DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.013
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0149-02

论著

$GABA_A$受体在爪蟾卵母细胞的表达

张献全[1],钱桂生[1],顾全宝[2],赵剑星[2] ([1]第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;[2]中国科学院上海细胞生物学研究所,上海 200031)

提 要:目的 将鼠源γ-氨基丁酸A型($GABA_A$)受体表达于爪蟾卵母细胞膜上并行功能测定。方法 微量注射仪将纯化的大鼠脑mRNA注入准备好的爪蟾卵母细胞内并于19℃温浴48 h以上使其表达;使用常规双电极电压钳记录卵母细胞表达的受体特性。结果 爪蟾卵母细胞注射大鼠脑mRNA 48 h后有$GABA_A$受体的表达,此受体具有天然$GABA_A$受体的氯通道特性。结论 爪蟾卵母细胞具有表达外源$GABA_A$受体的特性,是研究$GABA_A$受体生理和药理功能的一种重要工具。

关键词:γ-氨基丁酸受体;爪蟾卵母细胞
中图法分类号:R394.2 文献标识码:A

Brain $GABA_A$ receptors expression in Xenopus oocytes in rats

ZHANG Xian-quan, QIAN Gui-sheng, GU Quan-bao, ZHAO Jian-xing(Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To express $GABA_A$ receptors in Xenopus oocytes. Methods mRNA was isolated from brain of neonatal rat and injected into prepared Xenopus oocytes. Voltageclamp was used to measure electrophysiological character of $GABA_A$ receptors expressed in oocytes. Results $GABA_A$ receptors were expressed in Xenopus oocytes 48 h after injection at 19℃ and the Cl^- channel character was similar to those of native's receptors. Conclusion Xenopus oocyte can be used to express exogenous $GABA_A$ receptors, and is an important tool in studying physiological and pharmacological function of $GABA_A$ receptor subunits.

Key words: $GABA_A$ receptor; Xenopus oocyte

γ-氨基丁酸A型(Gamma-aminobutyric $acid_A$,$GABA_A$)受体是中枢神经系统内最重要的抑制性受体,苯二氮䓬类、巴比妥类和神经类固醇等都作用于$GABA_A$受体而发挥其镇静、催眠、抗惊厥等作用[1]。但由于$GABA_A$分子是5个亚单位组成的多聚体,它的亚型众多(目前已发现6类19种亚单位),使得$GABA_A$受体的结构组成复杂,种类繁多,且表现出不同的生理和药理特性,加之同一细胞内有不同的受体分布[2],使$GABA_A$受体的研究非常困难。爪蟾卵母细胞具有将外源mRNA翻译的功能,并将它们整合到卵母细胞膜上,显示膜蛋白的原有特性,是研究膜蛋白的一种工具[3]。本研究拟采用爪蟾卵母细胞表达大鼠脑mRNA的$GABA_A$受体的方法,建立$GABA_A$受体卵母细胞表达系统,为进一步研究$GABA_A$受体的生理和药理功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 mRNA的提取与纯化

新生SD大鼠(8 d)2只,断头活杀后,迅速取出脑组织,异硫氰酸胍法提取脑总RNA,Promeger试剂盒磁珠法分离mRNA,甲醛变性凝胶电泳鉴定其完整性,紫外分光光度计鉴定纯度并定量,-80℃保存。

1.2 卵母细胞的准备及培养

取性成熟雌性爪蟾,冰冻麻醉后,手术取卵,Ringer's液洗涤后,胶原酶消化2~3 h(2 mg/ml),以去除卵巢膜和滤泡膜,挑选成熟的卵母细胞(Ⅴ~Ⅵ期)于Ringer's液中,20℃恒温恢复数小时。

1.3 mRNA的微量注射

参照文献[4],由World Precision Instruments生产的微量注射仪完成,100 nm/min,每个卵母细胞注射50 nl(mRNA浓度1 ng/ml),注射后的卵母细胞在Ringer's液中温浴2~3 d,每天换液并去除坏死细胞,同时选注射水和未注射卵母细胞作对照。

1.4 电生理记录

实验采用常规的双电极电压钳记录方法。电压电极和电流电极均用3 mol/L KCl灌注,电压电极阻抗约为10 MΩ,电流电极的阻抗为2 MΩ,钳制电压为-60 mV。实验中以Ringer's液灌流,灌流速度为3~5 ml/min。所有药物均溶解在Ringer's液中。实验电流变化由XWT-201台式自动平衡记录仪记录,通过扫描仪扫描成图形文件。实验温度控制在(19±1)℃。

1.5 $^{36}Cl^-$流入测定

取一定数量表达后和对照组的卵母细胞,分别培育在含$^{36}Cl^-$(24.05×10^3 Bq/ml)的流入测试液中,恒温(19±1)℃振荡水浴温浴。在不同的时相点,取一定数量的卵母细胞迅速在冰浴的Ringer's液中洗涤3次,分装在计数杯中,在Beckman LS5801液体闪烁计数仪上计数cpm。数据处理参照文献[5],以每个卵母细胞nmol为计算单位。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570306)
作者简介:张献全(1965-),男,内蒙古赤峰市人,博士,主治医师,讲师,主要从事呼吸衰竭发病机制方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2000-04-07;修回日期:2000-07-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 GABA 受体的表达

卵母细胞注射大鼠脑 mRNA 72 h 后，GABA 能明显的诱导出内向电流，对照组卵母细胞即使较高浓度的 GABA 也不能诱导出膜电流，表明爪蟾卵母细胞已成功的表达了源自大鼠脑 mRNA 的 GABA 受体。为明确卵母细胞表达的 GABA 受体的亚型，我们在浴液中分别加入了 $GABA_A$ 受体的特异性拮抗剂荷包牡丹碱和 $GABA_B$ 受体的特异性拮抗剂氯苯安丁酸，结果显示，当浴液中的荷包牡丹碱的浓度为 5×10^{-6} mol/L 时，荷包牡丹碱能明显地降低 GABA 诱导电流，当荷包牡丹碱的浓度达到 2×10^{-5} mol/L 时，GABA 诱导电流几乎完全被抑制，而经 Ringer's 液洗涤后，GABA 诱导电流可基本恢复到原水平，而氯苯安丁酸对 GABA 诱导电流影响很小，见图 1。说明卵母细胞表达的 GABA 受体主要为 $GABA_A$ 受体。

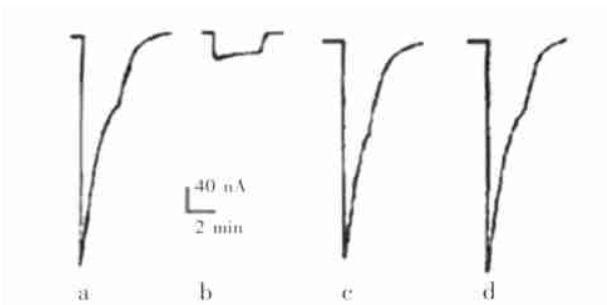


图 1 大鼠脑 GABA 受体在卵母细胞中的表达

Fig 1 Expression of rat GABA receptors in oocytes

a: Current response induced by GABA (1×10^{-4} mol/L); b: Effect of antagonist Bicuculline (5×10^{-6} mol/L) on the current induced by GABA; c: Recovery of the current response induced by GABA (1×10^{-4} mol/L); d: Effect of antagonist Baclofen (1×10^{-4} mol/L) on the current induced by GABA

2.2 Cl^- 运输蛋白的表达

在未注射的卵母细胞，$^{36}Cl^-$ 内流量随温浴时间上升，每个卵母细胞达(0.88±0.17) nmol/h，说明卵母细胞膜自身存在内源性 Cl^- 运输系统。注射大鼠脑 mRNA 的卵母细胞，其曲线变得更陡，$^{36}Cl^-$ 的流入量比对照组明显提高，每个卵母细胞达(1.97±0.30) nmol/h，说明卵母细胞也表达 Cl^- 运输蛋白，并处于功能状态。

3 讨论

本研究用大鼠脑 mRNA 注射到爪蟾卵母细胞，应用电压钳测定到有 GABA 诱导电流的存在，并应用放射性同位素示踪测定了 $^{36}Cl^-$ 的内流量。结果表明，爪蟾卵母细胞成功地表达了 GABA 受体，荷包牡丹碱能完全阻遏 GABA 诱导电流，说明表达受体是 $GABA_A$ 受体。本实验提示，爪蟾卵母细胞能够表达 $GABA_A$ 受体，可作为研究 $GABA_A$ 受体一个非常有用的工具，将 $GABA_A$ 受体众多亚单位的不同组合注入爪蟾卵母细胞，卵母细胞就会表达相应的 $GABA_A$ 受体，对这种表达受体电生理和药理特性的研究，将有助于我们认识不同亚单位的生理和药理功能，对消除药物的副作用、治疗药物依赖/耐受等有重要意义。在实验过程中我们体会到，多种因素影响外源 mRNA 在卵母细胞的表达，如 mRNA 的完整性、每个卵母细胞的注射量、孵浴液的离子浓度及 pH 等，另外爪蟾的生理状态和卵母细胞的生长状态对外源 mRNA 的表达也有重要影响，我们的经验是，选择青壮年大鼠 Ⅴ ~ Ⅵ期卵母细胞可明显提高受体的表达率。

本实验还发现，未注射 mRNA 的卵母细胞也存在 $^{36}Cl^-$ 流入，表明爪蟾卵母细胞膜上存在内源性 Cl^- 运输系统[6]，注射 mRNA 的卵母细胞的 $^{36}Cl^-$ 内流明显增强，说明卵母细胞液可表达源于大鼠脑 mRNA 的 Cl^- 运输蛋白。目前发现 Cl^- 的跨膜转运有以下机制[7]：Na^+-Cl^- 和 K^+-Cl^- 同相运输、Na^+-K^+-Cl^- 协同运输、Na^+-Cl^--HCO_3^- 交换、Cl^--HCO_3^- 交换、Cl^- 泵和 Cl^- 通道等，但这种表达的 Cl^- 运输系统的归属尚难确定，需要进一步研究。总之，卵母细胞具有表达外源蛋白、受体通道的特性，随着分子生物学的发展，人们可以把更多的基因表达于卵母细胞上，测定它们的电生理特性，还可通过突变、基因敲除等技术揭示不同氨基酸残基的生理药理特性。因此，爪蟾卵母细胞作为表达工具有更广泛的用途。

参考文献：

[1] Bormann I. The 'ABC' of GABA receptors[J]. Trends Pharmacol Sci, 2000, 21(1): 16—19.

[2] Mehta A K, Ticku M K. An update on $GABA_A$ receptors[J]. Brain Res Brain Res Rev, 1999, 29(2): 196—217.

[3] Sanna E, Motzo C, Biggio G. Expression of native $GABA_A$ receptors in Xenopus oocytes injected with rat brain synaptosomes[J]. J Neurochem, 1996, 67(5): 2 212—2 214.

[4] Guille M. Microinjection into Xenopus oocytes and embryos[J]. Methods Mol Biol, 1999, 127(2): 111—123.

[5] Malatynska E, Miller C, Schindler N. Amitriptyline increases GABA-stimulated $^{36}Cl^-$ influx by recombinant (alpha 1 gamma 2) $GABA_A$ receptors [J]. Brain Res, 1999, 851(1-2): 277—280.

[6] Weber W M. Endogenous ion channels in oocytes of Xenopus laevis: recent developments[J]. J Membr Biol, 1999, 170(1): 1—12.

[7] Meir A. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release[J]. Physiol Rev, 1999, 79(3): 1 019—1 088.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net