

谷氨酸对人交感神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系超极化激活的阳离子通道的影响

郝 维 于晓霞 谷婧丽 曹济民

摘 要 目的 观察谷氨酸(Glu)对交感神经细胞超极化激活的阳离子通道(I_h 通道)活动的影响。方法 采用人交感神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系作为交感神经细胞模型,用全细胞电压箝方式记录 I_h 通道电流。结果 SH-SY5Y 细胞存在 I_h 通道电流;Glu(1mmol/L)可抑制 SH-SY5Y 细胞 I_h 电流的 K^+ 电流成分,但增强 I_h 电流的 Ca^{2+} 电流和 Na^+ 电流成分,综合效应是使 I_h 电流增大。结论 Glu 可增大 SH-SY5Y 细胞的 I_h 电流。这一效应提示,Glu 可能通过诱发交感神经元去极化并促进其传出冲动增加。

关键词 谷氨酸 超极化激活的阳离子通道 SH-SY5Y 细胞系 交感神经

中图分类号 R739.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.007

Effect of Glutamate on the Hyperpolarization-activated Cation Channels in the Human Sympathetic Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line.

Hao Wei, Yu Xiaoxia, Gu Jingli, et al. Department of Physiology, Institute of Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract Objective To investigate the effect of glutamate on the hyperpolarization-activated cation channels (I_h channel) in sympathetic neurons. **Methods** Using the human sympathetic neuroblastoma cell line SH-SY5Y as a model of sympathetic neurons, we recorded the I_h channel currents with the whole-cell voltage clamp technique. **Results** There were I_h currents in the SH-SY5Y cells. Glu (1mmol/L) suppressed the K^+ component of I_h currents, but enhanced the Ca^{2+} and Na^+ components of I_h currents, and as a whole, increased the I_h currents. **Conclusion** Glu increases the I_h currents of SH-SY5Y cells. This result suggests that Glu may induce depolarization and efferent impulses of sympathetic neurons.

Key words Glutamate; Hyperpolarization-activated cation channels; SH-SY5Y cell line; Sympathetic nerve

超极化激活的阳离子通道(hyperpolarization-activated cation channels, I_h channels),因其受环核苷酸门控,又名超极化激活-环核苷酸门控的阳离子通道(hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels, HCN channels)^[1,2]。在早期的心肌细胞电压箝实验时,研究者发现了一种很有趣(funny)但不明性质的通道电流,当时被命名为 I_f ^[3]。在神经细胞上发现的 I_h 曾被命名为 I_q (q 即 queer,意为“奇怪的”)^[4]。 I_h 是一种起搏电流(pacemaker current),该电流增大会导致细胞膜电位去极化,达到阈电位时即触发动作电位,从而引发细胞的兴奋或自律性兴奋冲动。 I_h 通道的载荷离子为 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} ,可被 Cs^+ 和 ZD7288 阻断。 I_h 通道广泛表达于中枢神经、

外周神经(包括交感神经)以及心肌细胞,在调节上述细胞的膜电位及电生理活动(特别是起搏活动)方面起重要作用。已知 I_h 通道在中枢神经系统中可调节神经元静息膜电位水平和神经元对超极化电流的反应以及产生起搏活动来控制神经元节律震荡的速率,并与癫痫的发生有关^[5]。在自律心肌细胞中, I_h 通道电流主要产生舒张期自动去极化,决定心率的快慢^[3]。因此研究 I_h 通道的活动特征以及影响因素对于深入认识神经元和自律心肌细胞的起搏活动规律及其影响因素,以及认识相关疾病的发生机制有重要意义。

谷氨酸(glutamate, Glu)是一种重要的中枢神经递质,也有研究提示谷氨酸可能是一种交感神经伴随递质^[6]。谷氨酸同时也是血循环中存在的一种营养性氨基酸,在许多细胞内也含有丰富的谷氨酸。在神经或心肌病理情况下,由于神经末梢释放大量谷氨酸,或细胞损伤后兴奋性氨基酸转运体的反向转运激活,致使“谷氨酸泄漏”(glutamate leakage),会使组织间隙或突触间隙聚集大量的谷氨酸,因而产生谷氨酸

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81300139,31171088)

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系

通讯作者:曹济民,电子信箱:caojimin@126.com

的神经毒和细胞毒作用,与神经组织病理改变和心律失常有密切关系^[7,8]。但有关谷氨酸对细胞 I_h 通道作用的研究报道较少。本研究利用人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 作为交感神经细胞模型,观察谷氨酸对 I_h 通道的影响,进一步了解谷氨酸在细胞电生理活动中的作用。

材料与方法

1. 细胞和试剂:人交感神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系由中国医学科学院基础医学研究所生物化学和分子生物学系惠赠。细胞培养试剂来源:胎牛血清(Gibco 公司, USA); Hepes、RPMI-1640(改良)培养基、青霉素、链霉素、胰蛋白酶、PBS 等均购买于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。其他耗材购于 Corning 公司(USA)。

2. 细胞培养:采用 RPMI-1640(改良)培养基常规培养 SH-SY5Y 细胞,在细胞处于对数生长期时用于实验。

3. 全细胞式电压钳实验所用溶液:(1)细胞外液(细胞浴液):①用于记录钾电流的细胞浴液:天冬钾 137mmol/L, Hepes 10mmol/L, 葡萄糖 10mmol/L。溶液中不含 Na^+ 、 Ca^{2+} 等阳离子;②用于记录钙电流的细胞浴液:TEA-Cl 137mmol/L, CsCl 5.4mmol/L, Hepes 10mmol/L, 葡萄糖 10mmol/L, CaCl_2 20mmol/L。溶液中不含 Na^+ 、 K^+ 等阳离子;③用于记录钠电流的细胞浴液:NaCl 140mmol/L, Hepes 10mmol/L, 葡萄糖 10mmol/L。溶液中不含 Ca^{2+} 、 K^+ 等阳离子。细胞外液的酸碱度均为 pH 7.4。(2)电极内液:天冬氨酸钾 130mmol/L, MgCl_2 5mmol/L, EGTA 5mmol/L, HEPES 10mmol/L, pH 7.2。

4. 全细胞式电压钳:利用 EPC-7 型膜片钳放大器(德国 HEKA 公司)记录 SH-SY5Y 细胞的 I_h 电流。由于 I_h 通道可通透 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 3 种阳离子,因此先用箝制方式 A 记录 I_h 电流(Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 混合离子流)。箝制方式 A 的具体操作:将膜电位箝制在 -30mV,从 0mV 开始给予一系列步幅 10mV、时程为 300ms 的超极化方波脉冲,可记录到 I_h ,该电流并可被 1mmol/L 的 CsCl 抑制。然后利用 B 和 C 种不同箝制方式分别观察在各自适合的细胞外液环境下 Glu 对 SH-SY5Y 细胞 I_h 电流的 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 电流成分的影响。箝制方式 B:先将膜电位箝制在 0mV(holding potential,即箝制电位),然后膜

电位向超极化方向跃迁到 -80mV,之后给予一系列步幅为 10mV、时程为 300ms 的去极化方波脉冲。每一步结束后再回到箝制电位,观察电流的变化,并绘制电压-电流关系曲线。箝制方式 C:先将膜电位箝制在 -90mV,然后膜电位向去极化方向跃迁到 -40mV 并持续 50ms,之后给予一系列步幅为 10mV、时程为 300ms 的去极化方波脉冲。每一步结束后再回到箝制电位,观察电流的变化,分别用膜电容矫正电流密度,并绘制电压-电流关系曲线。

5. 统计学方法:所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,两组间比较采用分组 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. I_h 电流的特征:在箝制方式 A 的条件下, I_h 电流以内向电流为主,电流的大小可被 CsCl 明显抑制(图 1)。

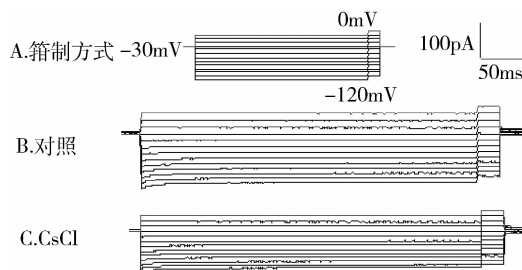


图 1 电压箝技术记录 SH-SY5Y 细胞的 I_h 电流原始记录图

可见 I_h 电流在采用的膜电位箝制范围内,以内向电流为主,并且该电流可被 CsCl 抑制,符合 I_h 电流的特征

2. Glu 对 SH-SY5Y 细胞 I_h 电流的 K^+ 电流成分的影响:在箝制方式 B 条件下,当 K^+ 为细胞外液的仅有阳离子时,1mmol/L 的 Glu 对 SH-SY5Y 细胞 K^+ 载荷的阳离子电流有抑制作用(图 2)。在箝制方式 C 条件下,1mmol/L 的 Glu 对 SH-SY5Y 细胞 K^+ 载荷的阳离子电流的影响与在 B 型箝制方式下的结果相似(结果图未显示)。

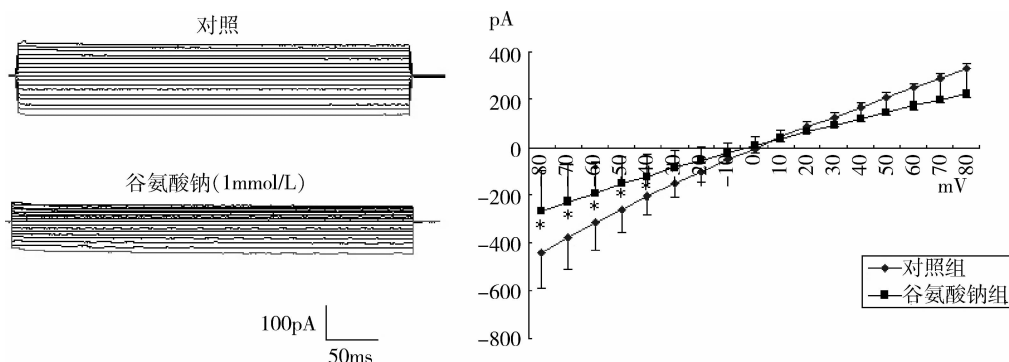


图 2 电压箝技术记录 SH-SY5Y 细胞的 K^+ 载荷的阳离子电流

左侧为代表性的电流原始记录图,右侧为电压-电流曲线($n=8$)。该电流可被 Glu(1mmol/L)抑制

3. Glu 对 SH-SY5Y 细胞 I_h 电流的 Ca^{2+} 电流成分的影响:在箴制方式 B 条件下,1mmol/L 的 Glu 使 Ca^{2+} 载荷的阳离子电流幅值明显增大(图 3)。在箴

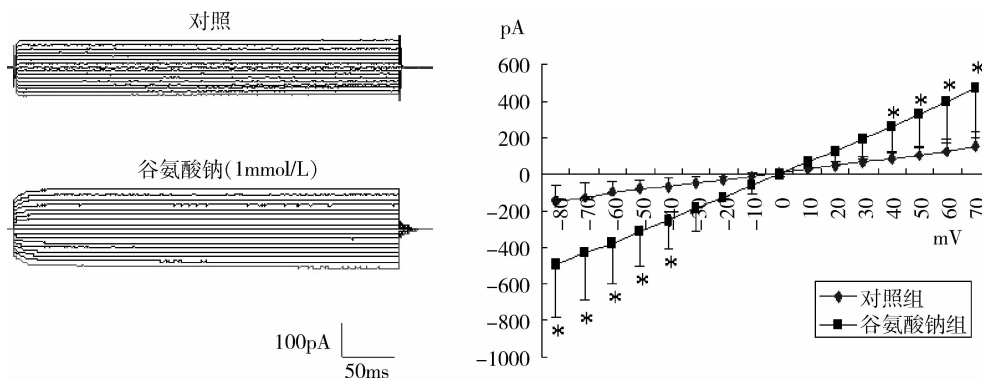


图 3 电压箴技术记录 SH-SY5Y 细胞的 Ca^{2+} 载荷的阳离子电流

左侧为代表性的电流原始记录图,右侧为电压-电流曲线($n=8$)。该电流可被 Glu(1mmol/L)增大

4. Glu 对 SH-SY5Y 细胞 I_h 电流的 Na^+ 电流成分的影响:在箴制方式 B 条件下(Na^+ 为细胞外液中仅有的阳离子),1mmol/L 的 Glu 使 Na^+ 载荷的阳

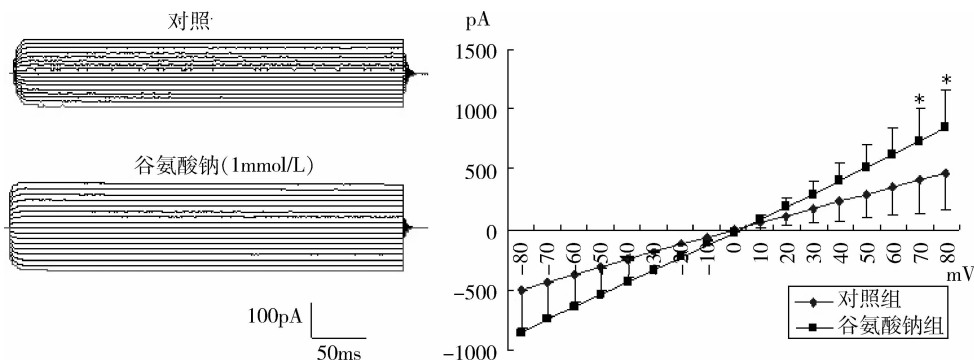


图 4 电压箴技术记录 SH-SY5Y 细胞的 Na^+ 载荷的阳离子电流

左侧为代表性的电流原始记录图,右侧为电压-电流曲线($n=8$)。该电流可被 Glu(1mmol/L)增大

讨 论

SH-SY5Y 细胞是由 SK-N-SH 细胞系重复亚克隆得到的,其特性类似于交感神经元,所以该细胞系常作为交感神经元模型用于研究离子通道^[9]。SH-SY5Y 细胞表达促离子型谷氨酸受体和 I_h 通道,利用该特点可以间接了解交感神经元由 I_h 通道控制的自发或诱发电活动及其影响因素。本工作重点通过观察了 SH-SY5Y 细胞的 I_h 电流对谷氨酸的响应,这一研究有助于了解谷氨酸对交感神经元自发活动的调节或影响。

由于 I_h 通道可通透 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} ,并且由这些阳离子载荷的离子电流各自存在不同的膜电位依赖性和胞外离子浓度依赖性,因此笔者在膜片钳记录

制方式 C 条件下,Glu 对 SH-SY5Y 细胞 Ca^{2+} 载荷的阳离子电流的影响与在 B 型箴制方式下的结果相似(结果未显示)。

子电流幅值明显增大(图 4)。在箴制方式 C 条件下,1mmol/L 的 Glu 似可增大 Na^+ 电流,但差异无统计学意义(结果未显示)。

条件上,采取各自最适合的细胞外液,并且采取了 3 种不同的箴制方式,记录到了 I_h 电流,也分别记录到了由 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 载荷的 I_h 电流成分。结果表明,Glu 增强由 Na^+ 和 Ca^{2+} 载荷的 I_h 内向电流成分,抑制由 K^+ 载荷的 I_h 外向电流成分(这里的“内向”和“外向”电流是指在自然情况下情形),总的效应是增大 I_h 电流。Glu 的这一作用有重要意义,因为这涉及到 Glu 对神经元(包括交感神经元)以及心肌细胞的自发(包括自律电活动)和诱发电活动的影响及其与疾病的关系。

支配心脏的交感神经的传出活动增强可诱发梗死心脏发生心律失常。例如,将神经生长因子(NGF)慢性注射于患有陈旧性心肌梗死犬的星状神

经节以刺激支配心脏的交感神经纤维末梢芽生(sympathetic nerve sprouting),可引起心室颤动和猝死;星状神经节自发放电增加可直接导致陈旧性心肌梗死犬发生室性期前收缩和室性心动过速;电刺激陈旧性心肌梗死犬的星状神经节可诱发室性期前收缩、室性心动过速和心室颤动^[10-12]。本研究表明,Glu 可增大 SH-SY5Y 细胞的 I_h 电流,提示 Glu 可能诱发交感神经元的传出冲动,从而增加心律失常的风险。有些人食用含味精(主要成分为谷氨酸单钠)量高的食物会发生中国餐馆综合征,个别人甚至会发生心律失常^[13]。如果再考虑到前述的病理性组织局部“谷氨酸泄漏”,由 Glu 引起的交感神经不正常兴奋和(或)心肌电生理不稳定可能在某些心脏病(特别是心肌梗死)患者中容易发生。因此,依据本研究 and 以往研究的结果,减少味精摄入或抑制 Glu-iGluRs 信号通路可能对 Glu 引发的 I_h 通道开放概率增高以及由此引起的交感神经兴奋起到一定的抑制作用,从而减少心肌梗死或其他心脏病患者心律失常的风险。

志谢:感谢鲍光宏教授的大力技术支持。

参考文献

- 1 Wahl-Schott C, Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(3): 470-494
- 2 Postea O, Biel M. Exploring HCN channels as novel drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(12): 903-914
- 3 Scicchitano P, Carbonara S, Ricci G, et al. HCN channels and heart rate[J]. *Molecules*, 2012, 17(4): 4225-4235
- 4 Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, et al. Hyperpolarization -

- activated cation channels: from genes to function[J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(3): 847-885
- 5 Shah MM, Huang Z, Martinello K. HCN and KV7 (M-) channels as targets for epilepsy treatment[J]. *Neuropharmacology*, 2013, 69: 75-81
- 6 Zhou Z, Misler S. Amperometric detection of stimulus-induced quantal release of catecholamines from cultured superior cervical ganglion neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(15): 6938-6942
- 7 Re DB, Nafia I, Melon C, et al. Glutamate leakage from a compartmentalized intracellular metabolic pool and activation of the lipoxygenase pathway mediate oxidative astrocyte death by reversed glutamate transport[J]. *Glia*, 2006, 54(1): 47-57
- 8 Gao X, Xu XB, Pang J, et al. NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiocyte[J]. *Physiol Res*, 2007, 56(5): 559-569
- 9 Cannarsa R, Landuzzi D, Cavina C, et al. Kainic acid down-regulates NOP receptor density and gene expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. *J Mol Neurosci*, 2008, 35(2): 171-177
- 10 Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, et al. Nerve sprouting and sudden cardiac death[J]. *Circ Res*, 2000, 86(7): 816-821
- 11 Chen PS, Choi EK, Zhou S, et al. Cardiac neural remodeling and its role in arrhythmogenesis[J]. *Heart Rhythm*, 2010, 7(10): 1512-1513
- 12 Zhou S, Jung BC, Tan AY, et al. Spontaneous stellate ganglion nerve activity and ventricular arrhythmia in a canine model of sudden death[J]. *Heart Rhythm*, 2008, 5(1): 131-139
- 13 Pulce C, Vial T, Verdier F, et al. The Chinese restaurant syndrome: a reappraisal of monosodium glutamate's causative role[J]. *Adverse Drug React Toxicol Rev*, 1992, 11(1): 19-39

(收稿日期:2014-10-08)

(修回日期:2014-10-16)

2 型糖尿病合并下肢动脉闭塞症患者手术前后血糖控制情况的研究

许建萍 肖新华

摘要 目的 观察一组糖尿病下肢动脉闭塞症患者手术前后的血糖控制情况。**方法** 选取 2002~2012 年在北京协和医院血管外科行手术治疗的糖尿病下肢动脉闭塞症患者,并以同期门诊就诊的 2 型糖尿病且并不合并下肢动脉闭塞的患者为对照组,监测血压、血糖和血脂。观察两组患者的空腹、3 餐后 2h 及平均血糖差异,并比较有动脉闭塞症的患者手术前后血糖变化情况。同时比较基线时两组的血压和血脂。组间比较采用 t 检验和方差分析。**结果** 共纳入有下肢动脉闭塞症的 2 型糖尿病患者

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170736);国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)内分泌临床重点专科基金资助项目

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院内分泌科、国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)内分泌重点实验室

通讯作者:肖新华,电子信箱:xiaoxinhua@medmail.com.cn