

三氯化铝对大鼠海马 CA1 区锥体细胞钠电流的影响

孟紫强*, 聂爱芳, 白 伟

(山西大学环境医学与毒理学研究所, 山西 太原 030006)

摘要: 目的 为了进一步明确铝及含铝化合物对神经系统的损伤及其作用机制。方法 采用全细胞膜片钳技术研究三氯化铝(AlCl_3)对急性分离的大鼠海马 CA1 区神经元钠通道的影响。结果 AlCl_3 对钠电流有明显的抑制作用, 且呈浓度依赖性, $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AlCl_3 给药前后钠电流激活曲线 V_h 分别为 $-(51.3 \pm 6.0)\text{mV}$ 和 $-(47.5 \pm 5.4)\text{mV}$ ($P < 0.05$), k 值分别为 $-(8.1 \pm 2.3)\text{mV}$ 和 $-(8.6 \pm 3.2)\text{mV}$ ($P > 0.05$), 给药前后钠电流失活曲线 V_h 分别为 $-(67.4 \pm 5.5)\text{mV}$ 和 $-(71.4 \pm 4.4)\text{mV}$ ($P < 0.05$), k 值分别为 $(6.1 \pm 1.1)\text{mV}$ 和 $(6.8 \pm 1.2)\text{mV}$ ($P > 0.05$)。结论 AlCl_3 对大鼠海马 CA1 区神经元钠通道有抑制作用, 这可能是铝引起中枢神经系统损伤的机制之一。

关键词: 铝; 海马; 膜片钳技术, 全细胞; 钠通道

中图分类号: R995

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)04-0309-04

随着铝工业的发展, 铝制品和含铝化合物的广泛应用, 生活和自然环境中铝的含量日益增高。由此引起的健康问题越来越引起人们的关注。有报道表明, 铝能促进淀粉样蛋白的形成和积累, 从而在老年痴呆症的致病过程中发挥作用^[1-3]。也有文献对铝引起的海马组织病变进行了报道, 表明铝可以使细胞死亡率明显增加, 降低 Mg^{2+} -ATP 酶等酶活性^[4,5]。另外, 也有报道表明, 三氯化铝(AlCl_3)还可致胚胎发育毒性^[6]。但是, 铝对海马神经元离子通道的研究却鲜有报道, 本实验研究了 AlCl_3 对大鼠海

马 CA1 区神经元钠通道的影响, 以探讨铝的神经毒作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和溶液

N-2-羟乙基哌嗪-*N*'-2-乙磺酸 (*N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N*'-[2-ethanesulfonic acid], HEPES)、乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸 (ethylene glycol-bis[2-aminoethyl ether]-*N*, *N*', *N*', *N*'-tetraacetic acid, EGTA)、 Na_2ATP 均为 Sigma 产品。孵育液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 124, KCl 5, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.3, CaCl_2 2.4, 葡萄糖 10, NaHCO_3 26, pH 7.4; 标准细胞外液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 150, KCl 5, MgCl_2 1.1, CaCl_2 2.4, HEPES 10, 葡萄糖 10, pH 7.4, 记录前在上述标准外液中加入 CdCl_2 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 电极内液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): CsCl 75, NaF 75, MgCl_2 2, HEPES 10, EGTA 2.5, Na_2ATP 3, pH 7.5。

1.2 大鼠海马 CA1 区神经元的急性分离

按照本室建立的方法^[7]分离大鼠海马 CA1 区神经元, 主要过程如下: Wistar 大鼠, 鼠龄 7 d, 雌雄不限。实验当日大鼠断头取脑, 置于 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 孵育液中取出海马, 手工切成 $500 \mu\text{m}$ 厚的脑片, 分出 CA1 区, 置于 32°C 孵育液中, 连续通以 $5\% \text{ CO}_2 + 95\% \text{ O}_2$ 混合气, 孵育 30 min。然后加入胰蛋白酶, 使其终浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 32°C 下消化 35 min。消化完毕用孵育液洗脑片 3 次, 移入盛有氧饱和和标准细胞外液的离心管内, 用 Pasteur 吸管轻轻吹打, 制成单细胞悬液, 静置约 5 min, 取上部细胞悬液, 加入盛有氧饱和和标准细胞外液的培养皿内, 约 15 min 后细胞贴壁, 即可进行全细胞膜片钳记录。

1.3 全细胞膜片钳记录

记录电极由玻璃微电极经 PP-830 型微电极拉制仪 (Narishige, Japan) 拉制, 尖端直径为 $1 \sim 2 \mu\text{m}$, 充灌电极内液后阻抗为 $8 \sim 10 \text{ M}\Omega$, 记录在 $20 \sim 24^\circ\text{C}$ 的室温下进行, 实验用 Axopatch 200B 膜片钳放大器

收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2004-02-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070647)

作者简介: 孟紫强 (1939-), 男, 山西省临汾人, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为环境毒理学。

* 联系作者 E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn Tel/Fax: (0351)7011895

(Axon Instrument, USA)进行全细胞膜片钳记录。当电极尖端与细胞膜之间形成高阻抗封接 ($> 5 \text{ G}\Omega$) 后,负压破膜,使电极内液与细胞内液相通,即形成全细胞记录状态。电流信号经 2 kHz 滤波及 Digidata1200 型 A/D、D/A 转换器进行数模转换后存于硬盘,采样频率 1.67 kHz 。保持电位及钳制测试脉冲程序的设定、信号采集与存储均借助微机运行 Pclamp 6.0.4 软件(Axon Instrument, USA)完成。

1.4 数据分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据的分析和处理采用 Pclamp Clampfit 程序(Axon Instrument)和 Origin 5.0 软件(Microcal software, USA)完成,给药前后差异的显著性用 t 检验进行分析。

2 结果

2.1 大鼠海马 CA1 区神经元钠电流的分离

利用 Pclamp6.0.4 软件记录分离电流。在电压钳模式下将钳制电压置于 -100 mV , 给予 -120 mV 到 -20 mV 的阶梯去极化脉冲刺激,记录得到的电流,该电流可被 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的河鲀毒素阻断,证实为钠电流(图 1A)。

2.2 三氯化铝对钠电流的影响

由 2.1 所述方法获得电流,然后向培养皿中定量加入 AlCl_3 溶液,使其终浓度为 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,加药后不同时间分别记录钠电流,得到加药后的时间过程图(图 1B)。由图 1B 可看出给药后记录到的钠电流随时间的延长而减小,10 min 后药物的作用达到最大。

向培养皿中定量加入 AlCl_3 溶液,使其终浓度分别为 $1, 10, 100$ 和 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。给药后 10 min 再次记录上述内向电流,观察 AlCl_3 对钠电流-电压 ($I-V$) 曲线的影响(图 1C)。对照组钠电流有轻微的减小 ($5.6 \pm 0.9\%$),给药组钠电流则随 AlCl_3 浓度的增加而显著减小, $I-V$ 曲线显著升高,呈一定的浓度依赖性。

2.3 三氯化铝对钠电流激活动力学的影响

由 2.1 所述方法获得电流,然后向培养皿中定量加入 AlCl_3 溶液,使其终浓度为 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,给药后 10 min 再次记录上述外向电流。利用公式 $G = I/(V - V_{\text{Na}})$ 将钠电流值转换为电导值,其中 G 为电导, V 为膜电位, V_{Na} 为翻转电位。以电导值与最大电导值的比值 (G/G_{max}) 对应膜电位分别绘制出给药

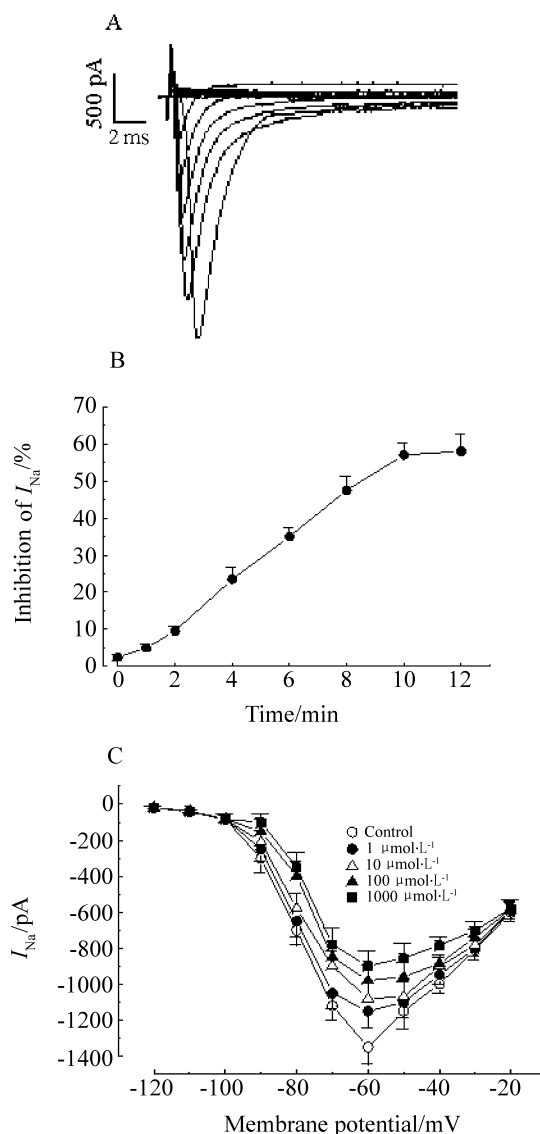


Fig 1. Effect of AlCl_3 on Na^+ current (I_{Na}). A: current traces obtained by 160 ms depolarizing pulses from -120 mV to -20 mV in 10 mV steps. B: time curve of the effect of $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 on I_{Na} . C: concentration-response curve for the effect of AlCl_3 on I_{Na} . $\bar{x} \pm s$, $n = 10$.

前后钠电流的激活曲线(图 2A)。所得曲线可以用 Boltzmann 方程 $G/G_{\text{max}} = 1/\{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$ 进行拟合,式中 G 为电导, V 为膜电位, V_h 为半数激活电压, k 为斜率因子。由图 2A 可以看出,钠电流激活曲线呈 S 形,并由此计算出给药前后钠电流的 V_h 分别为 $-(51.3 \pm 6.0) \text{ mV}$ 和 $-(47.5 \pm 5.4) \text{ mV}$ ($P < 0.05$), k 值分别为 $-(8.1 \pm 2.3) \text{ mV}$ 和 $-(8.6 \pm 3.2) \text{ mV}$ ($P > 0.05$)。这说明 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 可使钠电流的激活曲线显著右移,但不改变其斜率因子。

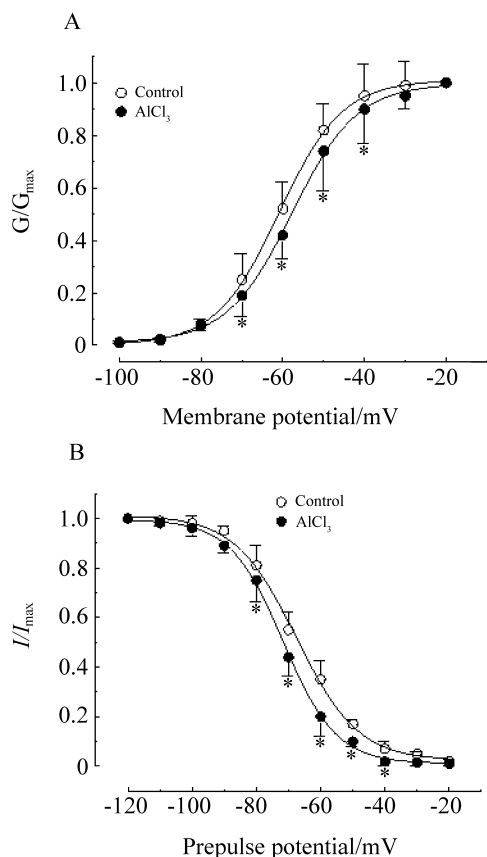


Fig 2. Effect of $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3$ on steady-state activation and inactivation kinetics of I_{Na} . A: steady-state activation curves of I_{Na} currents before and after application $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3$. B: steady-state inactivation curves before and after application $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3$. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. * $P < 0.05$, compared with control.

2.4 三氯化铝对钠电流失活动力学的影响

置保持电位于 -100 mV , 先给予 -120 mV 至 -20 mV , 步幅 10 mV , 刺激波宽 500 ms 的阶梯钳制预脉冲刺激, 然后回到保持电位 (-100 mV), 间隔 1 ms 再给予至 -30 mV 的测试脉冲刺激, 刺激波宽 12 ms , 刺激频率 0.25 Hz , 记录得到的电流图形。然后向培养皿中定量加入 AlCl_3 溶液, 使其终浓度为 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 给药后 10 min 再次记录上述外向电流。以电流峰值与最大电流峰值的比值 (I/I_{max}) 对应预脉冲刺激电压分别绘制出给药前后钠电流失活曲线 (图 2B)。所得曲线可以用 Boltzmann 方程 $I/I_{\text{max}} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$ 进行拟合, 式中 I 为电流, V 为膜电位, V_h 为半数失活电压, k 为斜率因子。由图 2B 可以计算出给药前后钠电流的 V_h 为 $-(67.4 \pm 5.5) \text{ mV}$ 和 $-(71.4 \pm 4.4) \text{ mV}$ ($n = 10$, $P < 0.05$), k 值分别为 $(6.1 \pm 1.1) \text{ mV}$ 和 $(6.8 \pm 1.2) \text{ mV}$ ($n = 10$, $P > 0.05$)。

这说明 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3$ 可使钠电流失活曲线明显左移, 但不改变其斜率因子。

3 讨论

近年来, 在铝引起神经系统疾病的研究方面取得了很大的进展。文献指出铝可以穿过血脑屏障进入和蓄积在脑组织中, 并且可以增加血脑屏障的通透性, 改变生物膜的转运方式^[8]。最近的研究资料表明^[9], 在老年痴呆症患者的脑组织神经纤维缠结和老年斑中, 铝含量可达 $0.5 \sim 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。研究铝对中枢神经元的毒理作用, 对探讨脑组织疾患的机理及防护具有重要意义。

Deleers 等^[10]认为, 在生理条件下, $20 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铝就可以取代胞膜上几乎所有的二价阳离子, 使进入细胞的铝增加, 并阻碍二价阳离子进入细胞, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铝可以使细胞膜带负电的磷脂双分子层分离解聚。电压门控性钙离子通道可被 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铝阻断 45% , $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时完全阻断^[11]。由此可见, 铝可使进入细胞内的钙离子减少, 导致膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活性降低, 功能改变。

本实验采用全细胞膜片钳技术观察了铝化合物对大鼠海马神经元 CA1 区锥体细胞的钠电流的影响, 结果表明 AlCl_3 对钠电流有明显的抑制作用, 且呈浓度依赖性, 同时可使钠电流激活曲线右移, 使失活曲线左移, 但不改变斜率因子。对钠电流的抑制, 可能是由于 Al^{3+} 快速且具有高度选择性地进入离子通道, 结合跨膜蛋白氨基酸残基, 在空间位置上关闭电压传感器来影响门控电荷, 从而诱导非正常状态下的离子通道构造, 导致钠电流减小。电压依赖性钠电流的减小, 会造成钠离子内流减少, 从而抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性, 使细胞膜难以超极化, 不利于静息电位的建立。此外, 它还会影响胞内 K^+ 浓度, 导致 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 等离子平衡的失调, 引起细胞功能紊乱^[12~15]。

总之, Al^{3+} 对中枢神经元膜离子通道有多方面的负面影响, 为了全面了解其神经毒性作用及其机制, 需要多方面的深入研究。

4 参考文献:

- [1] Yokel RA. The toxicology of aluminum in the brain: a review[J]. *Neurotoxicology*, 2000, **21**(5):813-828.

- [2] Guo GW, Wu YL, Yang XH, Ge LN, Liang YX. Effect of aluminum chloride on amyloid β -protein precursor and glial fibrillary acidic protein expression in rat cortex[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1999, **13**(3):227–230.
- [3] Kawahara M, Kato M, Kuroda Y. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of beta-amyloid protein[J]. *Brain Res Bull*, 2001, **55**(2):211–217.
- [4] Tian DQ, Yan ZG. Observation on the aluminum's neurotoxicity on the primary cultured rat hippocampal neurons[J]. *Chin J Cell Biol* (细胞生物学杂志), 1997, **19**(3):136–139.
- [5] Xiong XK, Dong DC, Zhang Y, Wang JB, Chen YX, Zhu QH, et al. Experimental study of injury effect of aluminum on the hippocampal of rat[J]. *Chin J Tissue Chem Cell Chem* (中国组织化学与细胞化学杂志), 1997, **6**(4):370–373.
- [6] Zhang BZ, Li Pu, Wu DS. Experimental study on developmental toxicity of AlCl_3 to rats' embryo *in vitro*[J]. *J Environ Health* (环境与健康杂志), 2002, **19**(3):190–191.
- [7] Meng Z, Sang N. Effects of SO_2 derivatives on sodium currents in acutely isolated rat hippocampal CA1 neurons[J]. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 2002, **54**(3):267–270.
- [8] Walton J, Tuniz C, Fink D, Jacobsen G, Wilcox D. Uptake of trace amounts of aluminum into the brain from drinking water[J]. *Neurotoxicology*, 1995, **16**(1):187–190.
- [9] Good PF, Perl DP, Bierer LM, Schmeidler J. Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study[J]. *Ann Neurol*, 1992, **31**(3):286–292.
- [10] Deleers M, Servais JP, Wulfert E. Aluminum-induced lipid phase separation and membrane fusion does not require the presence of negatively charged phospholipids[J]. *Biochem Int*, 1987, **14**(6):1023–1034.
- [11] Meiri H, Banin E, Roll M. Aluminum ingestion – is it related to dementia[J]? *Rev Environ Health*, 1991, **9**(4):191–205.
- [12] Boening JA, Kass IS, Cottrell JE, Chambers G. The effect of blocking sodium influx on anoxic damage in the rat hippocampal slice[J]. *Neuroscience*, 1989, **33**(2):263–268.
- [13] Haigney MC, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading[J]. *Circulation*, 1994, **90**(1):391–399.
- [14] Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death[J]. *Trends Neurosci*, 1995, **18**(2):58–60.
- [15] Peterson C, Ratan R, Shelanski M, Goldman J. Changes in calcium homeostasis during aging and Alzheimer's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1989, **568**(3):262–270.

Effects of aluminum chloride on sodium currents in acutely isolated rat hippocampal CA1 neurons

MENG Zi-Qiang*, NIE Ai-Fang, BAI Wei

(Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: **AIM** To further explore the damage effect of aluminum and compounds containing aluminum on nervous system and its mechanisms. **METHODS** The effects of aluminum chloride (AlCl_3) on Na^+ currents of isolated hippocampal CA1 neurons of rats were studied using whole-cell patch-clamp technique. **RESULTS** AlCl_3 could reduce Na^+ current in a concentration-dependent manner. Before and after application of $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AlCl_3 , the half-activation voltage of Na^+ current were $-(51.3 \pm 6.0) \text{mV}$ and $-(47.5 \pm 5.4) \text{mV}$ ($P < 0.05$), but the slope was not changed. Before and after application of $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AlCl_3 , the half-inactivation volt-

age of Na^+ currents were $-(67.4 \pm 5.5) \text{mV}$ and $-(71.4 \pm 4.4) \text{mV}$ ($P < 0.05$), but the slope was not changed. **CONCLUSION** AlCl_3 may damage sodium channels of the hippocampal CA1 neurons of rats, which may be related to the mechanism of damage of aluminum on central nervous system.

Key words: aluminum; hippocampus; patch clamp technique, whole-cell; sodium channels

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(30070647)

* Corresponding author.

(本文编辑 石 涛)