

· 论 著 ·

尼可刹米对新生大鼠大脑皮层神经元钠通道的兴奋作用

千智斌¹, 宋晓荣², 姬明丽²

(河南省新乡医学院:1. 机能学实验室;2. 病理生理学教研室 453003)

摘要:目的 观察尼可刹米对新生大鼠皮层神经元电压依赖性钠通道的作用。方法 应用全细胞膜片钳技术观察尼可刹米对新生大鼠脑片皮层神经元电压依赖性钠电流的作用。结果 尼可刹米增加皮层神经元河豚毒素(TTX)敏感性电压依赖钠电流;尼可刹米使钠通道稳态激活曲线向超极化方向移动,钠通道半数激活电压($V_{1/2}$)从给予尼可刹米前的(-34.67 ± 3.07) mV 变为给予尼可刹米后的(-37.63 ± 3.37) mV ($n=10, P<0.05$);尼可刹米使钠通道的稳态失活曲线向去极化方向移动,钠通道半数失活电压($V_{1/2}$)从给予尼可刹米前的(-43.36 ± 3.06) mV 变为给予尼可刹米后的(-33.24 ± 2.05) mV ($n=10, P<0.01$)。结论 尼可刹米通过改变皮层神经元钠通道的动力学特征来增加电压依赖性钠电流,这可能是尼可刹米兴奋中枢神经元的作用机制之一。

关键词:尼可刹米;皮层神经元;全细胞膜片钳;钠通道**中图分类号:**R971.7;R965**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)09-1053-03

Roles of nikethamide on sodium channel of cortical neurons in neonatal rat brain slice

QIAN Zhi-bin¹, SONG Xiao-rong², JI Ming-li²(1. Department of Functional Lab;2. Department of Pathophysiology,
Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To explore the effects of nikethamide on sodium channel in cortical neurons of brain slice in neonatal rat. **Methods** Using the whole-cell patch-clamp technique to record sodium currents of cortical neurons of brain slice in neonatal rat. **Results** The tetrodotoxin-sensitive voltage-dependent sodium currents in cortical neurons were increased by nikethamide. After nikethamide application, a clear shift of the activation curve of Na^+ channel was shown towards more hyperpolarized potential, resulting in channel opening at more negative membrane potentials. In the presence of nikethamide, the voltage for half-activation ($V_{1/2}$) was (-37.63 ± 3.37) mV compared with the control of (-34.67 ± 3.07) mV ($n=10, P<0.05$). The curve of steady-state inactivation of Na^+ channel was shifted towards positive potential after treatment of nikethamide. In the presence of nikethamide, $V_{1/2}$ was (-33.24 ± 2.05) mV compared with the control of (-43.36 ± 3.06) mV ($n=10, P<0.01$). **Conclusion** Nikethamide alters the sodium channel kinetics and increases the voltage-dependent sodium currents. This might be the reason that nikethamide increases the excitability of neurons.

Key words: nikethamide; cortical neuron; whole-cell patch-clamp; sodium channel

电压依赖性钠通道在细胞动作电位产生和传播过程中起着十分重要的作用,是快反应细胞的功能基础^[1]。许多资料表明,钠通道结构和功能的改变与神经元正常功能和多种疾病密切相关^[2-3]。大脑皮层是运动、感觉、意识、情绪、语言、学习和记忆的高级中枢,大脑皮层结构和功能的正常是个体健康存活的前提。尼可刹米是临床治疗上常用的非特异性呼吸中枢兴奋剂,临床上过量使用尼可刹米引起中枢兴奋、精神错乱、恶心、呕吐、抽搐、血压升高、心律失常、惊厥等不良反应。为明确尼可刹米对新生大鼠皮层神经元钠通道的作用机制,分析尼可刹米对皮层神经元功能的影响,本研究使用新生大鼠全脑脑片,应用全细胞膜片钳技术观察尼可刹米对皮层神经元钠通道的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 10 只,日龄 1~3 d,雌雄不限,由南方医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂 CsCl、TEACl、CaCl₂、EGTA、MgCl₂、Na₂ATP、HEPES 购自 Sigma 公司,河豚毒素(TTX)购自河北水产研究所,其余为国产分析纯。人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF, in mmol/L): NaCl 124 mmol/L, KCl 5 mmol/L,

MgSO₄ 1.3 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, CaCl₂ 2 mmol/L, NaHCO₃ 26 mmol/L, 葡萄糖 30 mmol/L。电极内液(micro-electrode internal solution, MIS, in mmol/L): CsCl 110 mmol/L, TEACl 30 mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, EGTA 10 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Na₂ATP 4 mmol/L, HEPES 10 μ mol/L, 用 CsOH 调节 pH 值至 7.2, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 大鼠海马脑片标本制备 新生大鼠乙醚麻醉后断头取脑、脑修切立即固定于震动切片机(LEICA VT1000S 德国)的切片槽内,内盛 0 $^{\circ}\text{C}$ ACSF 并持续通 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气,该操作在 1 min 内完成。利用震动切片机冠状切取厚 400 μ m 包含完整海马的脑片,将脑片转移至持续通 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气的孵育槽中,34 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后常温孵育。记录时将脑片转移至记录槽中并使用粘有尼龙丝的白金框固定脑片。保持温度在 27~29 $^{\circ}\text{C}$,记录槽容积 8 mL,记录槽中 ACSF 使用蠕动泵循环,流速为 6~8 mL/min。

1.4 全细胞膜片钳记录 在红外微分干涉相差显微镜(600-FN, NIKON, 日本)下选择内锥体细胞层(internal pyramidal layer)边缘清晰、立体感强、胞质均匀、轴突树突较长的神经元进行全细胞膜片钳记录($n=10$)。记录电极外径 1.5 mm(南京

六合泉水教学实验器材有限公司, 中国), 使用微电极拉制仪 (P-97, Sutter, 美国) 多步水平拉制而成, 并使用抛光仪 (MF-830, NARISHIGE, 日本) 抛光。电极尖端内径 $2 \sim 3 \mu\text{m}$, 充灌内液电极后加少许正压后阻抗为 $2 \sim 4 \text{ M}\Omega$ 。在显微镜下操纵微电极接近神经元, 当电极电阻升高 $0.1 \text{ M}\Omega$ 或观察到神经元细胞膜被电极尖端正压“冲”出痕迹时, 立即撤去正压并给少许负压, 封接电阻急剧上升, 当封接电阻上升至 $1 \text{ G}\Omega$ 以上时, 微电极与细胞膜之间即形成了稳定的高阻封接。这时进行快电容补偿 (C-fast), 稍加负压或电击破膜, 形成全细胞模式, 后行慢电容补偿 (C-slow), 并通过漏电流法减去漏电流 (leak subtraction)。在设定的刺激电压模式下记录引出的电流。全细胞膜片钳记录所用放大器为 MultiClamp700B 膜片钳放大器 (AXON, 美国), 使用 Pclamp10.0 软件描记实验曲线和处理结果。

1.5 实验分组 以正常 ACSF 灌流所记录到的数据为正常组, 含尼可刹米的 ACSF 灌流记录到的数据为尼可刹米组。

1.6 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析检验和配对 t 检验, Origin7.5 软件作图, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尼可刹米对皮层神经元电压依赖性钠电流的影响 钳制膜电位位于 -80 mV , 给予 $-80 \sim +20 \text{ mV}$ 的阶梯去极化脉冲步幅 10 mV , 步宽 12 ms , 记录到电压门控内向电流。该电流在大约 -50 mV 时出现, -20 mV 时达到峰值, 符合钠通道的动力学特征, 并可被外液中加入的 $1 \mu\text{mol/L}$ TTX 阻断, 确定所记录到的是钠电流。记录到空白 ACSF 下的钠电流后, 经蠕动泵灌流含 5 mg/L 尼可刹米的 ACSF^[4], 10 min 后再次记录钠电流。比较使用尼可刹米前后钠电流的变化, 分析尼可刹米对皮层神经元钠电流的作用。以测试电压为横轴、相应电压下钠电流幅值为纵轴绘制出给药前后 $I-V$ 曲线, 将各细胞给药前后各测试电压下最大激活电流进行统计分析。结果发现, 尼可刹米在膜电位 $-50 \sim +20 \text{ mV}$ 范围内增大钠电流。 ($n=10$, 单因素方差分析: $F=195.458$, $P=0.000$, 图 1A 尼可刹米对神经元钠电流原始图, 图 1B 尼可刹米对神经元钠电流 $I-V$ 曲线图)。

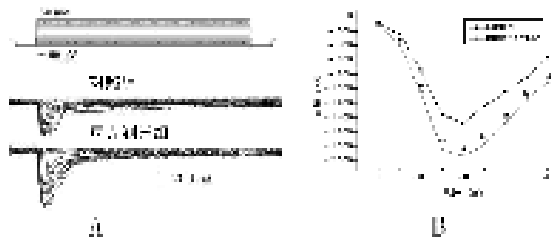


图 1B 中尼可刹米组与对照组相比, * : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$ 。

图 1 尼可刹米对皮层神经元钠电流 (图 1A) 和钠通道 $I-V$ 曲线 (图 1B) 的作用。

2.2 尼可刹米对皮层神经元电压依赖性钠通道激活曲线和失活曲线的影响

2.2.1 尼可刹米对皮层神经元电压依赖性钠通道激活曲线的影响 钳制膜电位位于 -70 mV , 首先给予 -130 mV 、宽 500 ms 的超极化脉冲, 然后从 -70 mV 起给予 10 mV 步幅递增、 12 ms 步宽的去极化脉冲刺激至 0 mV , 诱发钠电流。以测试电压为横轴, 测试电压下的 I/I_{max} 为纵轴, 用 Boltzmann 方程 $I/I_{\text{max}} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_{1/2})/\kappa]\}$ 进行曲线拟合。

其中 $V_{1/2}$ 为半数激活电压。绘制给药前后的稳态激活曲线。给药前钠通道激活曲线 $V_{1/2}$ 为 $(-34.67 \pm 3.07) \text{ mV}$, 给予尼可刹米后 $V_{1/2}$ 变为 $(-37.63 \pm 3.37) \text{ mV}$ ($n=10$, $P < 0.05$)。激活曲线在尼可刹米加入后向超极化方向移动 (图 2A), 表明 $5 \mu\text{g/mL}$ 的尼可刹米使钠通道激活门开放阈值降低。

2.2.2 尼可刹米对皮层神经元电压依赖性钠通道稳态失活曲线的影响 钳制膜电位位于 -100 mV , 给予 $-120 \sim +10 \text{ mV}$ 、宽 500 ms (足够长的时间来获得稳态失活), 阶跃 10 mV 的系列条件脉冲刺激, 条件脉冲后给予固定去极化至 -20 mV 、步宽 12 ms 的测试脉冲。以测试脉冲所激活的电流相对值 I/I_{max} 对条件脉冲电压作图, 用 Boltzmann 方程 $I/I_{\text{max}} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_{1/2})/\kappa]\}$ 进行曲线拟合, 得出钠通道的稳态失活曲线 (图 2B)。给药前钠通道失活曲线 $V_{1/2}$ 为 $(-43.36 \pm 3.06) \text{ mV}$, 给予尼可刹米后 $V_{1/2}$ 为 $(-33.24 \pm 2.05) \text{ mV}$ ($n=10$, $P < 0.01$)。尼可刹米使钠通道稳态失活曲线向去极化方向移动, 即钠通道失活门关闭阈值升高。

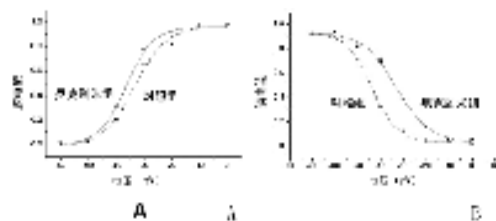


图 2 尼可刹米对皮层神经元钠通道激活曲线 (A) 和失活曲线 (B) 的作用

3 讨论

尼可刹米在临床上被应用于以下 3 个方面: (1) 呼吸中枢兴奋剂^[5], 可选择性兴奋延髓呼吸中枢; (2) 降低肝脏转氨酶和黄疸, 常用来治疗新生儿黄疸^[6-7]; (3) 作为溶解性较差药物的促溶剂, 促进药物的溶解和在体内的吸收、释放^[8-9]。许多资料表明, 钠通道结构和功能的改变与神经元正常功能和多种疾病密切相关。钠离子通道是神经元电活动的基本通道, 是产生动作电位和长时程增强 (long term potentiation, LTP) 的基础。钠电流幅度影响着神经元的兴奋性和动作电位幅度^[10-11]。本研究实验结果显示, 尼可刹米使皮层神经元钠通道激活曲线向超极化方向移动, 通道激活门开放阈值变负, 通道激活门易开放; 通道失活曲线向去极化方向移动, 通道失活门关闭电位升高, 通道失活门不易关闭。尼可刹米通过改变钠通道动力学特征增加了皮层神经元钠电流。实验结果提示, 尼可刹米对皮层神经元有兴奋作用, 这可能是尼可刹米兴奋中枢神经系统 (包括延髓呼吸中枢) 的细胞机制之一。

Bushma 等^[12] 发现尼可刹米用于降低肝脏转氨酶时可增加还原型辅酶 II (NADPH)、谷胱甘肽、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸的生物转化作用。尼可刹米进入体内后去乙酰基转化为尼克酰胺, 然后再被甲基化成为 N-甲基尼克酰胺经肾脏排出。维生素 PP 包括尼克酰胺和尼克酸两种形式 (两种形式在体内可以互相转化), 尼克酸、核酸、磷酸、腺嘌呤经酶促反应组成脱氢酶的辅酶 NAD^+ 和 NADP^+ ^[13]。作者推测尼可刹米对海马神经元的作用通过经典 PKC 途径在 NADPH 位点存在交互作用。尼可刹米增加 NADPH 激活 PKC、活性氧簇 (ROS) 增加钠电流, 增加呼吸中枢神经元兴奋性来发挥呼吸兴奋剂作用。临床

上过量使用尼可刹米引起中枢兴奋、精神错乱、恶心、呕吐、抽搐、血压升高、心律失常、惊厥等不良反应,这些症状与钠通道不能正常关闭导致组织细胞兴奋性增高的钠通道变异疾病表现相似^[14],也间接提示尼可刹米的作用与呼吸神经元细胞膜钠电流有关,为作者的实验提供了佐证。 Na^+ 内流被认为是缺血性脑损害的始动因素之一。在缺血缺氧条件下神经元能量代谢障碍、胞内 ATP 减少使 Na^+-K^+ 泵活性降低,膜静息电位朝去极化方向变化。神经元膜电位去极化促使钠通道开放增加,进一步增加胞内钠浓度。胞内钠浓度升高除了引起神经元水肿外还直接或间接引起钙超载和以一些兴奋性递质释放,从而加重神经元的缺血缺氧性损伤。临床上治疗缺血性脑损伤常采用低温、高压氧、改善微循环、增加神经元抗缺氧能力等措施。低温降低神经元代谢率、减少 ATP 的消耗,同时也降低了钠通道活性,降低了细胞钠浓度,有利于神经元正常功能的恢复^[15]。高压氧治疗提高了动脉血氧分压,有利于神经元摄取足够的氧以恢复正常功能^[16]。本实验从尼可刹米对钠电流的作用方面,探讨了尼可刹米兴奋中枢神经系统的作用机制,根据尼可刹米对钠电流的兴奋作用为尼可刹米的临床使用提供了实验依据和指导意见。

参考文献:

- [1] Biella G, Di Febo F, Goffredo D, et al. Differentiating embryonic stem-derived neural stem cells show a maturation-dependent pattern of voltage-gated sodium current expression and graded action potentials[J]. *Neuroscience*, 2007, 149(1):38.
- [2] Catterall WA. Molecular properties of brain sodium channels: an important target for anticonvulsant drugs[J]. *Adv Neurol*, 1999, 79:441.
- [3] Reckziegel G, Beck H, Schramm J, et al. Electrophysiological characterization of Na^+ currents in acutely isolated human cortical dentate granule cells[J]. *J Physiol*, 1998, 509(Pt 1):139.
- [4] 千智斌, 吴中海. 5-HT_{2A} 受体在尼可刹米引起新生大鼠延髓脑片呼吸放电增强中的作用[J]. *生理学报*, 2008, 60(2):216.
- [5] 陈余清, 蔡映云. 慢性阻塞性肺疾病合并呼吸衰竭应用尼可刹米的临床思维[J]. *中国临床药理学杂志*, 2002, 11(4):241.
- [6] Bushma MI, Legon'kova LF, Zverinskiĭ IV, et al. Disturbed functioning of enzyme systems of microsomal oxidation, glucuro-, and glutathione conjugation of xenobiotics in the liver of rats intoxicated by deoxycholate and their correction[J]. *Biull Eksp Biol Med*, 2000, 129(3):297.
- [7] 张敏芳, 陈明英, 张碧瑞. 应用苯巴比妥加尼可刹米(鲁可合剂)防治新生儿黄疸 35 例分析[J]. *福建医药杂志*, 2007, 29(4):55.
- [8] Elkharraz K, Faisant N, Guse C, et al. Paclitaxel-loaded microparticles and implants for the treatment of brain cancer: preparation and physicochemical characterization[J]. *Int J Pharm*, 2006, 314(2):127.
- [9] Baek N, Lee J, Park K, et al. N-diethylnicotinamide (DE-NA) solution as a medium for accelerated release study of paclitaxel[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004, 15(4):527.
- [10] Baccaglini PI, Spitzer NC. Developmental changes in the inward current of the action potential of Rohon-Beard neurones[J]. *J Physiol*, 1977, 271(1):93.
- [11] Munoz-Cuevas J, Vara H, Colino A. Augmentation of excitability in the hippocampus of juvenile rat[J]. *Neuroscience*, 2006, 143(1):39.
- [12] Bushma MI, Legon'kova LF, Zverinskiĭ IV, et al. Disturbed functioning of enzyme systems of microsomal oxidation, glucuro-, and glutathione conjugation of xenobiotics in the liver of rats intoxicated by deoxycholate and their correction[J]. *Biull Eksp Biol Med*, 2000, 129(3):297.
- [13] 查锡良. 生物化学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:440.
- [14] Cannon SC. Sodium channel gating: no margin for error[J]. *Neuron*, 2002, 34(6):853.
- [15] 宋伦贤. 重型颅脑损伤经过亚低温治疗的疗效研究[J]. *重庆医学*, 2006, 35(4):322.
- [16] 王强. 高压氧对中枢神经细胞损伤后的保护与重塑[J]. *重庆医学*, 2008, 37(9):897.

(收稿日期:2009-08-17 修回日期:2009-10-19)

(上接第 1052 页)

- [1] [J]. *Front Biosci*, 2002, 7(1):257.
- [2] Tulzo YL, Shenkar R, Kancko D, et al. Hemorrhage increase cytokine expression in lung mononuclear cells in mice[J]. *Clin Invest*, 1997, 99(7):1516.
- [3] 刘峰, 高士杰, 胡慧刚, 等. 大黄治疗休克后胃肠功能障碍的研究[J]. *中国急救医学*, 2003, 23(1):38.
- [4] 陈海龙, 吴咸中, 关凤林, 等. 大承气汤对 MODS 时肠道细菌微生物学影响的实验研究[J]. *中国微生物学杂志*, 2007, 19(2):132.
- [5] 王春妍, 杨世忠, 迟宝荣. 大承气汤对急性肝损伤大鼠肠源性内毒素血症生物学效应的阻断作用[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2006, 16(6):356.

- [6] Garg PK, Prasad H, Tandon RK. Elevated level of interleukin-6 predicts organ failure and severe disease in patients with acute pancreatitis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(4):550.
- [7] 吕冠华, 王长洪, 王立新, 等. 大承气汤对重症急性胰腺炎大鼠细胞因子及外周血 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2008, 16(6):355.
- [8] 何俊, 何庆玲, 陈忠华, 等. 生长抑素联合柴芍承气汤鼻饲和生大黄灌肠治疗重症急性胰腺炎 50 例分析[J]. *重庆医学*, 2008, 37(22):2603.

(收稿日期:2009-10-19 修回日期:2009-11-12)