

白介素 1 β 对培养的大鼠皮层神经元钙通道电流的抑制作用

周 辰*

(河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 白细胞介素 1 β (IL-1 β) 是重要的促炎细胞因子, 在中枢神经系统 (CNS) 中发挥广泛的生物学功能。在病理条件下, 细胞膜上电压门控钙通道的变化与疾病发展过程密切相关。虽然 IL-1 β 和钙通道都在脑损伤和脑疾病过程中发挥重要作用, 但目前还很少有两者之间相互关系的研究报道。该研究使用了培养的大鼠胎鼠皮层神经元和膜片钳记录技术, 研究了长时间的 IL-1 β 处理对电压门控钙通道电流的作用。结果表明, IL-1 β 在 10 和 50 ng/mL 剂量下都可以抑制钙电流, 这种抑制作用具有时间和剂量依赖性的模式, 并且不改变钙通道的激活性质。

关键词: 白介素 1 β ; 钙电流; 膜片钳记录; 皮层神经元

中图分类号: Q424; Q426 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)01-0089-05

Inhibition Effect of IL-1 β on Calcium Channels Currents in Cultured Cortical Neurons of Rat

ZHOU Chen*

(College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: Interleukin-1 β (IL-1 β) is an important proinflammatory cytokine that exert wide biological functions in the central nervous system (CNS). Voltage-gated Ca²⁺ channels in plasma membrane are essential components of Ca²⁺ signal whose change on pathological conditions is closely related to processes of diseases. Although both IL-1 β and Ca²⁺ channels have key roles in injury and disease of the brain, so far their relations have been reported in few studies. The effects of IL-1 β on Ca²⁺ channels in cultured cortical neurons of rats were investigated using patch-clamp recording in present research. Our results showed that both 10 and 50 ng/mL of IL-1 β treatment inhibit the Ca²⁺ currents in time and dose dependent manner, without the change of activation properties of voltage-gated Ca²⁺ channels (VGCC)s.

Key words: Interleukin-1 β ; Ca²⁺ currents; Patch-clamp recording; Cortical neurons

白介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 是一种重要的促炎细胞因子, 广泛存在于动物的神经、免疫等系统, 具有重要的生物学功能。已经有很多研究工作涉及到 IL-1 β 在神经系统, 特别是脑中的作用。研究表明, IL-1 β 与很多种中枢神经系统 (CNS) 的病理学条件有关, 例如阿尔海默氏症 (AD)、中风和脑肿瘤 (MacManus et al, 2000; Griffin & Mark, 2002; Rothwell, 2003)。在人类和啮齿动物中 IL-1 β 的表达水平在正常条件下很低, 但是在脑损伤后 15 min, 其 mRNA 水平就开始上升, 而蛋白水平最早在 4 h 后出现上调 (Rothwell & Luheshi, 2000), 这表明 IL-1 β 对损伤具有一个快速的应答, 很可能是

因为其在病理过程中发挥重要的功能。

目前关于 IL-1 β 生物学功能的研究还没有得到统一的结果, 很多研究表明 IL-1 β 具有神经毒性作用, 例如在纹状体中将 IL-1 β 与 AMPA 受体激动剂一起注射, 会显著恶化 AMPA 受体激动剂所引起的损伤作用, 并且引起远距离的广泛的神经元死亡 (Grundy et al, 2002; Allan et al, 2000)。在培养细胞中 IL-1 β 也可以剂量依赖性地降低神经元的生存 (Marx et al, 2001)。在脑片模型中, 低浓度的 IL-1 β 可以恶化缺氧诱发的神经元死亡, 但是高浓度下反而没有损伤作用 (Pringle et al, 2001)。也有相当数量的研究报道了 IL-1 β 在适当的条件下发

收稿日期: 2009-08-13; 接受日期: 2009-11-07

基金项目: 河北省教育厅科学研究计划 (Z2009109); 北京大学生物膜与膜生物工程国家重点实验室开放课题

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zezhou@sina.com

挥神经保护作用 (Rothwell, 2003)。例如使用 IL-1 β 预处理 24 h 可以显著降低谷氨酸和 NMDA 引起的神经损伤 (Strijbos & Rothwell, 1995)。IL-1 β 也可以诱导产生 IL-6, 并增加成纤维细胞生长因子的释放, 从而减少兴奋毒性 (Ringheim et al, 1995; Thorns et al, 2002)。

钙离子是重要的细胞内第二信使。通过细胞膜上的电压门控钙通道进入神经元的钙离子控制着很多重要的细胞功能, 例如神经递质的释放和起搏细胞的发放等。在神经系统的损伤和疾病中, 钙通道也发挥重要的作用。例如大脑缺血后 N 型通道的表达产生了一个时间和空间特异性的变化 (Chung et al, 2001)。海马 CA1 神经元中缺氧可以诱导 L 和 N 型通道的电流增加 (Lukyanetz et al, 2003)。选择性的 L 型通道阻断剂, 例如 *S-312-d* 和尼啡地平在阿尔海默氏症和中风的体外模型中表现出保护作用 (Yagami et al, 2004)。

IL-1 β 和钙通道都在神经系统的损伤和疾病中发挥重要作用, 但是在这些过程中它们之间是否有相互作用还有待研究。只有很少的工作探讨了 IL-1 β 对电压门控钙通道的影响。有报道指出 IL-1 β 对一种软体动物 *Helix pomatia* L 的中枢神经元钙电流具有抑制作用 (Szucs et al, 1992); 在急性分离的豚鼠海马神经元中发现 IL-1 β 处理可以抑制全细胞钙电流 (Plata-Salmán & Ffrench-Mullen, 1994); 在培养的大鼠心室肌中, IL-1 β 可以通过一个 G 蛋白介导的机制抑制 L 型钙电流 (Liu & Schreur, 1995)。这些研究中 IL-1 β 都使用了急性处理的方式, 处理时间不超过 30 h, 而在损伤和疾病条件下, IL-1 β 可能以较高的浓度长时间存在, 对于较长时间 IL-1 β 处理引起中枢神经系统电压门控钙电流的变化还没有直接的研究。阐明其中的相互关系及其机制可能对中枢神经系统损伤和疾病的治疗产生新的指导。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

使用怀孕 18~20 d 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠胎鼠 (北京维通利华实验动物科技有限公司) 进行皮层细胞的培养。拉断颈椎处死孕鼠, 取出胎鼠大脑, 分离皮层, 用 0.25% 的胰酶 (Gibco 公司) 在室温下消化 2~3 min。加入 0.5 mL 的胎牛血清 (FBS, HyClone 公司) 中止消化后, 尽量吹散皮层。

悬液在 900 g (3000 r/min) 下离心 5~8 min, 弃去上清, 重悬沉淀。按照 0.8×10^6 /mL 的密度种在预先铺了 Poly-D-Lysine (12.5 μ g/mL, Sigma 公司) 的盖玻片上, 盖玻片放在 35 mm 直径的细胞培养皿中。全部用于培养的 MEM 培养基都在使用前加入 10% 的胎牛血清、1% 的 B-27 (Gibco 公司) 和 2 mmol/L 的谷氨酰胺 (Sigma 公司)。每隔 3 天进行半量换液。在分离后的 7~12 d 进行实验。

1.2 全细胞膜片钳记录

实验中使用中国科学院微电子所的硬质厚壁硼硅酸盐玻璃毛细管, 通过 P-97 水平拉制仪 (Sutter 公司) 制作玻璃微电极, 并且经过抛光仪 (MF-83, Narishige 公司) 热抛光。所有膜片钳实验都使用 EPC-7 膜片钳放大器 (HEKA 公司), 在 810185 型倒置显微镜 (Nikon 公司) 上完成。记录全细胞钙通道电流所使用的浸泡溶液为 (mmol/L): TEA-Cl 135; BaCl₂ 10; HEPES 10; 葡萄糖 10; pH 用 TEA-OH 调整为 7.4。电极溶液为 (mmol/L): CsCl 130; MgCl₂ 1; EGTA 8; TEA-Cl 4; HEPES 4; ATP-Mg 4; 磷酸肌酸 10; GTP-Li₄ 0.1; pH 用 TEA-OH 调整为 7.2。在外液中使用 10 mM 的钡离子代替钙离子, 以最大限度的增加钙通道电流和减少 rundown 现象。

形成全细胞模式后首先从 -100 mV 的钳制电压去极化阶跃到 -80 mV, 采样间隔为 8 μ s, 用以计算细胞膜电容。然后从 -80 mV 的钳制电压开始以 10 mV 的间隔去极化到 80 mV, 记录去极化所引发的全细胞钙通道电流, 采样频率为 2.5 kHz, 去极化脉冲持续时间为 140 ms, 两次刺激脉冲的间隔为 2 s。

1.3 统计分析

电生理学数据的分析使用 Clampfit 6.0 和 8.0 软件 (Axon 公司)。对于全细胞钙通道电流, 选用封接电阻超过 1 G Ω 的记录进行分析。通过计算细胞膜电容放电 τ 值得到全细胞电容。使用玻尔兹曼方程拟合不同电压下的通道电导, 计算通道的激活曲线, 包括半激活电压 $V_{1/2}$ 和斜率因子 (k)。

统计分析使用的软件包括 Excel (Microsoft 公司)、SPSS 11.5 (SPSS 公司)、OriginPro 7.0 (OriginLab 公司) 和 SigmaPlot 2001 (SPSS 公司)。显著性差异的标准为 $P < 0.05$, 所有的统计比较都使用成组 student *t*-检验。

2 结果

2.1 IL-1 β 以时间和剂量依赖性的模式抑制全细胞钙电流

选择 10 ng/mL 的 IL-1 β 处理培养的神经元, 时间分别为 8 和 24 h。在每个记录电压下读取钙电流峰值, 除以全细胞电容得到电流密度, 并对电压作图得到电流密度-电压曲线。结果表明 IL-1 β 处理 8 h 不影响全细胞钙电流密度, 但是处理时间延长到 24 h 后, 钙电流显著降低, 在 -10 到 20 mV 之间都产生显著抑制 (Fig. 1A)。0 mV 下的峰值电流幅度被 IL-1 β 抑制到对照水平的 50%, 有极显著差异 ($P < 0.0001$, 使用 student *t*-检验)。

使用 50 ng/mL 的 IL-1 β 处理神经元, 时间同样是 8 和 24 h。与 10 ng/mL 的 IL-1 β 的作用不同, 50 ng/mL IL-1 β 处理 8 h 就产生了极显著的抑制作用, 在 0 mV 下的电流峰值降低到对照水平的 48%, 这个幅度与 10 ng/mL 处理 24 h 的结果类似; 而处理 24 h 后抑制作用完全消失 (Fig. 1B)。

也比较不同处理模式下全细胞电容的情况 (Fig. 1C), 对照组与 10 ng/mL 和 50 ng/mL 各处理 8 和 24 h 等 4 组间, 全细胞电容没有差异。这些结果说

明 IL-1 β 处理不会改变神经元大小, 但是会在不同的剂量和时间下抑制全细胞钙电流。

2.2 IL-1 β 处理不改变全细胞钙电流的激活性质

通过电流密度-电压曲线得到钙电流的反转电位, 并由此得出每个记录电压下的全细胞电导, 通过玻尔兹曼方程拟合, 可以得到钙电流的激活曲线及其参数。在 10 ng/mL 浓度下, 8 和 24 h 给药组的激活曲线与对照组没有差异 (Fig. 2A)。在对照、8 和 24 h 处理条件下, 半激活电压和斜率因子分别为 (-16.8 ± 1.0) 、 (-18.6 ± 1.5) 、 (-18.6 ± 2.9) mV (Fig. 2B) 和 (5.4 ± 0.5) 、 (5.2 ± 0.5) 、 (6.0 ± 0.6) (Fig. 2C), 这些数值都无显著差异。

与 10 ng/mL 组类似, 50 ng/mL 给药组的激活曲线也无变化 (Fig. 3A), 半激活电压和斜率因子分别为 (-16.4 ± 1.1) 、 (-17.5 ± 1.9) 、 (-13.9 ± 0.8) mV (Fig. 3B) 和 (6.0 ± 0.5) 、 (6.3 ± 0.5) 、 (6.3 ± 0.5) mV (Fig. 3C), 这些数值也无显著差异。50 ng/mL 浓度组与 10 ng/mL 浓度组的半激活电压和斜率因子之间也无显著差异。这些结果表明 IL-1 β 处理不改变钙电流的激活性质。

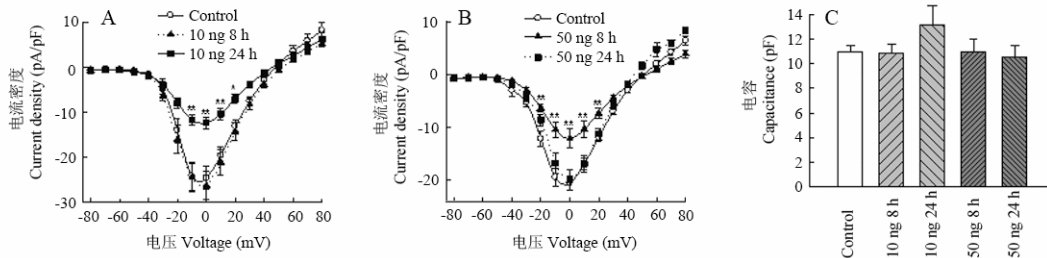


图 1 IL-1 β 对神经元电压门控钙电流的抑制作用

Fig. 1 The inhibition of IL-1 β on voltage-gated Ca²⁺ currents in neurons

10 ng/mL (A, $n \geq 6$) 和 50 ng/mL (B, $n \geq 10$) IL-1 β 处理抑制皮层神经元钙电流, 但不影响全细胞电容 (C)。

10 ng/mL (A) and 50 ng/mL (B) of IL-1 β treatment inhibited the Ca²⁺ currents of cortical neurons, but didn't affect the membrane capacitance (C).

结果表示为平均值 \pm 标准误 (the results were expressed as mean \pm SE)。

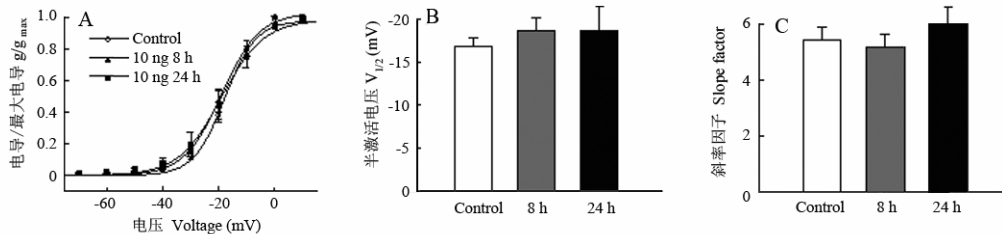


图 2 10 ng/mL 的 IL-1 β 处理不改变钙通道激活性质

Fig. 2 10 ng/mL of IL-1 β treatment didn't affect activation properties of Ca²⁺ channels

激活曲线 (A)、半激活电压 (B) 和斜率因子 (C) 均无变化。

Activation curve (A), half-activation voltage (B) and slope factor (C) all were unaltered.

结果表示为平均值 \pm 标准误 (The results were expressed as mean \pm SE)。

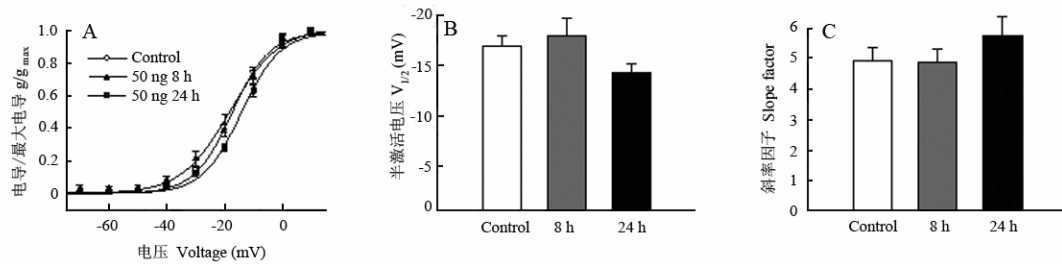


图 3 50 ng/mL 的 IL-1 β 处理不改变钙通道激活性质

Fig. 3 50 ng/mL of IL-1 β treatment didn't affect activation properties of Ca²⁺ channels

激活曲线 (A)、半激活电压 (B) 和斜率因子 (C) 均无变化。

Activation curve (A), half-activation voltage (B) and slope factor (C) all were unaltered.

结果表示为平均值 \pm 标准误(The results were expressed as mean \pm SE)。

3 讨论

使用全细胞膜片钳记录, 我们研究了不同剂量和不同时间的 IL-1 β 处理对大鼠皮层神经元钙通道电流的作用。结果显示, IL-1 β 以时间和剂量依赖性的模式抑制全细胞钙电流, 并且不改变钙电流激活的电压依赖性。这些结果提示, IL-1 β 并不影响通道本身的性质, 我们推测可能是通过其他途径抑制钙电流, 例如改变 VGCCs 的单通道性质或者减少细胞表面的通道数量等。

IL-1 β 在很多种神经疾病或者损伤过程中具有重要作用。截至目前, 还不能完全了解 IL-1 β 的作用及其机制; 但是一些提示 IL-1 β 具有神经保护作用的研究指出其可能是通过减少了损伤或疾病期间过多的钙流入细胞来保护神经系统的 (MacManus et al, 2000)。电压门控钙通道是神经元中钙流入的主要途径。而我们的实验结果表明 IL-1 β 长时间的处理可以抑制培养的大鼠皮层神经元全细胞钙电流。这提示了 IL-1 β 通过降低钙电流减少进入神经元的钙离子, 可能在损伤或疾病过程中起到保护作用。

对于 IL-1 β 的不同作用的研究已经很多, 而且剂量差异很大。对于神经毒性作用, 不同研究中使用的剂量从 0.05 ng/mL (Viviani et al, 2003) 到 100 ng/mL (Li et al, 2000), 甚至还有超过 100 μ g/mL 的高浓度 (Strijbos & Rothwell, 1995)。而神经保护作用的研究同样范围悬殊, 从 5 ng/mL 到 100 ng/mL (MacManus et al, 2000; Carlson et al, 1999; Prehn, 1996)。这些结果表明 IL-1 β 在体内的作用十分复杂, 并且很可能通过不同的途径发挥其生物学功能。

有报道指出在病理学条件下, 脑脊液中的 IL-1 β 浓度超过 100 pg/mL (Plata-Salamán & French-Mullen, 1994), 我们假设在有活性的局部分泌区域中, IL-1 β 的浓度会更高, 可能达到两个数量级。因此, 在本实验中选择了 10 ng/mL 和 50 ng/mL 的浓度来分别研究 IL-1 β 对皮层神经元钙电流的作用。对于细胞因子与离子通道之间相互关系的研究目前还比较少, 并且大多数是急性处理条件下进行的, 但也有少部分研究使用了慢性处理的方式。例如在痛敏神经元中 IL-1 β 急性处理 (5 min) 会抑制钠电流, 但是长时间处理 (24 h) 则会增加钠电流 (Liu et al, 2006)。我们没有使用急性处理模式, 但是根据以前报导的 IL-1 β 急性处理得到抑制性作用 (Szucs et al, 1992; Plata-Salman & French-Mullen, 1994; Liu & Schreier, 1995), 与慢性处理对钙电流的作用是一致的。

我们的实验中使用了不同的剂量和处理时间。在 10 ng/mL 的剂量下, 处理时间需要达到 24 h 才能观察到对钙电流的抑制作用, 这表明其作用机制与急性作用不同。提示 IL-1 β 通过细胞内的信号转导过程完成其抑制作用。在 50 ng/mL 的剂量下, 处理 8 h 即可产生抑制作用, 表明高浓度的 IL-1 β 会更快发挥其生物学功能; 而 24 d 后抑制作用消失, 可能是由于其他途径的代偿作用或者 IL-1 β 调节钙通道所经过的信号通路的失效。这些结果提示了 IL-1 β 对钙电流的作用具有时间和剂量依赖性。这也可能是 IL-1 β 具有双重作用的原因之一。

总之, 我们的研究表明 IL-1 β 在长时间处理条件下会抑制皮层神经元钙电流, 这种抑制作用提示 IL-1 β 可能通过减少钙过载发生的几率在损伤和疾病过程中保护神经细胞。本文的结果加深了对白介

素和电压门控钙通道之间关系的理解, 扩展了细胞

因子与离子通道的研究。

参考文献:

- Allan SM, Parker LC, Collins B, Davies R, Luheshi GN, Rothwell NJ. 2000. Cortical cell death induced by IL-1 is mediated via actions in the hypothalamus of the rat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**(10): 5580-5585.
- Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. 1999. Inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways [J]. *J Immunol*, **163**: 3963-3968.
- Chung YH, Shin CM, Kim MJ, Shin DH, Yoo YB, Cha CI. 2001. Spatial and temporal distribution of N-type Ca²⁺ channels in gerbil global cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, **902**: 294-300.
- Griffin WS, Mark RE. 2002. Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease [J]. *J Leukoc Biol*, **72**: 233-238.
- Grundy RI, Rothwell NJ, Allan SM. 2002. Site-specific actions of interleukin-1 on excitotoxic cell death in the rat striatum [J]. *Brain Res*, **926**: 142-148.
- Li Y, Liu L, Kang J, Sheng JG, Barger SW, Mark RE, Griffin WS. 2000. Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression [J]. *J Neurosci*, **20**: 149-155.
- Liu L, Yang TM, Liedtke W, Simon SA. 2006. Chronic IL-1 β signaling potentiates voltage-dependent sodium currents in trigeminal nociceptive neurons [J]. *J Neurophysiol*, **95**: 1478-1490.
- Liu S, Schreier KD. 1995. G protein-mediated suppression of L-type Ca²⁺ current by interleukin-1 β in cultured rat ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol*, **268**(2 Pt 1): C339-C349.
- Lukyanetz EA, Shkryl VM, Kravchuk OV, Kostyuk PG. 2003. Action of hypoxia on different types of calcium channels in hippocampal neurons [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1618**: 33-38.
- MacManus A, Ramsden M, Murray M, Henderson Z, Pearson HA, Campbell VA. 2000. Enhancement of 45 Ca²⁺ influx and voltage-dependent Ca²⁺ channel activity by β -amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons [J]. *J Biol Chem*, **275**: 4713-4718.
- Marx CE, Jarskog LF, Lauder JM, Lieberman JA, Gilmore JH. 2001. Cytokine effects on cortical neuron MAP-2 immunoreactivity: implications for schizophrenia [J]. *Biol Psychiatry*, **50**(10): 743-749.
- Plata-Salamán CR, French-Mullen JM. 1994. Interleukin-1 β inhibits Ca²⁺ channel currents in hippocampal neurons through protein kinase C [J]. *Eur J Pharmacol*, **266**(1): 1-10.
- Prehn JH. 1996. Marked diversity in the action of growth factors on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal degeneration [J]. *Eur J Pharmacol*, **306**: 81-88.
- Pringle AK, Niyadurupola N, Johns P, Anthony DC, Lannotti F. 2001. Interleukin-1 β exacerbates hypoxia-induced neuronal damage, but attenuates toxicity produced by simulated ischaemia and excitotoxicity in rat organotypic hippocampal slice cultures [J]. *Neurosci Lett*, **305**: 29-32.
- Ringheim GE, Burgher KL, Heroux JA. 1995. Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: Evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain [J]. *J Neuroimmunol*, **63**: 113-123.
- Rothwell NJ, Luheshi GN. 2000. Interleukin-1 in the brain: biology, pathology, and therapeutic target [J]. *Trends Neurosci*, **23**: 618-625.
- Rothwell NJ. 2003. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential [J]. *Brain Behav Immun*, **17**: 152-157.
- Strijbos P, Rothwell NJ. 1995. Interleukin-1 β attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration *in vitro*: involvement of nerve growth factor [J]. *J Neurosci*, **15**: 3468-3474.
- Szucs A, Stefano GB, Hughes TK, Rozsa KS. 1992. Modulation of voltage-activated ion currents on identified neurons of *Helix pomatia* L. by interleukin-1 [J]. *Cell Mol Neurobiol*, **12**(5): 429-438.
- Thorns V, Walter GF, Licastro F. 2002. Effects of IL-6 and IL-1 β on aFGF expression and excitotoxicity in NT2N cells [J]. *J Neuroimmunol*, **127**: 22-29.
- Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Diluca M, Galli CL, Marinovich M. 2003. Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases [J]. *J Neurosci*, **23**: 8692-8700.
- Yagami T, Ueda K, Kakaeda T, Itoh N, Sakaguchi G, Okamura N, Hori Y, Fujimoto M. 2004. Protective effect of a selective L-type voltage-sensitive calcium channel blocker, S-312-d, on neuronal cell death [J]. *Biochem Pharma*, **67**: 1153-1165.