

# 弱激光诱导神经元兴奋性改变的实验研究\*

乔晓艳<sup>1)†</sup> 李 刚<sup>2)</sup> 董有尔<sup>1)</sup> 贺秉军<sup>3)</sup>

1) 山西大学物理电子工程学院, 太原 030006)

2) 天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072)

3) 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

(2006 年 12 月 20 日收到, 2007 年 5 月 2 日收到修改稿)

利用全细胞膜片钳技术研究弱激光诱导下大鼠海马 CA3 区锥体神经元兴奋性. 实验结果显示: 弱激光作用使神经元钠通道激活电位向超极化方向移动, 钠电流幅度增大, 且这种增大作用具有电压依赖性和可逆性. 激光作用显著影响钠电流稳态激活与失活特性, 对照组和照射组通道半数激活电压分别为  $(-44.14 \pm 5.28) \text{ mV}$  和  $(-56.55 \pm 6.14) \text{ mV}$  ( $n=8, P < 0.01$ ), 半数失活电压分别为  $(-69.02 \pm 10.31) \text{ mV}$  和  $(-56.60 \pm 8.97) \text{ mV}$  ( $n=8, P < 0.01$ ). 弱激光照射降低了神经元静息膜电位和动作电位阈值, 使动作电位幅度增大, 复极化动作电位时程  $\text{APD}_{90}$  增加, 发放频率减慢, 且这种作用具有可逆性. 结果表明弱激光可诱导神经元钠通道特性改变, 影响动作电位去极化及发放, 从而引起神经元兴奋性发生变化.

关键词: 钠离子通道, 膜片钳技术, 弱激光, 动作电位, 神经元

PACC: 8700, 8720, 8750E, 8760F

## 1. 引 言

基础研究和大量临床应用表明, 弱激光具有生物刺激效应, 能对神经电生理活动和神经损伤后再生过程产生影响<sup>[1,2]</sup>. 低能量激光照射可首先作用于细胞膜, 引起某些跨膜蛋白构象和功能发生改变, 激活细胞内多种信息传递, 最终影响 DNA 的表达和复制<sup>[3]</sup>. Rochkind 等人<sup>[4]</sup>对大鼠正常神经进行弱激光照射, 随后记录该神经支配的诱发动作电位幅度 (AP 值), 发现 AP 值与未照射前相比显著增高, 即弱激光具有预防神经损伤后传导功能减退的功效. 使用氦氖激光穴位照射可促进大脑神经元恢复, 促进脑电活动和神经递质分泌, 同时激活处于抑制状态的脑细胞, 加速受损脑组织的康复. 弱激光可引起各种酶活性增强, 改善系统血流变状态, 并能刺激神经末梢, 使神经冲动传导加快<sup>[5-8]</sup>. 虽然弱激光临床应用已经很多, 但其作用机理尚不清楚<sup>[9]</sup>. 另一方面, 对弱激光生物刺激效应深入到细胞分子水平的研究很少. 国外学者就弱磁场作用对细胞跨膜信息传递的影响进行了研究, Linz 等人<sup>[10]</sup>研究低强度射

频 (900 MHz) 脉冲磁场对心肌细胞膜电位和  $\text{Ca}^{2+}$  电流的影响. Ottaviani 和 Rosen 等人<sup>[11,12]</sup>分别研究了 50 Hz 工频电磁场和 125 mT 的静磁场对  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  跨膜转运的影响. 目前从细胞膜离子通道和兴奋性方面研究弱激光生物刺激效应的报道很少. 此外, 现已发现许多脑部疾病与细胞膜离子通道及放电特性改变有关<sup>[13]</sup>. 鉴于电压门控  $\text{Na}^+$  通道在动作电位形成及神经兴奋传导过程中起着重要作用<sup>[14]</sup>, 本文利用膜片钳技术研究弱激光诱导下, 神经细胞膜  $\text{Na}^+$  通道电流特性及神经元动作电位发放特征, 为从细胞和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

动物: Wistar 大鼠, 鼠龄 10—12 d, 雌雄不限, 天津药物研究院实验动物中心提供.

试剂: Pronase 酶, Merck 公司生产. 河豚毒素 (TTX), 氯化镉 ( $\text{CdCl}_2$ ), 4-氨基吡啶 (4-AP), 氯化四

\* 国家自然科学基金 (批准号: 60174032) 和山西省自然科学基金 (批准号: 2007011041) 资助的课题.

† E-mail: xyqiao@sxu.edu.cn

乙胺 (TEA-CL)、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES)、己二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸 (EGTA)、氯化铯 (CsCl)、氟化铯 (CsF)、 $\text{Na}_2\text{ATP}$  均为 Sigma 公司产品,其余为国产分析纯。

1) 孵育液 (ACSF, mmol/L): NaCl 134, KCl 5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $\text{MgSO}_4$  2,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{NaHCO}_3$  25, D-glucose 10, HEPES 10, PH7.3;

2) 标准细胞外液 (mmol/L): NaCl 50, KCl 5.4,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{MgCl}_2$  1, D-glucose 10, HEPES 10, AchCl 90, PH7.3 使用前经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤并通 100%  $\text{O}_2$  饱和;

3) 电极内液 (mmol/L): CsCl 70, CsF 70, HEPES 10, EGTA 10,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  3,  $\text{MgCl}_2$  2, PH7.2, 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  $0\text{--}4^\circ\text{C}$  孵育液中迅速剥离海马,分离出 CA3 区,手工切成  $400\text{--}500 \mu\text{m}$  厚的脑片,置于孵育液中,连续通入  $95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$  混合气,孵育 50 min,之后加入 Pronase 酶,使其浓度为  $0.5 \text{g/L}$ ,  $32^\circ\text{C}$  下消化 25 min. 然后用孵育液冲洗脑片 3 次,将脑片加入盛有标准细胞外液的离心管中,用烧制成不同口径的 Pasteur 吸管轻轻吹打,制成单细胞悬液,静置 5 min 后吸取上清液,放入带盖玻片的培养皿内,约  $15\text{--}20 \text{min}$  后细胞贴壁. 分离完整的海马神经元倒置显微镜下观察,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  $4\text{--}5 \text{h}$  内保持良好的生理状态<sup>[15]</sup>。

## 2.3. 全细胞膜片钳记录和数据分析

在  $21\text{--}25^\circ\text{C}$  室温下,利用 EPC-10 膜片钳放大器 (HEKA 公司,德国) 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 Pulse 软件来控制,经  $3.3 \text{kHz}$  滤波和  $20 \text{kHz}$  数据采集. 玻璃微电极经 PP-830 电极拉制仪 (Narashige, Japan) 两步拉制而成,充灌电极内液后,电极阻抗为  $2\text{--}4 \text{M}\Omega$ . 当电极与细胞膜之间形成高阻封接 ( $>1 \text{G}\Omega$ ) 后,立即进行快电容补偿,然后稍加负压破膜,使电极内液与细胞内液相通,再进行慢电容和串连电阻补偿,串连电阻补偿为  $60\%\text{--}80\%$ . 之后在设定的刺激电压下,测量和记录通道电流。

实验所用连续半导体激光器 (LS-150 型) 波长  $670 \text{nm}$ , 激光功率计测量输出功率  $5 \text{mW}$ , 光斑直径

$3 \text{mm}$ , 功率密度  $70.8 \text{mW}/\text{cm}^2$ , 激光照射距离  $15 \text{cm}$ , 照射角度  $75^\circ$ , 光束从侧面入射,照射装置由本实验室自行改制而成,激光照射示意图如图 1 所示. 实验过程中能够在倒置相差显微镜下观察到激光器发射出的红光照射于目标细胞上。

实验结果处理和统计分析采用 Igor4.04 软件和 Origin6.0 统计软件完成,分析结果用  $\text{Mean} \pm \text{S. D.}$  表示,激光照射前后差异的显著性采用单因方差分析和配对  $t$  检验进行分析.  $P < 0.05$  认为存在统计学差异。

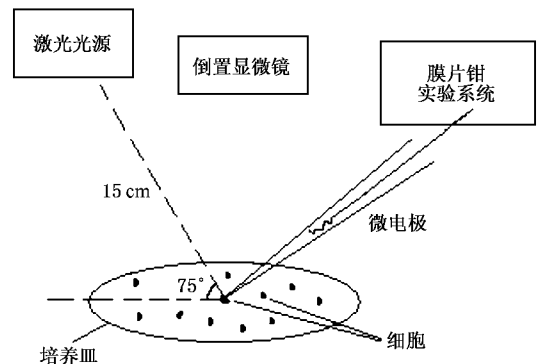


图 1 激光照射示意图

## 3. 结 果

### 3.1. 电压门控钠离子通道电流的分离

采用上述细胞外液和电极内液,记录单个海马 CA3 区锥体神经细胞膜上电压门控  $\text{Na}^+$  通道电流. 置钳制电位  $-100 \text{mV}$ , 给予脉冲幅度从  $-100 \text{mV}$  到  $+60 \text{mV}$ , 脉冲宽度  $20 \text{ms}$ , 步幅  $10 \text{mV}$  的去激化脉冲电压, 刺激频率  $0.5 \text{Hz}$ , 测量并记录得到一系列快速激活与失活的内向电流 (图 2(a)). 由于细胞外液中加入了 TEA-Cl 和 AP, 电极内液中有高浓度的  $\text{Cs}^+$ , 故钾电流可被阻断, 钙电流可被外液中加入的  $\text{CdCl}_2$  和内液中高浓度的  $\text{F}^-$  所灭活. 向外液中加入  $1 \mu\text{mol/L}$  的钠通道阻断剂 TTX, 该电流被阻断 (图 2(b)), 证实其为 TTX 敏感的钠电流。

### 3.2. 激光照射对钠电流 $I-V$ 曲线的影响

$-100 \text{mV}$  钳制电位下, 给予  $10 \text{mV}$  步幅递增,  $20 \text{ms}$  脉宽的去极化脉冲电压刺激至  $+60 \text{mV}$ , 刺激频率  $0.5 \text{Hz}$ , 激活并记录钠通道电流作为对照. 然后打开激光器, 以 2.3 节中所述方法照射海马锥体神

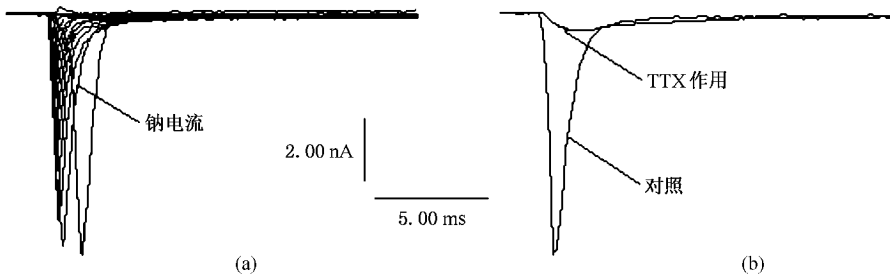


图2 去极化刺激记录的钠电流曲线 (a)置钳制电位 -100 mV 给予脉冲幅度 -100 mV—+60 mV 脉冲宽度 20 ms,步幅 10 mV,频率 0.5 Hz 的去极化电压刺激,记录的内向钠电流;(b)给予 -30 mV 去极化电压刺激,记录的钠电流及其被 1 μmol/L TTX 阻断后的钠电流

经细胞,照射时间 5 min,此时激光作用达到稳定,再次激活并记录钠通道电流  $I_{Na}$  作为激光照射组.最后关闭激光器停止照射,细胞恢复 5 min,再次以同样方式激活并记录  $I_{Na}$  作为恢复组,记录得到的钠电流变化如图 3.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(峰电流/膜电容)为纵轴,绘制激光作用前后钠电流的  $I-V$  曲线(图 4).结果发现激光作用 3 min 时, $Na^+$  通道激活电位开始向超极化方向移动,峰值电流增大,5 min 激光作用达到稳定,通道开始激活的电位移至 -60 mV 左右,最大激活电位移至 -50 mV 左右,激光照射组钠通道最大激活电位与对照组相比左移了 20 mV ( $n = 8$ ).从钠电流  $I-V$  曲线还可以得出,激光

照射使  $I-V$  曲线显著下移,即增大钠电流,但不同膜电位下增大的幅度不同,说明激光照射对钠电流的增大作用具有电压依赖性.激光照射使钠通道峰电流增加,对照组、照射组和恢复组峰电流密度分别为  $(-346.87 \pm 46.94)$  pA/pF  $(-492.15 \pm 70.12)$  pA/pF 和  $(-369.21 \pm 54.35)$  pA/pF.经  $t$  检验,对照组和激光照射组  $I_{Na}$  在统计学上有显著性差异( $n = 8, P < 0.01$ ),对照组与恢复组  $I_{Na}$  无统计学差异( $n = 8, P > 0.05$ ).由此可知,弱激光作用可电压依赖性地增大钠电流,而且这种增大作用具有可逆性.

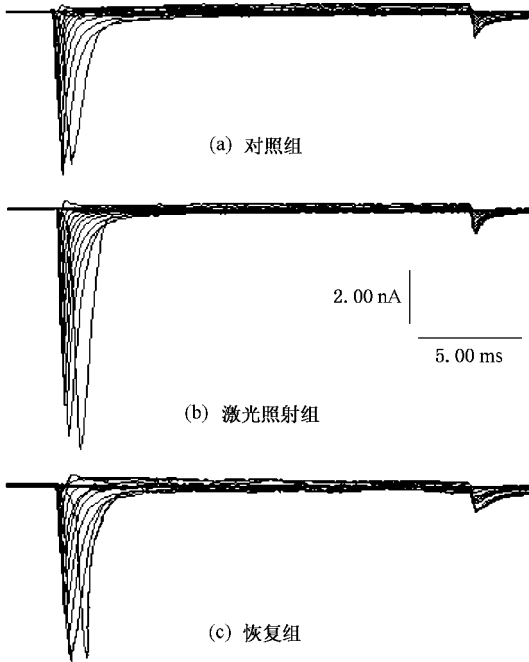


图3 记录的钠电流变化曲线 (a)对照组 (b)激光作用组;(c)恢复组

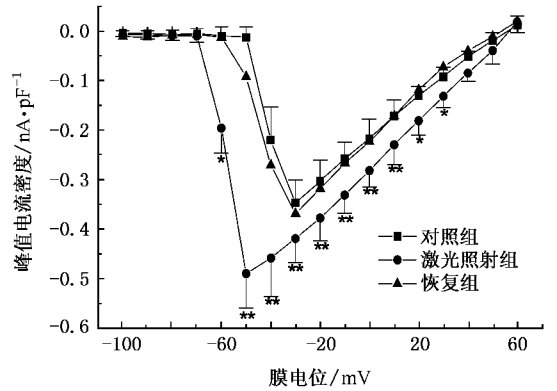


图4 对照组、激光照射组和恢复组钠电流的  $I-V$  曲线(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

### 3.3. 激光照射对钠电流稳态激活和失活曲线的影响

#### 3.3.1. 激活曲线

将膜电位钳制 -100 mV,预置 -120 mV 超极化电压 500 ms,然后从 -80 mV 起给予 10 mV 步幅递增,20 ms 脉宽的去极化脉冲刺激至 0 mV,刺激频率 0.5 Hz,测量并记录得到钠电流.以 2.3 节中所述方法激光照射细胞,照射时间 5 min,再次给予同样刺

激并记录上述电流,然后利用公式  $G = I/V - V_{rev}$  将钠电流峰值转换成电导值,其中  $G$  为电导,  $V$  为测试膜电位,  $V_{rev}$  为翻转电位,  $I$  为各膜电位下测定的钠电流峰值.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激光作用前后钠电流的稳态激活曲线(图 5).所得曲线可以用 Boltzmann 方程  $G/G_{max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k]\}$  进行拟合,其中  $V_{1/2}$  为半数激活电压,  $k$  为曲线斜率因子.由图中可知对照组与激光照射组钠电流稳态激活曲线均呈 S 形,并由此计算出对照组和激光照射组钠通道半数激活电压  $V_{1/2}$  分别为  $(-44.14 \pm 5.28) \text{ mV}$  和  $(-56.55 \pm 6.14) \text{ mV}$  ( $n = 8, P < 0.01$ ) 斜率因子  $k$  分别为  $(-4.89 \pm 1.75) \text{ mV}$  和  $(-4.07 \pm 1.66) \text{ mV}$  ( $n = 8, P > 0.05$ ).由此可见,弱激光作用可促进钠通道电流的激活,使稳态激活曲线向超极化方向移动,但不改变其斜率因子.

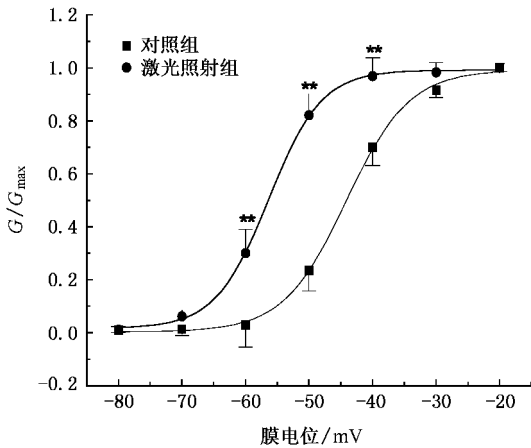


图 5 对照组和激光照射组钠电流稳态激活曲线 (\*\* $P < 0.01$ )

### 3.3.2. 失活曲线

置钳制电位  $-100 \text{ mV}$ ,先给予  $-120 \sim -20 \text{ mV}$ ,步幅  $10 \text{ mV}$ ,刺激时程  $500 \text{ ms}$  的预脉冲刺激,间隔  $1 \text{ ms}$  之后,再给予  $-30 \text{ mV}$  的测试脉冲刺激,刺激时程  $12 \text{ ms}$ ,刺激频率  $0.5 \text{ Hz}$ ,记录得到电流作为对照.然后激光照射细胞,照射时间  $5 \text{ min}$ ,同样刺激方式下,再次记录电流(图 6).以电流峰值与最大电流峰值的比值  $I/I_{max}$  对应预脉冲刺激电位分别绘制对照组和激光作用组钠电流的稳态失活曲线(图 7).所得曲线可以用 Boltzmann 方程  $I/I_{max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k]\}$  拟合,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 7 可知对照组与激光照射组稳态失活曲线均呈反 S

型,并由此计算出对照组和激光照射组钠电流半数失活电压  $V_{1/2}$  分别为  $(-69.02 \pm 10.31) \text{ mV}$  和  $(-56.60 \pm 8.97) \text{ mV}$  ( $n = 8, P < 0.01$ ),斜率因子分别为  $(5.96 \pm 2.64) \text{ mV}$  和  $(6.48 \pm 2.13) \text{ mV}$  ( $n = 8, P > 0.05$ ).由此可见,弱激光照射抑制钠通道电流的失活,使稳态失活曲线向去极化方向移动,但不改变其斜率因子.

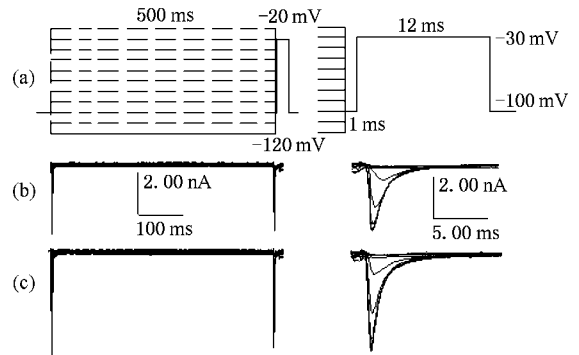


图 6  $I_{Na}$  失活的刺激波形和记录的电流曲线,右边部分是左边部分的放大 (a) 刺激波形 (b) 记录的对照组电流曲线 (c) 记录的激光照射组电流曲线

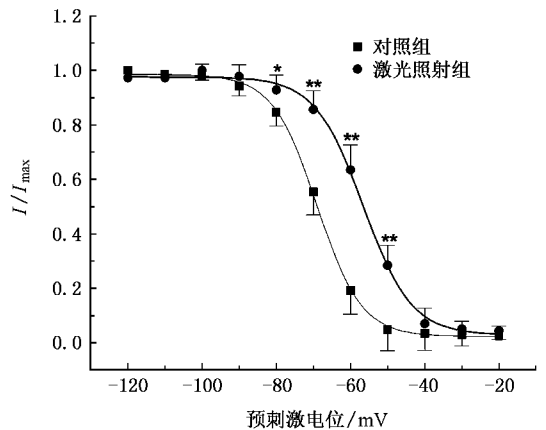


图 7 对照组和激光照射组钠电流稳态失活曲线 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

### 3.4. 激光照射对神经元动作电位的影响

选择健康的分离完整的大鼠海马神经元,记录动作电位的细胞外液( $\text{mmol/L}$ ):  $\text{NaCl } 130, \text{KCl } 5.4, \text{CaCl}_2 \text{ } 2, \text{MgCl}_2 \text{ } 1, \text{D-glucose } 10, \text{HEPES } 10, \text{pH} 7.3$ . 电极内液( $\text{mmol/L}$ ):  $\text{KCl } 120, \text{CaCl}_2 \text{ } 1, \text{HEPES } 10, \text{EGTA } 10, \text{Na}_2\text{ATP } 3, \text{MgCl}_2 \text{ } 2, \text{pH} 7.2$ . 细胞与电极之间达到  $\text{G}\Omega$  封接之后破膜,形成全细胞状态.稳定  $3 \sim 5 \text{ min}$ ,在

电流钳模式下 给予从 40—200 pA 以 20 pA 步幅递增 刺激时程 500 ms 刺激间隔 5 s 的脉冲去极化电流刺激 诱发正常单个和成串动作电位的连续发放 (图 8). 图 8 显示 :当刺激达到阈值 在一定刺激范围内 随着去极化刺激强度的增加 神经元产生动作电位的数目从单个到明显增加 进一步增大其去极化强度至 200 pA 时 神经元发放动作电位数目又逐渐减少. 大约 30% 的神经元 当给予阈上刺激 (> 40 pA) 时 最初一段时间发放动作电位 然后出现膜电位振荡. 给予强度为 0—160 pA 刺激时程 500 ms 的连续斜坡电流刺激 测得神经元动作电位发放频率由低逐渐增强至饱和 (图 9).

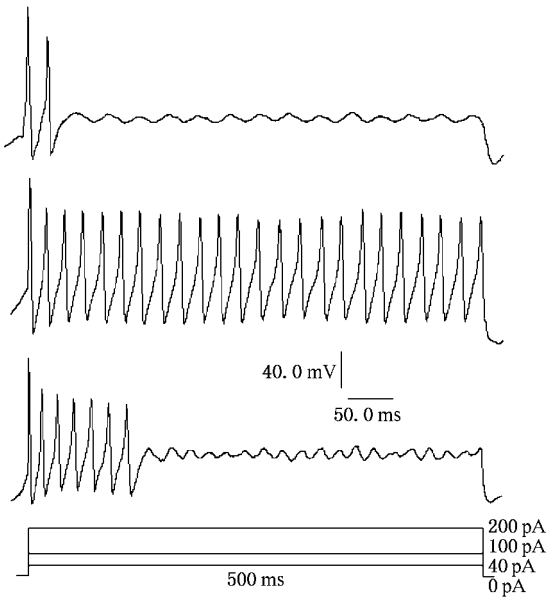


图 8 不同强度脉冲电流刺激下神经元单个和成串动作电位

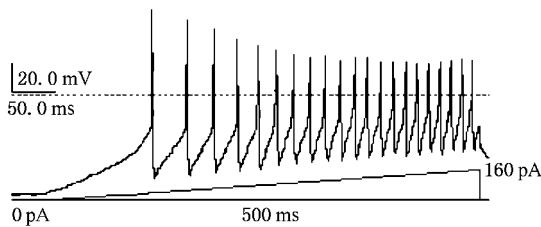


图 9 连续斜坡电流刺激下神经元动作电位的连续发放

选择静息膜电位低于 - 50 mV 且封接稳定 (> 1 GΩ) 的细胞进行激光诱导实验 照射方式同前 照射 5 min 后 给予刺激强度 100 pA 刺激时程 10 ms 的去极化电流脉冲刺激 测量和记录激光照射对神经元单个动作电位特性的影响. 结果显示 激光照射使神经元静息膜电位降低 从照射前的

( - 61.7 ± 3.3 ) mV 降至照射后的 ( - 68.6 ± 4.2 ) mV ( n = 10 , P < 0.05 ) ,且动作电位阈值(阈电位)明显降低 从 ( - 46.8 ± 4.3 ) mV 降至 ( - 59.3 ± 4.1 ) mV ( n = 10 , P < 0.01 ) . 激光照射后动作电位幅度(超射值)和复极化动作电位时程 (APD<sub>90</sub>) 与对照组比较均有明显差异 幅度从 ( 51.2 ± 4.6 ) mV 增大至 ( 76.8 ± 4.3 ) mV ( n = 10 , P < 0.01 ) ,复极化时程从 ( 2.32 ± 0.19 ) ms 增加为 ( 5.31 ± 0.14 ) ms ( n = 10 , P < 0.01 ) . 此作用在停止照射 5 min 后可基本恢复到对照组的水平 测得动作电位阈值为 ( - 48.2 ± 4.6 ) mV ( n = 10 , P > 0.05 ) 动作电位幅度为 ( 54.9 ± 5.2 ) mV ( n = 10 , P > 0.05 ) ,复极化动作电位时程 APD<sub>90</sub> 为 ( 2.65 ± 0.18 ) ms ( n = 10 , P > 0.05 ) ,如图 10 中所示. 为了产生成串动作电位 神经元给予强度 100 pA 刺激时程 500 ms 间隔 5 s 的去极化电流刺激 诱导稳定的动作电位发放 分别测量和记录神经元在无照射、照射 5 min 以及恢复 5 min 后动作电位的重复发放特性 考察弱激光作用对神经元动作电位发放特征的影响 (图 11). 由图 11 可见 同一个记录分离的海马神经元 在无激光照射时 细胞放电成串,

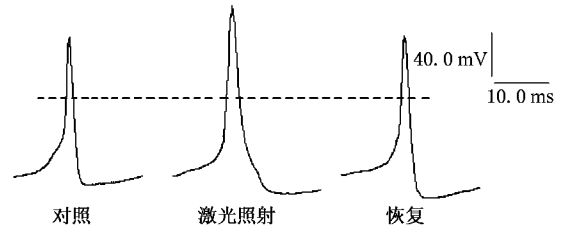


图 10 激光照射对神经元单个动作电位特性影响

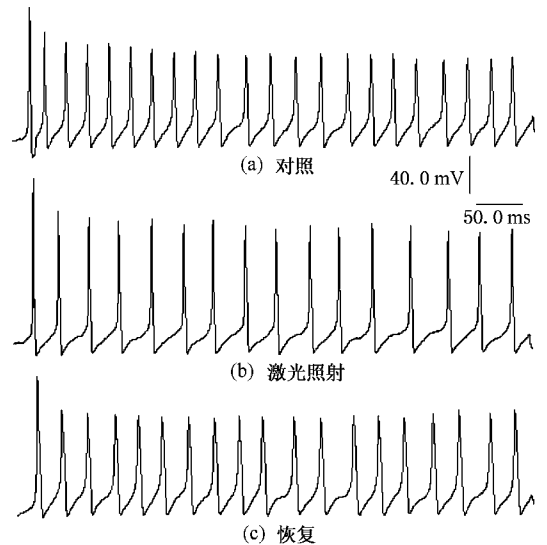


图 11 激光照射对神经元动作电位重复发放特性影响 (a) 对照 ;(b) 激光照射 (c) 恢复

表现频率高、规则。激光照射 5 min 后,动作电位幅度增大,发放频率减慢,从照射前的  $42.6 \pm 2.5$  Hz 减小到  $32.3 \pm 3.1$  Hz ( $n = 10, P < 0.01$ )。停止照射,细胞恢复 5 min,在同样刺激条件下,记录的神经元动作电位幅度、发放频率可逐渐恢复到照射前的水平,发放频率为  $38.4 \pm 3.6$  Hz ( $n = 10, P > 0.05$ )。

## 4. 结论与讨论

实验结果表明,波长 670 nm、功率 5 mW 的弱激光照射大鼠海马 CA3 区锥体神经元,使神经元电压门控  $\text{Na}^+$  通道电流显著增大,且这种增大作用呈现电压依赖性和可逆性。弱激光照射使钠电流的稳态激活曲线显著左移,稳态失活曲线显著右移。由此可知,弱激光作用是通过促进神经元电压门控  $\text{Na}^+$  通道的激活并抑制其失活过程而增大钠电流。由于电压门控  $\text{Na}^+$  通道电流决定产生动作电位的幅值大小,钠电流幅度增大,从而使神经元动作电位幅值增加,诱发动作电位是许多单个神经元产生动作电位的整合,从而弱激光作用可增大诱发动作电位幅度,这一结论与 Rochkind 等人<sup>[4]</sup>所做的激光照射使大鼠正常神经支配的诱发动作电位幅度增大的结果相一致。

实验结果还表明,在阈刺激达到 40 pA 时,可以使大鼠海马锥体神经元产生动作电位,给予大于阈强度的连续斜坡电流和脉冲电流刺激时,均可诱发海马神经元动作电位的连续发放,且神经元产生动作电位的数目在一定范围内随着刺激强度的增大而增加。给予波长 670 nm、功率 5 mW 的弱激光作用,使海马神经元静息膜电位和阈电位降低,且阈电位降低的幅度更显著,使动作电位幅度增大,复极化动作电位时程  $\text{APD}_{90}$  增加,动作电位连续发放频率减慢,且这种作用具有可逆性。由于弱激光作用,使  $\text{Na}^+$  通道的激活电位向超极化方向移动,即降低了钠通道激活电位,导致神经元只需达到较小的去极化程度就可激活钠电流,即降低了激活阈值,阈电位下降。通常,静息电位下降,增大了同阈电位的差距,细胞兴奋性会随之下降。然而,弱激光作用后,由于静息电位下降的同时,阈电位也下降,并且阈电位下降的幅度要远大于静息电位下降幅度。因而,使得静息电位和阈电位之间的差距实际上减小,从而使神经元兴奋性提高。

弱激光作用可以明显促进  $\text{Na}^+$  通道的激活,  $I_{\text{Na}}$  增大,而  $I_{\text{Na}}$  大小决定了动作电位的幅度,因而导致 AP 值增大。动作电位的复极化时程主要由  $I_{\text{K}}$  决定,由于弱激光作用可以抑制延迟整流钾通道电流的激活<sup>[16]</sup>,使  $I_{\text{K}}$  降低,因而动作电位的复极化时间延长。动作电位的放电频率主要取决于  $I_{\text{A}}$ ,激光作用抑制  $I_{\text{A}}$  激活,使重复放电神经元呈缓慢放电节律,因而动作电位的发放频率减慢,进而减少了神经元因动作电位发放而损耗的能量,在大脑缺血和缺氧状态下,可减轻神经元的损伤和促进神经元存活。动作电位去极化速度越快,幅度越大,则传导速度就越快,动作电位传导速度和幅度与  $\text{Na}^+$  通道的功能状态和  $\text{Na}^+$  驱动力等因素有关,从而弱激光作用可以改变动作电位的传导特性。

## 5. 结束语

目前,弱激光生物刺激作用机制和作用位点还不明确,本实验从神经元电压门控  $\text{Na}^+$  通道和兴奋性角度研究弱激光生物刺激效应。电压门控  $\text{Na}^+$  通道由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基组成, $\alpha$  亚基由四个对称的同源功能区构成,每一功能区均含有六个  $\alpha$  螺旋的跨膜片段 ( $S_1-S_6$ ),通道电压感受器  $S_4$  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<sup>[17]</sup>。由于  $S_4$  片段含有较多的正电荷氨基酸,围绕  $S_1, S_2, S_3$  片段的跨膜  $\alpha$  螺旋的氨基酸的负电荷和  $S_4$  片段的正电荷形成离子对,因而它们的跨膜位置是稳定的。这种排列形成了离子对的跨膜离子梯度,它是亚稳态的,在正常静息电位时,位于这一部位的电场使正电荷进入细胞,负电荷排列在外面。由于弱激光光子能量与生物电场能量相近,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,引起  $S_4$  片段松弛,沿螺旋方向滑动,形成新的离子对<sup>[18,19]</sup>。 $S_4$  片段的这种滑行运动使等量的正电荷通过细胞膜向外移动并旋转,电压驱动的  $S_4$  片段螺旋运动将导致钠通道四个功能区的连续构象改变,引起离子通道的激活。本实验结果提示弱激光诱导神经元兴奋性的改变最终与细胞膜电压门控离子通道特性密切相关。因此,  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  通道构象的改变可能会是弱激光生物刺激作用的本质。

- [ 1 ] Anders J J , Geuna S , Rochkind S 2004 *Neurol. Res.* **26** 233
- [ 2 ] Wollman Y , Rochkind S , Simantov R 1996 *Neurol. Res.* **18** 467
- [ 3 ] Mester E , Mester A F , Mester A 1985 *Lasers Surg Med.* **5** 31
- [ 4 ] Rochkind S , Nissan M , Alon M , Shamir M , Salame K 2001 *Lasers Surg Med.* **28** 216
- [ 5 ] Rochkind S , Rousso M , Nissan M , Villarreal M , Barr-Nea L , Rees D G 1989 *Lasers Surg Med.* **9** 174
- [ 6 ] Karu T I , Piatibrat L V , Afanasyeva N I 2004 *J. Photochem. Photobiol. B* **80** 366
- [ 7 ] Gigo-Benato D , Geuna S , Rochkind S 2005 *Muscle. Nerve.* **31** 694
- [ 8 ] Lan X F , Liu X R , Wang Y W , Lu J , Ni X W , Tao Y Y , Wang C H 2005 *Chin. J. Lasers* **27** 477 ( in Chinese ) [ 兰秀凤、刘晓然、王亚伟、陆建、倪晓武、陶月玉、汪春晖 2005 中国激光 **27** 477 ]
- [ 9 ] Karu T 1999 *J. Photochem. Photobiol. B* **49** 1
- [ 10 ] Linz K W , Westphalen C von , Streckert J , Hansen V , Meyer R 1999 *Bioelectromagnetics* **20** 497
- [ 11 ] Ottaviani E , Malagoli D , Ferrari A , Tagliazucchi D , Conte A , Gobba F 2002 *Bioelectromagnetics* **23** 292
- [ 12 ] Rosen A D 2003 *Cell Biochem. Biophys.* **39** 163
- [ 13 ] Yang Z Q , Lu Q S 2006 *Chin. Phys.* **15** 518
- [ 14 ] He B J , Liu A X , Chen J T , Sun J S 2002 *Acta Biophysica Sinica* **18** 201 ( in Chinese ) [ 贺秉军、刘安西、陈家童、孙金生 2002 生物物理学报 **18** 201 ]
- [ 15 ] Zhang C F , Yang P 2006 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345** 43
- [ 16 ] Qiao X Y , Li G , He B J 2006 *Chin. J. Lasers* **33** 1288 ( in Chinese ) [ 乔晓艳、李刚、贺秉军 2006 中国激光 **33** 1288 ]
- [ 17 ] Auld V J , Goldin A L , Krafte D S , Catterall W A , Lester H A , Davidson N , Dunn R J 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87** 323
- [ 18 ] Karu T , Tiphlova O , Esenaliev R , Letokhov V 1994 *J. Photochem. Photobiol. B* **24** 155
- [ 19 ] Liu Y Y , Dou S X , Wang P Y , Xie P , Wang W C 2005 *Acta Phys. Sin.* **54** 622 ( in Chinese ) [ 刘玉颖、窦硕星、王鹏业、谢平、王渭池 2005 物理学报 **54** 622 ]

## Neuron excitability changes induced by low-power laser irradiation \*

Qiao Xiao-Yan<sup>1)†</sup> Li Gang<sup>2)</sup> Dong You-Er<sup>1)</sup> He Bing-Jun<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> College of Physics and Electronics Engineering , Shanxi University , Taiyuan 030006 , China )

<sup>2)</sup> College of Precision Instruments and OptoElectronics Engineering , Tianjin University , Tianjin 300072 , China )

<sup>3)</sup> College of Life Science and Technology , Nankai University , Tianjin 300071 , China )

( Received 20 December 2006 ; revised manuscript received 2 May 2007 )

### Abstract

The change in excitability induced by low-power laser was investigated for freshly dissociated rat hippocampal CA3 pyramidal neuron using the whole-cell patch clamp technique. The experimental results indicate that the activation potential of Na<sup>+</sup> channel shifted towards a more negative potential, the peak amplitude of  $I_{Na}$  increased in a voltage-dependent and reversible manner, the steady-state activation curve and inactivation curve of  $I_{Na}$  were significantly shifted, the half-activation voltage and the half-inactivation voltage respectively changed from (  $-44.14 \pm 5.28$  )mV to (  $-56.55 \pm 6.14$  )mV (  $n = 8, P < 0.01$  ) and from (  $-69.02 \pm 10.31$  )mV to (  $-56.60 \pm 8.97$  )mV (  $n = 8, P < 0.01$  ) when the neuron was irradiated by low-power laser. Moreover, the irradiation reversibly lowered the resting potential and threshold potential, increased the amplitude of action potential, widened the repolarization duration, and slowed the firing frequency. The results suggest that low-power laser irradiation can change the characteristics of Na<sup>+</sup> channel, further affect the depolarizing and firing of action potential, and finally be involved in adjusting the excitability of neurons.

**Keywords** : sodium channel , patch clamp technique , low-power laser irradiation , action potential , neurons

**PACC** : 8700 , 8720 , 8750E , 8760F

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China ( Grant No. 60174032 ) and the Natural Science Foundation of Shanxi Province , China ( Grant No. 2007011041 ).

† E-mail : xyqiao@sxu.edu.cn