

不同强度工频磁场对神经元延迟整流钾通道特性的影响*

李 刚^{1)**} 李丹丹¹⁾ 李媛媛^{1, 2)} 林 凌¹⁾

(¹⁾ 天津大学, 精密测试技术及仪器国家重点实验室, 天津 300072; ²⁾ 天津工业大学计算机科学与软件学院, 天津 300387)

摘要 工频磁场是人类生活中接触最多的一类磁场, 其引起的生物效应与人类健康的关系备受关注. 本文选用 1 mT、5 mT 及 10 mT 工频磁场照射急性分离的小鼠皮层神经元(15 min), 应用全细胞膜片钳技术离线记录通道电流, 研究了工频磁场对神经元延迟整流钾通道特性的影响. 结果显示, 1 mT、5 mT 及 10 mT 3 个强度的工频磁场对 I_K 均有抑制作用, 但随着去极化电压的增加, 发现 1 mT 和 5 mT 工频磁场的抑制率几乎不变, 抑制率分别为 $(30 \pm 4.2)\%$ 和 $(20 \pm 2.2)\%$, 而 10 mT 工频磁场的抑制率增加, 最大抑制率为 43.4%. 另外, 1 mT 和 5 mT 工频磁场影响了延迟整流钾通道的激活特性, 通道的半数激活电压变大, 斜率因子不变. 而 10 mT 工频磁场对通道的激活特性没有影响, 半数激活电压和斜率因子均不改变. 研究表明, 工频磁场可能影响了细胞膜上离子通道蛋白质的结构和功能, 并且不同强度工频磁场对通道的影响不同, 存在强度窗口效应.

关键词 工频磁场, 延迟整流钾通道, 神经元, 膜片钳

学科分类号 Q689

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00444

工频磁场是指频率为 50 Hz 或 60 Hz 的磁场, 与生产和生活存在密切的关系. 目前, 对工频磁场的健康危害性存在争议, Wertheimer 和 Leeper^[1]最先开展了有关电磁场和儿童白血病的流行病学调查, 发现居室内伴有高电流配制者发生儿童白血病的报道病例数远高于低电流配置者. 随后开展了大量的流行病学调查研究, 有研究显示工频磁场增加了癌症的发病率^[2-4], 但也有研究表明工频磁场与癌症发病率没有相关性^[5]. 为了更深层次地研究磁场的生物效应, 从细胞及分子水平上研究磁场生物效应已经成为主流. Wolf 等^[6]研究表明工频磁场暴露促进了细胞的增殖和 DNA 损伤. Gaetani 等^[7]应用磁场照射成人心脏干细胞, 发现磁场影响细胞的新陈代谢、增殖及分化. 另外, 研究表明磁场照射影响酶的活性^[8]、自由基^[9-10]及活性氧簇^[11](ROS)的浓度. 但也有不同的报道^[12]表明实验组和对照组之间没有显著性差异. 由于磁场作用机制尚不清楚, 生物效应与磁场呈非线性关系, 即频率窗口、强度窗口及时间窗口等特性, 所以磁场的生物效应不能简单地推断.

细胞膜是磁场可能作用的靶点之一, 而离子通

道是镶嵌在细胞膜上的功能性蛋白, 在维持细胞内外的渗透压及电压差中起着关键性的作用. Mathie 等^[13]综述了极低频电场对神经元离子通道产生的效应. 另外本课题组也发表了恒定磁场及脉冲磁场对神经元离子通道的影响^[14-15], 并首先报道了不同强度工频磁场对神经元延迟整流外向钾离子通道的影响.

弱强度的工频磁场在人们生活中的分布相对比较广泛, 10 mT 和 1 mT 分别是弱强度磁场的上下界, 所以本文选择 1 mT, 5 mT 及 10 mT 工频磁场, 从电生理学的角度应用膜片钳技术, 研究不同强度工频磁场对延迟整流外向钾离子通道的影响, 探索生物效应与工频磁场强度的关系, 为揭示磁场作用机制提供数据.

* 天津市应用基础及前沿技术研究计划(08JCZDJC19400)和广东省科技计划(2008A030102010)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 13164048567, E-mail: ligang59@tju.edu.cn

收稿日期: 2011-10-20, 接受日期: 2011-12-02

1 材料与方法

1.1 急性分离小鼠皮层神经元

取 7~10 天的昆明小鼠(中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供), 断头取脑后放入 0~4℃ 的人工脑脊液(ACSF)中 2 min (ACSF 成分(mmol/L): NaCl 134, KCl 5, NaH₂PO₄ 1.5, MgSO₄ 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 25, 葡萄糖 10, HEPES 10, pH 7.4), 在冰枕上分离出小鼠脑皮层, 手工切成 400~600 μm 厚的脑片, 并置 ACSF 中连续通入 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气, 孵育 50 min 后加入链酶蛋白酶, 使其终浓度为 0.3 g/L, 32℃ 下消化 15 min. 消化结束后用孵育液冲洗脑片 3 次, 置 ACSF 中并连续通入 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气, 脑片中皮层神经细胞可在 4~6 h 内保持良好的生理状态. 将 1~2 个脑片放入盛有人工脑脊液的离心管中, 用不同口径的 Pasteur 吸管轻轻吹打, 静置 2~3 min 后取上部细胞悬液, 放入带有盖玻片(20 mm×20 mm)的培养皿(直径为 35 mm)内, 细胞贴壁约 20 min 后, 用标准细胞外液(成分(mmol/L): NaCl 130, KCl 5.4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, 葡萄糖 10, HEPES 10, pH 7.3)冲洗 2~3 次之后, 进行全细胞膜片钳记录.

1.2 全细胞膜片钳记录

在室温 20~25℃ 下进行实验数据采集, 利用 PC2C 膜片钳放大器在全细胞膜片钳方式下记录数据. 通过 05-E 型程控控制仪, 分两步得到玻璃微电极, 冲灌 K 电极内液(成分(mmol/L): KCl 130, CaCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 10, Na₂ATP 3, MgCl₂ 2, pH 7.2, 经 0.22 μm 滤膜过滤). 电极电阻为 3~5 MΩ, 当电极与细胞膜之间形成高阻封接(>1 GΩ)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%. 然后在设定的刺激波形下, 记录通道电流.

1.3 磁场装置及实验设计

实验室自制刺激装置如图 1 所示, 铁芯为冷轧硅钢片(厚 2 cm, 宽 4 cm, B=2 T), 线圈由直径 0.8 mm 漆包铜线绕制, 匝数 310, 舌面积为 8 cm². 用 PF-035 型数字特斯拉计得到暴磁区(40 mm × 40 mm)各点的磁场强度, 获得暴磁区域中心点的磁场强度分别为 1 mT, 5 mT 及 10 mT, 磁场分布图如图 2 所示, 中心暴磁区 20 mm × 20 mm 范围内磁场认为是均匀的. 另外在磁场刺激的时间段内, 细胞外液的温度没有变化.

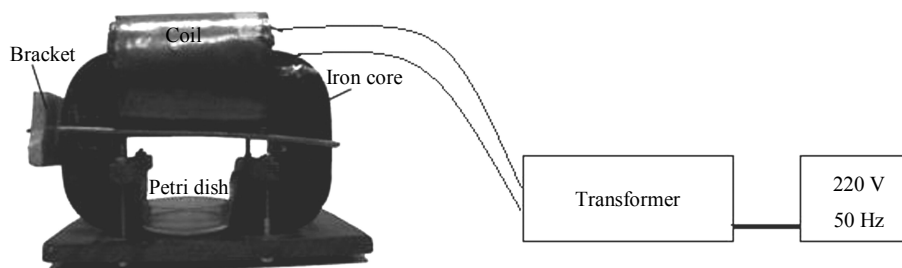


Fig. 1 The diagram of stimulation device of 50 Hz magnetic fields

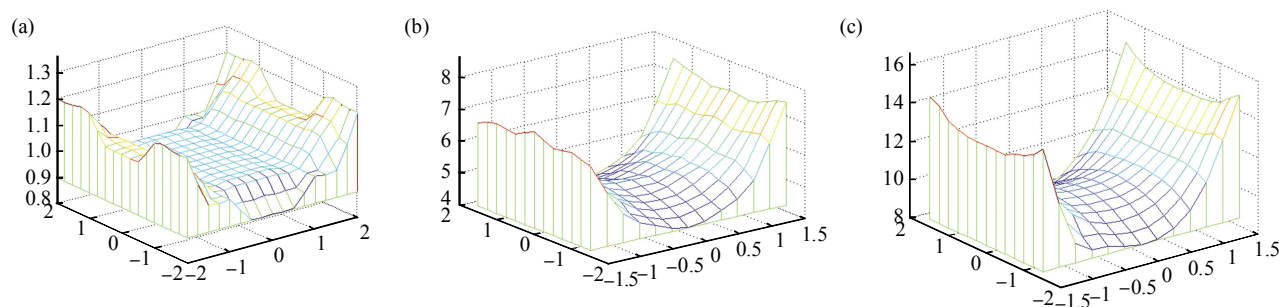


Fig. 2 The uniform distribution of magnetic fields

(a) The uniform distribution of 1 mT. (b) The uniform distribution of 5 mT. (c) The uniform distribution of 10 mT.

将已贴壁的细胞放入磁场刺激 15 min 后, 在离线的状态下进行膜片钳记录, 得到的实验数据作为暴磁组. 而在未加磁场刺激的情况下, 放置 15 min 后, 获得的数据作为对照组. 考虑到细胞活性的下降及磁场作用的恢复效应, 每盘细胞实验记录的时间在 30 min 内有效.

1.4 数据处理

实验结果分析采用 Clampfit 10.0 软件和 Origin 6.0 统计软件完成, 数据经过软件漏检之后进行统计分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 磁场照射前后差异应用配对 t 检验进行分析.

2 结 果

2.1 不同强度工频磁场对延迟整流外向钾通道电流(I_k)的影响

在细胞外液中加入阻断剂 $1 \mu\text{mol/L}$ TTX、 0.1 mmol/L CdCl_2 、 2 mmol/L 4-AP, 分别阻断小鼠脑皮层神经元的钠通道、钙通道和瞬时外向钾通道. 封接、破膜之后, 将钳制电压设为 -40 mV 并给予一串刺激脉冲^[10](图 3a), 其脉冲幅度为 $-40 \text{ mV} \sim +50 \text{ mV}$, 脉冲宽度为 160 ms , 步幅为 10 mV , 刺激频率 0.2 Hz , 得到一组外向电流(图 3b), 该电流具有几乎不失活的特性. 为了验证这组电流是延迟整流钾通道电流(I_k), 在溶液中加入 30 mmol/L TEA-Cl, 从图 3c 中可以看到, 大部分的电流被抑制了.

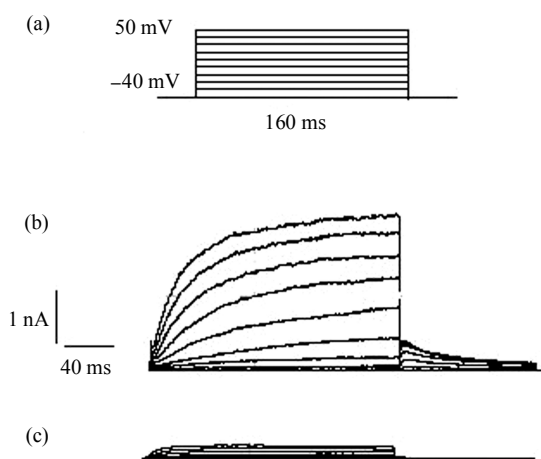


Fig. 3 The current curve of I_k

(a) The stimulation pulse. (b) The Delayed Rectifier Potassium channel current. (c) The Delayed Rectifier Potassium channel current with 30 mmol/L TEA-Cl.

以去极化电压作为横轴, 电流值与膜电容的比值即电流密度作为纵轴, 绘制出 4 条 I_k -V

曲线(图 4), 由图 4 可知工频磁场对 I_k 具有抑制作用. 对照组、 1 mT 暴磁组、 5 mT 暴磁组、 10 mT 暴磁组的峰值电流密度(pA/pF)分别为 173.61 ± 30.68 , 119.54 ± 5.58 , 138.23 ± 12.74 , 98.18 ± 22.57 , 与对照组分别进行配对 t 检验, 均有显著性差异($n=10$, $P < 0.05$).

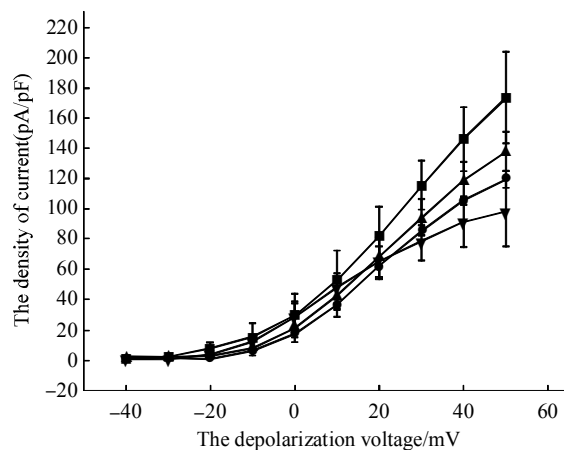


Fig. 4 The curve of I_k -V

■—■: The control group; ●—●: 1 mT exposure group; ▲—▲: 5 mT exposure group; ▼—▼: 10 mT exposure group.

为了更直观了解工频磁场对 I_k 的抑制作用, 以去极化电压为横轴, 抑制率为纵轴, 抑制率为 $(I_c - I_e)/I_c$, I_c 为不同去极化电压下对照组的通道电流密度, I_e 为不同去极化电压下暴磁组的通道电流密度, 绘制不同去极化电压下磁场对通道电流的抑制率曲线(图 5).

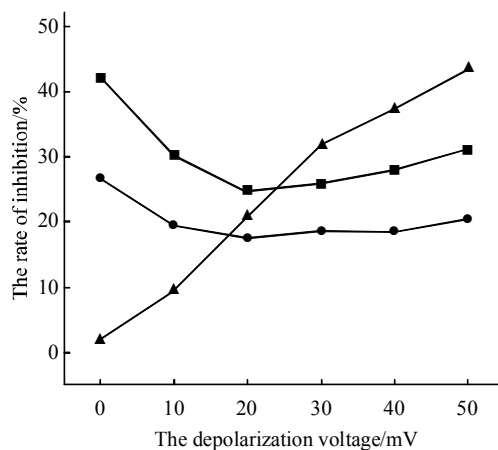


Fig. 5 The inhibition effects of magnetic fields

■—■: 1 mT exposure group; ●—●: 5 mT exposure group; ▲—▲: 10 mT exposure group.

不同强度工频磁场对 I_k 的抑制程度不同, 并且不同去极化电压下, 各暴磁组的抑制率曲线有差别, 1 mT, 5 mT 两组暴磁组的抑制率曲线几乎呈直线, 抑制率 $(30.0 \pm 4.2)\%$, $(20.0 \pm 2.2)\%$, 而 10 mT 暴磁组的抑制率曲线随着去极化电压的增加, 抑制率呈上升的趋势, 最大的抑制率为 43.4%.

2.2 不同强度工频磁场对延迟整流外向钾通道激活特性的影响

将膜电位钳制在 -40 mV, 预置 -120 mV 超极化条件刺激 200 ms, 然后从 -40 mV 起以 10 mV 的步幅递增, 160 ms 脉宽的去激化测试脉冲刺激至 50 mV^[16](图 6a), 刺激频率 0.2 Hz, 得到一组 I_k 激活曲线(图 6b).

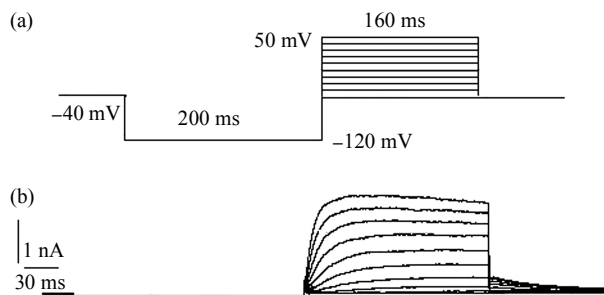


Fig. 6 The activation current of voltage-gated potassium channel

(a) Stimulation pulse of I_k . (b) The activation current of I_k .

利用公式 $G=I/(V-V_{rev})$ 将记录得到的通道电流转换为通道的电导值, 其中 G 为通道电导, I 为不同测试膜电位下的通道电流峰值, V 为测试膜电位, V_{rev} 为钾离子的反转电位. 以 G/G_{max} 作为纵轴, 去极化电压为横轴, 作通道稳态激活的散点曲线. 然后利用 Boltzman 方程 $G/G_{max}=1/\{1+\exp[(V_{1/2}-V)/k]\}$ 对通道的激活曲线进行拟合, 其中 $V_{1/2}$ 为半数激活电压, k 为斜率因子. 激活曲线呈 S 型(图 7)且稳态激活曲线的拟合参数如表 1 所示. 与对照组相比, 1 mT 暴磁组和 5 mT 暴磁组的钾通道半数激活电压均变大($n=10$, $P < 0.05$), 而 10 mT 暴磁组的半数激活电压没有显著性变化, 并且 3 个暴磁组的钾通道激活斜率因子均未发生显著性的改变.

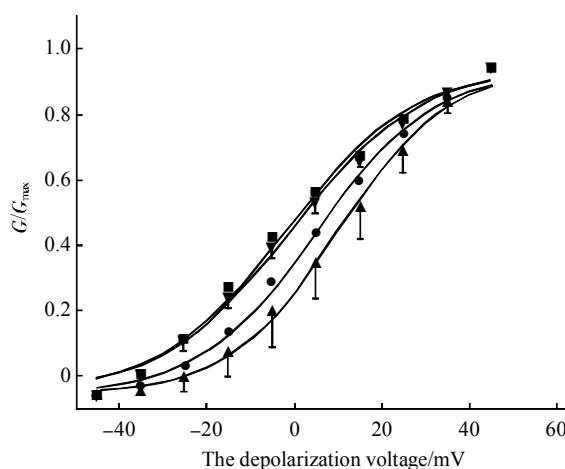


Fig. 7 Effects of magnetic fields on activation kinetics of I_k

■—■: The control group; ●—●: 1 mT exposure group; ▲—▲: 5 mT exposure group; ▼—▼: 10 mT exposure group.

Table 1 The fitting parameters of activation curve of I_k

	$V_{1/2}$ (mV)	k
Control	2.82 ± 0.85	14.61 ± 0.77
1 mT	$10.21 \pm 0.81^*$	13.42 ± 0.73
5 mT	$14.99 \pm 0.79^*$	12.57 ± 0.71
10 mT	3.94 ± 0.85	14.72 ± 0.78

* $P < 0.05$.

3 分析与讨论

延迟整流外向钾通道是电压敏感性钾通道的一员, 广泛分布在兴奋性细胞的细胞膜上. 在中枢神经系统中, 延迟整流外向钾通道影响动作电位的后期复极化, 且与动作电位的发放频率及形状有关^[17]. 本文研究了不同强度工频磁场对神经元延迟整流钾离子通道产生的生物效应, 进一步探讨了工频磁场对离子通道产生的影响与工频磁场强度的关系.

试验结果表明, 1 mT、5 mT、10 mT 工频磁场均抑制神经元延迟整流钾通道电流, 但随着去极化电压的增加抑制率曲线趋势不同. 1 mT 和 5 mT 的抑制率曲线趋势似乎相同, 随着去极化电压的增加, 抑制率几乎不变. 而 10 mT 工频磁场对 I_k 的抑制率则随着去极化电压的增加而变大, 即去极化

电压越大, 延迟整流钾通道的电压敏感性越不敏感, 导致延迟整流钾通道的开口变小, 造成整个神经元动作电位复极化的延迟, 从而影响动作电位的发放频率, 影响正常机体的某些功能. 目前磁场的作用机制尚不清楚, 从通道的结构角度来分析, 由于 S4 片段上最外端的 4 个精氨酸对电压变化非常敏感^[18-19], 当碱性氨基酸检测到膜电位的变化, 然后打开离子通道孔, 试验结果暗示, 工频磁场可能影响了 S4 片段上电压敏感性元件的正常功能, 使得通道的打开受到了一定的限制, 而抑制率曲线可能是磁场影响通道结构变化的更细微的表现.

与对照组相比, 1 mT 和 5 mT 工频磁场影响了延迟整流钾通道的激活特性, 两个场强下通道的半数激活电压均变大而斜率因子不变, 这一试验结果表明, 两个场强下的工频磁场均增大了延迟整流钾通道激活的电压阈值, 使得通道不易被激活, 而激活的速率均未发生改变. 另外, 本试验结果发现, 10 mT 工频磁场不影响延迟整流钾通道的激活特性, 通道的半数激活电压和斜率因子均没有显著性变化. 研究表明, 不同强度工频磁场对通道激活特性有不同的影响, 具有强度窗口效应.

Garip-Inhan 等^[20]研究了 1 mT、5 mT 及 10 mT 工频磁场对 K562 细胞分化的影响, 结果表明 1 mT 和 5 mT 增加了细胞的分化率而 10 mT 没有显著效应. 上述的研究与本论文的结果相比, 1 mT 和 5 mT 两个场强的工频磁场均对细胞产生一定的生物效应, 而 10 mT 工频磁场的生物效应, 研究结果不一致. 两个试验结果具有一定的参考价值, 但是由于生物系统的复杂多样性, 磁场暴露对不同类型或功能的细胞产生的生物效应不同, 并且研究方法对实验结果也有很大的影响, 所以在磁场作用机制尚不清楚的情况下, 大量的试验结果的积累是必要的, 而各个实验结果之间的相关性有待进一步的探索.

本论文研究了不同强度的工频磁场对神经元延迟整流钾通道的影响, 结果表明磁场对细胞膜上的离子通道蛋白存在一定的影响, 为细胞膜是磁场可能的作用靶点之一提供了依据.

参 考 文 献

- [1] Wertheimer N, Leeper Ed. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol*, 1979, **109**(3): 273-284
- [2] Feychting M, Ahlbom A. Childhood leukemia and residential exposure to weak extremely low frequency magnetic fields. *Environ Health Perspect*, 1995, Suppl 2: 59-62
- [3] Bates M N. Extremely low frequency electromagnetic fields and cancer: the epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect*, 1991Nov, **95**: 147-156
- [4] Caplan L S, Schoenfeld E R, O'Leary E S, *et al.* Breast cancer and electromagnetic fields-a review. *Annals of Epidemiology*, 2000, **10**(1): 31-44
- [5] McBride M L, Gallagher R P, Theriault G, *et al.* Power-frequency electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia in Canada. *Am J Epidemiol*, 1999, **149** (9): 831-842
- [6] Wolf F I, Torsello A, Tedesco B, *et al.* 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: Possible involvement of a redox mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1743**(1-2): 120-129
- [7] Gaetani R, Ledda M, Barile L, *et al.* Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Cardiovascular Research*, 2009, **82**(3): 411-420
- [8] Eleuteri A M, Amici M, Bonfili L, *et al.* 50Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance protein carbonyl groups content in cancer cells: effects on proteasomal systems. *J Biomedicine and Biotechnology*, 2009(2009), ID: 834239, 1-10
- [9] Simkó M. Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects. *Curr Med Chem*, 2007, **14** (10): 1141-1152
- [10] Simkó M, Mattsson M O. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses *in vitro*: possible immune cell activation. *J Cell Biochem*, 2004, **93**(1): 83-92
- [11] Rollwitz J, Lupke M, Simkó M. Fifty-hertz magnetic fields induce free radical formation in mouse bone marrow-derived promonocytes and macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **3**(1674): 231-238
- [12] Hefeneider S H, McCoy S L, Hausman F A. Long-term effects of 60-Hz electric *vs.* magnetic fields on IL-1 and IL-2 activity in sheep. *Bioelectromagnetics*, 2001, **22**(3): 170-177
- [13] Mathie A, Kennard L E, Veale E L. Neuronal ion channels and their sensitivity to extremely low frequency weak electric field effects. *Radiation Protection Dosimetry*, 2003, **106**(4): 311-316
- [14] Li G, Cheng L J, Qiao X Y, *et al.* Characteristics of delayed rectifier potassium channels exposed to 3 mT static magnetic field. *Ieee Transactions on Magnetics*, 2010, **46**(7): 2635-2638
- [15] 林 凌, 贾方荣, 李 刚, 等. 脉冲磁场对神经元瞬时外向钾电流的影响. *光学精密工程*, 2008, **16**(9): 1746-1751
Li L, Jia F R, Li G, *et al.* *Optics and Precision Engineering*, 2008, **16**(9): 1746-1751
- [16] 李 刚, 程立君, 林 凌. 恒定磁场对神经元延迟整流钾通道特性的影响. *天津大学学报*, 2009, **42** (10): 923-928
Li G, Cheng L J, Lin L. *J Tianjin University*, 2009, **42** (10): 923-928
- [17] Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Assoc, 2001

- [18] Seoh S A, Sigg D, Papazian D M, *et al.* Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, 1996, **16**(6): 1159–1167
- [19] Aggarwal S K, MacKinnon R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, 1996, **16** (6): 1169–1177
- [20] Garip-Inhan A, Işal-Tugut I, Kalkan M T. Effect of ELF-EMF on K562 cell differentiation in the presence or absence of quercetin and heat-shock. *Biotechnol*, 2007, **2**(21): 182–185

Effects of 50 Hz Magnetic Fields With Different Intensities Exposure on Delayed Rectifier Potassium Channel of Neurons*

LI Gang^{1)**}, LI Dan-Dan¹⁾, LI Yuan-Yuan^{1,2)}, LIN Ling¹⁾

¹⁾ State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instruments, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

²⁾ School of Computer Science Software Engineering Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China)

Abstract There is a growing concern about the relationship between the human health and the biological effects caused by the magnetic fields exposure. The cortical neurons isolated from the mice were exposed to 50 Hz magnetic fields (EMF 1 mT, 5 mT, 10 mT) for 15 min, and then the currents of the delayed rectifier potassium channel were recorded off-line using the whole-cell patch clamp technique to investigate the effects of EMF on channels for the first time. Compared to the control group, there was a significant inhibition on the I_k after exposure to EMF, and with the increase of the voltage depolarization, the inhibition rates of 1 mT and 5 mT almost unchanged and the inhibition rates were $(30.0 \pm 4.2)\%$ and $(20.0 \pm 2.2)\%$, respectively. While the inhibition rate of 10 mT became larger and the maximum inhibition rate was 43.4%. Additionally, 1 mT and 5 mT magnetic fields both affected the activation characteristics of delayed rectifier potassium channel, the half activation voltage became larger and the slope factor unchanged, while 10 mT magnetic fields did not changed anything. This paper indicated that the structure and function of the channel protein on cell membrane may be altered by 50 Hz EMF, and there were different effects on the channel for different strength of magnetic fields, the window effects of strength of magnetic fields were improved in this study.

Key words magnetic fields, delayed rectifier potassium channel, neurons, patch-clamp

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00444

*This work was supported by grants from Tianjin Application Basis & Front Technology Study Programs (08JCZDJC19400) and Supported by Guangdong Science & Technology Plan Project (2008A030102010)

**Corresponding author.

Tel: 86-13164048567, E-mail: ligang59@tju.edu.cn

Received: October 20, 2011 Accepted: December 2, 2011