

白介素 1 β 对大鼠皮层神经元钠电流的急性作用

齐 翠¹, 张伟伟², 王 飞¹, 鲍朝飞¹, 王歆玮¹, 李霄楠¹, 余晓青¹, 周 辰^{1,*}

(1. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002; 2. 河北大学 基础医学院, 河北 保定 071000)

摘要: 白介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)是重要的促炎细胞因子, 在多种中枢神经系统的损伤和疾病过程中发挥关键作用。电压门控的钠通道是神经元中最重要的离子通道之一, 是产生再生性动作电位的基础, 决定了神经元的兴奋性等电学性质, 也与多种中枢疾病过程相关。然而, 现在还没有直接关于 IL-1 β 与中枢钠通道的相互关系的研究。在该研究中, 使用全细胞膜片钳记录测定了 IL-1 β 对培养的皮层神经元钠电流的急性作用, 并分析了由此对动作电位的影响。结果显示, IL-1 β 对钠电流幅度只有较小的抑制, 而显著降低钠通道的半激活电压, 不改变激活的斜率因子和失活性质, 这个作用引起动作电位阈值显著降低。这些结果提示在损伤和疾病过程中, 快速释放的 IL-1 β 可能会增加神经元兴奋性, 从而恶化神经损伤过程。

关键词: 白介素 1 β ; 皮层神经元; 电压依赖性钠电流; 膜片钳记录

中图分类号: Q424; Q426; R338.2 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)03-0323-06

Acute effects of IL-1 β on sodium current in cortical neurons of rats

QI Cui¹, ZHANG Wei-Wei², WANG Fei¹, BAO Chao-Fei¹, WANG Xin-Wei¹,
LI Xiao-Nan¹, YU Xiao-Qing¹, ZHOU Chen^{1,*}

(1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. School of Basic Medical Science, Hebei University, Baoding 071000, China)

Abstract: Interleukin-1 β (IL-1 β) is an important proinflammatory cytokine that plays a key role in injuries and diseases of the central nervous system (CNS). The voltage-gated Na⁺ channel is the most important ion channel of neurons, and is essential for regenerative action potential (AP). The Na⁺ channel also contributes to many diseases of the brain. However, relations between IL-1 β and central Na⁺ channels remain unreported. In this study, whole cell patch-clamp recording was used to investigate the acute effects of IL-1 β (10 ng/mL) on voltage-dependent Na⁺ currents and AP of cultured cortical neurons from rats. Results showed that the half-activation voltage of Na⁺ channels and the threshold of AP, but not the amplitude, slope factor of activation, and inactivation properties, were affected by IL-1 β . These data suggest that increased IL-1 β in injury and disease may upregulate the excitability of neurons, and thereby exacerbate neurotoxicity.

Key words: Interleukin-1 β ; Cortical neurons; Voltage-dependent Na⁺ currents; Patch-clamp recording

促炎细胞因子白介素 1 β (IL-1 β)在中枢神经系统中发挥重要作用, 参与多种生理学和病理生理学过程, 包括兴奋毒性 (Fogal & Hewett, 2008) 和癫痫 (Rijkers et al, 2009) 等。最近越来越多的研究关注 IL-1 β 对神经元离子通道的作用, 包括中枢与外周神经系统, 如小直径三叉神经节神经元中的钾通道 (Takeda et al, 2008)、海马神经元中的钙激活钾通道 (Zhang et al, 2008) 以及培养的皮层神经元中的钙通道 (Zhou et al, 2006a, b)。电压门控的钠通道是最重要的离子通道类型之一, 在可兴奋细胞中,

钠通道激活产生的再生性事件是动作电位产生的基础, 并且可以决定兴奋性。成纤维细胞生长因子同源因子敲除的小鼠中, 钠通道的电生理学性质发生改变。因此, 小脑颗粒神经元不能反复产生动作电位 (Goldfarb et al, 2007)。Nav1.7 通道的突变会改变不同类型的神经元的兴奋性 (Rush et al, 2006)。在外周感觉神经元中, 钠通道参与炎症性和神经性疼痛 (Hains et al, 2004; Amir et al, 2006), 并且是多种药物处理的靶点 (Momin & Wood, 2008)。在中枢神经系统中, 缺血性脑损伤钠通道 α 亚基的表达下

收稿日期: 2010-09-25; 接受日期: 2011-01-28

基金项目: 河北省教育厅科学研究计划(Z2009109); 北京大学生物膜与膜生物工程国家重点实验室开放课题

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: zezhou@sina.com

调,而 $\beta 1$ 亚基能够促进神经生长, $\beta 2$ 亚基与多重硬化症有关(Davis et al, 2004; O'Malley et al, 2009; Yao et al, 2005)。这些都表明钠通道在神经系统中的关键作用。

目前只有较少的研究涉及到IL-1 β 对钠通道的作用。在外周神经系统中,IL-1 β 与钠通道都与炎症和痛觉传导有关。IL-1 β 增加痛觉感受器的兴奋性,从而引起痛觉过敏(Binshtok et al, 2008);而钠通道则是炎症性痛觉过敏的效应器(Amaya et al, 2006)。慢性的IL-1 β 处理增强痛觉神经元中的钠电流,这可能是IL-1 β 对痛觉传导作用的机制之一(Liu et al, 2006)。然而,在中枢神经系统中IL-1 β 与钠通道的相互关系还不清楚。我们在以前的研究中发现10 ng/mL的IL-1 β 可以抑制大鼠皮层神经元的电压门控钙电流和钾电流。因此,本研究使用了同样剂量的IL-1 β ,研究其对皮层神经元电压门控钠电流的急性作用。我们的结果显示,IL-1 β 改变钠电流的激活性质,而电流幅度和失活性质基本不变。由于激活性质的改变,也引起了动作电位阈值的降低。这些结果显示,IL-1 β 急性处理可能改变中枢神经元的兴奋性。

1 材料和方法

1.1 动物

实验动物:SD大鼠(购自北京维通利华实验动物科技有限公司),饲养在动物房中,室温维持在25℃左右,保持12:12h的昼夜节律。

1.2 大鼠皮层神经元的原代培养

取孕17~18d的SD大鼠胎鼠,断头,取大脑皮层,去除海马和硬脑膜,用0.25%的胰酶(Invitrogen, USA)在室温下处理1~2min,吸出胰酶后,用0.1%的胰酶抑制剂(Invitrogen, USA)终止消化。细胞悬液离心10min(900 \times g),沉淀重悬于Neurobasal(Invitrogen, USA)培养基中。使用台盼蓝排除法计数活细胞密度,并用相同培养基稀释细胞浓度至0.75 $\times 10^6$ 个/mL,将细胞接种到35mm的培养皿中的无菌盖玻片上,盖玻片用12.5 μ g/mL多聚赖氨酸(Poly-D-Lysine, Sigma, USA)预处理。

培养基使用Neurobasal(NB; Invitrogen, USA),在使用之前,培养基中加入2mmol/L的谷氨酰胺、50U/mL的青霉素、50 μ g/mL的链霉素,以及2%的B-27添加剂(Invitrogen, USA)。将培养皿放在含有5%CO₂/95%空气的恒温培养箱(Sanyo, Japan)内,每

3天半量换液。所有的记录在神经元体外培养的第6~10d进行。

1.3 全细胞膜片钳记录

使用P-97微电极拉制仪(Sutter, USA),通过三步拉制,从厚壁硼硅酸盐玻璃毛细管(南京泉水仪器厂)制作微电极,电极尖端阻抗5~10M Ω 。内充电极内液,成分为(mmol/L):145CsCl, 1MgCl₂, 10HEPES, 4TEA-Cl, 5ATP-Na₂和10EGTA,用CsOH调节pH值为7.2。将培养的神经细胞取出置于含有细胞外液的培养皿中,外液成分为(mmol/L):140NaCl, 5KCl, 2CaCl₂, 1MgCl₂, 10HEPES, 10葡萄糖,用NaOH调节pH值为7.4。

全细胞电压钳记录使用EPC-10膜片钳放大器(HEKA, Germany)。形成全细胞模式后将神经元钳制在-80mV,以5mV的电压阶跃进行去极化刺激,持续时间20ms,范围-80到65mV。记录前进行慢电容及串联电阻补偿(60%~80%)。电流信号通过放大器后输入计算机PatchMaster程序中,采样频率是200kHz。为了记录动作电位,采用全细胞电流钳模式。使用的外液与电压钳相同,内液成分为(mmol/L):130葡萄糖酸钾, 1CaCl₂, 10EGTA, 2MgCl₂, 10HEPES, 5ATP-Na₂, 4ATP-Mg, 10磷酸肌酸tris和0.1GTP-Li₄。在记录前输入超极化电流钳制细胞在-70mV左右,然后输入斜率去极化电流,最大幅度500pA持续时间100ms,以刺激产生动作电位。采样频率200kHz,记录并分析其幅度和阈值等性质。

1.4 药物处理

记录到稳定的正常钠电流后,在外液中加入10ng/mL的IL-1 β ,继续记录电压门控的钠电流直到给药后20min。

1.5 数据分析

数据分析使用Clampfit 10.0软件(Axon, USA)和Excel进行,使用Excel XP(Microsoft, USA)和SPSS 11.5(SPSS, USA)进行统计分析, Sigmaplot 10.0(SPSS, USA)软件进行作图,所有的数据用平均值 \pm 标准误(SE)表示,全部数据统计均使用平均值成对二样本分析。

2 结果

2.1 IL-1 β 对钠电流幅度的作用

培养6~10d的大鼠胎鼠皮层神经元用于膜片钳记录,钳制电压在-80mV,以5mV的去极化阶

跃到 65 mV, 通过膜片钳放大器记录内向钠电流。在获得稳定的电流记录之后, 外液中加入 10 ng/mL 的 IL-1β, 继续记录直到给药之后 20 min。图 1 是一个典型记录, 通过放大器可以记录到一个电压依赖性的内向电流, 并且具有快速激活和快速失活的性

质, 符合电压门控的钠电流的特性。加入 IL-1β 后, 电流幅度有逐渐减小的趋势(图 1: A—C)。给药前, 钠电流峰值出现在 -25 mV, 因此, 使用 -25 mV 下的电流幅度对 IL-1β 作用时间作图, 可以看到在给药后电流幅度随着时间延长而下降(图 1D)。

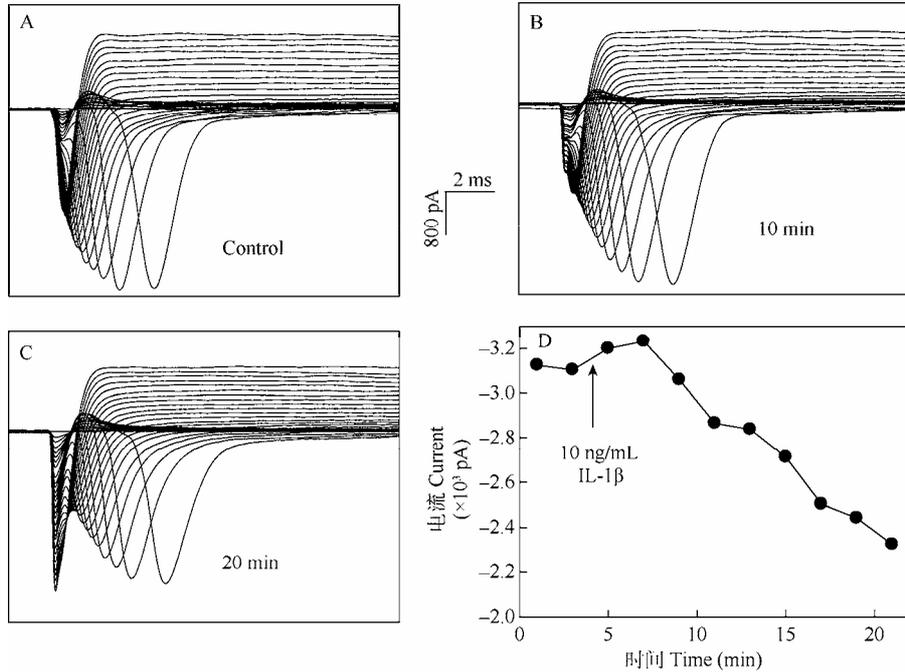


图 1 来自一个细胞的 IL-1β 对钠电流急性作用的典型记录

Fig. 1 A typical recording of the acute effect of IL-1β

A: 给药前; B: 给药后 10 min; C: 20 min 记录的电压门的控钠电流; D: -25 mV 下不同时间点的钠电流幅度。

Voltage-gated Na⁺ currents at before (A), 10 min (B) and 20 min (C) after IL-1β application. The amplitudes of Na⁺ currents at -25 mV (D).

我们总结了 5 个细胞所得到的数据, 给药前的峰值电流都出现在 -25 mV, 因此, 使用这个电压下的平均电流幅度作图。结果显示, 使用 IL-1β 处理后 7 min, 电流幅度的降低开始具有显著性差异, 在

处理后 15 min 达到极显著水平, 最大降幅是给药 20 min 后降低到对照水平的 80%(图 2A)。为了全面分析 IL-1β 对钠电流的作用, 使用电流幅度对测试电压作图, 获得电流 - 电压关系曲线。图 2B 是图 1

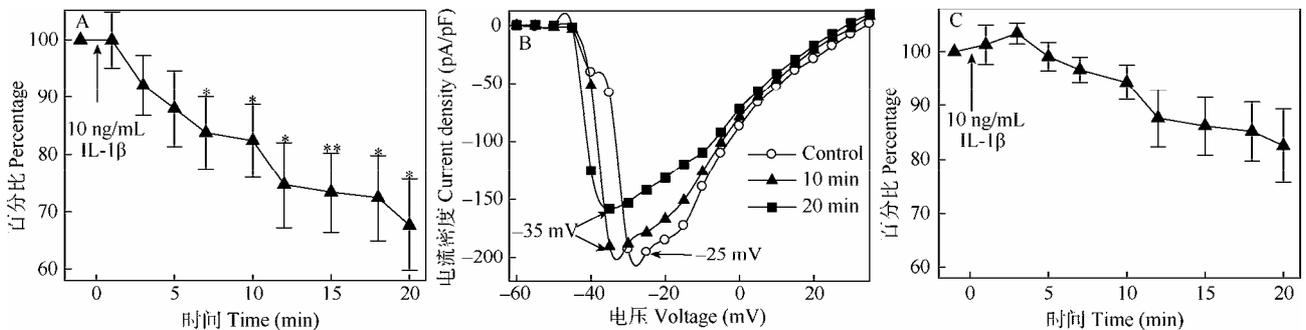


图 2 IL-1β 对钠电流幅度的作用

Fig. 2 Effects of IL-1β on the amplitude of Na⁺ currents

A: -25 mV 下的钠电流幅度比较(n=5); B: 典型记录中的电流 - 电压曲线; C: 不同处理时间下的峰值电流; * P < 0.05; ** P < 0.01。

A: The amplitudes of Na⁺ currents at -25 mV (n=5); B: The current-voltage curves from a typical recording; C: The peak amplitudes at time points; * P < 0.05; ** P < 0.01.

中典型例子的电流 - 电压关系, 可以看到给药前峰值电流出现在-25 mV, 给药后 10 min 和 20 min 的曲线显示峰值电流出现在-35 mV。这表明 IL-1 β 处理后峰值电流的位置改变, 因此, 重新统计了峰值电流, 其结果显示, 虽然 IL-1 β 处理后电流幅度仍然有下降的趋势, 但是没有显著性(图 2C)。

2.2 IL-1 β 改变钠电流的激活性质

峰值电流的提前很可能是由于钠通道的电生理学性质发生了变化, 我们继续分析了激活和失活性质。图 3A 是来自图 1 中典型记录的激活曲线, 在 IL-1 β 处理后, 激活曲线向超极化方向平移, 这表明半激活电压降低。统计显示, 给药后半激活电压开

始逐渐下降, 在 3 min 就已经产生显著差异, 5 min 后差异达到极显著水平(图 3B)。与半激活电压下降不同, 斜率因子在给药后没有变化(图 3C)。对于失活性质的分析表明, 钠通道的失活没有改变(图 3D)。这些结果解释了峰值电流提前的现象。

2.3 IL-1 β 改变动作电位的性质

钠通道是再生性动作电位产生的基础, 其激活性质的改变很可能影响到动作电位的性质。因此, 我们在电流钳模式下, 使用斜率刺激记录了神经元的动作电位。从典型记录可以看出动作电位的峰值幅度不变, 但时间提前, 而阈值则降低(图 4A)。我们分析了 4 组记录中的动作电位, 峰值幅度没有变

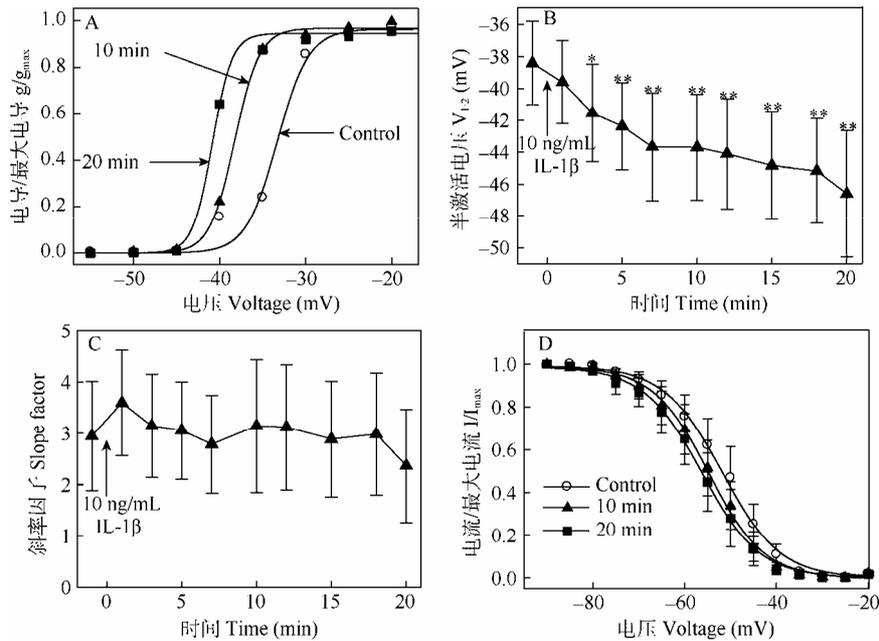


图 3 IL-1 β 改变钠电流的激活性质

Fig. 3 IL-1 β affects activation properties of Na⁺ currents

A : 典型记录的激活曲线; B 和 C : 不同处理时间下的半激活电压和斜率因子; D : 钠电流的失活曲线(n=5); * P < 0.05; ** P < 0.01。

A: The activation curves of a typical recording; B and C: The half-activation voltages and slope factors (at time points); D: The inactivation curves of Na⁺ currents (n=5); * P < 0.05; ** P < 0.01.

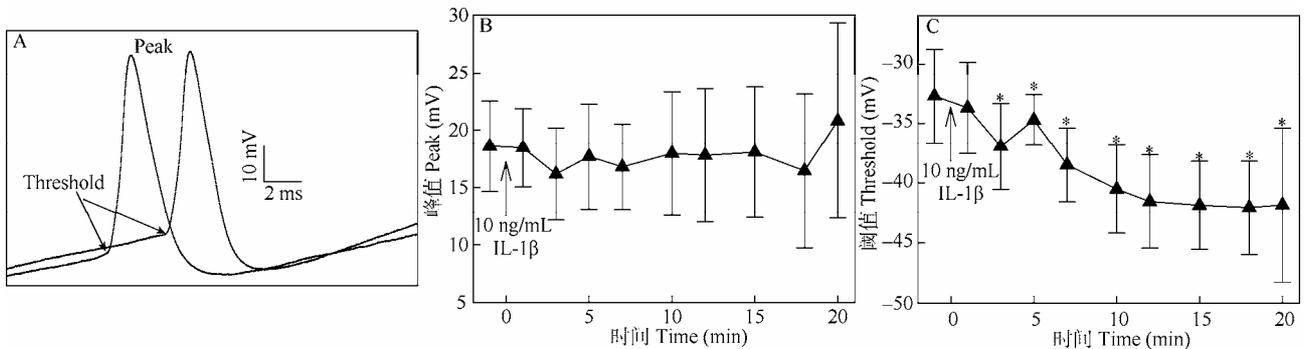


图 4 IL-1 β 对动作电位的作用

Fig. 4 Effects of IL-1 β on action potential

A : 一个动作电位的典型记录; B 和 C : 不同处理时间下动作电位的幅度和阈值(n=4); * P < 0.05。

A: A typical recording of AP; B and C: The amplitude and threshold at time points (n=4); * P < 0.05.

化(图 4B), 阈值显著下降, 与半激活电压的改变类似, 给药后阈值持续降低, 处理 3 min 后, 就具有统计显著性(图 4C)。这些结果表明, IL-1 β 处理通过改变钠通道激活性质, 降低了动作电位的阈值, 并由此提示可能增加神经元的兴奋性。

3 讨 论

最初我们对实验结果的分析显示, IL-1 β 显著抑制了钠电流幅度, 但进一步的分析表明, 这是由于药物处理后峰值电流提前。因此, 在给药前的峰值电压下的电流幅度有显著降低, 而比较不同时间下的峰值电流则没有显著差异。达到峰值的电压提前意味着激活性质很可能发生改变, 对钠通道激活和失活性质的计算确认了这一点。半激活电压向超极化方向移动, 而激活性质中的斜率因子和失活性质则没有变化。半激活电压的降低解释了峰值电流出现的提前, 幅度约为 10 mV, 同时, 也提示电压门控的钠通道介导的动作电位也会发生显著改变。对动作电位的记录表明, 幅度没有变化, 但是阈值显著降低, 下降的幅度与半激活电压改变的幅度接近。

3.1 IL-1 β 剂量的选择

IL-1 β 在中枢神经系统的多种损伤和疾病过程中发挥重要作用。已经有一些研究报道了 IL-1 β 与不同的离子通道之间的相互关系, 包括 IL-1 β 对海马神经元钙通道 (Plata-Salamán & French-Mullen, 1992) 和中枢, 以及外周神经元的钾通道 (Takeda et al, 2008; Zhang et al, 2008) 的急性作用。现在已有 Zhou et al (2006a, b) 有关 IL-1 β 对皮层钙通道和 Liu et al (2006) 对外周神经元钠通道的慢性作用的研究; 但是还没有关于 IL-1 β 对皮层神经元钠通道急性作用的相关研究。本实验中选择了 10 ng/mL 的浓度进行处理, 这是一个比较适当的剂量。Zhou et al (2006a) 指出, 在病理学条件下脑脊液中的 IL-1 β 浓度超过 100 pg/mL, 在有活性的局部分泌区

域中, IL-1 β 的浓度可能会高出两个数量级, 最大达到 10 ng/mL。我们以前关于 IL-1 β 对离子通道的慢性作用的研究也使用了 10 ng/mL 的浓度, 发现该剂量的 IL-1 β 可以抑制中枢神经元中的钙电流 (Zhou et al, 2006a, b) 以及钾电流 (Zhang et al, 2009)。因此, 本实验中将 IL-1 β 的浓度设定为 10 ng/mL。

3.2 IL-1 β 急性作用的可能的生物学意义

本文的研究结果表明, IL-1 β 对于中枢离子通道具有急性作用, 但与其抑制电流幅度的慢性作用结果不同, 急性作用对幅度的抑制较小, 主要影响钠通道的激活性质; 而慢性作用则是通过抑制表达减少通道数量。因此, 只影响幅度而不改变激活性质。通过改变激活性质, IL-1 β 也急性改变了动作电位的阈值, 而这是神经元兴奋性的重要指标。在外周痛觉传导神经元中, IL-1 β 显著降低动作电位的阈值, 从而造成神经元兴奋性增加, 这是炎症性疼痛或者痛敏的重要机制 (Binstok et al, 2008)。

在不同的处理条件下, IL-1 β 对中枢神经系统可能产生神经保护或者神经毒性作用, 对于离子通道的影响可能是 IL-1 β 发挥其生物学功能的重要途径之一。在视神经损伤后, IL-1 β 可以抑制视网膜神经节细胞的钠和钾通道, 从而产生保护作用 (Diem et al, 2003)。中枢神经元兴奋性增加, 则可能造成神经元过度兴奋, 释放过多的兴奋性神经递质, 例如谷氨酸, 造成进一步的损伤。IL-1 β 对离子通道的作用也非常复杂, 在外周神经元中, IL-1 β 急性处理抑制钠电流, 而慢性处理则会增加钠电流 (Liu et al, 2006)。因此, 对 IL-1 β 与离子通道以及神经元电学性质的相互关系还需要深入研究。

总之, 我们的研究表明, IL-1 β 急性处理通过改变钠通道激活性质降低了神经元阈值, 增加了兴奋性。在损伤和疾病过程中 IL-1 β 表达快速上调。因此, 产生的兴奋性增加可能会恶化兴奋毒性, 从而造成神经毒性作用。这些结果为进一步阐明 IL-1 β 的作用及其机制打下了基础并提供了新的思路。

参考文献：

- Amaya F, Wang H, Costigan M, Allchorne AJ, Hatcher JP, Egerton J, Stean T, Morisset V, Grose D, Gunthorpe MJ, Chessell IP, Tate S, Green PJ, Woolf CJ. 2006. The voltage-gated sodium channel Nav1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity[J]. *J Neurosci*, 26 (50): 12852-12860.
- Amir R, Argoff CE, Bennett GJ, Cummins TR, Durieux ME, Gerner P, Gold MS, Porreca F, Strichartz GR. 2006. The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain[J]. *J Pain*, 7: S1-S29.
- Binstok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Vardeh D, Shi L, Brenner GJ, Ji RR, Bean BP, Woolf CJ, Samad TA. 2008. Nociceptors are interleukin-1 β sensors[J]. *J Neurosci*, 28 (52): 14062-14073.
- Davis TH, Chen C, Isom LL. 2004. Sodium channel β 1 subunits promote neurite outgrowth in cerebellar granule neurons[J]. *J Biol Chem*, 279: 51424-51432.

- Diem R, Hobom M, Grötsch P, Kramer B, Bähr M. 2003. Interleukin-1 β protects neurons via the interleukin-1 (IL-1) receptor-mediated Akt pathway and by IL-1 receptor-independent decrease of transmembrane currents *in vivo*[J]. *Mol Cell Neurosci*, **22**: 487-500.
- Fogal B, Hewett SJ. 2008. Interleukin-1 β : A bridge between inflammation and excitotoxicity? [J] *J Neurochem*, **106**: 1-23.
- Goldfarb M, Schoorlemmer J, Williams A, Diwakar S, Wang Q, Huang X, Giza J, Tchetchik D, Kelley K, Vega A, Matthews G, Rossi P, Ornitz DM, D'Angelo E. 2007. Fibroblast growth factor homologous factors control neuronal excitability through modulation of voltage-gated sodium channels[J]. *Neuron*, **55**: 449-463.
- Hains BC, Saab CY, Klein JP, Craner MJ, Waxman SG. 2004. Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury[J]. *J Neurosci*, **24**: 4832-4839.
- Liu L, Yang TM, Liedtke W, Simon SA. 2006. Chronic IL-1 β potentiates voltage-dependent sodium currents in trigeminal nociceptive neurons[J]. *J Neurophysiol*, **95**: 1478-1490.
- Momin A, Wood JN. 2008. Sensory neuron voltage-gated sodium channels as analgesic drug targets[J]. *Curr Opin Neurol*, **18**: 383-388.
- O'Malley HA, Shreiner AB, Chen GH, Huffnagle GB, Isom LL. 2009. Loss of Na⁺ channel β 2 subunits is neuroprotective in a mouse model of multiple sclerosis[J]. *Mol Cell Neurosci*, **40**: 143-155.
- Plata-Salamán CR, French-Mullen JMH. 1992. Interleukin-1 β depresses calcium currents in CA1 hippocampal neurons at pathophysiological concentration[J]. *Brain Res*, **29**: 221-223.
- Rijkers K, Majoie HJ, Hoogland G, Kenis G, De Baets M, Vles JS. 2009. The role of interleukin-1 in seizures and epilepsy: A critical review[J]. *Exp Neurol*, **216**: 258-271.
- Rush AM, Dib-Hajj SD, Liu S, Cummins TR, Black JA, Waxman SG. 2006. A single sodium channel mutation produces hyper- or hypoexcitability in different types of neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 8245-8250.
- Takeda M, Kitagawa J, Takahashi M, Matsumoto S. 2008. Activation of interleukin-1 β receptor suppresses the voltage-gated potassium currents in the small-diameter trigeminal ganglion neurons following peripheral inflammation[J]. *Pain*, **139**: 594-602.
- Yao C, Williams AJ, Hartings JA, Lu XCM, Tortella FC, Dave JR. 2005. Down-regulation of the sodium channel Nav1.1 α -subunit following focal ischemic brain injury in rats: In situ hybridization and immunohistochemical analysis[J]. *Life Sci*, **77**: 1116-1129.
- Zhang R, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z, Koyama S, Nakanishi H. 2008. Inhibition of NMDA-induced outward currents by interleukin-1 β in hippocampal neurons[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **372**: 816-820.
- Zhang WW, Zhou C, Qi C, Bao CF, Jing JZ, Zhang LY, Han SE. 2009. Potassium currents in neurons of rats were reduced by IL-1 β in time dependent manner. [J]. *Acta Biophys Sin*, **25** (6): 415-422. [张伟伟, 周辰, 齐翠, 鲍朝飞, 景军展, 张丽瑶, 韩素娥. 2009. 白介素 1 β 时间依赖性抑制大鼠皮层神经元钾电流. 生物物理学报, **25**(6): 415-422.]
- Zhou C, Tai C, Ye HH, Chen JG, Wang SQ, Chai Z. 2006a. Interleukin-1 β downregulates the L-type Ca²⁺ channel activity by depressing the expression of channel protein in cortical neurons[J]. *J Cell Physiol*, **206**: 799-806.
- Zhou C, Ye HH, Wang SQ, Chai Z. 2006b. Interleukin-1 β regulation of N-type Ca²⁺ channels in cortical neurons[J]. *Neurosci Lett*, **403**: 181-185.