

弱激光对大鼠海马神经元钠通道特性的影响

乔晓艳^{1,3)} 李 刚^{1)*} 贺秉军²⁾

¹⁾天津大学精密仪器与光电子工程学院生物医学工程系, 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, 太原 030006)

摘要 利用波长 670 nm、功率 5 mW 的半导体激光器照射急性分离的大鼠海马 CA3 区锥体神经元, 应用全细胞膜片钳技术研究其电压门控 Na⁺ 通道的特性. 实验发现: 弱激光作用 5 min 时, Na⁺ 通道激活电位和峰值电位开始向负电位方向移动, 7 min 激光作用达稳定; 激光照射对 Na⁺ 通道电流峰值无影响, 对照组和激光照射组峰值电流密度分别为 (-383.51 ± 26.93) pA/pF 和 (-368.36 ± 33.14) pA/pF ($n=8$, $P > 0.05$); 激光作用降低了 Na⁺ 通道的激活阈值电位和峰值电位, 对照组通道电流在 -40 mV 激活, -30 mV 达峰值, 激光照射组通道电流在 -60 mV 激活, -40 mV 达峰值; 激光照射改变了 Na⁺ 通道半数激活电压和斜率因子, 对照组和激光照射组的半数激活电压分别为 (-42.091 ± 1.537) mV 和 (-54.971 ± 1.846) mV ($n=8$, $P < 0.01$), 斜率因子分别为 (1.529 ± 0.667) mV 和 (2.634 ± 0.519) mV ($n=8$, $P < 0.05$). 结果表明, 弱激光照射海马神经元可改变 Na⁺ 通道的激活特性, 从而影响动作电位的去激活过程, 进而会引起神经元细胞生理功能发生变化.

关键词 钠离子通道, 膜片钳技术, 弱激光照射, 生物效应

学科分类号 Q682

随着激光技术的发展, 各种新型激光器不断出现, 激光在医学领域的应用范围不断扩大, 既有采用强激光进行治疗的应用, 又有利用弱激光生物刺激效应的临床应用^[1,2]. 所谓弱激光生物刺激效应, 是指激光作用于生物体后, 不引起生物组织的不可逆损伤, 而是产生某种与超声波、针灸等物理因子所获得的生物刺激相类似的效应, 引起一系列的生理生化改变, 从而调节机体的功能^[2]. 基础研究和大量临床应用表明, 弱激光对生物组织有多方面的刺激作用, 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再生过程发生影响^[4,5]. Rochkind 等^[4,6]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, 还发现在神经钳伤前预先给予弱激光照射可以减少损伤后的 AP 值跌落, 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神经元恢复, 推测氦氖激光通过其生物刺激作用于穴位, 使穴位组织兴奋, 代谢活动加强, 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, 同时激活处于抑制

状态的脑细胞, 加速受损脑组织的康复^[7]. 实验还表明, 氦氖激光可促进各种酶活性增强, 改善系统血流变状态, 并能刺激神经末梢, 促进神经冲动传导加快, 进而激发总的代谢方面的变化^[8,9]. 目前临床应用的弱激光器主要有氦氖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, 输出功率在几毫瓦到几十毫瓦^[10]. 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^[11]. 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, 目前尚未有从细胞膜离子通道特性方面研究弱激光生物效应的研究报道, 这也是制约其前进的一个因素. 鉴于电压门控 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^[12], 本文利用膜片钳实验技术, 研究弱激光对海马神经元细胞膜 Na⁺ 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.

* 通讯联系人. Tel: 022-27401969, Fax: 022-27406535

E-mail: ligang59@tju.edu.cn

收稿日期: 2005-09-02, 接受日期: 2005-09-30

1 材料与方法

1.1 材料

动物: 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。

试剂: 链霉蛋白酶 (Pronase) 为 Merck 公司产品; 河豚毒素 (TTX)、氯化镉 (CdCl_2)、4-氨基吡啶 (4-AP)、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)、氯化铯 (CsCl)、氟化铯 (CsF)、 Na_2ATP 均为 Sigma 公司产品; 其余为国产分析纯。

(1) 孵育液 (ACSF): NaCl 134 mmol/L, KCl 5 mmol/L, NaH_2PO_4 1.5 mmol/L, MgSO_4 2 mmol/L, CaCl_2 2 mmol/L, NaHCO_3 25 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, pH 7.3; (2) 标准细胞外液: NaCl 50 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, CaCl_2 2 mmol/L, MgCl_2 1 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, AChCl 90 mmol/L, pH 7.3, 使用前经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤并通 95% O_2 +5% CO_2 混合气饱和; (3) 电极内液: CsCl 70 mmol/L, CsF 70 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 10 mmol/L, Na_2ATP 3 mmol/L, MgCl_2 2 mmol/L, pH 7.2, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

1.2 大鼠海马 CA3 区锥体神经元急性分离

大鼠断头取脑, 置于 $0\sim4^\circ\text{C}$ 孵育液中迅速取出海马, 分离出 CA3 区, 手工切成 $400\sim500\ \mu\text{m}$ 厚的脑片, 置于孵育液中, 连续通入 95% O_2 +5% CO_2 混合气, 孵育 50 min, 而后加入 Pronase, 使其终浓度为 0.5 g/L, 32°C 下消化 25 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 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, 即可用于全细胞膜片钳记录, 分离完整的海马神经细胞可在 4~6 h 内保持良好的生理状态^[3]。

1.3 全细胞膜片钳记录和数据分析

在 $20\sim25^\circ\text{C}$ 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, 实验参数的设置、数据采集和刺激方式的施加均通过 Pulse 软件来控制, 滤波器 1 设置为 10 kHz, 滤波器 2 设置为 2.9 kHz, 记录用玻璃微电极 (中国科学院电子研究所生产) 经 PP-830x 型电极拉制仪 (Narishage, Japan) 两步拉制而成, 充灌电极内液后, 电极阻抗为 $2\sim4\ \text{M}\Omega$. 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, 再进行慢电容和串联电阻补偿, 串联电阻补偿为 80%. 之后在设定的刺激电压下, 观察通道电流的激活情况。

实验所用半导体激光器波长为 670 nm, 输出峰值功率 5 mW, 光斑直径 3 mm, 功率密度 $70.8\ \text{mW}/\text{cm}^2$, 激光照射距离 15 cm, 照射角度 75° , 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于目标细胞上。

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 $(\bar{x} \pm s)$ 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。

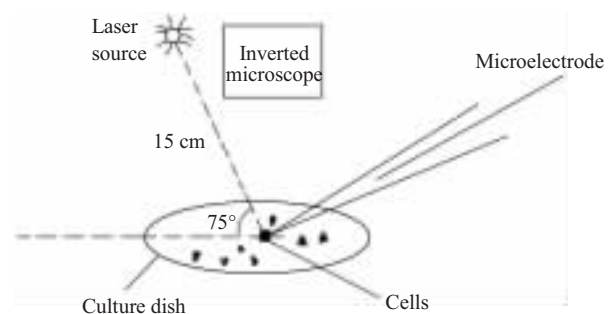


Fig. 1 Schematic diagram of laser irradiation

2 结果

2.1 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的电压门控钠离子通道电流. 置钳制电位于 $-80\ \text{mV}$, 给予脉冲幅度为 $-70\ \text{mV}\sim+60\ \text{mV}$, 脉冲宽度为 20 ms, 步幅为 $+10\ \text{mV}$ 的去激活脉冲刺激电压, 刺激频率 0.5 Hz, 记录得到一系列快速激活与失活的电流 (图 2a). 由于在细胞外液中加入了 TEA-Cl、4-AP, 电极内液中有高浓度的 CS^+ , 故钾电流可被阻断, 钙电流可被内液中的 F 所灭活且被外液中的 CdCl_2 阻断. 向外液中加入 $1\ \mu\text{mol/L}$ TTX, 该记录电流被阻断 (图 2b), 证实其为 TTX 敏感的钠电流。

2.2 激光照射对钠通道激活时间依赖性的影响

由于钠通道具有增敏 (Runup) 现象, 需要进行时间依赖性考察. 首先要考察正常海马神经元细胞 (对照组) 钠离子通道电流何时达稳定, 激光照射应在通道电流稳定的时间区段开始施加. 给予同 2.1 中相同的刺激方式, 分别在 1、3、5、7、9、

11 min 记录不同时间的电流峰值, 可知钠电流峰值在 3 min 基本达到稳定($n=15$), 激光照射应从该时刻开始施加. 其次考察激光照射下海马神经元细胞(照射组) 钠电流达稳定的时间区段, 对照组与激光照射组通道特性差异的显著性应选择该时间区段内的峰值电流进行统计分析. 图 3 为激光照射 3、5、7、9 min 时的钠电流 $I-V$ 曲线. 由实验结果可

知: 激光作用 5 min 时, Na^+ 通道激活电位和峰值电位开始向负电位方向移动, 7 min 激光作用达稳定, 通道激活电位移至 -60 mV, 峰值电位移至 -40 mV, 激光作用 9 min 通道的激活电位和峰值电位与 7 min 时无显著差异($n=8$, $P>0.05$), 并且激光照射不同的时间, Na^+ 通道电流峰值无显著性差异($n=8$, $P>0.05$).

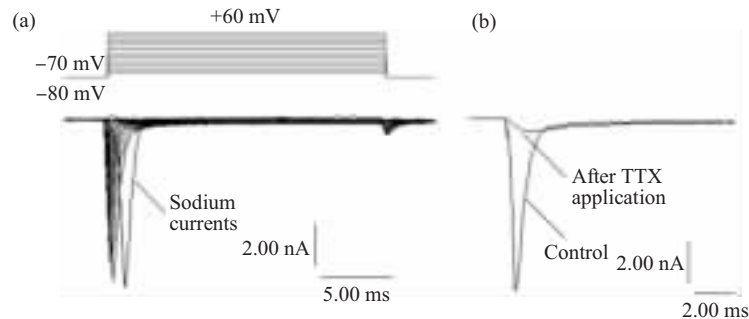


Fig. 2 Current traces obtained by patch-clamp recording

(a) Stimulation pulses and inward Na^+ currents. (b) Na^+ currents recorded in -30 mV stimulation potential and blocked by TTX.

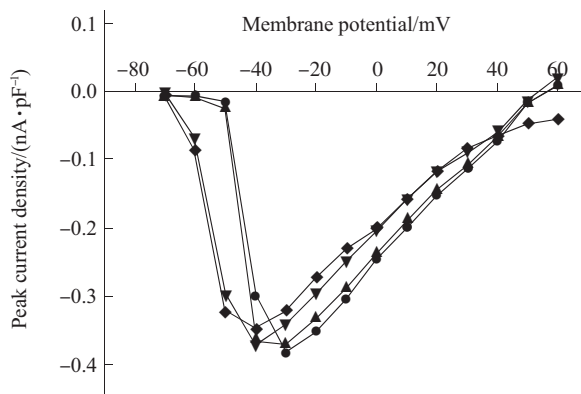


Fig. 3 Effects of laser irradiation on $I-V$ curves of I_{Na} in different time

Activation voltage and peak voltage of Na^+ channel shifted towards more negative potentials in irradiating 5 min and the action of laser irradiation reached stabilization in 7 min. $\bullet-\bullet$: Laser irradiation 3 min; $\blacktriangle-\blacktriangle$: Laser irradiation 5 min; $\blacktriangledown-\blacktriangledown$: Laser irradiation 7 min; $\blacklozenge-\blacklozenge$: Laser irradiation 9 min.

2.3 激光照射对钠通道电流 $I-V$ 曲线的影响

-80 mV 钳制电位下, 预置 -120 mV 超极化电压刺激 500 ms, 然后从 -70 mV 起给予 10 mV 步幅递增、 20 ms 波宽的去极化脉冲刺激至 $+60$ mV, 刺激频率 0.5 Hz, 激活并记录钠通道电流作为对照. 然后打开激光器, 以本文前述方法照射海马锥体神经元细胞, 照射时间 7 min, 此时激光作用达到稳定, 再次激活并记录钠通道电流作为激光照射

组. 以不同膜电位 (去极化刺激电位) 为横轴, 该膜电位下激活的钠电流为纵轴, 绘制激光作用前后电流的 $I-V$ 曲线 (图 4). 将对照组和激光照射组 $I-V$ 曲线的峰值电位 (即电流峰值所对应的刺激电位) 进行统计分析, 结果发现激光照射组钠通道 $I-V$ 曲线的激活电位和峰值电位均向左移动, 激活电位与对照组相比左移了 -20 mV ($n=8$), 峰值电位左移了 -10 mV ($n=8$). 从 $I-V$ 曲线可以得出, 激光照射对 Na^+ 通道电流峰值无影响, 对照组和照射组峰值电

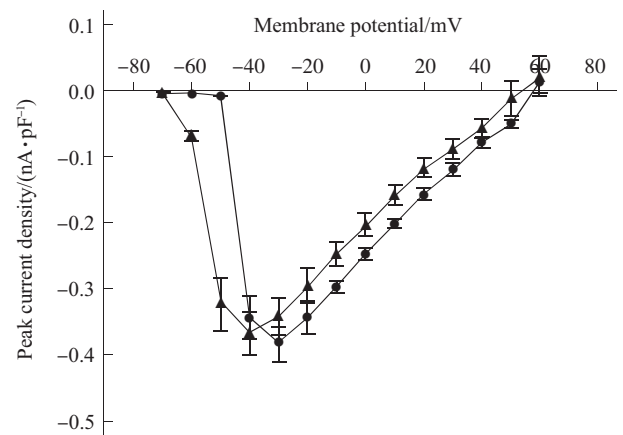


Fig. 4 $I-V$ curves of I_{Na} between control and irradiation group

Activation voltage shifted -20 mV towards negative potentials and no effect on peak currents of Na^+ channel via laser irradiating 7 min.

$\bullet-\bullet$: Control; $\blacktriangle-\blacktriangle$: Laser irradiation 7 min.

流密度分别为 (-383.51 ± 26.93) pA/pF 和 (-368.36 ± 33.14) pA/pF ($n=8$, $P>0.05$).

2.4 激光照射对钠通道电流稳态激活曲线的影响

将膜电位钳制在 -80 mV, 预置 -120 mV 超极化电压刺激 500 ms, 然后从 -70 mV 起给予 10 mV 步幅递增、 20 ms 波宽的去极化脉冲刺激至 $+10$ mV, 刺激频率 0.5 Hz, 引出一系列钠电流. 以本文前述方法激光照射细胞, 照射时间 7 min, 再次记录上述电流, 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出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 $G/G_{max} = 1/\{1 + \exp[V - V_{1/2}/k]\}$ 进行拟和, 式中 G 为电导, V 为膜电位, $V_{1/2}$ 为半数激活电压, k 为曲线的斜率因子. 由图 5 中可以看出对照组与激光照射组激活曲线均呈 S 型, 并由此计算出对照组和激光照射组钠电流的半数激活电压 $V_{1/2}$ 分别为 (-42.091 ± 1.537) mV 和 (-54.971 ± 1.846) mV ($n=8$, $P<0.01$), 斜率因子 k 分别为 (1.529 ± 0.667) mV 和 (2.634 ± 0.519) mV ($n=8$, $P<0.05$).

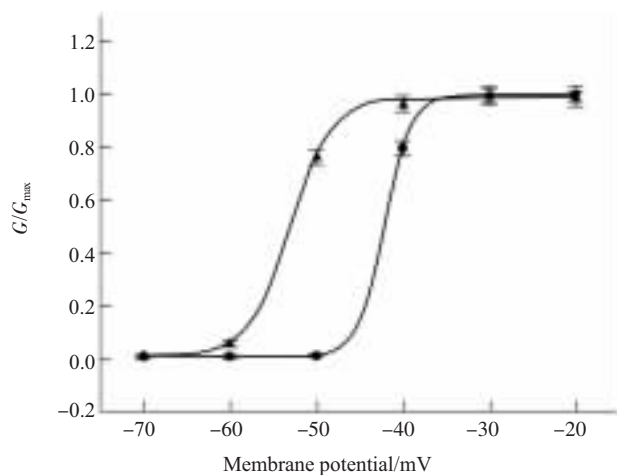


Fig. 5 Steady-state activation curves of Na^+ current between control and irradiation groups

The half-activation voltage and the slope factor of the activation curve changed via the laser irradiating 7 min. ●—●: Control; ▲—▲: Laser irradiation 7 min.

3 讨 论

实验结果表明, 波长 670 nm、功率 5 mW 的弱激光照射, 使海马神经元细胞膜电压门控钠离子通道稳态激活曲线左移, 半数激活电压降低, 与对

照组相比有显著性差异. 激活电压降低导致细胞膜电位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, 加快了通道的激活过程, 进而影响到动作电位的去极化. 实验结果还显示, 激光照射不影响电压门控钠离子通道的电流峰值大小, 因而可以推断出激光照射并不改变钠离子通道的最大开放数目.

临床研究表明: 弱激光具有预防神经损伤后传导功能减退的功效^[6], 这可能与激光作用使得钠离子通道激活电位降低, 而钠离子通道影响动作电位的去极化过程, 从而使动作电位阈值下降, 有助于提高神经系统的兴奋性和改善传导功能.

Rochkind 等所做的激光照射使神经支配的诱发动作电位幅度增高, 由本实验的结果可解释为: 激光照射后, 钠通道更容易激活, 动作电位阈值降低, 较低强度的刺激就能使受激光照射后的细胞产生动作电位, 而诱发动作电位是一些单个神经细胞发放的动作电位的整合, 从而使诱发动作电位幅度增高.

弱激光的生物刺激作用机制和作用位点目前还不明确, 本实验从电压门控离子通道的角度研究弱激光生物刺激作用. 电压门控钠离子通道由 α 亚基和 β 亚基组成, α 亚基由 4 个对称的同源功能区构成, 每一功能区均含有 6 个 α 螺旋的跨膜片段 ($S_1 \sim S_6$), 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^[14]. 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 α 螺旋氨基酸的负电荷和 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 -80 mV 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^[15], 激光照射会使电场分布发生改变, 引起 S_4 片段松弛, 沿螺旋方向滑动, 形成新的离子对. 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 片段螺旋运动将引起钠通道 4 个功能区的连续构象改变, 引起离子通道激活. 因此, 推测弱激光的生物刺激作用与细胞膜离子通道及通道构象改变有关.

参 考 文 献

- 1 Basford J R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med*, 1995, **16** (4): 331~342
- 2 Mester E, Mester A F, Mester A. The biomedical effects of laser

- application. *Lasers Surg Med*, 1985, **5** (4): 31~39
- 3 Karu T I, Kalendo G S. Helium-Neon laser induced respiratory burst of phagocytic cell. *Lasers Surg Med*, 1989, **9** (3): 585~588
 - 4 Anders J J, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res*, 2004, **26** (2): 233~239
 - 5 Wollman Y, Rochkind S, Simantov R. Low power laser irradiation enhances migration and neurite sprouting of cultured rat embryonal brain cells. *Neurol Res*, 1996, **18** (5): 467~470
 - 6 Rochkind S, Nissan M, Alon M, *et al.* Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. *Lasers Surg Med*, 2001, **28** (3): 216~219
 - 7 Karu T I, Piatibrat L V E, Senaliev R O. The effect of monochromatic light in the red and near infrared ends of the spectrum on adhesive properties of the cell membrane: dependence on wavelength. *Biull Eksp Biol Med*, 1994, **117** (6): 670~672
 - 8 Karu T I, Pyatibrat L, Kalendo G S. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. *J Photochem Photobiol B*, 1995, **27** (3): 219~223
 - 9 Karu T I, Piatibrat L V, Kalendo G S. The effect of He-Ne laser radiation on the adhesive properties of the cell membrane. *Biull Eksp Biol Med*, 1993, **115** (6): 622~623
 - 10 Siposan D G, Lukacs A. Relative variation to received dose of some erythrocytic and leukocytic indices of human blood as a result of low-level laser radiation: an *in vitro* study. *J Clin Laser Med Surg*, 2001, **19** (2): 89~103
 - 11 Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*, 1999, **49** (1): 1~17
 - 12 贺秉军, 刘安西, 陈家童, 等. 三氟氯氟菊酯对棉铃虫神经细胞钠及钙通道作用机理研究. *生物物理学报*, 2002, **18** (2): 201~205
 - He B J, Liu A X, Chen J T, *et al.* *Acta Biophys Sin*, 2002, **18** (2): 201~205
 - 13 Zou B D, Chen Y Z, Wu C H. Blockade of U50488H on sodium currents in acutely isolated mice hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*, 2000, **855**: 132~136
 - 14 Auld V J, Goldin A L, Krafte D S, *et al.* A neutral amino acid change in segment II S₄ dramatically alters the gating properties of the voltage dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (4): 323~327
 - 15 Karu T, Tiphlova O, Esenaliev R, *et al.* Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effects on *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*, 1994, **24** (3): 155~161

Effects of Low Level Laser Irradiation on Properties of Sodium Channel in Rat Hippocampal Neurons

QIAO Xiao-Yan^{1,3)}, LI Gang^{1)*}, HE Bing-Jun²⁾

⁽¹⁾College of Precision Instruments & Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

⁽²⁾College of Life Science and Technology, Nankai University, Tianjin 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 for wavelength 670 nm and power 5 mW. And properties of voltage-gated Na⁺ channel were studied using the whole-cell patch clamp technique. The experiment revealed that activation voltage and peak voltage of Na⁺ channel shifted towards more negative potentials in irradiating 5 min and the action of laser irradiation reached stabilization in 7 min. There was no effect on peak currents of Na⁺ channel using laser irradiation. The peak current density of control group and irradiation group were (-383.51 ± 26.93) pA/pF and (-368.36 ± 33.14) pA/pF respectively ($n=8$, $P > 0.05$). -40 mV activated threshold potential and -30 mV peak potential for control group respectively dropped to -60 mV and -40 mV after irradiating 7 min. The half-activation voltage and the slope factor of the activation curves of Na⁺ channel were also changed by the laser's exposure. The former changed from (-42.091 ± 1.537) mV to (54.971 ± 1.846) mV ($n=8$, $P < 0.01$) and the latter from (1.529 ± 0.667) mV to (2.634 ± 0.519) mV ($n=8$, $P < 0.05$). The results show that activation properties of Na⁺ channel are influenced by laser irradiating hippocampal neurons. Thus, depolarizing process of action potential is affected. And further physiological functions of neurons are altered as a result of low level laser irradiation.

Key words Na⁺ channel, patch clamp technique, low level laser irradiation, biological effect

*Corresponding author. Tel: 86-22-27401969, Fax: 86-22-27406535, E-mail: ligang59@tju.edu.cn

Received: September 2, 2005 Accepted: September 30, 2005