

弱激光对神经元钾离子通道特性影响的实验研究

乔晓艳^{1,2)} 李 刚¹⁾ 林 凌¹⁾ 贺秉军³⁾

1) 天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072)

2) 山西大学物理电子工程学院, 太原 030006)

3) 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

(2006 年 5 月 14 日收到 2006 年 12 月 15 日收到修改稿)

利用波长为 670 nm、功率为 5 mW 的半导体激光器照射急性分离的大鼠海马 CA3 区锥体神经元, 应用全细胞膜片钳技术研究其瞬时外向钾离子通道特性. 实验发现: 弱激光对瞬时外向钾电流具有抑制作用, 并且该抑制作用呈现电压依赖性和可逆性. 激光作用可显著影响通道稳态激活和失活过程. 激光照射组 and 对照组比较, 电流稳态激活曲线向去极化方向移动, 半数激活电压升高, 曲线斜率因子改变; 而失活曲线向超极化方向移动, 半数失活电压降低, 曲线斜率因子不变. 结果表明, 弱激光作用海马神经细胞可以改变其瞬时外向钾离子通道特性, 从而影响动作电位的形成和发放, 调节神经元生理功能, 有利于受损神经元的恢复和再生.

关键词: 瞬时外向钾离子电流, 膜片钳技术, 弱激光照射, 神经元

PACC: 8720, 8750E, 8760F

1. 引 言

随着激光技术的发展, 激光在生物医学领域的应用范围不断扩大, 其中弱激光生物刺激效应的临床应用越来越广泛^[1]. 所谓弱激光生物刺激效应是指低强度激光作用于生物体后, 不引起生物组织的不可逆损伤, 而是产生某种与超声波、针灸等物理因子所获得的生物刺激相类似的效应, 引起一系列的生理生化改变, 从而调节机体功能^[2]. 基础研究和大量临床应用表明, 弱激光对生物组织有多方面的刺激作用, 能促进免疫反应, 增强巨噬细胞吞噬功能, 改善全身状况^[1,3], 能对神经电生理活动和神经损伤后恢复及再生过程发生影响^[4,5]. 使用氦氖激光穴位照射可促进脑神经元恢复, 促进脑电活动和神经递质的分泌, 调节神经系统的兴奋和抑制过程, 激活处于抑制状态的脑细胞, 加速受损脑组织康复^[6]. 动物实验证实, 弱激光照射能促进坐骨神经再生, 刺激中枢和外周神经系统, 引起神经传导波形的变化^[7]. 实验还表明, 弱激光可促进各种酶活性增强, 改善系统血流变状态, 进而激发总的代谢方面的变化^[8,9]. 目前临床应用的弱激光治疗仪主要有氦氖激光器和半导体激光器, 波长范围多在可见和近红外区范围内, 输出功率一般在 1—60 mW^[10]. 虽然弱

激光的临床应用已经很多, 但其作用机制尚不清楚^[11], 这给进一步的临床应用和防护带来了困难. 另一方面, 深入到细胞分子水平的研究很少, 这也是制约其发展的一个因素. 此外, 现已发现许多脑部疾病与钾离子通道及神经元放电特性改变有关^[12], 研究弱激光对中枢神经细胞膜钾离子通道特性的影响, 可为激光探针直接作用于脑组织治疗某些脑部疾患起指导作用. 鉴于电压门控钾离子通道在调节神经细胞膜兴奋性及神经可塑性中起着关键作用, 本文利用膜片钳实验技术, 研究弱激光对大鼠海马神经细胞膜瞬时外向钾通道特性的影响, 为从细胞分子水平上探索弱激光生物刺激效应开辟一条新的道路.

2. 材料与方法

2.1. 材 料

实验动物为 Wistar 大鼠, 鼠龄 10—14 d, 雌雄不限, 由天津药物研究院实验动物中心提供. 实验试剂有 Merck 公司生产的链霉蛋白酶 (pronase), Sigma 公司生产的河豚毒素 (TTX), 氯化镉、氯化四乙胺 (TEA-Cl), 4-氨基吡啶 (4-AP), N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES), 乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸

(EGTA), Na_2ATP . 其余试剂均为国产分析纯.

(1) 孵育液(ACSF, 成分单位为 mmol/L): NaCl 134, KCl 5, NaH_2PO_4 1.5, MgSO_4 2, CaCl_2 2, NaHCO_3 25, 葡萄糖 10, HEPES 10, pH 7.4.

(2) 钾离子通道标准细胞外液(成分单位为 mmol/L): NaCl 130, KCl 5.4, CaCl_2 2, MgCl_2 1, 葡萄糖 10, HEPES 10, pH 7.3. 使用前经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤并通氧气饱和.

(3) 钾离子通道电极内液(成分单位为 mmol/L): KCl 120, CaCl_2 1, HEPES 10, EGTA 10, Na_2ATP 3, MgCl_2 2, pH 7.2, 使用前经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤.

2.2. 大鼠海马 CA3 区锥体神经元急性分离

大鼠断头取脑, 置于 $0\sim 4\ ^\circ\text{C}$ 孵育液中迅速取出海马组织, 分离出 CA3 区, 手工切成 $400\sim 500\ \mu\text{m}$ 厚的脑片, 移入连续通 $95\%\text{O}_2 + 5\%\text{CO}_2$ 混合气体的孵育液中, 孵育 50 min. 之后加入链霉蛋白酶, 其终浓度为 $0.5\ \text{g/L}$, $32\ ^\circ\text{C}$ 下消化 20 min. 消化结束用孵育液洗脑片 3 次, 加入盛有标准细胞外液的离心管中, 用不同口径的 Pasteur 吸管轻轻吹打, 制成细胞悬液, 静置 5 min 后取上部细胞悬液, 放入带有盖玻片的培养皿内, 约 15—20 min 后细胞贴壁. 显微镜下观察分离完整的海马神经细胞, 形态呈锥体或椭圆形, 顶树突和轴突完整, 细胞表面光滑, 颗粒均匀细腻, 可在 4—6 h 内保持良好的生理状态^[13].

2.3. 全细胞膜片钳记录和数据分

在 $22\sim 25\ ^\circ\text{C}$ 室温下, 利用德国 HEKA 公司生产的 EPC-10 型膜片钳放大器进行全细胞膜片钳记录, 实验参数设置、数据采集和刺激方式施加均通过软件来控制, 采样频率为 20 kHz. 记录用玻璃微电极由中国科学院电子学研究所生产, 经 PP-830 型电极拉制仪两步拉制而成, 充灌电极内液后, 电极阻抗为 $2\sim 4\ \text{M}\Omega$. 当电极与细胞膜之间形成高阻(大于 $1\ \text{G}\Omega$)封接后, 立即进行快电容补偿, 然后稍加负压破膜, 使电极液与细胞内液相通, 再进行慢电容和串联电阻补偿. 串联电阻补偿为 80%.

实验所用半导体激光器波长为 670 nm, 输出功率为 5 mW, 光斑直径为 3 mm, 功率密度为 $70.8\ \text{mW}/\text{cm}^2$, 激光照射距离为 15 cm, 照射角度为 75° , 光束从侧面入射. 照射装置自行改制而成, 如图 1 所示. 实验过程中能够在倒置显微镜下观察到激光器

发射出的红光照射于目标细胞上.

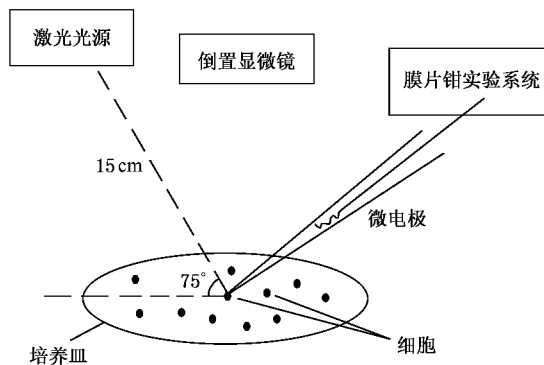


图 1 激光照射装置示意图

实验结果分析采用 Igor4.04 软件和 Origin6.0 统计软件完成, 数据经 M/N 漏减处理后(M 表示步阶脉冲数, N 表示漏减脉冲数)进行统计分析, 分析结果用平均值标准差来表示, 激光照射前后差异的显著性用单因方差分析和 t 检验进行统计分析.

3. 实验结果

3.1. 瞬时外向钾离子通道电流 I_A 的记录

采用上述标准细胞外液和电极内液, 且在外液中加入 $1\ \mu\text{mol/L}$ 的 TTX 和 $0.1\ \text{mmol/L}$ 的 CdCl_2 , 记录海马 CA3 区锥体神经细胞膜上外向钾电流. 置钳制电位于 $-80\ \text{mV}$, 给予脉冲幅度为 $-60\sim +50\ \text{mV}$ 、脉冲宽度为 160 ms、步幅为 $+10\ \text{mV}$ 的去极化脉冲电压刺激, 刺激频率为 0.5 Hz, 记录得到一组外向电流, 如图 2(a)(b)所示. 该激活的外向电流包括两种成分, 即快速激活和失活的瞬时外向钾离子电流 I_A (峰值部分)和缓慢激活且几乎不失活的延迟整流钾离子电流 I_K (平台部分). 向外液中加入 20 mmol/L 的 TEA-Cl 后, 仅得到瞬时外向钾离子电流 I_A , 如图 2(c)所示. 用 2 mmol/L 的 4-AP 可绝大部分阻断之, 如图 2(d)所示, 证实所记录到的外向电流为瞬时外向钾离子电流. 由于电流 I_A 具有激活和失活迅速的特点, 在以下实验中, 刺激脉冲宽度选择 60 ms 的刺激时程.

3.2. 激光照射对 I_A 时间依赖性影响

首先, 需考察正常海马神经细胞瞬时外向钾离

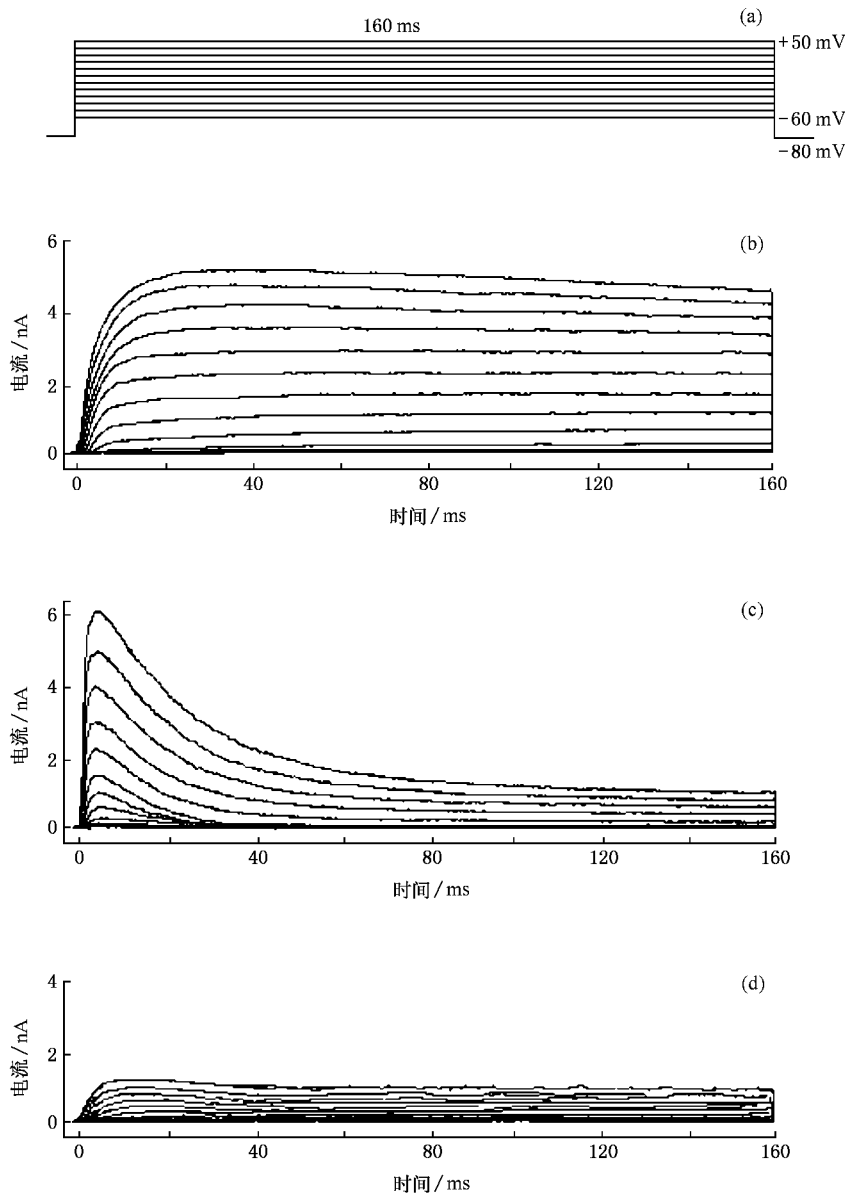


图2 记录得到的外向钾离子通道电流 (a)刺激脉冲信号,(b)记录得到的电流 I_A 和 I_K ,(c)20 mmol/L的TEA-Cl基本阻断了 I_K 之后的 I_A ,(d)2 mmol/L的4-AP阻断了 I_A 之后剩余的 I_K

子电流 I_A 何时达到稳定,激光照射应在通道电流稳定的时间区段开始施加.给予脉冲幅度为+50 mV,脉冲宽度为60 ms的去极化刺激,分别在2,4,6,8,10 min记录不同时间的 I_A ,可知 I_A 在4 min基本达到稳定,激光照射应从该时刻开始施加.其次,考察激光照射细胞后, I_A 达到稳定的时间区段,通道特性应选择该时间区段的电流进行统计分析.图3为给予不同阶梯去极化脉冲刺激,激光作用3,5,10 min时 I_A 的电流-电压($I-V$)关系曲线.由实验结果可知,激光作用3 min时, I_A 有明显下降,去极化至

+50 mV时,电流抑制比为 $(23.88 \pm 6.02)\%$.激光作用5 min时,抑制作用达到平衡,抑制比为 $(40.13 \pm 5.19)\%$.激光作用10 min时,电流抑制百分比与激光作用5 min时无显著差异.

3.3. 激光照射对瞬时外向钾离子电流 $I-V$ 曲线的影响

给予以上相同的刺激方式,激活并记录 I_A 作为对照组.然后打开激光器,以上述方式照射海马锥体神经细胞,待激光作用稳定后,以相同去极化刺激脉冲激活并记录 I_A 作为激光照射组.关闭激光器停止

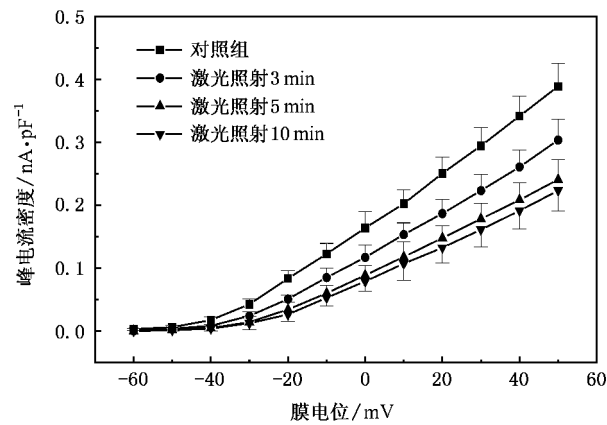


图3 激光照射对 I_A 的时间依赖性影响

照射细胞恢复 3 min 后,再次以同样方式激活并记录 I_A 作为恢复组,记录得到的电流 I_A 变化曲线如图 4 所示.以不同膜电位(去极化刺激电位)为横轴,该膜电位下激活的峰电流密度值(由于膜电容与细胞膜表面积成正比,故用电流峰值与膜电容之比表示峰电流密度)为纵轴,绘制通道电流的 $I-V$ 曲线如图 5 所示.由 $I-V$ 曲线可知,激光照射可以明显抑制 I_A ,且抑制作用随着膜电位的增加而增大,即呈现出电压依赖特性.对照组、照射组和恢复组的最大激活电流密度分别为 (398.55 ± 36.49) 、 (238.62 ± 30.78) 和 (354.08 ± 35.16) pA/pF.经 t 检验,对照组和激光照射组 I_A 在统计学上有显著性差异 ($n = 10, P < 0.01$, n 表示统计样本数, P 表示假设检验概率),对照组与恢复组 I_A 无统计学差异 ($n = 10, P > 0.05$).由此可知,激光作用可抑制瞬时外向钾离子通道电流 I_A ,而且这种抑制作用具有电压依赖性并呈现出可逆性.

3.4. 激光照射对 I_A 稳态激活特性的影响

给予以上相同的刺激方式,引出一系列瞬时外向钾离子电流作为对照.以上述方法激光照射细胞,照射时间为 5 min,再次记录上述电流,然后利用下式将电流值转换成电导值:

$$G = \frac{I}{V - V_{rev}},$$

其中 G 为电导, V 为测试膜电位, V_{rev} 为翻转电位, I 为不同膜电位下测定的电流峰值.以电导值与最大电导值之比 G/G_{max} 对应膜电位分别绘制激光作用前后 I_A 的稳态激活曲线(图 6).所得曲线可以用下列 Boltzmann 方程拟合:

$$G/G_{max} = \left(\frac{1 + \exp(V - V_{1/2})}{k} \right)^{-1},$$

其中 $V_{1/2}$ 为半数激活电压, k 为曲线斜率因子.由图 6 可以看出,对照组与激光照射组激活曲线均呈 S 形,并由此计算出对照组和激光照射组瞬时外向钾通道的半数激活电压 $V_{1/2}$ 分别为 (-27.05 ± 4.53) 和 (-2.10 ± 3.14) mV ($n = 10, P < 0.01$),斜率因子分别为 (-26.71 ± 6.15) 和 (-20.70 ± 4.38) mV ($n = 10, P < 0.05$).由此可知,激光作用可明显改变 I_A 的稳态激活特性,使激活曲线向去极化方向移动,并改变其斜率因子.

3.5. 激光照射对 I_A 稳态失活特性的影响

置钳制电位为 -80 mV,先给予 -120 — -10 mV,步幅 $+10$ mV,刺激脉冲宽度 80 ms 的阶梯钳制预脉冲刺激,然后再给予 $+50$ mV 的测试脉冲刺激,脉冲宽度为 100 ms,刺激频率为 0.5 Hz,记录得到电流作为对照.然后激光照射细胞,照射时间为 5 min,再次记录上述电流,如图 7 所示.以电流峰值与最大电流峰值之比 I/I_{max} 对应预脉冲刺激电位,分别绘制激光作用前后 I_A 的稳态失活曲线,如图 8 所示.所得曲线可以用下列 Boltzmann 方程拟合:

$$\frac{I}{I_{max}} = \left(\frac{1 + \exp(V - V_{1/2})}{k} \right)^{-1},$$

其中 I 为电流峰值, V 为膜电位, $V_{1/2}$ 为半数失活电压, k 为曲线斜率因子.由图 8 可知,对照组与激光照射组失活曲线均呈反 S 形,并由此计算出对照组和激光照射组瞬时外向钾离子通道的半数失活电压 $V_{1/2}$ 分别为 (-70.49 ± 7.21) 和 (-81.27 ± 6.26) mV ($n = 10, P < 0.01$),斜率因子分别为 (9.47 ± 3.54) 和 (9.58 ± 3.02) mV ($n = 10, P > 0.05$).由此可知,激光作用可明显改变 I_A 的失活特性,使失活曲线向超极化方向移动,但不改变其斜率因子.

4. 讨 论

电压门控离子通道是神经元电活动的分子基础,它参与初级生物信息传导,并在神经动作电位的产生、突触传递和其他重要的生理功能中起着重要作用.电压门控钠离子通道决定了动作电位的产生,钙离子通道是再生电位产生的基础,而钾离子通道在调节神经细胞膜兴奋性、神经可塑性及在神经元的信号调控过程中起主要作用,同时也是某些神经

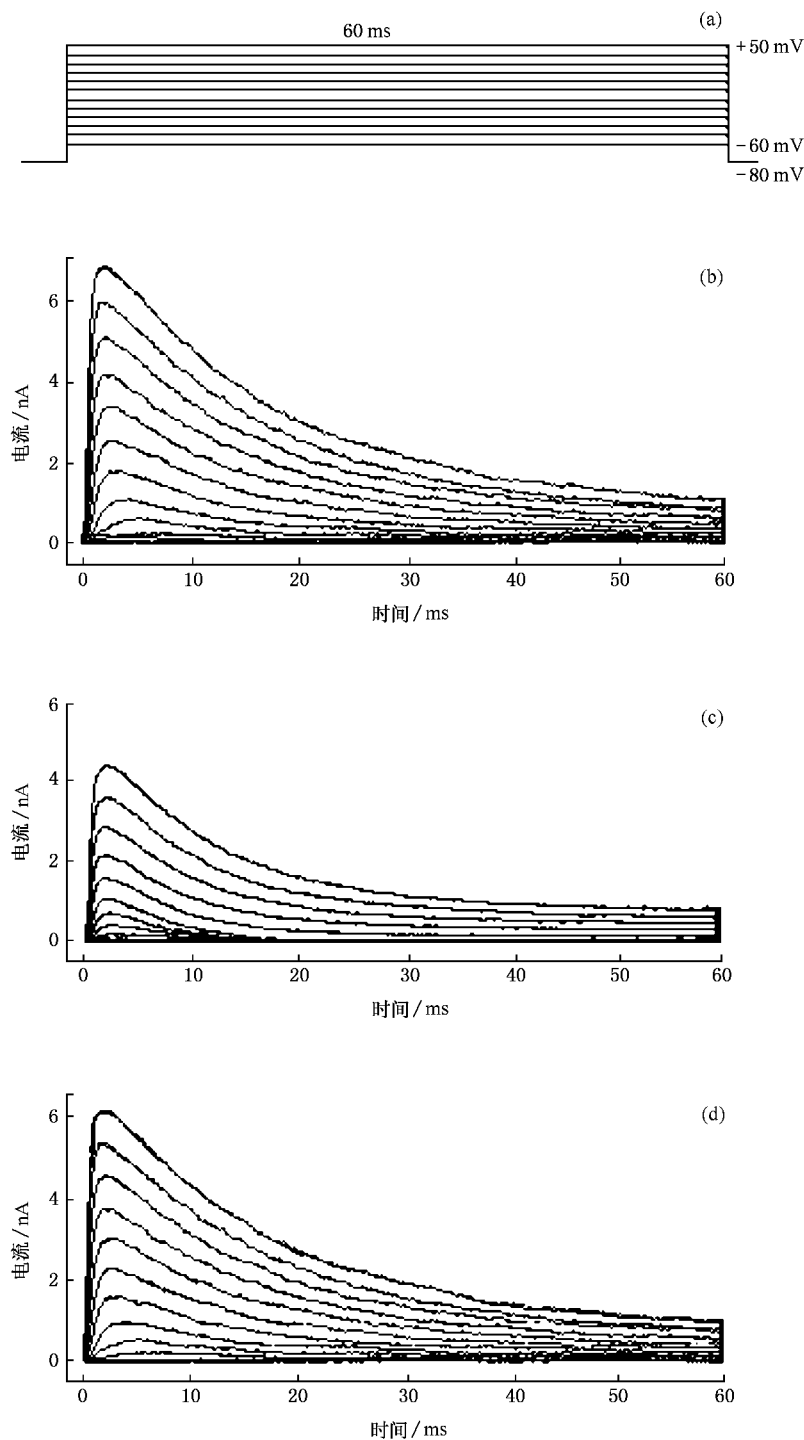


图4 记录得到的 I_A 变化曲线 (a)刺激脉冲,(b)对照组,(c)激光作用 5 min,(d)恢复组

毒素和药物作用的靶点.通过抑制瞬时外向钾通道激活,使细胞内钾离子外流减少,对受损神经元起保护作用^[14].瞬时外向钾离子电流 I_A 是动作电位复极化早期外向电流的主要成分,主要调节静息膜电位,减慢去极化的速度,决定动作电位产生的频率.

弱激光作用改变大鼠海马神经元瞬时外向钾离子通道的稳态激活和失活动力学特征,从而会影响神经元动作电位的形成和发放,最终调节神经元的生理功能.

弱激光的生物刺激作用机制和作用靶点目前尚

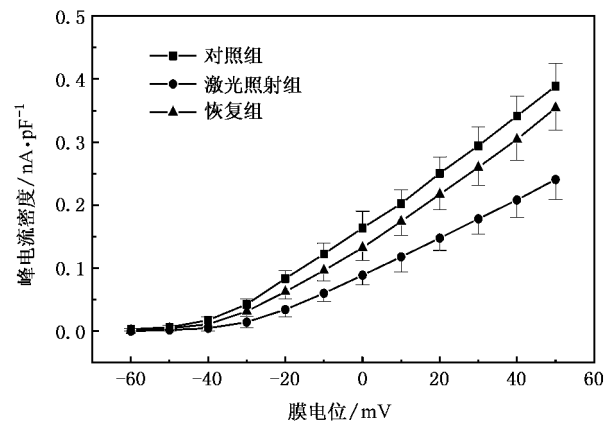


图5 对照组、激光照射组和恢复组瞬时外向钾离子电流的 $I-V$ 曲线

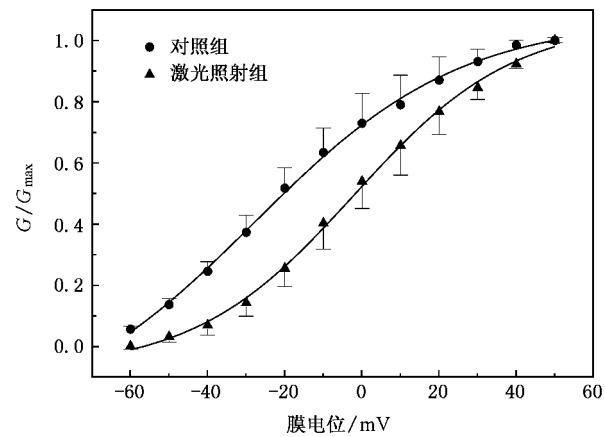


图6 对照组和激光照射组瞬时外向钾离子电流稳态激活曲线

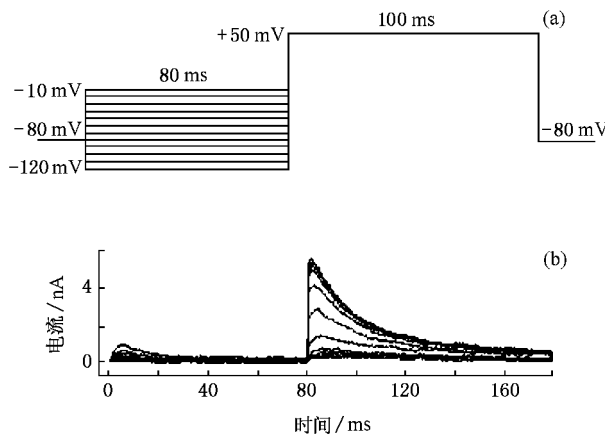


图7 I_A 失活的刺激波形和记录的电流曲线 (a)刺激脉冲, (b)失活电流曲线

不明确,仅限于一些假设.本实验从细胞膜电压门控钾离子通道角度研究弱激光的生物刺激作用,电压

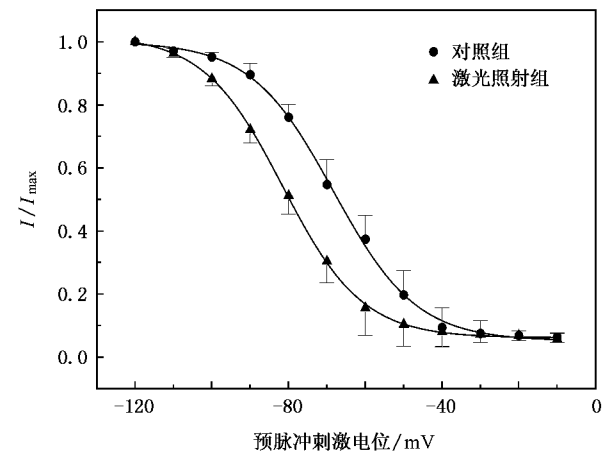


图8 对照组和激光照射组瞬时外向钾离子电流稳态失活曲线

门控钾离子通道由 α 亚基和 β 亚基组成,一个 α 亚基包含六个 α 螺旋的跨膜片段(S_1-S_6),其中 S_4 片段是电压敏感区,含有较多的正电荷氨基酸,电压感受器 S_4 片段的变化对通道功能有很大影响, S_4 片段氨基酸残基点突变或化学修饰会影响到通道的激活^[15].此外,通道电压依赖性激活和失活需要在磷脂双层膜电场内有带电荷的氨基酸或强的双极离子,这些闸门电荷的运动或电压感受器在电场力作用下的运动引起通道蛋白构形的改变而导致通道激活和失活.由于弱激光光子能量与生物电场的能量相近^[16,17],激光照射引起生物体对这种激光光子能量的吸收,改变生物电场的分布,从而导致细胞膜离子通道构象发生改变.

5. 结 论

实验结果表明,波长为 670 nm、功率为 5 mW 的弱激光照射,使大鼠海马神经细胞膜瞬时外向钾离子通道电流 I_A 受到抑制,且这种抑制作用呈现时间依赖性、电压依赖性和可逆性.结果还表明,弱激光作用可使 I_A 稳态激活曲线显著地右移,并改变曲线的斜率因子.稳态失活曲线显著左移,且不改变其斜率因子.这说明弱激光作用海马神经元,引起神经细胞膜瞬时外向钾离子通道 I_A 的激活过程受到抑制,使得动作电位复极化早期电压依赖性钾离子通道开放延迟且关闭加快.由此可见,弱激光作用是通过抑制 I_A 的激活过程并促进其失活过程而减小大鼠海马神经元瞬时外向钾离子电流,使得钾离子外流减

少,维持神经元细胞内正常的钾离子浓度, Ca^{2+} 水平以及 Na^{+} -ATP(三磷酸腺苷)酶、 K^{+} -ATP和 Ca^{2+} -ATP酶的活性,调节神经系统功能,有利于受损神经元恢复.这一结果为临床上使用弱激光照射治疗神经

系统损伤提供了有力的试验依据.同时,本实验结果也提示弱激光生物刺激作用与细胞膜离子通道特性及通道构象改变有关,但仍需进一步从分子生物学及细胞信号转导方面进行分子层面的理论和实验验证.

-
- [1] Basford J R 1995 *Lasers Surg. Med.* **16** 331
- [2] Mester E, Mester A F, Mester A 1985 *Lasers Surg. Med.* **5** 31
- [3] Karu T I, Kalendo G S 1989 *Lasers Surg. Med.* **9** 585
- [4] Anders J J, Geuna S, Rochkind S 2004 *Neurol. Res.* **26** 233
- [5] Gigo-Benato D, Geuna S, Rodrigues A C *et al* 2004 *Lasers Med. Sci.* **19** 57
- [6] Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G 1995 *J. Photochem. Photobiol. B* **27** 219
- [7] Rochkind S, Rousso M, Nissan M 1989 *Lasers Surg. Med.* **9** 174
- [8] Mi X Q, Cen Y, Zhou Z Y *et al* 2004 *Chin. J. Lasers* **31** 888 (in Chinese) [宓现强、岑 剌、周正谊等 2004 中国激光 **31** 888]
- [9] Lan X F, Liu X R, Wang Y W *et al* 2000 *Chin. J. Lasers* **27** 477 (in Chinese) [兰秀凤、刘晓然、王亚伟等 2000 中国激光 **27** 477]
- [10] Siposan D G, Lukacs A 2001 *J. Clin. Laser Med. Surg.* **19** 89
- [11] Karu T 1999 *J. Photochem. Photobiol. B* **49** 1
- [12] Yang Z Q, Lu Q S 2006 *Chin. Phys.* **15** 518
- [13] Zou B D, Ouyang K F, Chen Y Z 2001 *Brain Res.* **897** 52
- [14] Chi X X, Xu Z C 2000 *J. Neurophysiol.* **84** 2834
- [15] Auld V J, Goldin A L, Krafte D S 1990 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87** 323
- [16] Karu T, Tiphlova O, Esenaliev R *et al* 1994 *J. Photochem. Photobiol. B* **24** 155
- [17] Liu Y Y, Dou S X, Wang P Y *et al* 2005 *Acta Phys. Sin.* **54** 622 (in Chinese) [刘玉颖、窦硕星、王鹏业等 2005 物理学报 **54** 622]

Research on characteristics of neuron potassium channel under low level laser irradiation

Qiao Xiao-Yan^{1,2)} Li Gang¹⁾ Lin Ling¹⁾ He Bing-Jun³⁾

1) *College of Precision Instruments and Optoelectronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China*

2) *College of Physics and Electronics Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*

3) *College of Life Science and Technology, Nankai University, Tianjin 300071, China*

(Received 14 May 2006 ; revised manuscript received 15 December 2006)

Abstract

Acutely isolated rat hippocampal CA3 pyramidal neurons were irradiated with a semiconductor laser of wavelength 670 nm and power 5 mW. The properties of transient outward potassium (K^+) channel were investigated using the whole-cell patch clamp technique. The experiment revealed that low level laser reduced the amplitudes of I_A in a voltage-dependent and reversible manner. The steady-state activation and inactivation processes of I_A were significantly affected by laser irradiation. And the steady-state activation curve shifted towards positive potential direction, altering the slope factor of curve and increasing the half-activation voltage. However, the steady-state inactivation curve shifted towards negative potential direction, reducing the half-inactivation voltage without changing the slope factor. The results show that low level laser irradiation could change the characteristics of transient outward K^+ channel. Accordingly, the firing of action potential and the physiological function of neurons were adjusted as a result of low level laser irradiation, which might contribute to the recovery and regeneration of injured neurons.

Keywords : transient outward potassium current, patch clamp technique, low level laser irradiation, neurons

PACC : 8720, 8750E, 8760F