

## 咖啡因对急性分离的大鼠背根神经节细胞 H-电流的影响

何水金, 阮迪云\*, 陈聚涛

(中国科学技术大学生命科学学院神经毒理学实验室, 安徽 合肥 230027)

**摘要:** 目的 探讨咖啡因在镇痛中的作用机制。方法 应用膜片钳技术研究了咖啡因对大鼠的3种不同直径大小的背根神经节(DRG)细胞 H-电流特性的影响。结果  $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  咖啡因对 DRG 大细胞、中细胞和小细胞的 H-电流分别降低了  $(80 \pm 4)\%$ ,  $(40 \pm 3)\%$  和  $(11.0 \pm 2.3)\%$ 。结论 咖啡因使 H-通道的电压敏感性下降, H-通道的激活电压升高。咖啡因对大型和中型 DRG 细胞 H-电流的抑制作用, 可能是发挥抗伤害性感受和用作镇痛佐剂的作用机制之一。

**关键词:** 咖啡因; 神经节, 脊; H-电流; 膜片钳技术, 全细胞

中图分类号: R971.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)04-0241-05

咖啡因 (caffeine) 是一种中枢兴奋药, 它存在于日常饮用的咖啡、茶和可乐等饮料中。人们发现咖啡因与非甾体抗炎镇痛药合用能增强它们的镇痛作用<sup>[1~3]</sup>, 至今, 咖啡因作为镇痛佐剂的机制还不是很清楚<sup>[4]</sup>, 因此本文探讨它的一种可能的作用机制。

背根神经节 (dorsal root ganglion neurons, DRG) 细胞是一类假单极初级感觉神经元, 将外周信息传入至脊髓背角, 完成初级感觉信息的传递。根据细胞直径的大小分为大、中、小3类, 以大鼠为例, 小细

胞直径  $15.9 \sim 32.9 \mu\text{m}$ , 中细胞直径  $33.0 \sim 42.9 \mu\text{m}$ , 大细胞直径  $43.0 \sim 63.6 \mu\text{m}$ <sup>[5]</sup>。由于 DRG 细胞在痛觉信息传递中的重要作用, 在技术上已成功进行了分离并在膜片钳实验中得到了广泛应用, 本文采用急性分离的大鼠 DRG 细胞为模型, 研究了咖啡因对大、中、小3类不同直径大小的 DRG 细胞超极化诱导的 H-电流的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 背根神经节神经元的分离

将出生后2周龄(约10 d)的 Wistar 大鼠断头, 迅速分离出胸段至腰段脊柱并将脊柱剖为两半, 置于冰浴的 DMEM 液中 3~5 min 后, 用游丝镊从椎间孔处取出 DRG, 再放入  $\text{O}_2$  饱和的冰浴 DMEM 液中。15 min 后, 把修剪了神经干后的 DRG 置入含有  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胶原酶, 温度为  $32^\circ\text{C}$  DMEM 液中消化 1 h, 再在终浓度为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰蛋白酶的 DMEM 中消化 30 min。取出 DRG, 用细胞外液漂洗数次, 移至盛 2 mL 细胞外液的培养皿中, 用一系列口径从大到小的巴世德吹打管, 静止 1 h 后开始实验。

#### 1.2 实验所需溶液

普通细胞外液成分 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): NaCl 150, KCl 5,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10, D-葡萄糖 10, 用 Tris 调 pH 至 7.35。

电极内液 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): KCl 140,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10, EGTA 10,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  5, 用 Tris 调 pH 至 7.25。

DMEM 培养液: 将 DMEM 粉剂 (Gibco 公司产品) 定容为 1 L 溶液。

#### 1.3 膜片钳记录

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

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 ( $> 1 \text{ G}\Omega$ ) 后, 负压破膜, 使电极内液与细胞外液相通, 破膜后, 膜电容 ( $C_m$ ) 为  $40 \sim 60$

收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2003-04-25

基金项目: 国家自然科学基金 (30170809, 30000039); 国家 973 项目 (2002CB512907); 中国科学院创新项目基金 (KZCX 2-410); 高等教育博士点研究基金 (20020358053); 中国科学与技术大学基金 (KB0833, KY1206)

作者简介: 何水金 (1976-), 男, 江西省新余市人, 硕士研究生, 主要从事神经药理学与毒理学方面研究; 阮迪云 (1942-), 男, 湖南省邵阳市人, 教授, 博士生导师, 主要从事神经毒理学方面研究。

\* 联系作者 E-mail: Ruandy@ustc.edu.cn Tel: (0551) 3606374 Fax: (0551) 3601443

pF, 阻抗( $R_s$ )为 10 ~ 20 M $\Omega$ 。调节电容补偿和串联电阻值, 电流或电压信号经膜片钳放大器(PC-II B, 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。对照液和咖啡因灌流液通过 Y-管加药系统加入。测试和记录软件为 Ibbclamp (华中理工大学), 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。 $P$  值用 ANOVA 分析获得,  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 H-电流的特性

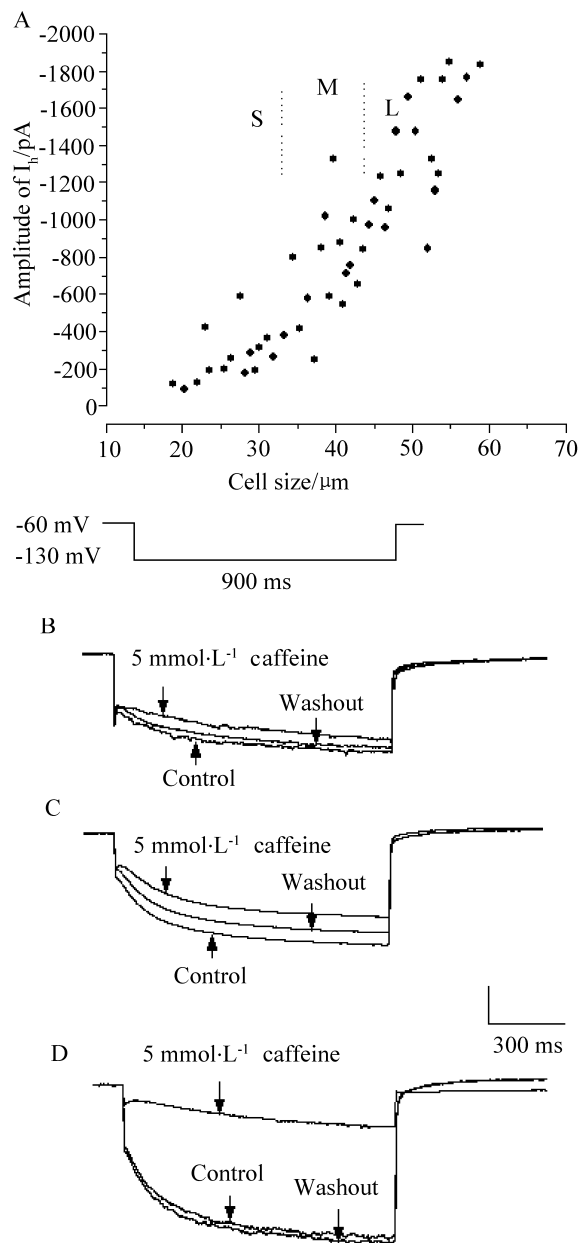
在多类可兴奋性细胞中, 有一类可以介导  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  等阳离子非选择性通透的一种快速内向电流的离子通道, 它被膜超极化激活但不失活。在膜的钳位值  $-60$  mV 的条件下, 给细胞阶跃为  $-10$  mV 超极化刺激, 最后一步超极化刺激到  $-130$  mV。这种超极化激活的阳离子内向电流包括瞬时内向电流 (instantaneous inward currents,  $I_{IN}$ ) 和慢时内向电流 (slowly activating inward currents,  $I_h$ )。H-电流是铯离子 ( $\text{Cs}^+$ ) 敏感的电[6~8], 作者采用上面这种超极化条件在 DRG 细胞上激活的  $I_h$  能被  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cs}^+$  所阻断。

### 2.2 咖啡因对 3 类大小不同直径的背根神经节细胞 H-电流的影响

3 种不同直径大小的 DRG 细胞在信息传递中有不同的作用。在这 3 类细胞中, 能诱导出 H-电流的细胞比例和 H-电流幅度大小都不一样。实验结果表明, 仅有 32% 的小细胞有 H-电流的表达, 72% 的中细胞和 91.3% 的大细胞表达 H-电流。小细胞的 H-电流的幅度范围为 80 ~ 400 pA, 中细胞为 400 ~ 900 pA, 大细胞为 900 ~ 2000 pA, 3 种细胞的 H-电流幅度的统计结果如图 3 所示。一定浓度的咖啡因都能抑制 3 类细胞的 H-电流, 降低了 H-电流的电压敏感性, 但抑制程度不同。5.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  咖啡因分别使小细胞、中细胞和大细胞的 H-电流幅度降低了  $(11 \pm 2.3)\%$  ( $n = 12$ ),  $(40 \pm 3)\%$  ( $n = 20$ ) 和  $(80 \pm 4)\%$  ( $n = 23$ ) (图 1)。5.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  咖啡因也抑制了 DRG 细胞的瞬时内向电流, 这可能是由于 H-电流的抑制的结果[5]。

### 2.3 咖啡因对背根神经节细胞 H-电流的抑制作用具有浓度依赖性

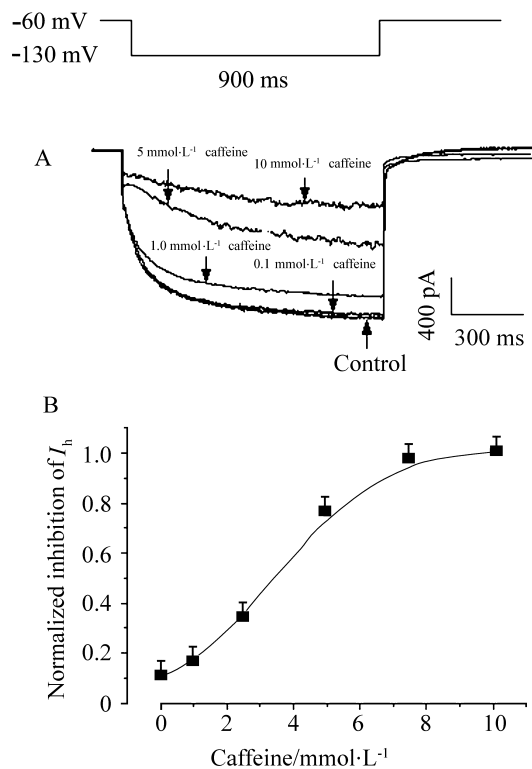
用不同浓度的咖啡因 (0.1, 1.0, 2.5, 5.0,



**Fig 1. Effect of caffeine on slowly activating inward currents ( $I_h$ ) in dorsal root ganglion (DRG) neurons of three different sizes.** (A) The statistical result of amplitude of  $I_h$  in DRG neurons of three different sizes. The amplitude of  $I_h$  in small-diameter DRG neurons (S) was between 80 ~ 300 pA, medium-diameter neurons (M) between 400 ~ 900 pA, large-diameter neurons (L) between 900 ~ 2000 pA. The current elicited by a step to  $-130$  mV from  $-60$  mV, the holding potential, in a small-diameter DRG neuron was shown in (B). (B) includes  $I_h$  in control, after the application of  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  caffeine and after wash. (C) a medium-diameter DRG neuron. (D) a large-diameter DRG neuron.

7.5, 10.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 灌流同一个大型的 DRG 细胞, 结果表明, 咖啡因对 DRG 细胞 H-电流的抑制作用

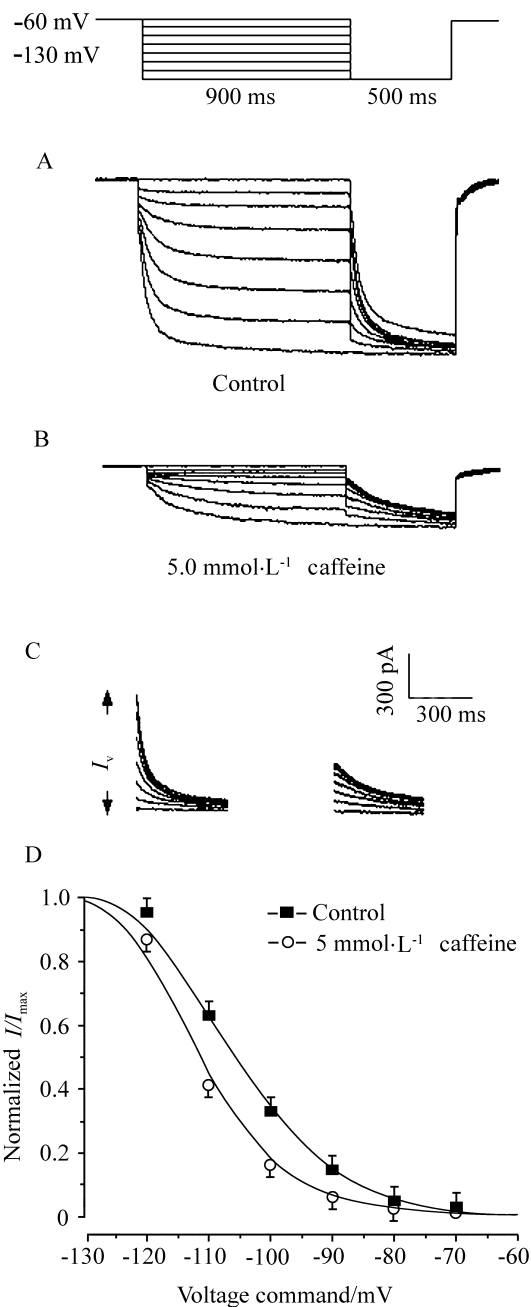
具有浓度依赖性(图 2A)。0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 咖啡因几乎没有抑制大细胞 H-电流。图 2B 以咖啡因的浓度为 X 轴, 以各个浓度的咖啡因灌流后的 H-电流被抑制的绝对值对 10.0 mmol·L<sup>-1</sup> 咖啡因抑制的绝对值归一化后的相对值为 y 轴绘制的咖啡因浓度与  $I_h$  幅度大小的关系图( $n = 7$ )。从图中可得到  $EC_{50} = 3.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



**Fig 2. Effect of different concentrations caffeine on  $I_h$ .**  $I_h$ : currents evoked by a step direct from -60 mV to 130 mV in a large-diameter DRG neuron were shown (A) after the applications of several concentrations caffeine. (B) Mean normalized inhibition of  $I_h$  in various concentrations caffeine is plotted against [caffeine] ( $n = 7$ ).

#### 2.4 咖啡因对 H-电流电压依赖性的影响

以大 DRG 细胞为标本, 在钳制电位基础上, 以阶跃为 -10 mV, 900 ms 第一个脉冲刺激, 紧接着给予 -130 mV, 500 ms 的第二个脉冲刺激, 得到的波形如图 3A(对照组)和图 3B(咖啡因组)所示。按照 Kamondi 等<sup>[9]</sup>的方法分析第二个脉冲诱导的电流, 以第一个脉冲的电压值为 X 轴, 以第二个脉冲归一化值为 y 轴作图(如图 3D)。结果表明咖啡因组的曲线向左移, 咖啡因升高了 H-通道的激活电压( $n = 8, P < 0.05$ )。



**Fig 3. Effect of caffeine on voltage dependence of  $I_h$ .**  $I_h$  evoked by the first pulse from -60 mV to -130 mV in -10 increments for 900 ms is subsequently given the second pulse of -130 mV for 500 ms at the end of each step (900 ms). Currents in a large-diameter DRG neuron elicited by the two-step protocol are shown in (A, control) and (B, 5 mmol·L<sup>-1</sup> caffeine).  $I = I_{-130} - I_v$ , here  $I_{-130}$  was evoked by stepping the membrane potential to -130 mV in the first pulse;  $I_v$  was the tail current elicited in the second pulse. Normalized  $I/I_{-130}$  is plotted against test potentials in the first pulse(D).

### 3 讨论

本研究采用了急性分离的 DRG 细胞作为标本,研究了咖啡因对 3 种直径不同大小的 DRG 细胞的 H-电流的影响。咖啡因对大、中型 DRG 细胞 H-电流抑制较大,对小细胞抑制较小。

咖啡因是一种中枢神经系统兴奋药,它是腺苷酸受体的拮抗剂,可以竞争性拮抗  $A_1$  和  $A_2$  受体,对腺苷酸  $A_1$  和  $A_2$  受体没有选择性。咖啡因在中枢和外周的药理效应被认为主要是拮抗腺苷酸受体起作用<sup>[10]</sup>。咖啡因也可以作为镇痛佐剂和非甾体类抗炎镇痛药合用缓解多种疼痛,而且, Sawynok 等<sup>[11]</sup>在大鼠后掌皮下注射甲醛引起损伤实验中,发现咖啡因能在脊髓水平上产生抗伤害性感受作用。但是,腺苷酸受体的激动剂也能产生抗伤害性感受作用。Ghelardini 等<sup>[12]</sup>认为咖啡因是抑制类胆碱神经末梢突触前的腺苷酸受体,而腺苷酸激动剂作用于突触后的腺苷酸受体。介于咖啡因在抗伤害性感受和被用作镇痛佐剂的机制还不是很清楚<sup>[4]</sup>和 H-电流参与了周围神经元抗伤害性感受<sup>[5,13,14]</sup>,本文研究了咖啡因对 H-电流的影响。

H-电流是一类非选择性的主要包括  $Na^+$ ,  $K^+$  离子的内向电流。它对细胞静息膜电位的维持,细胞的兴奋性及发放频率的调控起重要作用。H-通道在超极化条件下激活的 H-电流使细胞回到静息状态,有助于细胞动作电位的发放和细胞兴奋<sup>[5,6,8,15,16]</sup>。 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  咖啡因可抑制大细胞 H-电流的幅度 ( $80 \pm 4$ )%, 中细胞 H-电流的幅度 ( $40 \pm 3$ )%, 但仅抑制小细胞的 H-电流幅度 ( $11.0 \pm 2.3$ )%。咖啡因还抑制 3 类细胞的瞬时内向电流,这可能也是 H-电流被抑制的结果<sup>[5]</sup>。咖啡因抑制 3 种不同直径大小的 DRG 细胞 H-电流的幅度,从而降低细胞的兴奋性,使细胞维持在静息状态,作者推测咖啡因的抗伤害性刺激及充当镇痛佐剂的作用可能有一部分是通过抑制大、中细胞的 H-电流的缘故。

细胞膜上的腺苷酸受体与胞内 cAMP 信号系统相耦联,腺苷酸受体的激动剂使 cAMP 浓度升高, cAMP 活化蛋白质激酶,活化的激酶再磷酸化细胞膜上的 H-通道,使通道开放<sup>[17]</sup>。咖啡因在中枢或外周神经细胞的主要受体是腺苷酸受体,因而推测咖啡因对 H-电流的压抑可能是通过拮抗腺苷酸受体起作用。

本研究提示咖啡因可能通过抑制大、中型 DRG 细胞的 H-电流,从而降低 DRG 细胞的兴奋性,进而发挥它的抗伤害性感受及镇痛佐剂的作用。

### 4 参考文献:

- [1] Granados-Soto V, Lopez-Munoz FJ, Castaneda-Hernandez G, Salazar LA, Villarreal JE, Flores-Murrieta FJ. Characterization of the analgesic effects of paracetamol and caffeine combinations in the pain-induced functional impairment model in the rat[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1993, **45**(7): 627 - 631.
- [2] Castaneda-Hernandez G, Castillo-Mendez MS, Lopez-Munoz FJ, Granados-Soto V, Flores-Murrieta FJ. Potentiation by caffeine of the analgesic effect of aspirin in the pain-induced functional impairment model in the rat[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1994, **72**(10): 1127 - 1131.
- [3] Lopez-Munoz FJ, Castaneda-Hernandez G, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V. Effect of caffeine coadministration and of nitric oxide synthesis inhibition on the antinociceptive action of ketorolac[J]. *Eur J Pharmacol*, 1996, **308**(3): 275 - 277.
- [4] Sawynok J. Adenosine receptors activation and nociception [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, **347**(1): 1 - 11.
- [5] Yagi J, Sumino R. Inhibition of a hyperpolarization-activated current by clonidine in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *J Neurophysiol*, 1998, **80**(3): 1094 - 1104.
- [6] Mayer ML, Westbrook GL. A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurons[J]. *J Physiol (Lond.)*, 1983, **340**: 19 - 45.
- [7] McCormick DA, Pape HC. Properties of a hyperpolarization-activated cation currents and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones[J]. *J Physiol (Lond.)*, 1990, **431**: 291 - 318.
- [8] Scroggs RS, Todorovic SM, Andeson EG, Fox AP. Variation in  $I_H$ ,  $I_{IR}$ ,  $I_{LEAK}$  between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size[J]. *J Neurophysiol*, 1994, **71**(1): 271 - 279.
- [9] Kamondi A, Reuner PB. Hyperpolarization-activated inward current in histaminergic tuberomammillary neurons of rat hypothalamus[J]. *J Neurophysiol*, 1991, **66**(6): 1902 - 1911.
- [10] Fredholm BB. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine[J]. *Pharmacol Toxicol*, 1995, **76**(2): 93 - 101.
- [11] Sawynok J, Reid A. Neurotoxin-induced lesions to central serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems mo-

- dify caffeine-induced antinociception in the formalin test and locomotor stimulation in rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, **277**(2):646–653.
- [12] Ghelardini G, Galeotti N, Bartolini A. Caffeine induces central cholinergic analgesia[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1997, **356**(5):590–595.
- [13] Dalle C, Schneider M, Clergue F, Bretton C, Jirounek P. Inhibition of the  $I_h$  current in isolated peripheral nerve: a novel mode of peripheral antinociception [J]? *Muscle Nerve*, 2001, **24**(2):254–261.
- [14] Chaplan SR, Guo HQ, Lee DH, Luo L, Liu CL, Kuei C, et al. Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain[J]. *J Neurosci*, 2003, **23**(4):1169–1178.
- [15] Villiere V, McLachlan EM. Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration[J]. *J Neurophysiol*, 1996, **76**(3):1924–1941.
- [16] Cardenas CG, Mar LP, Vysokanov AV, Arnold PB, Cardena LM, Scroggs RS, et al. Serotonergic modulation of hyperpolarization-activated current in acutely isolated rat dorsal root ganglion neurons[J]. *J Physiol*, 1999, **518**(Pt 2):507–523.
- [17] Pape HC. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons [J]. *Annu Rev Physiol*, 1996, **58**:299–327.

## Effect of caffeine on hyperpolarization-activated current in acutely isolated rat dorsal root ganglion neurons

HE Shui-Jin, RUAN Di-Yun, CHEN Ju-Tao

(School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

**Abstract:** **AIM** To understand mechanisms of caffeine in antinociception and as an adjuvant analgesic. **METHODS** The effect of caffeine on slowly activating inward currents ( $I_h$ ) in small-, medium-, large-diameter acutely isolated rat dorsal root ganglion neurons (DRG) was studied by using whole cell patch clamp technique. **RESULTS** Five mmol·L<sup>-1</sup> caffeine suppressed the  $I_h$  amplitude by  $(11.0 \pm 2.3)\%$ ,  $(40 \pm 3)\%$ ,  $(80 \pm 4)\%$ , respectively, in small-, medium- and large-diameter DRG neurons respectively, and decreased the sensitivity of  $I_h$ . **CONCLUSION** The suppression of caffeine on  $I_h$  of medi-

um- and large-diameter cells may be one of the mechanisms acting as an adjuvant analgesic.

**Key words:** caffeine; ganglia, spinal; slowly activating inward currents; patch clamp technique, whole-cell

**Foundation item:** The project supported by the National Nature Science Foundation of China(30170809, 30000039); and National 973 Project(2002CB512907); and Academia Sinica (KZCX 2-410); and Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education(20020358053); and University of Science and Technology of China(KB0833, KY1206)

(本文编辑 石 涛)