

• 导师综述 •

离子通道门控动力学研究^①方积乾 刘向明^② 倪涛洋 胡性本^② 周文清^③ 游志颖 李彩霞

(中山医科大学公共卫生学院卫生统计学教研室; 广州市, 510089)

摘要 报道作者近期在离子通道动力学方面所作的研究工作。以膜片钳记录信号的自相关函数为基础,证实了离子通道记忆性的存在,并提出两状态非线性随机模型和镶嵌点过程模型,用于描述记忆性和门控动力学的特征,这样做可以克服 Markov 模型和分形模型所遇到的 3 项困难,即状态不可辨认性、开关判定的主观性和时间间隔疏漏。另外,作者还提出了连续分组平均时间检测法,帮助确定 Markov 模型中状态的个数,与多指数拟合法相比,此方法更直观和易于操作。

关键词 离子通道闸门; 模型, 统计学; 膜电位; Markov 链

中图分类号 R 329.25; 195.1

Studies on Gating Dynamics of Ion Channel

Fang Jiqian Liu Xiangming Ni Taoyang Hu Xingben Zhou Wenqing You Zhiying Li Caixia

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

Abstract The authors recent works on gating dynamics of ion channel were summarized in this paper. Based on the autocorrelation function of Patch Clamp recording, the existence of memory in ion channels was confirmed, and two-state nonlinear stochastic process models and embedded point processes models were proposed to describe the characteristics of memory and gating dynamics. As a result, three difficult problems of state-unidentifiability, subjectivity in defining open and close and time-interval omission met by the Markov models and fractal models can be overcome. In addition, the method of mean open durations of consecutive groups was proposed to determine the number of states for Markov models which is more intuitive and easier to operate, compared with the method of multi-exponential components.

Subject headings ion channel gating; models, statistics; membrane potentials; Markov chains

1 Markov 多状态模型和分形模型的缺点

离子通道在细胞内和细胞间信号传递中起着重要作用,利用片膜钳技术可记录到各类离子通道活动的电信号。从 70 年代后期起,人们开始着手分析单通道记录信号,从中总结一般结论,建立反映通道门控机制的数学模型,以定量的方式刻划通

道蛋白时而开启、时而关闭的动态特性,力求通过数理分析,在更深层次上认识通道门控的动作规律。在这些模型中,Markov 模型和分形(fractal)模型最引人注目,但这两类模型存在严重缺陷,难以自圆。

早期,主张用 Markov 模型刻划通道动力学的学者认为:离子通道只有开放与关闭两个状态,且两状态间不断转移,是转移强度为常数的 Markov 过程,可用单指数函数 ae^{-bt} ($a, b > 0$) 拟合开放

① 国家自然科学基金资助—39170222; 广东省自然科学基金资助—950306; ② 进修生,现地址:荆州市湖北职工医学院(434000);

③ 博士生,现地址:苏州工业园区公积金管理中心(215000)

(或关闭)持续时间的频数直方图。但在实践中很快发现,用单指数函数不都能较好地拟合单通道记录,有时用多个指数项的线性组合,即多指数函数才能取得较好的拟合效果。学者们据此又认为:这些单通道记录表面上看只存在开放与关闭持续时间这两种现象,但是通道可能不止开、关两个状态,或许存在着平均寿命不同的多种不同性质的开放状态与多种不同性质的关闭状态,状态间按照某种方式连接,以常数转移强度相互转移。按照这种观点建立的模型就是在离子通道动力学领域里流行的 Markov 多状态模型^[1]。然而,这种模型有 3 个根本性的缺陷,往往使研究者陷入困境。

①人们不能通过观察实验记录将各种开放(关闭)状态一一识别出来,无法确定状态个数及其连接方式,给建立模型造成了很大困难。目前,只能用具有不同项数的多指数函数,按照项数从少到多的顺序拟合持续时间频数直方图,由此寻求对实验资料的“最佳拟合”项数,将这个项数就作为通道所具有的开放(关闭)状态个数。

②需要凭经验主观设定区分“开”“关”的阈值,使“开放持续时间”和“关闭持续时间”的认定存在很大的主观性。由于检验水准是人为选定的,对于不同的检验水准,拟合同一单通道记录的多指数函数项数就可能不同;而对于同一水准,不同指数项的多指数函数也可能同样好地拟合同一单通道记录,这时要确定状态的数目,使人感到困惑。而确定状态间的连接方式,不确定性更大。

③限于测量的时间分辨力,两个相邻的开放时间或两个相邻的关闭时间点之间通道处什么状态却不得而知,但在计算持续时间时却都作为开放或都作为关闭处理,如此作法可能疏漏了短暂的开放或关闭,所得到的长开或长关可能是假象。这就是困扰研究人员的著名的时间间隔疏漏(time interval omission)问题。

Liebovitch 等^[2]在观察研究了角膜内皮细胞通道实验资料后发现:不同蛋白质构象间转化的时间历程表现出自相似的特性,即在一种时间尺度下测得的通道开放和关闭时间历程与另一种时间尺度下测得的相似,具有所谓分形特性。据此,他们用时间 t 的函数 $K_o = At^{1-D}$ 和 $K_c = A't^{1-D'}$ 作为通道开、关两种现象间相互转换的强度函数,建立了通道动力学的分形模型(其中 A 、 A' 是动力学设置点, D 、 D' 分别是离开关闭和开放的分形维数, D

≥ 1 , $D' \leq 2$)。分形模型不存在状态识别问题,但其应用范围受到对通道开关持续时间特性诸多要求的限制;而且,分形模型仍然没有摆脱时间区间疏漏的困惑。

2 研究工作及结果

我们于 1992 年承担了“细胞膜离子通道的动力学研究与神经生长因子等药物的影响”这一国家自然科学基金研究项目,在国内率先开展了离子通道门控动力学研究。此后又于 1995 年承担了广东省自然科学基金课题“细胞膜单离子通道的门控动力学研究”,现今已在门控动力学的非 Markov 模型研究及其参数估计方法,齐次 Markov 模型中通道门控状态的检测、建立模型及随机模拟,以及神经生长因子等药物对门控的影响和因此引起的参数变化规律的探索等方面作了一系列工作。

2.1 记忆性的存在与分类

为了克服多状态 Markov 模型中的“多状态”不能直接识别和状态间连接转移方式不易确定的缺陷,我们提出采用和实验现象一致的两状态模型,着重探求开放和关闭之间的转移规律,即用两状态非线性随机过程研究通道的门控机制。同时,为了避开时间疏漏问题,我们在国内外首次直接利用电流强度序列进行统计分析,提取通道门控活动的动态信息,为建立新的模型奠定基础^[3]。

我们计算了数值化的原始数据中电流值构成的时间序列的自相关函数,以及滤波后得到的 $0 \sim 1$ 序列的自相关函数。计算结果表明两个自相关函数几乎是一致的。接着我们发现有的自相关函数衰减较慢,有的衰减较快,较慢的反映“长期依赖性”,较快者反映“短期依赖性”。对照原信号来看,具有“长期依赖性”的信号开、关变化频繁,通道十分活跃,而具有“短期依赖性”的信号则往往是短开之后是长关,通道不甚活跃。我们分别定义了“长期记忆”和“短期记忆”两个概念;用模型 $\exp(-At)$ 和 $(Bt + 1)^{-C}$ 分别拟合自相关函数,以便判断通道有“长期记忆”还是“短期记忆”。前者拟合得好而后者拟合得不好则为“短期记忆”,反之,则为“长期记忆”。随机模拟研究结果表明,用模型 $\exp(-At)$ 拟合“短期记忆”情形所得参数估计值的稳定性良好,其分布呈正态,在一定程度上验证了该模型的正确性,也为参数的假设检验提供了基

础。

进一步,我们又用随机过程分别研究这两种情形。与“短期记忆”对应的实际上是转移强度为常数的两状态 Markov 模型;与“长期记忆”对应的是处于随机环境中的二状态 Markov 模型,转移强度为随机变量或时间的函数。

我们还提出了模型参数估计的方法,并且给出模型的物理解释:通道电流是复杂的蛋白质构型中渗出的无数“短期记忆”离子流的汇集^[4]。

我们的工作克服了多状态 Markov 模型状态识别的困难及模型构造复杂的缺陷,避开了开(关)持续时间测量中的开关阈值的主观设定和时间分辨力限制而产生的“时间间隔疏漏”问题。用随时间变化的转移强度描述开关状态的转移,实际上相当于把每时每刻的“开”、“关”都看成是不同的“开”、“关”,接近分形模型的思路,但比分形模型具体化,给出了随机过程的细节。

2.2 镶嵌随机点过程模型

最近,我们又首次应用随机点过程理论,研究通道的门控动力学,着眼于通道开放与关闭发生的时刻,把开放与关闭各自发生的时刻分别看作两个点过程,然后按一定规则镶嵌起来形成离子通道的随机点过程,并引入了反映关闭点对开放点产生影响和开放点对开放点产生影响的概念。为了研究通道记忆性,还引入了由开放点过程和关闭点过程形成的互激点过程的协方差密度 $\varphi_{oo}(\tau)$, $\varphi_{oc}(\tau)$, $\varphi_{co}(\tau)$ 和 $\varphi_{cc}(\tau)$, 用于度量在相隔时间间隔为 τ 的两个点事件的相关程度,描述通道的“记忆性”,反映通道门控活动的变化规律,克服了 Markov 模型和分形模型各自的局限性。并且,对有关的统计性质作了研究,将这种随机点过程模型应用于单通道实验数据分析,得到了较目前常规分析方法所能得到的更多的信息。例如用点过程模型分析 17 β -雌二醇对海马锥体细胞钾离子通道的影响,从药物作用机制上进行解释,认为 17 β -雌二醇能改变通道的记忆性;浓度为 10 nmol/L 的 17 β -雌二醇对通道记忆性的影响大于浓度为 0.1 nmol/L 的影响;这种作用侧重于改变记忆对后继关闭性能的影响,促使关闭点提前发生,而对开放点影响较小,从而延长了关闭时间,缩短了开放时间。相比之下,用 Markov 模型作分析只能笼统地得到 17 β -雌二醇对海马锥体细胞钾离子通道具有抑制作用。

2.3 离子通道门控动力学中其他问题的研究

我们在多状态 Markov 模型方面也做了一些工作^[5~8]。在对大量单通道数据分析计算的基础上,我们结合离子通道动力学领域里其他学者的研究成果,认识到许多通道的同一开放(关闭)状态通常会连续出现,进一步应用 Markov 过程理论分析可知,通道在每一状态中的逗留时间是服从指数分布的随机变量,因此,同一开放(关闭)状态的开放(关闭)持续时间是独立同指数分布的随机变量的取值。若将单通道记录中开放(关闭)持续时间按适当的个数分组,然后各组取平均,得到平均开放(关闭)持续时间,根据极限定理,在各状态下的平均时间应近似服从均值、方差各异的正态分布。将这种想法应用于持续时间存在相关的单通道记录分析,就得到确定通道状态个数的连续分组平均持续时间检测法。这个方法用正态分布密度函数线性组合拟合直方图,由正态密度项数确定状态个数,具有直观且易于操作的优点。我们还利用计算机模拟,证实了该方法的可靠性,并给出了实施步骤,保证了可行性。针对二状态 Markov 模型的情形,我们提出了确定“开”“关”阈值的最大 F 值准则,客观性较好,为正确辨别模型的状态提供了有效手段。此外,我们还对 PC12 细胞的 Markov 模型的建模、参数估计作了系统研究,为实际数据分析工作提供了借鉴。

参 考 文 献

- 1 Colguhoun D, Hawkes A G. On the stochastic properties of single ion channel. Proc Roy Soc Lond 3, 1981, 211; 205
- 2 Liebovitch L S, Fischbar J, Koniarek J P. Ion channel kinetics: a model based on fractal scaling rather than multi-state Markov Processes. Math Bico Sci, 1987, 84; 37
- 3 Fang J Q, Ni T Y, You Z Y, et al. Existence of memory in ion channels. Acta Pharmacol Sinica, 1995, 16(3); 213
- 4 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
- 5 胡性本,刘向明,樊 菁. PC12 细胞离子单通道开放状态的检测.生物数学学报,1996, 11(2); 56
- 6 刘向明,胡性本,方积乾.离子通道开放状态检测法的计算机模拟研究(I).生物数学学报,1996, 11(2); 60
- 7 胡性本,刘向明,方积乾.离子通道开放状态检测法的计算机模拟研究(II).生物数学学报,1997, 12(5); 450
- 8 刘向明,方积乾.PC12 细胞钾离子通道门控动力学随机建模与参数估计(I).生物数学学报,1998, 13(3); 372

(1998 - 05 - 06 收稿 1998 - 07 - 31 修回)