论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0922-03

大鼠前额叶皮层锥体细胞中 Orexin A 对谷氨酸介导电流的调节效应

张春青[1],夏建霞[2],陈鹏慧[1],胡志安[2] (第三军医大学基础医学部:[1]神经生物学教研室,[2]生理学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)锥体细胞中觉醒肽 orexin A 对谷氨酸受体电流的调节效应。**方法** 采用酶加机械分离法分离 10~14 d 鼠龄的 Wistar 大鼠 PFC Ⅴ、Ⅵ层锥体细胞,利用膜片钳全细胞记录技术记录 orexin A 对谷氨酸诱发的跨膜电流的影响。**结果** Orexin A 和谷氨酸均能以剂量依赖性的方式使 PFC 锥体神经元产生内向电流,将最大有效浓度 1 mmol/L 的谷氨酸诱发电流的幅值作为对照组(100%),灌流 1 μmol/L orexin A 孵育 4~10 s 后,再次给予 1 mmol/L 谷氨酸,诱发电流的幅值明显增大(46.59±15.19)% ($n=8$, $P<0.01$)。**结论** Orexin A 对 PFC 锥体细胞谷氨酸受体具有显著的正向调控作用。

关键词:Orexin;谷氨酸;觉醒

中图法分类号:R338.25;R338.8;R977.4 **文献标识码**:A

Regulation of glutamate current by orexin A on pyramidal neurons in rat prefrontal cortex

ZHANG Chun-qing[1], XIA Jian-xia[2], CHEN Peng-hui[1], HU Zhi-an[2] ([1]Department of Neurobiology, [2]Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the modulatory effect of orexin A on glutamate receptor-mediated current in the freshly isolated pyramidal neurons from the rat prefrontal cortex (PFC). **Methods** Deep layer (Ⅴ-Ⅵ) prefrontal cortical pyramidal neurons from postnatal 10 to 14 day-old Wistar rats were acutely dissociated by a combination of mechanical and enzymatic method. Subsequently, the effect of orexin A on the current induced by glutamate was studied by the technique of whole cell patch clamp. **Results** Both orexin A and glutamate dose-dependently evoked the inward transmembrane current. The current was evoked by 1 mmol/L glutamate as a control group(100%). After treatment with 1 mmol/L orexin A for 4-10 s, 1 mmol/L glutamate induced-current was increased by (46.59±15.19)% ($n=8$, $P<0.01$). **Conclusion** Glutamate receptor-mediated current is markedly potentiated by orexin A in the freshly isolated pyramidal neurons, which suggests that a synergistic action between orexin and glutamate systems exists in PFC.

Key words: orexin; glutamate; wakefulness

Orexin (Orexin A 和 B),即 hypocretin (hypocretin 1 和 2)主要是由外侧下丘脑特定神经元产生的小分子神经肽。Orexin 有两种 G 蛋白耦联受体,分别为 OX1R 和 OX2R。虽然 orexin 神经元的分布较为局限,但其纤维投射及受体分布却非常广泛,遍及多个脑区。Orexin 参与机体多种生理功能的调节,包括睡眠觉醒、能量稳态、神经内分泌、认知以及药物成瘾等[1,2]。

前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)是与觉醒相关的重要脑区,同时在认知、学习记忆等脑高级功能的发挥中起到重要的作用[3]。我室前期研究[4]表明 orexin 能直接兴奋 PFC 锥体神经元。谷氨酸是 PFC 中最重要神经递质之一,其介导的兴奋性突触传递与 PFC 的功能密切相关。我室前期研究发现,以去极化电位幅度和放电频率为衡量指标,orexin 与谷氨酸共同作用的反应强度大于二者单独作用于同一神经元之和[5],但是迄今尚少见文献报道通过记录神经元跨膜电流来具体量化这种效应,因此本实验采用膜片钳全细胞跨膜电流记录技术,以探究 orexin 对谷氨酸能递质系统的作用,旨在进一步揭示 orexin 在相关脑高级功能中的作用机制。

基金项目:国家自然科学基金(30370465)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370465)

作者简介:张春青(1980-),男,青海省乐都县人,硕士研究生,主要从事睡眠与觉醒方面的研究。电话:(023)68752232, E-mail: zhangchunqing0927@126.com

通讯作者:胡志安,电话:(023)68752254, E-mail: zhianhu@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-12-23;修回日期:2007-01-30

1　材料与方法

1.1　实验动物

新生 12～14 d 的 Wistar 大鼠 30 只，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 cerebro spinal fluid，ACSF）：NaCl 126，KCl 2.5，$CaCl_2$ 2，$MgCl_2$ 2，NaH_2PO_4 1.25，$NaHCO_3$ 2.6，D-glocuse 10，TTX 0.001 mmol/L，混合气（95% O_2 +5% CO_2）饱和后用 NaOH 和 HCl 调节 pH 至 7.3～7.4；电极内液：potassium gluconate 145，$MgCl_2$ 2，K_2 ATP 5，EGTA 0.5，HEPES 5 mmol/L，用 KOH 和 HCl 调节 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 胰蛋白酶用新鲜 ACSF 配成，谷氨酸（L-glutamate，Glu）和 orexin A 分别用去离子水配制成 10 mmol/L 和 10 μmol/L 母液分装后 -20 ℃冻存备用，实验当天用新鲜 ACSF 配制成终浓度。

Potassium gluconate，K_2ATP，EGTA，HEPES，胰蛋白酶，L-glutamate，orexin A，均为 Sigma 公司产品，TTX 为河北水产研究所产品，其余为市售分析纯试剂。

1.3　大鼠前额叶皮质神经元的急性分离

大鼠快速断头取脑，置入 0～4 ℃混合气饱和的 ACSF 中约 60 s，在冰台上将 PFC（前囟前 2.2～3.5 mm，旁开 0.8～1.2 mm，颅骨表面下 3～5 mm）按冠状面切成约 500 μm 的薄片，置入常温（20～24 ℃）混合气饱和的 ACSF 中孵育 1～6 h；在持续通混合气的胰蛋白酶溶液中消化 30～40 min，温度 37 ℃；消化结束后将脑片在 ACSF 中漂洗 3 次，再次在混合气饱和的 ACSF 中孵育 1 h，在深色背景下分出前额叶皮质的深（Ⅴ、Ⅵ）层，用经热处理的尖端直径分别为 1.0、0.5、0.1 mm 的 Pasteur 吸管轻轻吹打成细胞悬液，静置 1 min 左右，吸取上层悬液加入膜片钳操作台上的记录槽中，待细胞贴壁后用混合气饱和的 ACSF 灌流，将未贴壁的细胞及杂质冲洗干净即可进行膜片钳记录[4]。

1.4　膜片钳记录

采用软质中性无芯玻璃管（直径 1.5 mm，长 8 cm，南京泉水教学实验器材公司）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 Axonpatch 200B 膜片钳放大器，Digidata1200 模数转换器，pclamp6（版本：6.0.4）记录软件和 Clampfit 分析软件（均为 Axon 公司产品）。采样频率 10 kHz，滤波频率 2 kHz。选择典型的锥体样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，在电流钳下记到动作电位（action potential，AP）后，转到电压钳连续记录模式下观察影响因素引起的跨膜电流的变化。除膜静息电位的测量以及诱发 AP 外，其余的指标均在膜钳制电压为 -60 mV 的条件下采集。

1.5　给药方式

采用局部喷射给药装置给药，药品配成终浓度后加入给药装置中，药物通过尖端直径约 50 μm 的玻璃管给出。调节尖端与记录细胞的距离在 100 μm 以内，轻轻给予正压后可见足量的介质流过细胞表面。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计软件进行配对样本 t 检验。

2　结果

2.1　急性分离的 PFC 锥体神经元对谷氨酸的反应

相差显微镜下，状态良好的锥体神经元细胞表面光滑、立体感强，具有典型的形态特征：锥形或三角形的胞体，较长的顶树突和多个基树突。实验中给予阶跃刺激时，大部分所记录的神经元（n = 118/124，95.16%）可以产生 AP。

选择典型的锥体神经元进行全细胞记录，给药时以新鲜 ACSF 做对照。结果显示所有记录的神经元都对饱和浓度（1 mmol/L）的谷氨酸有反应，可产生典型的离子型通道介导的快反应电流，且至少在 10 min 内，此反应具有可重复性。在电压钳记录模式下，不同的谷氨酸浓度与所诱发的电流值之间有显著的量效关系，见图 1。

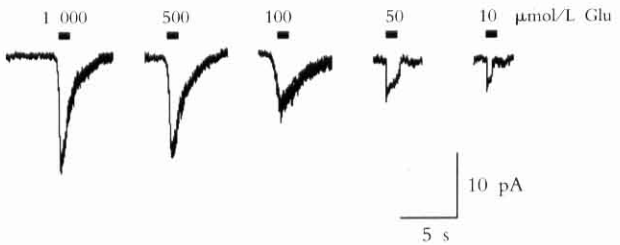


图 1　不同浓度的谷氨酸（Glu）诱发的跨膜电流（n = 4）

2.2　PFC 锥体神经元对 orexin A 的反应

选择细胞状态及电生理特性良好的 PFC 锥体神经元进行记录后发现，在对 orexin A 有反应的细胞中，10 μmmol/L，5 μmmol/L，1 μmmol/L，0.1 μmmol/L orexin A 诱发的电流幅值分别为（21.33±1.72）、（12.07±1.59）、（5.13±1.58）、（2.50±0.43）pA，orexin A 浓度与诱发的全细胞电流幅度呈现剂量依赖性的关系。见图 2。

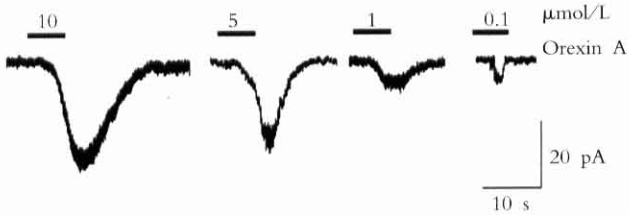


图 2　不同浓度的 orexin A 诱发的跨膜电流（n = 4）

2.3　急性分离的 PFC 锥体细胞中 orexin A 对谷氨酸诱发电流的影响

电压钳连续记录模式下，向状态良好的 PFC 锥体神经元表面快速喷射谷氨酸可诱发出典型的快反应电流，将最大有效浓度 1 mmol/L 的谷氨酸诱发电流的幅值作为对照组（100%），灌流 1 μmol/L orexin A 孵育 4～10 s 后，再次给予 1 mmol/L 谷氨酸所诱发电流的幅值明显增大（46.59±15.19）%（n = 8，P < 0.01）（图 3）。

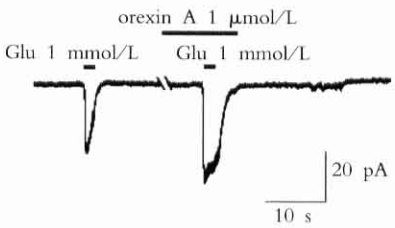


图3 OrexinA 对谷氨酸诱发的跨膜电流的影响(n=8)

3 讨论

Orexin 广泛参与了机体内多种生理功能的调节，其中最显著的作用是促觉醒功能，有“觉醒调节开关”之称。随着社会进步以及生活节奏的加快，与觉醒能力下降(即觉醒不良，arousal deficit)有关的社会问题日渐凸显，对觉醒机制的探究逐渐成为国内外学者研究的热点。

觉醒能力的维持是觉醒调节系统功能的体现，众多而分散的觉醒调节系统最终则在下丘脑外侧区 orexin 系统的统一调控下，发出上行纤维投射到皮层，从而达到皮层兴奋和觉醒状态维持。已往研究表明，orexin 的促觉醒作用主要是由调节皮层下觉醒系统的相关位点来实现[2]。然而最近我室研究结果显示，orexin 对 PFC 亦具有直接的兴奋效应，这一发现强烈提示，orexin 不仅通过皮层下觉醒系统促发和维持觉醒，而且也能通过纤维投射直接作用于大脑皮层神经元，引起皮层兴奋和觉醒的维持[4,6]。

皮层是觉醒调节系统的最终靶区，尤其是 PFC 在觉醒，认知，记忆等脑高级功能以及这些脑功能的整合中发挥着重要作用。我们知道，PFC 的功能是由多种神经递质和调质共同介导的。在 PFC 中，谷氨酸能递质系统发挥着极其重要的作用[3]。以往的研究表明，脑内多种递质系统能够通过调节 PFC 中谷氨酸递质系统的活动来调控 PFC 的功能，例如 5-HT 能够通过 5-HT1A 受体下调谷氨酸系统的兴奋性，从而降低 PFC 的兴奋性[7]；而多巴胺能够通过 D1 受体增强谷氨酸受体介导的兴奋性效应[8]。Orexin 作为新型的神经递质，同样能够调节脑内谷氨酸递质系统的活性，如 orexin 能够增强腹侧被盖区多巴胺能神经元上谷氨酸受体的功能[9]；而在伏核，orexin 则能下调神经元上谷氨酸受体的功能[10]；因此，我们非常关注 orexin 对 PFC 神经元上谷氨酸系统的调节效应。我室前期研究中通过观察 PFC 锥体神经元放电情况发现，orexin A 与谷氨酸之间呈现协同效应，但是未将这种效应量化[5]。因此在本研究中，我们以神经元的跨膜电流作为观测指标，量化这种非线性整合现象。我们发现给予有效剂量的 orexin A 后，与对照组相比神经元上谷氨酸诱发的跨膜电流增大(46.59 ± 15.19)%，表明 orexin 对 PFC 锥体神经元的谷氨酸受体具有显著的正向调控作用。

鉴于 orexin 能系统和谷氨酸能系统在 PFC 维持觉醒中的重要作用，我们的研究结果可能揭示了 orexin 在皮层水平调控觉醒能力的一种新模式：orexin 在细胞水平上调谷氨酸受体系统的活性，易化神经元的兴奋性，与脑内的谷氨酸能系统以协同作用的方式进一步增强 PFC 的兴奋水平。Orexin 上调 PFC 谷氨酸系统活性的机制可能涉及：促进神经元上的谷氨酸受体磷酸化；改变谷氨酸受体亚基表达；加速神经元内谷氨酸受体的合成以及促进谷氨酸受体向膜表面的表达等[9]。

结合本室前期的研究，本实验结果强有力的提示了，orexin 系统可以以不同的方式直接作用于大脑皮层，引起皮层兴奋和觉醒的维持。进一步地，我们将试图阐明这种协同作用的信号机制，并探究在体条件下 orexin 能否通过直接兴奋皮层神经元参与促觉醒作用。

参考文献：

[1] de-Lecea L, Jones B E, Boutrel B, *et al*. Addiction and arousal: alternative roles of hypothalamic peptides[J]. J Neurosci, 2006, 26(41): 10372 - 10375.

[2] 陈伯成，赵红梅，谌小维，等. Orexin A 对麻醉大鼠前额叶皮层神经元单位放电的影响及其机制研究[J]. 第三军医大学学报，2007, 29(2): 105 - 107.

[3] Lambe E K, Aghajanian G K. Hypocretin (orexin) induces calcium transients in single spines postsynaptic to identified thalamocortical boutons in prefrontal slice[J]. Neuron, 2003, 40(1): 139 - 150.

[4] Song C H, Xia J X, Ye J N, *et al*. Signaling pathways of hypocretin-1 actions on pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex[J]. Neuroreport, 2005, 16(13): 1529 - 1533.

[5] Song C H, Chen X W, Xia J X, *et al*. Modulatory effects of hypocretin-1/orexin-A with glutamate and gamma-aminobutyric acid on freshly isolated pyramidal neurons from the rat prefrontal cortex[J]. Neurosci Lett, 2006, 399(1 - 2): 101 - 105.

[6] 贾晓军，王艳芳，赵红梅，等. Orexin-A 对急性乙醇中毒昏迷大鼠的实验性促醒疗效研究[J]. 第三军医大学学报，2006, 28(8): 750 - 752.

[7] Yuen E Y, Jiang Q, Chen P, *et al*. Serotonin 5-HT1A receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism[J]. J Neurosci, 2005, 25(23): 5488 - 5501.

[8] Tseng K Y, O'Donnell P. Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms[J]. J Neurosci, 2004, 24(22): 5131 - 5139.

[9] Borgland S L, Taha S A, Sarti F, *et al*. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine[J]. Neuron, 2006, 49(4): 589 - 601.

[10] Martin G, Fabre V, Siggins G R, *et al*. Interaction of the hypocretins with neurotransmitters in the nucleus accumbens[J]. Regul Pept, 2002, 104(1 - 3): 111 - 117.

(编辑 栾 嘉)