

# 铅对大鼠海马神经细胞 H - 电流特性的影响

熊巧婕, 葛少宇, 何水金, 谷 岩, 阮迪云

(中国科学技术大学生命科学学院, 安徽 合肥 230027)

**摘要:** 应用全细胞膜片钳技术研究了铅对大鼠海马神经细胞 H - 电流特性的影响。结果表明 铅抑制了 H - 电流表达; 降低了 H - 通道电压敏感性和升高了 H - 通道的激活电压。铅对 H - 电流的压抑效应及其对 H - 通道电压敏感性的改变, 是铅损伤神经活动的一个因素之一。

**关键词:** 铅; 大鼠海马细胞; 全细胞膜片钳技术; H - 电流

**中图分类号:** Q424      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000 - 6737(2002)02 - 0197 - 04

铅是一种重要的环境毒物。人们已从分子、细胞、形态和功能上较广泛研究了铅的神经毒理机制。低铅暴露对神经系统的毒性表现为慢性和广泛两大特征。铅在突触传递可塑性方面的损伤表现为: 铅降低了建立在突触可塑性基础上的 LTD 和 LTP 表达<sup>[1]</sup>; 抑制了 TTX 敏感突触自发放和加强了 TTX 不敏感突触自发放<sup>[2,3]</sup>。铅还抑制了钠、钾、钙等离子型通道和谷氨酸等配体门控类通道所介导的电流<sup>[1,4]</sup>。但是关于铅对控制细胞膜电位之一的超极化电流(H - 电流, Leak - 电流和 M - 电流)影响的研究却很少。

海马是学习记忆关键部位。慢性铅暴露影响了学习记忆, 本文采用了急性分离的大鼠海马神经细胞, 研究了铅对超极化诱导的主要通透 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 的 H - 电流的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 大鼠海马神经元的分离

取出生后 7 - 14 天 Wistar 大鼠断头取脑, 置于人工脑脊液中冰浴, 后取出海马, 切成约 500  $\mu\text{m}$  厚的海马脑片, 室温下置入人工脑脊液中, 并连续通以 95%O<sub>2</sub> + 5%CO<sub>2</sub>; 30 min 后取出海马脑片, 先置入 10 ml 含 0.17 g/L 链霉菌蛋白酶的人工脑脊液(31°C)中孵育 20 min; 然后再移入 10 ml 含 0.17 g/L 嗜热菌蛋白酶的人工脑脊液中孵育 20 min; 最后用不含酶液的人工脑脊液将脑片冲洗三次。小心取出 CA1 区脑块, 放入含 2 ml 标准细胞外液培养皿中, 分别用大小不同、直径逐渐减小的尖端被热处理过的 Pasteur 吸管轻轻吹打, 便可得到所需的分离细胞。静置约 5 min 后, 即

可进行全细胞膜片钳记录。

### 1.2 实验所需溶液

人工脑脊液成分 (mmol/L): 126 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 10 D - glucose, 以 (5%CO<sub>2</sub> + 95%O<sub>2</sub>) 混合气调节 pH 值至 7.4。

普通细胞外液成分 (mmol/L): 125 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 D - glucose, 用 Tris 碱调 pH 至 7.4。

电极内液 (mmol/L): KCl 140, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, EGTA 10, Na<sub>2</sub>ATP 5, 用 Tris 碱调 pH 至 7.25。

实验用化学试剂均为 Sigma 公司产品。

### 1.3 电生理实验

玻璃微电极(上海科达医学科技公司)经过二次拉制后抛光, 尖端直径为 2 ~ 3  $\mu\text{m}$ , 充灌电极内液后阻抗为 2 ~ 5 M $\Omega$ 。

在室温下进行实验, 当电极尖端与细胞膜之间形成高阻抗封接(> 1 G $\Omega$ )后, 负压破膜, 使电极内液与细胞内液相通, 可测到膜电容为 10 - 20 pF, R<sub>s</sub> 为 10 - 20 M $\Omega$ 。电流或电压信号经膜片钳放大器(PC - IIB, 华中理工大学)放大后与微机相连, 经 3 kHz 滤波, 采样频率为 20 kHz。测试和记录软件为 Ibbclamp(华中理工大学, 1999), 结果分析在 Igor 软件上完成。归一化后的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。P

收稿日期: 2001 - 07 - 02

作者简介: 熊巧婕, 1979 年生, 学士, E - mail: xiongqj@mail.ustc.edu.cn.

通讯作者: 阮迪云

值用 ANOVA 分析获得,  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

对照液和铅灌流液 ( $Pb(AC)_2$  溶于普通细胞外液制得)通过 Y-管加药系统加入。

## 2 实验结果

### 2.1 H-电流的度量

在许多类可兴奋性细胞中,都有一类在超极化条件下激活且不失活对  $Na^+$ 、 $K^+$  等阳离子非选择性通透的离子型通道,这一电流在快速内向电流后逐渐展开,最后进入稳态阶段。此通道介导电流的分析和度量方法如图 1 所示。

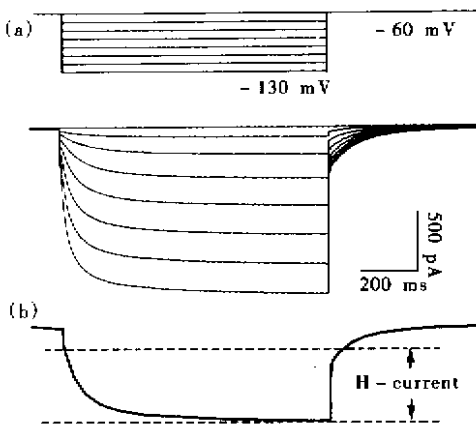


Fig.1 H-currents were elicited with the protocol in (a) and the representative recordings were also shown. The H-current relaxation amplitude was calculated as the difference between the instantaneous (upper dashed line) and steady-state (bottom dashed line) current values (b)

### 2.2 海马锥体细胞 H-电流的诱导与分离

在急性分离的大鼠海马锥体细胞上,利用图 1

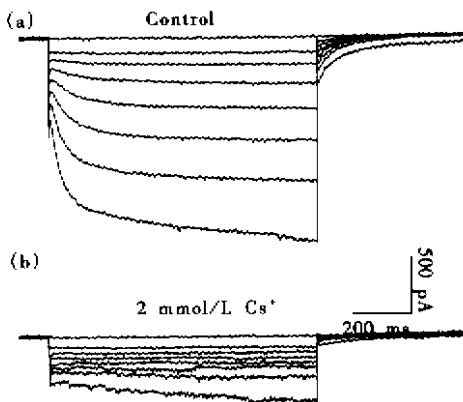


Fig.2 Effect of  $Cs^+$  on H-current. Currents evoked by hyperpolarized voltage steps from -60 to 130 mV in control (a) and after addition of 2 mmol/L  $Cs^+$  (b)

所示的刺激方波,在钳位值为 -60 mV 的条件下,给细胞以阶跃为 -10 mV 的超极化刺激,诱导的电流如图 2a。2 mmol/L 的  $Cs^+$  可以阻断这一电流的表达(图 2b),而 2 mmol/L 的  $Ba^{2+}$  对电流没有显著性的作用(图未显示),这一结果进一步证明了此电流为 H-电流。

### 2.3 铅压抑了 H-电流的表达

在钳位为 -60 mV 的大鼠海马细胞上,给细胞以阶跃为 -10 mV 的超极化刺激诱导 H-电流。图 3a、b 显示了这一超极化电流在对照组和 5  $\mu$ mol/L 铅灌流组中诱导的 H-电流曲线。实验结果表明:铅压抑了这一电流的表达。图 3c 描述了以超极化电压脉冲值为 x 轴,以 H-电流的绝对值对最大值归一化后值为 y 轴绘制的曲线图。图形表明铅使电压-电流曲线向左偏移 ( $n = 8, P < 0.05$ ) 降低了 H-电流的电压敏感性。

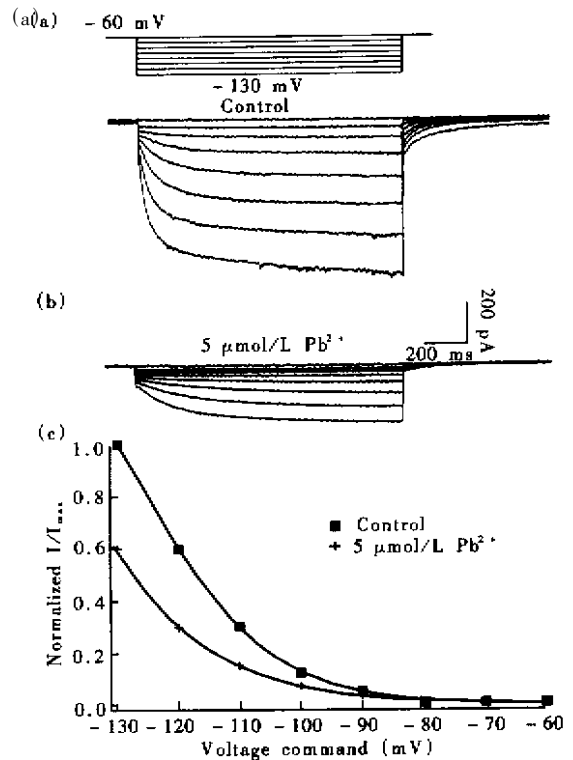
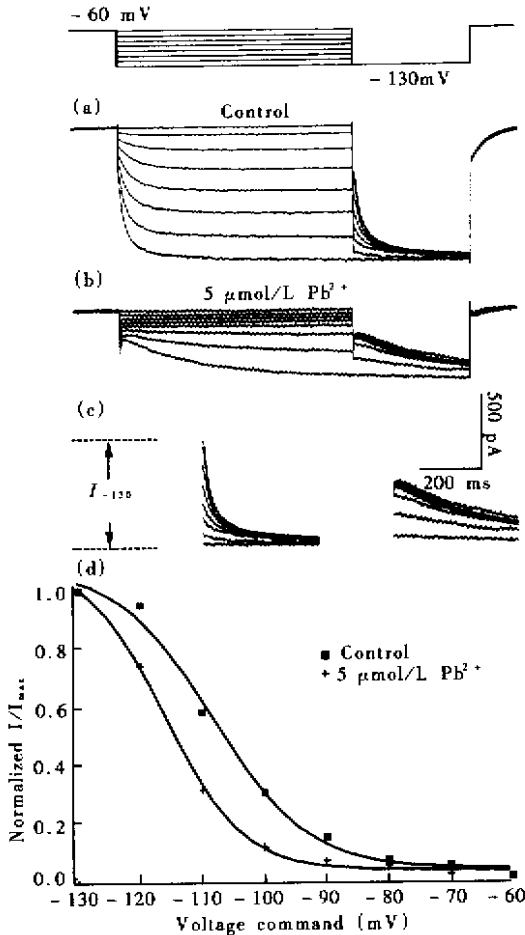


Fig.3 Effect of  $Pb^{2+}$  on H-current. (a) and (b): currents evoked by hyperpolarized voltage steps from -60 to -130 mV in control (a) and after addition of 5  $\mu$ mol/L  $Pb^{2+}$  (b). (c) the amplitude of H-current is plotted against the stimulating membrane potential in control and  $Pb^{2+}$  containing solution. Noted that: error bars were removed

### 2.4 $Pb^{2+}$ 对 H-通道激活特性的影响

为了观察  $Pb^{2+}$ 对 H-通道激活特性的影响。在

以阶跃为  $-10\text{ mV}$  第一个脉冲刺激条件下,接着给予  $-130\text{ mV}$  的第二个脉冲刺激,在对照组和  $5\text{ }\mu\text{mol/L Pb}^{2+}$  组中记录的电流图如图 4a、b。当按照 Kamondi 和 Reiner 方法<sup>[5]</sup>分析第二个脉冲诱导的在对照组和  $5\text{ }\mu\text{mol/L}$  电流时(图 4c),以第一个脉冲的电压值为  $x$  轴,以第二个脉冲 ( $-130\text{ mV}$ )



**Fig.4** Voltage dependence of H - current. A two - step protocol was used to determine the voltage - dependent activation of H - current in control (a) and  $5\text{ }\mu\text{mol/L Pb}^{2+}$  (b). The 900 ms duration prepulse to various holding potentials between  $-60$  and  $-130\text{ mV}$  partially activated H - current. Current observed during the subsequent test pulse to  $-130\text{ mV}$  was used to calculate the amount of H - current at different membrane potentials.  $I_{-130}$  is the maximal current in this protocol, evoked by stepping the membrane potential to  $-130\text{ mV}$ , and  $I_v$  is the current evoked during the  $-130\text{ mV}$  test pulse after a prepulse of membrane potential  $V$ . H - current was calculated for each test pulse by subtracting  $I_v$  from  $I_{-130}$ . Plot of relative H - current current ( $I/I_{\text{max}}$ ) against the prepulse membrane potential from the cell was shown in (c). Noted that: error bars were removed

诱导电流的归一化值为  $y$  轴作图 (如图 4d)。结果表明了铅升高了 H - 通道的激活电压 ( $n = 6$ ,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨 论

本文以急性分离的大鼠海马细胞为标本,研究了铅对超极化诱导电流特性的影响。结果表明铅抑制了 H - 电流的表达,降低了 H - 通道的电压敏感性。

铅是一种重要神经毒物,铅损伤在分子、细胞水平已被广泛的研究。以往在电生理水平的研究注重于突触传递效率研究;并且在通道水平的研究很多也是研究了去极化诱导的兴奋性通道,尚未研究超极化激活的通道。而本文在大鼠海马细胞上研究了铅对超极化通道激活的影响。超极化通道对静息状态下细胞稳定性发挥着重要的作用。而铅离子抑制了 H - 电流的表达,降低了此通道电压敏感性,因此铅可能通过改变 H - 通道的激活特性来改变细胞兴奋性。

H - 通道是一种内向非选择性的阳离子通道,其主要通透的有  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  等<sup>[6]</sup>。与 Talukder 和 Harrison 在解释  $\text{Pb}^{2+}$  对  $I_A$  的作用时提出的模型相似<sup>[4]</sup>,二价阳离子  $\text{Pb}^{2+}$  可能通过阻塞效应抑制在膜电位超极化条件下主要通透  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  等的内向 H - 电流表达,并且可能通过与其通道的电荷中心发生相互作用改变 H - 通道的激活特性及电压敏感性。

总之,铅可能通过改变 H - 通道的电压敏感性及抑制 H - 通道的表达,而降低细胞的兴奋性,进而发挥其神经毒性。

### 参考文献:

- [1] Lasley SM, Gilbert ME. Glutamatergic components underlying lead - induced impairments in hippocampal synaptic plasticity[J]. *Neurotoxicology*, 2000,21(6):1057 - 1068.
- [2] Braga MF, Pereira EF, Albuquerque EX. Nanomolar concentrations of lead inhibit glutamatergic and GABAergic transmission in hippocampal neurons[J]. *Brain Res*, 1999,826(1):22 - 34.
- [3] Braga MF, Pereira EF, Marchioro M, et al. Lead increases tetrodotoxin - insensitive spontaneous release of glutamate and GABA from hippocampal neurons[J]. *Brain Res*, 1999,826(1):10 - 21.

- [4] Talukder G, Harrison NL. On the mechanism of modulation of transient outward current in cultured rat hippocampal neurons by Di- and Trivalent cations[J]. *J Neurophysiol*, 1995,73(1):73-79.
- [5] Kamondi A, Reiner PB. Hyperpolarization-activated inward current in histaminergic tuberomammillary neurons of rat hypothalamus[J]. *J Neurophysiol*, 1991,66(6):1902-1911.
- [6] Pape HC. Queer current and pacemaker: The hyperpolarization-activated cation current in neurons[J]. *Annu Rev Physiol*, 1996,58:299-327.

## EFFECT OF $Pb^{2+}$ ON THE H-CURRENT ELICITED IN THE ACUTELY DISSOCIATED HIPPOCAMPUS CELL

XIONG Qiao-jie, GE Shao-yu, HE Shui-jin, GU Yan, RUAN Di-yun  
(School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

**Abstract:** Effect of  $Pb^{2+}$  on hyperpolarization-activated current (H-current) of rat hippocampal cell was studied with whole cell patch clamp technique. The results demonstrated:  $Pb^{2+}$  suppressed the expression of H-current, decreased the voltage sensitivity and increased the activation voltage. Suppression of the expression and change of the voltage-sensitivity of H-current may be one pathway by which  $Pb^{2+}$  expressed its toxicity.

**Key Words:**  $Pb^{2+}$ ; Hippocampal cell; Whole cell patch clamp; H-current