文章编号:1000-5404(2008)10-0903-03

论著

腺苷对小鼠前额叶皮质锥体细胞超极化激活阳离子电流的影响

闫 洁,陈 芳,贾晓军,李 博,谌小维,胡志安 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 应用膜片钳全细胞记录技术,探讨腺苷对小鼠前额叶皮质锥体细胞的超极化激活阳离子电流(hyperpolarization-activated cation current,IH)的影响。**方法** 制备小鼠前额叶皮质脑片,在膜片钳全细胞记录模式下,观察腺苷对锥体细胞 IH 的调节作用。**结果** 记录的43个细胞中有41个观察到 IH;腺苷能够使该电流幅度减小,并使 I-V 曲线显著下移($P<0.01$,$P<0.05$),此效应呈剂量依赖性($P<0.05$)。**结论** 腺苷具有抑制前额叶皮质锥体细胞 IH 的作用。

关键词: 前额叶皮质;腺苷;超极化激活阳离子电流
中图法分类号: R322.81;R329.25;R338.8 **文献标识码:** A

Adenosine inhibits hyperpolarization-activated current in the pyramid neurons of prefrontal cortex

YAN Jie, CHEN Fang, JIA Xiao-jun, LI Bo, CHEN Xiao-wei, HU Zhi-an (Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of adenosine on hyperpolarization-activated current (IH) in the mouse pyramid neurons of prefrontal cortex (PFC). Methods The pyramid neurons of Kunming mice were selected from PFC slices by infrared visual patch clamp technique. The effect of adenosine on IH in these cells was studied using the whole cell configuration. Results IH currents evoked by hyperpolarization were observed on 41 (95.35%) of the 43 recorded neurons. Adenosine reduced the amplitude of IH in a concentration-dependent manner (10 – 100 μmol/L), and caused a negative shift in the voltage dependence of IH activation. Conclusion The IH in PFC pyramid neurons can be inhibited by adenosine.

Key words: prefrontal cortex; adenosine; hyperpolarization-activated current

腺苷是一种在体内广泛存在的嘌呤核苷酸,它是能量代谢的中间产物,在中枢神经系统由神经元与神经胶质细胞释放到细胞外。腺苷具有抑制神经递质释放,使静息膜电位超极化等功能,是一种抑制性神经调质。腺苷及其受体参与机体多种生理功能的调节,在睡眠觉醒周期中,被视为稳态因子,对促进睡眠起着重要作用[1,2]。

大脑皮层是睡眠-觉醒调节系统的最终作用靶区,尤其是前额叶皮质在认知、思维等高级功能中发挥着重要作用。在前额叶皮质的锥体细胞上分布有大量超极化激活环核苷酸门控阳离子通道(hyperpolarization-activated cyclin nucleotide-gated cation channel, HCN)。HCN 通道在细胞膜超极化时被激活,产生内向阳离子电流,即超极化激活阳离子电流(hyperpolarization-activated cation current, IH)。该电流对维持细胞兴奋性和静息膜电位,整合突触信息等具有重要作用[3,4]。在觉醒相关脑区-基底前脑,腺苷可减弱非胆碱能神经元的 IH[5]。但是腺苷对大脑皮层神经元 IH 的影响尚少见报道。因此本实验采用脑片膜片钳技术,研究腺苷对前额叶皮质锥体细胞 IH 的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生10~15 d的昆明小鼠15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 cerebrospinal fluid, ACSF, mmol/L):

基金项目:国家自然科学基金(30670668)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670668)
作者简介:闫 洁,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事脑觉醒与认知方面的研究。电话:(023)63125670, E-mail:y.j.000@163.com
通信作者:胡志安,电话:(023)68752254,E-mail:zhianhu@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-10-25;修回日期:2007-11-14

NaCl 124、KCl 3、$CaCl_2$ 2、$MgCl_2$ 2、NaH_2PO_4 1.23、$NaHCO_3$ 26、D-Glucose 10；切片液（mmol/L）：sucrose 220、KCl 2.5、$CaCl_2$ 1、$MgCl_2$ 6、NaH_2PO_4 1.25、$NaHCO_3$ 26、D-Glucose 10。两种溶液混合气（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 140、$MgCl_2$ 2、K_2ATP 2、EGTA 1.1、HEPES 10，用 NaOH 和 HCl 调 pH 至 7.2～7.3，0.22 μm 微孔膜过滤分装后 -20 ℃冻存备用。

腺苷用去离子水配制成 10 mmol/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。

葡萄糖酸钾、EGTA、K_2ATP、HEPES、腺苷、ZD7288 均为 Sigma 公司产品。

1.3 前额叶脑片的制备

小鼠快速断头取脑，置入 0～4 ℃混合气饱和的切片液中，30～60 s 后取出修块，用少许 502 胶把修好的组织块固定在切片机的标本托上，在 0～4 ℃混合气饱和的切片液中，用振动切片机将前额叶按冠状面切成约 350 μm 的薄片。全部脑片置于混合气饱和的 ACSF 中室温（20～24 ℃）下孵育 90 min 以上备用[3,6]。

1.4 脑片固定、灌流与给药

采用盖网固定法，即用银丝制成 U 形框架，将稀疏的尼龙丝附着其上，制成盖网轻压于脑片上。使用恒流泵持续向脑片浴槽灌注混合气饱和的 ACSF，脑片浸没于液面下 1～2 mm。采用局部喷射给药装置，药物配成终浓度后加入装置中，通过尖端直径约 50 μm 的管口喷出。

1.5 膜片钳记录

采用软质中性有芯玻璃管（直径 1.5 mm，长 8 cm，南京泉水教学实验器材公司）于拉制仪（P-97，Sutter）上拉制成尖端 2～3 μm 的微电极。充满电极内液后阻抗为 2～4 MΩ。实验采用 EPC-10 膜片钳放大器，PULSE 记录软件和 Igor 分析软件（均为 HEKA 公司产品）。采样频率 10 kHz，滤波频率 3 kHz。

实验在室温（20～24 ℃）下进行。使用 Leica 红外干涉相差显微镜，成像通过显微镜上方的成像系统（DAGE-MTI CCD 相机）连接到电脑。封接前，首先在高倍浸水物镜（×40）下，通过图像采集软件观察镜下细胞形态，选择合适的大锥体细胞，在电脑屏幕上标记定位。形成全细胞记录后，立即记录静息膜电位，然后转到电压钳模式下，给予超极化测试电压，比较给药前后内向电流的变化。除静息膜电位的测量以外，其余指标均在膜钳制电压为 -60 mV 的条件下采集[3]。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行配对样本 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 IH 的特点

在红外干涉相差技术下，可以清楚的看到细胞的胞体形态和树突走行，选择形态典型的大锥体神经元进行全细胞记录，见图 1。给予超极化刺激时，大部分所记录的神经元（n = 41/43）可以检测到内向电流，该内向电流能够被 HCN 通道的特异性阻断剂 ZD7288（50 μmol/L）所阻滞（n = 5），证明为 IH，见图 2。

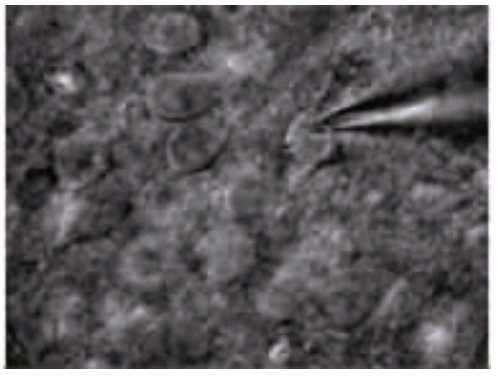


图 1 小鼠前额叶皮质脑片神经元 （干涉相差显微镜 ×400）

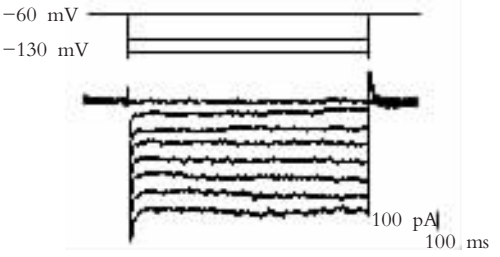
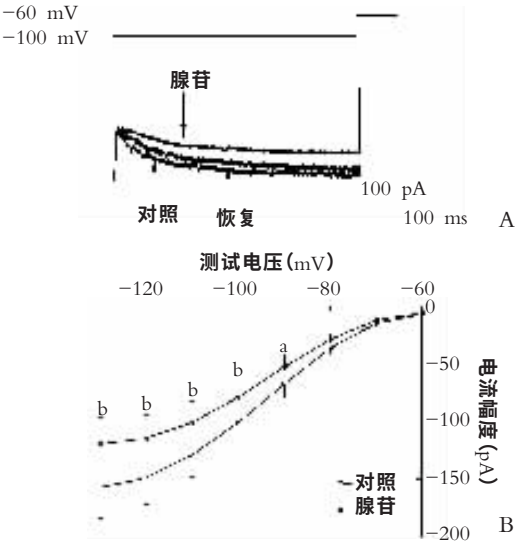


图 2 被 ZD7288 阻断的超极化激活阳离子电流

2.2 腺苷对 IH 的影响

以 ACSF 作为对照，腺苷使 94.12% 的记录神经元（n = 16/17）IH 幅度减小（P < 0.01），冲洗后能够恢复，见图 3A。给细胞 100 μmol/L 腺苷，并施加从 -60 mV 至 -130 mV 的跃阶测试电压，持续 1 s，IH 的 I-V 曲线显著下移（n = 8）（P < 0.01，P < 0.05），见图 3B。



A：电流幅度变化图；B：I-V 曲线变化图

a：P < 0.05，b：P < 0.01，与对照比较

图 3 腺苷对超极化激活阳离子电流的影响

为初步观察剂量依赖性，对同一细胞给予 10、50、100 μmol/L 腺苷，并予 -100 mV 的超极化测试电压。每给 1 个药物浓度前，均先给 ACSF 作为该浓度的对照。结果显示在 -100 mV 的条件下，IH 的幅度分别降低（6.27 ± 1.88）%、（13.59 ± 2.68）%、（17.44 ± 3.57）%（n = 7）；给予 10、100 μmol/L

腺苷,IH 的幅度下降有统计学差异($P<0.05$)。

3　讨论

HCN 通道是超极化激活的阳离子通道,分为 4 个亚型,在激活动力学上存在较大差异,HCN1 激活最快,t 值 25 ~300 ms, HCN2 和 HCN3 次之,HCN4 激活最慢,t 值可达数秒。据文献[7,8]报道新皮层主要表达 HCN1 和 HCN2 亚型,且分布广泛。本实验中检测到 IH 的神经元达 95.35%,记录到的电流相对稳定,表现为超极化激活的内向电流,具有电压依赖性和时间依赖性,激活较快,没有明显失活,为 HCN 通道的特异性阻断剂 ZD7288 所阻滞,特征与其他电生理研究中的描述相似[3,9]。

在中枢神经系统,目前已知多种神经递质可影响超极化激活阳离子电流。例如,5-HT 对海马 CA1 锥体细胞的 IH 具有增强作用[10],乙酰胆碱能则可通过毒蕈碱受体抑制脊髓运动神经元的 IH[11]。此外,腺苷作为一种重要的抑制性神经调质,也可削弱基底前脑非胆碱能神经元的 IH[5]。前额叶皮层是与觉醒相关的重要脑区,在认知、情绪等高级神经活动中占有重要地位。形态学研究证实,前额叶皮层的锥体细胞上有丰富的 HCN 通道[4]。因此本实验中,我们观察了腺苷对前额叶皮层锥体神经元 IH 的影响。结果表明,腺苷使锥体细胞的超极化激活阳离子电流幅度减小,I-V 曲线下移,具有抑制效应,与其在基底前脑的作用一致。

对于该作用的信号机制,我们推测与 A1 受体介导的腺苷酸环化酶失活有关。腺苷 A1 受体广泛分布于中枢神经系统,在大脑皮层有较高密度的表达[2]。A1 受体与 Gi 蛋白偶联,激活后抑制细胞内腺苷酸环化酶,减少 cAMP 产生[12]。而细胞内 cAMP 水平是调控 HCN 通道的主要因素,cAMP 升高能够使 HCN 通道门控的电压依赖性向正的电压水平移动,促进 HCN 通道激活,cAMP 降低则产生相反的效应[4]。因此腺苷可通过 A1 受体降低细胞内 cAMP 水平,从而抑制锥体细胞的 IH。

IH 对纠正超极化水平、维持静息膜电位稳定具有重要意义。去甲肾上腺素可通过增强小脑篮状细胞的 IH,使细胞兴奋性增高[13];在内侧隔核,用 HCN 通道阻断剂 ZD7288 抑制 IH,神经元自发放电减少,兴奋性降低[14]。本研究发现腺苷能够抑制前额叶皮质锥体细胞的 IH,提示腺苷可造成皮层神经元的兴奋性降低,对外来兴奋性刺激的反应减弱[15],这可能是腺苷抑制皮层活性、诱发睡眠的机制之一。是否还存在其他离子通道参与腺苷的抑制作用,尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations[J]. J Neurochem, 2001, 79(3): 463 -484.

[2] Dunwiddie T V, Masino S A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system[J]. Annu Rev Neuronsci, 2001, 24: 31 -55.

[3] Day M, Carr D B, Ulrich S, *et al*. Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and Kleak channels[J]. J Neuronsci, 2005, 25(38): 8776 -8787.

[4] Robinson R B, Siegelbaum S A. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function[J]. Annu Rev Physiol, 2003, 65: 453 -480.

[5] Arrigoni E, Chamberlin N L, Saper C B, *et al*. Adenosine inhibits basal forebrain cholinergic and noncholinergic neurons *in vitro*[J]. Neuroscience, 2006, 140(2): 403 -413.

[6] 涂娅莉, 刘应兵, 阴正勤, 等. 与视皮层脑片膜片钳全细胞记录相结合的生物素标记技术[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(1): 75 -76.

[7] Santoro B, Chen S, Luthi A, *et al*. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS[J]. J Neurosci, 2000, 20(14): 5264 -5275.

[8] Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain[J]. J Comp Neurol, 2004, 471(3): 241 -276.

[9] 赵　欣, 杨向军, 李红霞, 等. 起搏通道 HCN2 基因稳定转染 HEK293 细胞的电生理特点[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2006, 20(6): 519 -522.

[10] Gasparini S, DiFrancesco D. Action of serotonin on the hyperpolarization-activated cation current (Ih) in rat CA1 hippocampal neurons[J]. Eur J Neurosci, 1999, 11(9): 3093 -3100.

[11] Chevallier S, Nagy F, Cabelguen J M. Cholinergic control of excitability of spinal motoneurones in the salamander[J]. J Physiol, 2006, 570(3): 525 -540.

[12] Yaar R, Jones M R, Chen J F, *et al*. Animal models for the study of adenosine receptor function[J]. J Cell Physiol, 2005, 202(1): 9 -20.

[13] Saitow F, Konishi S. Excitability increase induced by beta-adrenergic receptor-mediated activation of hyperpolarization-activated cation channels in rat cerebellar basket cells[J]. J Neurophysiol, 2000, 84(4): 2026 -2034.

[14] Xu C, Datta S, Wu M, *et al*. Hippocampal theta rhythm is reduced by suppression of the H-current in septohippocampal GABAergic neurons[J]. Eur J Neurosci, 2004, 19(8): 2299 -2309.

[15] Liu Z, Bunney E B, Appel S B, *et al*. Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (Ih) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT2 receptors and protein kinase C[J]. J Neurophysiol, 2003, 90(5): 3201 -3212.

(编辑　薛国文)