

文章编号: 0258-7025(2006)09-1288-06

弱激光对神经细胞膜延迟整流钾通道 电流特性的影响

乔晓艳^{1,3}, 李刚¹, 贺秉军², 林凌¹

¹ 天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072
² 南开大学生命科学学院, 天津 300071; ³ 山西大学物理电子工程学院, 山西 太原 030006

摘要 利用波长 650 nm, 功率 5 mW 的半导体激光器照射急性分离的大鼠海马 CA3 区锥体神经细胞, 应用全细胞膜片钳技术研究其延迟整流钾通道的电流特性。实验发现, 弱激光对延迟整流钾电流 I_K 有抑制作用, 且抑制呈时间依赖性, 5min 激光抑制作用达到稳定, 抑制百分比为 $34.54\% \pm 3.22\%$ (统计样本数 $n = 15$); 弱激光对 I_K 的抑制作用还具有电压依赖性和可逆性, 对照组、照射组和恢复组最大激活电流密度分别为 429.78 ± 41.40 pA/pF, 283.26 ± 39.62 pA/pF ($n = 10$, t 检验中 $P < 0.01$) 和 397.22 ± 36.81 pA/pF ($n = 10$, $P > 0.05$); 激光作用可显著地影响 I_K 的激活过程, 对照组和照射组半数激活电压分别为 5.74 ± 1.56 mV 和 20.98 ± 8.85 mV ($n = 10$, $P < 0.01$), 斜率因子分别为 16.51 ± 6.67 mV 和 17.44 ± 5.19 mV ($n = 10$, $P > 0.05$)。结果表明, 弱激光作用海马神经细胞可以改变其延迟整流钾通道特性, 从而影响动作电位复极化过程, 调节神经细胞的生理功能, 有利于受损神经元的恢复和再生。

关键词 医用光学与生物技术; 生物刺激效应; 延迟整流钾电流; 膜片钳技术; 弱激光照射

中图分类号 Q 682; Q 631 **文献标识码** A

Effects of Low Level Laser Irradiation on Delayed Rectifier Potassium Current in Neuron Membrane

QIAO Xiao-yan^{1,3}, LI Gang¹, HE Bing-jun², LIN Ling¹

¹ College of Precision Instruments & Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China
² College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin, Shanxi 300071, China
³ College of Physics & Electronics Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract Acutely isolated rat hippocampal CA3 pyramidal neurons were irradiated with a semiconductor laser of 650 nm wavelength and 5 mW power, and properties of delayed rectifier potassium (K^+) channel were studied using the whole-cell patch clamp technique. The experiment indicated that low level laser reversibly reduced the amplitudes of I_K in a time-dependent and voltage-dependent manner. The percentage of inhibition was up to $34.54\% \pm 3.22\%$ ($n = 15$) in irradiating 5 min. The maximum activated current densities of control group, irradiation group and restoration group respectively were 429.78 ± 41.40 pA/pF, 283.26 ± 39.62 pA/pF ($n = 10$, $P < 0.01$) and 397.22 ± 36.81 pA/pF ($n = 10$, $P > 0.05$). Laser irradiation significantly affected the activation process of I_K . The half-activation voltage and the slope factor of the activation curves were also changed by the laser's exposure. The half-activation voltages of control group and irradiation group were 5.74 ± 1.56 mV and 20.98 ± 8.85 mV ($n = 10$, $P < 0.01$) respectively, and the slope factors were 16.51 ± 6.67 mV and 17.44 ± 5.19 mV ($n = 10$, $P > 0.05$) respectively. The results show that low level laser can change the properties of delayed rectifier K^+ channel. Therefore, repolarization process of action potential is affected. Further, physiological functions of neurons are

收稿日期: 2006-01-04; 收到修改稿日期: 2006-04-06

作者简介: 乔晓艳 (1970—), 女, 山西运城人, 山西大学副教授, 天津大学博士研究生, 主要从事激光生物医学、生物物理方面的研究工作。E-mail: xyqiao@sxu.edu.cn

导师简介: 李刚 (1960—), 男, 江西人, 天津大学教授, 博士生导师, 主要从事生物医学信息检测及生物物理方面的研究。E-mail: ligang59@tju.edu.cn

adjusted, which might contribute to the restoration and regeneration of injured neurons.

Key words medical optics and biotechnology; biologic effect; delayed rectifier potassium current; patch clamp technique; low level laser irradiation

1 引言

随着激光技术的发展,激光在生物医学领域的应用不断扩大,临床医学利用弱激光的生物刺激效应调整机体的免疫系统、神经系统、血液循环系统和组织代谢等功能^[1,2]。大量临床应用表明,弱激光能促进免疫反应,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和再生过程发生影响^[4,5]。Rochkind等^[6]对大白鼠的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值较未照射前显著增高。使用氩氦激光穴位照射可促进神经元恢复,推测氩氦激光通过其生物刺激作用于穴位,使穴位组织兴奋,产生的生物电沿经络传导至脑组织,促进脑电活动和神经递质的分泌,激活处于抑制状态的脑细胞,加速受损脑组织的康复^[7]。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^[5];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^[8~10]。目前临床应用的弱激光治疗仪主要有氩氦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,输出功率在几~几十毫瓦^[11]。虽然弱激光的临床应用已经很多,但弱激光的作用机制尚不清楚^[12]。一些实验无法重复,甚至出现矛盾,这给进一步的临床应用和防护带来困难。另一方面,深入到细胞分子水平的研究还很少,目前很少有从细胞膜延迟整流钾通道特性方面研究弱激光生物刺激效应的报道。现已发现许多脑部疾病都与钾通道特性改变有关,研究弱激光对中枢神经细胞膜钾离子通道特性的影响,有可能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 K^+ 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延迟整流钾通道特性的影响,为从细胞分子水平探索弱激光的作用机制开辟一条新的道路。

2 材料与方 法

2.1 材料

Wistar大鼠,鼠龄10~14天,雌雄不限,天津

药物研究院实验动物中心提供。

链霉菌蛋白酶(Pronase),Merck公司产品。河豚毒素(TTX),氯化镉($CdCl_2$),氯化四乙胺(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)和 Na_2ATP 均为Sigma公司产品。其余为国产分析纯。

孵育液(ACSF, mmol/L):NaCl 134, KCl 5, NaH_2PO_4 1.5, $MgSO_4$ 2, $CaCl_2$ 2, $NaHCO_3$ 25, 葡萄糖(Glucose) 10, HEPES 10, pH7.4;

K通道标准细胞外液(mmol/L):NaCl 130, KCl 5.4, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, 葡萄糖 10, HEPES 10, pH7.3,使用前经0.22 μm 滤膜过滤并通氧气饱和;

K通道电极内液(mmol/L):KCl 120, $CaCl_2$ 1, HEPES 10, EGTA 10, Na_2ATP 3, $MgCl_2$ 2, pH7.2,经0.22 μm 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0~4℃孵育液中迅速取出海马,分离出CA3区,手工切成400~500 μm 厚的脑片,移入连续通95% O_2 +5% CO_2 (体积分数)混合气的孵育液中,孵育50 min。之后加入Pronase,使其质量浓度为0.5 g/L,32℃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,用不同口径的巴斯德(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。分离完整的海马神经细胞在显微镜下观察,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,它可在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析

在22~25℃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,实验参数的设置、数据采集和刺激方式的施加均通过Pulse软件来控制,采样频率为20 kHz。记录用玻璃微电极(中国科学院电子所生产)经PP-830型电极拉制仪(Narrishage, Japan)两步拉制而成,充灌电极内液后,电极阻抗为2~4 M Ω 。当电极与细胞膜之间形成高阻封接(>1 G Ω)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,再进行慢电容和串联电阻补偿,串联电阻补偿为

60%~70%。

实验所用半导体激光器波长650 nm,输出功率5 mW,光斑直径3 mm,功率密度70.8 mW/cm²,激光照射距离15 cm,照射角度75°,光束从侧面入射,照射装置自行改制而成,照射示意图如图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在目标细胞上。

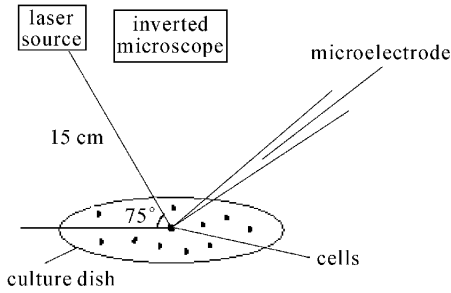


图1 激光照射示意图

Fig. 1 Schematic diagram of laser irradiation

实验结果分析采用 Igor4.04 软件和 Origin6.0 统计软件完成,数据经 P/N 漏减处理后进行统计分析,分析结果用 Mean±SD 表示,激光照射前后差异的显著性用单因方差分析和 t 检验进行分析,P < 0.05 表示有统计学差异。

3 结果分析

3.1 延迟整流钾通道电流(I_K)的记录

采用标准细胞外液和电极内液,且在外液中加入 1 μmol/L TTX 和 0.1 mmol/L 的 CdCl₂,记录海马 CA3 区锥体神经细胞膜上延迟整流钾电流。置钳制电位于 -40mV,给予脉冲幅度为 -40 ~ +50 mV,脉冲宽度160 ms,步幅+10 mV的去极化脉冲刺激电压(图 2(a)),刺激频率0.5 Hz,记录得到一组外向电流,该电流出现速度较慢,约 20~30 ms后保持稳定,在所测定的范围内不会自行失活,呈现出慢激活几乎不失活的特征(图 2(b))。由于在细胞外液中加入了 TTX 和 CdCl₂,因此钠电流、钙电流以及钙激活的钾电流被阻断,并且由于瞬时外向钾通道在膜电位为 -40 mV时失活,因此在钳制电压为 -40 mV条件下只能记录得到延迟整流钾电流 I_K。向外液中加入20 mmol/L的钾通道阻断剂 TEA-Cl后,该电流被大部分抑制(图 2(c)),证实所记录到的外向电流为延迟整流钾电流。

3.2 激光照射对 I_K 时间依赖性的影响

由于钾通道具有衰减(Rundown)现象,需要进

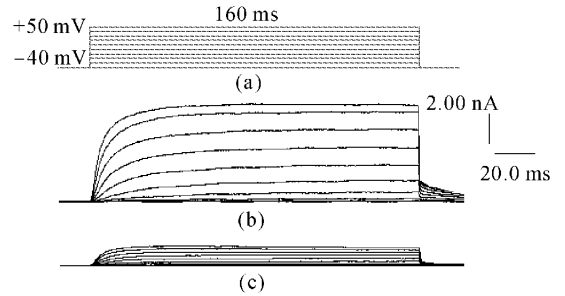


图2 海马 CA3区神经元延迟整流钾电流刺激脉冲波形(a),记录的 I_K 电流(b)和 20 mmol/L TEA-Cl 阻断后的 I_K 电流(c)

Fig. 2 Delayed rectifier potassium current in hippocampal CA3 nervous stimulation pulses (a), recorded current traces (b) and I_K blocked by 20 mmol/L TEA-Cl (c)

行时间依赖性考察^[14]。首先考察正常海马神经细胞 I_K 电流何时达到稳定,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+50 mV,脉冲宽度160 ms的去极化脉冲刺激,分别在 2,4,6,8,10 min记录不同时间的 I_K,可知 I_K 在6 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_K 达到稳定的时间区段,激光照射通道特性分析应选择该时间区段的电流进行统计分析。图 3(a)为激光作用不同时间对 I_K 电流的抑

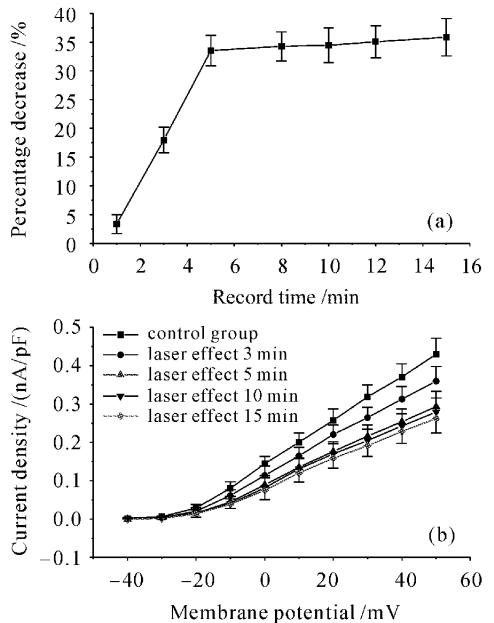


图3 激光照射不同时间对 I_K 的影响

(a) 电流抑制百分比曲线; (b) 电流 I-V 曲线

Fig. 3 Effects of laser irradiation on I_K at different times (a) inhibition percentage; (b) I-V curves of I_K

制率,激光作用达到稳定的电流抑制百分比为 $34.54\% \pm 3.22\%$ (统计样本数 $n = 15$)。图 3(b)为给予不同阶梯去极化脉冲刺激,激光作用 3, 5, 10, 15 min 时 I_K 电流的曲线。由实验结果可知,激光作用 3 min 时, I_K 有明显下降,电流抑制百分比为 $16.18\% \pm 2.87\%$ ($n = 10$)。激光作用 5 min 时,抑制作用达到平衡,抑制百分比为 $34.09\% \pm 3.45\%$ ($n = 10$)。

3.3 激光照射对延迟整流钾通道电流 $I-V$ 曲线的影响

给予相同的刺激方式,激活并记录 I_K 作为对照组。然后打开激光器,以文中 2.3 所述方式照射海马锥体神经细胞,待激光作用稳定后,以相同的去极化刺激激活并记录 I_K 作为激光照射组。最后关闭激光器停止照射,细胞恢复 3 min,再次以同样方式激活并记录 I_K 作为恢复组,记录得到的 I_K 电流变化如图 4。以不同膜电位(去极化刺激电位)为横轴,该膜电位下激活的 I_K 电流密度值(电流 / 膜电容)为纵轴,绘制通道电流的 $I-V$ 曲线(图 5)。由 $I-V$

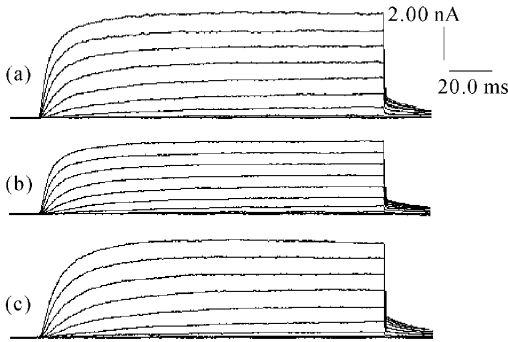


图 4 I_K 电流变化曲线

(a) 对照; (b) 激光作用 5 min; (c) 去光恢复 3 min

Fig. 4 I_K current traces

(a) control; (b) laser effect for 5 min;

(c) restoration for 3 min

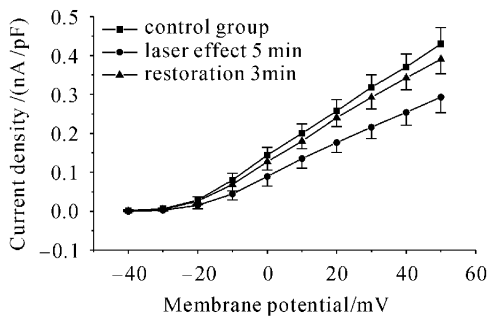


图 5 对照组、激光照射组和恢复组 I_K 的 $I-V$ 曲线

Fig. 5 $I-V$ curves of I_K from control, irradiation and restoration groups

曲线可知,激光照射可以明显抑制 I_K , 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(图 6)。对照组、照射组和恢复组的最大激活电流密度分别为 429.78 ± 41.40 pA/pF, 283.26 ± 39.62 pA/pF 和 397.22 ± 36.81 pA/pF。经 t 检验,对照组和激光照射组 I_K 在统计学上有显著性差异 ($n = 10, t$ 检验中 $P < 0.01$),对照组与恢复组 I_K 无统计学差异 ($n = 10, P > 0.05$)。由此可知,激光作用可电压依赖性地抑制延迟整流钾通道电流,而且这种抑制作用具有可逆性。

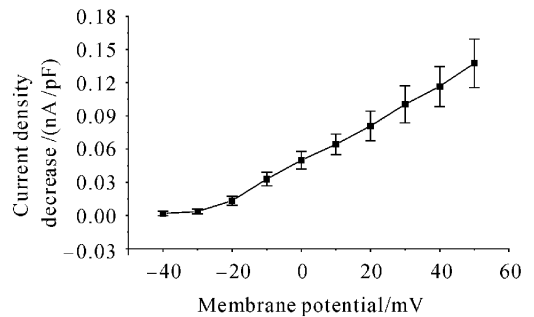


图 6 不同膜电位的电流密度抑制曲线

Fig. 6 Current density inhibition curve at different membrane potentials

3.4 激光照射对 I_K 稳态激活特性的影响

将膜电位钳制在 -40 mV, 预置 -110 mV 超极化条件刺激 200 ms, 然后从 -40 mV 起给予 10 mV 步幅递增, 160 ms 波宽的去极化测试脉冲刺激至 $+50$ mV, 刺激频率 0.5 Hz, 引出一系列延迟整流钾电流。以前述方法激光照射细胞, 照射时间 5 min, 再次记录上述电流, 然后利用公式 $G = I/V - V_{rev}$ 将电流值转换成电导值, 其中 G 为电导, V 为测试膜电

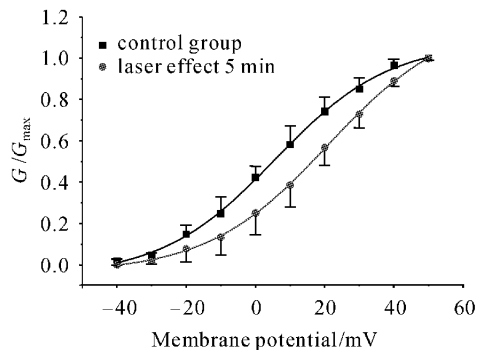


图 7 对照组和激光作用组延迟整流钾电流稳态激活曲线

Fig. 7 Effects of laser application on the steady-state activation curves of delayed rectifier K^+ current in hippocampal neurons

位, V_{rev} 为翻转电位, I 为不同膜电位下测定的电流。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 I_K 的稳态激活曲线, 如图 7 所示。所得曲线可以用玻尔兹曼 (Boltzmann) 方程 $G/G_{max} = 1/[1 + \exp(V - V_{1/2})/k]$ 拟合, 其中 $V_{1/2}$ 为半数激活电压, k 为曲线的斜率因子。由图 7 可以看出, 对照组与激光照射组激活曲线均呈 S 型。由此计算出对照组和激光照射组延迟整流钾通道的半数激活电压 $V_{1/2}$ 分别为 5.74 ± 1.56 mV 和 20.98 ± 8.85 mV ($n = 10$, $P < 0.01$), 斜率因子分别为 16.51 ± 6.67 mV 和 17.44 ± 5.19 mV ($n = 10$, $P > 0.05$)。由此可知, 激光作用可明显改变 I_K 的激活特性, 使激活曲线向去极化方向移动, 但不改变其斜率因子。

4 讨 论

实验结果表明, 波长 650 nm, 功率 5 mW 的弱激光照射, 使大鼠海马神经细胞膜延迟整流钾通道电流 I_K 的幅度受到抑制, 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, 激光照射可使 I_K 的激活曲线显著地右移, 但不改变曲线的斜率因子。说明 I_K 的激活过程受到抑制, 使得动作电位复极化过程中电压依赖性钾通道的开放延迟。由此可见, 弱激光作用是通过抑制 I_K 的激活过程, 减小大鼠海马神经元延迟整流钾电流, 使得 K^+ 外流减少, 维持神经元胞内正常的 K^+ 浓度, Ca^{2+} 水平以及 Na, K-ATP 酶和 Ca-ATP 酶的活性, 减少过氧化产物的释放, 从而调节神经系统功能紊乱, 有利于受损神经元的恢复。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实验依据。

Rochkind 等^[6]所做的激光照射使神经支配的诱发动作电位幅度改变, 由本实验的结果可解释为: 激光照射后, 由于延迟整流钾通道开关动力学特征及离子通透性发生改变, 通道开放延迟, 钾电流受到抑制。延迟整流钾通道主要参与调节动作电位的复极化过程, 决定动作电位的时程和幅度, 而诱发动作电位是许多个神经细胞发放的动作电位的整合, 从而影响诱发动作电位的幅度。

5 结 论

弱激光的生物刺激作用机制和作用靶点目前尚不明确, 仅限于一些假说。本实验从细胞膜钾离子

通道角度研究弱激光的生物刺激作用, 电压门控钾离子通道由 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 ($S_1 \sim S_6$)。钾通道的 S_4 片段是电压敏感区, 该段的几个疏水性氨基酸残基突变将导致钾通道激活曲线移动。由于弱激光光子能量与生物电场的能量相近, 激光照射会引起生物体对这种激光光子能量的吸收^[15], 使得生物电场分布发生改变, 因而导致电压门控钾离子通道特性变化。同时, 一个光子的能量可以激活 500 个转导蛋白 GT。当 GT 蛋白被激活后, α 亚基与 β 亚基脱离, 可引起细胞膜离子通道构形改变。实验结果提示弱激光的生物刺激作用与细胞膜离子通道特性及通道构形改变有关, 但还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。

参 考 文 献

- 1 Jeffrey R. Basford. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1995, 16(4): 331~342
- 2 Endre Mester, Andrew F. Mester, Adam Mester. The biomedical effects of laser application [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1985, 5(4):31~39
- 3 T. I. Karu, T. P. Ryabykh, G. E. Fedoseyeva *et al.*. Helium-neon laser induced respiratory burst of phagocytic cell [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1989, 9(3):585~588
- 4 Sandra Cristina de Souza, Egberto Munin, Leandro Procopio Alves *et al.*. Low power laser radiation at 685 nm stimulates stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* during regeneration [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2005, 80(3): 203~207
- 5 Yoram Wollman, Semion Rochkind, Rabi Simantov. Low power laser irradiation enhances migration and neurite sprouting of cultured rat embryonal brain cells [J]. *Neurol Res.*, 1996, 18(5):467~470
- 6 Semion Rochkind, Morris Rousso, Moshe Nissan *et al.*. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds and burns [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1989, 9(2):174~182
- 7 Zhao Xiaoning, Wang Yu, Tao Yanmei *et al.*. Protective effect of the low level He-Ne laser on damaged neurons of mice induced by excitatory neurotoxin [J]. *Chin. J. Laser Med. Surg.*, 1999, 8(4):220~224
赵晓宁, 王 瑜, 陶艳梅 等. 低强度 He-Ne 激光对兴奋性神经毒素所致小鼠神经元损伤的防护作用[J]. *中国激光医学杂志*, 1999, 8(4):220~224
- 8 T. Karu, L. Pyatibrat, G. Kalendo. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1995, 27(3):219~223
- 9 Mi Xianqiang, Cen Yan, Zhou Zhengyi *et al.*. The in vitro effects of low power laser irradiation animal erythrocyte rheology [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, 31(7):888~892
宓现强, 岑 刻, 周正谊 等. 低强度激光照射对离体动物红细胞流变学性质的影响[J]. *中国激光*, 2004, 31(7):888~892
- 10 Lan Xiufeng, Liu Xiaoran, Wang Yawei *et al.*. Physical analysis of intravascular low-reaction-level laser irradiation therapy decreasing the aggregate degree of erythrocyte [J]. *Chinese J. Lasers*, 2000, A27(5):477~480

- 兰秀凤, 刘晓然, 王亚伟 等. 弱激光血管内照射改善红细胞聚集能力的物理机理研究[J]. 中国激光, 2000, **A27**(5): 477~480
- 11 Luo Xiaosen, Ni Xiaowu, Lu Jian *et al.*. Study of fluorescent spectrum of blood induced by lights of different wavelengths [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(1): 93~96
- 12 骆晓森, 倪晓武, 陆建 等. 不同波长光照射血液诱发的荧光光谱研究[J]. 中国激光, 2003, **30**(1): 93~96
- 13 Tiina Karu. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1999, **49**(1): 1~17
- 13 Ben-Dev Zou, Yu-Zhen Chen, Cai-Hong Wu *et al.*. Blockade of U50488H on sodium currents in acutely isolated mice hippocampal CA3 pyramidal neurons [J]. *Brain Research*, 2000, **855**: 132~136
- 14 He Bingjun, Liu Anxi, Chen Jiatong *et al.*. Effects of cyhalothrin on the sodium and calcium channels in central neurons of *helioverpa armigera* [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2002, **18**(2): 201~205
- 贺秉军, 刘安西, 陈家童 等. 三氟氯氰菊酯对棉铃虫神经细胞钠及钙通道作用机理研究[J]. 生物物理学报, 2002, **18**(2): 201~205
- 15 Tiina Karu, Olga Tiphlova, Rinat Esenaliev *et al.*. Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effects on *Escherichia coli* [J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1994, **24**(3): 155~161