

镧对大鼠海马神经元瞬时外向钾电流和延迟整流钾电流动力学的影响

杜会枝, 杨 频

(山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要 利用全细胞膜片钳技术, 在急性分离的大鼠海马锥形细胞上研究了 La^{3+} 对快速激活与失活的瞬时外向钾电流 I_A 和平台电流 I_K 的影响. 结果发现, 随着细胞外液中 La^{3+} 浓度的增加, La^{3+} 对 I_A 的抑制率逐渐增大, 而且具有电压依赖性; 10^{-5} mol/L La^{3+} 可改变 I_A 激活曲线和失活曲线的半数激活电压 V_h 值, 使激活曲线和失活曲线左移, 但不改变其斜率因子 k 值. 细胞外液中 La^{3+} 对 I_K 及其激活曲线都没有明显作用. 这可能是镧导致海马神经元异常的作用机制之一.

关键词 膜片钳技术; 海马神经元; 镧离子

中图分类号 O614.33

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)01-0013-04

中枢神经元上去极化激活的电压依赖性外向钾电流是其动作电位复极化过程的主要成分. 神经细胞膜电压门控性钾通道在神经元的信号调控过程中具有十分重要的作用, 同时它又是某些毒素和药物作用的靶点, 这些毒素和药物通过影响钾通道的结构和功能而发挥其对中枢神经系统的损伤或保护作用. Landifield 等^[1]首先报道了 K^+ 通道参与和年龄有关的认知功能损伤, 并且认为 K^+ 通道在学习与记忆过程中起重要作用, 而 Alzheimer 老年痴呆症(AD)的主要临床表现就是记忆力和认知能力下降. 在中枢神经系统中, 海马的主要功能之一就是调节学习和记忆, AD 可能与某些毒素和药物对海马 K^+ 通道的作用有关.

近年来, 稀土在我国农业、畜牧业和医药等方面得到了广泛应用, Zhu 等^[2]测出了镧系元素由土壤向人体的转移系数及其在人体某些器官和组织中的分布情况. 据文献报道, $100 \mu\text{mol/L}$ La^{3+} 可增强大鼠海马 CA1 区锥形细胞上的后突触电流^[3], 也能抑制钾电流^[4], 而且稀土在多种短期体外诱变实验中显示出了抗诱变作用和低剂量硝酸镧具有一定阻抑肝癌病变的作用^[5], La^{3+} 在脑缺血(此时, 血脑屏障通透性增加)情况下, 也能顺利通过血脑屏障进入脑组织^[6], 保护脑缺血后的神经细胞凋亡^[7]. 但其对神经细胞的作用机理却不十分清楚, 从细胞水平和分子水平的研究才刚刚开始. 本文应用全细胞膜片钳技术研究了 La^{3+} 对大鼠海马锥形细胞 I_A 和 I_K 的影响, 以期从离子通道的角度研究 La^{3+} 对中枢神经系统的作用提供实验依据.

1 实验部分

1.1 大鼠海马神经元的急性分离

按文献[8]方法略加修改: Wistar 大鼠乳鼠, 出生 7 d 左右, 雄雌不限(山西省中医药研究院动物室提供). 乳鼠断头取脑, 在 $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 的孵育液中取出海马, 手工切成约 $500 \mu\text{m}$ 厚的脑片, 置于 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育液中 30 min(其间连续通入氧气), 然后移入含 0.5 mg/mL protease 的孵育液中, 于 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 消化 35 min(其间连续通入氧气). 消化后的脑片用孵育液洗 3 次, 移入标准细胞外液中, 用孔径从小到大的 Pasteur 吸管轻轻吹打, 制成细胞悬液, 静置 20 min, 待细胞贴壁后, 弃液, 换成新的标准细胞外液, 即可进行全细胞膜片钳记录.

收稿日期: 2004-12-17.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30470408)和山西省自然科学基金资助.

联系人简介: 杨 频(1933 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物无机及配位化学研究. E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

1.2 全细胞膜片钳记录

膜片钳全细胞记录模式根据 Hamill 等^[9]改进的膜片钳技术进行. 将玻璃毛细管(BJ-40, 北京)用两步法制成内径为 1~2 μm 的微电极, 轻吸电极使电极与细胞膜间形成 $10^9 \Omega$ 高阻抗封接. 形成全细胞模式后, 首先进行正常生理状态下的信号采集, 然后将 La^{3+} 定量加入到培养皿中, 使其达到所需的终浓度, 10 min 后再次进行相应信号的采集. 用 Axopatch 200B 膜片钳放大器(Axon Instrument, USA)进行全细胞膜片钳记录, 经数模转换装置(Digidata 1200)和 Pclamp 6.0 软件采集数据, 利用 Clampfit 6.0 及 Origin 5.0 分析及绘图. 在本实验中, I_A 通过电流峰值计算, I_K 通过 266 ms 处的电流值计算^[10].

1.3 溶液配制

Protease, TEA Cl, HEPES 均为 Sigma 产品, 其它试剂均为国产分析纯. 孵育液: 124 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 1.3 mmol/L MgSO_4 , 2.4 mmol/L CaCl_2 , 10 mmol/L Glucose, 26 mmol/L NaHCO_3 , 用 Tris 调节 pH 值为 7.4. 标准细胞外液: 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1.1 mmol/L MgCl_2 , 2.6 mmol/L CaCl_2 , 10 mmol/L Glucose, 10 mmol/L HEPES, 用 Tris 调节 pH 值为 7.4, 记录前加入 0.2 mmol/L CdCl_2 . 这两种溶液在实验前均用氧气饱和. 电极内液: 65 mmol/L KCl, 5 mmol/L KOH, 80 mmol/L KF, 2 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L EGTA, 2 mmol/L Na_2ATP , 用 KOH 调节 pH 值为 7.3. La^{3+} 的配制: 将镧氧化物加入到浓盐酸中, 加热溶解至盐酸挥发尽干, 加三次蒸馏水溶解定容成 20 mmol/L, 于 0~4 $^\circ\text{C}$ 保存备用.

2 结果与讨论

2.1 外向钾电流

保持电位(V_h)为 -100 mV, 从 -100 mV 开始以 10 mV 阶跃到 90 mV 的电压刺激大鼠海马神经元, 刺激频率 0.5 Hz, 持续时间 300 ms, 即引出一系列外向电流[图 1(A)]. 同样的实验在大于 20 个神经元上重复, 其图形类似, 但电流大小稍有差异. 当将电极内液中的钾离子用相同浓度的铯离子取代时, 则记录不到这些外向电流, 表明所记录的为钾电流. 图 1(B)为其电压-电流曲线. 去极化激活的外向钾电流包括快速激活与失活的瞬时外向钾电流 I_A 和平台电流 I_K ^[10]. 从图 1(A)也可以看出, 此外向电流有一个快速上升的起始峰, 随后缓慢降至一平台. 当在外液中加入 30 mmol/L TEA Cl 时, 平台电流 I_K 被抑制, 所记录的为 I_A [图 1(C)]. 继续改变 V_h 为 -40 mV 时, I_A 也被阻断^[11][图 1(D)]. 在图 1(A)中还能观察到外向钾电流起始部分有一快速的内向成分, 即为钠电流. 因为内向钠电流的激活和失活过程极为迅速, 对所研究的外向钾电流影响不大, 故本实验中记录的外向钾电流均是在未阻断钠电流的情况下得到的.

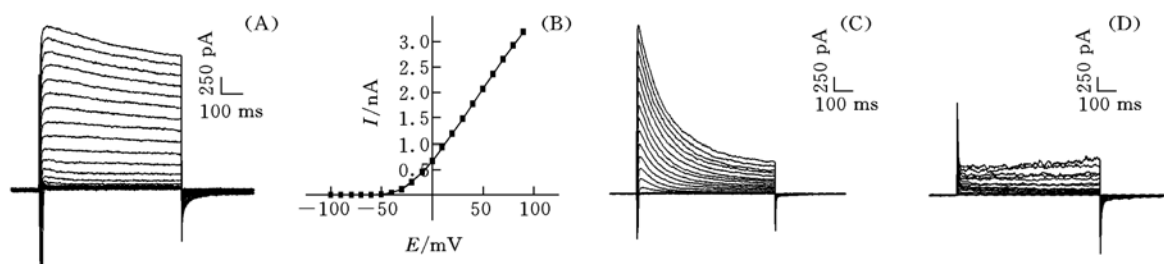


Fig. 1 Outward K^+ current

(A) Outward K^+ current; (B) The current-voltage relationship curve; (C) Effect of 30 mmol/L TEA Cl on K^+ current; (D) Effect of a holding potential(V_h) of -40 mV on K^+ current.

2.2 La^{3+} 对 I_A 和 I_K 作用的影响

在与图 1 相同的跃迁电压刺激下记录出外向电流, 然后依次向培养皿中加入浓度为 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} mol/L 的 La^{3+} , 考察 La^{3+} 对 I_A 和 I_K 的影响. 结果表明, 在细胞外液中加入不同浓度的 La^{3+} 后, I_A 电流值有较大幅度的减少, 而且随着 La^{3+} 浓度的增加, 它对 I_A 的抑制率也逐渐增大, 呈现出剂量-效应关系[图 2(A)] ($n > 5$). 10^{-5} mol/L La^{3+} 可显著抑制 I_A , 抑制率为 $(53 \pm 5)\%$. 但在细胞

外液中加入不同浓度的 La^{3+} 后, I_K 电流值只略微减少 ($n = 5, P > 0.05$). $10^{-5} \text{ mol/L La}^{3+}$ 可使 I_A 的电压-电流关系曲线明显降低, 但在不同膜电压下的减小幅度不同. 这说明 La^{3+} 对 I_A 的抑制具有电压依赖性[图 2(B)].

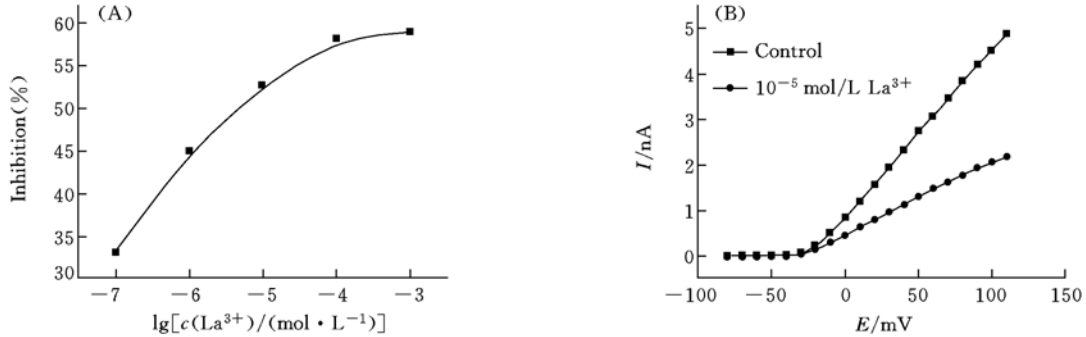


Fig. 2 The inhibitory effects of La^{3+} concentration in the bath solution on I_A (A) and effects of 10^{-5} mol/L on the current-voltage relationship of I_A (B)

2.3 La^{3+} 对 I_A 和 I_K 激活和失活动力学的影响

利用公式 $G = I/(V - V_k)$ 将 I_A 和 I_K 的电流值转换为电导值, 其中 G 为电导值, V 为膜电位, V_k 为翻转电位, 以电导值与最大电导值的比值 (G/G_{\max}) 对应膜电位分别绘制出加 $10^{-5} \text{ mol/L La}^{3+}$ 前后的 I_A 和 I_K 的激活曲线. 所得曲线用 Boltzmann 方程 $G/G_{\max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$ 进行拟合, 式中 V_h 为半数激活电压, k 为曲线的斜率因子(图 3). 从图 3 中可以看出, I_A 和 I_K 的激活曲线均呈 S 型, 并计算出加 La^{3+} 前后 I_A 的 V_h 值分别为 (0 ± 1.54) 和 $(-10 \pm 2.17) \text{ mV}$ ($n = 5, P < 0.05$), k 分别为 (18 ± 1.64) 和 $(20 \pm 2.06) \text{ mV}$ ($n = 5, P > 0.05$). 加 La^{3+} 前后 I_K 的 V_h 值分别为 (4.59 ± 2.34) 和 $(3.82 \pm 2.2) \text{ mV}$ ($n = 5, P > 0.05$), k 分别为 (22.85 ± 2.34) 和 $(20.11 \pm 2.11) \text{ mV}$ ($n = 5, P > 0.05$). 这说明 $10^{-5} \text{ mol/L La}^{3+}$ 可以使 I_A 的激活曲线左移, 但不改变其斜率因子. $10^{-5} \text{ mol/L La}^{3+}$ 对 I_K 的激活曲线及其斜率因子没有影响. 保持电位于 -100 mV , 先给予 -120 mV 至 10 mV , 步幅 10 mV , 刺激波宽 80 ms 的阶梯钳制预脉冲刺激, 然后再给予至 50 mV 的测试脉冲刺激, 刺激波宽 120 ms , 刺激频率 0.5 Hz , 记录电流[图 3(C)]. 然后向培养皿中加入 $10^{-5} \text{ mol/L La}^{3+}$, 10 min 后再次记录电流. 以电流峰值与最大电流峰值的比值 (I/I_{\max}) 对应预脉冲刺激电压分别绘制出加 La^{3+} 前后 I_A 的失活曲线. 所得曲线可用 Boltzmann 方程 $I/I_{\max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$ 进行拟合, 式中 I 为电流峰值, I_{\max} 为最大电流峰值, V_h 为半数失活电压, k 为曲线的斜率因子[图 3(D)]. 加 La^{3+} 前后, I_A 的 V_h 值分别为 $(-46.39 \pm 0.67) \text{ mV}$ 和 $(-53.53 \pm 1.18) \text{ mV}$ ($n = 5, P < 0.01$), k 分别为 $(9.28 \pm 0.6) \text{ mV}$ 和 $(10.54 \pm 1.07) \text{ mV}$ ($n = 5, P > 0.05$). 这说明 $10^{-5} \text{ mol/L La}^{3+}$ 可以使 I_A 的失活曲线左移, 但不改变曲线的斜率因子.

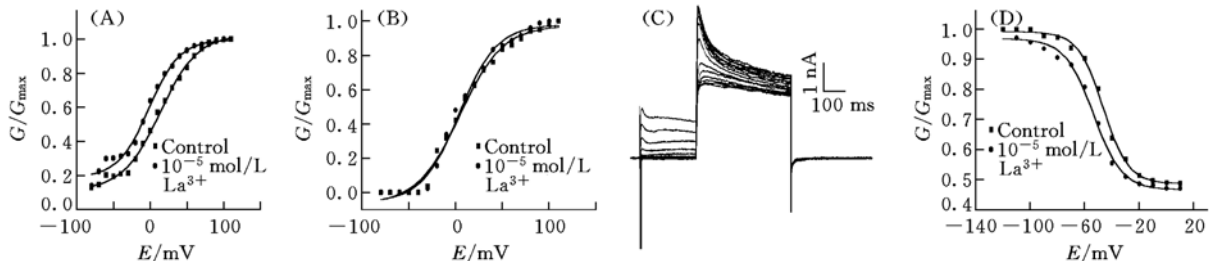


Fig. 3 Effects of $10^{-5} \text{ mol/L La}^{3+}$ on activation kinetics of I_A (A) and I_K (B), on the inactivation curve of I_A (C) and the inactivation kinetics of I_A (D)

2.4 讨 论

本文利用全细胞膜片钳技术研究了 La^{3+} 对大鼠海马神经元 I_A 和 I_K 电流的影响. 结果表明, La^{3+} 抑制 I_A , 且具有浓度依赖性和电压依赖性. $10^{-5} \text{ mol/L La}^{3+}$ 使 I_A 激活曲线和失活曲线左移, 说明 La^{3+} 可使 I_A 的激活和失活向超极化方向移动. 因为 I_A 是动作电位复极化早期外向电流的主要成分, 所以在动

作电位复极化早期氯化镧的作用是加速 I_A 的失活, 减小 I_A . 但 La^{3+} 对 I_K 没有影响. 膜去极化时, 会有快速激活的 I_A 电流和几乎不失活的 I_K 电流产生. 镧可以部分地阻断电压门控型外向钾通道, 使动作电位发放延长, 引起兴奋, 神经元表现为持续发放动作电位, 使神经元随电压改变而启闭的功能减弱, 从而引起海马神经细胞膜功能发生改变. 有人认为, 钾通道蛋白上存在特异的镧离子结合位点, 镧可能结合跨膜蛋白氨基酸残基, 在空间位置上关闭电压传感器来影响门控电荷, 使电压保持在静息状态, 从而导致非正常状态下的离子通道构象, 即影响钾离子外流^[12]. 据文献[13]报道, 离子要结合在作用位点上或从结合位点上脱离, 离子通道必须处于开放状态, 所以阻断作用未必是由阻断剂结合在离子通道深处而引起的. 相反, 阻断离子可能结合在通道口附近的表面位置或通道外面^[14]. 在正电位时, 后者可能有一个构象发生改变. 阻断和对阻断的恢复的双指数动力学表明, 对于抑制, 有两个不同的结合位点: 一个是快速平衡位点(低微摩尔), 一个是高亲和力, 平衡较慢, 而且可能仅仅部分地抑制^[15]. 总之, La^{3+} 可能结合在海马神经元钾通道口附近的结合位点上抑制钾电流, 使神经细胞乃至神经系统出现异常.

参 考 文 献

- [1] Landifield P. W., Pilter T. A. . Science[J], 1984, **226**: 1089—1095
- [2] LIU Qing-Fen(刘庆芬), ZHU Hong-Da(诸洪达). Chin. J. Radiol. Health(中国辐射卫生)[J], 2004, **13**(1): 13—15
- [3] Kozhemiaki M. B., Draguhn A., Skrebtsky V. G. . Brain Res. Bulletin[J], 2004, **64**: 97—101
- [4] Tytgat J., Daenens P. . Brain Res. [J], 1997, **749**: 232—237
- [5] JIANG Wen-Hua(姜文华), CHEN Dong(陈 东), MENG Xiao-Ting(孟晓婷) *et al.* . Journal of the Chinese Rare Earth Society(中国稀土学报)[J], 2004, **22**(2): 292—294
- [6] Nakagawa Y., Fujimoto N., Matsumoto K. *et al.* . Adv. Neurol. [J], 1990, **52**: 21—27
- [7] SONG Shu-Xin(宋书欣), DENG Zhi-Feng(邓志锋), WANG Yang(汪 泐) *et al.* . Acta Academiae Medicinae Jiangxi(江西医学院学报)[J], 2003, **43**(6): 41—44
- [8] Sang N., Meng Z. Q. . Brain Res. [J], 2002, **952**: 218—221
- [9] Hamill O. P., Marty A., Neher E. *et al.* . Pflügers. Arch. [J], 1981, **391**: 85—100
- [10] Zhang G. Q., Hao X. M., Zhou P. A. *et al.* . Acta Pharm. Sin. [J], 2001, **22**(3): 253—256
- [11] Storm J. F. . Nature[J], 1988, **336**(6197): 379—381
- [12] Chi X. X., Xu Z. C. . Neurophysiol. [J], 2000, **84**: 2834—2843
- [13] Huettner J. E., Bean B. P. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 1988, **85**: 1307—1311
- [14] Mayer M. L., Westbrook G. L. . J. Physiol. (London)[J], 1987, **394**: 501—527
- [15] Huettner J. E., Stack E., Wilding T. J. . Neuropharmacol. [J], 1998, **37**: 1239—1247

Effects of La^{3+} on Transient Outward K^+ and Delayed Rectifier K^+ Currents Kinetics in Hippocampal Neurons of Rat

DU Hui-Zhi, YANG Pin*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Using the whole cell patch-clamp technique, the effects of La^{3+} on transient outward K^+ and delayed rectifier K^+ currents kinetics were studied in acutely isolated rat hippocampal neurons. The results show that La^{3+} in the external solution inhibited I_A (K^+ current) in a concentration- and voltage-dependent manner. The La^{3+} concentration of 10^{-5} mol/L could significantly affect V_h of the activation curve and inactivation curve of I_A , respectively, but the k was not changed. La^{3+} in the external solution did not affect I_K (platform current) and the activation curve. These may contribute to abnormality of the central nervous system by La^{3+} .

Keywords Patch-clamp technique; Hippocampal neurons; La^{3+}

(Ed.: I, X)