

· 综述 · 文章编号 1000-2790(2004)16-1528-03

## 膜片钳技术在角膜研究中的应用进展

邢咏新 张 林

(西安交通大学第一医院眼科, 陕西 西安 710061)

### Patch clamp technique in cornea research

XING Yong-Xin, ZHANG Lin

Department of Ophthalmology, First Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

**Abstract:** The patch clamp technique was invented in 1976 and has been applied in researches on cornea cells since the 90's of twenty century. It has been found that there are different types of ionic channels on the corneal epithelium and endothelium. These channels are responsible for maintaining cornea transparency. Several patch clamp modes have been used. The activities of ionic channels, the resting potential and capacity have been measured and the expression modulation of the channels has also been preliminarily studied.

**【Keywords】** patch clamp techniques; ion channels; cornea

**摘 要:** 膜片钳技术产生于 1976 年, 自 20 世纪 90 年代以来, 这一技术被应用于角膜各层细胞的研究中。研究结果显示, 在角膜上皮细胞、内皮细胞上存在着多种离子通道, 它们对于维持角膜的透明性具有重要意义。在研究中, 多种模式的膜片钳技术被应用其中。研究者不仅记录了角膜多种细胞的离子通道活动, 还对细胞的静息膜电位和膜电容进行了测量, 同时对于通道的表达调控进行了初步研究。

**【关键词】** 膜片钳术; 离子通道; 角膜

**【中图分类号】** R772 **【文献标识码】** A

**0 引言** 角膜的透明性是维持视觉器官正常视功能的重要条件。各种炎症、外伤、年龄因素以及代谢水平的变化, 可以使角膜水肿、混浊, 影响角膜的透明性, 导致视力下降, 严重者致盲。以前对于角膜的研究大多集中于病理学、形态学等方面。近年来随着膜片钳技术的日臻完善, 国外许多学者将这一新技术应用于角膜生理功能、病理状态的研究, 以及药物

疗效的评价, 取得了较大的进展。研究结果表明, 在角膜的上皮细胞、基质细胞和内皮细胞中, 均存在很多不同类型的离子通道, 这些离子通道与细胞间的缝隙连接一同参与角膜与外部环境及房水间的离子转运, 以维持角膜的透明性。当缝隙连接与离子通道的功能发生紊乱时, 则会导致角膜的透明性下降, 影响视觉功能。我们将膜片钳在角膜研究中的应用进行简要综述。

**1 概述** Neher 等<sup>[1]</sup>于 1976 年建立了膜片钳技术(patch clamp recording technique)。该技术以记录通过离子通道的离子电流来反映细胞膜上单一的(或多个的)离子通道分子活动。以后由于吉欧姆阻抗封接(gigaohm seal,  $10^9 \Omega$ )方法的确立和几种方法的创建, 使其测量电流分辨率可达到 1 pA, 其电极尖端直径仅有几个微米, 故对于体积较小、脆性较大的细胞亦可进行电压钳制, 从而可用于多种细胞系的研究。膜片钳的出现, 为细胞电生理的研究带来了革命性的变化, 此技术被认为与基因克隆并驾齐驱, 给生命科学研究带来了巨大的推动力。这一伟大的贡献使 Neher 和 Sakmann 获得了 1991 年度的诺贝尔生理学及医学奖。膜片钳技术被广泛应用于细胞电生理的研究中。自 20 世纪 90 年代以来, 研究者们利用膜片钳技术从不同方面对角膜上皮细胞、角膜内皮细胞、角膜基质细胞以及角膜缘干细胞进行研究, 证实了多种离子通道在这些细胞中的存在。

### 2 角膜上皮细胞

#### 2.1 正常角膜上皮细胞的研究

**2.1.1 大电导  $K^+$  离子选择性通道** 1992 年 Rae 等<sup>[2]</sup>利用膜片钳技术研究发现, 在兔的角膜上皮细胞基底部存在一个大电导的  $K^+$  离子选择性通道, 该通道可被细胞膜内外的奎尼丁所阻断。而后 Farrugia 等<sup>[3]</sup>进一步证实这一通道是角膜上皮细胞全细胞电流的主要来源, 通过改变细胞的渗透压可以对  $K^+$  通道进行调控: 当以低渗液取代常规灌注液时, 细胞水肿, 可选择性激活  $K^+$  离子通道, 而高渗液使细胞脱水时, 则可使  $K^+$  离子通道失活。灌注液中  $Cl^-$  离子浓度增高时, 穿孔性膜片钳可检测到类似低渗液灌注时的电流变化。这些电流变化与细胞的静息膜电位的变化一致, 说明大电导的  $K^+$  离子选择性通道在细胞渗透压改变时发生相应变化, 同时影响细胞的全细胞电流和静息电位。近年来研究者们对于  $K^+$  离子通道的调控表达进行了进一步的研究。Ta Kahira 等<sup>[4]</sup>采用常规全细胞和穿孔膜片钳技术记录牛角膜上皮细胞的全细胞电流, 结果证实角膜上皮细胞上存在两种不同的  $K^+$  离子通道, 一种是不活泼的、电压门控性  $K^+$  离子通道, 可被细胞膜的去极化完全阻断; 另一种是活泼的、恒定性  $K^+$  离子通道, 不能被阻断, 与以上研究中的大电导  $K^+$  离子通道类似。细胞外的脂肪酸如花生四烯酸(AA)等可抑制不活泼、电压门控性  $K^+$  离子通道, 并增加活泼、恒定性  $K^+$  离子通道电流。这一研究首次证实角膜上皮细胞中存在不活泼、电压门控性  $K^+$  离子通道, AA 及其代谢产物可调节  $K^+$  离子的转运, 直接激活大电导  $K^+$  离子通道, 并增加其在角膜上皮细胞中的管家功能, 调节

收稿日期 2004-04-01; 修回日期 2004-05-14

基金项目 陕西省自然科学基金资助项目(Y100 323020); 西安交通大学重点培植行动计划(XY10 082011)

通讯作者 张 林. Tel. (029) 85324017 Email. lin\_zhang@263.net

作者简介 邢咏新(1972-), 女(汉族), 辽宁省大连市人。硕士生(导师张 林), 主治医师. Tel. (029) 85324017 Email. xyxmexjtu@ sina100.com

上皮细胞的移植及移行。Rae 等<sup>[5]</sup>利用膜片钳结合 PCR 技术在上皮细胞中测得内向性整流性  $K^+$  离子通道的 mRNA, 并将这一通道命名为 Kir2.1, 再次证实这一通道的存在对于维持细胞的静息电位具有重要作用。

2.1.2 非电压门控性  $Ca^{2+}$  离子通道 Rich 等<sup>[6]</sup>使用  $Ca^{2+}$  离子敏感性荧光色素 Fura2, 利用膜片钳技术检测兔角膜上皮细胞内  $Ca^{2+}$  离子浓度  $[Ca^{2+}]_i$ 。在以下几方面结果与非电压门控性  $Ca^{2+}$  离子内流途径一致: ① 灌注液中加入 KCl 造成细胞膜去极化后  $[Ca^{2+}]_i$  增加; ② 借助氟灭酸 (Flufenamic acid) 等物质对  $K^+$  离子通道进行刺激, 使细胞膜超极化, 从而使  $[Ca^{2+}]_i$  降低; ③  $Ca^{2+}$  离子通道可被  $Ni^{2+}$  离子所阻断; ④ 常规  $Ca^{2+}$  通道阻断剂如 Bay-K-8644 等不影响  $Ca^{2+}$   $i$ 。

2.1.3 紧张性激活通道 Watanabe 等<sup>[7]</sup>利用膜片钳技术发现角膜上皮细胞存在紧张性激活通道, 即选择性  $K^+$  离子大电导 L 通道和非选择性小电导 S 通道。研究采用细胞吸附或内面向外膜片钳记录法, 分别测定离子的选择性、电压依赖性和紧张依赖性。细胞吸附模式记录到 L 通道和 S 通道的出现概率为 2:1, 前者呈现选择性  $K^+$  离子的单通道电流, 后者呈现  $Na^+$   $K^+$  通透性单通道电流, 二者均可被吸附管的负压吸附作用诱发、激活, 通道的开放概率和平均电流与细胞膜的紧张程度成正比。

## 2.2 培养角膜上皮细胞的研究

2.2.1 电压依赖性的外向整流性通道 1991 年, Marshall 等<sup>[8]</sup>在对原代培养的鼠和兔的角膜上皮细胞的研究中, 使用巨阻抗封接膜片钳技术, 测得在离体培养的最初 1~4 d 细胞上存在电压依赖性的外向整流性通道, 并证实该通道具有阴离子选择性, 而温度的升高可使其通道的电导增加但整流性降低。

2.2.2 多种离子通道类型 1998 年, Bockman 等<sup>[9]</sup>对于培养的人角膜上皮细胞的全细胞离子电流的特征进行了研究。他们利用两性霉素 B 与穿透性膜片钳技术, 对融合的单层细胞的全细胞电流进行测定, 结果发现, 无论细胞处于原代或传代期, 均表现为几乎相同的多种离子通道类型, 即呈现非选择性阳离子电流活性, 且对  $Ba^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  不敏感, 细胞膜去极化时, 可被氟灭酸激活, 产生外向性整流  $K^+$  电流, 并被四乙铵 (TEA) 所抑制, 同时呈现电压门控性内向  $Na^+$  电流, 细胞膜超极化时, 可测得外向整流  $K^+$  电流, 可为氟灭酸激活, 为  $Ba^{2+}$  阻断, 而内向整流  $K^+$  电流和非选择性阳离子电流均可被氟灭酸阻断。这一研究结果在测定角膜上皮细胞的生理作用、评价损伤修复及药理、毒理等方面提供了有力的细胞模型基础。

2.2.3 cAMP 依赖性  $Cl^-$  离子通道 Al-Nakkash 等<sup>[10]</sup>在对 SV40 永生化的兔角膜上皮细胞系的研究中发现, 利用全细胞模式及细胞吸附模式膜片钳技术, 可见一种 cAMP 依赖性  $Cl^-$  离子通道电流, 该通道具有电压依赖性, 并可被跨膜转导调节蛋白 (CFTR) 的激活剂——染料木黄酮激活, 其激活机制可能是通过增加通道开放时间及减少通道关闭时间实现, 此外, 非特异性磷酸二酯酶抑制剂 IBMX 可增加  $Cl^-$  离子电流, 提示细胞内的 cAMP 在角膜上皮细胞的信号转导过程中具有重要作用。这一研究结果对于研究角膜上皮性疾病, 尤其是上皮转运、

分泌功能下降或水代谢转运异常导致的疾病, 具有重要意义。

## 3 角膜内皮细胞

3.1 阴离子选择性  $K^+$  离子通道 Rae 等<sup>[11, 12]</sup>对兔角膜内皮细胞进行膜片钳检测发现, 其上存在  $K^+$  选择性离子通道, 该通道的开放概率取决于灌注液中的  $HCO_3^-$  和  $Cl^-$  的存在, 二者浓度的增加可使  $K^+$  离子通道开放增加,  $Na^+/H^+$  交换、 $Na^+/HCO_3^-$  共同转运、 $Na^+-K^+-ATP$  酶及碳酸酐酶抑制剂均不能阻断  $HCO_3^-$  对  $K^+$  离子通道的作用。在利用内面向外膜片钳记录模式时, 可发现这一通道可被内源性的  $Ca^{2+}$  激活, 同时被 ATP 及 AMP、ADP 所抑制, 但  $Ca^{2+}$  离子和 ATP 均不能进入健康的内皮细胞, 奎尼丁对于此通道具有一种微弱的、不稳定的电压依赖性阻断作用。Watsky 等<sup>[13]</sup>在测量兔角膜内皮细胞静息电位时, 发现在内皮细胞上还存在着另外一种  $K^+$  离子通道电流, 呈现一种温度敏感性, 温度升高可增加其电导, 从而增加静息电位。这一通道电流与上述的阴离子选择性  $K^+$  离子通道被认为是角膜内皮细胞静息电位的主要来源。其后的研究中证实, 在内皮细胞的  $K^+$  离子通道亦具有内向性整流性的 Kir2.1 mRNA 序列的存在, 这一序列对于细胞静息电位的维持具有重要作用<sup>[5]</sup>。角膜内皮及基质的水肿可能与  $K^+$  离子通道的阻断有关, 当相应的  $Na^+-K^+-ATP$  酶的功能异常时, 可导致  $K^+$  的再循环通路受阻, 从而导致水肿发生。Watsky 等<sup>[14]</sup>利用传统全细胞膜片钳和穿孔性膜片钳技术分别检测新鲜分离的兔角膜内皮细胞的离子电流, 记录到一种与可兴奋细胞的 A 电流类似的电流, 呈现外向性、整流性、非选择性  $K^+$  离子瞬时电流, 这一电流可被奎尼丁和 4-氨基吡啶以剂量依赖性方式阻断, 同时引起角膜内皮和基质的水肿, 研究证实这一通道对于内皮细胞及基质的容量调控具有重要作用。近期对于编码这一通道的氨基酸序列的研究正在进行, 现已初步得知编码  $K^+$  离子通道 kv3.3 的氨基酸序列, 这一序列是产生 A 电流样电流的结构基础<sup>[15]</sup>。在培养的牛角膜内皮细胞中可见到 kir2.1 (IRK1) 内向性整流性  $K^+$  离子通道的表达, 这一通道可被外源性的  $Ba^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  阻断, 并呈现电压和浓度依赖性。该通道可能与角膜内皮细胞膜电位的调节、内皮细胞的跨膜转运以及其他生理功能有关<sup>[16, 17]</sup>。

3.2 L 型  $Ca^{2+}$  通道 Mergler 等<sup>[18]</sup>通过酪氨酸激酶受体配体介导的细胞内  $Ca^{2+}$  离子反应, 在分析研究永生化的 SV40 转化的人角膜内皮细胞 (HCEC-SV40) 的电生理特性时发现, FGF 受体 (FGFR) 可使细胞内游离的  $Ca^{2+}$  离子增多, 从而激活 L 型  $Ca^{2+}$  离子通道, 这一通道可被 Nifedipine 阻断, 同时减少容量型  $Ca^{2+}$  离子通道的数量。这一研究首次证实 L 型  $Ca^{2+}$  通道与 FGF 受体酪氨酸激酶的关联, 对于研究活体及培养的人角膜内皮细胞的功能具有重要价值。

3.3 非选择性阳离子通道 角膜内皮细胞在损伤时呈现的离子通道状态与健康状态时是有差异的。Watsky<sup>[19]</sup>利用两性霉素 B 穿孔性膜片钳技术对机械及热损伤的兔角膜内皮细胞的研究中发现, 在损伤的角膜内皮细胞中, 正常状态下的  $K^+$  通道电流消失, 而表现为一种非选择性的阳离子电流。这一损伤诱导的通道电流是一种外向性整流性电流, 在细胞膜去

极化时具有活性,可被奎尼丁、氟灭酸及醋酸盐抑制。正常状态下的内皮细胞则不表现这一特征电流。

**4 角膜缘干细胞** 人角膜缘干细胞在人的一生始终处于增殖状态,实验证实该细胞来源于神经外胚层,并具有神经元的特性。Seigel 等<sup>[20]</sup>的研究结果表明,角膜缘干细胞中存在 Nestin、GABA 受体、氨基乙酸受体、血敏受体,同时其全细胞膜片钳显示角膜缘干细胞的静息电位在  $-6\text{ mV} \sim -40\text{ mV}$ , 未见电压敏感性  $\text{Na}^+$  离子及  $\text{K}^+$  离子通道,但在某些细胞中 Kainic Acid 和 GABA 可诱导出微弱的内向性电流,GABA 受体拮抗剂和荷包牡丹碱等可阻断这一电流。研究证实非胚胎源性的人角膜缘干细胞具有神经元的特性。

**5 角膜基质细胞** 角膜基质细胞在角膜基质的损伤或感染修复中起着重要作用。Watsky<sup>[21]</sup>对于兔冷冻损伤的角膜基质的电压门控离子电流的检测结果显示,在损伤修复中的角膜基质细胞具有延迟性整流性  $\text{K}^+$  离子通道电流和微弱  $\text{Na}^+$  离子通道电流,前者多见于处于修复状态的细胞中,而后者多见于损伤区域的细胞中。

**6 问题与展望** 膜片钳技术已经产生发展近 30 a。近年来,在角膜研究方面亦取得了一些成绩,从离子通道的角度,对角膜上皮细胞、内皮细胞、基质细胞以及角膜缘干细胞的细胞电生理特性进行了研究和探索,对于清晰认识角膜的生理、病理过程以及药理学研究,具有重要意义。但是,目前的研究大多集中于离子通道特征的描述,而对于各种通道的生理学意义和调控机制尚有待进一步深入诠释阐明,各种离子在机体复杂的病理过程中,其通透性改变的临床参数也较难测定,因此需要将膜片钳技术同分子生物学等多学科技术进行结合、渗透,在未来的研究中,必将为角膜疾病的病因学研究及药物研制、筛选、疗效评价等提供新的研究思路 and 手段。

#### 【参考文献】

- [1] Neher E, Sakmann B. Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers [J]. *Nature*, 1976;260:799-802.
- [2] Rae JL, Dewey J, Rae JS. The large-conductance potassium ion channel of rabbit corneal epithelium is blocked by quinidine [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992;33(2):286-290.
- [3] Farrugia G, Rae J. Effect of volume changes on a potassium current in rabbit corneal epithelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1993;264:C1238-C1245.
- [4] Ta Kahira M, Sakurada N, Segawa Y, et al. Two types of  $\text{K}^+$  currents modulated by arachidonic acid in bovine corneal epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001;42(8):1847-1854.
- [5] Rae JL, Shepard AR. Kir2.1 potassium channels and corneal epithelia [J]. *Curr Eye Res*, 2000;20(2):144-152.
- [6] Rich A, Rae JL. Calcium entry in rabbit corneal epithelial cells: Evidence for a nonvoltage dependent pathway [J]. *J Membr Biol*,

1995;144(20):177-184.

- [7] Watanabe SI, Tanizaki M, Kaneko A. Two types of stretch-activated channels coexist in the rabbit corneal epithelial cell [J]. *Exp Eye Res*, 1997;64(6):1027-1035.
- [8] Marshall WS, Hamrahan JW. Anion channels in the apical membrane of mammalian corneal epithelium primary culture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991;32(5):1562-1568.
- [9] Bockman CS, Griffith M, Watsky MA. Properties of whole-cell ionic currents in cultured human corneal epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998;39(7):1143-1151.
- [10] Al-Nakkash L, Reinach PS. Activation of a CFTR-mediated chloride current in a rabbit corneal epithelial cell line [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001;42(10):2364-2370.
- [11] Rae JL, Dewey J, Cooper K, et al. Potassium channel in rabbit corneal endothelium activated by external anions [J]. *J Membr Biol*, 1990;114(1):29-36.
- [12] Rae JL, Dewey J, Cooper K, et al. A non-selective cation channel in rabbit corneal endothelium activated by internal calcium and inhibited by internal ATP [J]. *Exp Eye Res*, 1990;50(4):373-384.
- [13] Watsky MA, Rae JL. Resting voltage measurements of the rabbit corneal endothelium using patch-current clamp techniques [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991;32(1):106-111.
- [14] Watsky MA, Cooper K, Rae JL. Transient outwardly rectifying potassium channel in the rabbit corneal endothelium [J]. *J Membr Biol*, 1992;128(2):123-132.
- [15] Rae JL, Shepard AR. Kv3.3 potassium channels in lens epithelium and corneal endothelium [J]. *Exp Eye Res*, 2000;70(3):339-348.
- [16] Yang D, Sun F, Thomas LL, et al. Molecular cloning and expression of an inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel from bovine corneal endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000;41(10):2936-2944.
- [17] Yang D, MacCallum DK, Ernst SA, et al. Expression of the inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel Kir2.1 in native bovine corneal endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003;44(8):3511-3519.
- [18] Mergler S, Dannowski H, Bednarz J, et al. Calcium influx induced by activation of receptor tyrosine kinases in SV40-transfected human corneal endothelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2003;77(4):485-495.
- [19] Watsky MA. Nonselective cation channel activation during wound healing in the corneal endothelium [J]. *Am J Physiol*, 1995;268(5pt1):C1179-C1185.
- [20] Seigel GM, Sun W, Salvi R, et al. Human corneal stem cells display functional neuronal properties [J]. *Mol Vis*, 2003;9:159-163.
- [21] Watsky MA. Loss of keratocyte ion channels during wound healing in the rabbit cornea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995;36(6):1095-1099.