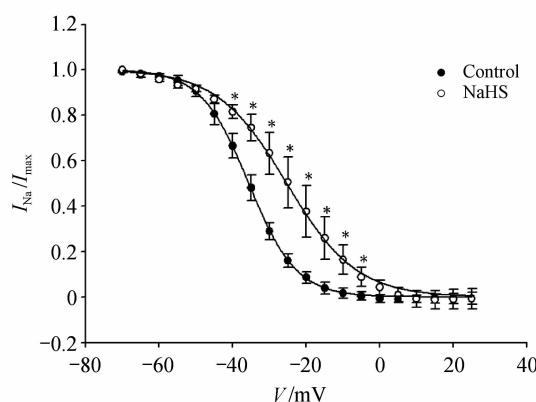


Figure 6 Effect of 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS on the inactivation curve of TTX-S sodium current. The steady state inactivation curves of sodium current were obtained by means of a double pulse protocol, a 100 ms conditioning prepulse depolarized to various potentials (from -90 mV to +30 mV, holding potential at -60 mV) was followed by a 100 ms test pulse to +10 mV ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

* $P < 0.05$ vs control group

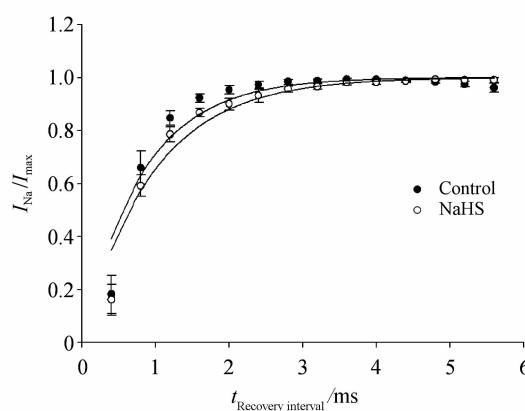


Figure 7 Effect of 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS on the recovery from inactivation of TTX-S sodium current. The time course of recovery of Na^+ current was studied by using a double pulse protocol. A 100 ms pre-pulse to +10 mV from a holding potential of -80 mV was followed by various recovery durations and then by a test pulse to +10 mV for 100 ms ($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 讨 论

本文的实验结果表明, H_2S 能增加 DRG 细胞 TTX-S 钠电流, 并且具有明显的浓度依赖性。给予 H_2S 供体 NaHS 后, TTX-S 钠通道电流激活曲线右移, 半激活电压向去极化方向偏移, 表明 H_2S 使 TTX-S 钠通道在膜电位相对较正时才被激活, 但不影响增加通道的开放数量, 这与增加电流幅度有关^[12]。此外, NaHS 使 TTX-S 钠通道电流稳态失活曲线向去极化方向偏移, 表明 H_2S 引起钠通道失活较慢, 使通道开放时间延长, 从而增加电流幅度^[13]。

除了 TTX-S 钠通道, DRG 上还存在 TTX-R 钠通道, Qi 等^[14]研究证明, 外源性给予 250 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 能显著增加 TTX-R 钠通道电流密度, 增加 DRG 细胞的兴奋性。另外, 在炎症条件下, CBS- H_2S 信号通路在伤害性感受的激活和传导过程中是非常必要的。结合本文的研究结果证实, H_2S 不仅能影响 TTX-R 钠通道电流, 也能增加 TTX-S 钠通道电流, 因此 H_2S 在疼痛中的作用可能是通过影响 TTX-R 和 TTX-S 两种钠通道来发挥作用的, 为治疗疼痛找到了新的靶点, 也为探讨 H_2S 在疼痛中的调节作用提供了新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Sun YG, Cao YX, Wang WW, et al. Hydrogen sulfide's involvement in modulating nociception [J]. *Pain Physician*, 2009, **12**(5): 901–910.
- [2] Tang GH, Wu LY, Wang R. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, **37**(7): 753–763.
- [3] Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, et al. Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels [J]. *Pain*, 2009, **142**(1/2): 127–132.
- [4] Distrutti E, Cipriani S, Renga B, et al. Hydrogen sulphide induces micro opioid receptor-dependent analgesia in a rodent model of visceral pain [J]. *Mol Pain*, 2010, **6**: 36–52.
- [5] Cunha TM, Dal-Secco D, Guerrero A T, et al. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, **590**(1/2/3): 127–135.
- [6] Thakor DK, Lin A, Matsuka Y, et al. Increased peripheral nerve excitability and local Nav1.8 mRNA up-regulation in painful neuropathy [J]. *Mol Pain*, 2009, **5**: 14–26.
- [7] Beyak MJ, Ramji N, Krol KM, et al. Two TTX-resistant Na^+ currents in mouse colonic dorsal root ganglia neurons and their role in colitis-induced hyperexcitability [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, **287**(4): 845–855.
- [8] Black JA, Liu S, Tanaka M, et al. Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain [J]. *Pain*, 2004, **108**(3): 237–247.
- [9] Rizzo MA, Kocsis JD, Waxman SG. Selective loss of slow and enhancement of fast Na^+ currents in cutaneous afferent dorsal root ganglion neurones following axotomy [J]. *Neurobiol Dis*, 1995, **2**(2): 87–96.
- [10] Kao DJ, Li AH, Chen JC, et al. CC chemokine ligand 2 upregulates the current density and expression of TRPV1 channels and Nav 1.8 sodium channels in dorsal root ganglion neurons [J]. *J Neuroinflamm*, 2012, **9**: 189–202.
- [11] Ebersberger A, Natura G, Eitner A, et al. Effects of prostaglandin D-2 on tetrodotoxin-resistant Na^+ currents in DRG neurons of adult rat [J]. *Pain*, 2011, **152**(5): 1114–1126.
- [12] Hill AP, Sunde M, Campbell TJ, et al. Mechanism of block of the hERG K^+ channel by the scorpion toxin CnErg1 [J]. *J Biophys*, 2007, **92**(11): 3915–3929.
- [13] Qian H, Cai BZ, Gong DM, et al. Sodium currents increased by homocysteine in guinea pig atrial myocytes by slowing sodium channel inactivation [J]. *J Harbin Med Univ(哈尔滨医科大学学报)*, 2007, **41**(5): 411–414.
- [14] Qi FH, Zhou YL, Xiao Y. Promoter demethylation of cystathionine-beta-synthetase gene contributes to inflammatory pain in rats [J]. *Pain*, 2013, **154**(1): 34–45.