

大鼠背根神经节神经元上失活 BK 通道特性的研究*

李伟¹⁾ 万有²⁾ 韩济生²⁾ 丁久平¹⁾ 徐涛^{1)**}

(¹⁾华中科技大学生命科学与技术学院生物物理与生物化学研究所, 武汉 430074;

(²⁾北京大学医学部神经科学研究所, 北京 100083)

摘要 大电导的电压和 Ca^{2+} 激活的 K^{+} 通道 (BK 通道) 在哺乳动物的组织中广泛表达, 起着多种多样的作用. 目前只有少数组织中 BK 通道的性质被深入地研究, 而且鲜见有失活的 BK 通道 (BK_i) 的报道, 尤其是在神经元中. 现在大鼠小直径的背根神经节 (DRG) 神经元中, 普遍存在失活的 BK 通道. 失活的 BK 电流成分是 Ca^{2+} 敏感的, 可以被大电导的 BK 通道特异阻断剂 ChTX 所阻断, 而且木瓜蛋白酶可以从胞外改变通道失活的特性.

关键词 背根神经节, BK 通道, 失活

学科分类号 Q424

大电导的电压和钙激活的钾通道 (BK 通道) 在膜去极化或胞内 Ca^{2+} 升高时通道的活性增加, 抑制了由于胞内 Ca^{2+} 浓度升高和 / 或膜去极化所引起的兴奋性事件. 在轴突末梢, BK 通道和电压依赖的 Ca^{2+} 通道耦联, 因此, 在调节神经递质释放方面起着重要作用. 尽管 BK 通道在各种组织和细胞中广泛存在^[1-8], 但是却很少展现失活的性质, 尤其是在神经元中.

背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 从外周组织传递躯体和内脏的感觉信息到脊髓^[9], 中小直径的 DRG 神经元胞体和轴突主要传递疼痛和温度信息, 而大直径的神经元主要传递机械性刺激的信息. 先前 DRG 神经元上 BK 通道的研究主要是关于 BK 通道对动作电位的影响, 激活 BK 通道使 DRG 神经元动作电位的时程 (action potential duration, APD) 缩短, 动作电位的爆发频率 (firing frequency) 降低^[10-12].

我们发现在大鼠小直径 DRG (L4-L6) 神经元中, 失活的 BK 电流普遍存在, 表现快速和完全的失活特性. 失活的 BK 电流成分确是 Ca^{2+} 敏感的, 大电导的 BK 通道特异阻断剂 ChTX 能够阻断失活的 BK 电流成分. 木瓜蛋白酶可以从胞外改变 BK 通道这种失活的特性.

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM 和胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司, 其余试剂均购自 Sigma 公司. 纯化的木瓜蛋白酶

(papain, twice crystallized; Sigma, cat no. P3125) 使用浓度为 16 U/ml, 用正常外液稀释, 加入 5 mmol/L L-cysteine 激活. 在外液中加入 10 mmol/L 4-aminopyridine (4-AP) 以阻断电压依赖的 K^{+} 通道 (K_v)^[13]. Charybdotoxin (ChTX, Sigma, cat no. C 7802) 配制成 50 $\mu\text{mol/L}$ 的储液, 加入 0.5% (质量体积比) 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 防止非特异性的结合, 使用前用正常外液稀释至 100 nmol/L.

1.2 DRG 单细胞的分离

取 3~5 周的雄性 Wistar 大鼠, 迅速断头处死, 从脊椎外将两侧 L4, L5 和 L6 神经节连同附着的神经一同取出, 置于预先冰孵的 DMEM 外液中, 在解剖镜下用虹膜剪仔细剪净神经节附着的背根和腹根神经后, 将神经节剪碎. 将神经节转移到 37°C 预孵的酶液中 [1 ml Collagense (2 g/L), 50 μl Dnase (4 g/L), 1 ml Trypsin (0.5 g/L)], 水浴摇床 (37°C, 170 r/min) 中消化约 35 min, 间或轻轻吹打, 使细胞分散. 加入 8 ml 37°C 含胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化. 1 000 r/min 离心 6 min, 去上清, 加入 400 μl DMEM 培养基轻轻吹打均匀分散. 滴片, 每片约 20 μl , 37°C 静置沉降 20 min. 每皿加入 2 ml

* 国家自然科学基金资助项目 (30025023, 30270363, 30130230, 30470448), 国家重点基础研究资助项目 (G1666054000, 2004CB720000), 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-SW-224) 和李氏基金和中德科学中心.

** 通讯联系人.

Tel: 027-87792024, E-mail: txu@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2005-02-04, 接受日期: 2005-03-13

含血清 DMEM 培养基, 于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养 2 h 后待用。

1.3 电生理实验

全细胞记录使用 EPC 9 膜片钳放大器 (HEKA, Lambrecht, 德国), PULSE+PULSEFIT 8.67 软件 (HEKA Electronics, 德国)。全细胞记录增益为 0.5~2 mV/pA, 膜电位钳制在 -60 mV, 电极入水电阻 2~4 MΩ, 90%~95% R_s 补偿。灌流及加药采用 MPS-1 多通道快速微量加药系统 (华中科技大学仪器博生命科学仪器有限公司)。

膜片钳实验在室温下 (20~25℃) 进行, 全细胞记录电极内液的成分为: KCl 150 mmol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 0.2 mmol/L, MgATP 2 mmol/L, Na₂GTP 0.3 mmol/L, 用 KOH 调 pH 值到 7.4。细胞外液的成分为: NaCl 150 mmol/L, KCl 5 mmol/L, CaCl₂ 2 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, 用 NaOH 调 pH 值到 7.4。0 Ca²⁺ 外液用 2 mmol/L MgCl₂ 替换正常外液中的 CaCl₂, 并加入 1 mmol/L 的 EGTA。渗透压使用 Wescor 蒸汽压力渗透压仪测量, 内液的渗透压调至 290~300 mOsm, 外液的渗透压调至 305~315 mOsm。

1.4 数据分析

数据分析使用 Igor Pro 4.09 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) 软件。实验结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结 果

2.1 小鼠小 DRG 神经元上普遍存在着失活的 BK 通道

全细胞模式下, 在 DRG 神经元上给予标准的检测 BK 电流刺激^[14], 即先给予双刺激 (从 -60 mV 钳制电位给予 100 ms 0 mV 的去极化电压刺激) 使 Ca²⁺ 通过电压门控的 Ca²⁺ 通道内流, 接着给予 400 ms 去极化到 80 mV 的电压刺激, 激活电压和 Ca²⁺ 依赖的 K⁺ 电流 (K_{Ca}) 和电压依赖的 K⁺ 电流 (K_V), 如图 1 中实线所示的电流和刺激波。然后从 -60 mV 钳制电位直接去极化到 80 mV, 这时由于没有 Ca²⁺ 内流 K_{Ca} 通道几乎不开放, 去极化激活的仅是电压依赖的 K⁺ 电流 (K_V)。两者相减得到的电流即纯的 K_{Ca} 电流 (图 1 的右图)。所有细胞上电流的检测电压均为 80 mV, 并且给予 90%~95% 的 R_s 补偿。我们发现小的 DRG 神经元中 (细胞直径 =

(26.2±5.5) μm; n=82), 96.3% (79/82) 的神经元上存在典型的快速且完全失活的 K_{Ca} 电流 (图 1a 的右图), 单指数拟合得到失活时间常数为 $\tau = 80$ ms。仅有 3.7% (3/82) 的神经元上表现为很小的不失活外向电流 (图 1b 的右图)。

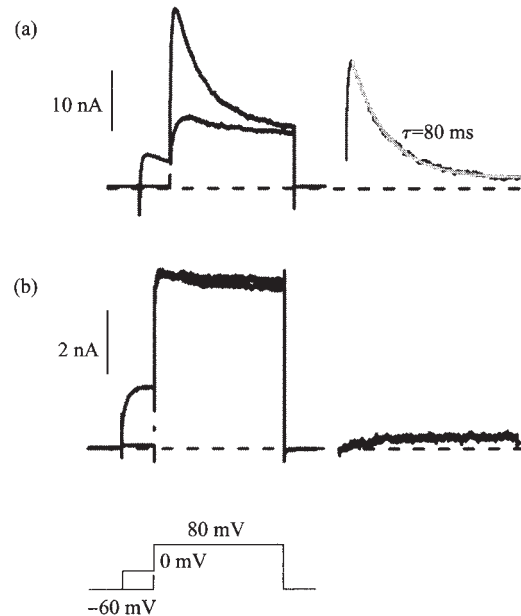


Fig.1 Inactivating and noninactivating Ca²⁺-dependent K⁺ currents in DRG neurons

Whole-cell current trace recorded with the pipette containing 150 K⁺ were shown. The cell was stepped from a holding potential of -60 mV to either -60 mV or 0 mV for 100 ms and then to 80 mV for 400 ms. The voltage protocol was shown at the bottom. In all the whole-cell cases without specific explanation, cells were bathed in the normal saline. The current trace at 80 mV by 0 mV prepulse is supposed to contain both Ca²⁺-dependent K⁺ and K_V currents and the trace by -60 mV prepulse is only composed of K_V current. Therefore, a difference between the two traces gives a net Ca²⁺-dependent K⁺ current shown on the right. (a) the difference between the two traces shown on the left gave a pure inactivating K_{Ca} current, a single-exponential fitted to the inactivating K_{Ca} current gave the time constant of inactivation $\tau = 80$ ms. (b) the difference between the two traces shown on the left gave a pure noninactivating small outward current.

结果表明, 小 DRG 神经元上普遍存在着失活的 Ca²⁺ 激活的 K⁺ 通道 (K_{Ca} 通道)。然而之前, DRG 神经元上 BK 通道的研究却没有关于失活电流的报道^[10-12]。

2.2 失活的 Ca²⁺ 激活的 K⁺ 电流的成分确是 Ca²⁺ 敏感的

用 0 Ca²⁺ 外液置换正常外液后, 失活的电流成分完全阻断 (n=19)。再给予正常外液, 失活的电流又随即恢复 (图 2a)。两者的相差的部分即为完全 Ca²⁺ 敏感的电流成分 (BK 电流) (图 2 b), 表明 DRG

神经元上的 BK 电流的确是 Ca^{2+} 依赖性的.

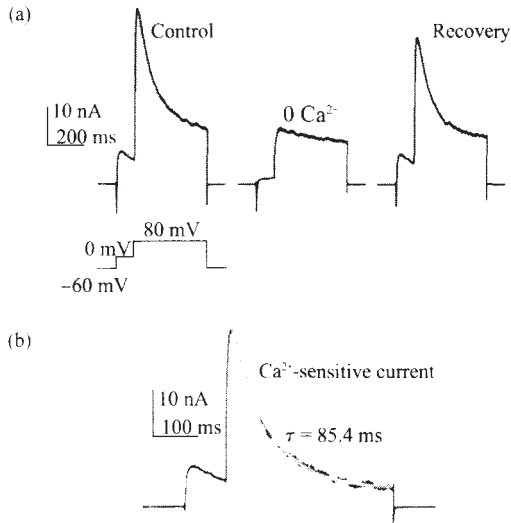


Fig.2 The Ca^{2+} -dependent component of whole-cell current

(a) Application of calcium-free external solution reversibly eliminated the inactivating Ca^{2+} -dependent K^+ current at 80 mV. The voltage protocol was indicated at the bottom. (b) The Ca^{2+} -sensitive K^+ current was obtained by subtracting the current recorded in calcium-free external solution. The best single-exponential fitted to the inactivating current gave a slow time constant of inactivation $\tau = 85.4 \text{ ms}$.

2.3 失活的 Ca^{2+} 激活的 K^+ 电流成分可以被 BK 通道特异的阻断剂 ChTX 所阻断

毒素 Charybdotoxin (ChTX) 能够在纳摩尔 (nmol/L) 的浓度下特异地阻断大电导的 BK 通道, 在脊椎动物和哺乳动物的研究中通常被用来鉴定 BK 通道的生理作用^[15]. 由于它能够特异地阻断大电导的 BK 通道, 所以用来鉴别 Ca^{2+} 激活的 K^+ 电流成分是否是 BK 电流. 在外液中加入 100 nmol/L 的 ChTX 后, 失活的 Ca^{2+} 激活的 K^+ 电流成分被阻断 (18/18), 这说明 DRG 细胞上这种失活的 Ca^{2+} 激活的 K^+ 电流成分确是大电导的 BK 电流. 正常外液洗脱约 15 min 后电流可以缓慢地不完全地恢复 (最多恢复至 80% 左右)(图 3), 这一点同 Ding 等^[3,16]在 chromaffin 细胞上关于失活的 BK 电流对 ChTX 敏感性的研究结论是一致的.

2.4 木瓜蛋白酶可从胞外改变通道的失活特性

我们的结果表明, 小的 DRG 神经元上普遍存在着失活的 BK 通道, 然而之前的 DRG 神经元上 BK 通道的研究却没有显示它的失活特征^[10-12]. Armstrong 等^[17]报道在青蛙毛细胞上, 一种在原代细胞分离中普遍使用的酶——木瓜蛋白酶(papain),

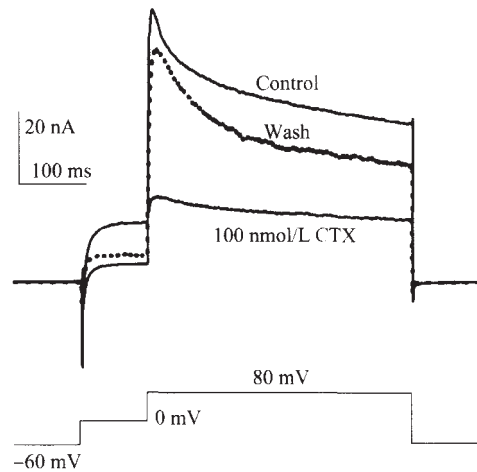


Fig.3 The Ca^{2+} -dependent K^+ currents identified as BK channels by BK channel blocker ChTX

Ca^{2+} -dependent K^+ currents activated by a voltage step to 100 mV before, during and after the application of 100 nmol/L ChTX were shown. Outward current trace were clearly reduced by a BK channel blocker ChTX, which means that Ca^{2+} -dependent K^+ currents were BK currents. The voltage protocol was shown below traces. Obviously, recovery of BK channels from blocking was incomplete.

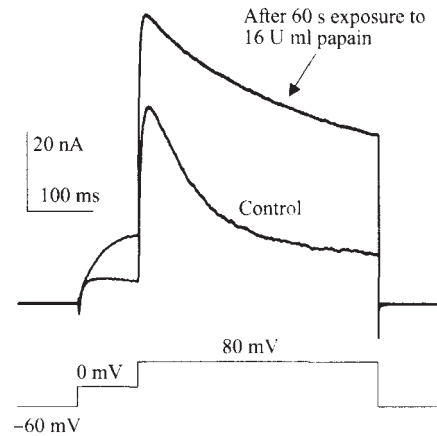


Fig.4 Extercellular application of 16 U/ml papain removed the inactivation of BK current

Whole-cell current from a DRG neuron bathed in the normal saline with 10 mmol/L 4-AP were shown before and after bath application of 16 U/ml of twice crystallized papain for 1 min. The voltage protocol was the same with Figure 1 and shown at the bottom. The inactivation of BK current was clearly removed by papain.

会使 BK 通道失去失活的性质. 我们猜测有可能在分离单细胞的过程中我们采取了更为温和的酶消化和机械分离相结合的方式, 避免 BK 通道蛋白受酶消化作用的影响, 保护了通道的失活特性. 因此, 我们在正常外液中加入 16 U/ml 二次结晶的纯

papain (避免粗制酶里其他组分可能的干扰) 和 10 mmol/L 的 4-AP (阻断电压依赖 K_v 通道)^[13,17], 发现加入 papain 一段时间后 (60 s), 原先快速失活的 BK 电流 (失活时间常数 $\tau = 88.9$ ms) 由于失活特征的改变, 变成一个大的缓慢失活的外向电流 (6/6, 失活时间常数 $\tau = 246.5$ ms)(图 4). 这说明 papain 的确从细胞膜外作用于通道蛋白, 使之失去失活的特性.

3 讨 论

大电导的电压和 Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道(BK 通道)在哺乳动物的组织中普遍存在, 特别是存在于可兴奋性细胞如胰岛 β 细胞、肾上腺嗜铬细胞、脑垂体细胞、心肌细胞、海马神经细胞、平滑肌细胞和耳毛细胞中^[1-8]. 在许多生理过程中, 如神经递质释放、动脉平滑肌的收缩、耳毛细胞的频率调谐, BK 通道都起到连通胞内自由钙离子信息和膜(动作)电位之间的桥梁作用^[18]. 由于原代细胞中 BK 通道电性质的复杂性和不确定性, 只有少数组织中的 BK 通道的性质被深入地研究. 原代细胞中失活的 BK 通道的报道比较少见, 尤其是在神经元中, 只有少数神经元上存在少量失活的 BK 电流. 肾上腺嗜铬细胞中失活的 BK 通道显示了快速的失活和慢的去激活动力学. 由于 BK 通道更慢地去激活, 超极化后电位被延长, 这有助于解除 Na^+ 通道的失活, 使得可以反复触发动作电位, 因此这种细胞是重复放电 (tonically firing) 细胞^[14]. 但是 BK 通道的失活在原代细胞尤其是可兴奋细胞中更多的生理意义还不清楚, 有待于原代细胞中更多更深入的研究. 激活 BK 通道能够使 DRG 神经元动作电位的时程 (action potential duration, APD) 缩短, 动作电位的爆发频率 (firing frequency) 降低^[10-12]. 由于它对动作电位的影响和对流入细胞内的 Ca^{2+} 负反馈的调节作用, 影响了神经细胞的递质分泌. 但是这种失活的生理意义还有待于进一步的研究. 我们在大鼠 DRG 神经元上的工作表明, 失活的 BK 通道普遍地存在于小直径的 DRG (L4~L6) 神经元中. 由于坐骨神经 DRG 神经元通常位于腰椎 L3~L6 背根神经节, 并且 98%~99% 的坐骨神经感觉纤维的胞体位于 L4 和 L5 背根神经节中^[19], 失活的 BK 通道在这一组织中的广泛存在, 提示 BK 通道很可能参与外周神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 中伤害性感受信息的传递.

先前 DRG 神经元中 BK 通道的研究没有关于

失活电流的报道^[10-12], 而我们发现失活的 BK 电流却普遍存在于小直径的 DRG 神经元中. 一种通常用来分离原代细胞的酶, 木瓜蛋白酶 (papain) 可以从细胞外作用于 DRG 神经元上的 BK 通道, 改变 BK 电流快速的失活性质. 之前用 papain 分离的青蛙毛细胞上 BK 通道都不失活, 而 Armstrong 等^[17, 20]用非酶法 (semi-intact epithelial preparation) 得到的毛细胞上却有失活的 BK 电流, 说明在细胞分离的过程中酶的消化会损伤通道蛋白. 在木瓜蛋白酶对 BK 通道失活特性影响的实验中, 我们在外液中加入 10 mmol/L 4-AP, 目的是阻断 DRG 神经元上电压依赖的 K^+ 通道(K_v), 避免木瓜蛋白酶对 DRG 神经元上可能存在失活的 K_v 通道的影响, 只观察它对失活的 BK 通道的作用. 4-aminopyridine(4-AP)是一种阻断剂, 它能够有效地阻断电压依赖的 K^+ 通道(K_v)(包括失活的和不失活的 K_v 通道), 而不影响电压和 Ca^{2+} 同时依赖的 K^+ 通道(BK 通道)^[13]. Armstrong 和 Roberts^[17]报道了 10 mmol/L 4-AP 存在的情况下(阻断 K_v 通道), 木瓜蛋白酶能够作用于非哺乳动物毛细胞的 BK 通道(对 10 mmol/L 4-AP 不敏感), 使之失活的特性发生改变. 我们的实验验证了 DRG 神经元上, BK 通道的失活特性能被胞外的木瓜蛋白酶所改变. 目的在于说明单细胞分离的过程中, 酶的消化作用可能会导致通道失活特性的改变, 这可能是之前 DRG 神经元上没有关于失活的 BK 电流报导的原因. 4-AP 在这里是作为一种工具药, 排除 K_v 通道的干扰, 只观察木瓜蛋白酶对失活的 BK 通道的作用. 我们已经验证了高浓度的 4-AP (大于 5 mmol/L), 主要阻断 DRG 神经元上的 K_v 通道, 它对 BK 通道影响很小. 加入 10 mmol/L 4-AP 后, 失活的 BK 通道仍然存在 (图 4, control), 而且可以被木瓜蛋白酶改变其失活特性. 由于 4-AP 的作用已经在 Armstrong 和 Roberts^[17], Goodman 和 Art 等^[13]的文章中阐明, 因而我们没有在文中重复这一结果.

木瓜蛋白酶的作用机制和位点目前还不明确. BK 通道的失活是由它的 β 亚基结合到 α 亚基所形成的通道上造成的, 因而木瓜蛋白酶可能是从胞外与 BK 通道 β 亚基胞外的 Loop 环相互作用, 破坏(解除)BK 通道 β 亚基与 α 亚基的相互作用从而使通道失去失活的性质. 也可能通过孔道进入胞内, 切去胞内 β 亚基的 N 端, 使通道不再失活. 这可能是造成原代细胞上关于失活的 BK 通道报道较少的原因. 采用较温和的消化方法, 也许可以在其他类

型的细胞上发现更多失活的 BK 通道, 更好地研究失活的 BK 通道在原代细胞中的生理意义, 尤其是在神经元中的作用.

参 考 文 献

- Brenner R, Perez G J, Bonev A D, *et al.* Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, 2000, **407** (6806): 870~876
- Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, *et al.* Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol*, 1989, **51**: 385~399
- Li Z W, Ding J P, Kalyanaraman V, *et al.* RINm5f cells express inactivating BK channels whereas HIT cells express noninactivating BK channels. *J Neurophysiol*, 1999, **81** (2): 611~624
- Ramanathan K, Fuchs P A. Modeling hair cell tuning by expression gradients of potassium channel beta subunits. *Biophys J*, 2002, **82** (1 Pt 1): 64~75
- Xia X M, Ding J P, Zeng X H, *et al.* Rectification and rapid activation at low Ca^{2+} of Ca^{2+} -activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *J Neurosci*, 2000, **20** (13): 4890~4903
- Xia X M, Ding J P, Lingle C J. Molecular basis for the inactivation of Ca^{2+} - and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J Neurosci*, 1999, **19** (13): 5255~5264
- McManus O B, Magleby K L. Accounting for the Ca^{2+} -dependent kinetics of single large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat skeletal muscle. *J Physiol*, 1991, **443**: 739~777
- Solaro C R, Lingle C J. Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science*, 1992, **257** (5077): 1694~1698
- Devor M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain*, 1999, (Suppl 6): S27~S35
- Naruse K, McGehee D S, Oxford G S. Differential responses of Ca-activated K channels to bradykinin in sensory neurons and F-11 cells. *Am J Physiol*, 1992, **262** (2 Pt 1): C453~C460
- Zhang X F, Gopalakrishnan M, Shieh C C. Modulation of action potential firing by iberitoxin and NS1619 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 2003, **122** (4): 1003~1011
- Gruss M, Henrich M, Konig P, *et al.* Ethanol reduces excitability in a subgroup of primary sensory neurons by activation of BK_{Ca} channels. *Eur J Neurosci*, 2001, **14** (8): 1246~1256
- Goodman M B, Art J J. Variations in the ensemble of potassium currents underlying resonance in turtle hair cells. *J Physiol*, 1996, **497** (Pt 2): 395~412
- Solaro C R, Prakriya M, Ding J P, *et al.* Inactivating and noninactivating Ca^{2+} - and voltage-dependent K^{+} current in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*, 1995, **15** (9): 6110~6123
- Meera P, Wallner M, Toro L. A neuronal beta subunit (KCNC4) makes the large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channel resistant to charybdotoxin and iberitoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (10): 5562~5567
- Ding J P, Li Z W, Lingle C J. Inactivating BK channels in rat chromaffin cells may arise from heteromultimeric assembly of distinct inactivation-competent and noninactivating subunits. *Biophys J*, 1998, **74** (1): 268~289
- Armstrong C E, Roberts W M. Rapidly inactivating and non-inactivating calcium-activated potassium currents in frog saccular hair cells. *J Physiol*, 2001, **536** (Pt 1): 49~65
- Orio P, Rojas P, Ferreira G, *et al.* New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci*, 2002, **17**: 156~161
- Swett J E, Torigoe Y, Elie V R, *et al.* Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol*, 1991, **114** (1): 82~103
- Armstrong C E, Roberts W M. Electrical properties of frog saccular hair cells: distortion by enzymatic dissociation. *J Neurosci*, 1998, **18** (8): 2962~2973

Inactivating Calcium-activated Potassium Currents in Rat Dorsal Root Ganglia Neurons*

LI Wei¹⁾, WAN You²⁾, HAN Ji-Sheng²⁾, DING Jiu-Ping¹⁾, XU Tao^{1)**}

⁽¹⁾Institute of Biochemistry and Biophysics, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

⁽²⁾Institute of Neuroscience, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract Large conductance voltage and Ca^{2+} -activated K^{+} channels (BK channels), which are ubiquitously expressed among mammalian tissues, play a variety of physiological roles. The inactivating BK channels have not been extensively studied in primary tissues and rarely do they exhibit inactivation. An inactivating BK current (BK_{i}) was identified in rat small dorsal root ganglia (DRG) neurons. The inactivating currents are sensitive to the specific BK channel blocker charybdotoxin (ChTX) and the effect of ChTX can be removed partially when washed with normal external solution. The inactivation of BK_{i} can be removed by external treatment of papain.

Key words dorsal root ganglia (DRG), BK channel, inactivation

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30025023, 30270363, 30130230, 30470448), The National Basic Research Program of China (G1666054000, 2004CB720000), The Chinese Academy of Sciences Project (KSCX2-SW-224), The Li Foundation and the Sinogerman Scientific Center.

**Corresponding author. Tel: 86-27-87792024, E-mail: txu@mail.hust.edu.cn

Received: February 4, 2005 Accepted: March 13, 2005