

## 研究论文

# Mg<sup>2+</sup>抑制表达在爪蟾卵母细胞上P2X4受体介导的ATP-激活电流

彭芳, 张玉芹\*, 曾燕, 周艳玲

武汉科技大学医学院生理学教研室, 武汉 430065

**摘要:** 本文旨在研究Mg<sup>2+</sup>对表达在非洲爪蟾卵母细胞上P2X4受体介导的ATP-激活电流(ATP-activated current,  $I_{ATP}$ )的调制及机理。大鼠P2X4受体野生型及突变型cDNA在体外转录成cRNA, 通过显微注射技术将该cRNA注入非洲爪蟾卵母细胞中进行表达。应用全细胞双电极电压钳技术研究Mg<sup>2+</sup>对 $I_{ATP}$ 的影响。结果显示, 细胞外液加MgCl<sub>2</sub>对 $I_{ATP}$ 的影响如下: (1) Mg<sup>2+</sup>在0.5~10 mmol/L范围内, 浓度依赖性地抑制 $I_{ATP}$ , 半效抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为(1.24 ± 0.07) mmol/L, 冲洗10 min后,  $I_{ATP}$ 可恢复; (2) 1 mmol/L的Mg<sup>2+</sup>使 $I_{ATP}$ 量-效曲线右下移, 最大效应电流( $E_{max}$ )降低了(42.0 ± 2.1)%, 但半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)不变; (3) 预加Mg<sup>2+</sup> 80 s后再加ATP, Mg<sup>2+</sup>对 $I_{ATP}$ 抑制效应可达最大; (4) Mg<sup>2+</sup>对 $I_{ATP}$ 的抑制不受膜电位的影响; (5) 以100 μmol/L ATP激活的电流为对照, 将P2X4受体280位的天冬氨酸突变成不带电荷的谷氨酰胺后, 相同浓度的ATP诱发的 $I_{ATP}$ 幅值仅为对照值的(4.12 ± 0.15)%; 将280位的天冬氨酸突变成带负电荷的谷氨酸,  $I_{ATP}$ 幅值和对照值相比没有显著性差异; (6) 当P2X4受体280位的天冬氨酸缺失后, 100 μmol/L ATP诱发的 $I_{ATP}$ 的幅值几乎为对照值的两倍, 且0.5~10 mmol/L的Mg<sup>2+</sup>对相应的 $I_{ATP}$ 无明显影响。以上结果提示: Mg<sup>2+</sup>抑制P2X4受体介导的 $I_{ATP}$ 是非竞争性的、可逆的、具有浓度依赖性、时间依赖性、无电压依赖性; Mg<sup>2+</sup>的这种抑制效应可能是通过作用于P2X4受体280位的天冬氨酸而实现的。

**关键词:** Mg<sup>2+</sup>; ATP-激活电流; 爪蟾卵母细胞; 双电极电压钳技术

**中图分类号:** R338

## Mg<sup>2+</sup> inhibits ATP-activated current mediated by rat P2X4 receptors expressed in *Xenopus oocytes*

PENG Fang, ZHANG Yu-Qin\*, ZENG Yan, ZHOU Yan-Ling

Department of Physiology, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China

**Abstract:** To investigate the modulation of Mg<sup>2+</sup> on rat P2X4 receptors and its underlying mechanism, we transcribed cDNA coding for wild-type and mutant P2X4 receptors to cRNA *in vitro*, injected the cRNA to oocytes of *Xenopus laevis* using the microinjection technique and revealed the effect of Mg<sup>2+</sup> on ATP-activated currents ( $I_{ATP}$ ) mediated by P2X4 receptors using the two-electrode whole-cell voltage clamp technique. The effects of extracellular Mg<sup>2+</sup> on  $I_{ATP}$  were as follows: (1) In oocytes expressing P2X4 receptors, Mg<sup>2+</sup> with concentration ranging from 0.5–10 mmol/L inhibited the amplitude of  $I_{ATP}$  in a concentration-dependent and reversible manner, with a 50% inhibitory concentration value (IC<sub>50</sub>) of (1.24 ± 0.07) mmol/L for current activated by 100 μmol/L ATP. (2) Mg<sup>2+</sup> (1 mmol/L) shifted the dose-response curve for  $I_{ATP}$  right-downward without changing the EC<sub>50</sub>, but reduced the maximal current ( $E_{max}$ ) by (42.0 ± 2.1)%. (3) After being preincubated with Mg<sup>2+</sup> for 80 s, the inhibitory effect of the Mg<sup>2+</sup> on  $I_{ATP}$  reached the maximum. (4) The inhibition of Mg<sup>2+</sup> on  $I_{ATP}$  was independent of membrane potential from -120 mV to +60 mV. (5) Compared with the current activated by 100 μmol/L ATP in the wild-type P2X4 receptors, mutant P2X4 D280Q responded to the application of 100 μmol/L ATP with a smaller current. The peak current was only (4.12 ± 0.15)% of that seen in wild-type receptors. Mutant P2X4 D280E responded to ATP stimulation with a current similar to that observed in cells expressing wild-type receptors. (6) When Asp280 was removed from P2X4, the current amplitude of  $I_{ATP}$  was increased almost one-fold, and Mg<sup>2+</sup> with concentration ranging from 0.5–10 mmol/L did not affect the

Received 2011-07-06 Accepted 2011-11-03

This work was supported by the Key Research Program of Department of Education, Hubei Province, China (No. 20081108).

\*Corresponding author. Tel: +86-27-5697182336; E-mail: zhangyuqin@wust.edu.cn

$I_{ATP}$  significantly. The results suggest that  $Mg^{2+}$  inhibits  $I_{ATP}$  mediated by P2X4 receptors non-competitively, reversibly, concentration-dependently, time-dependently and voltage-independently. The inhibitory effect of  $Mg^{2+}$  might be realized by acting on the site Asp280 of the P2X4 receptors.

**Key words:**  $Mg^{2+}$ ; ATP-activated current; *Xenopus* oocytes; two-electrode voltage clamp technique

镁是维持机体正常所必需的矿物质之一，其正常人体血清浓度为 0.83~1.25 mmol/L。有大量研究显示，镁离子 ( $Mg^{2+}$ ) 对癫痫、急性重型颅外伤、血管内皮细胞缺氧再复氧损伤、缺血缺氧性脑病等都有治疗作用，而且无论是人体还是实验诱导的大鼠，注射  $Mg^{2+}$  都可以使得各种形式的疼痛缓解，相反， $Mg^{2+}$  缺乏可以导致痛觉增敏<sup>[1-4]</sup>。一般认为  $Mg^{2+}$  作为生理性钙通道阻滞剂及 NMDA 受体拮抗剂，通过阻止钙离子内流、拮抗 NMDA 受体达到保护神经及镇痛效应<sup>[5-7]</sup>，然而有关  $Mg^{2+}$  的确切作用机制还存在争议。

P2X4 是离子通道型 ATP 受体的亚型之一，广泛分布于中枢及外周神经系统<sup>[8,9]</sup>。有研究表明，脑外伤后 P2X4 受体表达水平迅速升高，并在损伤后长时间内维持较高的水平<sup>[10]</sup>；之后有研究进一步证实了 P2X4 受体在疼痛信号转导中的作用<sup>[11]</sup>。因此，我们推测  $Mg^{2+}$  和 P2X4 受体之间存在某种联系，这种联系可能是  $Mg^{2+}$  保护神经、缓解疼痛等的原因之一。有研究指出， $Mg^{2+}$  能降低 PC12 细胞及神经元的 ATP- 激活电流 (ATP-activated current,  $I_{ATP}$ )<sup>[12]</sup>。之后又有研究显示， $Mg^{2+}$  通过降低激动剂与受体的亲和力，从而抑制大鼠结状神经节上  $I_{ATP}$ <sup>[13]</sup>。目前，国内外有关  $Mg^{2+}$  对 P2X4 受体调制的研究很少。有研究将人 P2X4 受体表达在人胚肾细胞上，应用膜片钳技术证明  $Mg^{2+}$  可阻断人 P2X4 受体或通道<sup>[14]</sup>。本文对大鼠 P2X4 受体介导的  $I_{ATP}$  的调制、调制特征以及  $Mg^{2+}$  的作用位点进行研究，旨在探讨  $Mg^{2+}$  治疗相关疾病的作用机制，并为合理应用  $Mg^{2+}$  提供电生理依据。

1 材料和方法

**1.1 动物、重组质粒** 成熟雌性非洲爪蟾 (中国科学院遗传与发育研究所提供)。大鼠颈上神经节重组质粒 pcDNA3-P2X4 由 Dr. G. Buell (Glaxo Institute for Molecular Biology, Geneva, Switzerland) 构建并惠赠。

**1.2 药品、试剂及主要仪器设备** 质粒小量快速提取试剂盒 (Axygen 公司)；内切酶 *XhoI* (Fermentas 公司)；体外转录试剂盒 (Mmessage Mmachine T7 RNA Transcription Kit, Ambion 公司)；ATPNa<sub>2</sub>、PPADS、suramin (Sigma 公司)；Fast-*Pfu* 酶 (TransGen 公司)；*DpnI* 酶 (TaKaRa 公司)；PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司)； $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (Merk 公司, 德国)；Ringers' 液 (mmol/L)：NaCl 95, KCl 1.0,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.0,  $CaCl_2$  1.0, HEPES 5.0；卵母细胞孵育液 (mmol/L)：NaCl 96.0, KCl 2.0,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.0,  $CaCl_2$  1.8, HEPES 5.0；不加  $CaCl_2$  的 Ringers' 液即为无钙 ND96 溶液。三种溶液均用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.4~7.6，使用前高压灭菌，孵育液高压后加青霉素至 100 U/L、丙酮酸钠至 2 mmol/L 以及胎牛血清 (每 500 mL 孵育液加 1 mL 胎牛血清)；双电极电压钳放大器 (OC-725C, 美国 Warner 公司)；微量注射仪 (Micro4TM Nanoliter2000, 美国 WPI 公司)；微电极拉制仪 (德国 HEKA 公司)；8 道灌流系统 (ALA-VM8, Scientific Instruments, NY)；微操纵器 (美国 WPI)；Biophotometer 核酸测定仪 (Eppendorf 公司)；凝胶成像分析系统 (Gene 公司)；PCR 仪 (Thermal 公司)。

**1.3 P2X4 受体定点突变** 应用 PCR 技术分别将

表 1. PCR 定点突变的引物

Table. 1 Primers for PCR site directed mutagenesis

| Parameter       | Sense primer (5'–3')                    | Antisense primer (5'–3')                |
|-----------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| D280Q           | CTATAAggAAggCCgCggACgTCTgggCCCTggACCTTg | CAAggTCCAgggCCCAgACgTCCgCggCCTTCCTTATAg |
| D280E           | gAAggCCgCggACCTTTgggCCCTggACCTTg        | CAAggTCCAgggCCCAAAggTCCgCggCCTTC        |
| Asp280 deletion | gAAggCCgCggACTgggCCCTggACC              | ggTCCAgggCCCAgTCCgCggCCTTC              |

P2X4 受体 280 位的天冬氨酸突变成谷氨酰胺 (D280Q)、谷氨酸 (D280E) 或缺失 (Asp280 deletion)。分别设计一条正义引物和一条反义引物 (表 1)。建立 50  $\mu$ L PCR 反应体系进行突变, 在 PCR 产物中加入 *DpnI* 酶作用 3 h 以去除质粒模板, 之后进行转化, 转化成功后, 挑克隆小量抽提并进行酶切鉴定, 然后取 3~5 个酶切鉴定正确的克隆测序, 得到预期的突变克隆。

#### 1.4 P2X4 受体野生型和突变体 cRNA 的体外转录及表达

P2X4 受体 cRNA 的体外转录及表达方法详见文献<sup>[15]</sup>。简单的流程是: 用转录试剂盒在体外将线性的 cDNA 转录成 cRNA, 将该 cRNA 注射到用胶原酶处理过的非洲爪蟾卵母细胞中。线性 cDNA 的纯化由原来的胶回收法改为现在的酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提法。

**1.5 卵母细胞的制备及显微注射** 参考文献<sup>[15]</sup>进行。设空白对照组和注射等量无酶水的对照组。卵母细胞在 18  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 48~72 h 后用于电生理研究。

**1.6 电生理记录与结果分析** 电生理记录方法详见文献<sup>[15]</sup>。实验所用到的液体均在使用前临时配制。ATP 溶液、 $MgCl_2$  溶液等均用标准细胞外液配制, 并将 pH 调至 7.4~7.6。ATP 和  $MgCl_2$  均通过 8 通道加药系统给药, 给药时间为 20 s, 加药时间间隔为 6 min。用 CytoBench 软件对数据进行采样、存储和分析。量-效关系曲线采用 Hill 方程进行拟合,  $I/I_{max} = 1/[1+(EC_{50}/C)^n]$ ,  $I/I_{max}$  表示当前效应和最大效应百分比,  $EC_{50}$  为半效能作用浓度,  $C$  为激活物浓度,  $n$  为 Hill 系数。实验数据的处理、分析及图表的绘制和拟合采用 Origin7.5 软件, 实验所得的数据均用 mean  $\pm$  SD 表示, 显著性检验采用 ANOVA 法,  $P < 0.05$  时认为差别具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 爪蟾卵母细胞表达的P2X4受体介导的 $I_{ATP}$ 确认

将卵母细胞膜电位钳制在 -60 mV, 在注射了 P2X4 受体 cRNA 的卵母细胞的细胞外液中加入不同浓度的 ATP (1~300  $\mu$ mol/L), 可记录到  $I_{ATP}$ , 并且  $I_{ATP}$  的大小呈浓度依赖性。同时在细胞外液中分别加入 10  $\mu$ mol/L 的乙酰胆碱、谷氨酸、5-HT 等, 均未记录到电流; 未注射 P2X4 受体 cRNA 和注射了等量无酶水的卵母细胞, 在其细胞外液加不同浓度 (10~1 000  $\mu$ mol/L) 的 ATP, 未记录到电流; 单

独加 2~10 mmol/L 的  $Mg^{2+}$ , 也没有记录到电流。分别用 100  $\mu$ mol/L 的 PPADS、suramin 与 100  $\mu$ mol/L 的 ATP 共同灌流卵母细胞, 以 100  $\mu$ mol/L 的 ATP 诱发的  $I_{ATP}$  为对照, 发现 PPADS 或 suramin 对  $I_{ATP}$  无明显影响 ( $n = 8$ )。PPADS 和 suramin 是 P2X 受体的非特异性阻断剂, 但 P2X4 受体的药理特性不同于 P2X 家族的其它成员, 其介导的  $I_{ATP}$  不能被 PPADS 和 suramin 阻断, 与已有的报道结果一致<sup>[16]</sup>, 因此证明本研究中显微注射后的卵母细胞表达 P2X4 受体。

### 2.2 不同浓度的 $Mg^{2+}$ 对 $I_{ATP}$ 的影响

图 1 显示, 以 100  $\mu$ mol/L ATP 产生的  $I_{ATP}$  为对照。 $Mg^{2+}$  在 0.5~10 mmol/L 的范围内, 随着浓度的增大, 对  $I_{ATP}$  的抑制越明显, 呈现出浓度依赖性。半效抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $(1.24 \pm 0.07)$  mmol/L。冲洗 10 min 后, 再于细胞外液加入 100  $\mu$ mol/L ATP,  $I_{ATP}$  恢复为对照水平 ( $n = 8$ )。

### 2.3 $Mg^{2+}$ 对 $I_{ATP}$ 量-效曲线的影响

图 2 显示  $Mg^{2+}$  分别为 0 mmol/L、1 mmol/L 时的  $I_{ATP}$  量-效曲线图。在 1 mmol/L  $Mg^{2+}$  存在下,  $I_{ATP}$  量-效曲线右下移, 最大效应电流 ( $E_{max}$ ) 减小, 比单独加入 ATP 时减小  $(42.0 \pm 2.1)\%$ ;  $EC_{50}$  无显著性差异 [ $(16.02 \pm 2.13)$   $\mu$ mol/L vs  $(16.28 \pm 1.76)$   $\mu$ mol/L,  $n = 10$ ]。

### 2.4 $Mg^{2+}$ 对 $I_{ATP}$ 的抑制与 $Mg^{2+}$ 孵育时间的关系

用 2 mmol/L 的  $Mg^{2+}$  分别孵育表达 P2X4 受体卵母细胞 0、20、40、60、80、100、120 s, 再加 ATP 观察  $Mg^{2+}$  的不同孵育时间对  $I_{ATP}$  的影响。以  $Mg^{2+}$  和 ATP 同时加入产生的  $I_{ATP}$  为对照, 结果显示, 预孵育时间在 80 s 以后时,  $Mg^{2+}$  对  $I_{ATP}$  的抑制效应达到最大, 此时的  $I_{ATP}$  小于对照电流 ( $P < 0.01$ ,  $n = 8$ )。80、100、120 s 三组中两两间比较无显著性差异 ( $n = 8$ ) (图 3)。

### 2.5 $Mg^{2+}$ 对 $I_{ATP}$ 的抑制与钳制电位的关系

图 4 显示, 当 ATP 浓度为 100  $\mu$ mol/L 时, 改变钳制电位 (-120 mV~+60 mV), 2 mmol/L 的  $Mg^{2+}$  对  $I_{ATP}$  的抑制无显著性差异 ( $n = 10$ ), 说明这种抑制作用不依赖于膜电位的改变。

### 2.6 P2X4受体突变对 $I_{ATP}$ 的影响

为了探索  $Mg^{2+}$  在 P2X4 受体上的作用位点, 以 100  $\mu$ mol/L ATP 激活的电流为对照 (图 5A)。将 P2X4 受体 280 位的天冬氨酸突变成不带电荷的谷氨酰胺 (D280Q) 后,  $I_{ATP}$  幅值明显下降, 仅为对照值的  $(4.12 \pm 0.15)\%$  ( $P < 0.01$ ,  $n = 5$ ), 而突变体

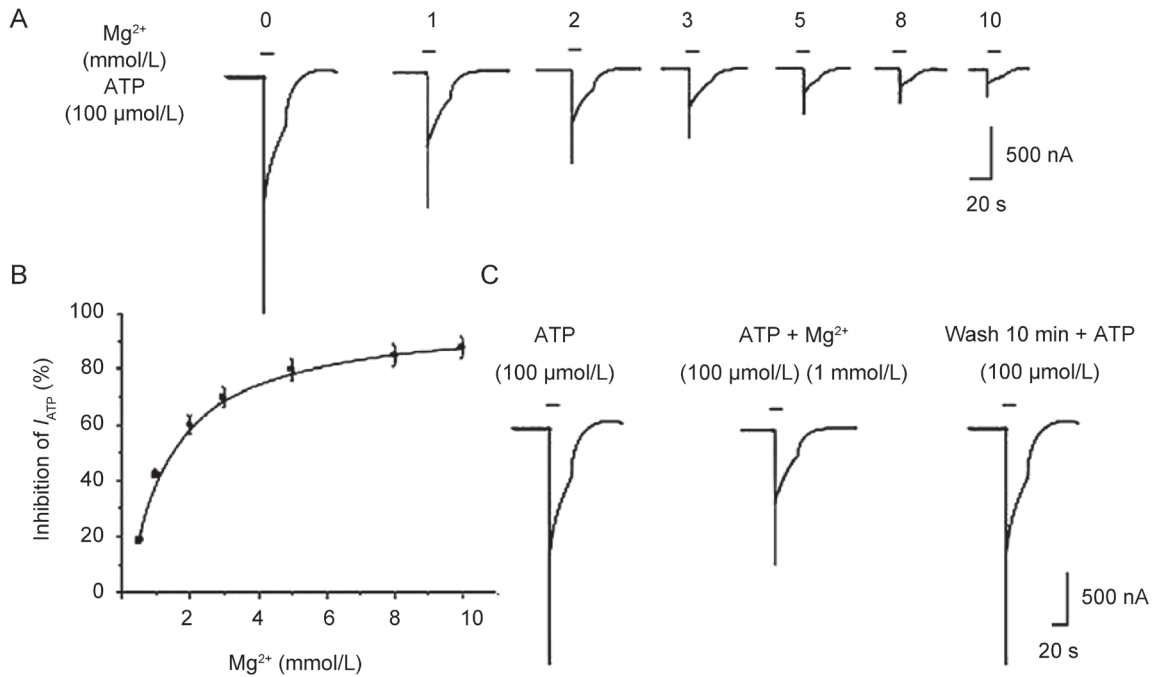


图 1. 不同浓度 $Mg^{2+}$ 对 $I_{ATP}$ 的影响及 $Mg^{2+}$ 对 $I_{ATP}$ 抑制效应的可逆性

Fig. 1.  $Mg^{2+}$  reversibly inhibits ATP-activated current mediated by P2X<sub>4</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes. A: Currents activated by 100  $\mu\text{mol/L}$  ATP plus different concentrations of  $Mg^{2+}$  (1–10 mmol/L). Records are sequential current traces from a single oocyte. B: Dose-response curve for  $Mg^{2+}$  reduction of current activated by 100  $\mu\text{mol/L}$  ATP. Each point represents mean  $\pm$  SD of 8 cells. The  $IC_{50}$  is ( $1.24 \pm 0.07$ ) mmol/L. On average, the inhibition rate of  $I_{ATP}$  by 1 mmol/L and 2 mmol/L  $Mg^{2+}$  is ( $42.0 \pm 2.1$ )% and ( $60.0 \pm 3.0$ )% respectively. C: At 10 min after being washed, the ATP-activated current which was previously inhibited by  $Mg^{2+}$  recovered.

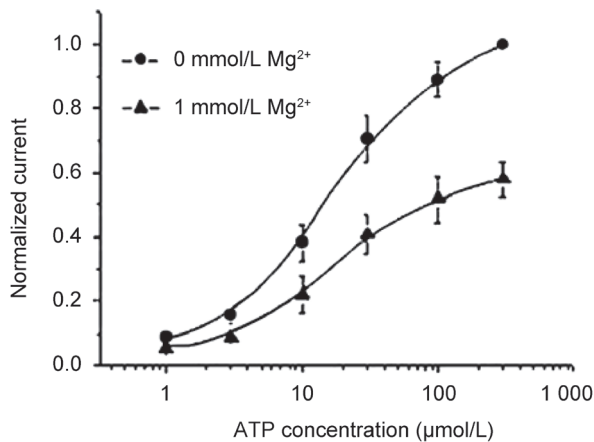


图 2.  $Mg^{2+}$ 对 $I_{ATP}$ 量-效曲线的影响

Fig. 2. Dose-response curves for  $I_{ATP}$  in the absence and presence of 1 mmol/L  $Mg^{2+}$ . Each point represents mean  $\pm$  SD of 10 cells. Invisible error bars are smaller than the size of symbols. Curves shown are the best fit of the data to the equation in the methods.  $Mg^{2+}$  (1 mmol/L) reduced the  $E_{max}$  by almost ( $42.0 \pm 2.1$ )%. The  $EC_{50}$  was ( $16.02 \pm 2.13$ )  $\mu\text{mol/L}$  and ( $16.28 \pm 1.76$ )  $\mu\text{mol/L}$  respectively in the absence and presence of 1 mmol/L  $Mg^{2+}$ .

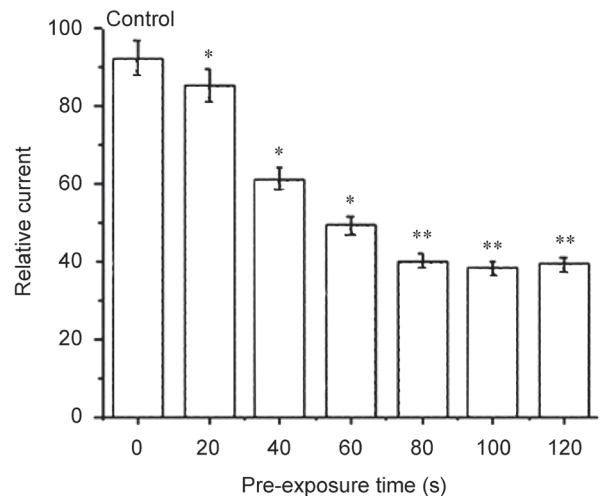


图 3.  $Mg^{2+}$ 预孵育时间对 $I_{ATP}$ 的影响

Fig. 3. Bar graphs showing the current when the cells were pre-incubated with  $Mg^{2+}$  for 0, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 s. Data are means  $\pm$  SD values of 8 oocytes. There was no significant difference among the last three groups. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control.



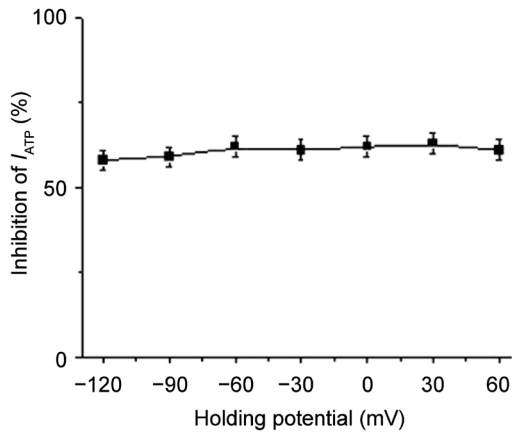


图 4.  $Mg^{2+}$ 对 $I_{ATP}$ 的抑制与钳制电位的关系

Fig. 4. The inhibition of  $Mg^{2+}$  (2 mmol/L) on  $I_{ATP}$  at different holding potentials. Each point represents means  $\pm$  SD of 10 cells.

D280E 的  $I_{ATP}$  和对照值相比没有显著性差异 ( $n = 5$ ), P2X4 受体 280 位的天冬氨酸缺失时,  $I_{ATP}$  幅值和对照值相比明显增大, 几乎为对照的两倍 ( $P < 0.01$ ,  $n = 5$ ), 细胞外液中加入 0.5~10 mmol/L 的  $Mg^{2+}$  对  $I_{ATP}$  无明显影响 ( $n = 5$ ) (图 5F)。

### 3 讨论

非洲爪蟾卵母细胞是研究基因转录、蛋白质表达及其功能调控等独特的异体表达系统, 它不仅可将外源性 cRNA 翻译成蛋白质, 还能进行翻译后期的加工 (如糖基化、乙酰化、蛋白裂解等)、剪切、并正确地组装到细胞膜中。用 1.0 mg/mL 的胶原酶消化非洲爪蟾卵母细胞, 以去除滤泡膜及血管膜, 然后通过显微注射技术将外源性 P2X4 受体注入细

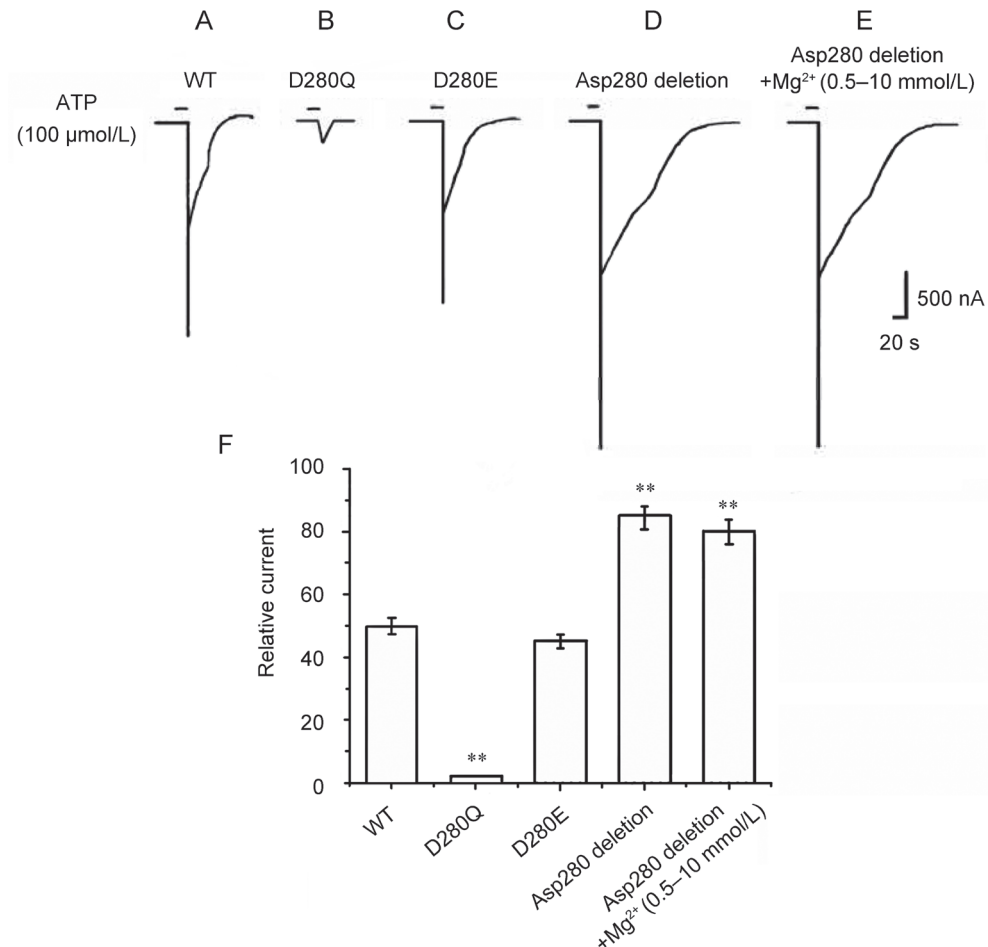


图 5.  $Mg^{2+}$ 在P2X4受体上的作用位点

Fig. 5. Asp280 may be the binding site of  $Mg^{2+}$  on P2X4 receptors. A: Current recorded in response to 100  $\mu$ mol/L ATP stimulation in wild-type receptors. B, C and D: P2X4 receptors function under replacement of Asp280 with the noncharged glutamine (B), negatively charged glutamate (C) residues, or removal of the Asp280 (D). The related currents were recorded in response to 100  $\mu$ mol/L ATP stimulation. E: Applying  $Mg^{2+}$  (0.5-10 mmol/L) did not affect the current in the P2X4 receptors lacking of Asp280. F: Graph showed the currents which were representative of 5 experiments per channel. \*\* $P < 0.01$  vs control (WT).

胞胞浆表达, 这样在研究过程中可以避免内源性嘌呤受体及其它受体的干扰, 内源性 ATP 受体存在于滤泡膜上<sup>[17,18]</sup>。由于人体血清镁低于 0.75 mmol/L 时即为低镁血症, 高于 1.25 mmol/L 为高镁血症, 超过 12.5 mmol/L 可致死, 因此本研究将  $Mg^{2+}$  浓度范围设计为 0.5~10 mmol/L。本实验成功建立了 P2X4 受体异体表达模型, 从实验结果可以看出, 0.5~10 mmol/L 的  $Mg^{2+}$  可明显抑制爪蟾卵母细胞表达的 P2X4 受体介导的  $I_{ATP}$ , 这种抑制作用表现为浓度依赖性、可逆性、非电压依赖性。在有一定浓度的  $Mg^{2+}$  存在的情况下,  $I_{ATP}$  量-效曲线向右下移,  $E_{max}$  减小, 但  $EC_{50}$  无显著性差异, 提示  $Mg^{2+}$  的拮抗效应属于非竞争性拮抗, 因为竞争性拮抗的特点是  $EC_{50}$  降低,  $E_{max}$  不变。开放性通道阻滞虽然属于非竞争性拮抗常见的作用机制, 但其常显现出明显的电压依赖性, 而  $Mg^{2+}$  对  $I_{ATP}$  的抑制不依赖于膜电位。另外,  $Mg^{2+}$  预孵育时间可影响其对  $I_{ATP}$  的抑制效应, 随着预孵育时间的增长,  $Mg^{2+}$  对  $I_{ATP}$  的抑制也越强, 80 s 以后抑制作用达到最大。本实验结果提示,  $Mg^{2+}$  在 P2X4 受体的具体作用位点或结构域应该位于离子通道的胞外部分, 至少是有胞外部分的参与, 在不同的钳制电位下,  $Mg^{2+}$  对  $I_{ATP}$  的抑制作用没有明显的改变, 不具有电压依赖性, 说明  $Mg^{2+}$  在 P2X4 受体上的作用位点位于通道孔外面或者接近通道外面的位置, 而不是作用于通道里面。

$Mg^{2+}$  是一种天然的钙通道拮抗剂, 这可能是它抑制 P2X4 受体介导的  $I_{ATP}$  的原因之一, 然而, 通过观察  $Mg^{2+}$  对  $I_{ATP}$  影响的特点, 我们推测  $Mg^{2+}$  在 P2X4 受体胞外域可能有相应的作用位点, 当  $Mg^{2+}$  作用该位点后, 使 ATP 与受体的亲和力下降, 进而抑制  $I_{ATP}$ 。Freist 等曾认为 Asp280 是  $Mg^{2+}$  在 P2X4 受体上的作用位点<sup>[19]</sup>。为了确定  $Mg^{2+}$  在 P2X4 受体上的作用位点, 在本实验中, 我们将 P2X4 受体 280 位的天冬氨酸分别突变成不带电荷的谷氨酰胺 (D280Q) 和带负电荷的谷氨酸 (D280E), 发现同样带负电荷的 D280E 突变体对 ATP 的反应和野生型受体相似, 而 D280Q 介导的  $I_{ATP}$  幅值和野生型相比明显降低。当去除 Asp280 后, 受体介导的  $I_{ATP}$  幅值显著增大, 通道关闭时间延长。因此推测 Asp280 为  $Mg^{2+}$  在 P2X4 受体上的抑制位点, 其作用机制可能是  $Mg^{2+}$  改变了电荷平衡, 从而降低了配体与受体的亲和力或内在活性, 当抑制位点不存在时, ATP 能以更高的亲和力和受体结合, 并更长时程地

激活 P2X4 受体。

本实验结果显示生理浓度的  $Mg^{2+}$  就能较大幅度地抑制 P2X4 受体介导的  $I_{ATP}$ , 因此, 我们推测  $Mg^{2+}$  可能通过 P2X4 受体而发挥其镇痛作用。神经病理性疼痛是神经系统损伤引起的一种慢性疼痛, 其发病机制复杂, 至今尚缺乏有效的治疗药物。研究显示小胶质细胞的活化在神经病理性疼痛发生中具有重要的作用, 而活化的小胶质细胞中 P2X4 受体表达量显著增加<sup>[11]</sup>, 提示 P2X4 受体可能参与了神经病理性疼痛。外周神经的损伤和炎症反应通过一定的机制传递给脊髓中的小胶质细胞, 而后小胶质细胞发生聚集并激活, 并且通过其上的 P2X4 受体对 ATP 做出反应, 最后由 ATP 激活的小胶质细胞修正脊髓神经节间的信号转导。多种伤害性刺激均可引起细胞内释放大量的 ATP, ATP 过度兴奋 P2X4 受体导致神经毒性, 从而引起疼痛, 而  $Mg^{2+}$  可能通过抑制 P2X4 受体介导的  $I_{ATP}$  而发挥其镇痛效应。

本研究初步探讨了  $Mg^{2+}$  对 P2X4 受体介导的  $I_{ATP}$  的调制及特征, 并应用定点突变技术深入探索了  $Mg^{2+}$  作用于 P2X4 受体的位点, 为某些神经系统疾病提供可能的治疗靶点。

\* \* \*

**致谢:** 感谢 Dr. G. Buell (Glaxo Institute for Molecular Biology, Geneva, Switzerland) 提供重组质粒 pcDNA3-P2X4。

### 参考文献

- Begon S, Pickering G, Eschalier A, Dubray C. Magnesium increases morphine analgesic effects in different experimental models of pain. *Anesthesiology* 2002; 96(3): 627–632.
- Begon S, Pickering G, Eschalier A, Mazur A, Rayssiguier Y, Dubray C. Role of spinal NMDA receptors, protein kinase C and nitric oxide synthase in the hyperalgesia induced by magnesium deficiency in rats. *Br J Pharmacol* 2001; 134(6): 1227–1236.
- Honarmand A, Safavi M. Magnesium sulphate pretreatment to alleviate pain on propofol injection: A comparison with ketamine or lidocaine. *Acute Pain* 2008; 10(1): 23–29.
- Sen AP, Gulati A. Use of magnesium in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 2010; 7(1): 91–99.
- Sirvinskas E, Laurinaitis R. Use of magnesium sulfate in anesthesiology. *Medicina* 2002; 38(7): 695–698.
- Hollmann MW, Liu HT, Hoenemann CW, Liu WH, Durieux

- ME. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. Part II: interactions with volatile anesthetics. *Anesth Analg* 2001; 92(5): 1182–1191.
- 7 Rondón LJ, Privat AM, Daulhac L, Davin N, Mazur A, Fialip J, Eschalier A, Courteix C. Magnesium attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain. *J Physiol* 2010; 588(Pt21): 4205–4215.
- 8 North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82(4): 1013–1067.
- 9 Bo X, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G, North RA. Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res* 2003; 313(2): 159–165.
- 10 Xiang ZH (向正华), Lv J, Jiang P, Jiao BH, Burnstock G. Expression of P2X4 purinoceptor subunit after traumatic brain injury in rats. *Chin J Anat (解剖学杂志)* 2003; 26(3): 203–207 (Chinese, English abstract).
- 11 Tsuda M, Inoue K. Neuropathic pain and ATP receptors in spinal microglia. *Brain Nerve* 2007; 59(9): 953–959.
- 12 Choi SY, Kim KT. Characterization of  $Na^+$  influx mediated by  $ATP^{4-}$ -activated P2 purinoceptors in PC12 cells. *Br J Pharmacol* 1996; 118(4): 935–940.
- 13 Li C, Peoples RW, Weight FF.  $Mg^{2+}$  inhibition of ATP-activated current in rat nodose ganglion neurons: evidence that  $Mg^{2+}$  decreases the agonist affinity of the receptor. *J Neurophysiol* 1997; 77(6): 3391–3395.
- 14 Negulyaev YA, Markwardt F. Block by extracellular  $Mg^{2+}$  of single human purinergic P2X4 receptor channels expressed in human embryonic kidney cells. *Neurosci Lett* 2000; 279(3): 165–168.
- 15 Zhu F (朱凡), Zhang YQ, Cheng H, Tian WH. Characteristics of ATP-activated current mediated by rat P2X4 receptor expressed in the *Xenopus* oocytes. *Chin J Neuroanat (神经解剖学杂志)* 2008; 24(4): 391–395 (Chinese, English abstract).
- 16 Xiong KM, Li CY, Weight FF. Inhibition by ethanol of rat P2X4 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* 2000; 130(6): 1394–1398.
- 17 Yang Q (杨青), Li ZW, Wei JB. Current responses mediated by endogenous  $GABA_B$  and  $GABA_C$  receptors in *Xenopus* oocytes. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2001; 53(4): 311–315 (Chinese, English abstract).
- 18 Yang Q (杨青), Xu Y, Li ZW, Wei JB, Wang QW. Comparison between the responses mediated by endogenous and expressed ATP- and GABA-receptors in *Xenopus laevis* oocytes. *Med J Wuhan Univ (武汉大学学报医学版)* 2002; 23(3): 193–195 (Chinese, English abstract).
- 19 Freist W, Verhey JF, Stuhmer W, Gauss DH. ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett* 1998; 434(1–2): 61–65.