论著

文章编号:1000-5404(2005)16-1674-04

大鼠海马CA1区神经元P2X受体对ATP、suramin的反应

赵延东,阮怀珍 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究大鼠海马CA1区神经元P2X受体对ATP的反应和suramin、ivermectin (IVM)及低pH值对诱发电流的影响。**方法** 采用酶加机械分离法分离后7 d的Wistar大鼠海马CA1区锥体细胞,用膜片钳全细胞记录技术测定P2X受体激动剂ATP,阻断剂suramin,调节剂ivermectin(IVM)及低pH值(pH=6.5)对跨膜电流的作用。**结果** 分离神经元对P2X受体激动剂和阻断剂反应明显,P2X受体调节剂对不同细胞有不同的作用。**结论** 大鼠海马CA1区锥体细胞有丰富的P2X受体表达。细胞间P2X受体的表达类型有一定差别。

关键词: P2X受体;海马;膜片钳;ATP suramin

中图法分类号: R322.81;R329.27;R392.2 **文献标识码:** A

Response of P2X receptors in CA1 region of rat hippocampus to ATP and suramin

ZHAO Yan-dong, RUAN Huai-zhen (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ATP, suramin, ivermectin (IVM) and low pH value on pyramidal cells of rat hippocampus. **Methods** Pyramidal cells were rapidly dissociated from the hippocampus of 7-day postnatal rats by mechanical and enzymatic methods. Effects of ATP, suramin, IVM and low pH value on P2X receptor of neurons were studied by the technique of whole cell patch clamp. **Results** The transmembrane current was affected by ATP and suramin. There were different effects of IVM and low pH value on ATP induced current on different neurons. **Conclusion** There is extensive expression of P2X receptor on hippocampus pyramidal cells of rats. The expression of P2X receptors subunits are different among neurons.

Key words: P2X receptor; hippocampus; patch clamp; ATP suramin

早在1959年,就有人提出ATP是一种神经递质[1],而介导了ATP的快神经递质作用的是P2X受体。迄今为止已有7个配体门控的P2X($P2X_{1-7}$)受体亚型被克隆[2]。它广泛存在于中枢神经系统中,介导非选择性内向离子流,导致神经元的去极化。在大鼠海马CA1区也有丰富的P2X受体表达。该部位神经元所表达的P2X受体的单通道特性[3],ATP与其他神经递质的相互作用[4],P2X受体本身在长时程增强LTP[5]、神经元变性[6]中的作用以及各种物质对P2X受体功能的调节等都有了一些研究。本实验对海马CA1区锥体细胞P2X受体介导的离子通道的一般特性进行研究,同时对大鼠海马CA1区神经元表达的P2X受体进行亚型分析。

基金项目: 国家自然科学基金资助面上项目(30470557)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470557)

作者简介: 赵延东(1973-),男,天津市人,硕士,助教,主要从事神经电生理方面的研究。电话:(023)68752233

通讯作者: 阮怀珍,电话:(023)68752233

收稿日期: 2004-10-21;**修回日期:** 2005-01-05

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生后7 d的Wistar大鼠20只,体质量约10 g,雌雄不限,由本校实验动物中心提供。

1.2 试剂

人工脑脊液(artifical cerebrospinal fluid/ACSF, mmol/L)参考文献[7]介绍的方法:NaCl 126, KCl 2.5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 2, NaH_2PO_4 1.25, $NaHCO_3$ 2.6, D-glocuse 10,混合气(95% O_2 5% CO_2)饱和条件下用NaOH和HCl调pH至7.3~7.4;电极内液(mmol/L):葡萄糖酸钾145, $MgCl_2$ 2, K_2 ATP 5, EGTA 0.5, HEPES 5,用KOH和HCl调pH至7.2~7.3,0 22 μm微孔滤膜过滤分装后-20 ℃冻存备用。

1 mg/ml的胰蛋白酶(Trypsin)溶液用新鲜ACSF配成、1 mmol/L的suramin和梯度浓度的ATP(0.1、1、10、100、1 000 μmol/L)用生理盐水配制分装后-20 ℃冻存备用。0.1 mmol/Livermectin用二甲亚砜(DMSO)配制,分装后冻存备用。低pH值ACSF,正常ACSF用5MHCl调节到pH值=6.5。

葡萄糖酸钾、EGTA、K_2 ATP、suramin、ivermectin均为Sigma公司产品,HEPES为上海生工(AMRESCO分装)产品,其余为市售分析纯试剂。

1.3　膜片钳实验

1.3.1　大鼠海马 CA1 区锥体细胞的急性分离

参考文献[8]并结合本实验室经验分离获得单个神经元。大鼠快速断头取脑，在冰台上将双侧海马完整剥离，按垂直于海马长轴方向切成约 500 μm 的薄片，入室温(20～24 ℃)混合气饱和的 ACSF 中孵育 >30 min；在胰蛋白酶溶液中消化，37 ℃ 40 min；再次孵育 1 h 后在解剖显微镜下分出海马 CA1 区，取 2～3 片于盛有 1 ml ACSF 的离心管，用经热处理的尖端直径分别为 1、0.5、0.1 mm 的 Pasteur 吸管轻轻吹打成细胞悬液；静置 1 min 吸取上层细胞悬液加入自制的有机玻璃灌流槽中，待细胞贴壁后通以混合气饱和的 ACSF 灌流，将未贴壁的细胞及杂质冲洗干净即可进行膜片钳实验。

1.3.2　膜片钳记录

采用软质中性无芯玻璃管(直径 1.5 mm，长 10 cm)于拉制仪(Narishge，PC10)上拉制成尖端 1～2 μm 的微电极。充灌电极内液后阻抗为(8±2) MΩ。实验采用 Axopatch 200B 膜片钳放大器，Digidata1200 模数转换器和 pclamp 6(版本：6 0 4)记录和分析软件(均为 Axon 公司产品)。采样频率 10 kHz，滤波频率 2 kHz。选择贴壁牢固，表面光洁，突起完整的典型的海马锥体细胞进行膜片钳实验。形成全细胞记录后，立即记录静息膜电位(RMP)。然后转到电压钳连续记录模式下观察影响因素引起的膜电流的变化。除膜静息电位的测量以外，其余的指标均在膜钳制电压为 -60 mV 的条件下采集。

梯度浓度的 ATP 采用自制的多管微电极喷射给药装置给药；suramin、ivermectin 与低 pH 值 ACSF 采用灌流给药，低 pH 值情况下所用的 ATP 亦调节 pH 值至 6.5，suramin 用时用 ACSF 配成终浓度为 100 μmol/L，ivermectin 使用时用 ACSF 稀释到 5 μmol/L。

1.4　统计学处理

数据采用 SPSS 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　急性分离的海马 CA1 区神经元形态及基本电生理学特性

显微镜下，急性分离后完整的海马锥体细胞体积较大、胞体呈锥形或三角形，表面光洁，折光性好，有较完整的突起，见图 1，静息膜电位(RMP)为(-54.96±5.24) mV (n=45)。在有氧饱和 ACSF 灌流情况下完整的锥体细胞可维持几个小时仍具有良好活性。

2.2　ATP 及 suramin 对 P2X 受体的作用

我们选择典型的锥体细胞进行记录，用自制的多管微电极给药，以生理盐水做对照。结果显示对 ATP 有反应的细胞占总数的 95%(38/40)，ATP 浓度在 0.1 μmol/L 到 1 000 μmol/L 范围内与所诱发电流值之间有明显的量效关系。具体结果见图 2A 与表 1。记录结果用 pclamp9 软件进行分析显示电流类型均为慢反应电流。待细胞记录稳定后将灌流液换成 100 μmol/L suramin(母液用新鲜配制的 ACSF 稀释)灌流 2 min 以上，使灌流槽内 suramin 达到浓度平衡后喷射给予 1 mmol/L ATP，观察到内向电流被阻断，具体值为(-4.4±1.251) pA，与单独应用 1 mmol/L ATP 诱发的电流(-18.888 5±7.623 7)比较，差异具有显著性(P<0.01)。具体结果如图 2B 与表 1。

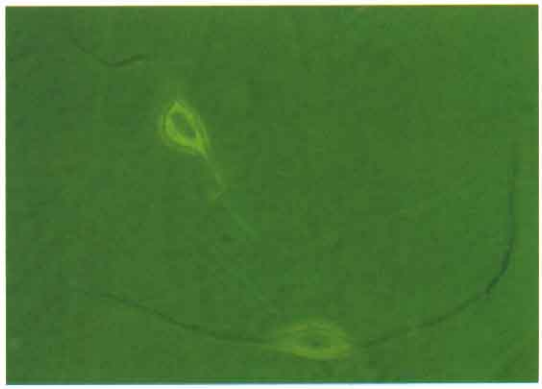


图 1　急性分离的海马 CA1 区锥体细胞　(相差显微镜×200)

Fig 1　Pyramidal cell of rat hippocampus in CA1 region

(Phase contrast microscope×200)

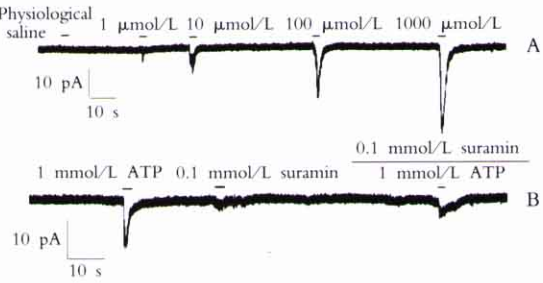


图 2　不同浓度 ATP 诱发的跨膜电流(A)及 suramin 的抑制作用(B)

Fig 2　Transmembrane currents evoked by ATP (A) and the inhibition effect of suramin (B)

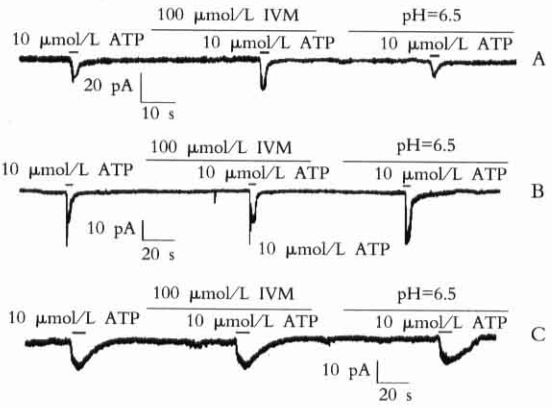
表 1　不同浓度 ATP 诱发的内向电流及 suramin 的抑制作用

Tab 1　Inward current evoked by ATP of different concentrations and the inhibition effects of suramin

Concentration(μmol/L)	Sample(n)	Mean (pA)	SD standard deviation
0.1	4	-2.025	0.613
1	7	-2.8	0.899
10	24	-10.24	4.571
100	14	-17.314	4.713
1 000	13	-18.8885	7.6237

2.3　ivermectin(IVM)和低 pH 环境对 P2X 受体的影响

在应用 P2X 受体调节剂 IVM(100 μmol/L)与低 pH(pH=6.5)的条件下，ATP(10 μmol/L)诱发的电流受其影响，结果主要有 3 种情况(n=23)：①IVM 对 ATP 诱发的内向电流有增强作用而低 pH 有抑制作用(65.2%　15/23)如图 3A；②IVM 对诱发电流几乎无影响而低 pH 有增强作用(17.4%　4/23)如图 3B；③IVM 和低 pH 对 ATP 诱发的电流几乎没有影响(17.4%　4/23)如图 3C。在所记录的细胞中，结果与细胞形态和大小无直接联系，各种结果的出现是随机的。



A: Enhancement of IVM and inhibition of low pH value on inward current evoked by ATP; B: No effects of IVM and enhancement of low pH value on inward current evoked by ATP; C: No effects of IVM and low pH value on inward current evoked by ATP

图3 IVM与低pH值对ATP诱发电流的影响

Fig 3 Effects of IVM and low pH value on inward current evoked by ATP

3 讨论

3.1 大鼠海马CA1区锥体细胞的急性分离

要分离得到理想的细胞要注意以下几个方面:断头取脑、剥离海马和切片要迅速并且最好在低温下进行,缩短组织在无氧气充灌环境下的时间;消化前和消化后都要有充足的孵育时间,一般不少于30 min;严格控制酶的浓度和消化的温度,根据老鼠的情况适当调节消化的时间;机械吹打制成细胞悬液过程中要轻、慢,在能获得足够细胞的前提下尽量减少吹打次数,以减小对膜受体的损伤。按照此方法分离得到的海马锥体细胞突起完整,表面光滑、折光性好,贴壁迅速牢固,细胞静息电位、串联阻抗及诱发动作电位等电生理指标正常、稳定。进行膜片钳实验时易于封接形成全细胞记录且维持时间长,对相关药物反应灵敏,说明细胞膜表面受体结构和功能保存完好,是进行膜片钳实验的理想细胞。

3.2 大鼠海马CA1区锥体细胞对P2X受体激动剂和阻断剂的反应

实验结果表明细胞对ATP的反应明显且迅速,在停止加药后内向电流也立即停止,这是配体门控离子通道的主要特征之一。在P2X受体阻断剂suramin存在的情况下,ATP诱发的内向电流被阻断,这进一步证明ATP诱发的内向跨膜电流是由P2X受体介导的。我们记录的40个细胞中有38个(95%)神经元对ATP有反应,可见P2X受体在大鼠海马CA1区锥体细胞表面有广泛的分布。除了介导ATP作为神经递质完成神经传导功能之外,它还在在海马长时程增强(LTP)形成[5]、缺氧条件下对神经元的保护[9]等方面发挥重要的生理功能。但是在病理情况下ATP从受损伤的细胞漏出等因素的影响会导致胞外达到较高的浓度[10]。suramin能有效地阻断P2X受体介导的去极化电流,基于这种特性,我们可以通过调节P2X受体激动剂与阻断剂的应用来实现对这种电流的调控,从而影响目的细胞的功能和状态。比如一些P2X受体阻断剂能防止谷氨酸导致的钙离子内流,降低兴奋性细胞毒性[11]。

3.3 大鼠海马CA1区锥体细胞表达P2X受体亚型的分析

P2X受体目前已知一共有7个亚型,除去共性以外,不同亚型还有各自的特性。这些特性也表现在不同的P2X受体对ATP和特定的调节剂有不同的反应。在我们实验所记录的结果中,根据这些电流特征对大鼠海马CA1区所表达的受体亚型进行初步分析。就ATP诱发电流的形态上分析都属于慢反应电流,这也就反映出在大鼠海马CA1区锥体细胞所表达的P2X受体不包括$P2X_1$、$P2X_3$这两种介导快反应电流的受体。在应用低pH值与IVM两种具有特异药理学特性P2X受体调节因素的情况下,不同的P2X受体亚型也有着不同的表现。低pH值能增强ATP对$P2X_2$受体的作用,而对其他的P2X受体则主要表现抑制作用[12]。IVM是谷氨酸门控氯离子通道的激动剂,同时它通过对$P2X_4$受体的变构效应而表现特异的激动作用。如果IVM能够增强ATP诱发的电流,则表示该神经元表达有$P2X_4$。凭借高度的特异性IVM可以作为一种药理学工具将$P2X_4$从其他P2X受体亚型中分离出来[13]。当然这些作用不仅表现在同聚体的受体,具有该种成分的异聚体也表现出相应的药理学特点。从我们的实验结果可以推断,大鼠海马CA1区锥体细胞中大65%左右表达有$P2X_4$受体;17%左右表达有$P2X_2$受体;而此区应该没有$P2X_1$与$P2X_3$两种受体亚型的表达。另外一部分神经元不能明确所表达的受体亚型,它们可能表达有其他亚型的受体或者是具有多种特性的异聚体。

在对P2X受体的研究中,ATP的作用也受到某些离子浓度,细胞生理状态等多种因素的影响。并且ATP除了作用于P2X受体外还作用于P2Y受体,这两种受体在同一细胞可以是共存的,P2X受体各亚型也可共存于同一细胞,这使ATP作为神经递质的作用研究更为困难。从ATP作为一种神经递质到P2X受体各个亚型基因的克隆再到对P2X受体的功能和调节因素及其生理功能研究,对P2X受体的认识正不断深入。但就目前研究所遇到的困难而言,对这一领域的探索任重而道远。

参考文献：

[1] Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves[J]. J Physiol, 1959, 145(3): 494-504.
[2] Burnstorck G, Brain F. Numbering of cloned P2 purinoceptors[J]. Drug Dev Res, 1996, 38: 67-71.
[3] Wong A Y, Burnstock G, Gibb A J. Single channel properties of P2X ATP receptors in outside-out patches from rat hippocampal granule cells [J]. J Physiol, 2000, 527(Pt 3): 529-547.
[4] Okada M, Kawata Y, Murakami T, *et al*. Interaction between purinoceptor subtypes on hippocampal serotonergic transmission using *in vivo* microdialysis[J]. Neuropharmacology, 1999, 38(5): 707-715.
[5] Pankratov Y V, Lalo U V, Krishtal O A. Role for P2X receptors in long-term potentiation[J]. J Neurosci, 2002, 22(19): 8363-8369.
[6] Amadio S, D'rosi N, Cavaliere F, *et al*. P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons[J]. Neuropharmacology, 2002, 42(4): 489-501.
[7] 宋承辉，胡志安，阮怀珍，等. 谷氨酸和GABA对额叶皮质锥体细胞自发性电活动的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(10)：858-861.
[8] 高秀萍，张 宇. 大鼠海马神经元急性分离法[J]. 山西医科大学学报，2003，3(3)：197-198.
[9] Aihara H, Fujiwara S, Mizuta I, *et al*. Adenosine triphosphate accelerates recovery from hypoxic/hypoglycemic perturbation of guinea pig hippocampal neurotransmission *via* a P(2) receptor[J]. Brain Res, 2002, 952(1): 31-37.
[10] Agteresch H J, Dagnelie P C, van den Berg J W, *et al*. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications [J]. Drugs, 1999, 58 (2): 211-232.
[11] Volonte C, Merlo D. Selected P2 purinoceptor modulators prevent glutamate-evoked cytotoxicity in cultured cerebellar granule neurons [J]. J Neurosci Res, 1996, 45 (2): 183-193.
[12] Stoop R, Surprenant A, North R A. Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors[J]. J Neurophysiol, 1997, 78(4): 1837-1840.
[13] Khakh B S, Proctor W R, Dunwiddie T V, *et al*. Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels[J]. J Neurosci, 1999, 19(17): 7289-7299.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2005)16-1677-01

个案与短篇

食管支架置入术的疗效及并发症防治

Therapeutic effect of esophageal stent and prevention and cure to complications

刘 辉，于 双，邹义端，王晴雷 （重庆三峡中心医院消化内科，重庆 404000）

收集我院2002-2004年31例经食管支架植入治疗食管癌、食管癌术后吻合口狭窄及癌性食管瘘的资料，对其疗效和并发症进行分析。

1 材料与方法

1.1 临床资料

31例患者，其中男20例，女11例，年龄51~81岁，平均67.5岁，均经胃镜下活检或手术切除后组织病理学检查证实为食管癌或癌性食管瘘。其中食管癌性狭窄25例（包括吻合口复发癌7例，合并食管瘘2例），食管癌术后吻合口狭窄6例。吞咽困难分级：0级：能进各种饮食；1级：能进软食；2级：能进半流质；3级：能进流质；4级：进流质及饮水均感困难。本组31例患者中2级7例，3级10例，4级14例，平均为3.23级。

1.2 器械

采用PENTAXEG-2940型胃镜；Savary-Gilliard全套扩张器；超滑导丝；常州智业微创医疗器械公司的镍钛记忆合金带膜支架及支架置入器。

1.3 手术方法

本组患者口服利多卡因胶浆后常规胃镜检查，了解病变部位、狭窄程度。然后在胃镜直视下经活检口送入导丝，轻柔地转动导丝方向使其通过狭窄段进入胃腔，保留导丝，退出胃镜。沿导丝送入Savary-Gilliard扩张器由细至粗渐次扩张，直至12~15 mm的扩张器能过。再次胃镜检查，核实、确定病变长度及病变上、下端距门齿的距离，有无食管穿孔，之后退出胃镜并根据狭窄段长度选择适当的支架，本组病例支架直径为16~20 mm，长度为60~120 mm，要求支架两端均超过狭窄段2~3 cm为宜，术前检查置入器中支架是否放置正确，观察置入器上刻度，计算出放置的深度。在导丝引导下将支架置入器送入预期位置，缓慢退出置入器外管，直至支架完全释放之后退出置入器和导丝。术后胃镜观察支架是否安放到位，上口与食管壁是否贴附完全。如果支架位置稍有向上或下的偏差，在胃镜直视下用拉钩或活检鼠齿钳进行调整。

2 治疗效果

本组31例患者中30例一次性置入成功，1例上段食管癌在放置支架后频繁呛咳，经X光造影排除穿孔，发现支架上口超过食管入口约1 cm，取出支架经抗炎治疗5 d后再次置入成功。2例食管癌并食管瘘患者，经置入带膜支架后迅速封堵瘘

（下转1689页）

作者简介：刘 辉（1962-），女，重庆市万州区人，副主任医师，主要从事食管炎方面的研究。电话：13206262203

收稿日期：2004-10-19；修回日期：2005-01-05