

5-羟色胺重摄取过程的机制

李慈珍 杨智昉 王艺颖 张野 郑燕倩 刘远谋 王红卫*

(上海交通大学医学院生理教研室, 上海 200025)

摘要 将重组质粒pOTV-hSERT(oocyte transcription vector)中的人5-羟色胺转运体(hSERT) cDNA 转录合成 cRNA, 通过显微注射技术注入爪蟾卵母细胞, 建立 hSERT 异体表达模型, 用电压钳技术测定其转运功能, 研究 hSERT 重摄取的调控因素。胞外 5-羟色胺 (5-HT) 灌流液引起内向转运电流, 可被 hSERT 特异阻断剂去甲丙米嗪(desipramine)所阻断。该电流大小随测试电位的变化而改变, 膜电位愈负, 转运电流愈大。灌流液无钠或无氯时, 转运电流分别减小(89.6±1.4)%和(51.7±1.5)%, 表明胞外钠、氯离子为转运过程的必需条件。胞外 5-HT 浓度变化时, 转运电流呈剂量依赖性, 并有饱和现象。提高胞内 5-HT 浓度至胞外的 20 或 40 倍时, 并不影响转运过程。因此, 5-HT 的重摄取与胞外 Na⁺、Cl⁻ 离子联合转运有关, 胞内 5-HT 浓度并不影响转运电流的大小, 细胞膜电位的变化对转运过程有快速调控作用。

关键词 5 羟色胺转运体; 卵母细胞; 异体表达; 电压钳

神经递质 5-羟色胺(serotonine, 5-HT)在运动、摄食、睡眠、生殖能力、认知以及情感状态等诸多生理功能的调节中起重要作用。5-羟色胺转运体(serotonin transporter, SERT)通过将 5-HT 重摄取入突触前神经末梢, 在递质的量和递质与受体的作用时间上对信息传递进行精细的调控。研究表明: SERT 在神经精神心理正常功能维持及疾病的发生和发展中起重要作用, 脑中 5-HT 转运功能下调可导致精神障碍、强迫症、抑郁、焦虑、惊恐等疾病^[1-4]; SERT 功能异常也与可卡因成瘾性有关^[5]。SERT 基因缺失或突变的动物的研究表明, 单胺类神经递质转运体在功能上既限制了突触传递的作用时间和程度, 又有助于突触前、后递质浓度的维持和调节^[6,7]。单胺类递质转运体属于离子依赖性神经递质转运蛋白。转运体在转运递质的同时伴随有转运电流的产生, 并具有类似离子通道功能的电生理特性^[8]。但是哪些因素影响转运过程, 是一个尚未完全解决的问题。

Gurdon 等^[9]和 Colman 等^[10]的研究证明, 非洲爪蟾卵母细胞可以翻译外源 mRNA, 并能合成人体内正常分泌的一些蛋白质。随后, 许多异体蛋白通过在卵母细胞胞浆中注射相关的 RNA 而被成功表达。通过 mRNA 或 cDNA 细胞内微量注射, 使卵母细胞的异体表达被广泛应用于离子通道蛋白、受体蛋白、转运体蛋白的结构、功能及功能调控的研究。

本文用非洲爪蟾卵母细胞作为 5-HT 等单胺类神

经递质转运体的异体表达系统。通过显微注射技术将体外合成的转运体 cRNA 注入卵母细胞的胞质中, 使其表达以建立 SERT 的异体表达模型。探讨 SERT 重摄取的动力过程和条件。通过改变膜外 Na⁺ 和 Cl⁻ 的浓度、跨膜电位及被转运物质在膜内外的浓度差, 研究它们对转运过程的影响, 以阐明转运的动力过程和机制, 为进一步研究转运过程的调控及药物作用机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

内切酶 *Xho*II、*Xba*I 和 *Not*I 为 Takara 公司产品; Plasmid Mini Kit、Plasmid Midi Kit 为 Qiagen 公司产品; mMESSAGING mMACHINE RNA Transcription Kit 为 Ambion 公司产品; 胶原酶 Collagenase Type I A 为 Sigma 公司产品。

Ringer 溶液(mmol/L): 96 NaCl、2 KCl、5 MgCl₂·6H₂O、0.6 CaCl₂、5 HEPES, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.60, 高压灭菌后加入庆大霉素至终浓度 100 IU/ml。Ca²⁺-free-Ringer 溶液, 去除 CaCl₂ 其余成分同 Ringer 溶液。

收稿日期: 2006-03-13 接受日期: 2006-08-01

上海市科委重点资助项目(No.03JC14034, No.06JC14045); 上海教委第四期重点学科资助项目(No.ZDXK2001)

* 通讯作者。Tel: 021-64672079, E-mail: sljys@shsmu.edu.cn; jiywanghai@shsmu.edu.cn

卵母细胞培养基(mmol/L): Ringer 溶液高压灭菌后加入庆大霉素 100 IU/ml、5% 马血清、丙酮酸钠 550 μ g/ml。

微电极放大器(Axoclamp 2B)为 AXON 公司产品; DigiData 1320A 数据信号接口为 AXON 公司产品; pCLAMP 8 信号处理系统 为 AXON 公司产品; 微量注射器 (Nanoliter Injector)为 WPI 公司产品。

成熟雌性非洲爪蟾 20 只(中国科学院上海神经生物学研究所提供), 每只非洲爪蟾每隔 3 月可循环取卵共 4~5 次。

1.2 重组质粒的转化、筛选及酶切鉴定

重组质粒 pOTV-hSERT 由美国 Vanderbilt 大学神经生物系馈赠, 感受态细菌为 *E. coli* DH5 α 。CaCl₂ 法制备感受态细菌。高压电穿孔法转化 *E. coli* DH5 α 。小规模制备质粒 DNA, 蓝白斑筛选法筛选重组质粒。然后利用 *Xba*I、*Xho*I 进行双酶切鉴定, 同时设未酶切的质粒为对照。

1.3 体外转录 cRNA

1.3.1 线性化模板 *Not*I 酶切后得线性化模板 DNA, 蛋白酶 K 处理线性化模板 DNA 以去除其中所含蛋白质; NaAc 法回收模板 DNA, 以备用。

1.3.2 体外转录反应 转录反应按 mMACHINE RNA Transcription Kit (Ambion 公司)操作流程进行。以线性化 DNA 为模板, dNTP 为原料, 使用 T7 RNA 聚合酶, 体外合成与 DNA 模板相互补的 cRNA。LiCl 法沉淀 RNA, 70% 乙醇洗涤, 干燥后溶于 20 μ l RNase-free 的水中。取转录产物 1 μ l 测 A₂₆₀ 以定量, 取 2 μ l 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 cRNA 显微注射及卵母细胞的培养

1.4.1 爪蟾卵母细胞的制备 取成熟爪蟾, 冷冻休克 30 min, 麻醉后手术剖开腹腔取出卵巢组织块, 缝合伤口, 待爪蟾苏醒后将其放回。将卵巢块用无 Ca²⁺ Ringer 氏液(Ca²⁺-free-Ringer, 下同)轻轻洗涤后, 置于 2 mg/ml 胶原酶中 18~20 $^{\circ}$ C 处理 2 h 以去除卵巢膜及滤泡膜。用 Ca²⁺-free-Ringer 液洗 7 次, 再用 Ringer 液洗 3 次, 置于 Ringer 液中 1~2 h 后挑选出成熟卵母细胞(V~VI 期)用于注射。

1.4.2 cRNA 显微注射 利用显微注射法, 将体外转录的 cRNA 注射到爪蟾卵母细胞的胞浆中, 每个卵母细胞注射 42 ng cRNA (42 nl)。设注射水的爪蟾卵母细胞为对照组。

1.4.3 卵母细胞的培养 在 19 $^{\circ}$ C 置于卵母细胞培养基继续培养 4~9 天, 每天更换培养基, 及时弃去

有坏死迹象的细胞。

1.5 双微电极电压钳制术

室温 20~22 $^{\circ}$ C, 卵母细胞置于灌流槽中, 灌流速度 1 ml/min。将电压和电流电极分别插入卵母细胞, 测得静息电位。选用静息电位为 -40 mV~-60 mV 的细胞进行实验。电流电极插入细胞时可引起膜电位短时间下降, 待膜电位恢复至静息电位时再进行电压钳制。膜电位由微电极放大器(Axoclamp 2B)或 pCLAMP 8 信号处理系统来控制。电流电极所记录的信号放大后, 经 DigiData 1320A 数据信号接口转换, 送计算机采样和存储, 并在示波器上实时监视^[11]。

2 结果

2.1 转运过程的电压依赖性

2.1.1 改变 Holding 电位 未注射 hSET RNA 的正常卵母细胞分别用未含和含有 5 μ mol/L、10 μ mol/L 5-HT 的 Ringer 液灌流, 两者结果相同, 均没有转运电流出现(图未显示)。

以 Ringer 液灌流已表达的卵母细胞, 将膜电位分别钳制在 -20、-40、-60、-80、-100、-120 mV, 最后钳回到 -20 mV。在各测试电压钳制中, 待电流曲线稳定后, 用含 5 μ mol/L 5-HT 的 Ringer 液灌流, 产生转运电流。约 60 s 后洗回, 再进入下一个测试电位。结果显示, 随着膜电位的超极化, 在相同浓度的 5-HT 灌流下, 转运电流不断增大。当膜电位再次回复到 -20 mV 时, 转运电流基本恢复到对照水平。该电流可被 5-HT 转运体特异性阻断剂去甲丙米嗪(desipramine)所阻断(图未显示)。共测试 6 例, 图 1 为其中一例, 显示了 5-HT 转运过程的内向电流呈电压依赖性。

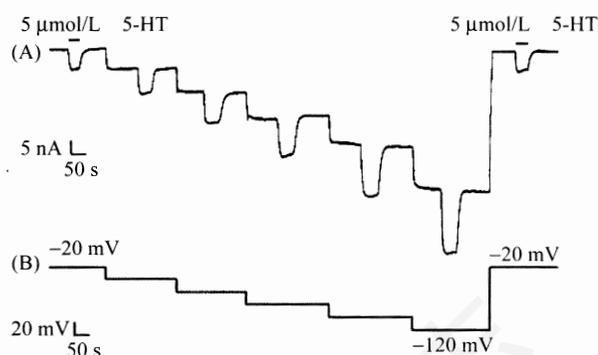


图 1 5-HT 诱导的内向电流呈电压依赖性

A: 膜电位钳制不同情况下的内向电流(5-HT: 5 μ mol/L); B: 测试电位分别为: -20, -40, -60, -80, -100, -120, -20mV。

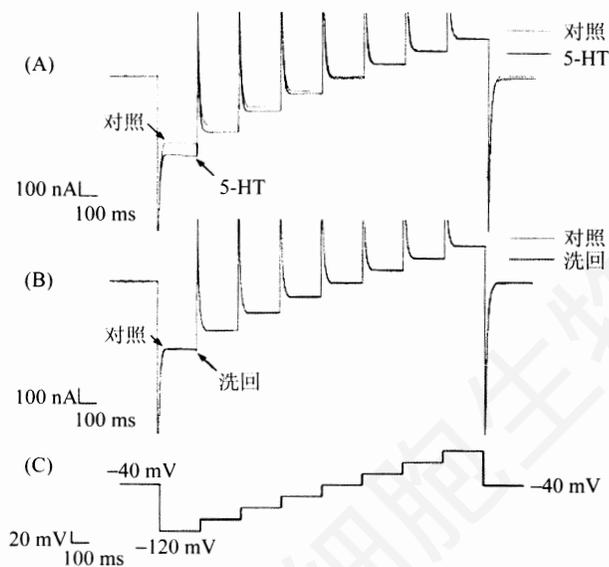


图2 阶梯电压变化模式下5-HT转运电流的电压依赖性
A: 对照和5-HT转运电流(5 $\mu\text{mol/L}$); B: 对照和洗回; C: 阶梯式测试电压变化: 从-120 mV至+20 mV。保持电位(holding potential): -40 mV。

表1 5-HT转运电流的电压依赖性

电压 (mV)	-120	-100	-80	-60	-40	-20	0	20
$I_{5\text{-HT}}$ (nA)	-74.3	-59.1	-43.4	-30.6	-19.3	-10.7	-0.3	0
	(± 6.9)	(± 9.7)	(± 7.5)	(± 5.9)	(± 4.3)	(± 3.5)	(± 2.1)	0

均数 \pm 标准误, $n=6$ (取自4只爪蟾的卵巢)。

2.1.2 阶梯式电位变化对转运电流的影响 为了观察膜电位快速改变时转运过程的电压依赖性有无变化, 采用阶梯式电压钳实验。先将膜电位维持在-40 mV (holding potential, 保持电位), 然后将测试电位改变到-120、-100、-80、-60、-40、-20、0、20 mV, 各步钳制时间200 ms, 最后回复到-40 mV (图2)。先后以对照和含5 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT Ringer液灌流卵母细胞, 记录5-HT灌流前后电流的变化。以各测试电压的电流均值之差为5-HT诱导的内向转运电流($I_{5\text{-HT}} - I_{\text{Ringer}}$)。统计资料显示($n=6$), 转运电流随膜电位的超级化而增大, 随膜电位的去极化而减小。从-20 mV到-120 mV, 转运电流增加了约7倍, 图2为其中1例, 表1是本实验的统计结果。图3是按照表1中不同测试电位转运电流的大小所作的5-HT转运电流的“电压-电流”曲线。上述结果显示, 5-HT转运电流有明确的快速电位依赖性。

2.2 膜外溶液中的离子对转运电流的影响

2.2.1 Na^+ 的影响 观察 Na^+ 对转运过程的影响时, 用四甲基胺(tetramethylammonium)(TMA $^+$)替代对

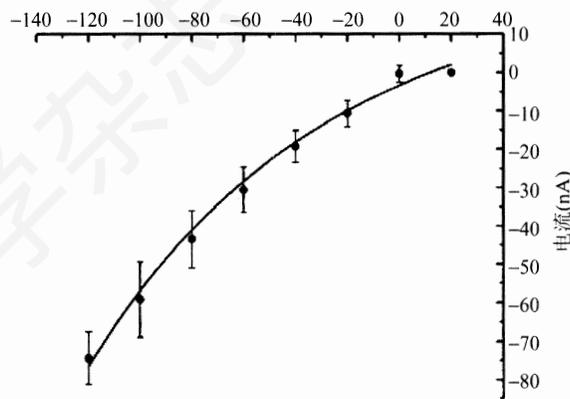


图3 5-HT转运电流的电压-电流关系曲线($n=6$, 均数 \pm 标准误)

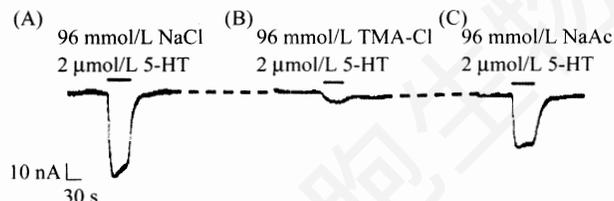


图4 5-HT转运电流受灌流液中 Na^+ 和 Cl^- 的影响

A: Ringer溶液含96 mmol/L NaCl; B: 用TMA $^+$ (96 mmol/L TMA-Cl)代替Ringer溶液中 Na^+ ; C: 用Acetate $^-$ (96 mmol/L NaAc)代替Ringer溶液中 Cl^- 。

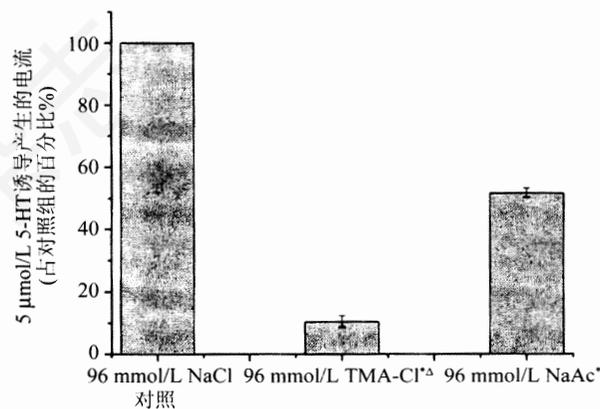


图5 5-HT转运电流依赖于灌流液中 Na^+ 和 Cl^- ($n=5$)
与96 mmol/L NaCl组相比较, $*P < 0.05$; 与96 mmol/L NaAc组相比较, $\Delta P < 0.05$ 。

照Ringer液中的 Na^+ 。将卵母细胞的膜电位钳制在-60 mV, 先观察对照Ringer液灌流下2 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT引起的内向电流大小。再改用含2 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT的无 Na^+ 溶液灌流, 测定无钠溶液下, 5-HT引起的电流变化(图4B)。图5为膜外 Na^+ 对转运电流影响的统计图。在无 Na^+ 的条件下(96 mmol/L TMA-Cl组), 转运电流较对照组减小了(89.6 \pm 1.4)%。

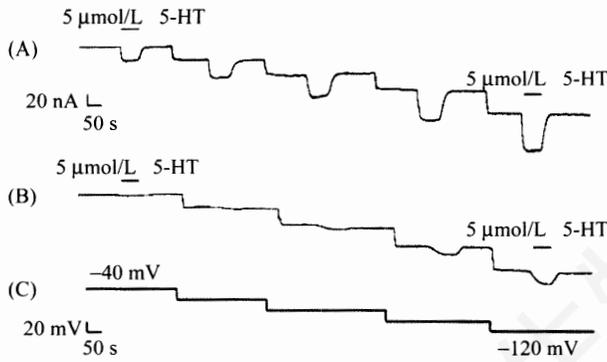


图6 在不同测试电位 Na^+ 对 5-HT 转运电流的影响

A: 96 mmol/L Na^+ -Ringer 溶液灌流下细胞的 5-HT 转运电流; B: 改用 0 mmol/L Na^+ -Ringer 溶液灌流同一细胞后的转运电流; C: 测试电位: -40, -60, -80, -100, -120 mV。

在观察膜电位(即钳制电位)对无钠条件下 5-HT 转运电流的影响, 先将卵母细胞的膜电位分别钳制在 -40、-60、-80、-100、-120 mV。记录对照 Ringer 液灌流时, 5-HT 转运电流的大小。再用无钠溶液灌流, 观察相同浓度 5-HT 在相同电压下, 转运电流的变化。图 6 为其中一例, 结果显示, 无钠溶液对各测试电位下的转运电流均有减小作用, 再次表明 Na^+ 是转运过程的必需条件之一, 并显示膜电位变化对转运过程具有调控作用。

2.2.2 Cl^- 的影响 观察 Cl^- 对转运过程的影响时, 使用相同浓度的 NaAc 取代 Ringer 液中的 NaCl。方法同前。结果显示, 在无 Cl^- 条件下, 转运电流减小到正常对照的 $(51.7 \pm 1.5\%) (n=5)$ 。统计结果见图 5 中 NaAc 96 mmol/L 组。

图 4 显示同一细胞中, 膜外 Na^+ 和 Cl^- 对转运电流的影响。用对照 Ringer 液、再用无 Na^+ -Ringer 液和无 Cl^- -Ringer 液相继灌流, 观察在此三种条件下, 同一浓度 5-HT (5 $\mu\text{mol/L}$) 产生的转运电流的差异。在 96 $\mu\text{mol/L}$ NaCl 的 Ringer 液中, 5-HT 产生的内向电流为 58 nA, 无 Cl^- 条件下转运电流为 31 nA; 而用无 Na^+ -Ringer 液灌流时, 5-HT 仅能产生 6 nA 的内向电流。5 例中 Na^+ 和 Cl^- 对转运过程影响的统计结果见图 5。表明 Na^+ 与 Cl^- 对转运电流有不同的影响作用。

2.3 被转运物质 5-HT 在胞内、外浓度的改变对转运过程的影响

先在灌流液中改变 5-HT 的浓度, 观察在不同浓度下, 转运电流的变化。图 7A 显示随 5-HT 浓度的增加, 转运电流增大, 当 5-HT 在 5 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, 基本达到饱和。

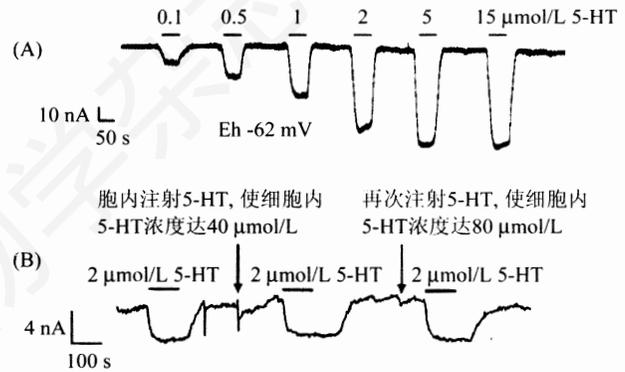


图7 细胞内外不同浓度 5-HT 对转运电流的影响

A: 细胞外灌流液中 5-HT 浓度的变化对转运电流的影响; B: 提高细胞内 5-HT 浓度后, 对转运电流的效应。箭头表示向胞内注射 5-HT 的时间点。

当用微注射器将 5-HT 注入到卵母细胞内, 使胞内 5-HT 浓度达 40 $\mu\text{mol/L}$ 和 80 $\mu\text{mol/L}$ (胞外 5-HT 灌流浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$)。图 7B 表明, 尽管胞内 5-HT 浓度非常高, 比胞外灌流的 5-HT 大 20~40 倍, 但转运电流并无减小现象, 提示胞内 5-HT 的浓度改变对转运过程无明显影响。

3 讨论

突触间隙递质的被清除, 在信息传递中起重要作用。有三种方式进行递质的清除: (1) 代谢降解; (2) 递质由突触间隙弥散至周围; (3) 由神经末梢或胶质细胞重摄取。虽然谷氨酸能神经元可由上述三种方式来灭活神经递质, 但单胺类递质, 如 5-羟色胺等, 主要由神经末梢特异的蛋白体来重摄取而失活。

神经递质重摄取属于继发性主动转运, 由钠泵提供能量, 造成膜内外 Na^+ 的浓度差。递质转运的能量来自于 Na^+ 的跨膜浓度差, 因而又称协同转运 (co-transport)。有两种学说解释递质分子的转运过程: 一为“交替转运学说”(alternating access), 即 5-HT 离子与转运体在膜外的结合位点结合, 造成转运体蛋白质构型的变化, 使得 5-HT 转向细胞膜胞浆面, 5-HT 脱离转运体, 进入胞内。此过程交替反复出现。其中胞外的 Na^+ 、 Cl^- 和 5-HT 及胞内的 K^+ 或 H^+ 均可能参与这种协同转运过程^[12,13]。另一种假说认为, 底物(即 5-HT)与离子通过共同的转运体孔道, 由膜外进入膜内。递质与离子分别可与通道内壁位点相结合。借助 Na^+ 的浓度差和电位差, 递质分子被 Na^+ 推入而通过通道, 转运入膜内。在这里, Na^+ 的电化学梯度是把 5-HT 逆浓度

差推入(push)膜内的动力,即所谓的按序列进入(one file theory)^[14]。不管何种学说都反映出5-HT重摄取是与Na⁺的跨膜电化学梯度有关的。本实验表明转运电流随膜外5-HT浓度增高而变大,但当胞内5-HT浓度比胞外高时,仍有转运过程的发生,提示膜内外5-HT的浓度差并非转运过程能量的来源,支持钠的联合转运学说。

Galli等^[15]研究表明,5-HT所诱导的转运电流与SERT对5-HT的重摄取正相关。在膜电位为-20 mV时,每转运500个5-HT分子,会产生约10 000个净正电荷,从而形成内向性电流。因此本实验中用电压钳的方法对转运电流的研究,不仅是目前国际上常用的方法,能反映转运体的电生理特性,也是衡量其转运功能的重要指标之一。

本实验测试了5-HT转运过程的电位依赖性。细胞内电位愈负,转运电流愈大。无论转运机制是哪一种学说,继发性主动转运的能量是来自于膜内外的Na⁺浓度差和电位差。当细胞膜电位变得更负时,跨膜的Na⁺电化学驱动力(electrochemical force)变大。这一方面解释了本实验中电位依赖性的现象,也提示了在神经末梢处,对已释放递质的重摄取有电位依赖性。当神经细胞因某种原因而膜电位下降时,Na⁺的电化学驱动力减小,神经末梢重摄取递质的速率将下降。这可能会影响正常信息传递的处理过程,甚至产生功能异常。反之,膜电位愈负,转运过程会加强。

本实验中改变细胞外灌流液中Na⁺或Cl⁻的浓度均能明显地改变转运电流的大小。但二者的影响程度不同:在无钠溶液中(TMA-Cl)转运电流减少了近90%,而在无氯环境中,仅减少49%左右。进一步表明膜内外Na⁺的浓度差,是5-HT转运的主要动力。但无钠溶液中10%的剩余电流是为何形成的需要进一步研究。有人认为,递质转运体所转运的电流,除与底物(为本实验中5-HT)有关还与漏电流(leak current)^[16],酸电流(acidic current)^[17],第二信使(second messengers)^[18]等相关。总之,剩余电流的成份是什么,值得我们进一步研究。

用无Cl⁻溶液灌流已表达的细胞时,电流值减小约50%,其效应与无钠浓度不一样。Cl⁻在递质转运中的作用是一个尚未解决的问题。细胞外Cl⁻的存在能促进递质转运过程,已在很多其他转运体的研究中得到证实^[19]。如果膜内外Cl⁻的浓度差是转运的电化学驱动力,则在无Cl⁻条件下,细胞内Cl⁻的

外流应产生内向电流。实际上细胞外无Cl⁻溶液中转运电流明显减小(约50%)。关于这点我们同文献[20]的观点相似,即Cl⁻可能对hSERT的功能起调控作用,细胞外Cl⁻可与转运蛋白的膜外位点相结合,影响了转运蛋白对5-HT和Na⁺的通透性,从而改变了转运电流的大小。

当细胞外5-HT灌流液的浓度为2 μmol/L,通过细胞内微量注射,使胞内5-HT浓度达到40或80 μmol/L,即胞内5-HT的浓度比胞外增加20倍或40倍时,转运电流并不是我们预想之中的会减少、甚至逆转。并且在两种浓度差的情况下,转运电流的大小基本不变。这就提示,重摄取是一个单向转运过程。其能量来自于膜内外Na⁺的浓度差,并非是由被转运物5-HT的跨膜浓度差来决定。细胞内5-HT浓度增高并不影响转运电流的大小。当然,这也不排除注入的5-HT很快进入胞内囊泡,使胞浆内的5-HT浓度下降。

总之,在爪蟾卵母细胞上成功建立了人5-HT转运蛋白的异体表达模型,结果表明(1)递质的重摄取主要与胞外Na⁺、Cl⁻的联合转运;(2)膜外递质浓度的改变,可影响转运电流的大小,呈剂量依赖型;实验中膜内递质的浓度变化对转运过程没有明显影响。(3)膜电位越负,转运电流越大;阶梯电位钳制实验进一步显示,膜电位的变化对递质的重摄取还具有快速调节作用。

参考文献(References)

- [1] Marazziti D et al. *Psychiatry Res*, 2001, **103**: 125
- [2] Holmes A et al. *Psychopharmacology (Berl)*, 2002, **161**: 160
- [3] Caspi A et al. *Science*, 2003, **301**: 386
- [4] Ozaki N et al. *Mol Psychiatry*, 2003, **8**: 895
- [5] Sandhu SK et al. *Euro J Biochem*, 2002, **269**: 3934
- [6] Bengel D et al. *Mol Pharmacol*, 1998, **53**: 649
- [7] Fabre V et al. *Eur J Neurosci*, 2000, **12**: 2299
- [8] Masson J et al. *Pharmacol Rev*, 1999, **51**: 439
- [9] Gurdon JB et al. *Nature*, 1971, **233**: 177
- [10] Colman A et al. *Euro J Biochem*, 1981, **113**: 339
- [11] 王艺颖等. *中国应用生理学杂志*, 2005, **21**: 444
- [12] Rudnick G. *Methods Enzymol*, 1998, **296**: 233
- [13] Rudnick G et al. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1144**: 249
- [14] Adams SV et al. *Biophys J*, 2002, **83**: 3268
- [15] Galli A et al. *J Neurosci*, 1997, **17**: 3401
- [16] Sonders MS et al. *J Neurosci*, 1997, **17**: 960
- [17] Hilgemann DW et al. *J Gen Physiol*, 1999, **114**: 459
- [18] Ingram SL et al. *J Neurosci*, 2000, **20**: 550
- [19] Cao Y et al. *J Neurosci*, 1998, **18**: 7739
- [20] Adams SV et al. *Biophys J*, 2003, **85**: 1548

The Mechanism for Serotonin Re-uptak by Heterologous Expressed Human Serotonin Transporter in *Xenopus* Oocyte

Ci-Zheng Li, Zhi-Fang Yang, Yi-Ying Wang, Ye Zhang, Yan-Qian Zheng, Yuan-Mou Liu, Hong-Wei Wang*

(Department of Physiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract cRNA of SERT was transcribed from cDNA, which was cloned in the pOTV vector. Oocytes of *Xenopus laevis* were injected with transcribed cRNA *in vivo* and turned to a heterologous expression model (human serotonin transporter, hSERT) in 5–6 days. With voltage clamp technique in recording the current induced by 5-HT, we tested the function of the expressed 5-HT transporter and studied factors which influence the re-uptake of hSERT. When the cell membrane potential was held at -60 mV and perfused with Ringer's solution containing 5-HT, a steady inward current appeared and was almost completely inhibited by specific 5-HT transporter blocker, Desipramine, which demonstrated that it was 5-HT-induced current. The 5-HT-induced current varied with holding potentials or voltages in step protocol. The more negative of the clamping voltage, the bigger of the 5-HT-currents. The results from the experiments with 0 mmol/L Na^+ or 0 mmol/L Cl^- in Ringer solution indicated that transporting of 5-HT required Na^+ and Cl^- ion in extra-cellular solution and the influences of Na^+ and Cl^- ion on transporting were different, for with 0 mmol/L Na^+ or 0 mmol/L Cl^- the currents were reduced by $(89.6 \pm 1.4)\%$ and $(51.7 \pm 1.5)\%$ respectively. As the concentration of 5-HT in the perfusing Ringer's solution increased from 0.1 to 15 $\mu\text{mol/L}$, the current augmented accordingly until it was saturated. Injection of 5-HT into the Oocyte making the intracellular concentration of 5-HT increased to about 20 or 40 folds, the 5-HT-induced current was not changed in spite of the changes of intracellular concentrations of 5-HT. Conclusion: Na^+ ion and Cl^- ion are co-transported with 5-HT. The cell membrane potential may influence the 5-HT-induced current fulfilling a rapid regulation for re-uptake of 5-HT. Changing the intracellular concentration of 5-HT does not influence the amplitude of transporter current.

Key words serotonin transporter; oocyte; heterologous express; voltage clamp

Received: March 13, 2006 Accepted: August 1, 2006

This work was supported by the Major Science Foundation of Shanghai (No.03JC14034, No.06JC14045); Shanghai Educational Committee Science Foundation (No.ZDXK2001)

*Corresponding author. Tel: 86-21-64672079, E-mail: sljys@shsmu.edu.cn; jywanghw@shsmu.edu.cn