

Jurkat 细胞 Kv1.3 钾通道的基本电生理学特性及动力学特征

代中华 谭晓秋 闫 莉 程秀丽 祝 红 郝 维 曹济民

摘 要 **目的** 采用膜片钳技术记录 Jurkat 细胞膜的 Kv1.3 通道电流,分析通道的动力学特征,并体会成功记录的要领。**方法** 选择 T 淋巴细胞性白血病 Jurkat E6-1 细胞系为研究对象,采用全细胞膜片钳记录方式记录 Kv1.3 电流,选择合适的刺激方案,分析通道的激活、失活和复活动力学特性。**结果** Jurkat 细胞的 Kv1.3 电流具有电压门控特性,并能被 ShK (100pmol/L) 选择性阻断。Kv1.3 通道的激活时间常数 (τ_{act})、失活时间常数 (τ_{in}) 和复活时间常数 (τ_{rec}) 分别为 $\tau_{act} = 6.47 \pm 2.44\text{ms}$, $\tau_{in} = 622.49 \pm 93.90\text{ms}$, $\tau_{rec} = 6.141\text{s}$ 。在胞内钙没有被螯合的条件下, Kv1.3 通道电流常掺杂有中等电导钙激活钾通道 KCa3.1 电流。玻璃微电极的口径和电极内液是否含 EGTA 是能否记录到纯净 Kv1.3 电流的关键。**结论** Jurkat 细胞表达功能性 Kv1.3 通道,该通道呈现快速激活、缓慢失活和缓慢复活的动力学特征。记录 Kv1.3 通道须注意剔除 KCa3.1 电流的掺杂。该工作对研究 T 淋巴细胞 Kv1.3 通道的功能具有一定的借鉴意义。

关键词 Jurkat 细胞 电压门控钾通道 激活 失活

Electrophysiological Characteristics and Kinetics of Kv1.3 Channels in the Jurkat Cell. Dai Zhonghua, Tan Xiaochu, Yan Li, Cheng Xiuli, Zhu Hong, Hao Wei, Cao Jimin. Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract Objective Using the patch clamp technique, this study aimed to record the Kv1.3 current in Jurkat cells, analyze the channel kinetics and experience the essentials for successful recordings. **Methods** Kv1.3 currents were recorded by the whole-cell configuration in the T lymphocyte leukemia cell line Jurkat E6-1. With suitable stimulus scheme, being selected the kinetics of activation, inactivation and recovery of the Kv1.3 channel were also analyzed. **Results** The Kv1.3 channel in Jurkat cells exhibited voltage-gated characteristics and could be blocked by ShK (100pmol/L). The time constants for activation (τ_{act}), inactivation (τ_{in}) and recovery (τ_{rec}) were $6.47 \pm 2.44\text{ms}$, $622.49 \pm 93.90\text{ms}$ and 6.141s , respectively. In the absence of intracellular Ca^{2+} chelation, the Kv1.3 current was always mixed with KCa3.1 currents. The size of microelectrode caliber and EGTA in the pipette solution were two key points for a successful recording of pure Kv1.3 current. **Conclusion** Jurkat cells express functional Kv1.3 channels. This channel shows kinetics characterized with rapid activation, slow inactivation and slow recovery. Removing the KCa3.1 mixing is essential for the recording of pure Kv1.3 current. This study may provide experiences in the further study of Kv1.3 channel in T lymphocytes.

Key words Jurkat cell; Voltage-gated potassium channel; Activation; Inactivation

Kv1.3 通道属于电压门控钾离子通道 Shaker 家族成员之一,其主要功能是参与细胞膜的复极化过程,在可兴奋细胞中维持细胞的兴奋性,同时也参与了非可兴奋细胞的生理功能调节,例如调节 T 淋巴细胞增殖和凋亡^[1,2]。Kv1.3 通道在 T 淋巴细胞以及 T 淋巴细胞性白血病细胞系(例如 Jurkat 细胞)上也广泛分布。淋巴细胞的离子通道活动与其免疫功能的

关系近年来受到了免疫学界的关注^[3,4]。由于淋巴细胞悬浮生长且体积较小,记录其通道电流有相当的技术难度,这给淋巴细胞电生理学带来了一定困难,从而影响了这一领域的进展。本工作通过技术改进,以 Jurkat 细胞为模型,通过调整细胞电极内液成分和选择使用特异性的通道阻断剂来改进电流记录方法,从而得到纯净、稳定的 Kv1.3 通道电流,并且对其基本特性和动力学进行了初步研究。

材料与方法

1. 细胞株和试剂: Jurkat E6-1 细胞系购自北京协和医学院基础学院细胞中心。Kv1.3 通道的特异性阻断剂 stichodactyla 向日葵神经毒素 (stichodactyla helianthus neurotoxi, ShK)

基金项目: 国家“973”计划基金资助项目 (2011CB933500)

作者单位: 100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学和病理生理学系

通讯作者: 曹济民, 电子信箱: caojimin@126.com

购自 Bechem 公司, TRAM-34(1-[2-chlorophenyl]dephe-nylmethyl]-1H-pyrazole) 购自 Sigma 公司。其他试剂均为国产分析纯。

2. 细胞处理: 选择生长状态和细胞膜折光性良好的 Jurkat E6-1 细胞, 用 0.05% 胰蛋白酶处理 3min, 加入胎牛血清 (FBS) 终止消化, 1000r/min 离心 5min。弃上清液, 加入浴液吹散细胞。取适量的细胞至浴槽中, 等待 5~10min 细胞沉降至浴槽底, 进行下一步实验。

3. 全细胞记录: 毛细玻璃管购自 Sutter Instrument 公司。采用微管电极拉制仪 (P-97, Sutter Instrument) 进行玻璃微电极拉制, 电极在灌充电极液后入液电阻为 5~7MΩ。电流信号经膜片钳放大器 (EPC-10, 德国 HEKA 公司) 放大, 2kHz 低通滤波, 经 12 位 A/D-D/A 转换器转换后在专用软件系统 Patchmaster 记录并储存于计算机硬盘内。采样频率为 10kHz, 适当补偿串阻后的输入阻抗 ≤10MΩ。全细胞记录采用负压破膜方式进行。浴液组成: NaCl 150mmol/L, KCl 5mmol/L, CaCl₂ 2.5mmol/L, MgCl₂ 1mmol/L, 葡萄糖 10mmol/L, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 10mmol/L, pH 7.4。电极液成分: 天冬氨酸钾 (aspartic acid potassium) 130mmol/L, MgCl₂ 5mmol/L, HEPES 10mmol/L, pH 7.2。另配制 100mmol/L 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸 (EGTA) 备用。

4. 统计学方法: 数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 膜片钳数据分析采用 Clampfit 10.1 软件进行分析, 图像处理采用 OriginPro 8.0 软件, 数据统计采用 SPSS 10.0 进行, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Kv1.3 通道的电流记录: 本实验采用全细胞记录模式, 保持钳制电位于 -80mV, 接近 Jurkat 细胞的静息电位。结果显示, 当电极内液为上述成分 (不含 EGTA) 时, 记录到的电流具有明显的电压依赖性, 电流幅度随着去极化电压的增加而增大 (图 1A)。通道被激活后电流在短时间内达到最大值后会持续开放, 且开放时间较长, 无明显失活 (图 1A)。该电流是一个混合电流, 可能有钙激活钾通道电流的掺入。为了获得较为纯净的 Kv1.3 电流, 笔者向电极内液中加入 EGTA (5mmol/L) 已去除电流的钙离子依赖成分, 采用同样的方式记录全细胞电流。得到的钾电流同样具有电压依赖性, 但电流在达到最大值后会形成一个峰电流, 呈现较慢的失活, 并且通道开放时间也较长 (图 1B, 对照)。在浴液中加入 Kv1.3 特异性阻断剂 ShK (100pmol/L) 后, 电流被抑制, 证明记录到的电流为 Kv1.3 通道电流 (图 1B, ShK)。

为进一步鉴定复合电流中掺杂电流的成分, 在浴液中加入 Kv1.3 通道特异性抑制剂 ShK (100pmol/L) 并采用不含 EGTA 的电极内液, 记录到的电流如

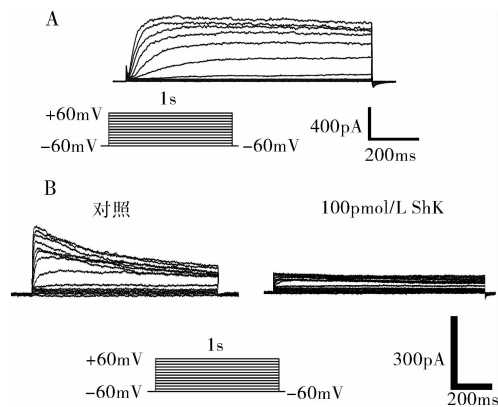


图 1 用全细胞模式记录的 Jurkat 细胞 Kv1.3 通道电流 A. 采用不含 EGTA 的电极内液时的钾电流 (含 Kv1.3 电流); B. 采用含有 5mmol/L EGTA 电极内液 (对照) 以及采用 Kv1.3 通道特异性抑制剂 ShK 的电流记录结果

图 2A 所示。再向浴液中加入中等电导钙激活钾通道 KCa1.3 的特异性阻断剂芳基甲烷-34 (triaryl-methane-34, TRAM-34) (20nmol/L) 后电流被抑制 (图 2B), 表明所掺杂的电流为 KCa1.3。

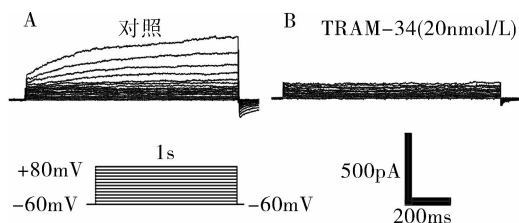


图 2 Jurkat 细胞 Kv1.3 电流的鉴别

A. 不加入 TRAM-34 时记录的混合电流 (含 Kv1.3 和 KCa1.3 电流); B. 加入 TRAM-34 去除 KCa1.3 后的电流, 认为是较为纯净的 Kv1.3 电流

2. Jurkat 细胞 Kv1.3 通道的动力学特性分析: 为进一步了解 Kv1.3 通道的动力学特性, 分别绘制了 Kv1.3 通道的失活曲线和恢复 (复活) 曲线。制作失活曲线时, 将膜电位钳制在 -80mV 持续 12.5s, 再给予一个 -70~+60mV 的步阶电压刺激, 持续 5s, 然后给予 +40mV 的测试电压, 以记录通道的失活情况, 最后再将膜电位钳制在 -80mV 持续 12.5s。制作复活曲线时, 将膜电位钳制在 -80mV 持续 5s 后, 给予 +40mV 的刺激电压持续 5s, 然后将膜电位钳制在 -80mV 持续不同的时间 | 持续时间 t 随着步阶 n 而逐渐延长, $t_1 = 20\text{ms}$, $t_2 = 40\text{ms}$, $t_n = [20 + 20 \times 1.5^{(n-2)}]\text{ms}$, $3 \leq n \leq 20$, 再给予 +40mV 的测试电压持续 1s 记录通道恢复情况, 最后将膜电位钳制在 80mV 持续至 100ms (图 3)。

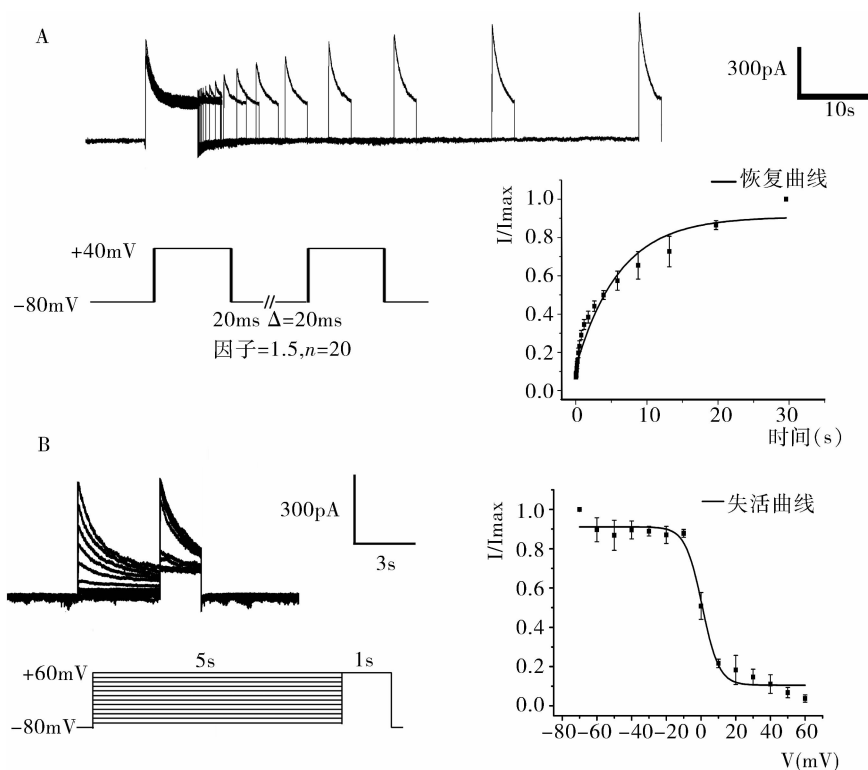


图3 Jurkat 细胞 Kv1.3 通道的动力学特性

A. Kv1.3 通道电流恢复电流图和恢复曲线通道电流复活情况及复活曲线,其中复活时间常数 $\tau_{rec} = 6.141s$ ($n = 3$); B. Kv1.3 通道电流失活情况和失活曲线,其中失活时间常数 $\tau_{in} = 4.85mV$ ($n = 3$), τ_{act} 和 τ_{in} 分别为通道激活达到电流峰值 63.2% 和通道失活电流降低至电流峰值 37.8% 所需要的时间, τ_{rec} 为通道完全失活并重新激活后电流峰值恢复至通道完全开放时电流值峰的 63.2% 时所需要的时间

为进一步了解 Kv1.3 通道特性,同时计算了 τ_{act} 和 τ_{in} , 其中 $\tau_{in} = 622.49 \pm 93.90ms$, $\tau_{act} = 6.47 \pm 2.44ms$ 。结果表明, Jurkat 细胞的 Kv1.3 通道具有快速激活(毫秒级)、缓慢失活(数百毫秒级)和缓慢复活(秒级, $\tau_{rec} = 6.14s$)的动力学特征。

讨 论

钾离子通道在维持 T 淋巴细胞的生理功能方面发挥着重要的作用,而 Kv1.3 通道为 T 淋巴细胞上主要的钾通道,它参与了细胞膜复极化、胞内钙信号的调节、T 淋巴细胞活化和细胞凋亡等一系列重要的生理过程^[5]。Kv1.3 通道激活阈值为 $-60mV$, 在 $-10 \sim 0mV$ 时达到稳态,单通道电导为 $10 \sim 12pS$ ^[6]。已有文献报道, Kv1.3 通道已经成为治疗自身免疫性疾病(如多发性硬化、银屑病、1 型糖尿病等)的靶点。此外, Kv1.3 在 T 淋巴细胞免疫突触形成以及维持其钙离子浓度的稳定方面发挥着重要的作用^[7]。因此,记录到稳定、纯净的电流是研究淋巴细胞电生理学特性的前提和基础。此外, Jurkat 细胞是 T 淋巴细胞性白血病细胞系,其离子通道的变化目前所知甚

少,本工作的目的之一是初步观察 Jurkat 细胞 Kv1.3 通道的功能特征。

鉴于 Jurkat 细胞体积较小,开展全细胞记录有技术困难的原因,笔者在试验中将玻璃微电极的尖端拉得较细。若电极尖端口径过大(电极入液电阻在 $4M\Omega$ 左右),会在负压吸引时对细胞造成较大的机械性损伤,甚至使细胞变形、死亡,或将细胞吸入到玻璃微电极中。若电极尖端口径较小(电极入液电阻在 $12M\Omega$ 以上),在电极贴附细胞后进行负压吸引,虽然很容易形成高阻抗封接,但之后进一步给予负压进行破膜却比较困难,即使破膜以后也容易自行封闭从而使串阻过大影响记录结果。经过多次尝试,我们发现玻璃微电极在注满电极内液后入液电阻在 $5 \sim 7M\Omega$ 时为最佳的尖端口径,其兼顾了高阻抗封接以及封接后的负压破膜两方面的成功率。

电极内液成分对通道电流的记录结果具有显著的影响。电极内液中 EGTA 的有无直接关系到 Kv1.3 电流的记录结果。因为虽然电极内液的成分配方中不含 Ca^{2+} , 但配方中其他的盐成分中含有微

量的 Ca^{2+} , 并且若盛装去离子水的容器选择不当(如选用软质玻璃容器), 容器壁中的离子也会渗入到去离子水中, 其中也包括 Ca^{2+} , 以上两种情况使电极内液中掺杂的 Ca^{2+} 浓度足以激活细胞中的其他通道(如钙激活钾通道)从而使记录结果为复合电流, 不能记录到纯净的 Kv1.3 电流。经反复验证, 复合电流中的掺杂电流具有钙依赖性并能够被 KCa3.1 特异性阻断剂 TRAM-34 阻断, 因此可认定为掺杂电流主要为 KCa3.1 电流。为了剔除 KCa3.1, 需在电极内液中加入 EGTA(5mmol/L)来螯合 Ca^{2+} , 从而真正达到电极内液无钙状态, 才能记录到单一的 Kv1.3 电流, 同时结果也经过了特异性阻断剂 ShK 的验证。

经通道动力学分析得知, Kv1.3 通道表现出快速激活($\tau_{\text{act}} = 6.47 \pm 2.44\text{ms}$)、缓慢失活($\tau_{\text{in}} = 622.49 \pm 93.90\text{ms}$)和缓慢复活($\tau_{\text{rec}} = 6.141\text{s}$)的特性, 这也为实验中刺激方案的设计提供了依据。值得注意的是, 与其他通道相比, Kv1.3 通道复活时间较长, 完全复活需要 25s, 如此长的恢复时间可能与通道功能相关且少见有文献报道。

本文仅描述了 Jurkat 细胞 Kv1.3 通道电流的记录心得和动力学特征, 并不代表正常 T 淋巴细胞

Kv1.3 通道的情况, 读者在借鉴本文时应注意。

参考文献

- 1 Qiu M, Campbell T, Breit S. A potassium ion channel is involved in cytokine production[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 130(1):67-74
 - 2 Ohya S, Niwa S, Yanagi A, et al. Involvement of dominant-negative spliced variants of the intermediate conductance Ca^{2+} -activated K⁺ channel, K(Ca)3.1, in immune function of lymphoid cells[J]. Biol Chem, 2011, 286(19):16940-16952
 - 3 Fabian B, Peter G, Barbara R, et al. Biomedical nanoparticles modulate specific CD4⁺ T cell stimulation by inhibition of antigen processing in dendritic cells[J]. Nanotoxicology, 2011, 5(4):606-621
 - 4 George CK, Heike W, Christine B, et al. K⁺ channels as targets for specific immunomodulation[J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(5):280-289
 - 5 Lina H, Michael P, Qiong J, et al. Characterization of the functional properties of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 in human CD4⁺ T lymphocytes[J]. Immunol, 2010, 179(7):4563-4570
 - 6 李桂阳, 王焱. 动脉粥样硬化、T 淋巴细胞、Kv1.3 通道三者相关性的研究进展[J]. 使用心脑血管病杂志, 2010, 5(18):680-682
 - 7 Stella A, Lisa N, Ashleigh S, et al. Localization of Kv1.3 channels in the immunological synapse modulates the calcium response to antigen stimulation in T lymphocytes[J]. Immunol, 2009, 183(10):6296-6302
- (收稿:2012-04-08)
(修回:2012-04-20)

不同治疗方案治疗丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒合并感染患者对血细胞影响的比较

孙洪清 黄 琴 沈 芳 邬 敏 周晓明 蔡卫平 胡芸文

摘 要 **目的** 探讨以蛋白酶抑制剂(Pis)或非核苷类反转录酶抑制剂(NNRTIs)为主治疗方案治疗丙型肝炎病毒(HCV)/人类免疫缺陷病毒(HIV)合并感染的患者, 比较其对血细胞的影响。**方法** 采用随机、开放、对照方法收集初次就诊的 273 例 HCV/HIV 合并感染患者为研究对象。分别用 Pis(Pis 组)或 NNRTIs(NNRTIs 组)为主的方案治疗。比较治疗前、后血红蛋白(Hb)、白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)等指标。**结果** 治疗后 Pis 组和 NNRTIs 组 Hb、WBC、PLT、RBC 均有不同程度的上升, 但是 NNRTIs 组比 Pis 组上升明显, Hb 分别为 $137.0 \pm 24.5\text{g/L}$ 和 $133.0 \pm 14.7\text{g/L}$, WBC 分别为 $(5.810 \pm 1.981) \times 10^9/\text{L}$ 和 $(4.440 \pm 1.244) \times 10^9/\text{L}$, PLT 分别为 $(206.0 \pm 66.7) \times 10^9/\text{L}$ 和 $(135.0 \pm 42.4) \times 10^9/\text{L}$, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** Pis 或 NNRTIs 为主治疗 HCV/HIV 合并感染的患者对血细胞没有影响。

关键词 Pis NNRTIs HCV/HIV 合并感染 血细胞

Comparison of the Different Therapeutic Impact on Blood Corpuscle in Hepatitis C Virus and Human Immunodeficiency Virus Co-infected Patients. Sun Hongqing, Huang Qin, Shen Fang, Wu Min, Zhou Xiaoming, Cai Weiping, Hu Yunwen. Shanghai Public Health Clinical

基金项目:国家科技重大专项基金资助项目(2008ZX10001-008);卫生部艾滋病防治研究基金资助项目(WA-2007-05)

作者单位:200083 上海市公共卫生临床中心感染科(孙洪清、黄琴);上海市公共卫生临床中心检验科(沈芳、邬敏、胡芸文);复旦大学上海医学院流行病学教研室(周晓明);广州市第八人民医院感染科(蔡卫平)

通讯作者:胡芸文,电子邮箱:ywhu19720117@sina.com