DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.009
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
208 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)03-0208-04

大鼠坐骨神经损伤后ATP对背根节神经元兴奋性的影响

黄 华,阮怀珍,蔡文琴,胡志安,吴喜贵,宋承辉 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 应用膜片钳全细胞记录技术,探讨ATP对坐骨神经损伤所引起的背根节神经元兴奋性的影响。方法 Wistar大鼠分为对照组和损伤组,损伤组建立大鼠坐骨神经离断模型,采用酶加机械分离方法急性分离背根节神经元,应用膜片钳全细胞记录技术测定神经元被动膜电特性,观察坐骨神经损伤后背根节神经元兴奋性的变化及ATP对其作用的影响。结果 与对照组比较,坐骨神经损伤后1、10、100 μmol/L ATP引起神经元产生动作电位的去极化反应上升幅度比率分别为458%、187%、75%($P<0.01$)。结论 坐骨神经损伤后背根节神经元兴奋性提高,ATP受体对ATP反应敏感性增强。

关键词:坐骨神经;神经损伤;背根神经节;ATP;膜片钳
中图法分类号:R338.1;R651.3;R977 文献标识码:A

Effect of ATP on excitability of dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury in rats

HUANG Hua, RUAN Huai-zhen, CAI Wen-qin, HU Zhi-an, WU Xi-gui, SONG Cheng-hui (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of ATP on excitability of dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. Methods Rats were divided into control group and injury group. Rats in the injury group underwent transection of the sciatic nerves. Neurons were acutely dissociated from the dorsal root ganglion by a combination of mechanical and enzymatic method. Effect of ATP on excitability of dorsal root ganglion neurons was studied based on whole cell patch clamp after sciatic nerve injury. Results Rising frequencies of depolarization of action potentials evoked by 1, 10, and 100 μmol/L ATP were 458%, 187%, and 75%, respectively after sciatic nerve injury ($P<0.01$). Conclusion After sciatic nerve injury, excitability of dorsal root ganglion neurons is increased, and reactive sensitivity of ATP receptor to ATP is enhanced.

Key words: sciatic nerve; nerve injury; dorsal root ganglion; patch clamp; ATP

神经系统损伤后的修复、再生是一个相当复杂的过程。近来研究表明,ATP受体在某些疾病发生的病理生理过程中扮演了重要的角色[1],如炎症、疼痛、缺血性心肌病、卒中、睡眠障碍和帕金森病等。ATP受体在嘌呤类物质的代谢过程中充当媒介引发级联反应,导致恶性循环,致使疾病发生发展。坐骨神经损伤后,对应阶段的背根节神经元ATP受体作为代谢过程中的一种重要媒介,也会发生相应的改变。目前对坐骨神经损伤后背根节神经元ATP受体的表达变化情况已经从形态学的角度进行了初步研究[2],而坐骨神经损伤后背根节神经元ATP受体电生理方面的研究尚少见报道。本实验通过建立大鼠坐骨神经离断模型,急性分离背根节神经元,采用膜片钳全细胞记录技术观察背根节神经元的电生理学特性,探讨坐骨神经损伤后背根节神经元兴奋性的变化及ATP对其作用的影响,试图对ATP受体在坐骨神经损伤过程中发挥的作用做初步的了解,为神经损伤的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及动物模型制作

1.1.1 动物分组 健康Wistar大鼠40只,雌雄不限,体质量180~220 g,由第三军医大学实验动物中心提供。分组:损伤组(operation group),20只;对照组(control group),20只。

1.1.2 坐骨神经损伤方法 大鼠以1%戊巴比妥钠(30~40 mg/kg)腹腔注射麻醉,无菌条件下手术:下肢背侧部纵向切口,暴露股二头肌,经肌间钝性分离,游离坐骨神经,切除距梨状肌下缘3 mm以下长约2 mm的坐骨神经,逐层缝合,建立大鼠坐骨神经离断模型;对照组大鼠游离坐骨神经后不做损伤处理。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054206)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054206)
作者简介:黄 华(1979-),男,湖北省松滋市人,硕士研究生,主要从事神经损伤、再生方面的研究。电话:(023)68752232
通信作者:阮怀珍,电话:(023)68752233
收稿日期:2003-09-18;修回日期:2003-10-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　试剂与溶液

葡萄糖酸钾、EGTA、胶原酶、胰蛋白酶、ATP、suramin、兔抗大鼠 ATP 抗体、结合 Cy3 的羊抗兔 IgG 血清为 Sigma 公司产品; HEPES 为上海生工(AMRESCO 分装)产品; 其余为市售药品。

1.3　大鼠背根节神经元的急性分离方法

大鼠在手术后 7 d 以 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 断头, 迅速切开背部皮肤, 沿脊柱两侧剪断与之相连的肋骨, 取出腰段脊柱。由脊柱正中剖开成两半, 置于氧饱和的 0～4 ℃的人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF), (mmol/L): NaCl 126, KCl 5, $CaCl_2$ 2, $MgSO_4$ 2, NaH_2PO_4 1.5, $NaHCO_3$ 25, 葡萄糖 10。混合气(95% O_2 + 5% CO_2)饱和条件下用 NaOH 调节 pH 至 7.2～7.4。由剖开的椎管内侧取出 L4、L5 段神经节及其相连的神经根, 在解剖显微镜下用精细角膜剪及游丝镊仔细剪除相连神经和周围的结缔组织被膜, 将清除干净的神经节剪碎成 2 至 3 块, 置于胶原酶Ⅰ型 3 mg/ml, 在恒温水浴锅(37 ℃)中孵育 100 min。孵育毕, 在脑脊液内清洗数次, 转移至胰蛋白酶 1 mg/ml, 在恒温水浴锅(37 ℃)中孵育 10 min。消化完毕, 在脑脊液内反复清洗, 然后机械吹打制成细胞悬液, 加入自制灌流槽内, 放在倒置显微镜的载物台上静置 30 min, 待细胞贴壁后缓慢灌流人工脑脊液。

1.4　膜片钳记录

膜片钳全细胞记录所采用的仪器为 Axopatch 200B 膜片钳放大器、Digidata 1200 模数转换器、clampex6 记录软件和 clampfit8.1 分析软件(均为 Axon 公司产品)。玻璃微电极用软质中性无芯玻璃管(直径 1.5 mm, 长 10 cm, 上海脑研究所)于电极拉制仪(Olympus, PC-10)上分两步拉制而成, 微电极尖端直径 1～2 μm, 充灌电极内液(mmol/L: 葡萄糖酸钾 145, $MgCl_2$ 2, K_2ATP 5, EGTA 0.5, HEPES 5。用 NaOH 调节 pH 至 7.2～7.4)后阻抗为 5～10 MΩ, 封接阻抗为 2～6 GΩ, 串连电阻在 20 MΩ 以下。实验采用采样频率 10 kHz, 滤波频率 2 kHz。

实验在 20～30 ℃室温下进行。选择表面光滑、有突起的中小神经元作为实验研究对象。调节微操纵器(Olympus, ONM-1)使电极与细胞之间形成高阻抗封接, 并进一步吸穿细胞膜形成全细胞记录, 调节串联电阻和补偿电容。通常置钳制电压于 −60 mV。所得资料通过 Clampex6 记录软件输入计算机储存和分析。该实验主要记录静息膜电位(RMP); 在电流钳下记录诱发动作电位(AP); 在电压钳下记录快速激活和失活钠电流; 在电流钳下观察神经元自发性电活动; 采用自制药物灌流装置给药, 以 ACSF 作为空白对照, 记录不同浓度 ATP 对背根节神经元兴奋性的影响。实验过程中灌流槽中通以混合气饱和的 ACSF 灌流, 调节流速(约 2 ml/min)使槽内液体 1 min 内完全更新。

1.5　应用免疫组化方法对大鼠背根节神经元 ATP 受体进行鉴定

大鼠在手术后 7 d 分别取对照组、损伤组各 3 只, 灌注固定, 取背根神经节, 连续冰冻切片(−27 ℃), 片厚 8 μm, 蒸馏水漂洗 10 min× 2 次, 进行抗 ATP 抗体免疫荧光组织化学反应, 甘油封片, 荧光显微镜观察。

1.6　统计学处理

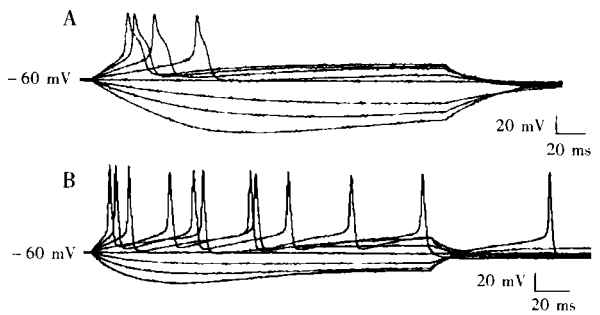
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

2.1　L_4、L_5 背根节神经元的形态及基本膜电特性

倒置显微镜下, 对照组急性分离得到的背根节神经元有大、中、小 3 种类型。细胞表面光滑, 胞体呈椭圆形、圆形, 突起细长, 多为单极, 偶有双极; 静息膜电位(RMP)为(−54.38 ± 4.84)mV, 串联阻抗(Rs)为(11.37±3.96)MΩ。在灌流槽中神经元可以维持数小时, 坐骨神经损伤后分离所得背根节神经元的形态没有改变; 被动膜电特性也没有发生改变。

在电流钳下, 给予神经元一系列由超级化至去极化的阶跃电流(−60～140 pA, step=20 pA, 时长 200 ms)刺激, 记录得到诱发动作电位, 见图 1, 两组细胞诱发动作电位阈值、时程均有显著差异($P < 0.01$), 见表 1。在电流钳下, 坐骨神经损伤后 11% 背根节神经元出现自发放电活动($n = 28$), 而对照组无自发放电活动, 见图 2。



A: Control group; B: Operation group

图 1　动作电位比较

Fig 1　Comparison of action potentials

表 1　动作电位特性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Comparison of characteristics of action potentials ($\bar{x} \pm s$)

Group	Amplitude(mV)	Frequency	Time(ms)	Threshold(mV)
Control	86.62±12.96	1.79±1.06	11.18±1.84	−19.05±5.59
Operation	88.54±14.41	1.84±1.04	8.03±2.37 *	−31.27±3.39 *

*: $P < 0.01$, *vs* control group

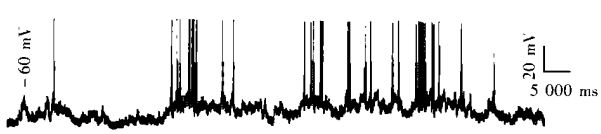


图 2　损伤组神经元出现自发动作电位

Fig 2　Spontaneous action potential of neurons observed in operation group

2.2　ATP 对背根节神经元兴奋性的影响

2.2.1　背根节神经元 ATP 受体的免疫组化鉴定结果　本实验应用免疫组化方法对大鼠背根节神经元 ATP 受体进行了鉴定, 见图 3, 证明背根节神经元膜表面确实存在 ATP 受体, 为下一步实验提供了更充分的理论依据。

2.2.2　ATP 对背根节神经元的作用　ATP 可以兴奋背根节神经元, ACSF 不能兴奋背根节神经元。损伤组、对照组对 ATP 有反应细胞比例分别为 92.86%、72.00%。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

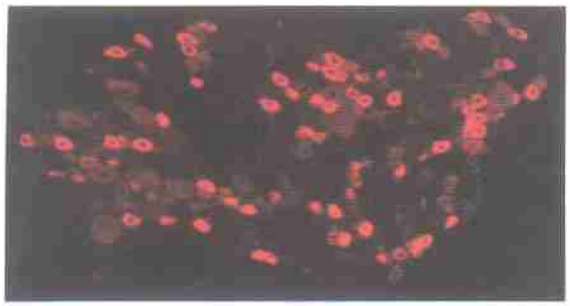
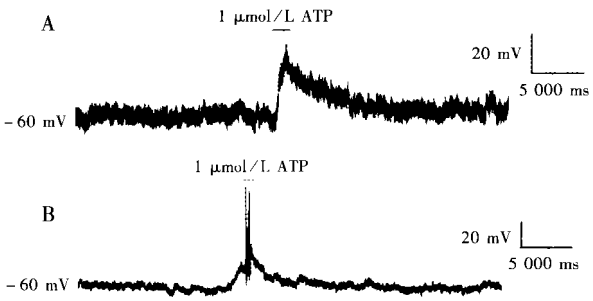


图3 背根节神经元膜表面存在ATP受体 (免疫荧光×200)

Fig 3 ATP receptor on the cell membrane dorsal root ganglion neurons (Cy3× 200)

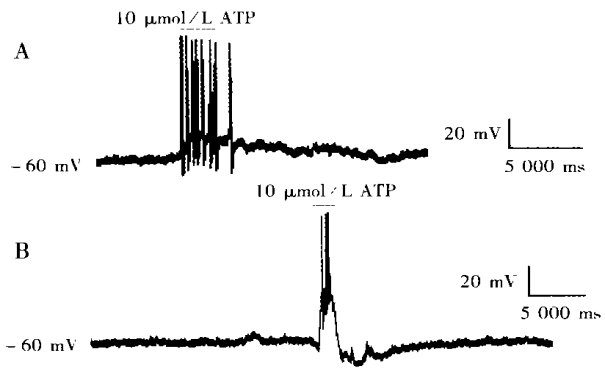
电流钳制模式下不同浓度ATP均可使背根节神经元发生去极化反应并伴有动作电位发放,见图4、5、6。1、10、100 μmol/L ATP引起损伤组和对照组细胞去极化反应幅度分别为25.18、28.73、32.16、4.51、10.00、18.44 mV,见表2。不同浓度ATP引起同组细胞之间去极化反应幅度、相同浓度ATP引起两组细胞之间去极化反应幅度均有显著差异($P<0.01$);与对照组比较,坐骨神经损伤后1、10、100 μmol/L ATP引起神经元产生动作电位的去极化反应上升幅度分别为458%、187%、75%。



A: Control group; B: Operation group

图4 1 μmol/L ATP诱发产生动作电位比较

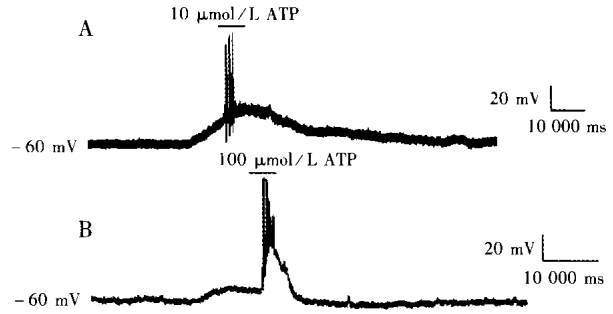
Fig 4 Comparison of action potentials evoked by 1 μmol/L ATP



A: Control group; B: Operation group

图5 10 μmol/L ATP诱发产生动作电位比较

Fig 5 Comparison of action potentials evoked by 10 μmol/L ATP



A: Control group; B: Operation group

图6 100 μmol/L ATP诱发产生动作电位比较

Fig 6 Comparison of action potentials evoked by 100 μmol/L ATP

表2 不同浓度ATP诱发产生动作电位去极化幅度(mV)比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of depolarization frequencies (mV) of action potentials evoked by 1, 10, and 100 μmol/L ATP ($\bar{x}\pm s$)

Group	Concentration of ATP(μmol/L)		
	1	10	100
Control	4.51±1.06	10.00±0.82	18.44±7.69
Operation	25.18±6.28*	28.73±7.69*	32.16±8.04*

*: $P<0.01$, *vs* control group

3 讨论

3.1 大鼠背根节神经元的急性分离法

分离得到独立完整、表面光滑、存活时间长的神经元是膜片钳全细胞记录技术成功的关键。我们建立的背根节神经元急性分离方法是参照文献[3]经过改进实现的。分离时主要注意以下几个方面:①快速分离出脊柱,置于氧饱和的0~4 ℃的脑脊液中,随后快速分离出背根神经节及相连组织,在解剖显微镜下剔除背根神经节周围组织,得到完整神经节,剪碎消化;②控制酶消化浓度、温度和时间;③机械吹打制悬过程中要轻、慢,保证吹打时间适度。

我们分离得到的背根节神经元容易封接形成全细胞记录,且维持时间长,适合膜片钳实验;细胞悬液加入灌流槽后贴壁牢固,不易受灌流液影响,说明实验设计确实可行。

3.2 坐骨神经损伤后背根节神经元兴奋性的变化

坐骨神经损伤后分离所得背根节神经元的形态没有发生改变;被动膜电特性也没有发生改变。但是在给予相同刺激的条件下,损伤组、对照组神经元所得到的诱发动作电位的阈值、时程均有显著差异,且损伤组11%神经元有自发性电活动。表明坐骨神经损伤后背根节神经元产生动作电位的能力增强了,兴奋性提高了;神经元产生的自发性活动在静息膜电位附近较易出现,膜电位去极化、超极化时不易出现自发电活动。从

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞的单个放电活动来看, 其波形与突触后电位明显不同[4], 而与动作电位波形一致。这种自发性电活动是神经元膜电位波动超过阈值后动作电位的发放, Robert E. Study 等[5] 也报道了类似结果。因此可以推断坐骨神经损伤后背根节神经元兴奋性发生了显著变化。

3.3　坐骨神经损伤后 ATP 对背根节神经元兴奋性的影响

ATP 通过与背根节神经元表面 ATP 受体结合, 开放相应的离子通道, 非选择性地引起阳离子内流, 使细胞发生去极化反应, 当膜电位达到阈值时产生动作电位[6,7]; 拮抗剂 Suramin 可使细胞发生超极化反应而抑制动作电位的发放[8]。本实验应用免疫组化方法对大鼠背根节神经元 ATP 受体进行了鉴定, 证明背根节神经元膜表面确实存在 ATP 受体, 为下一步实验提供了更充分的理论依据。实验表明不同浓度 ATP 引起细胞去极化反应幅度不同, 神经元去极化反应幅度与药物浓度成正相关[9]。ATP 可以兴奋背根节神经元; 而 ACSF 作为一种空白对照试剂不能对背根节神经元起作用, 说明在酶消化、机械吹打的过程中背根节神经元膜表面 ATP 受体没有受到损伤, 实验设计可行。药物浓度越大, 与 ATP 受体结合的药物的剂量越大, 神经元去极化反应幅度越高, 但是损伤组和对照组神经元对相同浓度 ATP 反应强度有显著差异, 提示坐骨神经损伤后对应阶段的背根节神经元 ATP 受体发生了相应的改变, 对 ATP 反应敏感性增强。

目前已有不少文献报道坐骨神经损伤后背根节神经元 ATP 受体的变化情况, 但由于形态学指标缺乏标准的定量方法[10], 所以报道结果不一。本实验从电生理学的角度出发, 对坐骨神经损伤后背根节神经元兴奋性的变化及 ATP 对其作用进行了初步探讨, 明确了坐骨神经损伤后对应阶段的背根节神经元兴奋性明显提高, ATP 受体也可能发生了相应的改变。背根节神经元兴奋性的提高及 ATP 受体对 ATP 反应敏感性的增强可能在 ATP 代谢的级联反应过程中发挥了作用, 影响神经损伤后的修复和再生, Michael 等[1] 大胆地提出了要将 ATP 受体作为药物治疗的靶目标, 试图采用 ATP 受体拮抗剂作用于 ATP 受体, 以中断 ATP 受体引起的级联反应达到治疗神经损伤的目的, 但效果欠佳, 可见神经损伤后的修复再生是相当复杂的, 还有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] Michael W, Michael F. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 599(1): 1173－1185.

[2] Bergman E, Ulfhake B, Hotfelt T, *et al*. Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the C57BL/6J mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression[J]. Neuroscience, 2001, 105(1): 249－263.

[3] Labrakakis C, Maixner W, Light A R, *et al*. Adenosine triphosphate-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurons obtained from rat embryos: desensitization kinetics and modulation of glutamate release[J]. Neuroscience, 2000, 101(4): 1117－1126.

[4] Drewe J A, Childs G V. Synaptic transmission between dissociated adult mammalian neurons and attached synaptic boutons[J]. Science, 1988, 241(4874): 1801－1803.

[5] Robert E. Study, Michael G. Spontaneous action potential activity in isolated dorsal root ganglion neurons from rats with a painful neuropathy[J]. Pain, 1996, (65): 235－242.

[6] Friel D D. An ATP-sensitive conductance in single smooth muscle cells from the rat vas deferens[J]. J Physiol, 1988, 401(1): 361－380.

[7] Benham C D. ATP-activated channels gate calcium entry in single smooth muscle cells dissociated from rabbit ear artery[J]. J Physiol, 1989, 419(1): 689－701.

[8] Vlachova V, Lyfenko A. Suramin affects capsaicin responses and capsaicin-noxious heat interactions in rat dorsal root ganglia neurons[J]. Physiol Res, 2002, 51(2): 193－198.

[9] Maria P, Geoggrey B. Purinergic signaling: pathophysiological roles[J]. Jpn J Pharmacol, 1998, 78(1): 113－145.

[10] Mikael W, Mikael W. Delayed loss of spinal motoneurons after peripheral nerve injury in adult rats: a quantitative morphological study[J]. Exp Brain Res, 2001, 139(1): 216－223.

（编辑　栾　嘉）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中, 引用英文文献的比例很高, 但有不少作者将英、美人的姓名搞错, 以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是: 名-名-姓, "名"可以有 1 个、2 个或 3 个, 但"姓"只有 1 个。因此, 从书籍或期刊中的姓名转录到文献时, 要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的; "名"可以缩写, 用第一个字母大写, 不用缩写点。数据库在著录作者姓名时, 已经调整为姓-名-名, 可照录。

例如: John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net