

# 胞外锌离子对鲫鱼视网膜 H1 型水平细胞内向整流钾通道的调控特性

张雅婷, 孙焱, 龚海庆, 梁培基

上海交通大学生物医学工程系, 上海 200240

本文通过“绿色通道”投稿 (推荐编委: 梁培基)

收稿日期: 2011-03-07; 接受日期: 2011-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870836), 上海交通大学分析测试中心资助项目

通讯作者: 梁培基, 电话: (021)34204015, 传真: (021)34204016, E-mail: pjliang@sjtu.edu.cn

**摘要:** 利用全细胞膜片钳技术, 研究了胞外锌离子对鲫鱼视网膜 H1 型水平细胞内向整流钾通道 (inward-rectifying potassium channel, Kir) 的调控特性。研究发现: 1) 当胞外为弱酸环境 (pH=6.8) 时, 毫摩尔级浓度的锌离子对 Kir 电流具有压抑作用, 而微摩尔级浓度的锌离子对 Kir 电流没有任何影响; 2) 当胞外 pH 为正常生理范围值 (7.2) 时, 无论锌离子浓度高或低, 都对 Kir 电流没有影响。以上结果表明, 锌离子对 Kir 的调控与胞外的 pH 环境密切相关。弱酸环境下, 高浓度的锌离子对 Kir 通道产生压抑作用, 在某些病理情况下 (如组织缺血缺氧), 这个过程可能起到了保护神经元免于凋亡的作用。

**关键词:** 膜片钳记录; 水平细胞; 内向整流钾通道

**中图分类号:** Q424

**DOI:** 10.3724/SP.J.1260.2011.00617

## 引言

锌离子 ( $Zn^{2+}$ ) 广泛存在于中枢神经系统<sup>[1]</sup>。它从突触末端释放入突触间隙, 不仅能调节神经递质的释放, 还参与调控突触后神经元上电压门控和配体门控离子通道的活动<sup>[2,3]</sup>。

在脊椎动物视网膜中, 大量  $Zn^{2+}$  存在于光感受器细胞的轴突末端<sup>[4]</sup>, 游离的  $Zn^{2+}$  可以从光感受器细胞的突触终末释放到突触间隙中<sup>[5]</sup>。视网膜水平细胞与光感受器细胞形成突触联系。在暗中, 水平细胞接收前级光感受器细胞的谷氨酸能输入, 于是推测, 与谷氨酸一同释放入突触间隙的  $Zn^{2+}$ , 可能对水平细胞上表达的离子通道具有调控作用。

视网膜水平细胞上表达有大量的离子通道, 内向整流钾通道 (inward-rectifying potassium channel, Kir) 是其中的一种。视网膜水平细胞上 Kir 通道的活动, 可以加速水平细胞对光的反应<sup>[6]</sup>, 且水平细胞上的 Kir 通道也受到谷氨酸的调控<sup>[7]</sup>。那么, 与谷氨酸一同释放入突触间隙的  $Zn^{2+}$ , 对水平细胞上 Kir 通道的作用是怎样的呢? 本文选用鲫鱼视网膜 H1 型水平细胞为标本, 采用全细胞膜片钳技术, 研究  $Zn^{2+}$  对视网膜水平细胞上 Kir 通道的影响, 进一步揭示 Kir 通道在水平细胞中发挥的作用。结果发现: 当胞外环境处于弱酸条

件下 (pH=6.8) 时, 毫摩尔级浓度的  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  电流 ( $I_{Kir}$ ) 具有抑制作用, 而微摩尔级浓度的  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  没有影响; 而当胞外 pH 值恢复到正常生理范围 (7.2) 时, 无论高浓度或低浓度的  $Zn^{2+}$ , 对  $I_{Kir}$  都没有调控作用。这些结果表明, 在中枢神经系统中,  $Zn^{2+}$  对  $Kir$  通道的调控作用与胞外的 pH 环境密切相关, 而且  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  的调控具有浓度依赖性。

## 材料和方法

### 试剂与溶液

Hank 氏液 (mmol/L): NaCl 120.0, KCl 3.0,  $CaCl_2$  0.5,  $MgSO_4$  1.0, Na-pyruvate 1.0,  $NaH_2PO_4$  1.0,  $NaHCO_3$  0.5, HEPES 20.0, glucose 16.0。标准 Ringer 氏液 (mmol/L): NaCl 120.0, KCl 5.0,  $CaCl_2$  2.0,  $MgCl_2$  1.0, HEPES 10.0, glucose 16.0。两种溶液均用 2.0 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 7.4。  $ZnCl_2$  及  $BaCl_2$  溶液均用 Ringer 氏液配制成需要的浓度。根据实验需要, Ringer 氏液与  $ZnCl_2$  溶液的 pH 值配成 6.8 和 7.2 两种。电极内液 (mmol/L): KCl 150.0, NaCl 5.0,  $CaCl_2$  1.0,  $MgCl_2$  1.0, EGTA 10, HEPES 10.0, pH 值用 KOH 调至 7.3。酶解视网膜所用的木瓜蛋白酶消化液是含木瓜蛋白酶 (20 U/mL, 购自伯奥生物科技公司) 和 L- 半胱氨酸 (1 mg/mL) 的 Hank 氏液, 分离细胞前新鲜配制。以上药物除特别说明外, 均购自 Sigma 公司 (St. Louis, Missouri, USA)。

### 标本制备

成年鲫鱼 (*Carassius auratus*), 尾叉长 14~20 cm。从上海市郊鱼塘捕获后饲养于室内玻璃鱼缸中, 日照条件同自然状态。鱼缸中的水通过水泵循环、滤膜过滤, 并由气泵将空气充入其中, 保持水质清洁和水中氧气充足。

取材前, 先将鲫鱼暗适应 15 min 左右。在暗红光和室温条件下, 用弯头眼科剪刀环切眼肌, 迅速摘下眼球, 在角膜和巩膜交界处沿冠状方向切开眼球, 弃去含角膜和晶状体的部分。将剩下的眼杯倒扣在普通滤纸上, 轻压巩膜, 再用眼科镊轻轻提起巩膜, 使视网膜和色素上皮层分离。在视盘处剪断视神经, 然后将粘附在滤纸上的视网膜小心转移到新鲜配制的木瓜蛋白酶消化液中, 将每个视网膜剪成 4 小片, 于室温下 (25°C) 酶解 25~30 min。用不含酶的 Hank 氏液在 10 ml 烧杯中清洗酶解后的组织块 6~8 次, 每次用 Hank 氏液 8 ml, 通过逐步稀释的办法终止木瓜蛋白酶的酶解作用。冲洗后的视网膜组织块放在 Hank 氏液中, 并置于 4°C 冰箱中保存备用。实验时, 取 1~2 片视网膜组织块, 放入装有 6 ml Ringer 氏液的玻璃试管中, 用一组管口由大到小 (直径 3~0.5 mm) 的滴管逐级温和吹打。吹打至溶液混浊, 组织块基本不见, 静置 1~2 min。取上清细胞悬浮液放入塑料培养皿中, 放在倒置显微镜上, 10 min 后即可进行全细胞膜片钳记录。H1 型水平细胞通过形态特征进行鉴定<sup>[8,9]</sup>。

### 全细胞膜片钳记录和施加药物的方式

采用外径为 1.5 mm、内径为 0.86 mm、长度为 10 cm 的有芯导流毛坏电极 (Sutter Instruments, USA), 在 P-97 控制仪 (Sutter Instruments, USA) 上拉制成记录电极。充灌电极内液后, 电极阻抗为 5~7 M $\Omega$ 。全细胞电压钳采集到的电信号经 Axopatch 200B (Axon

Instruments, USA) 放大和滤波后, 由 A/D-D/A 转换器 DigiData 1200 (Axon Instruments, USA) 模拟转换, 数字信号被保存于计算机中。而命令信号 (包括钳制电位和电流) 是将由计算机产生的数字信号, 经过 A/D-D/A 转换器转换后, 再输入到放大器中。实验数据的采集和命令产生都由软件 pClampex 9.2 (Axon Instruments, USA) 完成。实验数据的分析采用 pClampfit 9.2 软件 (Axon Instruments, USA)。应用快速给药系统 (DAD-12, ALA Scientific, USA) 施加药物, 加药的石英玻璃管内径为  $100\ \mu\text{m}$ , 长度为  $5\ \mu\text{m}$ , 距细胞约  $150\ \mu\text{m}$ 。所有给药记录均是在预先施加药物 20 s 后采集, 采集的同时伴随加药。正文和表格中的数据采用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 来表示, 图中的数据采用平均值 $\pm$ 标准误差 (mean $\pm$ SE) 来表示。统计分析采用配对  $t$  检验 (paired  $t$ -test)。

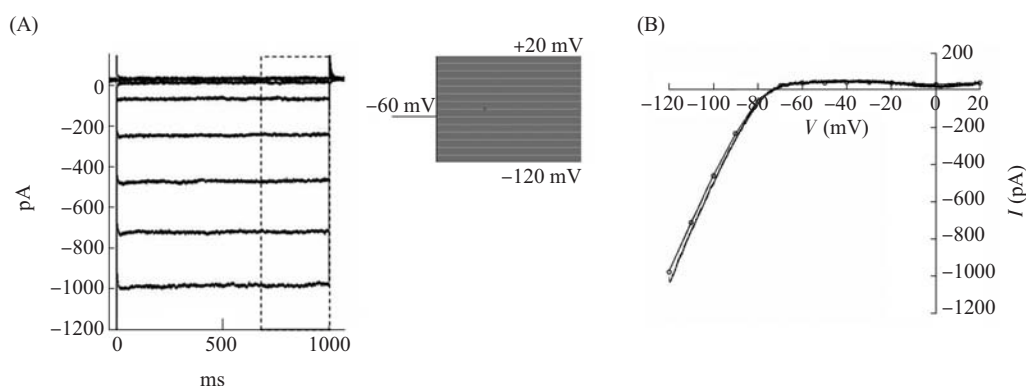
### 内向整流钾通道电流的记录方法

于室温下 ( $20\sim 25^\circ\text{C}$ ) 记录内向整流钾通道电流。将细胞钳制在  $-60\ \text{mV}$ <sup>[10]</sup>, 设定阶跃式的脉冲刺激, 从  $-120\ \text{mV}$  去极化到  $20\ \text{mV}$  (以  $20\ \text{mV}$  为步阶), 脉冲持续的时间为  $1\ \text{s}$ ; 或给予  $-120\ \text{mV}$  至  $20\ \text{mV}$  的斜坡式的电压刺激, 刺激时间为  $2\ \text{s}$ 。低通滤波的截止频率为  $5\ \text{kHz}$ , 采样频率为  $10\ \text{kHz}$ 。

## 结 果

### 视网膜 H1 型水平细胞上的内向整流钾通道

水平细胞上表达有大量的  $\text{K}_{\text{ir}}$  通道<sup>[11]</sup>。当膜电位低于钾离子平衡电位 ( $E_{\text{k}}$ ) 时, 通过  $\text{K}_{\text{ir}}$  通道外流的电流很小; 而当膜电位高于钾离子平衡电位时, 内流的电流则很大。图 1 为通



**图 1** H1 型水平细胞上记录到的内向整流钾通道的电流 - 电压关系曲线 (A) 在一例 H1 型水平细胞上,  $-120\ \text{mV}$  到  $20\ \text{mV}$  的步阶电压 (步长为  $20\ \text{mV}$ ) 所诱发的电流。电压命令的示意图在电流图右侧, 钳制电压为  $-60\ \text{mV}$ 。(B) 水平细胞在阶跃式及斜坡式的电压刺激下得到的电流 - 电压关系曲线图, 由符号 “ $\circ$ ” 连接的折线代表步阶式电压刺激下, 根据(A)图虚线框区域内的平均电流幅值所得的电流 - 电压曲线; 连续的曲线则代表斜坡式电压刺激下得到的电流 - 电压关系

**Fig.1** The  $I$ - $V$  relationship of inward-rectifying  $\text{K}^+$  channel ( $\text{K}_{\text{ir}}$ ) recorded on an H1 type horizontal cell (A) Currents were evoked with the step voltage commands from  $-120$  to  $20\ \text{mV}$  with  $20\ \text{mV}$  increments and the clamp protocol was illustrated on the right side of the traces. Holding potential was  $-60\ \text{mV}$ . (B) The  $I$ - $V$  curves obtained from horizontal cell under step and ramp protocols, represented by “ $\circ$ ” (using the mean current amplitudes in boxed area of Fig.A) and continuous curve, respectively

过全细胞膜片钳模式记录到的一例 H1 型水平细胞上的电流 - 电压关系曲线 ( $I-V$  曲线)。细胞钳制在  $-60$  mV, 设定的脉冲刺激以  $20$  mV 的步阶, 从  $-120$  mV 去极化到  $20$  mV。图 1A 是在不同的钳制电压下记录到的电流。其中, 每条迹线包含两种电流成分: 瞬态电流和稳态电流。图 1B 是根据图 1A 中的稳态电流值绘出的电流 - 电压关系曲线。横坐标代表电压, 纵坐标代表电流幅值。从图中可以看到, 该曲线与  $X$  轴交于  $-75$  mV 左右, 该值代表膜两侧离子的平衡电位, 与通过 Nernst 公式估算到的钾离子平衡电位 ( $E_k = -85$  mV) 接近。当膜电压负于  $-75$  mV, 即细胞处于超极化状态时, 可以诱发出很大的内向电流, 曲线呈现一个较陡的斜坡; 当膜电压正于  $-75$  mV, 即细胞处于相对去极化状态时, 只能诱发出较弱小的外向电流。这些特征与以往关于 Kir 通道特征的报道一致<sup>[12]</sup>。

阶跃式电压刺激的实验时间较斜坡式电压刺激长, 相比于斜坡式电压刺激, 阶跃式电压刺激对细胞产生的伤害更大。因此, 我们对细胞在两种电压刺激模式下的反应进行了测试, 以比较两种刺激模式对细胞的作用是否存在差异。由图 1 可以看到, 两种刺激模式下的电流反应基本没有显著差异。因此, 在接下来的实验中, 我们都采用斜坡式的电压刺激作为刺激模式。

研究表明, 钡离子 ( $Ba^{2+}$ ) 可以选择性地阻断 Kir 通道<sup>[13]</sup>,  $Ba^{2+}$  的阻断作用可作为鉴定 Kir 通道的方法之一。在一例 H1 型水平细胞上, 给予  $-120 \sim 20$  mV 的斜坡式电压刺激。标准 Ringer 氏液中, 电压为  $-120$  mV 时记录到的  $I_{Kir}$  是  $-1669.3$  pA, 用快速给药系统施加  $10$  mmol/L 的  $Ba^{2+}$ ,  $20$  s 后,  $-120$  mV 电压下的  $I_{Kir}$  被压抑到了  $-135.7$  pA, 用 Ringer 氏液冲洗  $60$  s 后,  $-120$  mV 下的  $I_{Kir}$  恢复到  $-1010.4$  pA。统计数据显示: 施加  $10$  mmol/L 的  $Ba^{2+}$   $20$  s 后,  $-120$  mV 电压下的  $I_{Kir}$  减小到对照水平的  $9.25\% \pm 2.8\%$  (mean  $\pm$  SD,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ); 洗脱后, 恢复到对照水平的  $78.6\% \pm 11.2\%$  (mean  $\pm$  SD,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ )。由此可以证实我们实验中测量到的确实是  $I_{Kir}$ 。

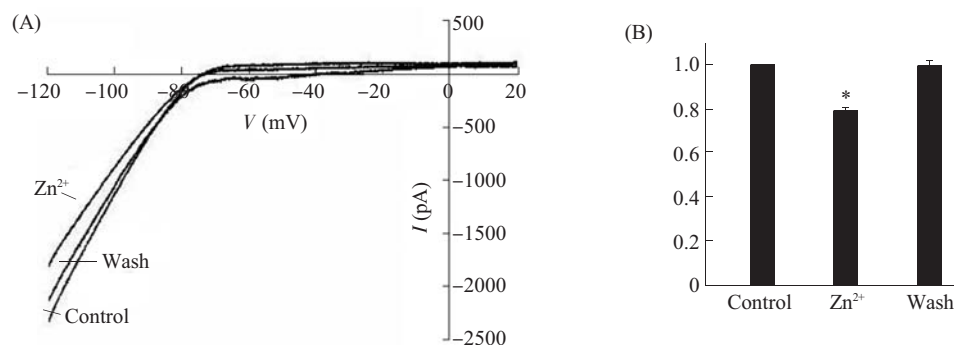
以下实验数据中的  $I_{Kir}$ , 均是指在电压为  $-120$  mV 时测得的电流值。

### Zn<sup>2+</sup> 对内向整流钾通道的作用

在证实了 H1 型水平细胞上的 Kir 通道后, 我们进一步研究了  $Zn^{2+}$  对 Kir 通道的调控作用。在蟾蜍骨骼肌及爪蟾卵母细胞上的研究表明,  $Zn^{2+}$  对 Kir 通道的阻断作用, 还依赖于胞外的 pH 环境<sup>[14,15]</sup>, 因而我们还关注了胞外 pH 值对这一调控作用的影响。

### 弱酸环境 (pH=6.8) 下, Zn<sup>2+</sup> 对 Kir 通道的调控作用

如图 2A 所示, 在 pH 为 6.8 的 Ringer 氏液中, 记录到的一例 H1 水平细胞上的 Kir 通道介导的  $I_{Kir}$  为  $-2432.0$  pA; 施加  $2$  mmol/L  $Zn^{2+}$   $20$  s 后, 记录到的  $I_{Kir}$  减小为  $-1878.2$  pA; 经过  $60$  s Ringer 氏液的冲洗后,  $I_{Kir}$  恢复到  $-2237.4$  pA。图 2B 给出了 pH 为 6.8 时,  $2$  mmol/L  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  压抑效果的统计数据。由图中可以看出, 施加  $Zn^{2+}$  后,  $I_{Kir}$  减小到对照水平的  $79.0\% \pm 2.0\%$  (mean  $\pm$  SD,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ); 洗脱后, 恢复到对照水平的  $99.3\% \pm 6.2\%$  (mean  $\pm$  SD,  $P > 0.05$ ,  $n = 5$ )。

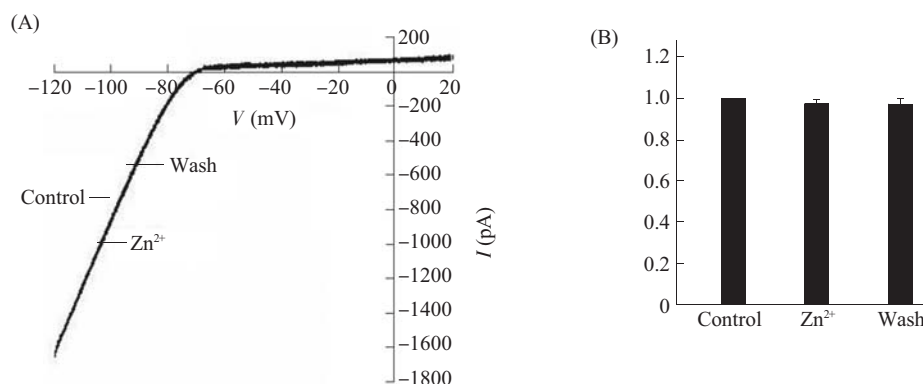


**图2  $Zn^{2+}$  对内向整流钾通道电流的压抑作用** (A) 在胞外 pH 为 6.8 时, 一例 H1 型水平细胞在对照、施加 2 mmol/L  $Zn^{2+}$  及洗脱情况下的电流 - 电压关系曲线图。(B) 以对照水平进行归一化的统计数据,  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  的抑制作用具有显著性(\* $P < 0.05$ , paired  $t$ -test,  $n = 5$ )

**Fig.2 The inhibition of  $Zn^{2+}$  on  $I_{Kir}$**  (A)  $I$ - $V$  relationship of an example H1 cell during control, 2 mmol/L  $Zn^{2+}$  application, and after  $Zn^{2+}$  washout (pH=6.8). (B) Normalized (against control) data of  $Zn^{2+}$  inhibition exerted on  $I_{Kir}$  (\* $P < 0.05$ , paired  $t$ -test,  $n = 5$ )

### 在弱酸环境 (pH=6.8) 下, $Zn^{2+}$ 调控作用的浓度依赖特性

进一步考察弱酸环境下 (pH=6.8), 不同浓度的  $Zn^{2+}$  (2  $\mu$ mol/L、20  $\mu$ mol/L、200  $\mu$ mol/L、1 mmol/L、2 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L) 对  $I_{Kir}$  的压抑程度。实验结果显示, 在弱酸环境下, 低浓度的  $Zn^{2+}$  (微摩尔级) 对  $I_{Kir}$  没有影响, 高浓度的  $Zn^{2+}$  (毫摩尔级) 对  $I_{Kir}$  的调控作用存在浓度依赖特性。图 3A 是一例 H1 型水平细胞上施加 2  $\mu$ mol/L  $Zn^{2+}$  前、后的电流 - 电压关系曲线图。如图所示, 施加  $Zn^{2+}$  以前, 在 Ringer 氏液中, 记录到的  $I_{Kir}$  为 -1660.5 pA; 施加 2  $\mu$ mol/L  $Zn^{2+}$  20 s 后, 记录到的  $I_{Kir}$  为 -1668.7 pA; 用 Ringer 氏液洗脱 60 s 后,  $I_{Kir}$  为 -1669.3 pA。如图 3B 统计数据所示, 施加低浓度的  $Zn^{2+}$  (2  $\mu$ mol/L),  $I_{Kir}$



**图3 低浓度(微摩尔级)的  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  没有影响** (A) 在胞外 pH 为 6.8 时, 一例 H1 型水平细胞上在对照、施加 2  $\mu$ mol/L  $Zn^{2+}$  和洗脱情况下的电流 - 电压关系曲线图。(B) 以对照水平进行归一化后, 统计数据显示  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  的压抑没有显著意义( $P > 0.05$ , paired  $t$ -test,  $n = 6$ )

**Fig.3 External  $Zn^{2+}$  in micromolar concentration has no effect on  $I_{Kir}$**  (A)  $I$ - $V$  relationship of an H1 cell during control, 2  $\mu$ mol/L  $Zn^{2+}$  application, and after  $Zn^{2+}$  washout (pH=6.8). (B) Normalized (against control) data show that effect of  $Zn^{2+}$  on  $I_{Kir}$  has no statistical significance ( $P > 0.05$ , paired  $t$ -test,  $n = 6$ )



为对照水平的  $97.5\% \pm 4.7\%$  (mean $\pm$ SD,  $n=6$ ), 这一变化与对照水平相比没有显著性差异 (paired  $t$ -test,  $P>0.05$ )。

当  $Zn^{2+}$  的浓度上升至  $20 \mu\text{mol/L}$  和  $200 \mu\text{mol/L}$  时,  $Zn^{2+}$  同样表现出对  $I_{Kir}$  没有任何作用。施加浓度为  $20$  和  $200 \mu\text{mol/L}$  的  $Zn^{2+}$ ,  $I_{Kir}$  分别为对照水平的  $94.0\% \pm 6.8\%$  (mean $\pm$ SD,  $P>0.05$ ,  $n=5$ ), 以及  $96.4\% \pm 1.7\%$  (mean $\pm$ SD,  $P>0.05$ ,  $n=4$ )。

当胞外  $Zn^{2+}$  浓度较高 (毫摩尔级) 时, 随着  $Zn^{2+}$  浓度的增加, 其对  $I_{Kir}$  的抑制效果增大 (见图 4, 表 1)。  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  的剂量 - 抑制效应曲线用方程  $y=1/(1+[Zn^{2+}]/IC_{50})^N$  进行拟合,  $y$  表示  $I_{Kir}$  被  $Zn^{2+}$  抑制后的大小 (以对照水平进行归一化);  $[Zn^{2+}]$  表示  $Zn^{2+}$  的浓度;  $IC_{50}$  是达到最大抑制效果一半时所需的  $Zn^{2+}$  的浓度;  $N$  是 Hill 系数。计算得到  $IC_{50}$  等于  $59.86 \text{ mmol/L}$ ,  $N$  等于  $0.37$ 。

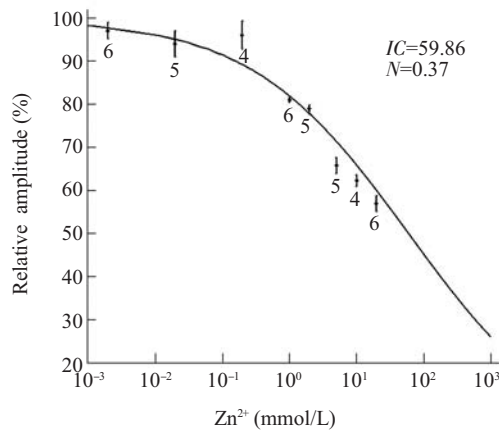


图 4  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  调控的浓度依赖曲线图(pH=6.8) 图中数据以 mean $\pm$ SE 的形式给出, 每个数据点下面的数字表示该浓度下的实验细胞个数  
Fig.4 The dose-dependent curve of  $Zn^{2+}$  effect on  $I_{Kir}$ . The data are plotted in mean $\pm$ SE. The numbers of cells tested at each concentration are also indicated

表 1 弱酸环境 (pH=6.8) 下,  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  调控的浓度依赖特性  
Table 1 The dose-dependence of  $Zn^{2+}$  effect on  $I_{Kir}$  at pH=6.8

	$Zn^{2+}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )			$Zn^{2+}$ (mmol/L)				
	2	20	200	1	2	5	10	20
Relative amplitude of $I_{Kir}$ (%)	$97.5 \pm 4.3$	$94.0 \pm 6.8$	$96.4 \pm 3.2$	$81.2 \pm 1.3$	$79.0 \pm 1.9$	$65.8 \pm 4.0$	$62.3 \pm 2.6$	$56.9 \pm 4.4$

在正常 pH 生理范围值 (pH=7.2) 时,  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  没有影响

当胞外 pH 值恢复到正常生理范围值 (pH=7.2) 时,  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  没有影响。当施加的  $Zn^{2+}$  的浓度为  $2 \mu\text{mol/L}$  时,  $I_{Kir}$  变为对照水平的  $102.0\% \pm 9.7\%$  (mean $\pm$ SD,  $P>0.05$ ,  $n=4$ ); 洗脱后,  $I_{Kir}$  恢复到对照水平的  $97.0\% \pm 4.4\%$  (mean $\pm$ SD,  $P>0.05$ ,  $n=4$ )。此外, 施加高浓度的  $Zn^{2+}$ , 对  $I_{Kir}$  也没有影响。施加  $2 \text{ mmol/L}$   $Zn^{2+}$  后,  $I_{Kir}$  变为对照水平的  $94.7\% \pm 2.7\%$  (mean $\pm$ SD,  $n=4$ ), 这一变化与对照水平相比没有显著性差异 (paired  $t$ -test,  $P>0.05$ ); 洗脱后,  $I_{Kir}$  恢复到对照水平的  $98.3\% \pm 5.7\%$  (mean $\pm$ SD,  $P>0.05$ ,  $n=4$ )。

## 讨 论

本文通过全细胞膜片钳技术,研究了胞外  $Zn^{2+}$  及环境酸碱性对视网膜 H1 型水平细胞上 Kir 介导的内向整流钾电流的调控特性,发现: 1) 当胞外为弱酸环境 (pH=6.8) 时,毫摩尔级浓度的  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  具有压抑作用,而微摩尔级浓度的  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  没有任何影响; 2) 当胞外 pH 为正常生理范围值 (7.2) 时,无论浓度高低,  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  均没有影响。

我们所记录到的鲫鱼视网膜 H1 型水平细胞上的 Kir 通道的平衡电位在  $-75$  mV 附近。在负于平衡电位时,内向电流随电压变化,两者呈线性关系;在正于平衡电位时,其外向电流很小,呈现出整流特性。此外, Kir 对胞外的  $Ba^{2+}$  敏感,几乎可以被毫摩尔级浓度的  $Ba^{2+}$  完全阻断。这些特性都与以往的相关报道相一致<sup>[12,16]</sup>。此外,本实验的结果表明,施加  $Zn^{2+}$  后,并没有引起平衡电位的变化,提示 Kir 对  $Zn^{2+}$  没有通透性。

鲫鱼视网膜 H1 型水平细胞上表达的电压门控性通道,除了 Kir 以外,还有电压依赖的钙离子通道和延迟整流钾通道等<sup>[7]</sup>,它们各自的激活电压临界值有所不同。有报道称,鳕鱼视网膜水平细胞上表达的电压依赖的钠离子通道、电压依赖的钙离子通道及延迟整流钾通道激活电压的临界值分别为  $-30$ 、 $-40$  和  $-20$  mV,且都随着去极化的过程被激活<sup>[8]</sup>。鲑鱼视网膜水平细胞上内向整流钾通道的激活临界值为  $-30$  mV,与电压依赖的钙离子通道发生部分重叠<sup>[9]</sup>。然而,本文实验中的  $I_{Kir}$ ,均是在电压为  $-120$  mV 下测得的,因此,本实验中所观察到的 Kir 通道电流可以排除其他电压门控离子通道的影响。Dixon 等<sup>[10]</sup>的研究发现,鲑鱼视网膜水平细胞上的内向整流钾通道不仅通透钾离子,同时还能够通透钠离子,使得钾离子的平衡电位朝正向偏移。本文实验中实际测得的平衡电位 ( $-75$  mV) 偏离预测值 ( $-85$  mV),可能就是由于上述原因引起的。

Kir 通道本身受到胞外 pH 的调控。酸性环境本身对 Kir 具有压抑作用<sup>[10]</sup>。本文实验中,对照组与  $Zn^{2+}$  实验组的 pH 保持一致。另外,从我们的实验数据来看,胞外 pH 为 6.8 与 7.2 时,对照组的  $I_{Kir}$  幅值均没有显著性差异 (数据未显示),因而可以排除  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  的压抑作用是单纯由 pH 降低引起的。

本文工作中,  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  产生压抑的  $IC_{50}$  等于  $59.86$  mmol/L,而  $Ba^{2+}$  对  $I_{Kir}$  产生压抑的  $IC_{50}$  低于  $0.1$  mmol/L<sup>[20,21]</sup>,表明  $Zn^{2+}$  与 Kir 通道蛋白结合的亲和性很低。根据我们的实验数据拟合得到的 Hill 系数为 0.37,表明  $Zn^{2+}$  结合位点数不大于 1,低于 Coulter 等人<sup>[15]</sup>关于爪蟾卵母细胞上异源表达的 Kir 通道的报道 (Hill 系数为 2.7)。这有可能是由于通道亚型不同及异源表达的通道发生变异所致。

Coulter 等人<sup>[15]</sup>在爪蟾卵母细胞上研究  $H^+$  与  $Zn^{2+}$  在异源表达的 Kir 通道上的结合位点时,发现 Kir 通道上存在一个氨基酸位点——第 117 位的组氨酸残基 (His117),它与  $H^+$  结合后,可以形成一种易于  $Zn^{2+}$  结合的分子构象。在 pH=6.0 时,组氨酸分子有 50% 质子化,有利于形成与  $Zn^{2+}$  稳定结合的分子构象,然而,在  $Zn^{2+}$  结合位点上,  $Zn^{2+}$  与  $H^+$  存在竞争关系<sup>[15]</sup>,过多的  $H^+$  会阻碍  $Zn^{2+}$  的结合;当 pH=7.0 时,质子化的组氨酸分子不到 10%,不利于形成稳定  $Zn^{2+}$  的分子构象;弱酸环境下 (pH 值介于 6.0~7.0),可能是一个较适中的环境,既为  $Zn^{2+}$  的结合提供分子构象,又保证有足够的  $Zn^{2+}$  结合于位点上。如此,便能够解释本文实验里  $Zn^{2+}$  在弱酸环境 (pH=6.8) 时对  $I_{Kir}$  产生压抑作用、而在 pH=7.2 时对  $I_{Kir}$  没有

任何影响的现象。

谷氨酸能的突触囊泡中含有大量的  $H^+$ ，使得囊泡中的 pH 呈酸性。例如在海马神经元中，检测到谷氨酸囊泡中的 pH 值为 5.5<sup>[22,23]</sup>。De Vries<sup>[24]</sup>在松鼠的视锥细胞里发现，囊泡中的  $H^+$  与谷氨酸可以同时从轴突末端释放到突触间隙，从而产生一种酸化的环境。视网膜胞外 pH 环境的变化，主要取决于明暗光的刺激<sup>[25]</sup>与生物钟节律<sup>[26]</sup>。在暗中，胞外 pH 环境偏酸性；在光照中，胞外 pH 环境偏碱性。

本文工作中， $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  产生压抑制作用的浓度为毫摩尔级。据估算，正常生理情况下，海马神经元的谷氨酸囊泡中， $Zn^{2+}$  的浓度可达到毫摩尔级，释放入间隙的  $Zn^{2+}$  小于  $300 \mu\text{mol/L}$ <sup>[27]</sup>。在病理情况下（如细胞缺血缺氧）， $Zn^{2+}$  会大量富集于细胞<sup>[28]</sup>，而这种现象是源于突触前谷氨酸能囊泡中过多  $Zn^{2+}$  的释放<sup>[29]</sup>，以及细胞膜上电压门控钙离子通道<sup>[30]</sup>、NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受体<sup>[31]</sup>、钙通透型 AMPA (amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) 受体<sup>[32]</sup>等离子通道对  $Zn^{2+}$  的通透。由于突触间隙是一个非常狭小的空间，因而只需要少量的离子就可以造成较大的浓度变化<sup>[33]</sup>。有报道称，虎蝾螈视网膜光感受器细胞的囊泡直径为  $35\sim 45 \text{ nm}$ <sup>[34]</sup>，经估算，每个囊泡中可包含上千个  $Zn^{2+}$ 。由于光感受器轴突末梢与水平细胞和双极细胞的突触所形成的突触间隙的容积为  $3\times 10^{-15} \text{ cm}^3$ <sup>[35]</sup>，突触间隙中仅增加一个囊泡便可以使突触间隙中的  $Zn^{2+}$  上升至毫摩尔级浓度。这些结果提示，高浓度（毫摩尔级）的  $Zn^{2+}$  可能存在于视网膜突触间隙中。

病理情况下，如细胞缺血缺氧时，组织进行无氧糖酵解，其产物乳酸可使胞外 pH 下降至呈酸性<sup>[25,36]</sup>，而且， $Zn^{2+}$  选择性地对神经元造成损伤<sup>[37,38]</sup>，高浓度  $Zn^{2+}$  的聚积可以促使神经元凋亡<sup>[28]</sup>。有研究发现，细胞处于去极化状态时，可以使胞外的  $Zn^{2+}$  通过电压依赖的钙离子通道进入到心肌<sup>[39]</sup>或神经细胞<sup>[40,41]</sup>内，而细胞保持超极化的状态可以阻止  $Zn^{2+}$  进一步进入到胞内<sup>[42]</sup>。于是推测， $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  产生压抑制可以降低细胞的兴奋性，从而阻止  $Zn^{2+}$  流入胞内介导细胞毒性作用。因而在弱酸环境下，高浓度的  $Zn^{2+}$  对  $I_{Kir}$  的压抑制，可能在病理情况下（如细胞缺血缺氧时）对保护神经元免于凋亡起一定的作用。

### 参考文献:

1. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron. *J Nutr*, 2000, 130(5): 1471~1483
2. Christine CW, Choi DW. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci*, 1990, 10(1): 108~116
3. Teisseyre A, Mercik K, Mozrymas JW. The modulatory effect of zinc ions on voltage-gated potassium currents in cultured rat hippocampal neurons is not related to Kv1.3 channels. *J Physiol pharmacol*, 2007, 58(4): 699~715
4. Wu SM, Qiao X, Noebels JL, Yang XL. Localization and modulatory actions of zinc invertebrate retina. *Vision Res*, 1993, 33(18): 2611~2616
5. Redenti S, Ripps H, Chappell RL. Zinc release at the synaptic terminals of rod photoreceptors. *Exp Eye Res*, 2007, 85(4): 580~584
6. Dong CJ, Frank SW. Inwardly rectifying potassium conductance can accelerate the hyperpolarizing response in retinal horizontal cells. *J Neurophysiol*, 1995, 74(6): 2258~2265
7. Kaneko A, Tachibana M. Effects of L-glutamate on the anomalous rectifier potassium current in horizontal cells of *Carassius auratus* retina. *J Physiol*, 1985, 358: 169~182
8. Jiang XD, Wang XL, Sun Y, Gong HQ, Liang PJ. NMDA modulation of GABA transporter current in carp retinal horizontal cells. *Brain Res*, 2008, 1240: 105~110
9. Sun Y, Jiang XD, Liu X, Gong HQ, Liang PJ. Synaptic contribution of  $Ca^{2+}$ -permeable and  $Ca^{2+}$ -impermeable AMPA



- receptors on isolated carp retinal horizontal cells and their modulation by  $Zn^{2+}$ . *Brain Res*, 2010, 1317: 60~68
10. Jonz MG, Barnes S. Proton modulation of ion channels in isolated horizontal cells of the goldfish retina. *J Physiol*, 2007, 581(2): 529~541
11. 鲁涛, 杨雄里. 鲫鱼视网膜水平细胞的分离、形态及生理特性. *神经解剖学报*, 1995, 11(4): 299~306  
Lu T, Yang XL. Carp retina horizontal cells: Dissociation, morphology and physiological characteristic. *Chin J Neuroanat*, 1995, 11(4): 299~306
12. Lu Z. Mechanism of rectification in inward-rectifier  $K^+$  channels. *Annu Rev Physiol*, 2004, 66: 103~129
13. Kuryshev YA, Haak L, Childs GV, Ritchie AK. Corticotropin releasing hormone inhibits an inwardly rectifying potassium current in rat corticotropes. *J Physiol*, 1997, 502: 265~279
14. Bertran GC, Kotsias BA. Blockade of the inward rectifier potassium currents by zinc and nickel ions in voltage-clamped toad muscles. *Life Sci*, 1997, 60(2): 119~125
15. Coulter KL, Perier F, Radeke CM, Vandenberg CA. Identification and molecular localization of a pH-sensing domain for the inward rectifier potassium channel HIR. *Neuron*, 1995, 15(5): 1157~1168
16. Newman EA. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci*, 1993, 13(8): 3333~3345
17. Tachibana M. Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. *J Physiol*, 1983, 345: 329~351
18. Malchow RP, Qian HH, Ripps H, Dowling JE. Structural and functional properties of two types of horizontal cell in the skate retina. *J Gen Physiol*, 1990, 95(1): 177~198
19. Dixon DB, Copenhagen DR. Metabotropic glutamate receptor-mediated suppression of an inward rectifier current is linked via a cGMP cascade. *J Neurosci*, 1997, 17 (23): 8945~8954
20. Hughes BA, Kumar G, Yuan Y, Swaminathan A, Yan D, Sharma A, Plumley L, Yang-Feng TL, Swaroop A. Cloning and functional expression of human retinal kir2.4, a pH-sensitive inwardly rectifying  $K^+$  channel. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 297(3): 771~784
21. Solessio E, Linn DM, Perlman I, Lasater EM. Characterization with barium of potassium currents in turtle retinal Müller cells. *J Neurophysiol*, 2000, 83(1): 418~430
22. Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 1998, 394(6689): 192~195
23. Sankaranarayanan S, De Angelis D, Rothman JE, Ryan TA. The use of pH fluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys J*, 2000, 79(4): 2199~2208
24. De Vries SH. Exocytosed protons feedback to suppress the  $Ca^{2+}$  current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron*, 2001, 32: 1107~1117
25. Oakley B 2nd, Wen R. Extracellular pH in the isolated retina of the toad in darkness and during illumination. *J Physiol*, 1989, 419: 353~378
26. Dmitriev AV, Mangel SC. A circadian clock regulates the pH of the fishretina. *J Physiol*, 2000, 522(Pt 1): 77~82
27. Assaf SY, Chung SH. Release of endogenous  $Zn^{2+}$  from brain tissue during activity. *Nature*, 1984, 308: 734~736
28. Cho E, Hwang JJ, Han SH, Chung SJ, Koh JY, Lee JY. Endogenous zinc mediates apoptotic programmed cell death in the developing brain. *Neurotox Res*, 2010, 17(2): 156~166
29. Park JA, Lee JY, Sato TA, Koh JY. Co-induction of p75<sup>NTR</sup> and p75<sup>NTR</sup>-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J Neurosci*, 2000, 20(24): 9096~9103
30. Freund WD, Reddig S. AMPA/ $Zn^{2+}$ -induced neurotoxicity in rat primary cortical cultures: Involvement of L-type calcium channels. *Brain Res*, 1994, 654(2):257~264
31. Koh JY, Choi DW. Zinc toxicity on cultured cortical neurons: Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, 1994, 60(4): 1049~1057
32. Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, Rao SS, Weiss JH. Preferential  $Zn^{2+}$  influx through  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 2414~2419
33. Kreitzer MA, Collis LP, Molina AJ, Smith PJ, Malchow RP. Modulation of extracellular proton fluxes from retinal horizontal cells of the catfish by depolarization and glutamate. *J Gen Physiol*, 2007, 130(2): 169~182
34. Bartoletti TM, Babai N, Thoreson WB. Vesicle pool size at the salamander cone ribbon synapse. *J Neurophysiol*, 2010, 103(1): 419~423
35. Raviola E, Gilula NB. Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits. *J Cell Biol*, 1975, 65(1): 192~222
36. 刘晓燕, 郑建全. 非选择性阳离子通道与缺血性脑损伤. *国际药学研究杂志*, 2009, 36(2): 95~99  
Liu XY, Zheng JQ. Non-selective cation channels and ischemic cerebral injury. *J Int Pharm Res*, 2009, 36(2): 95~99
37. Tonder N, Johansen FF, Frederickson CJ. Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia in the adult rat. *Neurosci Lett*, 1990, 109: 247~252
38. Medvedeva YV, Lin B, Shuttleworth CW, Weiss JH. Intracellular  $Zn^{2+}$  accumulation contributes to synaptic failure, mitochondrial depolarization, and cell death in an acute slice oxygen-glucosedeprivation model of ischemia. *J Neurosci*, 2009, 29(4): 1105~1114
39. Atar D, Backx PH, Appel MM, Gao WD, Marban E. Excitation-transcription coupling mediated by zinc influx through voltage-dependent calcium channels. *J Biol Chem*, 1995, 270: 2473~2477
40. Kerchner GA, Canzoniero LM, Yu SP, Ling C, Choi DW.  $Zn^{2+}$  current is mediated by voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels and enhanced by extracellular acidity in mouse cortical

- neurones. *J Physiol*, 2000, 528: 39-52
41. Sensi SL, Canzoniero LM, Yu SP, Ying HS, Koh JY, Kerchner GA. Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurones: Routes of entry. *J Neurosci*, 1997, 17: 9554-9564
42. Bloc A, Cens T, Cruz H, Dunant Y. Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic beta-cells: Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Physiol*, 2000, 529: 723-7347

## Modulation of Extracellular Zn<sup>2+</sup> on Inward-Rectifying Potassium Channel Expressed on H1 Type Horizontal Cell in Carp Retina

ZHANG Yating, SUN Yan, GONG Haiqing, LIANG Peiji

Department of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Communication by editorial board members (LIANG Peiji)

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (30870836) and Instrumental Analysis center of SJTU

Received: Mar 7, 2011 Accepted: Apr 26, 2011

Corresponding author: LIANG Peiji, Tel: +86(21)34204015, Fax: +86(21)34204016, E-mail: peiji@sjtu.edu.cn

**Abstract:** The Zn<sup>2+</sup> modulatory effect on inward rectifying potassium channel (Kir) was examined using whole-cell patch clamp technique. The main results of the present study are: 1) Zn<sup>2+</sup> at millimolar concentration has inhibitory effect on Kir currents when extracellular pH is 6.8, but micromolar concentration of Zn<sup>2+</sup> has no effect; 2) Zn<sup>2+</sup> has no effect on Kir currents when extracellular pH is in physiological range (pH=7.2). These results suggest that the modulatory effect of Zn<sup>2+</sup> on Kir currents is related to extracellular pH. Such Zn<sup>2+</sup> inhibitory effect on Kir currents may contribute to protect the neurons from apoptosis in condition of hypoxia/ischemia.

**Key Words:** Patch-clamp recording; Horizontal cell; Inward-rectifying potassium channel

**DOI:** 10.3724/SP.J.1260.2011.00617