

重复膜片钳法研究 MPP^+ 对神经元钙电流作用*

蔡 东¹⁾ 王晓民 瞿安连¹⁾ 韩松平²⁾ 于英心 周 专¹⁾ 康华光¹⁾ 韩济生³⁾

(北京医科大学神经科学研究中心, 北京 100083)

摘要 细胞膜片钳技术是研究膜离子通道的有效方法. 在单个细胞上反复形成多次全细胞构型从而在同一细胞上观察某些药物的长时间作用对于通道膜电流的影响. 利用全细胞构型下胞浆与电极内液的连通可以方便地向胞内引入药物. 以此法研究 MPP^+ 多巴胺能神经瘤细胞 (MN9D) 的毒性作用表明 MPP^+ 导致细胞电压依赖性钙电流 (I_{Ca}) 显著下降; MPP^+ 作用 1 h 以内高去极化电压较低去极化电压诱发的钙电流先受 MPP^+ 影响而下降; MPP^+ 对未分化细胞的钙电流无显著作用 ($n=3$).

关键词 钙电流, 膜片钳, MPP^+ , MN9D 细胞, 帕金森氏病

学科分类号 Q424

目前人们对于膜离子通道以及离子通道相耦联的膜外和膜内信使物质生理特性的研究多以膜片钳 (patch clamp) 技术为手段. 在各种离子通道电流中, 钙电流尤其重要, 因为钙离子的流入直接导致包括神经递质分泌在内的一系列细胞反应^[1]. 胞浆内的多种生理物质 (如 cAMP, GTP, PKA, PKC 以及 Ca^{2+} 等) 对膜离子通道具有调控作用. 如果长时间进行全细胞模式记录, 会因胞内物质向电极内扩散流失而导致严重的钙电流退减 (run down) 现象. 1-甲基-4-苯基吡啶 (1-methyl-4-phenylpyridium, MPP^+) 是外源性毒素 N-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP) 被神经细胞摄取后所产生的有活性的毒性基团. 它可被中脑多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元特异性摄取, 从胞内损伤细胞, 最终导致人和动物产生帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 样症状^[2]. MPP^+ 毒性机理是当前 PD 研究中的热点, 但由于其作用较缓慢, 因而无法用常规膜片钳方法观察它对于膜通道电流的影响. 本文报道采用重复膜片钳方法在单细胞上研究 MPP^+ 在胞内长达 1 h 的作用过程中 I_{Ca} 的变化.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

细胞采用多巴胺能神经细胞系 MN9D^[3], 其培养基为 DMEM (Sigma 公司), 附加 10% FBS, 80 U/ml 青霉素和链霉素, pH 7.3. 传代前将涂以 poly-(D)-lysine 的盖玻片 (0.5 cm × 0.5 cm) 数块放入 35 mm 培养皿中. 控制细胞传代密度为 70 000/皿, 培养液中加入分化剂丁酸钠 (sodium

butyrate, 1 mmol/L). 于 37℃, 10% CO_2 孵箱中培养至 6~8d, 隔天换液. 以下除特殊说明, 实验所用 MN9D 细胞为分化细胞.

1.2 实验溶液

为尽可能减少电极内液对胞内成分尤其是线粒体造成的不利影响, 依文献 [4, 5] 选择电极内液. 其成分为: Cs_2SO_4 75 mmol/L; CsCl 15 mmol/L; NaCl 6.5 mmol/L; 丙酮酸钠 (sodium pyruvate) 2.5 mmol/L; L-(-)-苹果酸 (L-(-)-malic acid) 2.5 mmol/L; NaH_2PO_4 1 mmol/L; $MgSO_4$ 1 mmol/L; HEPES 50 mmol/L; $MgATP$ 5 mmol/L; GTP 0.3 mmol/L; leupeptin 0.1 mmol/L; cAMP 0.5 mmol/L; 用 CsOH 校定 pH 为 7.3; 用葡萄糖 (glucose) 调节渗透压至 307 mOsm/kg H_2O .

细胞外液的成分为: NaCl 140 mmol/L; KCl 2.8 mmol/L; TEA · Cl 10 mmol/L; $CaCl_2$ 10 mmol/L; $MgCl_2$ 1 mmol/L; HEPES 10 mmol/L; 用 NaOH 校定 pH 为 7.4; 用葡萄糖 (glucose) 调节渗透压至 314 mOsm/kg H_2O .

每次实验的所有溶液均为新鲜配制. 实验前细胞外液中补加 0.5 μ mol/L TTX 以阻断 Na^+ 通道电流.

1.3 电生理实验

采用 EPC-9 膜片钳放大器及其数据采集软件 Pulse+ PulseFit7.63 (HEKA, Germany), 全细胞

* 国家自然科学基金 (39480008, 69571014, 39525009), 国家教委跨世纪优秀人才计划与北美医学基金会资助.

¹⁾ 华中理工大学生物物理与生物化学研究所, 武汉 430074.

²⁾ Department of Pharmacology and Physiology Science, Saint Louis University School of Medicine, Saint Louis, MO 63104, USA.

³⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-12-12, 修回日期: 1998-06-08

电压钳的方式记录. 去极化刺激脉冲宽 50 ms, 保持电位- 80 mV, 两次脉冲之间间隔 5 s. 玻璃电极平均入水电阻约 4M Ω .

MPP⁺ 来自美国 RBI 公司产品碘化 1-甲基-4-苯基吡啶 (1-methyl-4-phenylpyridium iodine, MPPI). 由于 MPP⁺ 易被氧化, 故配制溶液需冰浴避光操作. MPP⁺ 引入细胞有多种方法. 第一种方法是将细胞置于含 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 的培养液中孵育 1 h; 第二种为膜片钳电极注射. 为了将 MPP⁺ 注射进细胞内, 对每一个新鲜细胞, 第一根膜片钳电极的内液中含有 MPP⁺. 当形成全细胞构型后, MPP⁺ 会向胞内自由扩散, 若时间足够长, 胞内与电极内 MPP⁺ 的浓度会趋于相等. 实验中取注射时间为 100 s 左右^[6].

对同一细胞共进行三次全细胞膜片钳操作, 第一次要向胞内注射 MPP⁺, 此时记录的钙电流即作为 MPP⁺ 作用 0 时刻数据点, 100 s 后将电极移开, 形成 outside-out 膜片构型. 细胞一般仍然存活并仍

然贴附在培养皿底面上. 其他两次膜片钳选在注射 MPP⁺ 后 30 min 和 60 min. 当电极从细胞上取下时需通过微操纵器控制缓慢将电极提起. 镜下可见细胞由于牵拉会有一定的形变并可很快恢复. 实验观察表明下次封接点在胞体上的位置对于所记录的电流值无明显影响.

2 结 果

2.1 MPP⁺ 胞外作用 1 h 使钙电流下降

选择 MPP⁺ 实验剂量为 400 $\mu\text{mol/L}$, 作用时间为胞外孵育 1 h.

结果如表 1 所示. 将加药组和对照组的钙电流换算为最大钙电流密度 I_{max}/C_m , 即最大钙电流与膜电容 (补偿后的慢电容值) 之比, 以便于不同细胞之间的比较^[7]. 正常对照组 I_{max}/C_m 为 (11.40 $\pm$ 1.04) pA/pF, 而经 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 处理 1 h 后 I_{max}/C_m 降至 (6.86 $\pm$ 0.69) pA/pF ($n = 13$), $P < 0.01$, 说明 MPP⁺ 可使钙电流显著降低.

表 1 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 使 MN9D 细胞最大钙电流密度下降

编号	对照			MPP ⁺		
	$I_{\text{Ca}^{2+}} \text{ max/pA}$	C_m/pF	钙电流密度 (pA/pF)	$I_{\text{Ca}^{2+}} \text{ max/pA}$	C_m/pF	钙电流密度 (pA/pF)
1	- 302.16	44.24	- 6.83	- 532.63	51.44	- 10.35
2	- 299.74	52.64	- 5.69	- 438.07	52.08	- 8.41
3	- 409.04	49.87	- 8.20	- 394.02	69.39	- 5.68
4	- 649.85	58.13	- 11.18	- 279.65	43.44	- 6.44
5	- 570.14	29.03	- 19.64	- 604.57	48.98	- 12.34
6	- 330.83	36.18	- 9.14	- 390.33	58.44	- 6.68
7	- 676.79	63.73	- 10.62	- 203.10	40.34	- 5.03
8	- 409.21	31.65	- 12.93	- 309.13	73.95	- 4.18
9	- 419.21	30.89	- 13.57	- 360.01	64.91	- 5.55
10	- 451.56	30.55	- 14.78	- 367.22	51.53	- 7.13
11	- 704.92	71.19	- 9.90	- 311.77	83.68	- 3.73
12	- 509.60	45.36	- 11.23	- 488.40	56.30	- 8.67
13	- 480.14	33.04	- 14.53	- 175.83	35.12	- 5.01
$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$			- 11.40 $\pm$ 1.04			- 6.86 $\pm$ 0.69

对照与 MPP⁺ 处理组的钙电流均换算为钙电流密度 (density), 即钙电流最大值 (maximum I_{Ca}) 与细胞膜电容 (C_m) 之比. 膜电位钳制于- 80 mV, 去极化电位从- 40 mV 到 40 mV 每隔 10 mV 阶跃. 钙电流最大值为脉冲系列所激活的最大钙电流峰值. 采用 student t 试验作显著性分析, $P < 0.01$.

2.2 MPP⁺ 的影响时程与去极化电压有关

电极内液中未加入 MPP⁺ 时, 重复膜片钳记录的 MN9D 细胞的电压依赖性钙电流如图 1a 所示. 当胞内注射 40 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 后再用重复膜片钳便

可发现其电流明显下降 (图 1b). 实验进一步发现, MPP⁺ 导致的钙电流衰减现象与去极化电压有关, 特别是在去极化电压分别为- 10 mV 和 10 mV 时的钙电流 $I_{-10 \text{ mV}}$ 和 $I_{10 \text{ mV}}$ 上有明显差别. 图 1c 是

对 6 个细胞 $I_{-10\text{ mV}}$ 和 $I_{10\text{ mV}}$ 所作的时程统计图. 为便于比较, 各时程点上的电流值均换算为相对于零时刻的比例值. 由图 1 可见, 30 min 时 $I_{-10\text{ mV}}$ 下降不足 6%, $I_{10\text{ mV}}$ 下降了 $26.3\% \pm 5.1\%$; 在 60 min 时 $I_{-10\text{ mV}}$ 下降 $19.0\% \pm 4.3\%$, 而 $I_{10\text{ mV}}$ 下降 $37.1\% \pm 4.9\%$. 表明高电压诱发的钙电流受 MPP^+ 的抑制程度强, 且其变化在时程上超前于低电压诱发的钙电流.

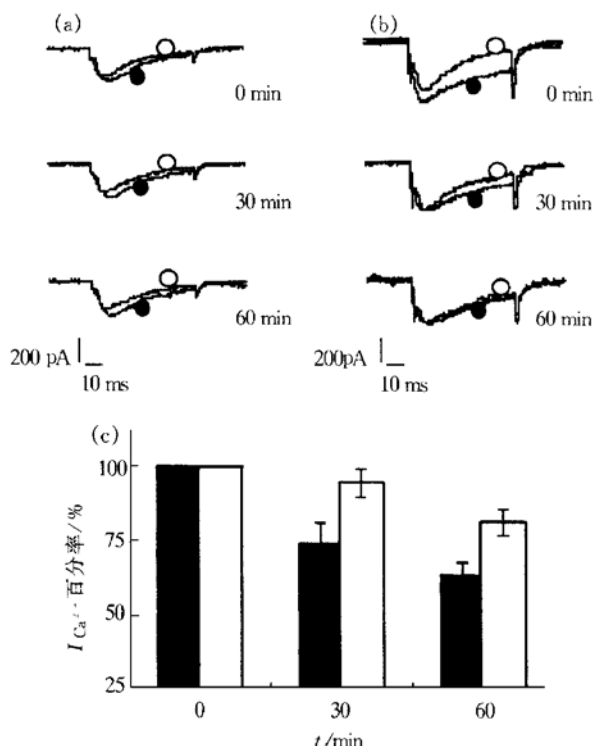


图 1 胞内注射 MPP^+ ($40\text{ }\mu\text{mol/L}$) 对电压依赖性钙电流的影响 (a) 重复膜片钳的对照实验. 图中所示为 0, 30 min, 60 min 时三次全细胞记录的 $I_{-10\text{ mV}}$ 和 $I_{10\text{ mV}}$. 每一时刻记录完毕后便将膜片钳电极从细胞上取走, 等到下时刻重新进行封接和全细胞记录. 两次记录之间不会有胞内物质流失; (b) 实验过程同 (a), 只是在 0 min 时将 MPP^+ 注射到了胞内. A、B 中 $\circ$ 和 $\bullet$ 分别指 $I_{-10\text{ mV}}$ 和 $I_{10\text{ mV}}$. 膜电位钳制在 -80 mV , 脉宽为 50 ms ; (c) MPP^+ 对 $I_{-10\text{ mV}}$ 和 $I_{10\text{ mV}}$ 的作用时程. 图中数据表示为对于 0 min 时 $I_{-10\text{ mV}}$ 和 $I_{10\text{ mV}}$ 的归一值. $\square$ 与 $\blacksquare$ 代表 $I_{-10\text{ mV}}$ 和 $I_{10\text{ mV}}$; $n = 6$.

2.3 MPP^+ 对未分化细胞无显著作用

图 2 显示一例未分化细胞 $I_{-10\text{ mV}}$ 及 $I_{10\text{ mV}}$ 在注射 $40\text{ }\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 后零时刻、30 min 和 60 min 时分别为 74.63 pA 、 69.60 pA 、 73.52 pA 和 57.85 、 55.36 pA 、 54.72 pA . 可见 $I_{-10\text{ mV}}$ 及 $I_{10\text{ mV}}$ 改变很小. 也就是说, 胞内注射 MPP^+ 对未分化 MN9D 的钙电流不产生显著影响. 在全部三

例试验细胞上的数据均支持这一结论. 本实验提示存在与细胞发育阶段相关的因子, 该因子可以减轻或抵抗 MPP^+ 介导的钙超载.

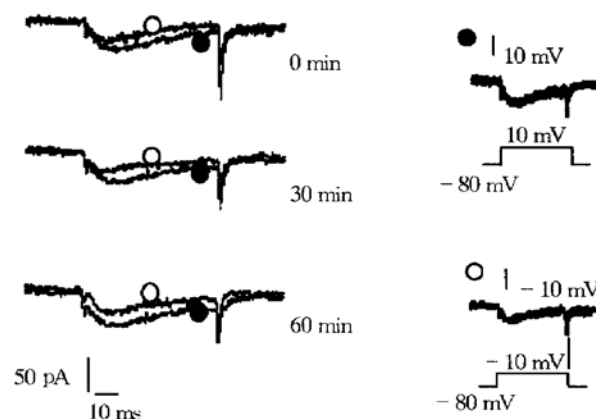


图 2 MPP^+ 作用下未分化 MN9D 细胞的电压依赖性钙电流. 本图与图 1 实验方法完全相同, 数据取自同一个未分化的 MN9D 细胞. 所示的电流图形在相对于向细胞内注射 MPP^+ 的零时刻、30 min 和 60 min 三个时间点得到. 为了便于对照, 框中对三个时刻的 $I_{-10\text{ mV}}$ 和 $I_{10\text{ mV}}$ 作了迭加对照.

$\bullet$: $I_{10\text{ mV}}$; $\circ$: $I_{-10\text{ mV}}$.

3 讨 论

众所周知, 由膜离子通道电流所形成的细胞电信号的发生与整合是神经细胞重要的生理功能. 这些信号是神经元内部和神经元间的相互联系和相互作用的基础. 因此如果要研究细胞作为一个与其他细胞存在广泛联系的有机整体去探讨它在某种外界因素下的生理状况, 此因素所导致的离子通道电流的变化是至关重要的. 然而有时这种影响要在一个缓慢的胞内作用过程之后方才出现, 所以其变化只能通过重复膜片钳方法去研究. Zhou 等^[8]最早于 1993 年报道使用重复膜片钳方法向胞内加载 Fura2 并研究大鼠肾上腺嗜铬细胞的钙缓冲力. 1996 年 Chen 等^[6]用这种方法向胞内导入 antisense 确定了生长素释放抑制因子受体与钾通道之间耦联 G 蛋白的类型. 本文在 Zhou 等二次膜片钳方法基础上, 在同一细胞上使用三次重复膜片钳记录. 我们以膜片钳记录数据说明了 MPP^+ 作用后钙通道电流下降时程.

其他研究表明 MPP^+ 可直接损伤线粒体产生自由基导致胞内钙平衡失调与钙超载^[1,9]. 本研究中观察到了钙电流下降. 这可能是胞内钙超载使钙通道钙依赖性失活所致. 从图 1c 看, 胞内注射 MPP^+ 1 h 内钙电流整体呈现一种下降趋势. 其中

$I_{10\text{ mV}}$ 在注射 60 min 后下降约 37%，与表 1 所列孵育结果（下降约 40%）大致吻合。总体而言，从零时刻到 MPP⁺ 处理后 60 min 内， $I_{10\text{ mV}}$ 为去极化脉冲所诱发的最大电流。在 MPP⁺ 引起的钙电流变化中，不同去极化电压诱发的钙电流的下降时程与下降幅度有明显区别（图 1）。提示这其中可能包含着不同的 MPP⁺ 毒理机制。今后实验需对本实验模型细胞上高、低电压诱发的钙电流的差别，如通道成分、电流的空间分布等细节进行分析。

MPP⁺ 1 h 量效显示 4 mmol/L 时钙电流的抑制与 400 $\mu\text{mol/L}$ 相近但细胞更表现为其他的损伤，如皱缩，膜无弹性等，对细胞进行膜片钳已较困难，而在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时变化则不明显。由于 MPP⁺ 主要是被 DA 神经元摄取到胞内而起作用^[2]，所以用胞内注射与胞外孵育对细胞进行损伤在机制上很可能是一致的。由于 MPP⁺ 从胞外摄取到胞内后 MPP⁺ 在胞浆中的浓度势必低于胞外浓度，所以我们选用胞内注射浓度是胞外孵育浓度的 1/10，即 40 $\mu\text{mol/L}$ 。

关于未分化细胞和分化细胞对 MPP⁺ 反应差异的机理尚待深入探讨。有文献报道 MPTP 在老年小鼠上的毒性反应比未成年小鼠明显^[10]，其中的机制与本文结果可能有相关之处。因而对该问题的研究有助于对神经退行性疾病致病机理的深入认识。

参 考 文 献

- 1 Chow R H, Ruden L V. 11th chapter of single channel recording. In: Sankmann B eds. *Electrochemical Detection of Secretion*. Plenum Press. 1995, 245~ 275
- 2 Gerlach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm*, 1996, **103** (8~ 9): 987~ 1041
- 3 Choi H K, Won L, Kontur P J, *et al.* immortalization of embryonic mesencephalic dopaminergic neurons by somatic cell fusion. *Brain Res*, 1991, **552** (1): 67~ 76
- 4 Park Y B, Herrington J, Babcock D F, *et al.* Ca^{2+} clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol*, 1996, **492** (Pt2): 329~ 346
- 5 Herrington J, Park Y B, Babcock D F, *et al.* Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca^{2+} loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron*, 1996, **16** (1): 219~ 228
- 6 Chen C H, Clarke I J. G α 2 protein mediates the reduction in Ca^{2+} currents by somatostatin in cultured ovine somatotrophs. *J Physiol*, 1996, **491** (Pt1): 21~ 29
- 7 Satoh H, Delbridge L, Blatter L, *et al.* Surface: volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscope and membrane capacitance measurement. *Biophys J*, 1996, **70** (3): 1494~ 1454
- 8 Zhou Z, Neher E. Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol*, 1993, **469** (2): 245~ 273
- 9 Frei B, Richter Ch. N-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) together with 6-hydroxydopamine or dopamine stimulates Ca^{2+} release from mitochondria. *FEBS Lett*, 1986, **198** (1): 99~ 102
- 10 Date I, Felten D L, Felten S Y. Long-term effect of MPTP in the mouse brain in relation to aging: neurochemical and immunocytochemical analysis. *Brain Res*, 1990, **519** (1~ 2): 266~ 276

Investigation of the Effect of MPP⁺ on Calcium Current of MN9D Cells with Repatched Whole Cell Method. CAI Dong¹⁾, WANG Xiao-Min, QU Ai-Lian¹⁾, HAN Song-Ping²⁾, YU Ying-Xin, ZHOU Zhuan¹⁾, KANG Hua-Guang¹⁾, HAN Ji-Sheng (*Neuroscience Research Center, Beijing Medical University, Beijing 100083, China; ¹⁾ Institute of Biophysics and Biochemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; ²⁾ Department of Pharmacology and Physiology Science, Saint Louis University School of Medicine, Saint Louis, MO 63104, USA*).

Abstract Patch clamp is a useful method to study ion channels in cell membrane. By means of repatched whole cell, it becomes available to monitor the long term effect of some kinds of reagents on ion currents of a single cell without wash-out problem. After the cell was whole cell patched, drugs can be conveniently dialyzed into the cell from the pipette. The neurotoxicity of MPP⁺ in dopaminergic neuronal cell line (MN9D) was investigated with repatched whole cell method. It was found that the voltage dependent calcium current (I_{Ca}) was significantly suppressed in differentiated cells and I_{Ca} induced by high depolarizing pulse decreased earlier than that induced by low depolarizing pulse during MPP⁺ treating for up to 1 h. In undifferentiated cells, no apparent change happened under the same condition.

Key words calcium current, patch clamp, MPP⁺, MN9D cell, Parkinson's disease