

成年大鼠海马 CA1 区锥体神经元 外向整流氯离子单通道特性*

李建国^{1,2)} 李晓明¹⁾ 胡 平¹⁾ 王 颖¹⁾ 李晓文¹⁾ 乔健天²⁾ 高天明¹⁾**

(¹⁾第一军医大学解剖学教研室, 生理教研室, 广州 510515; ²⁾山西医科大学生理教研室, 太原 030001)

摘要 采用膜片钳内面向外式技术, 在急性分离成年大鼠海马 CA1 区锥体细胞上记录到了外向整流氯离子通道 (outwardly rectifying chloride channel, ORCC). 长时间去极化 (≥ 60 mV) 刺激后, 在 30% 的游离膜片上记录到有外向整流特性的单通道氯电流, 膜电位在 -60 mV 到 0 mV 之间的单通道电导为 (16.58 ± 1.54) pS ($n=10$), 而在 0 mV 到 +60 mV 之间电导为 (40.92 ± 3.17) pS. 通道开放概率有明显的电压依赖性 (膜电位 -60 mV 时, $P_o = 0.44 \pm 0.12$; 膜电位为 +60 mV 时, $P_o = 0.86 \pm 0.06$, $n=10$). 在对称 Cl^- 浓度 (150 mmol/L) 时, 通道翻转电位为 (-4.17 ± 1.84) mV. 当溶液中部分 NaCl 被葡萄糖酸钠替代后, 翻转电位为: (-34.23 ± 4.86) mV ($[\text{Cl}^-]_i / [\text{Cl}^-]_o = (30 \text{ mmol/L}) / (150 \text{ mmol/L})$), 接近氯离子通道的理论值, 这表明通道具有氯离子选择性. 浴槽液中分别加入氯通道阻断剂 DIDS 和 SITS 可以使 +40 mV 的通道开放概率从 (0.83 ± 0.06) 和 (0.86 ± 0.06) 分别降低到 (0.12 ± 0.05) 和 (0.13 ± 0.04) ($n=5$), 冲洗后可使开放概率基本恢复. 上述研究结果显示, 在成年大鼠海马 CA1 神经元上存在外向整流氯离子通道.

关键词 氯离子通道, 膜片钳, 海马, 大鼠

学科分类号 Q424

Cl^- 是生物体内含量最多的阴离子, 氯通道参与了跨细胞膜和细胞器膜 Cl^- 的转运. 氯通道种类众多, 分布广泛, 参与了细胞多项生理功能的调控, 如调节细胞兴奋性、跨上皮细胞膜物质转运、细胞容积调控、细胞分化等^[1].

外向整流氯离子通道 (outwardly rectifying chloride channels, ORCC) 是一类中电导氯通道, 广泛分布于上皮细胞、神经胶质细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、心肌细胞等多种组织细胞^[2~4]. 最近 Szabo 等^[5]发现, 外向整流氯离子通道参与了 CD-95 诱导的 T 淋巴细胞凋亡过程. 给予 DIDS、NPPB 等氯通道阻断剂, 能够抑制由 STS 或 $\text{TNF}\alpha$ /CHX 诱导的多种细胞 (HeLa、U937、NG108-15 和 PC12 细胞) 的凋亡^[6]. 短暂性前脑缺血可引起成年大鼠海马 CA1 区锥体神经元出现凋亡^[7], 要阐明氯通道在缺血后海马 CA1 区锥体神经元凋亡中的作用, 有必要首先对这些神经元的外向整流氯离子通道有较清楚的认识. 为此, 本文观察了在成年大鼠海马 CA1 区锥体神经元上是否有外向整流氯离子通道, 并对其单通道特性进行了系统的研究.

1 材料和方法

1.1 脑片的制备与神经元的急性分离

按我们以往报道的方法进行神经细胞的急性分

离^[8~10]. 实验采用成年雄性 Wistar 大鼠 (180 ~ 220 g), 麻醉后 (水合氯醛 40×10^{-2} mg/g) 迅速断头取脑, 用振动切片机 (MA752-045, World Precision Instruments, 英国) 切成 400 μm 厚的脑片. 将切好的脑片置于通以 95% O_2 + 5% CO_2 混合气的 EBSS 液中孵育 1 ~ 6 h, 然后分离海马 CA1 区组织并放入用 100% O_2 饱和的 HBSS 液中用链蛋白酶 (protease XIV, 1.1 ~ 1.4 g/L) 消化 30 ~ 45 min, 控制温度为 33 $^{\circ}\text{C}$, 置于低 Ca^{2+} 的羟乙基磺酸钠缓冲液中吹打成细胞悬液备用, 实验选用形态饱满的锥形或梭形、有顶树突和基树突特征的锥体细胞进行记录.

1.2 单通道电流记录与数据分析

通过显微镜 (DMLFS, LEICA, 德国) 的观察, 用微电极操纵器 (PCS-5000, Burleigh, 美国) 驱动玻璃微电极接近锥体细胞, 在微电极尖端刚与细胞膜接触时稍加负压形成高阻密封 (封接电阻大于 5 G Ω), 电阻为 8 ~ 12 M Ω . 单通道电流经膜片钳放大器 (Axopatch 200B, Axon Instruments, 美国)

* 国家杰出青年基金 (30125013)、军队杰出青年基金 (01J009)、广东省自然科学基金团队项目 (10717) 和教育部长江学者奖励计划资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-61648216, E-mail: tgao@fimmu.com

收稿日期: 2003-03-18, 接受日期: 2003-04-30

由 A/D 转换系统 (Digidata 1320, Axon Instruments, 美国) 以 5 kHz 频率采集, 低通滤波为 1 kHz. 数据采集、分析使用 pClamp 8.0 软件 (Axon Instruments, USA). 测量通道开关事件的时间分辨率为 300 μ s, 通道的开放概率 (open probability, P_o) 由公式 $NP_o = \sum \{t_1 + 2t_2 + 3t_3 + \dots + nt_n\}$ 得出, 其中 n 为通道开放级数, $t_1, t_2, \dots, t_n$ 为各级开放中通道开放的时间在总时间中所占的比例. 单通道的电流-电压关系曲线由二次方程式拟和, 单通道电导由一定范围内做线性回归得到. 实验记录时环境温度在 20 ~ 22 $^{\circ}$ C.

1.3 溶液和试剂

羟乙基磺酸钠缓冲液成分为: 羟乙基磺酸钠 140 mmol/L, KCl 2 mmol/L, MgCl₂ 4 mmol/L, CaCl₂ 0.1 mmol/L, 葡萄糖 23 mmol/L, HEPES 15 mmol/L, 用 1 mol/L NaOH 将 pH 值调定为 7.35. 浴槽液和电极内液成分为: NaCl 150 mmol/L, CaCl₂ 2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, pH 7.4, 在部分实验中选用葡萄糖酸钠替代 NaCl 来改变细胞膜两侧 Cl⁻ 浓度. DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid)、SITS (4-acetamido-4-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid)、链霉蛋白酶、HEPES、EBSS、HBSS、羟乙基磺酸钠均为 Sigma 公司 (美国) 产品, 其他为国产分析纯试剂.

1.4 统计学处理

全部数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计分析采用配对

t 检验, $P < 0.05$ 认为有显著性差异.

2 结 果

2.1 单通道电流记录

在对称 Cl⁻ 浓度 (150 mmol/L) / (150 mmol/L) 的情况下, 采用膜片钳内面向外式记录技术, 在 30% (65/215) 的游离膜片中记录到外向整流氯离子通道. 单通道主要由长时间去极化激活, 也有少数为自动激活. 本实验使用阶跃电压刺激程序与 Tabcharani 等^[11] 基本相同. 在形成游离膜片后, 维持膜电位在 -30 mV 并持续 2 min, 如果有单通道电流活动则认为自动激活, 本实验只记录到 4 例. 否则, 将膜电位去极化到 +60 mV 并持续 3 min, 如果仍无电流活动, 则采取以下步骤激活通道: 改变钳制电位从 -60 mV 阶跃到 +60 mV (每次 15 s, 共 4 次), 或从 -90 mV 阶跃到 +90 mV, 或从 -120 mV 阶跃到 +120 mV. 仍然没有单通道活动的膜片则认为不含有外向整流氯离子通道.

图 1 为外向整流氯离子单通道电流图及其电流-电压关系曲线, 从图 1 中可以看出通道具有外向整流特性. 在 -60 ~ 0 mV 范围 (内向电流) 的单通道电导为 (16.58 ± 1.54) pS ($n = 10$); 在 0 ~ +60 mV 范围 (外向电流) 的电导为 (40.92 ± 3.17) pS. 通道多呈一级开放, 并且很少有其他类型通道电流的活动.

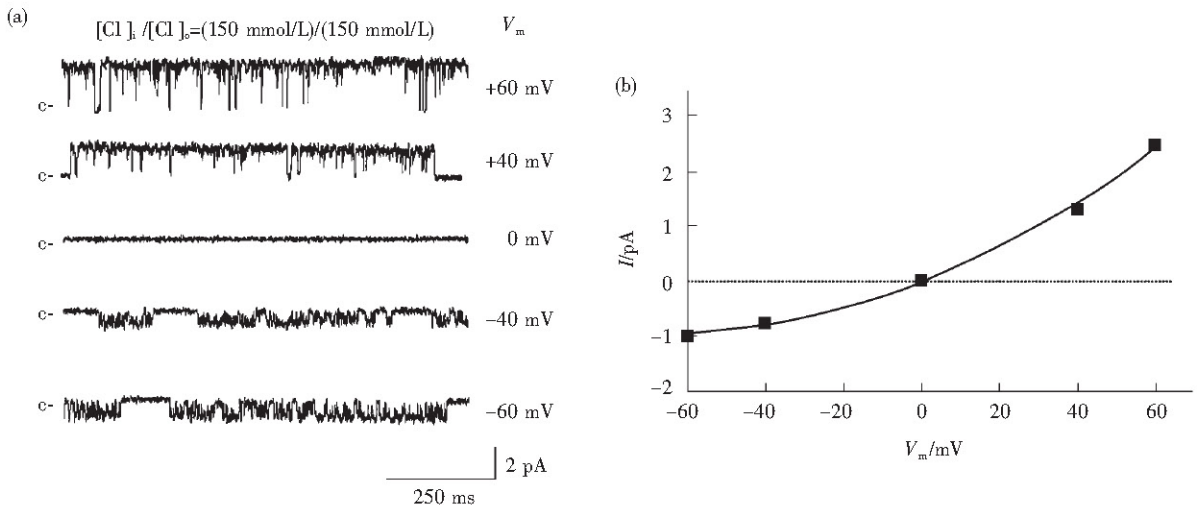


Fig. 1 Relation between currents and membrane potentials of outwardly rectifying chloride channel (ORCC)

(a) Single channel currents of ORCC in inside-out patches from acutely dissociated adult rat hippocampal CA1 pyramidal neurons in symmetrical 150 mmol/L NaCl solution. Voltage given are membrane potential (V_m), "c-" denotes the closed level in all figures. (b) Current-voltage relationship. Continuous line is the best fit to the dots. Slope conductance was (16.58 ± 1.54) pS between -60 mV and 0 mV, and (40.92 ± 3.17) pS between 0 mV and 60 mV ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$).

2.2 单通道动力学分析

通道的开放概率有明显的电压依赖性 (图 2). 膜电位 -60 mV 时, 通道开放概率为 (0.44 ± 0.12) ; 膜电位为 $+60\text{ mV}$ 时为 (0.86 ± 0.06) ($n = 10$). 在 $-60 \sim +60\text{ mV}$ 范围内, 通道开放概率变化符合 Boltzmann 曲线, 随去极化程度增加而增大.

2.3 通道的离子选择性分析

图 3 为 Cl^- 被葡萄糖酸部分替代前后单通道电流的变化. 在对称 Cl^- 浓度 (150 mmol/L) / (150 mmol/L) 情况下, 翻转电位为 $(-4.17 \pm 1.84)\text{ mV}$ ($n = 10$, 图 3b). 当浴槽液 (细胞内侧) Cl^- 浓度下降到 30 mmol/L 后, 电流-电压关系曲线向左移动, 翻转电位为 $(-34.23 \pm 4.86)\text{ mV}$ ($n = 5$, 图 3a, b), 接近通道翻转电位的理论值, 表明通道具有 Cl^- 选择性.

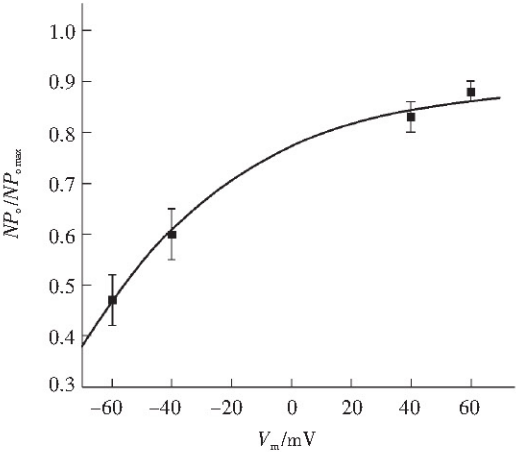


Fig. 2 Voltage dependence of open probability (P_o) for the ORCC

Continuous line is the best fit to the dots ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$).

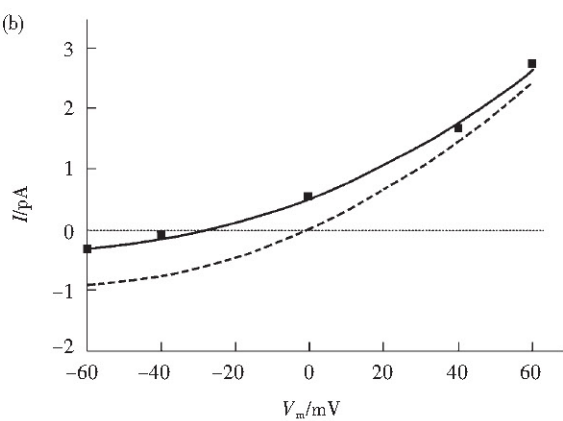
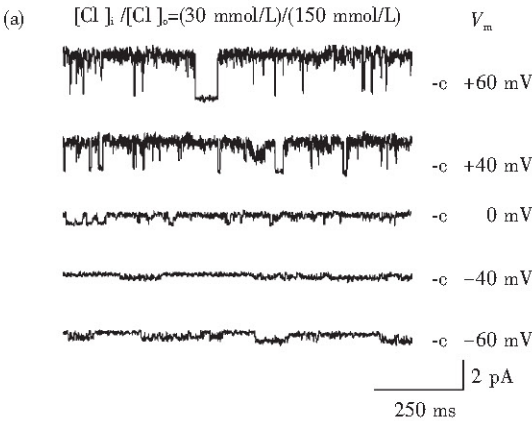


Fig. 3 Cl^- selectivity of ORCC

(a) Currents recorded from a patch exposed to 30 mmol/L Cl^- in the bath and 150 mmol/L Cl^- in the pipette solution. (b) Current-voltage relationship for the channels recorded in symmetrical and asymmetrical Cl^- . Dashed line shows the data in $[\text{Cl}^-]_i / [\text{Cl}^-]_o = (150\text{ mmol/L}) / (150\text{ mmol/L})$ Cl^- solution. ■ represent the data in $(30\text{ mmol/L}) / (150\text{ mmol/L}) \text{Cl}^-$ solutions.

2.4 氯通道阻断剂的作用

在浴槽液中加入 1 mmol/L DIDS 能够可逆性阻断外向整流氯离子通道. 在 $+40\text{ mV}$ 膜电位下, 通道开放概率从 (0.83 ± 0.06) 下降到 (0.12 ± 0.05) ($n = 5$, $P < 0.001$), 冲洗后恢复 (图 4). 另一个氯通道阻断剂 SITS 具有同样的效应, 浴槽液加入 1 mmol/L SITS 能够使 $+40\text{ mV}$ 膜电位时的氯通道开放概率从 (0.86 ± 0.06) 下降到 (0.13 ± 0.04) ($n = 5$, $P < 0.001$), 冲洗后亦可恢复.

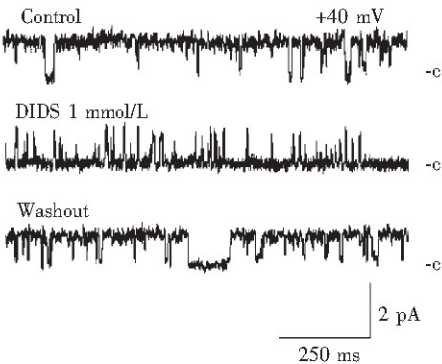


Fig. 4 Effects of the chloride channel blocker on ORCC activity

Application of 1 mmol/L DIDS to the bath solution inhibited channel activity within 3 min. DIDS produced a flickery block reversibly.

3 讨 论

本实验首次在成年大鼠海马 CA1 区锥体神经元上记录到外向整流氯离子通道的活动。

由于缺乏特异的阻断剂, 目前对此通道的分子结构尚不清楚。但是, 在多种组织细胞膜上的外向整流氯离子通道具有共同的特点: 通道只有在形成游离膜片后, 经过长时程去极化激活; 中电导 (15 ~ 70 pS); 具有外向整流特点; 可以被 DIDS 和 SITS 阻断^[12,13]。在本实验中, 采用内面向外式膜片钳记录方法, 当形成游离膜片后通道并不开放, 只有在施加 +60 mV 以上的去极化长时间刺激后, 通道才打开, 以及其他的一些电生理及药理学特性都表明此通道为外向整流氯离子通道。本研究在成年海马神经元上的结果也支持 Krick 等^[14,15]的观点: 在完整的细胞中外向整流氯离子通道可能被某些胞浆成分所抑制, 当形成游离膜片后, 抑制因子会扩散消失。

部分缓冲盐如 HEPES 对外向整流氯离子通道有一定程度的抑制效应^[11], 但是大量有关此通道的实验研究仍然选用它作为缓冲盐^[5,16], 所以我们同样选用了 HEPES。

ClC 氯通道家族是目前已知基因并克隆表达的氯离子通道之一。哺乳动物有 9 个家族成员 (ClC-1 ~ 7; ClC-K1, 2), 各成员之间有大小不一的同源氨基酸序列^[11]。在其中, ClC-3 同其他成员只有 24% 的同源性, 单通道电流也与大多数成员的不同, 却与外向整流氯离子通道特性相似^[17]。采用原位杂交技术, Kawasaki 等^[18]发现, 在大鼠的海马、嗅球、小脑区域有 ClC-3 mRNA 的大量表达。在 HeLa 细胞和非洲爪蟾卵母细胞上, Hermoso 等^[19]研究发现 ClC-3 蛋白是介导容积敏感氯通道 (volume-stimulated osmolyte and anion channel, VSOAC) 功能活动的一个重要成分, 另一方面, Duan 等^[20]认为外向整流氯离子通道介导了家兔心肌细胞上容积敏感氯通道的活动。因此我们认为在大鼠海马 CA1 区锥体细胞上, ClC-3 可能参与形成外向整流氯离子通道, 但尚需进一步的研究证实。

外向整流氯离子通道开通剂钆离子可以引起人 B 淋巴细胞和 HeLa 细胞肿胀, 表明此通道在维持细胞容积相对稳定方面起作用^[21]。中枢神经组织位于一个容积相对固定的颅骨腔内, 其对细胞容积的变化尤为敏感, 所以神经细胞具有较强的容积调控能力, 而外向整流氯离子通道可能在其中起重要

作用。

外向整流氯离子通道激活可导致细胞内酸化, 激活核酸内切酶使细胞发生凋亡^[5]。因此我们推测, 如果脑缺血激活了海马 CA1 区锥体神经元上外向整流氯离子通道, 可导致细胞容积调控失衡以及细胞内酸化, 这可能是脑缺血诱导海马 CA1 区锥体神经元凋亡的机制之一。支持脑缺血激活外向整流氯离子通道的证据, 来自于有研究观察到脑缺血后海马 CA1 区锥体神经元兴奋性呈现持续性降低^[22]。当然, 要证实这一推测仍需进一步的深入研究。

参 考 文 献

- Jentsch T J, Stein V, Weinreich F, *et al.* Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*, 2002, **82** (2): 503 ~ 568
- Welsh M J. An apical-membrane chloride channel in human tracheal epithelium. *Science*, 1986, **232** (4758): 1648 ~ 1650
- Barres B A, Chun L L, Corey D P. Ion channel expression by white matter glia: I. Type 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Glia*, 1988, **1** (1): 10 ~ 30
- Duan D, Nattel S. Properties of single outwardly rectifying Cl⁻ channels in heart. *Circ Res*, 1994, **75** (4): 789 ~ 795
- Szabo I, Lepplé-Wienhues A, Kaba K N, *et al.* Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (11): 6169 ~ 6174
- Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, *et al.* Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (17): 9487 ~ 9492
- Pulsinelli W A, Brierley J B, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, 1982, **11** (5): 491 ~ 498
- 周英杰, 佟振清, 高天明. 大鼠海马 CA1 区锥体细胞上一种 Ca²⁺ 依赖性 KATP 通道. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (1): 78 ~ 82
Zhou Y J, Tong Z Q, Gao T M. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (1): 78 ~ 82
- 胡平, 李晓明, 李建国, 等. 短暂脑缺血大鼠海马 CA1 区锥体细胞大电导 Ca²⁺ 依赖 K⁺ 通道活动降低. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (5): 714 ~ 718
Hu P, Li X M, Li J G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (5): 714 ~ 718
- Gong L W, Gao T M, Huang H, *et al.* Transient forebrain ischemia induces persistent hyperactivity of large conductance Ca²⁺-activated potassium channels via oxidation modulation in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*, 2002, **15** (4): 779 ~ 783
- Hanrahan J W, Tabcharani J A. Inhibition of an outwardly rectifying anion channel by HEPES and related buffers. *J Membr Biol*, 1990, **116** (1): 65 ~ 77
- Chen J H, Schulman H, Gardner P. A cAMP-regulated chloride channel in lymphocytes that is affected in cystic fibrosis. *Science*, 1989, **243** (4891): 657 ~ 660
- Garber S S. Outwardly rectifying chloride channels in lymphocytes. *J Membr Biol*, 1992, **127** (1): 49 ~ 56
- Krick W, Disser J, Hazama A, *et al.* Evidence for a cytosolic inhibitor of epithelial chloride channels. *Pflügers Arch*, 1991, **418**

- (5): 491~499
- 15 Kunzelmann K, Tilmann M, Hansen C P, *et al.* Inhibition of epithelial chloride channels by cytosol. *Pflügers Arch*, 1991, **418** (5): 479~490
 - 16 Mignen O, Egee S, Liberge M, *et al.* Basolateral outward rectifier chloride channel in isolated crypts of mouse colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, **279** (2): G277~G287
 - 17 Kawasaki M, Suzuki M, Uchida S, *et al.* Stable and functional expression of the ClC-3 chloride channel in somatic cell lines. *Neuron*, 1995, **14** (6): 1285~1291
 - 18 Kawasaki M, Uchida S, Monkawa T, *et al.* Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron*, 1994, **12** (3): 597~604
 - 19 Hermoso M, Satterwhite C M, Andrade Y N, *et al.* ClC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*, 2002, **277** (42): 40066~40074
 - 20 Duan D, Winter C, Cowley S, *et al.* Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature*, 1997, **390** (6658): 417~421
 - 21 Thinnies F P, Walter G, Hellmann K P, *et al.* Gadolinium as an opener of the outwardly rectifying Cl⁻ channel (ORCC). Is there relevance for cystic fibrosis therapy? *Pflügers Arch*, 2001, **443** (Suppl 1): S111~S116
 - 22 Gao T M, Pulsinelli W A, Xu Z C. Changes in membrane properties of CA1 pyramidal neurons after transient forebrain ischemia *in vivo*. *Neuroscience*, 1999, **90** (3): 771~780

Single Channel Properties of Outwardly Rectifying Chloride Currents in CA1 Pyramidal Neurons of Adult Rat Hippocampus*

LI Jian-Guo^{1,2)}, LI Xiao-Ming¹⁾, HU Ping¹⁾,

WANG Ying¹⁾, LI Xiao-Wen¹⁾, QIAO Jian-Tian²⁾, GAO Tian-Ming^{1)**}

(¹⁾ *Department of Anatomy, Department of Physiology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;*

(²⁾ *Department of Physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)*

Abstract An outwardly rectifying chloride channel (ORCC) was characterized in acutely dissociated hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rat by using inside-out configuration of patch clamp. The channels were usually activated by a long-lasting and depolarizing voltage step. Average single channel conductance was (16.58 ± 1.54) pS for membrane potential between -60 mV and 0 mV, and (40.92 ± 3.17) pS between 0 mV and $+60$ mV in symmetrical 150 mmol/L NaCl solution ($n=10$). The channel open probability was voltage dependent ($V_m = -60$ mV, $P_o = 0.44 \pm 0.12$; $V_m = +60$ mV, $P_o = 0.86 \pm 0.06$, $n=10$). The reversal potential of the channel was (-4.17 ± 1.84) mV in symmetrical Cl⁻ concentration (150 mmol/L). When partially substituting Na-Gluconate for NaCl, the reversal potential shifted to (-34.23 ± 4.86) mV ($[Cl^-]_i/[Cl^-]_o = (30 \text{ mmol/L}) / (150 \text{ mmol/L})$). This shift indicates a high Cl⁻ selectivity of the channel. Chloride channel blockers DIDS and SITS showed a reversible inhibiting effect on the channel activity. These results provide a report of an outwardly rectifying chloride channel (ORCC) in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rat.

Key words chloride channel, patch clamp, hippocampus, rat

* This work was supported by grants from Outstanding Young Scientists Program of NFSC (30125013), Outstanding Young Scientists Program of PLA (01J009), Team Collaboration Project of Guangdong (10717) and Cheung King Scholars Programme to Tian M. Gao.

** Corresponding author. Tel: 86-20-85148216, E-mail: tgao@fimmu.edu.cn

Received: March 18, 2003 Accepted: April 30, 2003