

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00171

Na⁺, K⁺-ATP 酶在大鼠皮质神经元缺氧性损伤中的作用

董 惠¹, 李 彬¹, 郭 芳², 郭会彩², 王永利^{2*}, 李春岩^{1*}

1. 河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000

2. 河北医科大学药理学教研室, 石家庄 050000

[摘要] **目的:**探讨缺氧对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响, 以及高亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶和低亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶在缺氧损伤中的不同作用。 **方法:**通过切换低氧灌流液模拟大鼠脑片和原代培养的皮质神经元缺氧环境, 以脑片膜片钳全细胞模式记录 Na⁺, K⁺-ATP 酶电流和膜电流, 以可视化边缘探测系统测定培养的皮质神经元内钙离子浓度([Ca²⁺]_i), 观察缺氧 4 min 时脑片皮质神经元 Na⁺, K⁺-ATP 酶电流的变化, 以及缺氧 2、4、6、8 和 10 min 时在有、无哇巴因(Na⁺, K⁺-ATP 酶阻断剂)存在情况下皮质神经元膜电流密度和[Ca²⁺]_i的变化。 **结果:**缺氧 4 min 总 Na⁺, K⁺-ATP 酶电流密度(0.160±0.046 pA/pF)较缺氧前(0.265±0.068 pA/pF)显著降低($P<0.01$), 但 10 min 缺氧可时间依赖性显著升高皮质神经元的膜电流密度($r=0.9803$, $P<0.01$)和[Ca²⁺]_i($r=0.9734$, $P<0.01$); 10 μmol/L 哇巴因可通过抑制低亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶进一步增强此种缺氧所致的膜电流密度和[Ca²⁺]_i增大作用($P<0.05$ 或 0.01), 但 10 nmol/L 哇巴因则通过抑制高亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶显著降低缺氧对二者的增大作用($P<0.05$ 或 0.01)。 **结论:**Na⁺, K⁺-ATP 酶活性改变参与了皮质神经元的缺氧性损伤, 其中高亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶与皮质神经元缺氧性损伤保护作用有关, 而低亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶则与其缺氧性损伤有关。

[关键词] Na⁺, K⁺-ATP 酶; 缺氧; 神经元; 钙信号; 膜片钳术

[中图分类号] R 743.31

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)02-0171-06

Role of sodium pump Na⁺-K⁺-ATPase in hypoxic injury of cortical neurons in rats

DONG Hui¹, LI Bin¹, GUO Fang², GUO Hui-cai², WANG Yong-li^{2*}, LI Chun-yan^{1*}

1. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

2. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of hypoxia on the activity of Na⁺-K⁺-ATPase (Na pump) and to understand the distinct functions of high- and low-affinity Na pump during hypoxia of cortical neurons. **Methods:** Hypoxic condition was mimicked by perfusing cortical slices or culturing cortical neurons with low oxygen solution. Sodium pump current and membrane current of neurons from cortical slices were measured by patch-clamp technique in the whole cell mode and the intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) in cultured cortical neurons was examined by video based motion edge detection system. Changes of Na pump current induced by hypoxia were also examined 4 min after hypoxia in the neurons of cortical slices. Changes of membrane current and [Ca²⁺]_i were determined 0, 2, 4, 6, 8 and 10 min after hypoxia with or without Ouabain (Oua, inhibitor of sodium pump). **Results:** Total sodium pump current were significantly decreased 4 min after hypoxia ([0.265±0.068] pA/pF vs [0.160±0.046] pA/pF, $P<0.01$). Membrane current and [Ca²⁺]_i were increased in a time-dependent manner 10 min after hypoxia ($r=0.9803$ and $r=0.9734$, $P<0.01$). The effect of hypoxia on membrane current was abolished by tetrodotoxin (TTX, 1 μmol/L, a blocker of sodium channel). Oua at 10 μmol/L significantly promoted the hypoxia-induced increase of membrane current and [Ca²⁺]_i through inhibiting low-affinity sodium pump ($P<0.05$ or 0.01), and Oua at 10 nmol/L significantly depressed the increase of membrane current and [Ca²⁺]_i through inhibiting high-affinity sodium pump ($P<0.05$ or 0.01). **Conclusion:** Change of sodium pump activity is involved in hypoxic injury in rat cortical neurons. High-affinity sodium pump is related to the protection of hypoxic injury and low-affinity sodium pump is related to the hypoxic injury.

[KEY WORDS] Na⁺, K⁺-ATPase; hypoxia; neuron; calcium signaling; patch-clamp techniques

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2): 171-176]

[收稿日期] 2007-06-22

[接受日期] 2007-11-12

[基金项目] 河北省自然科学基金(C2007000796). Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province (C2007000796).

[作者简介] 董 惠, 博士生. E-mail: dong_jj@tom.com

* 通讯作者 (Corresponding authors). Tel: 0311-86266824, E-mail: li6019@126.com; Tel: 0311-87064024, E-mail: wangyl52@heinfo.net

缺血性脑血管病是威胁人类健康的主要疾病之一,脑缺血后无氧代谢代替有氧代谢,ATP生成减少,其生成效率仅为后者的1/18^[1],致使一些ATP依赖性的酶活性因能量衰竭而降低^[2],如Na⁺,K⁺-ATP酶。Na⁺,K⁺-ATP酶是目前所知强心苷类药物(cardiotonic glycosides,CG)的唯一受体,由细胞内ATP分解供给能量,控制Na⁺和K⁺跨膜转运,因而它不仅起着维持细胞容量及膜电位离子平衡的作用,而且参与体内水和电解质调节^[3]。根据对CG亲和力的不同,可将Na⁺,K⁺-ATP酶区分为高亲和力Na⁺,K⁺-ATP酶和低亲和力Na⁺,K⁺-ATP酶,生理条件下低亲和力Na⁺,K⁺-ATP酶主要维持神经元内外的离子梯度,而高亲和力Na⁺,K⁺-ATP酶主要参与神经元静息电位的恢复过程^[4]。有研究表明,昆虫运动神经元细胞膜在缺氧早期可快速瞬间去极化10~25 mV,而完全抑制Na⁺,K⁺-ATP酶功能则可阻断这种膜去极化^[5],此外,这种缺氧去极化和细胞外Na⁺和Ca²⁺减少同步出现^[6-8],进而造成细胞内Na⁺和Ca²⁺蓄积引起神经元缺氧性损伤。我们以前的研究证实,大鼠和沙土鼠全脑缺血后的Na⁺,K⁺-ATP酶活性明显降低^[7-8],且Na⁺,K⁺-ATP酶抑制是缺氧所致大鼠皮质神经元细胞内钙离子浓度([Ca²⁺]_i)升高的机制之一^[9],但是到底是高亲和力泵、还是低亲和力泵、或者二者共同参与此机制,目前尚不清楚。因此本实验采用脑片膜片钳记录Na⁺,K⁺-ATP酶电流和膜电流,以及可视化动缘探测系统测定原代培养皮质神经元测定[Ca²⁺]_i,以神经元的膜电流改变和[Ca²⁺]_i升高作为缺氧损伤指标,探讨高亲和力Na⁺,K⁺-ATP酶和低亲和力Na⁺,K⁺-ATP酶在缺氧损伤中的不同作用。

1 材料和方法

1.1 溶液 人工脑脊液(ACSF)(mmol/L):NaCl 123.8,KCl 3,MgCl₂ 1.2,NaH₂PO₄ 1.2,CaCl₂ 2,D-葡萄糖 10,NaHCO₃ 25,调节渗透压为310 mmol/L。使用前通以体积分数95% O₂和5% CO₂混合气饱和1 h,pH值在7.4左右,记录时持续通氧。脑片灌流液:以CdCl₂ 0.1 mmol/L和BaCl₂ 0.2 mmol/L替换2 mmol/L CaCl₂的氧饱和的ACSF;低氧脑片灌流液:以相同摩尔数的蔗糖代替正常灌流液中的葡萄糖,其他成分不变,使用前通以体积分数95% N₂和5% CO₂混合气饱和1 h,pH值在7.4左右,其氧分压(16.9 kPa)明显低于正常的ACSF(119 kPa),但主要的离子如Na⁺和K⁺浓度及pH值不

变,缺氧记录时持续通N₂。电极内液成分(mmol/L):Gluconic acid 125,TEACl 10,CsOH 125,MgCl₂ 2,NaCl 8,HEPES 10,EGTA 0.2,用CsOH调节pH值至7.2。培养神经元灌流液(mmol/L):NaCl 142.6,KCl 5.4,HEPES 10,MgCl₂ 2,D-葡萄糖 8,CaCl₂ 3,用NaOH调节pH值到7.4;培养神经元低氧灌流液:将培养神经元灌流液中的葡萄糖以相同摩尔数的蔗糖代替,灌流前以100% N₂饱和1 h,细胞缺氧时液体持续通N₂以保证气体分压不变。

1.2 脑片制备及固定 出生11~14 d SD大鼠(由河北医科大学实验动物中心提供),2%戊巴比妥钠麻醉(每只0.1 ml),将大鼠断头,快速取脑置于4℃ ACSF中切取额叶,采用振动切片机(Sutter,美国)在4℃和氧混合气条件下,切成300 μm厚的冠状切片,在室温[(25±2)℃]条件下用氧饱和充分的ACSF中孵育1 h后用于实验。

1.3 脑片全细胞膜片钳记录 采用盖网法将脑片固定在灌流槽中,灌流液流速约2 ml/min,通过红外线成像系统(Hammatsu photo,日本)选择合适的神经元,微电极操纵器(MP-285,Sutter,美国)调整带有正压的电极入水,电阻在5~7 MΩ,到达前脑内侧皮质V和VI层的大锥体细胞。负压吸引形成(>1 GΩ)封接,再以负压吸破细胞膜,随即补偿慢电容以及局部串联电阻,形成全细胞记录模式。整个实验在室温下进行,设置钳制电压为-65 mV。电极由四步玻璃微电极拉制仪(P97,Sutter,美国)拉制,并经热抛光。电流信号经Ag/AgCl电极引导,由膜片钳放大器(EPC-10,HEKA,德国)放大,滤波(频率2 kHz)后储存在计算机,刺激信号的控制、数据的采集和分析均由Pulse和PulseFit(HEKA,德国)完成。

1.4 缺氧对脑片皮质神经元Na⁺,K⁺-ATP酶电流(I_p)的影响 待膜电流稳定后,施以从-60 mV→0 mV→-60 mV(共30 ms)的去极化刺激,若能记录到钠电流,则表明此细胞为神经元,区分神经元和角质细胞。此时通过切换含有1 mmol/L哇巴因(ouabain, Ou_a;Sigma;是一种Na⁺,K⁺-ATP酶阻断剂)的正常灌流液或含有Ou_a 1 mmol/L的低氧灌流液,并于灌流后4 min时记录膜电流的内向移动,此Ou_a引起的电流内向移动幅度即为I_p。由于I_p大小与细胞的体积成正比,故常用细胞本身的电容(C_m)将Na⁺,K⁺-ATP酶电流标化为电流密度(I_p/C_m),比较正常和缺氧神经元Na⁺,K⁺-ATP酶电流密度的变化。

1.5 脑片皮质神经元Na⁺,K⁺-ATP酶在缺氧损

伤中的作用 Ouabain 浓度的选择:根据生理条件下 Ouabain 对 Na^+ , K^+ -ATP 酶抑制的量效关系^[9],我们选择了两个浓度,10 nmol/L 可抑制高亲和力 Na^+ , K^+ -ATP 酶,以及 10 $\mu\text{mol/L}$ 可部分抑制低亲和力 Na^+ , K^+ -ATP 酶。

选择脑片皮质神经元形成全细胞记录模式后,设置钳制电压为 -65 mV,在正常灌流液中测量膜电流值(I_0),一部分神经元换为低氧灌流液 10 min,并分别测量该细胞缺氧 2、4、6、8 或 10 min 后的膜电流值(I_n),另部分神经元分别灌以含有河豚毒素(tetrodotoxin, TTX, Sigma, 1 $\mu\text{mol/L}$)正常或低氧灌流液,重复以上步骤。其他神经元分别给予含 Ouabain 10 nmol/L 或者 10 $\mu\text{mol/L}$ 的正常灌流液,待膜电流重新稳定后再更换为含同样浓度 Ouabain 的低氧灌流液 10 min,并分别测量该细胞缺氧 0、2、4、6、8 和 10 min 后的 I_n 。按公式 $\Delta I = I_n - I_0$ 计算膜电流变化值(ΔI),比较不同缺氧时间的 $\Delta I/\text{Cm}$ 差异。

1.6 前脑皮质神经元培养 取 24 h 以内新生的 SD 大鼠脑,分离额叶皮质置于 D-Hanks 液中,剪成体积为 1 mm^3 的小块,0.125% 胰蛋白酶消化(37 $^\circ\text{C}$ 、25 min)分散后,用种植培养液(10% 马血清、10% 胎牛血清、80% DMEM)稀释成 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 密度的细胞悬液,接种于涂有多聚赖氨酸(0.1 mg/ml, Sigma)细胞培养板中,于 37 $^\circ\text{C}$ 、10% CO_2 的培养箱(Sanyo)内培养。24 h 后改用饲养培养液(98% Neurobasal、2% B27、谷氨酰胺 100 $\mu\text{g/ml}$)。以后每周换液 2 次,每次半量换液,细胞培养至 14 d 后用于实验。

1.7 缺氧对 Ouabain 所致培养皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的影响 培养的皮质神经元以 Fura-2-AM 10 $\mu\text{mol/L}$ (Sigma)37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min,挑选体积较大的大锥体神经元为实验细胞,采用双激发荧光光电倍增系统(ION OPTIX, 美国),通过 340 和 380 nm 激发光交替扫描,采集荧光信号(F_{340} 、 F_{380})。持续灌流正常灌流液使细胞荧光信号稳定后,切换含有 Ouabain 10 nmol/L 或 10 $\mu\text{mol/L}$ 正常灌流液,待荧光信号重新稳定后,再切换为含有同样浓度 Ouabain 的低氧灌流液,连续记录 10 min,计算缺氧前后 2、4、6、8 和 10 min 时神经元的荧光强度比值($\text{Ratio} = F_{340}/F_{380}$),比较不同时间点比值的变化(ΔRatio),以反映相对的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。或者在没有 Ouabain 存在的情况下,记录缺氧 0、2、4、6、8 或 10 min 时神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光值,比较 ΔRatio 。每部分实验记录 3 片细胞($n=3$),每片细胞记录 3 个细胞的荧光强度,以其平均值作为每片细胞的测定值。

1.8 统计学处理 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间

差异采用双因素方差分析,两组间比较使用 Student's t 检验,检验水准在 0.05 的基础上进行校正。

2 结果

2.1 脑片皮质神经元的鉴别 本实验中选用 V 和 VI 层较大的神经元,属于运动神经元范畴,体积均匀且形态一致,这些细胞成像清晰。在红外微分干涉相差技术下,可以清楚地看到神经元胞体形态和树突走行(图 1A)。鉴于神经元为可兴奋细胞能够产生动作电位,所以可记录到明显的内向钠离子通道电流(图 1B),胶质细胞不能产生动作电位,则无内向钠电流,确保记录的细胞是神经元。

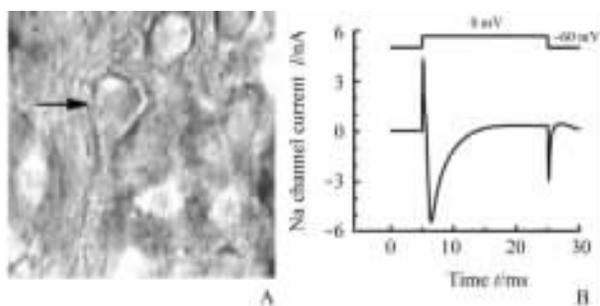


图 1 区分胶质细胞和神经元

Fig 1 Distinguishment of neurons from glial cells

A: Light photomicrograph of a pyramidal neuron (arrow, original magnification: $\times 400$) in cortical slice layer V using infrared differential interference contrast (DIC) optics; B: Na^+ channel current of the pyramidal neurons

2.2 缺氧对脑片皮质神经元 Na^+ , K^+ -ATP 酶电流的影响 离体皮质脑片缺氧 4 min 后, Na^+ , K^+ -ATP 酶电流降低(图 2)。缺氧前(0 min) Na^+ , K^+ -ATP 酶电流为 0.265 ± 0.068 pA/pF,而在缺氧 4 min 后 Na^+ , K^+ -ATP 酶电流显著降低,为 0.160 ± 0.046 pA/pF,显著低于缺氧前($P < 0.01$)。

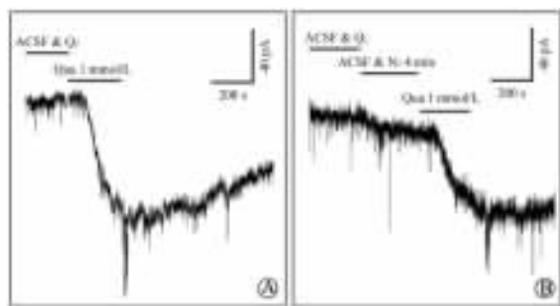


图 2 缺氧对脑片大锥体细胞 I_p 的影响

Fig 2 Effects of hypoxia on I_p of pyramidal neurons from cortical slices

A: Normal condition; B: 4 min after hypoxia

2.3 Na^+ , K^+ -ATP 酶在缺氧损伤中的作用 皮质脑片在正常灌流液条件下,其神经元膜电流水平在 10 min 内几乎维持不变,但缺氧 10 min,则神经元膜电流的内向移动逐渐增大,呈时间依赖性($r=0.9803, P<0.01$)。然而,若以含 TTX 的正常灌流液灌流神经元后再灌流含 TTX 的低氧灌流液,则可完全阻断缺氧所致的膜电流内向移动增大(图 3),说明缺氧刺激所改变的皮质神经元膜电流为钠离子通道的异常开放所致,提示钠电流增大可能是神经元缺氧性损伤指标之一。

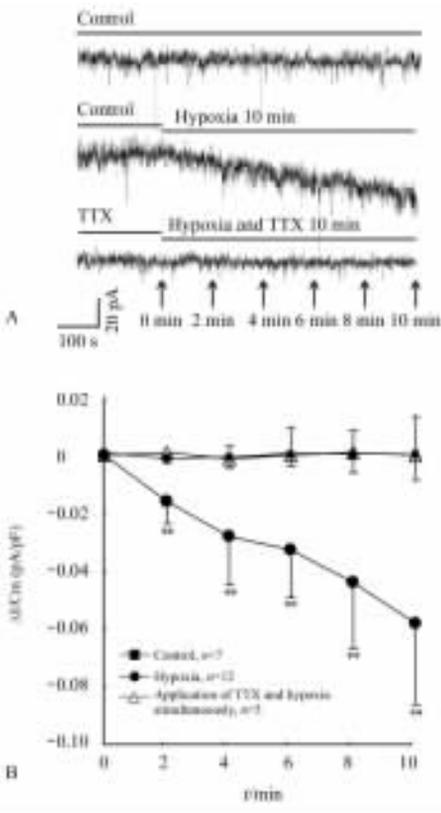


图 3 缺氧对皮质大锥体细胞膜电流的影响

Fig 3 Hypoxia-induced changes of membrane current in pyramidal neurons from cortical slices

A: Sample currents showing the protocol of hypoxia and TTX; B: Averages of $\Delta I/C_m$ after hypoxia and TTX. $** P<0.01$ vs 0 min

给予 Oua 10 $\mu\text{mol/L}$ 后可使膜电流有一个明显的下降($P<0.01$),此时再缺氧 10 min 可使膜电流进一步呈时间依赖性逐渐增大($r=0.9082, P<0.01$),于缺氧 2、4、6、8 和 10 min 时 $\Delta I/C_m$ 较缺氧前(0 min)明显增大($P<0.05$ 或 0.01),与单纯缺氧各时间点的值比较均明显增大($P<0.05$ 或 0.01)。但在给予 Oua 10 nmol/L 后缺氧 2、4、6、8 和 10 min, $\Delta I/C_m$ 分别较缺氧前(0 min)无明显改变,与单纯缺氧各时间点比较,缺氧 6、8 和 10 min 时其

$\Delta I/C_m$ 增加的程度明显减小($P<0.05$ 或 0.01),表明低浓度 Oua,即抑制高亲和力 Na^+ , K^+ -ATP 酶,可保护皮质神经元对抗缺氧性损伤,而高浓度 Oua 部分阻断低亲和力 Na^+ , K^+ -ATP 酶,加重了皮质神经元的缺氧损伤(图 4)。

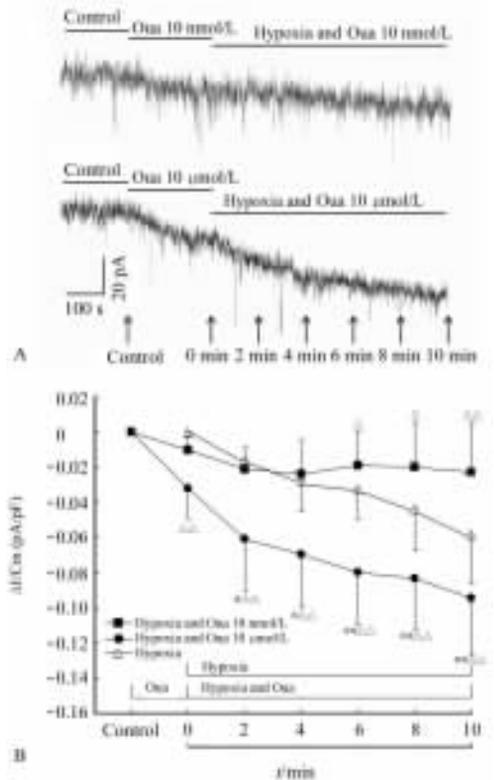


图 4 高浓度和低浓度 Oua 对缺氧所致皮质大锥体细胞膜电流增加的不同作用

Fig 4 Hypoxia-induced changes of membrane current in presence high or low concentrations of Oua

A: Sample currents showing the protocols of hypoxia and Oua; B: Changes of $\Delta I/C_m$ after hypoxia with Oua at different concentrations. $* P<0.05, ** P<0.01$ vs 0 min; $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$ vs hypoxia

2.4 Na^+ , K^+ -ATP 酶对缺氧所致培养皮质神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响 单纯缺氧可明显升高大锥体细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,且呈时间依赖性($r=0.9734, P<0.01$),与缺氧 0 min 比较,4、6、8 和 10 min 有明显差异($P<0.05$ 或 0.01)。在 10 nmol/L Oua 存在的情况下,缺氧 4、6、8 和 10 min 较缺氧前(0 min) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著升高($P<0.05$ 或 0.01),但缺氧 10 min 时其 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的程度明显低于单纯缺氧($P<0.05$)。在 Oua 10 $\mu\text{mol/L}$ 存在的情况下,与缺氧前(0 min)比较,缺氧后各时间点的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 均有明显增加($P<0.01$),而且与单纯缺氧各相应时间点比较, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的程度也显著增加($P<$

0.01),表明低浓度 Oua 可保护皮质神经元对抗缺氧所致的部分 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,而部分阻断低亲和力

Na⁺, K⁺-ATP 酶则加重了皮质神经元的缺氧损伤(图5)。

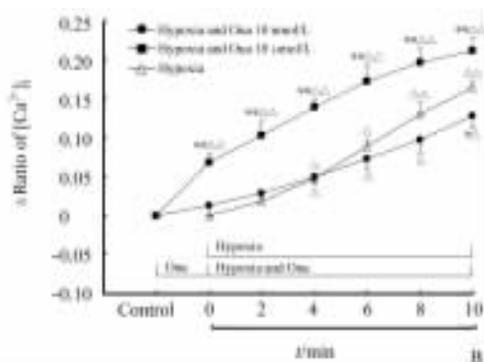
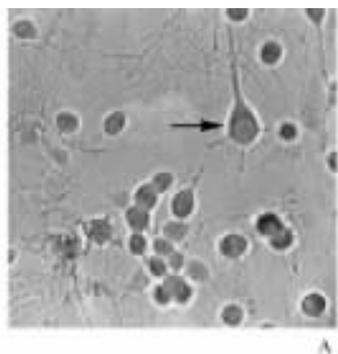


图5 高浓度和低浓度 Oua 对缺氧所致培养皮层神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响

Fig 5 Changes of $[Ca^{2+}]_i$ in cultured cortical neurons induced by hypoxia in presence of high and low concentrations of Oua

A: Light photomicrograph of cortical pyramidal neuron (arrow, original magnification: $\times 400$); B: Time-response relationship for the increase of $[Ca^{2+}]_i$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs hypoxia; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 0 min

3 讨论

离体脑片的电生理研究始于20世纪50年代,兼有在体脑和离体培养细胞共有的某些特点,且在某种程度上结合了二者的优点,因此本研究采用了离体脑片技术研究神经元 Na⁺, K⁺-ATP 酶的电生理特性。

脑片皮质神经元 Na⁺, K⁺-ATP 酶电流在缺氧早期4 min 时即明显减小,提示快速的瞬间缺氧即可抑制 Na⁺, K⁺-ATP 酶的离子转运功能。本实验中,缺氧可使脑片皮质神经元膜电流呈时间依赖性显著增大,但是此现象可被 TTX 阻断,推测是由于缺氧后能量耗竭,膜去极化,钠离子通道开放,细胞内钠离子浓度急剧升高,加重 Na⁺, K⁺-ATP 酶的转运负担,使 ATP 的消耗速度加快,Na⁺, K⁺-ATP 酶功能抑制程度加深,而缺氧的同时抑制钠离子通道的开放,可阻断此恶性循环,在缺氧短时间内(10 min)维持细胞内正常的钠离子浓度,缓解了 ATP 的过快消耗,使缺氧所致的 Na⁺, K⁺-ATP 酶功能降低表现的不明显。此外实验中消除了钾通道电流和钙通道电流的影响(电极内液中加入了 TEACl,并用 Cs⁺ 代替 K⁺,以阻断 K⁺ 电流;在细胞外液中加入了 BaCl₂ 和 CdCl₂,以分别阻断 K⁺ 电流和 Ca²⁺ 电流),故可以认为此时改变的神经元膜电流由细胞内外 Na⁺ 迁移造成的,这与目前普遍认为脑缺血、缺氧等异常条件下神经元 $[Na^+]_i$ 升高的理论相一致^[10]。此外本研究表明缺氧使皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,提示缺氧早期细胞内离子比例开始改变。

现已发现 Na⁺, K⁺-ATP 酶的 α 亚基分为4个

亚型($\alpha 1$ - $\alpha 4$),神经元上仅有 $\alpha 1$ 和 $\alpha 3$ 亚基,其中 $\alpha 1$ 为低亲和力结合亚基,可被 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Oua 部分抑制,而低浓度的 Oua 10 nmol/L 仅抑制 $\alpha 3$ 高亲和力结合亚基。Na⁺, K⁺-ATP 酶通过水解一个分子 ATP 将 3 个 Na⁺ 转运到细胞外,同时将 2 个 K⁺ 转运到细胞内,产生一个外向的电流,是维持质膜内外 Na⁺ 和 K⁺ 浓度梯度差的主动转运系统,这种梯度差为多种基本的细胞功能(控制膜电位、细胞体积、pH 平衡等)提供能量,而缺氧所致的神经元快速瞬间去极化可能来源于 Na⁺, K⁺-ATP 酶功能的抑制^[5]。不同类型的 α 亚基在不同组织和不同发育阶段特异表达,以适应不同的生理要求^[11],因而不同亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶的主要功能也存在差异。高亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶接受蛋白激酶调控^[12],与 Na⁺/Ca²⁺ 交换体偶联^[13-15] 调节 Ca²⁺ 信号,本实验结果中低浓度 Oua(10 nmol/L)抑制高亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶,可以明显减弱缺氧所致的 Na⁺ 内流(膜电流增加)和 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,提示低浓度 Oua 对神经元缺氧有保护作用,反过来也证明在缺氧刺激的早期,即可使高亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶功能改变,加速了神经元的缺氧损伤。低亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶作为“housekeeper”行使离子转运功能^[16],我们以前的研究表明高浓度 Oua 明显升高皮质神经元 $[Na^+]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_i$,说明低亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶维持细胞内外的 Na⁺ 和 K⁺ 梯度,有效调节 $[Na^+]_i$,进而精确调节胞内其他离子的浓度(如 Ca²⁺)^[9]。本实验中部分阻断低亲和力 Na⁺, K⁺-ATP 酶(10 $\mu\text{mol/L}$ Oua),加重缺氧所致的 Na⁺ 进

入神经元,且对缺氧所致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高作用明显,提示缺氧早期低亲和力 Na^+ , K^+ -ATP酶并没有被完全抑制,其抑制水平同样反映了缺氧性损伤的严重程度。不同浓度Oua抑制高亲和力或低亲和力 Na^+ , K^+ -ATP酶,对神经元缺氧性损伤的作用极不相同,这与心肌细胞对强心苷类药物的反应相似,低浓度毒毛苷1~10 nmol/L,即心衰的治疗浓度,可增强心肌的收缩力产生强心作用,而高浓度1~100 μ mol/L可导致心肌的不规律收缩,表现出毒性作用^[17]。因此区分不同浓度强心苷类药物对高亲和力和低亲和力 Na^+ , K^+ -ATP酶的不同作用,具有很实际的治疗意义,低浓度强心苷已经不仅仅是心衰的治疗方法,而且应该是众多神经保护剂的发展方向之一,参与脑血管疾病“鸡尾酒”疗法。

总之,本实验通过电生理的方法,对皮质大锥体细胞缺氧早期 Na^+ , K^+ -ATP酶电流进行记录,发现缺氧可抑制其离子转运功能,给予低浓度Oua抑制高亲和力 Na^+ , K^+ -ATP酶,可减弱神经元缺氧性 Na^+ 内流和 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,而给予高浓度Oua部分抑制低亲和力 Na^+ , K^+ -ATP酶,则加重了 Na^+ 内流和 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的程度,共同提示神经元缺氧早期抑制高亲和力 Na^+ , K^+ -ATP酶功能对神经元有保护作用,而抑制低亲和力 Na^+ , K^+ -ATP酶加重了缺氧损伤,说明 Na^+ , K^+ -ATP酶活性改变参与了皮质神经元的缺氧性损伤,以及高、低亲和力 Na^+ , K^+ -ATP酶在其中发挥了不同作用。

[参考文献]

- [1] La Noue K F, Duszynski J. Kinetic studies of ATP synthase; the case for the positional change mechanism[J]. J Bioenerg Biomembr, 1992, 24: 499-506.
- [2] Farber J L. Biology of disease—membrane injuring and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative hecrosis[J]. Lab Invest, 1982, 47: 114-123.
- [3] 吕卓人. 一种新的肾上腺皮质激素-内源性哇巴因[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14: 821-823.
- [4] Blaustein M P. Physiological effects of endogenous Ouabain; control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness[J]. Am J Physiol, 1993, 264: 1367-1387.
- [5] Corrone H L, Hue B, Pitman R M. Ionic mechanisms underlying depolarizing responses of an identified insect motor neuron to short periods of hypoxia[J]. J Neurophysiol, 1999, 81: 307-318.
- [6] Haddad G G, Mellins R B. Hypoxia and respiratory control in early life[J]. Ann Rev Phyto, 1984, 46: 629-643.
- [7] 郭芳, 齐亚娟, 王永利. 大鼠缺血性全脑损伤 Na^+ , K^+ -ATP酶活性及 α 亚基表达的变化[J]. 中国药理学通报, 2006, 22: 234-237.
- [8] 白剑, 王永利. 双苯氟嗪对沙土鼠急性脑缺血性脑水肿的影响[J]. 中华医学杂志, 2002, 82: 1130-1132.
- [9] 李石, 郭芳, 董惠, 王永利. Na^+ , K^+ -ATPase参与缺氧所致的大鼠皮质神经元钙升高[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 44-47.
- [10] Friedman J E, Haddad G G. Anoxia induced an increase in intracellular sodium in rat cortical neurons *in vitro* [J]. Brain Res, 1994, 663: 329-334.
- [11] Mobasher A, Avila J, C zar-Castellano I, Brownleader M D, Trevan M, Francis M J, et al. Na^+ , K^+ -ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions[J]. Biosci Rep, 2000, 20: 51-91.
- [12] Cornelius F, Mahmoud Y A. Themes in ion pump regulation [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 986: 579-586.
- [13] Juhaszova M, Blaustein M P. Na^+ pump low and high Ouabain affinity α subunit isoforms are differently distributed in cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94: 1800-1805.
- [14] Swift F, Tovsrud N, Enger U H, Sjaastad I, Sejersted O M. The Na^+ / K^+ -ATPase α 2-isoform regulates cardiac contractility in rat cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res, 2007, 75: 109-117.
- [15] Yamamoto T, Su Z, Moseley A E, Kadono T, Zhang J, Coughnon M, et al. Relative abundance of α 2 Na^+ pump isoform influences Na^+ - Ca^{2+} exchanger currents and Ca^{2+} transients in mouse ventricular myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 39: 113-120.
- [16] Monteith G R, Blaustein M P. Different effects of low and high dose cardiotonic steroids on cytosolic calcium in spontaneously active hippocampal neurons and in co-cultured glia[J]. Brain Res, 1998, 795(1-2): 325-340.
- [17] Su S W, Wang Y L, Li J X, et al. Relationship between cardiotonic effects and inhibition on cardiac sarcolemmal Na^+ , K^+ -ATPase of strophanthidin at low concentrations[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24: 1103-1107.

[本文编辑] 孙岩