DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.018

缺氧缺糖对大鼠大脑皮层神经元电压依赖性钾通道的影响

王中峰* 薛春生** 萧家思 (第三军医大学基础医学部生理学教研室) 重庆,400038

提 要 目的:研究在缺氧缺糖状态下,大鼠大脑皮层神经元膜电压依赖性钾通道的开关动力学变化。方法:急性分离大鼠大脑皮层神经元和细胞贴附膜片钳技术。结果:与对照组相比,在缺氧缺糖状态下,电压依赖性钾通道开放时间常数 τ_1和 τ_2分别由对照组的 0.429 ms和 8.209 ms增加至 1.855 ms和 17.464 ms ($P<0.01$),关闭时间常数 τ 和通道的电流幅度无明显变化。结论:缺氧缺糖可导致大鼠皮层神经元电压依赖性钾通道开放显著增加,对胞外钾离子聚集起重要作用,从而提高细胞的兴奋性,参与神经元的损伤。

关键词 缺氧;皮层神经元;膜片钳;钾;离子通道;大鼠
中图法分类号 R338.25

钾通道是维持细胞静息电位及细胞电活动所必需的一类离子通道。脑缺血时,在细胞内钙聚集的同时,发现胞外 K^+ 堆集,从而使胞内外钾离子的浓度梯度减小,细胞膜的静息电位降低,导致细胞兴奋性提高,细胞过度去极化[1,2]。钾通道的亚型较多,对缺血时该类通道的研究较少。本研究用缺氧缺糖来模拟缺血,用膜片钳技术研究缺氧缺糖对大鼠大脑皮层神经元电压依赖性钾通道开关动力学的影响。

1 材料与方法

1.1 药品

胰蛋白酶(Sigma);多聚赖氨酸(Sigma);四乙胺(Sigma);N-trimethylsilyldiethylamine(Sigma)

1.2 大鼠皮层神经元分离

按文献[3,4]的方法分离 Wistar大鼠大脑皮层神经元。

1.3 单个脑细胞缺氧缺糖模型的建立

以 95% N_2+ 5% CO_2混合气饱和无糖浴液,通气时间大于 1 h 血气分析(美国 IL-1620血气分析仪)结果表明:正常浴液经混合氧气饱和后氧分压为 105.2 kPa,无糖浴液在通混合氮气 1 h后其氧分压为 9.16 kPa。细胞分离后,加入此液体 20 min后开始实验记录。

1.4 通道电活动记录

采用细胞贴附式膜片钳技术记录通道电活动[4],采样频率 10 kHz,放大器低频滤波 1 kHz,用 pClamp软件的 Fetchex进行不间断记录,细胞钳制电位 - 80 mV。细胞浴液成分为(mmol/L): NaCl 140, KCl 10.8, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1, HEPES 5, 葡萄糖 10, NaOH调制 pH到 7.4;无糖浴液除不含葡萄糖外,其余同正常浴液;电极液成分为(mmol/L): KCl 120, EGTA 10, HEPES 10, KOH调制 pH到 7.4;电极电阻 2~4 MΩ。

对照组细胞加入正常浴液,缺氧缺糖组细胞加入经混合氮气饱和的无糖浴液,每组细胞记录 10个膜片。

1.5 结果分析处理

用 pClamp软件的 Fetchan程序对曲线理想化,忽略水平 0.01 ms,滤波 1 kHz用 pStat程序对通道的开放时间、关闭时间进行指数拟合,并求出通道的开放概率。用 t 检验进行统计学处理,实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 实验结果

2.1 正常钾通道的记录

I-V曲线:从 - 80 mV的钳制电位开始,以 20 mV为单位,使细胞逐步去极化到+ 80 mV,记录到的通道电活动如图 1所示,以此作出通道电活动的 I-V 曲线。从 I-V 曲线看,此通道有明显的电压依赖性,在负的钳制电位时,通道为外向电流,电流幅度随膜的超极化而增加;在正的钳制电位时,通道的电流方向发生翻转,变为内向电流,其翻转电位约为 0 mV。在浴液中加入 20μmol/L的四乙胺后,该通道被明显抑制,部分细胞记录时,在电极液中加入 ATP,通道电活动无明显改变。

在 - 80 mV的钳制电位下,该通道的开放有两个状态,其时间常数 τ_1和 τ_2分别为 0.429 ms和 8.209 ms,只有一个关闭状态,其时间常数 τ 为 24.427 ms,通道开放的电流幅度为 4.69± 0.29 pA,开放概率为 0.114± 0.065,见图 2。

2.2 缺氧缺糖对钾通道的影响

缺氧缺糖组细胞,钾通道的开放时间显著增加,其开放的时间常数 τ_1和 τ_2分别为 1.855± 0.033 ms和 17.464± 0.734 ms,与对照组相比差异均显著($P<0.01$),通道的关闭时间为 23.63± 13.035 ms,与对照组相比差异不显著,说明缺血对钾通道的关闭状态无影响。通道的开放概率明显增加,达到 0.151± 0.019,与对照组差异显著($P<0.01$),通道的电流幅度变化不明显,见图 2。

* 王中峰,男,33岁,讲师,博士
** 重庆医科大学药理学教研室 重庆,400042

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

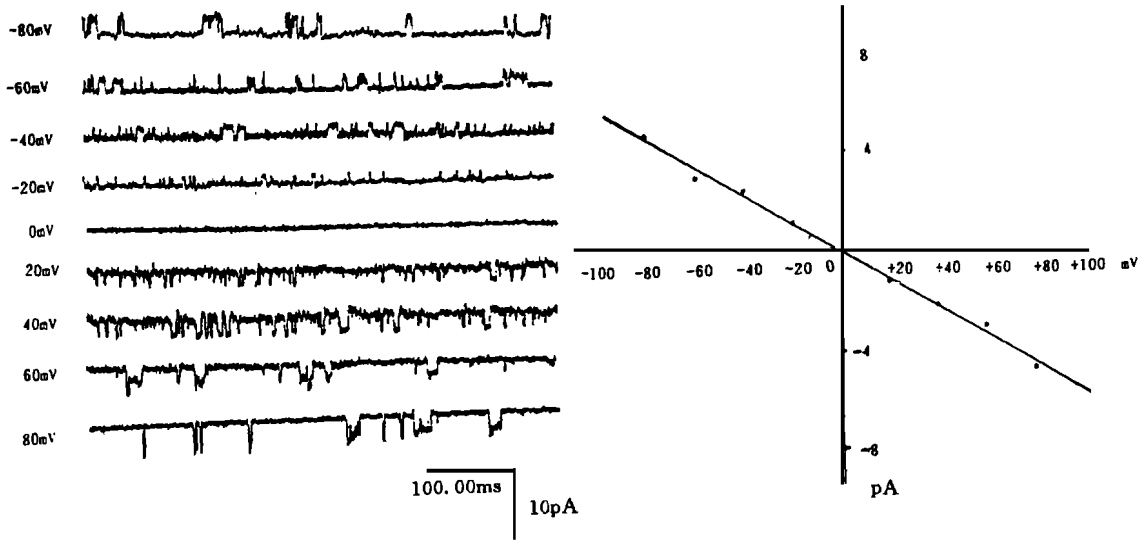


图 1 大鼠大脑皮层神经元电压依赖性钾通道的 I-V曲线

图左侧标志表示细胞的钳制电位,在负的钳制电位下,为外向电流,在正的钳制电位下,为内向电流,翻转电位约为 0 mV. 左图为单通道电流记录,右图为其 I-V 曲线。

Fig 1 I-V curve of voltage-dependent potassium channels in rat cerebral cortical neurons

Holding potential was indicated in the left. At negative holding potential, currents were outward, and at positive holding potontial, currents were inward. The turnover potential was about 0 mV. Left: single channel current recording. Right: I-V curve

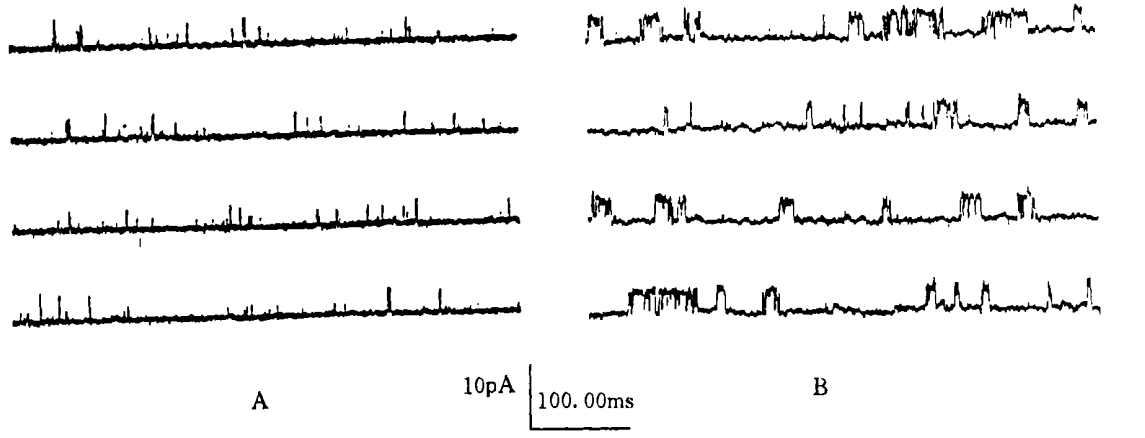


图 2 缺氧缺糖对大鼠大脑皮层神经元电压依赖性钾通道的影响

钳制电位 - 80 mV A: 对照组; B 缺氧缺糖组

Fig 2 Effects of anoxia and lacking glucose on voltage-dependent potassium channels in rat cerebral cortical neurons

Holding potential - 80 mV A: Control group; B: Anoxia and lacking glucose groups

3 讨论

钾通道是一类分布较广,亚型较多的离子通道,在可兴奋细胞它参与了细胞静息电位的维持和动作电位的形成,其亚型至少包括: 电压依赖性钾通道、ATP敏感钾通道、钙激活钾通道等[5~9]。本实验选择电压依赖性钾通道进行研究,所用细胞浴液为稍作修正的 Tyrode液,使细胞处于一种生理状态,电极液用高钾溶液,使封接的膜片膜电位为零,便于进行电位钳制。在电极液中加入 ATP,通道电活动无明显改变,排除了 ATP敏感通道,从 I-V 关系曲线看,实验记录到的离

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

子通道有明显的电压依赖性,在膜去极化时,电流幅度渐减少,钳制电位为正电位时,电流方向发生翻转,变为内向电流,其翻转电位约为 0 mV,在浴液中加入 20 μmol/L的四乙胺可完全阻断该通道,因此本实验记录到的离子通道电活动是典型的电压依赖性钾通道[5]。

Xie等[10]研究证明,缺氧导致细胞去极化,影响细胞内外的离子平衡,从而造成细胞的损伤,在此过程中,ATP-敏感钾通道的开放所致的钾外流增多发挥有一定作用。本实验结果发现,在缺氧缺糖状态下,电压依赖性钾通道开放时间明显延长,且以爆发开放为主,开放时间需双指数拟合,其时间常数 τ_1和 τ_2与对照组相比均明显延长,开放概率增大,表明缺氧缺糖使大鼠大脑皮层神经元膜电压依赖性钾通道开放增加,K^+ 外流增多,参与胞外钾聚集,结果胞内外的钾离子浓度梯度降低,细胞膜静息电位降低,细胞易去极化,兴奋性提高,和其它因素一起使细胞过度兴奋,从而产生细胞损伤。是否有其它类型的钾通道参与缺氧缺糖细胞膜外钾离子的聚集还有待进一步的研究。

参考文献

1 Katsura K, Ekholm A, Siesijo B K. Coupling among changes in energy metabolism, acidbase homestasis, and ion fluxes in ischemia. Can Physiol Pharmacol, 1992; 70(suppl): S170

2 Martins E, Inamura K, Themner K *et al*. Accumulation of calcium and loss of potassium in the hippocampus following transient cerebral ischemia: a proton microprobe study. J Cereb Blood Flow Metab, 1988; 8(4): 531

3 唐向东,佟振清,杨文俊.一种改进的适用于膜片钳记录的急性神经元分离方法.生理学通报(广东),1994; 11(1): 60

4 王中峰,薛春生,萧家思等.大鼠皮层神经元膜片钳单通道记录模型.第三军医大学学报,1997; 19(3); 271

5 Sugaya E, Sugaya A, Takagi T *et al*. Pentylenetetrazol-induced changes of the single potassium channel in primary cultured cerebral cortical neurons. Brain Res, 1989; 497(2): 239

6 Kohler M, Hirschberg B, Bond C T *et al*. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. Science, 1996; 273(5282): 1709

7 Kubo Y, Miyashita T, Kubokawa K. A weakly inward rectifying potassium channel of the salmon brain. J Biol Chem, 1996; 271(26): 15729

8 Simard J M, Song Y, Tewari K *et al*. Ionic channel currents in cultured neurons from human cortex. J Neurosci Res, 1993; 34(2): 170

9 Ohno-Shosaku T, Yamamoto C. Identification of an ATP-sensitive K^+ channel in rat cultured cortical neurons. Pflugers Arch, 1992; 422(3): 260

10 Xie Y X, Zacharias E, Hoff P *et al*. Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. J Cereb Blood Flow Metab, 1995; 15(4): 587

(收稿: 1997-06-25;修回: 1997-12-05)

(编辑　仇玉福)

Effects of anoxia and deficiency of glucose on potassium channel in cerebral cortical neurons in rats

Wang Zhongfeng, Xue Chunsheng, Xiao Jiasi (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To explore the effects of anoxia and deficiency of glucose on potassium channel in cortical neurons in rats. **Methods**: The rat cortical neurons were acutely isolated and the single channel recording of patch clamp was conducted. **Results**: Under the condition of anoxia and deficiency of glucose, the opening time constants τ_1 and τ_2 of potassium channel in the experimental group were increased from 0.429 ms and 8.209 ms to 1.855 ms and 17.464 ms respectively ($P < 0.01$) but no changes of closing time constant and current amplitude were found in it as compared with the control. **Conclusion**: The prolonged opening of potassium channel under the condition of anoxia and deficiency of glucose might result in extracellular K^+ assembling to enhance the excitability of the neurons, which plays an important role in cerebral injury.

Key words anoxia; cortical neuron; patch clamp; potassium; ion channel; rat

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