论文

高氯酸镱对大鼠背根神经元细胞毒性及膜上钾通道的影响

杜正清^{①②}, 李卓玉^②, 杨频^{②*}, 武文杰^③

① 山西财经大学环境经济学院, 太原 030006

② 化学生物学与分子工程教育部重点实验室; 山西大学, 太原 030006

③ 中北大学化工与环境学院, 太原 030024

*通讯作者: E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

收稿日期: 2010-04-06; 接受日期: 2010-05-28

摘要 研究了高氯酸镱($\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$)诱导大鼠背根神经(DRG)元凋亡、引起胞内钙离子浓度变化以及对膜上钾离子通道的影响. 急性分离大鼠 DRG 细胞, 用不同浓度的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 处理 DRG 细胞 24 和 96 h, 采用流式细胞仪和激光共聚焦法, 检测细胞的凋亡和细胞内钙离子荧光强度的变化. 利用全细胞膜片钳法, 记录 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对细胞膜上不同钾通道电流的影响. 结果表明, 10, 100, 1000 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 处理 DRG 神经元 24 h, 细胞基本不表现凋亡; 处理 96 h, 细胞出现明显的凋亡 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 尤其是 1000 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$, 凋亡率达到了 $(55.23 \pm 3.76)\%$ ($P < 0.01$). 经 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 孵育的 DRG 神经元胞内的 Ca^{2+} 的荧光强度显著增大; $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 抑制背根神经节纤维和神经元突起的生长. $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 抑制 DRG 神经元膜上的钾电流, 胞内和胞外的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 作用钾通道的部位不同. 细胞外液中的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 不同程度地阻断了瞬间外向钾电流 I_A , 对延迟整流钾电流几乎没影响; 往电极内液中加入同样浓度的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对 I_A 影响很小, 却特异性地阻断了延迟整流钾电流 I_K . 10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 使 I_A 的激活和失活过程都显著右移, 延长了瞬间外向钾电流达到峰值的时间和快速失活时间常数, 增加神经元的兴奋性.

关键词DRG 细胞
镱离子
凋亡
钙离子浓度
钾电流

1 引言

稀土元素具有独特的理化性质, 其化合物具有多种生物活性, 广泛应用于农业、畜牧业和医药业等方面^[1-3]. 近年来, 稀土的生物药理功能研发在我国十分活跃, 稀土对细胞生物行为的影响研究不断深入^[4]. 稀土对动物神经系统的影响研究正在逐渐展开, 特别是对动物的脑、脊髓神经细胞以及神经纤维的形态和功能的作用^[5-7]. 王瑜等人^[8]的研究说明, 大脑对稀土镧很敏感, 一定剂量镧染毒可诱发毒性效应, 对神经产生抑制作用, 其原因与脑内化合物的含量

或活性降低等密切相关. 姜杰等人^[9]的研究表明, 孕哺期镧暴露使大鼠子代海马神经元的超微结构发生病理性改变, 中枢神经元胞内的钙离子浓度显著增加. 但是稀土对外周神经的影响鲜见报道.

稀土离子是公认的钙通道阻断剂, 稀土离子进入体内后可以结合许多蛋白, 如通道蛋白、转铁蛋白、钙调蛋白进入细胞, 进而影响细胞的生物学功能^[10]. 钾离子是生物体的一种重要离子, 对细胞的新陈代谢、保持静息膜电位、调节细胞渗透压和酸碱平衡等发挥着重要的作用^[11, 12]. 外周神经(DRG)是躯体和内脏传入兴奋的基础神经元, 膜上有大量的钾通

道. 钾通道对神经元兴奋性的调节非常重要, 它们在神经元去极化后使其复极化, 并有助于使膜电压稳定在低于动作电位发放阈值以下^[13, 14].

为了探讨重稀土高氯酸铽($\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$)对外周神经系统的可能影响机制, 以期探究合理应用稀土元素材料提供安全性评价和危险度评估依据, 我们用不同浓度 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对背根神经元凋亡、胞内的钙离子浓度、膜上的钾通道电流进行了研究.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

DMEM-F12 细胞培养剂(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司), 小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司), Trypsin(华美生物工程公司), 神经生长因子(NGF)(*E. coli*, Peprotech, USA), 除河豚毒素(TTX)是购自河北水产公司外, 其余膜片钳实验部分所用的药品全部购自 Sigma 公司. 水套式二氧化碳细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司), 激光共聚焦显微镜(Olympus Fluoview FV1000), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司), 流式细胞仪(Beckman, USA), 膜片钳放大器 200B、数模转换器 Digdata1200B 和信号采集软件 pCLAMP 10.0 软件都是 Axon Instrument 公司生产, 结果分析使用 pCLAMP CLAMPFIT 程序(Axon Instrument)和 Origin 8.0 软件(Microal software, USA)完成. 高氯酸铽用去离子水配成 10 mmol/L 的母液, 高压灭菌, 使用前用含 NGF 和血清的 DMEM 培养基稀释成需要的浓度.

2.2 方法

(1) DRG 细胞培养

取新生的 Wistar 大鼠, 75%酒精消毒后在超净台中由椎管内侧取出神经节及相连的神经纤维, 放在冰浴的 DMEM-F12 细胞培养液中, 用虹膜剪及游丝镊仔细剪除相连神经纤维和周围结缔组织膜, 在 CO_2 培养箱中用 0.25% 的胰酶消化 20 min, 每隔 5 min 摇动一次, 然后用 10% 胎牛血清终止消化, 用吸管吹打神经节分离出单个神经细胞, 将细胞置于含 10% 胎牛血清, 5% NGF 的 DMEM-F12 培养液中, 37 °C、5% CO_2 , 饱和湿度培养箱中培养. 24 h 后换液

移除碎片, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的阿糖胞苷以抑制非神经元的增殖.

(2) 相差显微镜观察背根神经节纤维和神经元生长情况

将急性提取的背根神经节和 DRG 细胞接种在 96 孔培养板中, 每孔加一个神经节或 100 μL 的细胞, 每一浓度点设 8 个复孔. 细胞贴壁 24 h 后加不同浓度的药物. 实验组分别加 10, 100, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$, 对照组不加 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$, 在 CO_2 培养箱内培养 96 h 后, 用于实验.

(3) 激光共聚焦观察细胞形态和检测胞内游离的钙荧光强度

吸去塑料培养皿中的培养基, 将细胞用 D-Hanks 液清洗 3 次, 用终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fluo-3/AM 在 37 °C 恒温避光条件下负载 30 min, 然后吸出染液, 再以 D-Hanks 液清洗 3 次后在激光共聚焦显微镜下检测细胞荧光强度, 激发光选用 488 nm, 发射光为 530 nm. 随机选取结构清楚, 胞突完整的神经细胞, 每组扫描 20 个以上细胞, 所得图像和数据由计算机收集分析, 即得每个细胞内 Ca^{2+} 的荧光强度值, 荧光强度值越大, 则细胞内游离 Ca^{2+} 浓度越高.

(4) Annexin V /PI 双染色法检测细胞凋亡

调节细胞浓度为 5×10^5 个细胞, 种植在 50 mL 培养瓶里, 24 h 后换不同浓度的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 培养液和 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3^+ 10 \mu\text{mol/L}$ L-型钙通道阻断剂 nifedipin. 不给药组作为对照组, $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 分别作用细胞 24 和 96 h 后, 收集细胞, Hanks 悬浮细胞沉淀, 并重复操作一次. 每个样加入 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞, 加 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 避光染色 15 min, 1 h 内用流式细胞仪进行检测.

(5) 全细胞膜片钳记录膜上的钾离子通道电流

大鼠背根(DRG)神经元的分离同文献^[15], 分离得到的单个神经元细胞, 静置至少 30 min, 使细胞贴在皿底. 实验受检 DRG 细胞均为圆形或椭圆形, 细胞表面光滑, 活性较好.

记录钾电流的电极内液(mmol/L): KF 10, NaCl 4, KCl 130, MgCl_2 1, HEPES 10, EGTA 10 和 $\text{Na}_2\text{-ATP}$ 2, 用葡萄糖将渗透压调至 305 mos mol, 用 Tris 调 pH 至 7.2. 细胞外液(mmol/L): NaCl 140, KCl 4, MgCl_2 1, CaCl_2 2, HEPES 10, CdCl_2 0.5, TTX 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 D-glucose 10, 用葡萄糖将渗透压调至 310 mos mol, 用 NaOH 调 pH 至 7.4.

利用全细胞电压钳技术记录 DRG 神经元钾电流, 膜片钳全细胞记录模式根据 Hamill 等^[16]改进的膜片钳技术进行. 实验选择中等大小、直径范围为 30~40 μm 的 DRG 细胞. 记录电极充灌电极内液后阻抗为 5~8 $\text{M}\Omega$, 信号采集、给药和数据分析都同前.

实验结果用 $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ 表示, 给药前后差异的显著性用 t 检验进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著性.

3 结果

3.1 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对背根神经节和神经元生长的影响

我们把药物作用 96 h 的神经节和神经元在倒置显微镜下用 $\times 4$ 倍物镜观察神经节和神经元的生长情况. 发现对照组神经节周围长满了纤维和游离出来的神经元, 药物处理组 10 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 周围也有纤维和神经元爬出, 但辐射的面积呈缩小的趋势, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 处理组周围几乎观察不到纤维和神经元(见图 1(a)). 同样, 10 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的药物处理组神经元生长出现空泡化现象, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组细胞明显碎裂, 膜溶解, 突触大量减少, 细胞很大程度凋亡或死亡(图 1(b)). 说明不同浓度的高氯酸铽会抑制神经纤维和突起的生长, 诱导细胞凋亡.

3.2 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 使 DRG 胞内游离的钙荧光强度上调

以 flour-3/Am 荧光染色, 在激光共聚焦显微镜下检测 96 h 的染毒结果, 统计显示, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 组荧光强度为 (233.8 ± 18.7) , 100 $\mu\text{mol/L}$ 组为 (314.5 ± 30.3) , 1000 $\mu\text{mol/L}$ 组为 (527.4 ± 34.5) , 对

照组为 (170.6 ± 21.3) , 实验组均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 2. 与对照组细胞内 Ca^{2+} 水平相比, Yb^{3+} 加入组, 细胞内出现明显的 Ca^{2+} 聚积现象, 而对照组 Ca^{2+} 呈均匀分布, 表明 Yb^{3+} 使细胞内 Ca^{2+} 浓度上升和聚积, 显示高浓度的 Yb^{3+} 对背根神经元细胞有损伤作用.

3.3 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 诱导 DRG 神经元凋亡

Annexin V-FITC 是一种标记有荧光素的钙依赖磷脂结合蛋白, 可特异性地与早期凋亡细胞外翻的细胞膜磷脂酰丝氨酸(PS)结合, PI 能进入细胞膜不完整的晚期凋亡和坏死的细胞, 故 Annexin V-FITC/PI 双染色细胞可呈现 3 个细胞群, 即正常细胞(Annexin V-FITC⁻/PI⁻)、早期凋亡细胞(Annexin V-FITC⁺/PI⁻)、晚期凋亡和坏死细胞(Annexin V-FITC⁺/PI⁺).

用 10, 100, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 分别孵育 DRG 细胞 24 和 96 h, 用流式细胞仪定量检测 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对 DRG 细胞凋亡的影响. $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 孵育细胞 24 h, 与对照组相比, 凋亡不具有显著性差异. 孵育 96 h, 细胞存活率下降. 所有 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ L-型钙通道阻断剂与同剂量的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 相比, 凋亡不具显著差异, 说明 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 诱导的 DRG 细胞凋亡, 不是由于胞外的钙离子大量流入胞内而引起的凋亡. 图 3 为对照组和不同浓度的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 孵育细胞 96 h 的凋亡图. 10 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡率为 $(17.01 \pm 2.60)\%$, 100 $\mu\text{mol/L}$ 组为 $(19.57 \pm 3.21)\%$, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 组为 $(55.23 \pm 3.76)\%$, 与对照组相比, 差异具有显著性($P < 0.05$).

图1 (a) 不同浓度的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 处理背根神经节 96 h, 神经纤维和神经元的生长情况; (b) 不同浓度 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 处理 DRG 神经元 96 h 的生长情况

图 2 (a) 不同浓度 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 作用 DRG 神经元 96 h, 用 flour-3/Am 荧光染色的照片; (b) 统计分析不同浓度处理组的钙荧光强度的柱形图

图 3 (a) A, B, C, D 组分别是对照组、10/100/1000 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 处理 DRG 神经元 96 h 的凋亡图; (b) 统计结果的柱形图

3.4 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对 DRG 细胞膜钾离子通道的影响

3.4.1 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对钾电流的影响

将细胞钳制在 -80 mV, 先给予神经元 500 ms、 -120 mV 的超级化刺激, 去极化方波从 -40 mV 到 $+60$ mV, 阶跃为 10 mV, 引出一系列外向钾电流(图 4). 图 4(a)是在一个直径大约 33 μm 的 DRG 细胞上记录到的全钾电流图, 胞外液里含有 0.5 μM TTX 和 0.5 mM Cd^{2+} 以阻断钠电流和钙电流. 在细胞外液中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$, 得到图 4(b). 从图 4 中我们可以明显看出细胞外液中的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 阻断了瞬

间外向钾电流 I_A , 几乎不影响延迟整流钾电流 I_K , 这一点可以从(a)–(b)所得的图(c)中得到证实.

接下来, 我们在电极内液中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$, 还在原来的细胞上再次记录到一组新的钾电流, 如图 5(a), 从图中可以看到电极内液中的 10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 明显地阻断了延迟整流钾电流 I_K , 而瞬间外向钾电流 I_A 几乎没有变化. 这样的实验结果我们在 ~ 20 个细胞上得到了重复. 这说明细胞内的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对 I_K 很敏感, 对 I_A 没什么影响. 为了使得这一结论更精确, 我们在细胞外液中加入 20 mmol/L 氯化四乙铵 (TEA), 得到图 5(b), 可以看出得到的

图4 全钾电流. (a) 空白对照组; (b) 细胞外液中加入 $10 \mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 组; (c) (a)-(b)的结果

图5 电极内液的 Yb^{3+} 阻断 I_K , 但不影响 I_A . (a) 电极内液加入 $10 \mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 记录的钾电流; (b) 细胞外液加入 20 mmol/L TEA 记录的钾电流; (c) (a)-(b)的结果

电流没有太明显变化, 图 5(c)是(a)-(b)所得, 这也进一步说明了通过电极内液进入细胞内的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 阻断了延迟整流钾电流。

3.4.2 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对 I_A 激活和失活动力学的影响

实验在 47 个中等大小的 DRG 细胞上记录了胞外不同浓度的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对 I_A 的影响. 在上述细胞外液中加入 20 mmol/L 的 TEA 阻断 I_K , $0.5 \mu\text{mol/L}$ 的 TTX 阻断钠电流, 0.5 mmol/L 的 CdCl_2 阻断钙电流来记录 I_A . 首先进行正常生理状态下的数据采集作为对照值, 然后通过 Y 型加药管把不同浓度的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 加到距离细胞 0.2 mm 处, 给药的流速控制在 2 mL/min , 给药 2 min 后再次记录电流数据, 结果

发现 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 呈剂量依赖性抑制 I_A . 将 $10 \mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 作用前后的 I_A 的值对应去极化刺激电压作图, 用 Boltzmann 方程 $I/I_{\max} = \{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k]\}^{-1}$ 进行拟合, $I_{\max}$ 为最大电流值, $V_{1/2}$ 为半数电流激活时的膜电位, k 为描述激活曲线倾斜度的斜率因子. 所有归一化的 $I-V$ 曲线为各个膜电位处的电流值与最大电流值的比值对应于膜电位作图. 见图 6(a). 从图 6(a)中可以看出 I_A 的激活曲线呈 S 型, 并计算出加入 Yb^{3+} 前后 I_A 的 $V_{1/2}$ 值分别为 $(10.4 \pm 0.95) \text{ mV}$ 和 $(25.2 \pm 2.13) \text{ mV}$ ($n = 8$, $P < 0.05$), k 分别为 (17.5 ± 1.1) 和 $(17.8 \pm 1.3) \text{ mV}$ ($n = 8$, $P > 0.05$). 这说明 $10 \mu\text{mol/L}$ Yb^{3+} 可以使 I_A 的激活曲线显著右移, 但不改变斜率因子。

图6 Yb^{3+} 对 I_A 的激活和失活动力学影响. (a) I_A 的激活曲线 ($n = 8$); (b) 失活曲线 ($n = 9$)

将细胞钳制在 -80 mV, 条件刺激脉冲设置在 -120 mV, 时程为 80 ms, 阶跃为 10 mV, 去极化到 -10 mV, 其后直接阶跃到 $+60$ mV, 时程 400 ms, 记录 I_A 电流的失活. 同样的失活曲线也用 Boltzmann 方程拟合, 见图 6(b). 结果显示 Yb^{3+} 前后 I_A 的 $V_{1/2}$ 值分别为 (-90.5 ± 3.4) 和 (-82.3 ± 3.9) mV ($n = 9$, $P < 0.05$), k 分别为 (11.4 ± 0.7) 和 (15.7 ± 1.1) mV ($n = 9$, $P < 0.05$). 这说明 $10 \mu\text{mol/L}$ Yb^{3+} 可以使 I_A 失活曲线右移, 且改变斜率因子.

3.4.3 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对 I_A 激活和失活时间常数的影响

为了进一步研究 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对瞬间外向钾电流激活和失活动力学的影响, 实验分析了 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 作用前后 I_A 激活达到峰值的时间和失活时间常数的变化, 结果发现 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 使 I_A 激活过程中电流达到峰值的时间延长, 使快速失活时间常数变大(图 7). 说明 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 推迟了 I_A 的激活过程, 使激活开始到最多的钾离子通道打开的这段时间延长, 使 I_A 的快速失活过程变慢. 这些结果说明 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 使 DRG 神经元产生动作电位的过程延长.

4 讨论

研究结果显示, $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 会抑制外周神经元的生长, 使胞内的钙离子浓度增加, 会诱导 DRG 神经元凋亡. 细胞外的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 会阻断瞬间外向钾电流 I_A , 对延迟整流钾 I_K 影响很小. 细胞内的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对 I_A 没什么影响, 却特异性地阻断了 I_K . 显然, 胞内和胞外的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 作用 DRG 神经元钾通道的途径或部位不同. 胞内 Yb^{3+} 对 I_K 敏感, 胞外 Yb^{3+} 对 I_A 敏感. $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 使 I_A 的激活和失活曲线右移, 使 I_A 激活

达到峰值的时间延长, 使失活时间常数增大.

I_K 是动作电位复极化的主要电流^[17]. I_K 可缩短动作电位的时程, 从而保持细胞膜对兴奋的反应, 这种电流在细胞的凋亡过程中发挥重要的作用^[18]. 在对 I_K 电流的结果中显示, 胞内的 Yb^{3+} 抑制 I_K , 使得 DRG 神经元长时间处于动作电位开放的状态, 这会增加神经元的兴奋性^[19], 导致胞内的钙离子浓度增加.

I_A 是动作电位潜伏期外向电流的主要成分, 主要调节静息膜兴奋性, 减慢去极化的速度, 延缓动作电位的产生. I_A 的去极化对神经元的兴奋性具有重要的影响^[20, 21]. I_A 对各种神经元的动作电位的重复发放有重要的作用^[22, 23]. 在 DRG 神经元中 I_A 调节动作电位重复发放的时程、单位动作电位的复极化以及达到动作电位发放阈值的时间^[24]. $10 \mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 使 I_A 激活和失活曲线均向右移动, 说明 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 推迟了 I_A 的激活和失活过程, 并且激活曲线的右移($\Delta V_{1/2} = 14.8$ mV)比失活曲线的右移($\Delta V_{1/2} = 8.2$ mV)显著, 这可能是 Yb^{3+} 抑制钾通道的主要原因. Yb^{3+} 抑制 I_A , 延长 I_A 激活达到峰值的时间和失活时间常数, 使神经元持续发放冲动状态, 延长了动作电位的潜伏期, 进而加快去极化的速度, 促进动作电位产生, 导致异常的生理特性, 加速能量的消耗, 有可能使膜上的 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 泵不能耗能向胞外转运 Ca^{2+} 而功能失常^[25] 或导致细胞内的线粒体功能损伤^[26].

Ca^{2+} 是细胞内重要阳离子和第二信使之一, 与递质释放、细胞构筑和酶系统激活等密切相关^[27]. 生理条件下, 细胞质中 Ca^{2+} 浓度在 $10\sim 100$ nmol/L, 而细胞外和胞内钙池 Ca^{2+} 浓度则高达 1 mmol/L. 为了维持这样的浓度差和胞浆中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 相对稳定, 细胞有一套精细的装置控制 Ca^{2+} 在质膜、线粒体内膜、钙池膜之间流动. 细胞内 Ca^{2+} 超载, 会引发自由基

图 7 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 对 I_A 激活和快速失活动力学的影响. (a) 激活时 I_A 达到最高点的时间; (b) I_A 快速失活时间常数

产生、细胞膜衰竭和线粒体呼吸链中断等一系列病理改变,进而改变神经递质的释放、膜内外信息传递及基因表达、甚至造成神经元死亡,这种机制被认为是各种原因引起细胞损伤的“共同通路”^[27]。

一般认为,稀土金属化合物为钙通道阻滞剂^[28, 29],使用后可影响细胞内 Ca^{2+} 的分布^[30]。我们把不同浓度的 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 分别加 $10 \mu\text{mol/L}$ L-型钙通道阻断剂 nifedipin 来检测细胞凋亡,发现加 nifedipin 不影响 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 诱导的细胞凋亡率的改变,说明 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 引起 DRG 细胞凋亡,不是由于胞外的钙离子内流造成的。有研究表明稀土离子可以进入细胞膜,但不进入细胞器^[31],所以我们推测 DRG 神经元凋亡和胞内钙离子增大的原因可能是:(1) Yb^{3+} 通过抑制 I_A , 延缓 I_A 的激活过程,使细胞膜持续发放冲动状态,增加细胞的兴奋性,细胞器内的 Ca^{2+} 流出;(2) Yb^{3+} 通过影响钾通道而抑制膜上的 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 泵的作用,使 Ca^{2+} 的外排减少;(3) 胞内的 Yb^{3+} 抑制 Ca^{2+} 进入细胞器内。提示给予 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 后, DRG 神经元胞内的 Ca^{2+} 聚积,离子内环境紊乱,可能会造成线粒体功能障碍^[26],能量生成受阻,膜上的离子泵失效,神经元的结构及功能破坏。

一定浓度的稀土离子有诱导细胞凋亡和促细胞增殖的双重作用^[32]。一般稀土对肿瘤细胞有比正常细胞更高的亲和力^[33]。不同的稀土离子对细胞的作用强弱不同,稀土间存在轻重分组效应。前面的实验结果显示 $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 孵育 DRG 细胞 24 h, 细胞基本不出现凋亡, 孵育 96 h, 细胞出现凋亡, $10\sim 100 \mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 引起细胞凋亡的程度差不多, $1000 \mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 引起 DRG 严重凋亡,并且不同稀土离子诱导 DRG 细胞凋亡的程度不同(结果另文发表)。说明 Yb^{3+} 作用外周神经元一定时间才能引起凋亡, $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ 诱导 DRG 细胞凋亡可能是 Yb^{3+} 通过影响膜上钾通道蛋白引发细胞下游事件发挥其神经毒性, Yb^{3+} 作用后, 细胞内钙离子浓度增加, Ca^{2+} 聚积, 这种行为会引发自由基产生, 线粒体呼吸链断裂, 最后诱导 DRG 凋亡。

总之, Yb^{3+} 抑制 DRG 膜上的钾通道, 胞内的 Yb^{3+} 抑制 I_K , 胞外的 Yb^{3+} 抑制 I_A , Yb^{3+} 通过不同的通道蛋白影响 K 通道的正常生理功能, 引起初级感觉神经元的超兴奋性, 最终产生异常的感觉, 这种异常感觉从外周传入中枢神经系统。结论, 稀土离子 Yb^{3+} 有一定的神经毒性。

致谢 本工作得到国家自然科学基金重大项目(20637010)、山西省青年学术带头人项目和山西财经校级科研团队经费资助, 在此一并致谢。

参考文献

- 1 Wang K, Cheng Y, Yang XD, Li R. Cell responses to lanthanides and potential pharmacological actions of lanthanides. *Metal Ions Biolog Syst*, 2003, 40: 707—751
- 2 杨晓改, 杨晓达, 王夔. 稀土药用研究的动向和问题. 化学进展, 2007, 19: 201—204
- 3 沈立明, 兰子尧, 刘琼, 倪嘉瓚. 柠檬酸铈诱导肿瘤细胞凋亡的研究, 中国稀土学报, 2009, 27(3): 441—446
- 4 王夔, 杨晓改. 从细胞无机化学的角度看镧系元素化合物作为诊疗药物的安全性问题. 化学进展, 2009, 21(5): 803—818
- 5 Duan S, Cooke IM. Selective inhibition of transient K^+ current by La^{3+} in crab peptide-secreting neurons. *J Neurophysiol*, 1999, 81(4): 1848—1855
- 6 Enyeart JJ, Xu L, Gomora JC, Enyeart JA. Modulation of I_A potassium current in adrenal cortical cells by a series of ten lanthanide elements. *Memb Biol*, 1998, 164: 139—153
- 7 Watkins CS, Mathie A. Modulation of the gating of the transient outward potassium current of rat isolated cerebellar granule neurons by lanthanum. *Pflugers Arch*, 1994, 428 (3-4): 209—216
- 8 王瑜, 赵晓宁, 杨思军, 张祖暄. 镧对小鼠皮层细胞内游离钙和代谢活力的影响. 中华劳动卫生职业病杂志, 1999, 17(2): 85—87
- 9 姜杰, 蔡原, 周平. 孕哺期镧暴露对大鼠子代海马神经元细胞内钙稳态及超微结构影响. 预防医学论坛, 2008, 14: 779—781
- 10 王夔, 杜秀莲, 常彦忠, 李荣昌, 司徒加怡, 孙红哲, 钱忠明. 转铁蛋白结合铈跨膜转运及铈对 U-87MG 细胞增殖的影响. 中国病理生理杂志, 2003, 19(7): 902—904
- 11 Yost CS, Baker MD. Potassium channels. *Anesthesiology*, 1999, 90: 1186—1203
- 12 Foehring RC, Surmeier DJ. Voltage-gated potassium currents in acutely dissociated rat cortical neurons. *J Neurophysiol*, 1993, 70: 51—63
- 13 Yost CS, Baker MD. Potassium channels. *Anesthesiology*, 1999, 90: 1186—1203

- 14 Thompson SH. Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurons. *J Physiol (London)*, 1997, 265: 465—488
- 15 Du ZQ, Meng ZQ. Modulation of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by sulfur dioxide derivatives. *Brain Res*, 2004, 1010: 127—133
- 16 Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patch. *Pflugers Arch*, 1981, 391: 85—100
- 17 Gold MS, Shuster MJ, Levine JD. Characterization of six voltage-gated K^+ current in adult rat sensory neurons. *J Neurophysiol*, 1996, 75: 2629—2646
- 18 Pal S, Hartnett KA, Nerbonne JM, Levitan ES, Aizenman E. Mediation of neuronal apoptosis by KV2.1-encoded potassium channels. *J Neurosci*, 2003, 23(12): 4798—4802
- 19 Rudy B. Diversity and ubiquity of K^+ channels. *Neuroscience*, 1988, 25: 729—749
- 20 Dourado MM, Dryer SE. Regulation of A-currents by cell-cell interactions and neurotrophic factors in developing chick parasympathetic neurons. *J Physiol*, 1994, 474: 367—377
- 21 Matin SA, Nerbonne JM. Elimination of the fast transient in superior cervical ganglion neurons with expression of KV4.2W362F: Molecular dissection of I_A . *J Neurosci*, 2000, 20: 5191—5199
- 22 Nakayama T, Fozzard AH. Adrenergic modulation of the transient outward current in isolated canine purkinje cells. *Circ Res*, 1988, 62: 162—172
- 23 Kuo CC, Chen FP. Zn^{2+} modulation neuronal transient K^+ current: Fast and selective binding to the deactivated channels. *J Biophys*, 1999, 77: 2552—2562
- 24 Storm J F. Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol (London)*, 1987, 385: 733—759
- 25 Shimizu H, Borin ML, Blaustein MP. Use of La^{3+} to distinguish activity of the plasmalemmal Ca^{2+} pump from Na^+/Ca^{2+} exchange in arterial myocytes. *Cell Calcium*, 1997, 21(1): 31—41
- 26 刘会雪, 杨晓达, 王夔. 稀土离子(La^{3+} , Gd^{3+} , Yb^{3+} , Ce^{3+})对线粒体的氧化损伤. 中国稀土学报, 2007, 25(1): 102—106
- 27 Duncan RS, Goad DL, Grillo MA, Kaja S, Payne AJ, Koulen P. Control of intracellular calcium signaling as a neuroprotective strategy. *Molecules*, 2010, 15(3): 1168—95
- 28 Lansman JB. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. *J Gen Physiol*, 1990, 95: 679—696
- 29 郑志侠, 黄碧霞, 芮蕾, 徐洛. 稀土元素对 Ca 在细胞中分布影响机制的探讨. 稀土, 2001, 22 (6): 27—31
- 30 Mlinar B, Enyeart JJ. Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J Physiol*, 1993, 469: 639—652
- 31 Li YQ, Li ZY, Zhou XP, Yang P. Detection of nano Eu_2O_3 in cells and study of its biological effects. *Nano Biomed Eng*, 2010, 2(1): 32—45
- 32 刘会雪, 杨晓达, 王夔. La^{3+} 对肝细胞株 7701 的增殖和对蛋白质表达的影响. 中国稀土学报, 2004, 22(4): 434—437
- 33 倪嘉缙. 稀土生物无机化学. 北京: 科学出版社, 2002

The toxicity of ytterbium perchlorate in dorsal root ganglion neurons of rats and the influence of it on membrane potassium channels

DU ZhengQing^{1,2}, LI ZhuoYu², YANG Pin² & WU WenJie³

1 Department of Environmental Science, Shanxi University of Finance & Economics, Taiyuan 030006, China

2 Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education; Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3 School of Environmental Science and Chemical Engineering, Zhongbei University, Taiyuan 030024, China

Abstract: In this study, the effects of ytterbium perchlorate inducing apoptosis of dorsal root ganglion (DRG) neurons of rats and changes of intracellular calcium ion concentration and the influence on membrane potassium ion channels were investigated. After treatment DRG cells with different concentrations of ytterbium perchlorate for 24 and 96 h, the apoptosis and fluorescence intensity changes of intracellular calcium ions were detected with flow cytometry and confocal laser scanning. Whole-cell patch clamp technique was adopted to examine the effects of intracellular and extracellular Yb^{3+} on the potassium channels in rat DRG neurons. Results demonstrated that after DRG neurons were treated with 10, 100, 1000 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ for 24 h, there were generally no cell apoptosis; after 96 h treatment, there were apparent cell apoptosis ($P < 0.05$ – 0.01), especially with 1000 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$, the apoptosis rate achieved $(55.23 \pm 3.76) \%$ ($P < 0.01$). The fluorescence intensity of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of DRG neurons incubated with $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ significantly increased; $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ inhibited the growth of dorsal root ganglion fibers and neurites. $\text{Yb}(\text{ClO}_4)_3$ inhibited potassium current, Yb^{3+} in the intracellular or extracellular solution might interact with different sites on potassium channels. Yb^{3+} in the extracellular solution played a dominant role in inhibiting the transient outward potassium current, whilst playing a minor role in affecting the delayed rectifier potassium current. Yb^{3+} in the intracellular solution, however, only inhibited the delayed rectifier potassium current, without affecting the transient outward potassium current. 10 $\mu\text{mol/L}$ Yb^{3+} caused a significant right shift of the activation and inactivation processes of transient outward potassium current. Meanwhile, Yb^{3+} delayed the time reaching the peak of transient outward potassium current, increased the time constants of inactivation, and increased the excitability of neurons. Conclusion: through influence on I_A and I_K on the DRG, rare earth ytterbium ions led to long time excitation of DRG neurons, accelerated consumption of energy, increased intracellular calcium ion concentration, and ultimately induced cell apoptosis and peripheral nerve toxicity.

Keywords: dorsal root ganglion neurons, ytterbium ion, apoptosis, calcium ion concentration, potassium current