

# 大鼠海马 CA1 区锥体细胞上一种 Ca<sup>2+</sup> 依赖性 K<sub>ATP</sub> 通道\*

周英杰 佟振清 高天明\*\*

(第一军医大学生理教研室, 广州 510515)

**摘要** K<sub>ATP</sub>通道在细胞的新陈代谢与膜兴奋性的耦联中起重要作用. 采用膜片钳的内面向外式记录方法, 在成年大鼠海马 CA1 区锥体细胞上记录到一种被胞浆侧 ATP 和甲糖宁 (tolbutamide, 一种 K<sub>ATP</sub>通道阻断剂) 抑制的 Ca<sup>2+</sup> 依赖性钾离子通道. 在细胞膜内外的 K<sup>+</sup> 浓度均为 140 mmol/L 时, 通道的电导为 (204 ± 21) pS, 翻转电位为 (3.57 ± 1.13) mV, 通道无整流性. 通道开放概率及 ATP 对通道的抑制作用均呈现电压依赖性. 该 K<sub>ATP</sub>通道与以往报道的“经典” K<sub>ATP</sub>通道有显著不同, 其活动受膜电位、胞内 Ca<sup>2+</sup> 和 ATP 三重调节, 表明这是一种新型的 K<sub>ATP</sub>通道. 上述结果表明在海马神经元上至少有两种性质不同的 K<sub>ATP</sub>通道, 提示神经元可能通过不同性质的 K<sub>ATP</sub>通道感受细胞内的代谢状态, 进而调节细胞膜的兴奋性.

**关键词** ATP 敏感钾通道, Ca<sup>2+</sup>, 海马, CA1 区, 膜片钳

**学科分类号** Q424

K<sub>ATP</sub>通道的功能特点是将细胞的新陈代谢与电活动联系起来. 脑内的许多结构上都发现了 K<sub>ATP</sub>通道的存在<sup>[1-4]</sup>, 但这些 K<sub>ATP</sub>通道的单通道特性和对 ATP 的敏感性有很大的差异, 提示在脑内可能有多种类型的 K<sub>ATP</sub>通道, 神经元上 K<sub>ATP</sub>通道的功能目前尚不清楚, 由于在正常生理状态下细胞内的 ATP 浓度 (> 1 mmol/L)<sup>[5]</sup> 远大于完全抑制 K<sub>ATP</sub>通道所需的 ATP 浓度 (ATP 抑制 K<sub>ATP</sub>通道的半数最大抑制浓度多在 10~150 μmol/L 之间), 所以生理条件下神经系统的 K<sub>ATP</sub>通道是否活动及其生理条件下的功能目前尚不清楚<sup>[6]</sup>, 但普遍认为在缺血/缺氧等神经细胞代谢受损的情况下, K<sub>ATP</sub>通道参与了细胞兴奋性的调节, 很可能起到一定的保护作用<sup>[7]</sup>. 我们发现除了已报道过的“经典的” K<sub>ATP</sub>通道外<sup>[4]</sup>, 在海马 CA1 锥体神经元上还存在有另外一种受电压、胞内 Ca<sup>2+</sup> 和 ATP 三重调节的 K<sub>ATP</sub>通道.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:** 成年雄性 Wistar 大鼠, 体重为 200~250 g.

**1.1.2 试剂:** 链白蛋白酶、甲糖宁 (tolbutamide, 一种 K<sub>ATP</sub>通道阻断剂)、ATP、HEPES、EGTA 均购自美国 Sigma 公司, 其余试剂购自国内制剂公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 脑片的制备与神经元的急性分离:** 按本室方法进行神经细胞的急性分离<sup>[4,8]</sup>, 即大鼠麻醉后快速断头取脑, 用振动切片机 (MA752-045 WPI) 切成 400 μm 厚的脑片, 置于通以 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 混合气的 Earle's 平衡盐溶液 (EBSS) 中孵育 1~6 h (室温), 在解剖显微镜下分离出海马 CA1 区, 将组织块放入用 100% O<sub>2</sub> 饱和的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 中 (33 °C) 用链白蛋白酶 (protease XIV, 1.1~1.4 g/L) 消化 40 min 后取出, 在羟乙基磺酸钠缓冲液中将之吹打成细胞悬液, 并移数滴至盖玻片上. 待细胞贴壁后, 选用形态为锥形或梭形、有顶树突和基树突特征的锥体细胞进行记录.

**1.2.2 通道电流记录与数据分析:** 通过倒置显微镜 (Olympic IX70) 的观察, 用微电极操纵器 (MO-203 Narishige) 驱动微电极接近锥体细胞进行高阻密封 (封接电阻大于 5 GΩ). 微电极 (电阻为 8~12 MΩ) 与膜片钳放大器 (CEZ-2300 型 Narishige) 相连, 放大器低通滤波频率为 3 kHz. 单通道电流经 DMA 数据采集系统 (Labmaster-

\* 国家自然科学基金 (39970265)、广东省自然科学基金 (990395) 和军队杰出人才基金 (01J009) 资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 020-85148216, E-mail: tgao@fimmu.edu.cn

收稿日期: 2001-03-19, 接受日期: 2001-04-19

125 kHz Axon) 用 Pclamp (5.5.1 版 Axon) 软件的 FETCHEX 程序采集入计算机, 采样频率 5 kHz. 用 FETCHAN 程序进行测量, 测量通道开关事件的时间分辨率为 300  $\mu$ s, 测量结果用 pSTAT 程序进行分析. 全部数据以  $\bar{x} \pm s$  表示.

**1.2.3 实验所用药品和溶液:** 浴槽液成分为 KCl 140 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 1 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L, EGTA 0.5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 用 1 mol/L 的 KOH 将 pH 值调至 7.3, 部分实验浴槽液中的 Ca<sup>2+</sup> 和 EGTA 的浓度如文中所示. 微电极内液的成分为 KCl 140 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L, CdCl<sub>2</sub> 0.2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 用 1 mol/L 的 KOH 调 pH 值至 7.3. ATP 用浴槽液配制成 0.1 mol/L 的母液; tolbutamide 溶解于 0.15 mol/L 的 NaOH 溶液中配制成 20 mmol/L 的母液, 实验时取各药品的母液适量加入浴槽液中形成终浓度, 并用 1 mol/L HCl 将溶液 pH 值调至 7.4. 单通道记录时环境温度为 22~24  $^{\circ}$ C.

## 2 结 果

### 2.1 单通道的电流

在 180 个细胞的形成内面向外式记录的膜片上, 共记录到 18 例被胞浆侧 ATP 抑制的单通道电流 (占所记录细胞总数的 10%). 通道多数呈二级或三级开放, 开放多呈 burst 样, 在实验记录时间内未见通道有明显的时间依赖性失活. 通道电流的幅度随超极化或去极化程度加大而增大 (图 1a), 电流-电压 ( $I-V$ ) 曲线呈直线, 表明通道无整流性 (图 1b). 拟合直线的斜率即单通道电导为 ( $204 \pm 21$ ) pS ( $n = 10$ ), 通道的翻转电位为 ( $3.57 \pm 1.13$ ) mV ( $n = 10$ ). 由于电极液和浴槽液均不含 Na<sup>+</sup>, 并用 CdCl<sub>2</sub> 阻断了 Ca<sup>2+</sup> 通道, 且内面向外式膜片的内外 K<sup>+</sup> 浓度相等, 其 K<sup>+</sup> 平衡电位应为 0 mV, 与实验所记录到的通道翻转电位基本一致, 所以实验中所记录到的电流应为 K<sup>+</sup> 通道电流; 该电流能被 ATP 和 K<sub>ATP</sub> 通道阻断剂 tolbutamide 抑制, 因此可确定该通道为 K<sub>ATP</sub> 通道.

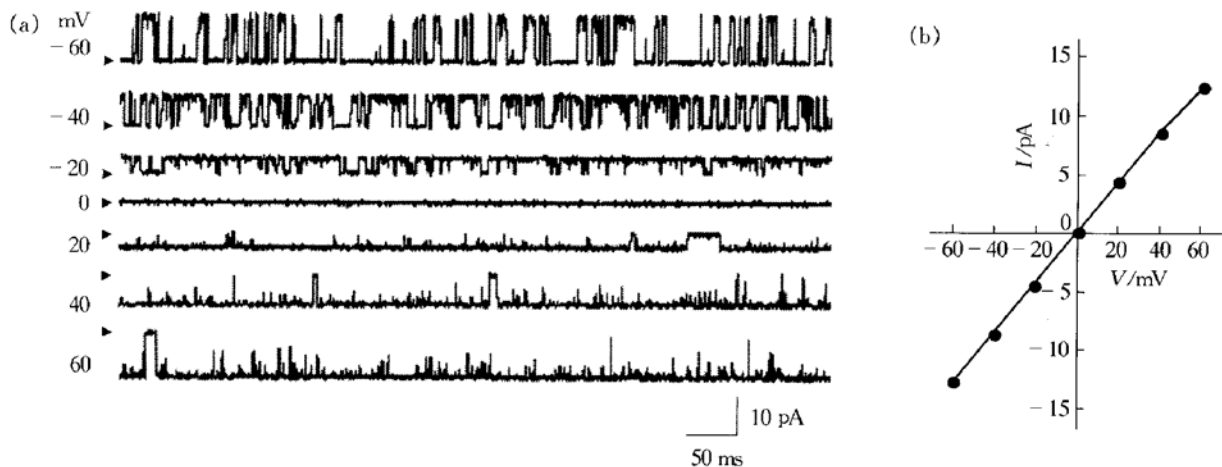


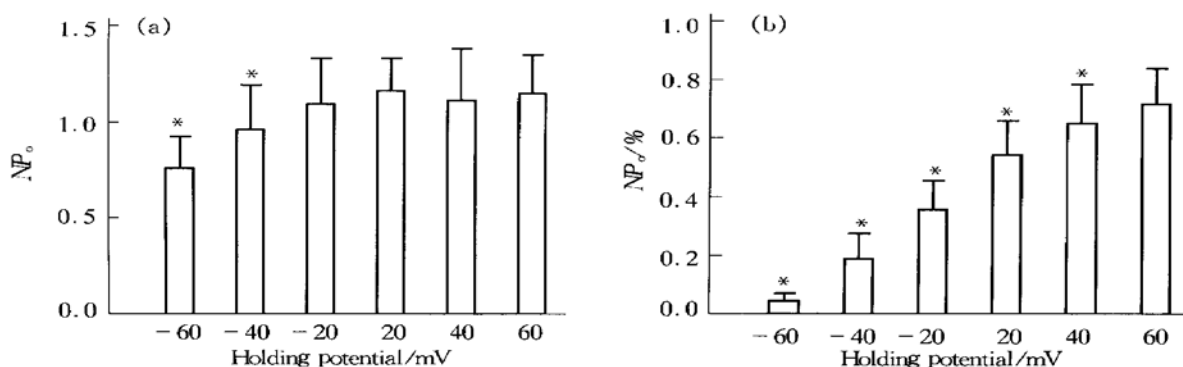
Fig. 1 Relation between currents and holding potentials of K<sub>ATP</sub> channel

(a) Single channel currents recorded from an inside-out patch of adult hippocampal CA1 pyramidal neuron at various holding potentials in symmetrical 140 mmol/L K<sup>+</sup> solution. The holding potentials in mV are listed on the left of the traces. Outward and inward currents evoked are shown as downward and upward deflections, respectively. The arrowheads indicate the current level at which all channels were closed. (b) Plots of single channel current amplitudes ( $I$ ) against holding potentials ( $V$ ) from data shown in (a). The line fitted to the data points from +60 mV to -60 mV gave a slope conductance of 204 pS.

### 2.2 通道活动的电压依赖性

通道的开放概率由公式  $NP_o = \sum \{t_1 + 2t_2 + 3t_3 + \dots + nt_n\}$  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. 如图 2a 所示, 随着钳制电位由超

极化向去极化转换, 通道的开放概率逐渐增加, 钳制电压为 -60 mV 和 -40 mV 时通道的开放概率显著低于 +60 mV 时, 表明通道的开放概率有电压依赖性 ( $n = 8$ ).

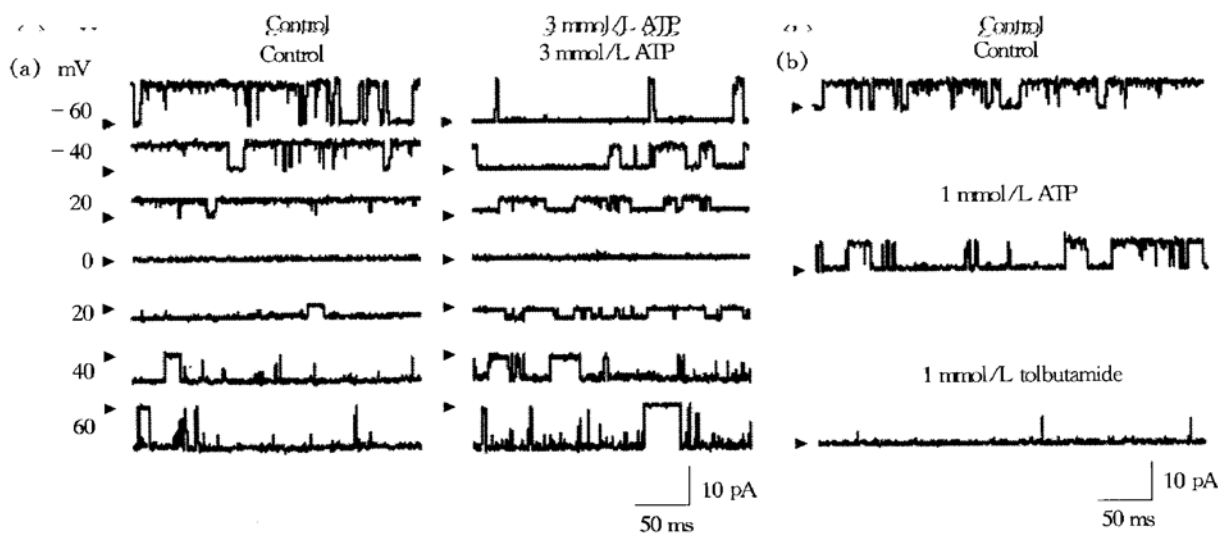


**Fig 2** Open probability (a) and the inhibitory effects of ATP (3 mmol/L) on  $K_{ATP}$  channels (b) at varied holding potentials.  $NP_0$  (%) is expressed as the mean value of percentage when compared with that before application of ATP. ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ ). \*  $P < 0.05$ , compared with + 60 mV.

**2.3 ATP 和 tolbutamide 对  $K_{ATP}$ 通道的抑制作用**

通道的活动可被加入浴槽中膜胞浆侧的 ATP 所抑制. ATP 对通道的抑制作用主要是减少通道的开放概率 (图 3). ATP 对通道的抑制作用有浓度依赖性, 即随着加入的 ATP 浓度的增加, 这种抑制作用也增强. 图 2b 为不同钳制电压下 3 mmol/L ATP 对通道开放概率的抑制作用 (柱形

图显示给予 ATP 后通道的开放概率占给药前通道开放概率的百分比), 由图 2b 可以看出 ATP 对通道的抑制作用也呈现电压依赖性, 随着膜超极化程度的增大这种抑制作用逐渐增强 (图 3b), 对三例 1 mmol/L ATP 能部分抑制其活动的通道, 在浴槽中加入 1 mmol/L 的 tolbutamide, 5 min 内通道的活动均被完全阻断 (图 3b).



**Fig 3** Effects of ATP and tolbutamide on  $K^+$  channels in inside out patches excised from adult hippocampal CA1 pyramidal neurons. The traces in (a) and (b) were obtained from continuous recordings of two different patches. The arrowheads indicate the closed levels. (a) The effects of ATP (3 mmol/L) on a  $K^+$  channel under different holding potentials. The patch membrane potential was clamped at the values given at the left of each trace. (b) Effects of ATP and tolbutamide on a  $K^+$  channel. The holding potential was - 40 mV. The  $NP_0$  values are listed as following: control (0.95), 1 mmol/L ATP (0.58), 1 mmol/L tolbutamide (0).

**2.4 通道对  $Ca^{2+}$  的依赖性**

通道只有在浴槽液中有  $Ca^{2+}$  存在的情况下才能被记录到. 将浴槽液中的  $Ca^{2+}$  浓度降到约 0.01  $\mu\text{mol/L}$  时 (使浴槽液中  $CaCl_2$  和 EGTA 浓度分别为 1 mmol/L 和 11 mmol/L), 或不加  $CaCl_2$  和 EGTA 时, 在 50 例成功封接的细胞内面向外式膜

片上, 都没有记录到这类  $K_{ATP}$  通道. 在同一膜片上, 用低  $Ca^{2+}$  (0.01  $\mu\text{mol/L}$ ) 的浴槽液进行记录时, 未见有通道活动; 当通过灌流将浴槽液  $Ca^{2+}$  浓度增至 1  $\mu\text{mol/L}$  时 (浴槽液中  $CaCl_2$  和 EGTA 的浓度分别为 0.9 mmol/L 和 1.0 mmol/L), 可记录到这类被 ATP 抑制的  $K^+$  电流 (图 4), 以上结

果表明这类  $K_{ATP}$  通道的激活需要膜胞浆侧  $Ca^{2+}$  的存在。

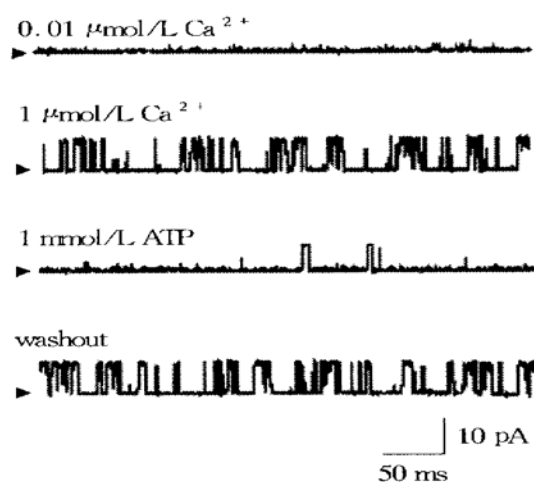


Fig. 4 Effects of  $Ca^{2+}$  concentration on a  $K_{ATP}$  channel in inside-out patches excised from hippocampal CA1 pyramidal neuron

Four traces were recorded from a single patch. The arrowheads indicate the closed levels. The membrane potential was held at  $-40$  mV.

### 3 讨 论

本实验记录到的  $K_{ATP}$  通道与以往报道的海马  $K_{ATP}$  通道<sup>[3,4]</sup>相比有显著不同: 其电导大 (“经典的”  $K_{ATP}$  通道电导约  $40\sim 70$  pS<sup>[9]</sup>), 对 ATP 的敏感性弱, 具有电压依赖性, 无整流性, 且对胞浆侧的  $Ca^{2+}$  有依赖性, 表明本实验记录到的是一种新型的  $K_{ATP}$  通道, 结合我室以前已报道的 “经典的”  $K_{ATP}$  通道<sup>[4]</sup>, 首次发现哺乳动物的海马神经元上至少有两种性质不同的  $K_{ATP}$  通道。我们以往在新生鼠的皮层神经元上发现了  $K_{ATP}$  通道受 ATP 和膜电位的双重调节, 提出了通道活动的 “化学-电压双重门控” 机制<sup>[10]</sup>, 本研究发现成年大鼠海马神经元上的  $K_{ATP}$  通道除受 ATP 和膜电位调节外, 细胞内  $Ca^{2+}$  水平也是一个重要的调控因素。

Jiang 等<sup>[5]</sup>在人的皮层神经元上也记录到一类大电导、 $Ca^{2+}$  依赖的  $K_{ATP}$  通道, 为区别于 “经典的”  $K_{ATP}$  通道而将之称为 L- $K_{ATP}$  (large conductance  $K_{ATP}$  channel), 但他们未研究此类通道活动是否有电压依赖性。因 “经典的”  $K_{ATP}$  的活动不依赖  $Ca^{2+}$ , 一般对  $K_{ATP}$  通道的研究中常用无钙或低钙的溶液, 无法记录到这类 L- $K_{ATP}$  通道, 所以我们推测 L- $K_{ATP}$  通道在脑内的分布应比目前所知的范围要广泛的多。

海马神经元上存在着两种不同性质的  $K_{ATP}$  通道的意义何在? 既然 “经典的”  $K_{ATP}$  通道具内向整流性, 且对 ATP 敏感性高, 因此只有当胞内 ATP 下降到相当低的水平时才有可能激活 (从毫摩尔降到微摩尔)<sup>[6]</sup>, 而 L- $K_{ATP}$  通道对毫摩尔的 ATP 敏感且有可能在胞内 ATP 浓度稍低于生理水平时便可激活, 那么缺血缺氧早期激活的应该是这类 L- $K_{ATP}$  通道, 而当细胞严重缺氧而使胞内 ATP 浓度持续降低到一定水平时才进一步激活 “经典的”  $K_{ATP}$  通道。我们的实验还表明: L- $K_{ATP}$  通道对胞内  $Ca^{2+}$  敏感。正常生理状态下胞内  $Ca^{2+}$  浓度在  $0.1$   $\mu\text{mol/L}$  左右, 在缺血缺氧时可升高至  $1$   $\mu\text{mol/L}$  以上<sup>[11]</sup>; 从本实验结果来看, 开始激活这类 L- $K_{ATP}$  通道所需的胞内  $Ca^{2+}$  浓度应在  $0.01$   $\mu\text{mol/L}$  到  $1$   $\mu\text{mol/L}$  之间, 因此缺血缺氧后胞内  $Ca^{2+}$  浓度的升高也是激活 L- $K_{ATP}$  通道的另一重要因素。L- $K_{ATP}$  通道还对膜电位敏感, 那么缺血缺氧时胞内 ATP 浓度的下降、 $Ca^{2+}$  浓度的升高和膜电位的去极化都能增强 L- $K_{ATP}$  通道的活动。L- $K_{ATP}$  通道在缺血缺氧时活动的增强可对抗膜的去极化、降低膜的兴奋性, 使细胞对 ATP 的需求和  $Ca^{2+}$  的内流减少, 起到一种负反馈调节的作用。综上所述, 不同细胞代谢水平可能通过调节不同  $K_{ATP}$  通道的活动影响细胞膜的兴奋性, 调节细胞的功能。L- $K_{ATP}$  通道受 ATP、膜电位及  $Ca^{2+}$  的三重调节, 可能在缺血缺氧等细胞代谢受损的情况下起到保护作用。

### 参 考 文 献

- Ohno-Shosaku T, Yamamoto C. Identification of an ATP-sensitive  $K^+$  channel in rat cultured cortical neurons. *Pflügers Arch*, 1992, **422** (3): 260~266
- Ashford M L J, Boden P R, Treherne J M. Glucose induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Pflügers Arch*, 1990, **415** (4): 479~483
- Politi D M T, Rogawski M A. Glyburide sensitive  $K^+$  channels in cultured rat hippocampal neurons: activation by cromakalim and energy-depleting conditions. *Mol Pharmacol*, 1991, **40** (2): 308~315
- 周英杰, 佟振清, 高天明. 成年大鼠海马 CA1 区锥体细胞  $K_{ATP}$  通道的特性. *生理学报*, 2001, **53** (5): 344~348  
Zhou Y J, Tong Z Q, Gao T M. *Acta Physiol Sin*, 2001, **53** (5): 344~348
- Jiang C, Haddad G G. Modulation of  $K^+$  channels by intracellular ATP in human neocortical neurons. *J Neurophysiol*, 1997, **77** (1): 93~102
- Babenko A P, Aguilar-Bryan L, Bryan J. A view of SUR/  $K_{IR}6$ . X  $K_{ATP}$  channels. *Annu Rev Physiol*, 1998, **60**: 667~687
- Jiang C, Xia Y, Haddad G G. Role of ATP-sensitive  $K^+$  channels

- during anoxia: major differences between rat (newborn and adult) and turtle neurons. *J Physiol (Lond)*, 1992, **448** (5): 599~612
- 8 Gong L W, Gao T M, Li X, *et al.* Enhancement in activities of large conductance calcium-activated potassium channels in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 2000, **884** (1~2): 147~154
- 9 Inagaki N, Seino S. ATP-sensitive potassium channels: structure, functions, and pathophysiology. *Jap J Physiol*, 1998, **48** (6): 397~412
- 10 Tang X D, Tong Z Q. An adenosine triphosphate (ATP)-sensitive  $K^+$  channel of rat neocortical neurons is brgated by intracellular ATP and Voltage: a novel channel gating mechanism? *Neurosci Lett*, 1995, **193** (2): 93~96
- 11 Nakamura T, Minamisawa H, Katayama Y, *et al.* Increased intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: a possible cause of delayed neuronal death. *Neuroscience*, 1999, **88** (1): 57~67

## $Ca^{2+}$ -dependent $K_{ATP}$ Channel, a New Subtype of $K_{ATP}$ Channel in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons From Adult Rat\*

ZHOU Ying-Jie, TONG Zhen-Qing, GAO Tian-Ming\*\*

(Department of Physiology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract** ATP-sensitive  $K^+$  channels play an important role in coupling membrane excitability with intracellular metabolic stress. To characterize such  $K_{ATP}$  channels from rat brain, the inside-out mode of patch-clamp technique was applied to freshly dissociated hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rat. One type of  $K^+$  permeable channel was recorded only at the presence of  $Ca^{2+}$  in the internal solution and it could be inhibited by application of 1~3 mmol/L ATP and 1 mmol/L tolbutamide, a  $K_{ATP}$  channel blocker. Both of channel open probability and the ATP induced-inhibition displayed a voltage-dependent fashion. When both sides of the excised membrane were in symmetrical 140 mmol/L  $K^+$ , the  $I-V$  relation was linear with a conductance of 204 pS and reversal potential was 3.57 mV. Unlike the previously reported "classical"  $K_{ATP}$  channel, this large-conductance  $K_{ATP}$  channel ( $L-K_{ATP}$ ) was regulated by membrane potential, intracellular  $Ca^{2+}$  and ATP, indicating a new subtype of  $K_{ATP}$  channel presents in hippocampus neurons. These results demonstrate that at least two distinct  $K_{ATP}$  channels exist in rat hippocampal neurons and suggest that metabolic state may be continuously sensed in neurons *via* different  $K_{ATP}$  channels with resulting alterations in neuronal membrane excitability.

**Key words**  $K_{ATP}$  channel,  $Ca^{2+}$ , hippocampal, CA1, patch clamp

\* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (39970265), Natural Science Foundation of Guangdong Province (990395) and Outstanding Scientists Program of PLA (01J009).

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

Received: March 19, 2001 Accepted: April 19, 2001