

铅对大鼠海马神经元钠电流的抑制作用

杜正清, 孟紫强*

(山西大学环境医学与毒理学研究所, 山西 太原 030006)

摘要: 目的 铅对神经系统有损害作用, 钠通道是神经元产生和传递电信号的重要枢纽, 故研究铅对大鼠海马 CA1 区神经元钠电流 (I_{Na}) 的影响。方法 全细胞膜片钳技术。结果 醋酸铅可浓度依赖地抑制 I_{Na} , 1, 10, 50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅对 I_{Na} 的抑制率分别为 $(8.2 \pm 0.8)\%$, $(20.9 \pm 2.6)\%$, $(51.8 \pm 4.8)\%$ 和 $(66.4 \pm 5.7)\%$ 。此外, 它还与电压呈依赖关系, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅可使 I_{Na} 的激活曲线显著右移, 但不改变斜率因子, 还可使 I_{Na} 的失活曲线显著左移。结论 铅可抑制 I_{Na} 的激活过程, 可促进 I_{Na} 的失活过程。铅改变了细胞膜的电压感应, 这可能是铅损伤海马神经元的作用机制之一。

关键词: 海马; 神经元; 膜片钳技术, 全细胞; 铅; 钠通道

中图分类号: R995

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)01-0062-04

铅是环境中的一种有毒重金属, 可通过多种途径进入人体, 对人体造成多系统、多功能的损害。大量的研究表明, 铅可对神经系统产生损害作用^[1]。阮迪云等^[2]研究发现, 低浓度铅处理组大鼠海马齿状回兴奋性突触后电位和群峰电位诱导的长时程突触后电位增强的幅度均明显低于对照组, 同时齿状回的双脉冲易化反应也受到损伤。研究还发现, 铅可对心脏产生损伤作用。王桂兰等^[3]报道, SD 雄性大鼠每天用 10, 30, 90 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 醋酸铅 ig 9 周, 结果心脏细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶、超氧化物歧化酶活性

降低, 丙二醛含量、 Ca^{2+} -ATP 酶活性升高, 血铅和尿铅含量也增高。铅能抑制机体的体液免疫和细胞免疫功能^[4]。戴晓青等^[5]报道了铅对背根神经元钠通道和钾通道的影响, 然而铅对海马神经元钠通道的影响还未见报道。为此, 本文利用全细胞膜片钳技术研究了铅对大鼠海马 CA1 区神经元钠离子通道的影响, 以探讨铅对神经细胞毒性作用的机制。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar 大鼠, 鼠龄 5 ~ 10 d, ♀ ♂ 不限, 中国辐射防护研究院动物房提供。

1.2 试剂

蛋白酶, HEPES, EGTA, Na_2ATP 和醋酸铅 [$\text{Pb}(\text{Ac})_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$] 均为 Sigma 公司产品。

标准细胞外液 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): NaCl 150, KCl 5, MgCl_2 1.1, CaCl_2 2.6, HEPES 10, 葡萄糖 10, pH 7.4, 记录前加入 CdCl_2 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

电极内液 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): CsCl 75, NaF 75, MgCl_2 2, HEPES 10, EGTA 2.5, Na_2ATP 3, pH 7.5。

1.3 大鼠海马神经元锥体细胞的急性分离

大鼠断头取脑, 置于 0 ~ 4℃ 孵育液中分出海马, 切成 400 ~ 500 μm 厚的脑片, 置于 32℃ 孵育液中, 连续通入 O_2 , 孵育 30 min。而后加入蛋白酶, 使其终浓度为 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 32℃ 下消化 35 min。消化毕用孵育液洗脑片 3 次, 投入盛有氧饱和标准细胞外液的离心管内, 用 Pasteur 吸管轻轻吹打, 制成单细胞悬液, 静置 5 min。取上部细胞悬液, 加入盛有氧饱和标准细胞外液的培养皿内, 15 min 后细胞贴壁, 即可进入全细胞膜片钳记录^[6]。

1.4 全细胞膜片钳记录及数据分析

在 20 ~ 25℃ 室温下, 利用 Axopatch 200B 膜片钳放大器 (Axon Instrument, USA) 进行全细胞膜片钳记录, 记录电极由玻璃毛细管径 PP-830 型微电极拉制仪 (Narishage, Japan) 拉制, 充灌电极内液后阻抗为

收稿日期: 2003-04-02 接受日期: 2003-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30230310)

作者简介: 杜正清 (1971 -), 女, 山西大学环境医学与毒理学研究所博士研究生, 山西财经大学讲师, 研究方向为环境医学与毒理学

* 联系作者 E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn Tel/Fax: 86-351-7011895

8~13 M Ω 。当电极尖端与细胞膜之间形成高阻抗封接(>1 G Ω)后,负压破膜,使电极内液与细胞内液相通,立即进行电容和电阻补偿。电流信号经2 kHz滤波及Digidata 1200B型A/D,D/A转换器进行数模转换后存于计算机硬盘。采样频率10 kHz。实验过程中保持电位及钳制测试脉冲程序的设定、信号采集与储存均借助微机运行PCLAMP 6.0.4软件(Axon Instrument)完成。

结果分析使用PCLAMP CLAMPFIT程序(Axon Instrument)和Origin 5.0软件(Microcal Software, USA)完成。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,给药前后差异的显著性用配对 t 检验进行分析。

2 结果

2.1 铅对钠电流(I_{Na})的作用

置保持电位于-100 mV,记录从-100 mV去极化至0 mV时激活的内向电流。由于该电流可被外液中加入的1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 河豚毒素(tetrodotoxin)所阻断,故判断为 I_{Na} 。实验在50个活性良好的细胞上观察了醋酸铅对 I_{Na} 的抑制效应。1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铅对 I_{Na} 的抑制率分别为(8.2 \pm 0.8)%, (20.9 \pm 2.6)%, (34.8 \pm 3.6)%, (51.8 \pm 4.8)%和(66.4 \pm 5.7)%。用标准细胞外液洗脱50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铅后 I_{Na} 可部分恢复(图1)。

2.2 铅对 I_{Na} -电压(I - V)曲线的影响

置保持电位于-100 mV,给予-100 mV至0 mV的阶梯去极化脉冲刺激,步幅10 mV,波宽12 ms,频

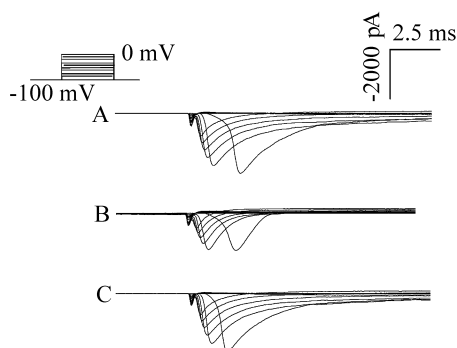


Fig 1. Inhibitory effect of $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ on I_{Na} . A: whole-cell I_{Na} was recorded in a hippocampal neuron before drug application. B: after the treatment of 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{Ac})_2$, I_{Na} was reduced significantly. C: on wash out, 80% recovery was seen, suggesting the inhibitory effects of $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ was reversible.

率0.25 Hz,可激活一系列快速激活与失活的内向 I_{Na} ,此电流在-80 mV激活,-40 mV达到峰值。向培养皿中加入醋酸铅溶液,使其终浓度为50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果表明,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铅可使 I_{Na} 的 I - V 曲线显著上移,即减小 I_{Na} ,在不同膜电位下的减小幅度不同。这说明醋酸铅对 I_{Na} 的抑制作用具有电压依赖性,但给药前后 I_{Na} 的激活电位和到达电流峰值的电位基本未发生变化(图2)。

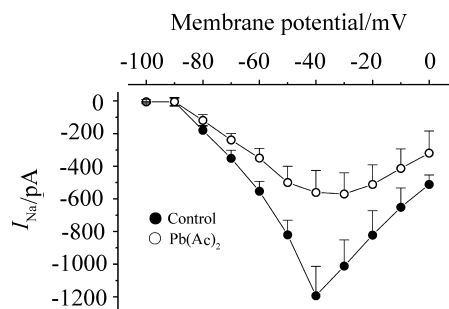


Fig 2. Effects of 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ on I - V curves of I_{Na} . Normalized steady-state current I - V curves for activation of I_{Na} were shown. I_{Na} was elicited by 12 ms depolarizing pulses from holding potential(HP) of -100 mV to 0 mV in 10 mV steps applied at a frequency of 0.25 Hz. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$.

2.3 铅对 I_{Na} 激活和失活动力学的影响

图1中的 I - V 曲线经归一化处理,利用公式 $G = I/(V - V_{Na})$,将图中的 I_{Na} 峰值转换为电导值,其中, G 为电导, V 为膜电位, V_{Na} 为翻转电位。以电导值与最大电导值的比值对应膜电位分别绘制出给药前后 I_{Na} 的激活曲线。所得曲线可以用 Boltzmann 方程 $G/G_{max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$ 进行拟合,式中 G 为电导, V 为膜电位, V_h 为半数激活电压, k 为曲线的斜率因子(图3A)。结果表明,加50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铅前后 I_{Na} 的 V_h 分别为(-42.0 \pm 0.6) mV和(-36.1 \pm 0.5) mV($n = 10$, $P < 0.05$), k 分别为 9.0 ± 0.6 和 7.2 ± 0.5 ($n = 10$, $P > 0.05$)。由此可见醋酸铅可使 I_{Na} 的激活曲线显著右移,但不改变其曲线的斜率因子。

I_{Na} 的失活曲线归一化后,经 Boltzmann 方程 $I/I_{max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$ 拟合,式中 I 为电流峰值, V 为膜电位, V_h 为半数失活电压, k 为曲线的斜率因子(图3B)。结果表明,加50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铅前后 I_{Na} 的 V_h 分别为(-54.1 \pm 0.3) mV和

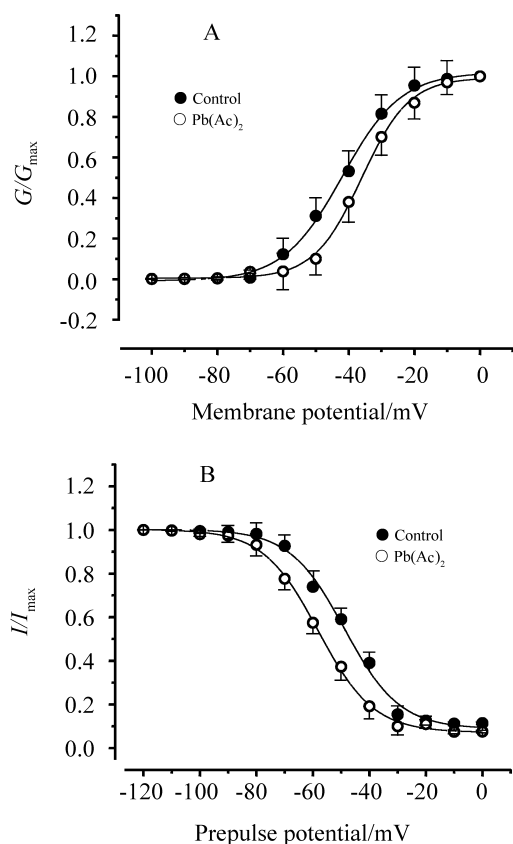


Fig 3. Effect of $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ on the activation kinetics and steady-state inactivation kinetics of I_{Na} in hippocampal neurons of rats. (A) I_{Na} was evoked

by 12 ms depolarizing pulses from HP of -100 mV to 0 mV in 10 mV steps applied at a frequency of 0.25 Hz. Activation curves were fitted using the Boltzmann equation of the form: $G/G_{\text{max}} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$, where G_{max} is the maximal conductance, V_h , the voltage at which the current is half activated, and k is the slope factor describing the slope of the activation curves. Before $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ application, V_h and k were $-(42.0 \pm 0.6)$ mV and 9.0 ± 0.6 , respectively. During $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ application, V_h and k were $-(36.1 \pm 0.5)$ mV and 7.2 ± 0.5 , respectively. (B) Currents were elicited by a two-pulse protocol, a 500 ms conditioning prepulse to various potentials (from -120 mV to 0 mV) was followed by a 12 ms depolarizing pulse from -100 mV to -30 mV applied at a frequency of 0.25 Hz. HP = -100 mV. Steady-state inactivation curves were fitted using the Boltzmann equation of the form: $I/I_{\text{max}} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$, where I_{max} is the maximal current, V_h , the voltage at which the current is half inactivated, and k is the slope factor describing the slope of the steady-state inactivation curves. Before $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ application, V_h and k were $-(54.1 \pm 0.3)$ mV and 6.8 ± 0.2 , respectively. During $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ application, V_h and k were $-(58.3 \pm 0.5)$ mV and 9.8 ± 0.5 , respectively. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$.

$-(58.3 \pm 0.5)$ mV ($n = 10$, $P < 0.05$), k 分别为 6.8 ± 0.2 和 9.8 ± 0.5 ($n = 10$, $P < 0.05$)。由此可见,醋

酸铅可使 I_{Na} 的失活曲线显著左移,且改变其斜率因子。

3 讨论

神经细胞膜电压门控性钠通道在神经元的信号调控过程中具有十分重要的作用,同时它又是某些神经毒素作用的靶点,这些毒素通过影响钠通道的结构和功能而发挥其对中枢神经元的损伤效应^[5~7]。

当去极化刺激时,电压门控钠通道开启所形成的内向 I_{Na} 是产生神经动作电位上升相的必要条件和关键因素,因此, I_{Na} 的幅度是产生神经信号的关键。本实验证实了铅降低 I_{Na} 的幅度,抑制 I_{Na} 的激活过程,促进 I_{Na} 的失活化过程。说明了铅损伤了神经信号的产生和传导过程,这一过程在铅抑制神经细胞钙离子通道和钾离子通道,从而对神经细胞产生损伤作用中起着一种辅助效应。另外,电压依赖性 I_{Na} 的减小,会造成神经元胞内 Ca^{2+} 浓度降低,从而抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性,使得细胞难以超极化,不利于恢复到静息电位。它会影响到胞内 K^+ 浓度,加速能量的消耗^[8]。胞内正常水平的 K^+ 浓度可抑制引起半胱天冬酶-3 效应的蛋白酶的激活和凋亡的 DNA 断裂;而胞内 K^+ 浓度的减小可激活半胱天冬酶和核酸酶,进而诱导细胞凋亡^[9]。另一方面,能量消耗的加速导致能量供应不足,使 Ca^{2+} -ATP 酶的活性降低, Ca^{2+} 外流减小,由此引起钙平衡机制的破坏,造成胞内 Ca^{2+} 水平持续增高,导致蛋白酶、磷脂酶和核酸内切酶活化,引起蛋白质、磷脂和 DNA 损伤,而且还会启动耗能代偿机制,导致与功能有关的系统紊乱^[10]。本研究结果表明,铅可抑制大鼠海马 CA1 区神经元的 I_{Na} 的激活过程,促进其失活过程,使胞内的钠离子浓度减小。分子的活动是电压门控通道的基本特征,在膜去极化时,会有快速激活的 I_{Na} 产生; I_{Na} 的激活推迟可能是铅快速且具有高度选择性地进入离子通道,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,从而诱导非正常状态下的离子通道构象,从而影响钠内流。铅促使钠离子通道失活可能是铅结合氨基末端的离子通道蛋白,通过另一条氨基酸片段栓在通道的余留部分,进而使通道提前失活。铅的这一影响会使膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性和功能改变,造成海马神经元损伤。这意味

着铅对海马神经具有神经毒物的作用,它通过影响 I_{Na} ,从而改变胞内的 K^+ 和 Ca^{2+} 浓度,使神经系统出现异常性质,破坏神经元细胞膜的电压感应。引起钙平衡机制的破坏,使胞内 Ca^{2+} 浓度升高,造成中枢神经系统损伤,从而提示铅污染可能与一些中枢神经系统疾病和衰老有关,对此尚待进一步研究。

致谢:感谢中国科技大学生命科学院神经毒理学实验室阮迪云教授对此文所提的宝贵意见。

4 参考文献:

- [1] Madeja M, Musshoff U, Binding N, Witting U, Speckmann EJ. Effects of Pb^{2+} on delayed-rectifier potassium channels in acutely isolated hippocampal neurons[J]. *J Neurophysiol*, 1997, **78**(5):2649-2654.
- [2] Ruan DY, Chen JT, Zhao C, Xu YZ, Wang M, Zhao WF. Impairment of long-term potentiation and paired-pulse facilitation in rat hippocampal dentate gyrus following developmental lead exposure *in vivo* [J]. *Brain Res*, 1998, **806**(2):196-201.
- [3] Wang GL, Liu SJ, Lu P, Liu ZM. Lipid peroxidation of myocardial microsome membrane in rats chronically poisoned with low levels of lead[J]. *J Hyg Res*(卫生研究), 1996, **25**(5):265-267.
- [4] Xu SS, Wu GY. Influence of zinc in lead cellular immunotoxicity in mice[J]. *Acta Yanbian Med Coll*(延边医学院学报), 1990, **13**(2):92-97.
- [5] Dai XQ. Effects of lead on sodium current and potassium current in adult rat dorsal root ganglion[J]. *J Hyg Res*(卫生研究), 1998, **27**(1):32-35.
- [6] Zou B, Chen Y, Wu C, Zhou P. Blockade of U50488H on sodium currents in acutely isolated mice hippocampal CA3 pyramidal neurons[J]. *Brain Res*, 2000, **855**(1):132-136.
- [7] Urenjak J, Obrenovitch TP. Pharmacological modulation of voltage-gated Na^+ channels: a rational and effective strategy against ischemic brain damage[J]. *Pharmacol Rev*, 1996, **48**(1):21-67.
- [8] Boening JA, Kass IS, Cottrell JE, Chambers G. The effect of blocking sodium influx on anoxic damage in the rat hippocampal slice[J]. *Neuroscience*, 1989, **33**(2):263-268.
- [9] Chi XX, Xu ZC. Differential changes of potassium currents in CA1 pyramidal neurons after transient forebrain ischemia [J]. *J Neurophysiol*, 2000, **84**(6):2834-2843.
- [10] Hu HJ, Yang DM, Dai DZ, Wu CH, Zhou PA. Bepridil inhibition of sodium current in rat hippocampal CA1 neurons [J]. *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报), 1999, **20**(9):819-823.

Inhibitory effect of lead on sodium currents in acutely isolated rat hippocampal neurons

DU Zheng-Qing, MENG Zi-Qiang*

(Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: AIM Lead injures nerve system. Because sodium channels are pivotal in generation and conduction of electrical signals in neurons, the effect of lead on sodium current (I_{Na}) in freshly dissociated hippocampal neurons of rats was studied. **METHODS** The whole-cell patch clamp techniques were used. **RESULTS** The results showed that 1, 10, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Pb(\text{Ac})_2$ inhibited the amplitude of I_{Na} by $(8.2 \pm 0.8)\%$, $(20.9 \pm 2.6)\%$, $(51.8 \pm 4.8)\%$ and $(66.4 \pm 5.7)\%$ ($n = 10$), respectively. It suggested that the inhibition of $Pb(\text{Ac})_2$ on I_{Na} be concentration-dependent. The inhibition of

$Pb(\text{Ac})_2$ on I_{Na} was also voltage-dependent. The activation curve of I_{Na} was shifted to right and the inactivation curve was shifted to left with 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Pb(\text{Ac})_2$. **CONCLUSION** The inhibition of lead on I_{Na} significantly increases the excitation of hippocampal neurons, which may take an assistant part in lead neurotoxication.

Key words: hippocampus; neurons; patch clamp technique, whole-cell; lead; sodium channels

* Corresponding author.