DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000855

P2X3受体对大鼠海马 CA1 区锥体神经元兴奋性的影响

周　鑫，陈阳美

（重庆医科大学附属第二医院神经内科，重庆　400010）

【摘　要】**目的**：研究 P2X3 受体（P2X3 receptor，P2X3R）在海马 CA1 区的定位及对 CA1 区锥体细胞兴奋性的影响。**方法**：免疫荧光技术对 P2X3R 在海马 CA1 区表达进行定位，SD 鼠麻醉后断头取脑，修块后应用振动切片机切出 350 μm 脑片并用正常人工脑脊液 26 ℃恒温孵育 1 h，通过膜片钳全细胞记录技术，给予 P2X3R 选择性拮抗剂 AF-353 和非选择性激动剂 α，β-MeATP 干预，记录锥体细胞动作电位发放频率的改变。**结果**：P2X3R 在海马区主要表达于神经元上，在星形胶质细胞不表达。P2X3R 拮抗剂AF-353 减慢锥体细胞动作电位发放频率减小其兴奋性[(0.788 ± 0.163) Hz vs. (0.352 ± 0.079) Hz，t=7.32，P=0.002]，α，β-MeATP 则加快动作电位发放频率[(0.715 ± 0.186) Hz vs. (1.610 ± 0.454) Hz，t=-4.97，P=0.008]，增加兴奋性。**结论**：P2X3R 在海马区主要表达于神经元树突及胞质并且影响神经元兴奋性，可能参与了兴奋性增高有关疾病的发生发展过程。

【关键词】P2X3 受体；兴奋性；癫痫；阿尔茨海默病

【中图分类号】R741.05　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-09-02

Effects of P2X3 receptor on neuronal excitability in hippocampal CA1 pyramidal cells of rats

Zhou Xin，Chen Yangmei

（*Department of Neurology，the Second Affiliated Hospital，Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To investigate the effects of P2X3 receptor（P2X3R）on neuronal excitability in hippocampal CA1 pyramidal cells of rats. ***Methods***：The localization of P2X3R was detected by immunofluorescence. Sprague-Dawle rats were euthanized via decapitation after anesthetization and the brain tissues were trimmed and placed in a vibratome to obtain a slice thickness of 350 μm. The slices then were incubated in normal artificial cerebrospinal fluid at 26 ℃ for 1 h. Intervention of AF-353 and α，β-MeATP was performed and the action potentials（APs）frequency was recorded via whole cell patch-clamp technique. ***Results***：The P2X3R was located at the neuron instead of the astrocyte in hippocampal CA1 region. The antagonist of AF-353 decelerated the APs frequency and reduced cellular excitability[(0.788 ± 0.163) Hz vs. (0.352 ± 0.079) Hz，t=7.32，P=0.002] whereas α，β-MeATP agonist had the reverse effects[(0.715 ± 0.186) Hz vs. (1.610 ± 0.454) Hz，t=-4.97，P=0.008]. ***Conclusion***：P2X3R effect neuronal excitability and may participate in the process and development of diseases related to hyperexcitability.

【Key words】P2X3R receptor；excitability；epilepsy；Alzheimer's disease

P2X3 受体（P2X3 receptor，P2X3R）是 P2X 受体家族中的一员，P2X 受体广泛分布于中枢和外周神经系统，为 ATP 激活的配体门控通道并介导着阳离子，尤其是钙离子内流。脑内 ATP 被认为是一种具有广泛作用的神经递质，参与了神经元兴奋性毒性，炎症形成等病理生理过程[1-2]。研究显示 P2X 受体亚型 P2X7 受体促进癫痫的发生，而 P2X7 受体拮抗剂，可控制癫痫发作[3]。同时 P2X3R 引起脊髓背根神经元钙离子内流，在疼痛的传导方面起着至关重要的作用，目前 P2X3R 阻断剂已用于疼痛相关疾病的治疗[4-5]。然而，P2X3R 对海马区神经元兴奋性的影响尚不明确，为研究 P2X3R 对海马神经元兴奋性的影响，本实验运用免疫荧光定位和膜片钳全细胞记录技术，通过选择性抑制剂 AF-353 和非选择性激动剂 α，β-MeATP 对大鼠海马 CA1 区锥体神经元进

作者介绍：周　鑫，Email：zx66288@126.com，
研究方向：癫痫与神经电生理。

通信作者：陈阳美，Email：chenym1997@sina.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81171225）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160118.1523.007.html（2016-01-18）

行干预，Clampfit 10.3 软件观察锥体神经元动作电位发放频率的变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 脑组织 实验所用动物均来源于重庆医科大学实验动物中心。所有动物实验程序遵守国际伦理准则并取得重庆医科大学附属第二医院伦理委员会同意。选取成年 SD 鼠 2 只，体重 180~200 g，在标准温度（20 ℃）和湿度（50%~60%）环境下饲养。10%的水合氯醛 3 ml/kg 麻醉大鼠后，用生理盐水和 4%多聚甲醛灌注，断头后取出脑组织浸泡于 4%多聚甲醛 24 h，利用冰冻切片机制作成 10 μm 厚的冰冻切片备用。

1.1.2 实验试剂 山羊血清，FITC 标记的山羊抗兔二抗，TRITC 标记的山羊抗小鼠二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司；兔抗大鼠 P2X3 抗体，小鼠抗大鼠 MAP2 抗体购于英国 Abcam 公司；小鼠抗大鼠 GFAP 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司；Triton X-100、KCl、NaH_2PO_4、$CaCl_2$、$MgCl_2.6H_2O$、NaCl、$NaHCO_3$、D-glucose、K_2SO_4、NMG、HEPES、BAPTA、phosphocreatine、NA2ATP、NA3ATP、AF-353、α，β-MeATP、二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide，DMSO）购于美国 Sigma 公司；玻璃电极购于美国 Sutter Instrument 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫荧光检测 冰冻切片在室温中晾干后浸泡于丙酮 30 min，随后用磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗 5 min。0.4% Triton X-100 37 ℃孵育 20 min，随后 PBS 冲洗，之后将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液（pH 6.0）并在微波炉中高火加热 5 min，低火加热 15 min，随后取出自然冷却。室温下将冷却后的切片浸入抗原修复液 20 min，PBS 冲洗后加山羊血清 37 ℃封闭 1 h，随后去除血清，滴加配好的混合一抗 4 ℃过夜。混合一抗为兔抗大鼠 P2X3 抗体（1:120）分别与以下两种物质混合：小鼠抗大鼠 MAP2 抗体（1:50）和小鼠抗大鼠 GFAP 抗体（1:300）。第 2 日，37 ℃下 PBS 冲洗多余液体，避光滴加 FITC 标记的山羊抗兔二抗（1:100）和 TRITC 标记的山羊抗小鼠二抗（1:100），并于 37 ℃下避光孵育 2 h，随后加入 DAPI，室温下避光孵育 8 min，最后用 PBS 充分冲洗切片并用 50%甘油封片，-20 ℃保存。

1.2.2 脑片制作 选取出生 14 d 的健康 SD 鼠 10 只，体质量 30~40 g，由重庆医科大学实验动物中心提供。经 10%水合氯醛 3 ml/kg 麻醉后，1 min 内断头取脑，迅速置于含有标准气体的冰水混合物（95% O_2 and 5% CO_2）中。2 min 后取出脑组织并修块，修好的脑组织用瞬间粘合剂固定于振动切片机的标本托上。在 0 ℃和标准气体环境下，修块的脑组织浸入切片液中，并被切成厚 350 μm 的薄片，随后置于含有标准气体的正常人工脑脊液中，在 26 ℃恒温孵育槽中孵育 1 h 备用。冰水混合物，切片液，人工脑脊液均采用同一配方，其成分（mmol/L）为：2.5 KCl、1.6 NaH_2PO_4、2.0 $CaCl_2$、1.0 $MgCl_2.6H_2O$、119.0 NaCl、26.0 $NaHCO_3$、25.0 D-glucose（pH 7.4，osmolarity of 295~305 mosmol/L）。

1.2.3 全细胞记录 使用盖网固定法固定脑片，持续向脑片浴槽灌注含有标准气体的人工脑脊液，流速为 1~2 ml/min，室温保持在 25 ℃。在红外可视条件下，首先在低倍镜（×5）下找到海马 CA1 区，标记相应位置后在高倍镜下观察 CA1 区细胞形态和轴突方向，选择合适的锥体细胞。利用玻璃微电极拉制仪拉制玻璃电极，灌入电极内液后固定于微电极操纵器并调整到相应位置，施加正压后入水，保证入水电阻 3~5 MΩ。切换高倍镜，利用图像采样使玻璃电极靠近 CA1 区细胞层，在选定的锥体细胞上再次给予正压并拍击锥体细胞，随后撤去正压并给予少许负压（图 1）。电压钳模式下观察电极阻抗，上升至 100 MΩ 后换至 patch 挡进行封接，高阻抗（大于 1 GΩ）封接后采用负压吸引或电击（Zap）破膜方式进行全细胞记录。记录时为得到自发放电，给予适当刺激电流使膜电位保持在-50~-60 mv。实验所采用电极内液的成分为（mmol/L）：60 K_2SO_4，60 NMG，40 HEPES，4 $MgCl_2$，0.5 BAPTA，12 phosphocreatine，2 NA2ATP，0.2 NA3ATP。对脑片干预所采用 P2X3R 拮抗剂为选择性拮抗剂 AF-353，由于目前尚无 P2X3R 选择性激动剂，故本实验选用非选择性激动剂 α，β-MeATP 进行干预。AF-353 溶于 DMSO 后 加入人工脑脊液进行灌流，DMSO 的终浓度为 0.2%，α，β-MeATP 直接加入人工脑脊液灌流，为排除 DMSO 对动作电位频率的影响，等量的 DMSO 也加入人工脑脊液进行灌流。研究表明 AF-353 和 α，β-MeATP 浓度 10 μmol/L 为有效作用浓度[6-7]。本实验采取同一细胞自身前后对照，给予适当刺激电流保持膜电位处于-50~-60 mv 左右，所有脑片分为 3 组，分别为：正常人工脑脊液组+AF-353 组，正常人工脑脊液组+DMSO 组，正常人工脑脊液组+α，β-MeATP 组，n=5。通过 Clampfit 10.3 软件观察动作电位频率的变化。



图 1 红外可视下大鼠海马 CA1 区锥体细胞全细胞记录（40×）

Fig.1 Whole cell recording of hippocampal CA1 pyramidal cells through infrared videomicroscopy（40×）

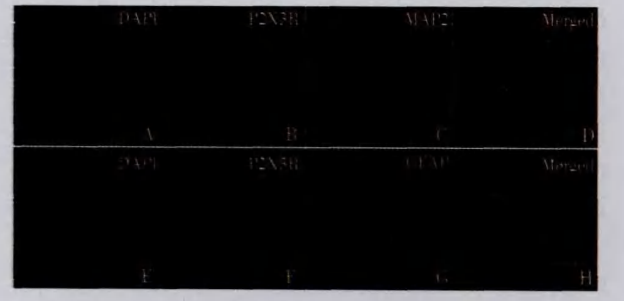
1.3　图像采集和统计学分析

激光扫描共聚焦显微镜对荧光图像进行采集，通过 Clampfit 10.3 分析软件计算锥体细胞干预前后动作电位频率的变化，最后结果用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组内比较采用 SPSS 17.0 软件行配对 t 检验，检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　免疫荧光检测结果

免疫荧光结果显示，P2X3R（绿色信号）与神经元树突标记物 MAP2（红色信号）所处的位置重合，与大多数星形胶质细胞标记物 GFAP（红色信号）和细胞核标记物 DAPI（蓝色）均不重合（图 2），提示 P2X3R 主要表达于海马 CA1 区神经元胞质和树突中。



A~D：CA1 区，P2X3R（绿色）与 MAP2（红色）重合，而与 DAPI（蓝色）不重合。比例尺=100 μm。E~H：CA1 区，P2X3R（绿色）与 GFAP（红色）和 DAPI（蓝色）均不重合。比例尺=100 μm

图 2　免疫荧光检测 P2X3R 在海马 CA1 区的定位（200×）

Fig.2　Location of P2X3R in hippocampal CA1 region detected by immunofluorescence（200×）

2.2　膜片钳全细胞记录

免疫荧光结果显示海马 CA1 区锥体细胞表达有P2X3R，但 P2X3R 对神经元的作用尚不明确，因此，运用膜片钳全细胞记录技术探讨 P2X3R 与锥体神经元兴奋性是否存在关联。在正常人工脑脊液加 AF-353 组中，未加药状态下锥体细胞动作电位发放频率为（0.788 ± 0.163）Hz，进行拮抗剂 AF-353 干预后，锥体细胞放电频率明显降低，为（0.352 ± 0.079）Hz，差异有统计学意义（t=7.32，P=0.002）。由于 AF-353 需溶解于 DMSO 中，为排除 DMSO 对动作电位发放频率的影响，在正常脑脊液加入等量 DMSO，观察加药前后放电频率的变化。加药前锥体细胞动作电位发放频率为（0.703 ± 0.338）Hz，加入 DMSO 后动作电位频率为（0.694 ± 0.349）Hz，差异无统计学意义（t=1.25，P=0.281）。而在正常脑脊液加 α，β-MeATP 组，干预前正常组动作电位放电频率为（0.715 ± 0.186）Hz，给予激动剂 α，β-MeATP 10 μmol/L 后动作电位频率增高为（1.610 ± 0.454）Hz，差异存在统计学意义（t=-4.97，P=0.008）（图 3）。

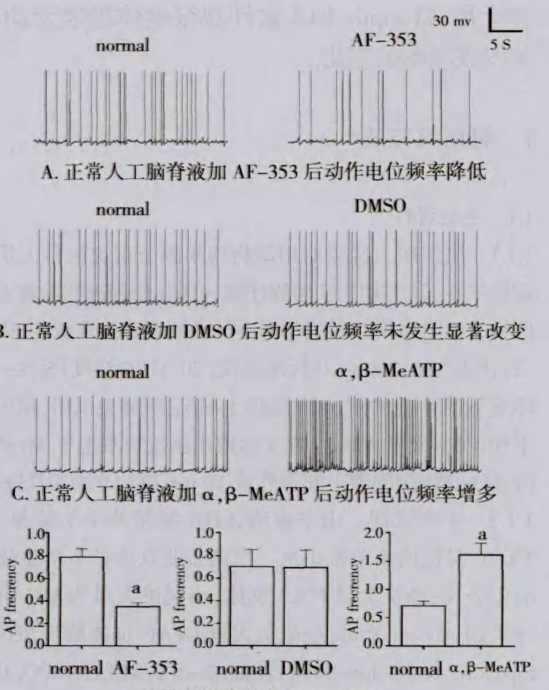


图 3　全细胞记录观察干预前后动作电位发放频率的改变

Fig.3　Whole cell recording of the changes of APs frequency after intervention

3　讨　论

神经元兴奋性改变是多数神经系统疾病发生的重要病理生理基础。Dubé 等[8]已经在动物实验中证实长期的生存压力促使青年大鼠大脑兴奋性增强并可能形成癫痫。Andresen 等[9]通过冰冻损伤建立皮质发育异常的动物模型并在体外实验中发现该模型皮质兴奋性增高，给予加巴喷丁后抑制了冰冻损伤引起的兴奋性神经网络形成并缓解了皮质发育异常引起的癫痫样放电。Hall 等[10]通过膜片钳技术发现过表达 Aβ 后小鼠海马神经元兴奋性增高并推断在阿尔茨海默病早期，树突过度兴奋导致了神经元功能障碍。控制神经元过度兴奋是治疗癫痫和早期阿尔茨海默病的重要靶点，因此本课题组围绕 P2X3R 对神经元兴奋性的影响进行了研究。

膜片钳技术自 1976 年创建以来已被广泛应用于神经电生理研究领域，特别在神经元兴奋性研究中起着至关重要的作用[11]。动作电位形成取决于膜电位阈值和电压依赖性 Na^+通道，当阳离子内流或其他刺激使膜电位达到动作电位阈值时，Na^+通道瞬

时开放，促使膜电位倾向钠的平衡电位，随后钾离子通道开放，细胞内阳离子外流使膜电位恢复到静息水平从而完成一个动作电位周期。本实验细胞外液采用国际公认的正常脑脊液配方并成功模拟了大脑神经元的正常状态，为研究 P2X3R 对神经元兴奋性的影响，分别对锥体细胞进行 P2X3R 激动和拮抗干预并观察动作电位频率变化。激活 P2X3R 后动作电位发放频率增快而阻断 P2X3R 后电活动减慢，提示 P2X3R 能够影响神经元兴奋性。先前已有研究报道激活 P2X3R 引起胞外阳离子内流，尤其是钙内流[12]。另外有研究表明 P2X3R 激活后突触前膜谷氨酸释放增多和兴奋性突触后电流（EPSC）增强[13-14]，生理状态下，谷氨酸作为神经系统主要的兴奋性神经递质与抑制性神经递质 γ-氨基丁酸处于动态平衡，维持大脑神经网络的正常联系和活动。P2X3R激活后，谷氨酸释放过多打破动态平衡，与离子型谷氨酸受体（NMDA 受体，AMPA 受体）结合后引起阳离子内流，若阳离子内流效应超过抑制性神经递质引起的阴离子内流效应，则突触后膜兴奋性增高。

在人体中 P2X3R 作为 ATP 激活的配体门控通道，其作用的发挥需要 ATP 参与。脑内细胞外 ATP 是一种非常重要的神经递质，它与众多伴有兴奋性增高的神经系统疾病密切相关。早年 Wieraszko 和 Seyfried[15]发现在有癫痫发作倾向的小鼠大脑中 ATP 表达水平增高。Klaft 等[16]也发现 ATP 可以直接引起神经元兴奋性增高但其代谢产物腺苷可通过其 A1 受体降低兴奋性发挥神经保护作用，提示ATP 对神经元兴奋性的影响具有双重性。由于脑内 ATP 对神经元兴奋性产生直接的增强效应，但同时也通过其代谢产物腺苷发挥间接抑制效应，因此 ATP 对神经元兴奋性的总效应仍不清楚。P2X3R 作为 ATP 下游门控通道，激活或抑制后引起神经元单一的兴奋性增强或减弱，提示 P2X3R 是神经元兴奋性形成的重要环节并可能成为伴有兴奋性增高的神经系统疾病（如癫痫，早期阿尔茨海默病）的治疗靶点。

课题组对 P2X3R 进行了研究，免疫荧光结果显示 P2X3R 表达于海马 CA1 区神经元胞质和树突，膜片钳全细胞记录结果显示抑制 P2X3R 后 CA1 区锥体细胞动作电位发放频率减慢，激活 P2X3R 后频率加快，差异均具有统计学意义。P2X3R 激活是神经元兴奋性形成的重要因素，抑制 P2X3R 活化可以降低神经元兴奋性并可能用于伴有神经元兴奋性增高的疾病的治疗。

参 考 文 献

[1] Sáez-Orellana F, Godoy PA, Bastidas CY, et al. ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of β-amyloid peptide in hippocampal neurons[J]. Neuropharmacology, 2016(100): 116-123.

[2] Facci L, Barbierato M, Marinelli C, et al. Toll-like receptors 2, -3 and -4 prime microglia but not astrocytes across central nervous system regions for ATP-dependent interleukin-1β release[J]. Sci Rep, 2014(4): 6824.

[3] Henshall DC, Engel T. P2X purinoceptors as a link between hyperexcitability and neuroinflammation in status epilepticus[J]. Epilepsy Behav, 2015(49): 8-12.

[4] Bele T, Fabbretti E. P2X receptors, sensory neurons and pain[J]. Curr Med Chem, 2015, 22(7): 845-850.

[5] Wang S, Dai Y, Kobayashi K, et al. Potentiation of the P2X3 ATP receptor by PAR-2 in rat dorsal root ganglia neurons, through protein kinase-dependent mechanisms, contributes to inflammatory pain[J]. Eur J Neurosci, 2012, 36(3): 2293-2301.

[6] Martínez-Cutillas M, Gil V, Gallego D, et al. α,β-meATP mimics the effects of the purinergic neurotransmitter in the human and rat colon[J]. Eur J Pharmacol, 2014(740): 442-454.

[7] Vandenbeuch A, Larson ED, Anderson CB, et al. Postsynaptic P2X3-containing receptors in gustatory nerve fibres mediates responses to all taste qualities in mice[J]. J Physiol, 2015, 593(5): 1113-1125.

[8] Dubé CM, Molet J, Singh-Taylor A, et al. Hyper-excitability and epilepsy generated by chronic early-life stress[J]. Neurobiol Stress, 2015(2): 10-19.

[9] Andresen L, Hampton D, Taylor-Weiner A, et al. Gabapentin attenuates hyperexcitability in the freeze-lesion model of developmental cortical malformation [J]. Neurobiol Dis, 2014(71): 305-316.

[10] Hall AM, Throesch BT, Buckingham SC, et al. Tau-dependent Kv4.2 depletion and dendritic hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. J Neurosci, 2015, 35(15): 6221-6230.

[11] Karmazinova M, Lacinova L. Measurement of cellular excitability by whole cell patch clamp technique[J]. Physiol Res, 2010, 59(s1): 1-7.

[12] Fabbretti E, Nistri A. Regulation of P2X3 receptor structure and function [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012, 11(6): 687-698.

[13] Xing J, Lu J, Li J. Purinergic P2X receptors presynaptically increase glutamatergic synaptic transmission in dorsolateral periaqueductal gray[J]. Brain Res, 2008(1208): 46-55.

[14] Jin YH, Bailey TW, Li BY, et al. Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius[J]. J Neurosci, 2004, 24(20): 4709-4717.

[15] Wieraszko A, Seyfried TN. Increased amount of extracellular ATP in stimulated hippocampal slices of seizure prone mice[J]. Neurosci Lett, 1989, 106(3): 287-293.

[16] Klaft ZJ, Schulz SB, Maslarova A, et al. Extracellular ATP differentially affects epileptiform activity via purinergic P2X7 and adenosine A1 receptors in naive and chronic epileptic rats[J]. Epilepsia, 2012, 53(11): 1978-1986.

（责任编辑：关蕴良）