

文章编号 1004-924X(2008)09-1746-06

脉冲磁场对神经元瞬时外向钾电流的影响

林 凌¹, 贾方荣¹, 李 刚¹, 程立君¹, 乔晓艳²

(1. 天津大学 精密测试技术及仪器国家重点实验室, 天津 300072;

2. 山西大学 物理电子工程学院, 山西 太原 030006)

摘要: 实验研究了脉冲磁场对小鼠皮层细胞的瞬时外向钾离子通道的影响。采用频率为 15 Hz、强度为 1.4 mT 的超低频脉冲磁场对小鼠的脑皮层神经细胞进行刺激, 而后应用全细胞膜片钳技术测量其瞬时外向钾电流特性。实验发现, 超低频脉冲磁场对瞬时外向钾电流 I_A 有一定的抑制作用, 脉冲磁场作用可显著地影响通道的激活, 对照组和脉冲磁场作用组通道半数激活电压分别为 (13.25 ± 2.22) mV 和 (30.98 ± 4.11) mV ($n=6, P<0.05$), 斜率因子分别为 (24.00 ± 2.05) mV 和 (23.30 ± 2.13) mV ($n=6, P>0.05$)。结果表明, 脉冲磁场作用皮层神经细胞可以改变其瞬时外向钾通道的特性, 调节神经元的生理功能。

关键词: 瞬时外向钾电流; 膜片钳技术; 脉冲磁场; 生物效应; 神经元

中图分类号: Q42; R454.1 **文献标识码:** A

Effect of pulsating magnetic fields on neuron transient outward potassium channel

LIN Ling¹, JIA Fang-rong¹, LI Gang¹, CHENG Li-jun¹, QIAO Xiao-yan²

(1. *State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instruments, Tianjin University, Tianjin 300072, China;*

2. *College of Physics and Electronic Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*)

Abstract: The effect of pulsating magnetic fields on the transient outward K^+ channel of rat cortical neurons was researched. This experiment used pulsating magnetic fields with frequency of 15 Hz and intensity of 1.4 mT to impose on acutely the isolated rat cortical neurons, and studied the properties of transient outward K^+ channel using the whole-cell patch clamp technique. The experiment reveals that pulsating magnetic fields reduce the amplitude of I_A , and significantly affect the activation process of I_A . The half-activation voltage and the slope factor of the activation curve are changed by the pulsating magnetic fields' exposure from (13.25 ± 2.22) mV to (30.98 ± 4.11) mV ($n=6, P<0.05$) and from (24.00 ± 2.05) mV to (23.30 ± 2.13) mV ($n=6, P>0.05$), respectively. The results show that pulsating magnetic fields can change the properties of transient outward K^+ channel and can adjust the physiological functions of neurons by the pulsating magnetic fields.

Key words: transient outward potassium current; patch clamp technique; pulsating magnetic field; biological effect; neuron

收稿日期: 2008-01-10; 修订日期: 2008-03-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 60674111)

1 引 言

现代科学的发展已经表明,任何空间都存在着或低或高的磁场,这些生物磁场及其变化与生物的生命活动、生理状态密切相关。随着生物磁技术的发展,有关磁场作用与生物学效应的研究,取得了积极的成果,不仅丰富了磁场疗法的基础理论,而且推动了磁场疗法的发展与深入,各类磁疗在医学中的基础和临床应用研究越来越广泛。现代科技的发展使人们越来越多地暴露在各种各样的磁场中,磁场对人体正常机理的影响及其影响机理至今未明^[1]。有关低频脉冲磁场促进骨折愈合^[2]、改善血流变^[3]、预防静脉血栓、脊髓损伤及脑创伤^[4-6]甚至利用电磁场的生物学效应做肿瘤的辅助治疗^[8-9]等方面的研究都有报道。同时射频电磁场对人体造成多种伤害也屡见描述,如神经系统方面主要表现为神经衰弱,同时伴有植物神经功能失调的征候^[7],当然也涉及对内分泌功能的影响。微波可使精子数量减少,活动能力降低,甚至可发生暂时性不育。妇女在妊娠早期受微波照射可引起流产,分娩后可引起乳汁分泌量减少等等。

多年的研究表明,磁场对于细胞膜^[10]有着特殊的影响,磁场特别是磁场的脉冲作用,能够改变细胞膜两侧的离子分布,从而在某些创伤或是变性组织产生的炎症反映中表现出治疗效应。磁场对生物膜的效应主要表现在:磁场对于许多细胞内的酶系统有影响;磁场还影响抗原和抗体的关系;磁场可使细胞膜通透性发生改变,从而改变了膜两侧离子平衡。实际上,在许多病理状态下,都有细胞膜势能的改变,膜的结构组织上出现的变化导致了细胞膜极性的翻转等。现阶段磁场的生物效应没有明确的理论基础,很多关于此方面的研究都处于假设阶段,因此对于电磁作用生物组织治疗机理的研究还在逐步进行中^[11-13]。

本文主要针对脉冲磁场时小鼠皮层细胞的瞬时外向钾离子通道的影响进行研究。

2 材料与方 法

2.1 材 料

动物:昆明小鼠,鼠龄10~14 d,雌雄不限,天

津医科大学动物实验中心提供。

试剂:链霉菌蛋白酶(Pronase),Merck公司产品。河豚毒素(TTX)、氯化镉(CdCl_2)、氯化四乙胺(TEA-Cl)、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES)、己二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)、 Na_2ATP 均为Sigma公司产品。其余为国产分析纯。

(1)人工脑脊液(ACSF, mmol/L): NaCl 134, KCl 5, NaH_2PO_4 1.5, MgSO_4 2, CaCl_2 2, NaHCO_3 25, Glucose 10, HEPES 10, pH7.4;使用前通氧气饱和。

(2)K通道标准细胞外液(mmol/L): NaCl 130, KCl 5.4, CaCl_2 2, MgCl_2 1, Glucose 10, HEPES 10, pH7.3,使用前通氧气饱和。

(3)K通道电极内液(mmol/L): KCl 120, CaCl_2 1, HEPES 10, EGTA 10, Na_2ATP 3, MgCl_2 2, pH 7.2,经0.22 μm 滤膜过滤。

2.2 小鼠大脑皮层神经元急性分离

取出生10 d左右的昆明小鼠迅速断头取脑,置于4℃人工脑脊液中,1 min后将脑切成冠状切片,并继续切取皮层组织,厚度约为400 μm 左右,放入连续通95% O_2 +5% CO_2 混合气的人工脑脊液中,孵育50 min。之后加入Pronase,其浓度为0.36 g/L,32℃下消化15 min。消化结束后用人工脑脊液洗脑片3次,加入盛有人工脑脊液的离心管中,用4根口径渐小的Pasteur吸管轻轻吹打组织块,制成细胞悬液,静置5 min后取上部细胞悬液,放入带有盖玻片的培养皿内,约15~20 min后细胞贴壁。在显微镜下观察分离完整的皮层神经细胞,形态呈锥体或椭圆形,顶树突和轴突完整,细胞表面光滑,颗粒均匀细腻,可在6~8 h内保持良好的生理状态^[14-17]。

2.3 全细胞膜片钳记录和数据 分析

在25℃室温下,利用PC2C膜片钳放大器(华中科大)进行全细胞膜片钳记录,实验参数的设置、数据采集和刺激方式的施加均通过软件来控制,采样频率为100 kHz。记录用玻璃微电极经两步拉制而成,充灌电极内液后,电极阻抗为1.5~3 M Ω 。当电极与细胞膜之间形成高阻封接(>1 G Ω)后,将钳制电位调到-80 mV,进行快电容补偿后,稍加负压破膜,使电极液与细胞内液

相通,再进行慢电容和串联电阻补偿。

实验所用的刺激装置由实验室自行研制,先将小鼠的皮层神经细胞分离和贴壁,然后再将得到的活性状态较好的细胞放置于脉冲磁场当中,刺激后再进行膜片钳试验,最后将得到的数据和正常的进行对比研究,刺激过程如图 1 所示。

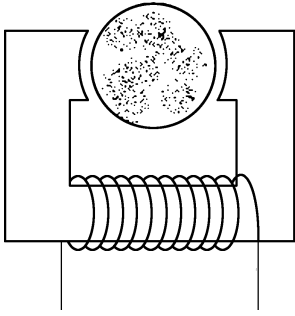


图 1 脉冲磁场刺激示意图

Fig. 1 Schematic diagram of irradiation of pulsating magnetic field

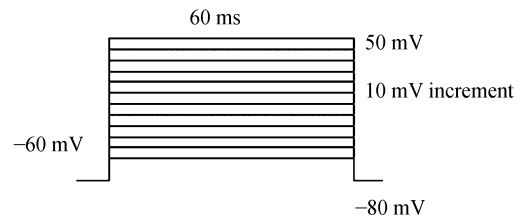
实验结果分析采用 Pclamp 软件和 Origin7.5 统计软件完成,分析结果用 Mean \pm SD 表示,脉冲磁场刺激前后差异的显著性用单因数方差分析和检验进行分析, $P<0.05$ 表示有统计学差异。

3 结果

3.1 瞬时外向钾通道电流(I_A)的记录

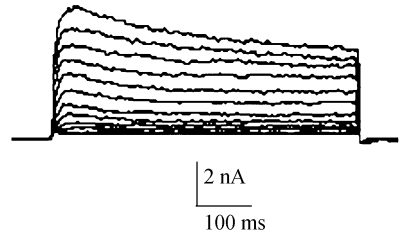
采用上述标准细胞外液和电极内液,在外液中加入 $1\ \mu\text{mol/L}$ 的 TTX、 $0.1\ \text{mmol/L}$ 的 CdCl_2 和 $20\ \text{mmol/L}$ 的 TEA-Cl。置细胞的钳制电位位于 $-80\ \text{mV}$,给予脉冲幅度为 $-60\sim+50\ \text{mV}$,脉冲宽度为 $60\ \text{ms}$,步幅为 $+10\ \text{mV}$,刺激频率为 $0.25\ \text{Hz}$ 的去极化脉冲刺激电压(如图 2(a))。在此条件下对皮层神经细胞膜上瞬时外向钾电充进行记录,得到快速激活和失活的瞬时外向钾电流。图 2(b)和图 2(c)即为曝磁前后的瞬时外向钾电流。

考察正常皮层神经细胞 I_A 电流随时间变化的特点。给予图 2(a)所示的去极化脉冲刺激,分别在破膜后的 $1\sim6\ \text{min}$ 记录不同时间的 I_A ,可知 I_A 在 $4\ \text{min}$ 时基本达到稳定。本试验分别采用加刺激与并未加刺激的细胞第 $4\ \text{min}$ 的 I_A 电流进行比较。



(a)刺激脉冲

(a)Depolarizing steps



(b)记录的 I_A

(b)Transient outward I_A



(c)曝磁后的 I_A

(c)Transient outward I_A after magnetic field exposure

图 2 瞬时外向电流 I_A 的记录

Fig. 2 Transient outward potassium current traces

3.2 脉冲磁场刺激对 I_A 时间依赖性的影响

给予与 3.1 相同的去极化脉冲刺激,分别对磁场照射 $25\ \text{min}$ 和 $45\ \text{min}$ 的 I_A 进行记录,已知 I_A 在 $4\ \text{min}$ 时基本达到稳定,数据记录应从该时刻开始进行。为给予不同阶梯去极化脉冲刺激,做出经磁场作用 $25\ \text{min}$ 和 $45\ \text{min}$ 后的 I_A 电流密度的 $I-V$ 曲线。由实验结果可知:细胞经过曝磁后, I_A 受到明显的抑制,对照组的最大电流密度为 $(213.80\pm 41.65)\ \text{pA/pF}$ ($n=9, P<0.05$), $25\ \text{min}$ 照射组最大电流密度为 $(70.24\pm 21.92)\ \text{pA/pF}$ ($n=6, P<0.05$), $45\ \text{min}$ 曝磁组的最大电流密度为 $(49.28\pm 10.91)\ \text{pA/pF}$ ($n=6, P<0.05$)。

3.3 脉冲磁场对瞬时外向钾电流曲线的影响

给予同 3.1 中相同的刺激方式,将未加刺激和加磁场刺激后得到的瞬时外向钾电流数据加以比较,其结果如图 3 所示。

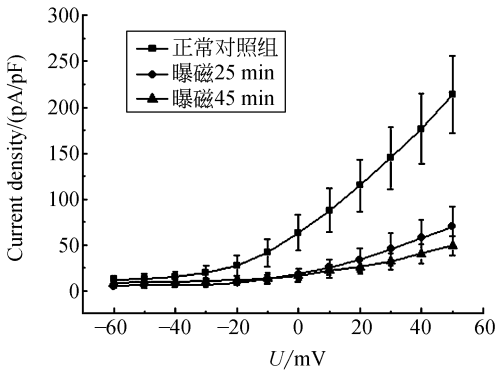


图 3 I_A 随时间变化的 $I-V$ 曲线

Fig. 3 Effect of magnetic field irradiation on I_A in different irradiation time

以膜电位(去极化刺激电位)为横轴,该膜电位下激活的 I_A 电流密度值(电流/膜电容)为纵轴,绘制通道电流的曲线,如图 4 所示。对照组和曝磁组的最大激活电流密度分别为 213.80 ± 41.65 pA/pF 和 67.46 ± 22.34 pA/pF。由 $I-V$ 曲线可知,脉冲磁场可以抑制 I_A 。并且经检验,对照组和脉冲磁场刺激组 I_A 在统计学上具有显著性差异($n=10, P < 0.05$)。

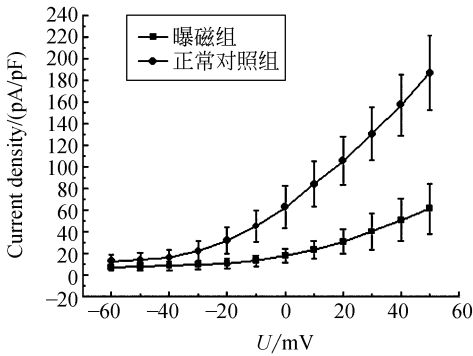


图 4 对照组、曝磁组 I_A 的 $I-V$ 曲线

Fig. 4 I_A of control irradiation and magnetic field irradiation

3.4 脉冲磁场对 I_A 稳态激活特性的影响

给予同 3.1 中相同的刺激方式,以第 4 min 纪录的瞬时外向钾电流作为对照。利用公式 $G = I / (V - V_{rev})$ 将电流值转换成电导值,其中 G 为电导、 V 为测试膜电位、 V_{rev} 为翻转电位、 I 为不同膜电位下测定的电流峰值。以电导值与最大电导值的比值 G/G_{max} 对应膜电位,分别绘制脉冲磁场作用前后 I_A 的稳态激活曲线,如图 4 所示。所得曲

线可以用 Boltzmann 方程 $G/G_{max} = 1 / \{1 + \exp[V - V_{1/2}] / k\}$ 拟合,其中 $V_{1/2}$ 为半数激活电压, k 为曲线的斜率因子。由图 5 可以看出对照组与脉冲磁场组激活曲线均呈 S 型,并由此计算出对照组和曝磁组瞬时外向钾通道的半数激活电压 $V_{1/2}$ 分别为 (13.25 ± 2.22) mV 和 (30.98 ± 4.11) mV ($n=6, P < 0.05$),斜率因子分别为 (24.00 ± 2.05) mV 和 (23.30 ± 2.13) mV ($n=6, P > 0.05$)。由此可知,脉冲磁场作用可明显改变 I_A 的激活特性,使激活曲线向右移动,且不改变其斜率因子。

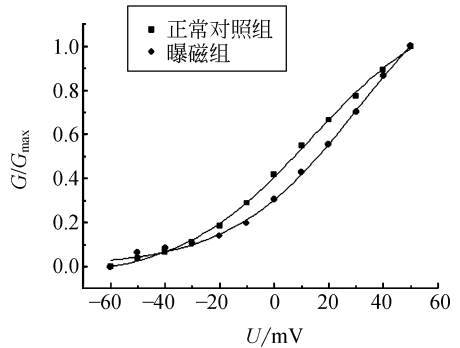


图 5 对照组、脉冲磁场照射组 I_A 的激活曲线

Fig. 5 Activation curves of I_A of control irradiation and pulsating magnetic field irradiation

4 结 论

实验结果表明,频率为 15 Hz,强度为 1.4 mT, 占空比位 50% 的脉冲磁场的作用,会使小鼠皮层神经细胞膜瞬时外向钾通道电流 I_A 受到一定的抑制。结果还表明,脉冲磁场的作用可使 I_A 的激活曲线显著地右移,但不显著改变曲线的斜率因子。据文献[15],神经细胞膜瞬时外向钾离子通道 I_A 的激活过程受到抑制,会使得电压依赖性钾通道的开放延迟,抑制 I_A 的激活过程而调节神经细胞的静息电位和兴奋性,延缓神经细胞的去极化过程,加速动作电位的产生。因此可知脉冲磁场作用皮层神经细胞可以改变其瞬时外向钾通道特性,调节神经元的生理功能。

低频脉冲磁场对有机体的作用是一个非线性、瞬态的过程,主要集中在生物膜上。在中枢神经系统中,由于对获取的信号存在放大机制,即便采用低频低能脉冲磁场,在毫秒的瞬间使膜电

位发生毫伏量级的细微改变,也可使神经细胞膜电位发生意义深远的变化。神经元的快速信号获取是典型敏感的膜离子通道的关闭或开往,控制膜内外的钠、钾、钙等离子转运。无论是膜两侧离

子浓度比值的变化还是电荷穿越质膜迁移所携带的信息,都会改变细胞自身的生理和生化状态,但其具体影响的机理则需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] MIYAKOSHI J. Biological responses to extremely low-frequency electromagnetic fields[J]. *Journal of Dermatological Science Supplement*, 2006,2(1):23-30.
- [2] 徐巧玲,路丽华,罗二平,等. 低强度脉冲电磁场对大鼠骨密度及骨形态计量学的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2004,25(21):2004-2006.
XU Q L,LU L H,LUO E P, *et al.*. Effects of low intensity PEMFs on bone mineral density and histomorphometry in SD rats[J]. *J. Fourth Mil. Med. Univ.*, 2004,25(21):2004-2006. (in Chinese)
- [3] 罗二平,张峰,张建保,等. 低强度脉冲电磁场暴露对小鼠血液流变学指标的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21(8):932-934.
LUO E P,ZHANG F,ZHANG J B, *et al.*. Effects of low intensity PEMFs on mouse hemorheology[J]. *J. Fourth Mil. Med. Univ.*, 2000,21(8): 932-934. (in Chinese)
- [4] 蒋马莉,韩太真. 电磁场对脑发育的影响[J]. *中国儿童保健杂志*, 2003,11(2):114-116.
JIANG M L,HAN T ZH. Effects of electromagnetic fields on the growth of brain[J]. *Chinese Journal of Infants Health Care*, 2003,11(2):114-116. (in Chinese)
- [5] 邢莹,李怡,王小平,等. 极低频点磁场对中脑神经干细胞体外诱导分化的影响[J]. *中国临床康复*, 2004,8(13): 2458-2459.
XING X,LI Y,WANG X P, *et al.*. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on the induction and differentiation in vitco of midbrain neural stem cells[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2004,8(13): 2458-2459. (in Chinese)
- [6] BRILLAUD E,PIOTROWSKI A,SEIE R D, *et al.*. Effect of an acute 900 MHz GSM exposure on glia in the rat brain: a time-dependent study[J]. *Toxicology*, 2007,238(1):23-33.
- [7] MERAL I, MERT H, MERT N,*et al.*. Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs[J]. *Brain Research*, 2007,1169:120-124.
- [8] SELVAM R, SELVAM R, NARAVANA K V S, *et al.*. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity[J]. *Life Sciences*, 2007,80(26):2403-2410.
- [9] 赵仑,赵德明,魏金河,等. 15 Hz 磁场刺激对大鼠局灶性脑创伤影响的实验研究[J]. *航天医学与医学工程*, 2003, 16(1):75-76.
ZHAO L,ZHAO D M,WEI J H, *et al.*. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on focal brain injury in rats[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2003,16(1):75-76. (in Chinese)
- [10] 王江,张骅,邓斌. 交变电场作用下细胞膜离子通道电流的趋肤效应[J]. *天津大学学报*, 2004,37(9):792-796.
WANG J,ZHANG H,DENG B. Skin effect of currents in trans-membrane ion channels exposes to electric field [J]. *Journal of Tianjin University*, 2004,37(9):792-796. (in Chinese)
- [11] LEI Y, LIU T, WILSON F A W, *et al.*. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on morphine-induced conditioned place preferences in rats[J]. *Neuroscience Letters*, 2005,390(2):72-75.
- [12] 邱纪方. 超低频磁场的生物效应和临床应用[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2002,24(4):439-441.
QIU J F. Biological effect & clinical application of extremely low-frequency electromagnetic fields[J]. *Chin H Phys. Med. Rehabil*, 2002,24(4):439-441. (in Chinese)
- [13] 王毅,牛金龙,沈强,等. 强脉冲磁场作用于大鼠脑部镇痛效果的初步研究[J]. *生物医学工程杂志*, 2001,18(4): 552-553.

- WANG Y, NIU J L, SHEN Q, *et al.*. Analgesic effect induced by stimulation of rats brain with strong pulsed magnetic field: a preliminary study[J]. *J. Biomed Eng.*, 2001, 18(4):552-553. (in Chinese)
- [14] HASHIMOTO Y, KAWASUMI M, SAITO M, *et al.*. Effect of static magnetic field on cell migration[J]. *Electrical Engineering in Japan*, 2007, 160(2):46-52.
- [15] 乔晓艳, 李刚, 林凌, 等. 弱激光对神经元钾离子通道特性影响的实验研究[J]. *物理学报*, 2007, 56(4):2448-2454.
- QIAO X Y, LI G, LIN L, *et al.*. Research on characteristics of neuron potassium channel under low laser irradiation[J]. *Acta Physica Sinica*, 2007, 56(4):2448-2454. (in Chinese)
- [16] 乔晓艳, 李刚, 贺秉军. 弱激光对大鼠海马神经元钠通道特性的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(2):178-182.
- QIAO X Y, LI G, HE B J. Effects of low level laser irradiation on properties of sodium channel in rat hippocampal neurons[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 33(2):178-182. (in Chinese)
- [17] 乔晓艳, 李刚, 贺秉军, 等. 弱激光对神经元瞬时外向钾通道电流特性的影响[J]. *光学精密工程*, 2007, 15(3):337-343.
- QIAO X Y, LI G, HE B J, *et al.*. Effects of low power laser irradiation on characteristics of transient outward potassium current of neurons[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2007, 15(3):337-343. (in Chinese)
- [18] 乔晓艳, 李刚, 贺秉军, 等. 弱激光对神经细胞膜延迟整流钾通道电流特性的影响[J]. *中国激光*, 2006, 33(9):1289-1293.
- QIAO X Y, LI G, HE B J, *et al.*. Effects of low power laser irradiation on delayed rectifier potassium current in neuron membrane [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2006, 33(9):1289-1293. (in Chinese)
- [19] MANIKONDA P K, RAJENDRA P, DEVENDRANATH D, *et al.*. Influence of extremely low frequency magnetic fields on Ca^{2+} signaling and NMDA receptor functions in rat hippocampus[J]. *Neuroscience Letters*, 2007, 413(2):145-149.

作者简介:林 凌(1961—), 福建人, 博士, 副教授, 主要研究方向为精密测试技术与机械、生物医学信号检测与处理、生物医学工程等。E-mail: linling@tju.edu.cn

贾方荣(1981—), 女, 河北人, 学士, 博士研究生, 主要研究方向为生物医学信号检测与处理、生物医学工程等。

李 刚(1959—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 中国电子学会嵌入式系统专家委员会成员, 主要研究方向为生物医学信号检测与处理、生物医学工程等。

程立君(1981—), 女, 河北人, 学士, 博士研究生, 主要研究方向为生物医学信号检测与处理、生物医学工程等。