

离子通道镶嵌点过程模型在 K^+ 通道研究中的应用^①周文清^② 李彩霞¹ 张吉力² 方积乾¹

(中山医科大学 1 卫生统计学教研室 2 生理教研室; 广州, 510089)

摘要 目的: 用作者提出的离子通道镶嵌点过程模型拟合海马锥体细胞钾离子单通道记录数据分析 17 β -雌二醇的效应。方法: 用协方差密度度量通道记忆, 从 3 个方面做拟合优度检验。结果: 该模型与观察资料拟合效果良好; 17 β -雌二醇能改变海马锥体细胞钾离子单通道的记忆; 17 β -雌二醇对关闭的影响比对开放的影响大, 从而表现为对通道具有抑制作用; 浓度为 10 nmol/L 组的 17 β -雌二醇对通道记忆的影响比对浓度为 0.1 nmol/L 组的大。结论: Markov 模型的常规分析只能得到 17 β -雌二醇对海马锥体细胞钾离子单通道具有抑制作用, 而用本模型分析能得到更多通道的信息。

关键词 钾通道; 模型; 统计学; 雌二醇

中图分类号 R 195.1; 329.5

Application of Embedded Point Process Model for Study on K^+ Channels

Zhou Wenqing Li Caixia Zhang Jie Fang Jiqian

(Department of Medical Statistics Public Health School, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: The model of stochastic point processes for ion channels proposed by the authors is used to fit the data recorded from the potassium channels in hippocampal neurons, and to analyze the effect of 17 β -estradiol. **Methods:** Covariance density of point processes is applied to assess quantitatively the memory in ion channels and three methods are applied for the goodness-of-fit test. **Results:** The goodness-of-fit test shows that the model is fit; 17 β -estradiol can change the memory of the potassium channels in hippocampal neurons; the effect of 17 β -estradiol on close is greater than that on open, and hence it shows an inhibitory effect; the effect of 10 nmol/L 17 β -estradiol on memory is greater than that of 0.1 nmol/L. **Conclusion:** Applying Markov model with routine method, we can only conclude the effect of 17 β -estradiol is an inhibitory one. While on the basis of the point process model, more information can be obtained than it.

Subject headings potassium channels; models, statistical; estradiol

在“离子通道镶嵌点过程模型”一文中, 我们把随机点过程理论用于离子通道活动的分析, 认为离子通道随机点过程由开放点过程和关闭点过程镶嵌而成。同时, 在 Fang 等^[1, 2] 提示的通道记忆性的基础上, 用点过程协方差密度度量通道记忆和描述通道活动的变化。本文用模型拟合海马锥体细胞钾离子单通道记录数据, 用于分析 17 β -雌二醇对

海马锥体细胞钾离子单通道活动的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 资料来源

由本文作者之一张吉力亲自收集, 系采用膜片钳技术的细胞贴附式方法记录海马锥体细胞钾离子

通道电流, 观察同一膜片上 17β-雌二醇作用前后单通道活动的变化。每次换药后 10 s 左右开始记录通道电流。室温保持在 20~27℃, 记录用玻璃微电极的电阻为 8~12 MΩ。封接过程同时通过倒置相差显微镜和微机监视。由计算机经膜片钳放大器探头发出指令电压, 反馈电流在计算机上直接测得。电极入水后首先清除接口电位, 然后在微电极操纵器驱动下达到细胞表面。稍加负压, 高阻密封可在瞬间形成。实验中仅选用封接电阻大于 5 GΩ 的细胞。高阻密封形成以后, 通过改变电极电压而控制电极下的小片细胞膜的跨膜电位, 即可在示波器上观察此膜片上的离子通道电流的变化, 这就是细胞膜贴附式记录。单通道电流经膜片钳放大器 (CEZ2300, Nihon Konden, 日本) 放大, 放大器探头反馈阻抗为 50 GΩ, 增益为 50 mV/Pa, 4 极低通滤波频率为 1~5 kHz。原始数据用 PCM 数字录像机记录在录像带上, 用带有 TL-1-125 接口的 125 kHz Lab-master DMA 数据采集系统和 5.5.1 版 pCLAMP 电信号分析软件包 (Axon Instruments, Inc.) 将录像带上的原始数据采入计算机, 得到单通道记录。所用 17β-雌二醇的浓度分别为 0.1 nmol/L 和 10 nmol/L, 每个浓度都有给药前记录作为对照, 共两组 4 个数据文件。

1.2 统计方法

模型的选择: 用 Akaike 信息准则 (AIC) 选出一个最优的模型。参数估计: 使用模式搜索法^[3] 和 Broyden 秩 1 算法^[3] 求参数极大似然估计的数值解, 所有计算均用自编 Fortran 78 程序在 Pentium 586/120 微机上实现。

拟合优度检验: 按照本文作者提出“离子通道镶嵌点过程模型”中第 3 部分介绍的 3 个方面, 对开放点过程、关闭点过程经随机时间变换后得到的点过程进行拟合优度检验。

协方差密度: 将估计的参数代回模型中, 通过数值解求满足积分方程组

$$\begin{aligned} \varphi_{rs}(\tau) = & \mu_s g_{rs}(\tau) + \int_0^\infty g_{rs}(\tau+v) \varphi_{ss}(v) dv + \int_0^\tau g_{rs}(\tau-v) \varphi_{ss}(v) dv \\ & + \int_0^\infty g_{rs}'(\tau+v) \varphi_{ss}'(v) dv + \int_0^\tau g_{rs}'(\tau-v) \varphi_{ss}'(v) dv \end{aligned} \quad (1.1)$$

的 $\varphi_{rs}(\tau)$ 数值解。

$$\text{其中, } r, s = 0, 1; s' = \begin{cases} 0, & \text{若 } s = 1 \\ 1, & \text{若 } s = 0 \end{cases}; \mu_0 \text{ 和 } \mu_1$$

分别是开放点过程和关闭点过程的平均发生率。

2 结果

2.1 模型的选择

通过 AIC 准则得到 0.1 nmol/L 17β-雌二醇组给药前后分别是 $K = 1$ 和 $K = 2$, 结果见表 1; 10 nmol/L 17β-雌二醇组给药前后分别是 $K = 1$ 和 $K = 3$, 结果见表 2, 可以验证, 这与通过似然比检验选择模型所得结果一致。

表 1 0.1 nmol/L 17β-雌二醇组给药前后的对数似然值 L 和 AIC 值

Table 1 Logarithm likelihood L and AIC value, before and after 0.1 nmol/L 17β-estradiol was given

K	Before		After	
	L	AIC	L	AIC
1	-997.515	2009.030 ¹⁾	-1942.439	3898.877
2	-995.680	2015.359	-1935.300	3894.599 ¹⁾
3	-994.113	2022.225	-1933.897	3901.793
4	-993.113	2030.225	-1932.750	3909.500
5	-990.304	2034.608	-	-

1) The minimum of AIC value; -, the iteration was divergent

表 2 10 nmol/L 17β-雌二醇组给药前后的对数似然值 L 和 AIC 值

Table 2 Logarithm likelihood L and AIC value, before and after 10 nmol/L 17β-estradiol was given

K	Before		After	
	L	AIC	L	AIC
1	-2560.862	5135.724 ¹⁾	-526.234	1066.469
2	-2556.087	5136.175	-514.669	1053.339
3	-2555.333	5144.666	-509.799	1051.598 ¹⁾
4	-2544.690	5165.380	-507.481	1058.961
5	-2544.143	5162.286	-507.032	1068.066

1) The minimum of AIC value

2.2 参数估计

对应模型的参数估计结果分别见表 3 和表 4。

表 3 0.1 nmol/L 17 β -雌二醇组给药前后模型的参数估计

Table 3 Estimation of model parameters before and after 0.1 nmol/L 17 β -estradiol was given¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)

	Before		After	
	$k = 1$	$k = 1$	$k = 1$	$k = 2$
a_{00}^k	-0.0621 \pm 0.0812	-0.0217 \pm 0.0043	-0.0117 \pm 0.0104	
a_{01}^k	0.5407 \pm 0.0973	0.8309 \pm 0.0512	0.0659 \pm 0.0076	
a_{10}^k	0.0614 \pm 0.0085	0.2152 \pm 0.0442	0.0449 \pm 0.0317	
a_{11}^k	-0.0340 \pm 0.0069	-0.1830 \pm 0.0596	0.0378 \pm 0.0099	
b_k	0.2056 \pm 0.1421	0.5548 \pm 0.2743	0.3237 \pm 0.0865	

1) Before: $v_0 = 0.0060 \pm 0.0005$, $v_1 = 0.0524 \pm 0.0077$ after: $v_0 = 0.0660 \pm 0.0009$, $v_1 = 0.0700 \pm 0.0017$; the standard deviations (s) were got from the inverse of Fisher's information matrix

表 4 10 nmol/L 17 β -雌二醇组给药前后模型的参数估计

Table 4 Estimation of model parameters before and after 10 nmol/L 17 β -estradiol was given¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)

	Before: $k = 1$		After: $k = 2$	
	$k = 1$	$k = 1$	$k = 2$	$k = 3$
a_{00}^k	-0.5704 \pm 0.0081	-0.0293 \pm 0.0066	-0.0293 \pm 0.0111	0.0105 \pm 0.0047
a_{01}^k	0.9392 \pm 0.0123	0.0675 \pm 0.0265	0.0084 \pm 0.0019	0.0037 \pm 0.0008
a_{10}^k	0.1183 \pm 0.0571	1.3326 \pm 0.0945	0.0886 \pm 0.0071	0.0033 \pm 0.0016
a_{11}^k	-0.0774 \pm 0.0031	-0.1557 \pm 0.0068	-0.1022 \pm 0.0163	0.0101 \pm 0.0065
b_k	0.3174 \pm 0.1624	0.5508 \pm 0.0488	0.3075 \pm 0.0954	0.0474 \pm 0.0035

1) Before: $v_0 = 0.0119 \pm 0.0033$, $v_1 = 0.0640 \pm 0.0058$ after: $v_0 = 0.0119 \pm 0.0074$, $v_1 = 0.1771 \pm 0.0126$; the standard deviations (s) were got from the inverse of Fisher's information matrix

2.3 模型的拟合优度检验

优度检验结果见表 5; 10 nmol/L 17 β -雌二醇组给药前后模型的拟合优度检验结果见表 6。

0.1 nmol/L 17 β -雌二醇组给药前后模型的拟合

表 5 0.1 nmol/L 17 β -雌二醇组给药前后模型的拟合优度检验

Table 5 Goodness-of-fit test for the model, before and after 0.1 nmol/L 17 β -estradiol was given

	Before		After	
	open point process	close point process	open point process	close point process
d	9.977 ($< \chi_{9,0.05}^2$)	11.126 ($< \chi_{9,0.05}^2$)	13.32 ($< \chi_{9,0.05}^2$)	11.78 ($< \chi_{9,0.05}^2$)
S_n	13933.01	14302.99	86601.14	8373098
(CI) ¹⁾	(13496.01, 16385.16)	(12325.62, 14638.81)	(80027.4, 89489.5)	(78470.66, 87748.70)
χ^2	4.45 ($< \chi_{7,0.05}^2$)	5.04 ($< \chi_{7,0.05}^2$)	7.32 ($< \chi_{15,0.05}^2$)	9.65 ($< \chi_{15,0.05}^2$)

1) CI denotes the 95% confidence interval of S_n

表 6 10 nmol/L 17 β -雌二醇组给药前后模型的拟合优度检验

Table 6 Goodness-of-fit test for the model, before and after 10 nmol/L 17 β -estradiol was given

	Before		After	
	open point process	close point process	open point process	close point process
d	12.52 ($< \chi_{9,0.05}^2$)	14.41 ($< \chi_{9,0.05}^2$)	9.19 ($< \chi_{9,0.05}^2$)	8.87 ($< \chi_{9,0.05}^2$)
S_n	115234.60	99830.95	4137.69	4022.15
(CI) ¹⁾	(106729.0, 118083.5)	(97698.9, 108092.6)	(3443.13, 4387.77)	(3457.07, 4411.72)
χ^2	8.96 ($< \chi_{15,0.05}^2$)	12.28 ($< \chi_{15,0.05}^2$)	5.02 ($< \chi_{7,0.05}^2$)	2.46 ($< \chi_{7,0.05}^2$)

1) CI denotes the 95% confidence interval of S_n

上面的拟合优度检验结果表明: 0.1 nmol/L 17 β -雌二醇组给药前后所选模型与观察资料拟合效果良好, 因此模型可以接受; 10 nmol/L 17 β -雌二醇

组给药前后所选模型与观察资料拟合效果良好, 因此模型可以接受。

2.4 协方差密度

我们按照《数学手册》中对 Fr 方程的线性代数方程组的逼近法^[4]来求积分方程组(1.1)的数值解。

分别计算两组给药后和给药前对应协方差密度函数之比值。0.1 nmol/L 组给药后开放点对开放点的协方差密度大约是给药前的 0.85~0.89 倍, 给药后关闭点对开放点的协方差密度大约是给药前的 0.82~0.84 倍, 给药后开放点对关闭点协方差密度大约是给药前的 1.27~1.29 倍, 给药后关闭点对关闭点协方差密度大约是给药前的 1.05~1.28 倍。10 nmol/L 组给药后开放点对开放点的协方差密度大约是给药前的 0.72~1.03 倍, 给药后关闭点对开放点的协方差密度大约是给药前的 0.60~1.58 倍, 给药后开放点对关闭点的协方差密度大约是给药前的 2.12~13.36 倍, 给药后关闭点对关闭点的协方差密度大约是给药前的 3.06~30.53 倍。说明给予 17 β -雌二醇后, 海马锥体细胞钾离子单通道记忆性发生改变, 10 nmol/L 组的变化比 0.1 nmol/L 组的变化大, 并且这种变化集中于关闭点过程, 使用关闭点事件提前出现, 而对开放点过程的影响较小, 从而延长了关闭时间, 缩短了开放时间, 说明 17 β -雌二醇对海马锥体细胞钾离子单通道具有抑制作用。

3 讨论

钾离子通道的开放可以保持膜电位的稳定性, 使膜电位接近钾的平衡电位, 并使其远离兴奋阈值。以往大量的研究发现, 17 β -雌二醇对外周和中枢神经系统(CNS)均具有快速作用。例如, 细胞内记录发现, 17 β -雌二醇可以引起垂体^[5]、下丘脑^[6]、海马^[7]神经元去极化并触发动作电位; 细胞外记录发现, 17 β -雌二醇可以引起下丘脑^[8]、海马^[9]神经元冲动发放率增加; 在海马脑片, 17 β -雌二醇可以引起 CA1 区动作电位群(population spike)幅度的增加^[10], 均表明 17 β -雌二醇对 CNS 的不同脑区存在兴奋性作用, 本次研究得到 17 β -雌二醇对海马锥体细胞钾离子单通道具有抑制作用, 与上述实验是一致的。

我们使用 pCLAMP 软件对上述两个处理组的 4 个 pCLAMP 记录数据进行计算, 计算结果表明: 17 β -雌二醇影响通道的平均开放时间, 并且这种影响是缩短通道的开放延长关闭, 从而表现为对通道具有抑制作用。

用本模型分析 17 β -雌二醇对海马锥体细胞钾离子单通道活动的影响, 分析结果表明: 17 β -雌二醇能改变海马锥体细胞钾离子单通道的记忆, 浓度为 10 nmol/L 17 β -雌二醇对通道记忆的影响比浓度为 0.1 nmol/L 时的大; 这种影响主要侧重于记忆对后继关闭性能的影响, 使得关闭点事件提前出现, 而对开放点过程的影响较小, 从而延长了关闭时间, 缩短了开放时间, 表现为对通道具有抑制作用。

用本模型分析 17 β -雌二醇的效应与用 pCLAMP 软件中统计模块的 Markov 模型的分析结果一致, 但是用我们的模型解释现象要比用 Markov 模型更深入细致, 从改变通道记忆性的角度讨论药物作用的机制, 得到 17 β -雌二醇是促使关闭点提前发生的, 对开放点的影响较小, 而 Markov 模型只能笼统地得到 17 β -雌二醇对海马锥体细胞钾离子单通道具有抑制作用的结论。

参 考 文 献

- 1 Fang J Q, Ni T Y, Fu C Z, *et al.*. Existence of memory in ion channels. *Acta Pharmacol Sinica*, 1995, 16(3): 213
- 2 Fang J Q, Ni T Y, Fu C Z, *et al.*. Two-state stochastic models for memory in ion channels. *Acta Pharmacol Sinica*, 1996, 17(1): 13
- 3 王德人. 非线性方程组解法与最优化方法. 北京: 高等教育出版社, 1984. 107
- 4 《数学手册》编写组. 数学手册. 北京: 高等教育出版社, 1979. 774
- 5 Dufy B, Vincent J D, Fleury H, *et al.*. Membrane effects of thyrotropin-releasing hormone and estrogen shown by intracellular recording from pituitary cells. *Science*, 1979, 204(2): 509
- 6 Minami T, Oomura Y, Nabekura J, *et al.*. 17 β -estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP. *Brain Res*, 1990, 519(1): 301
- 7 Wong M, Moss R L. Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid 17 β -estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Res*, 1991, 543(2): 148
- 8 Kelly M J, Moss R L, Dudley C A. The effect of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp Brain Res*, 1977, 30(2): 53
- 9 Kelly M J, Moss R L, Duddley C A, *et al.*. The specificity of the response of preoptic-septal area neurons to estrogen; 17 α -estradiol versus 17 β -estradiol and the response of extrahypothalamic neurons. *Exp Brain Res*, 1977, 30(3): 43
- 10 Teyler T J, Vadaris R M, Lewis D, *et al.*. Gonadal steroids; effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science*, 1980, 209(1): 1017

(1998-05-08 收稿 1999-01-06 修回)