DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.006

论著

文章编号:1000-5404(2003)10-0854-04

大鼠视皮层神经元N-甲基-D-天冬氨酸受体电流的发育变化

秦 伟[1],阴正勤[1],王仕军[1],赵妍君[2],范慧民[1],胡志安[3] ([1]第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038;[2]四川大学华西医学中心生理学教研室,成都 610041;[3]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 探讨大鼠视觉发育可塑性关键期内视皮层神经元N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体介导的突触后电流的发育变化。方法 采用脑片膜片钳全细胞记录技术,记录出生后14、21、28 d龄Wistar大鼠视皮层神经元兴奋性突触后电流。然后在人工脑脊液中加入荷包牡丹碱(20 μmol/L),记录谷氨酸受体电流;接着在人工脑脊液中同时加入荷包牡丹碱(20 μmol/L)和6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮(20 μmol/L),记录NMDA受体电流,并计算NMDA受体和谷氨酸受体的峰电流的比率。结果 大鼠睁眼后,视皮层神经元的NMDA受体电流的下降时间显著变短($P<0.05$),而上升时间无明显变化($P>0.05$);NMDA受体电流和谷氨酸受体电流比率逐渐变小($P<0.05$)。结论 随着视觉输入的增加,大鼠视皮层神经元的NMDA受体电流的时程变短,其电流成分在谷氨酸受体电流中所占的比例相对减少。

关键词:N-甲基-D-天冬氨酸受体;兴奋性突触后电流;视皮层;发育
中图法分类号:R338.3;R339.146 文献标识码:A

Developmental changes of N-methyl-D-aspartate receptor currents in rat visual cortical neurons

QIN Wei, YIN Zheng-qin, WANG Shi-jun, ZHAO Yan-jun, FAN Hui-min, HU Zhi-an (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the developmental changes of the excitatory postsynaptic currents (EPSCs) mediated by the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (NMDA-PSCs) of neurons in rat visual cortex during the critical period of visual development. Methods The postsynaptic currents in visual cortex slices of Wistar rats at postnatal days 14, 21 and 28 were recorded by whole-cell patch recording. Glutamate currents were recorded after adding bicuculline methiodide (BMI, 20 μmol/L) to artificial cerebrospinal fluid (ASCF). NMDA currents were also recorded after adding BMI (20 μmol/L) and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (20 μmol/L) to ASCF. The ratio of the peak current of NMDA receptor to that of glutamate receptor was calculated. Results The decaying time of NMDA-EPSCs of neurons in the visual cortex became shorter after eye-opening ($P<0.05$), but the rising time did not change markedly ($P>0.05$). The ratio of NMDA currents to glutamate currents became gradually smaller after eye-opening ($P<0.05$). Conclusion With the increase in visual input, the time course of NMDA-EPSCs of neurons in the visua

Key words: postsynaptic currents; N-methyl-D-aspartate receptor; visual cortex; development

视觉发育可塑性关键期内,视觉经验可以修饰、调制视皮层神经元的突触联系,至成年以后,不再具有这种作用[1]。这一问题一直引起广泛关注,但关键期"激发"和"终止"的细胞和分子机制仍不清楚。作为谷氨酸受体亚型之一的N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体在视皮层介导兴奋性突触传递,其亚单位NR2B在出生时有高水平表达,在随后几周内亚单位NR2A表达逐渐提高[2,3]。NR2A/B比率的变化带来的一个功能表现就是由NMDA受体介导的电流的时程发生变化[4]。在这一变化过程中,视皮层神经元NMDA受体电流成分在谷氨酸受体电流中的比例又如何发育变化?也就是说,与nonNMDA受体电流之间具有何种存在关系?目前,未见有关的研究报道。为此,本实验采用脑片膜片钳全细胞记录技术,研究视觉可塑性关键期内大鼠视皮层神经元的NMDA受体介导的兴奋性突触后电流(Excitatory postsynaptic currents, EPSCs)的发育变化、以及与nonNMDA受体电

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30025014)
作者简介:秦 伟(1967-),男,河南省社旗县人,博士,主治医师,从事眼部疾病影像诊断和视觉发育方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754403
收稿日期:2002-12-05;修回日期:2003-03-05

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

流之间的存在关系，为进一步从突触水平探索弱视的发病机制增添基础研究资料。

1　材料和方法

1.1　实验动物

出生后 14（睁眼前）、21（睁眼后 7 d）和 28 d（睁眼后 14 d）龄健康 Wistar 大鼠各 10 只（本校实验动物中心提供），雌雄不限。

1.2　主要溶液的配制

1.2.1　新鲜人工脑脊液（Artificial cerebrospinal fluid，ACSF）的配制[3]　将 NaCl 7.246 g，KCl 0.236 5 g，$MgSO_4$ 0.320 4 g，NaH_2PO_4 0.149 97 g，$NaHCO_3$ 1.092 13 g，葡萄糖 4.930 2 g 以及 $CaCl_2$ 0.176 45 g 加入到 1 500 ml 蒸馏水中溶解。室温、通 O_2 下，调整 pH 为 7.2～7.6。

1.2.2　电极内液的配制[3]　EGTA 0.003 8 g，葡萄糖酸钾 0.679 2 g，$MgCl_2$ 0.008 13 g，HEPES 0.023 83 g，ATP 0.06 g 加入蒸馏水至 25 ml，调整 pH 值为 7.3 后迅速放入 0 ℃冰箱备用。

1.3　视皮层脑片的制备

乙醚麻醉动物，快速断头，取出的大脑浸入 0 ℃、氧饱和的 ACSF 中。将脑组织块固定到振动切片机（Vibratome-1000，美国 Ted Pella 公司）的平台上，在冠状平面上切成厚度为 300～400 μm 的脑片。移入通 O_2 的 ACSF 中，室温下孵育 1 h 备用。

1.4　脑片膜片钳全细胞记录

取一片备用的视皮层脑片，放入脑片槽中，用室温下氧饱和的 ACSF 循环灌流（3～4 ml/min）。双极钢丝刺激电极（尖端直径小于 10 μm）置于脑白质。用电极拉制器（P-97，美国 Sutter 公司）拉制玻璃微电极（tw150 F-4 型，美国 WPI 公司），记录电极（阻抗为 5～10 MΩ[5]）内充入适量的电极内液，置一根 Ag/AgCl 电极，通过电极夹持器与放大器（Axopatch 200B，美国 Axon 公司）的探头相连。在解剖显微镜下，用微操纵器将记录电极插入视皮层Ⅱ-Ⅳ层。利用特定的测试方波电脉冲寻找细胞，给予幅度 0.5 mA，时程 100 μs 的刺激诱发突触后电流。记录 5 min，如峰电流无变化，即在 ACSF 中加入以下受体拮抗剂（均购自美国 Sigma 公司）：加入 γ-氨基丁酸（Gamma-aminobutyric acid，GABA）受体选择性拮抗剂荷包牡丹碱（Bicuculline methiodide，BMI）20 μmol/L[5]，分离出其中的谷氨酸受体介导的成分电流；然后，同时加入 nonNMDA 受体阻断剂氰基-7-硝基喹啉-2，3-二酮（6-cyano-7-nitroquinoxaline-2，3-dione，CNQX）20 μmol/L 和 BMI 20 μmol/L[5]，分离出其中的 NMDA 受体成分电流。并计算 NMDA 受体和谷氨酸受体的峰电流的比率。

1.5　统计学处理

采用 Clampfit 8.1（美国 Axon 公司）和 SPSS 10.0 软件，分别对上升时间、下降时间和电流比率进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠视皮层神经元 NMDA-EPSCs 的发育变化

共在 40 个细胞（视皮层Ⅱ-Ⅳ层神经元）上成功分离出 NMDA-EPSCs，见图 1、2。在生后 14～28 d，随着天龄的增加，视皮层神经元的 NMDA-EPSCs 的下降时间变短（$F_{2,37}=5.949$，$P=0.006$），而上升时间并无显著性变化（$F_{2,37}=0.671$，$P=0.517$），见表 1。

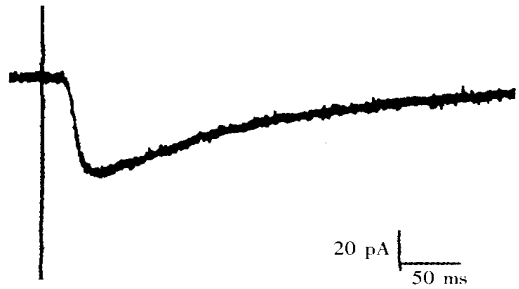


图 1　大鼠生后 **14 d**（睁眼前）视皮层神经元 **NMDA-EPSCs**，下降时间较长

Fig 1　NMDA-EPSCs of neurons in rat visual cortex on postnatal day 14 (before eye-opening), its decaying time is longer

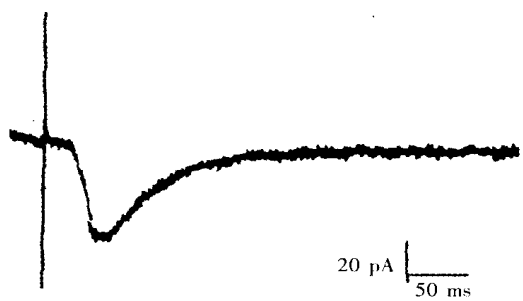


图 2　大鼠生后 **21 d**（睁眼后 **7 d**）视皮层神经元 **NMDA-EPSCs**，下降时间变短

Fig 2　NMDA-EPSCs of neurons in rat visual cortex on postnatal day 21 (7 days after eye-opening), its decaying time becomes shorter

表 1　大鼠视皮层神经元 **NMDA-EPSCs** 的发育变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　The developmental changes of NMDA-EPSCs in rat visual cortex（$\bar{x}\pm s$）

Group	Cell-number	Rising time (ms)	Decaying time (ms)
Postnatal day 14	13	5.7±2.0	35.4±13.8
Postnatal day 21	14	5.9±2.5	24.5±7.7 *
Postnatal day 28	13	6.6±1.7	22.5±8.3 *

*：$P<0.05$ *vs* postnatal day 14

2.2　大鼠视皮层神经元 NMDA 受体和谷氨酸受体的峰电流比率的发育变化

在 ACSF 中加入 GABA 受体选择性拮抗剂 BMI（20 μmol/L），分离出突触后电流中的谷氨酸受体介导的成分电流，见图 3；然后同时加入 nonNMDA 受体拮抗剂 CNQX（20 μmol/L）和 GABA 受体选择性拮抗剂 BMI（20 μmol/L），分离出其中的 NMDA 受体介导的成分电流，见图 4。计算出每个细胞的 NMDA 受体和谷氨酸受体的峰电流的比率。结果显示，在生后 14～28 d，这一比率随天龄增加而减小（$F_{2,37}=4.661$，$P=0.016$），见表 2。

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

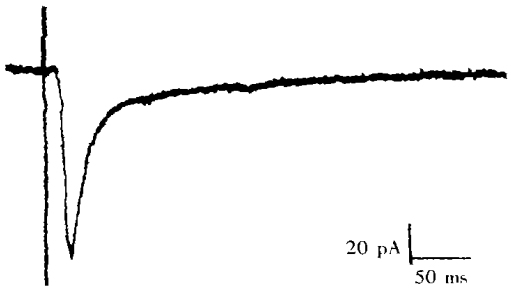


图3 大鼠生后 28 d(睁眼后 14 d)视皮层神经元的谷氨酸受体成分电流

Fig 3 Glutamate-EPSCs of neurons in rat visual cortex on postnatal day 28(14 days after eye-opening)

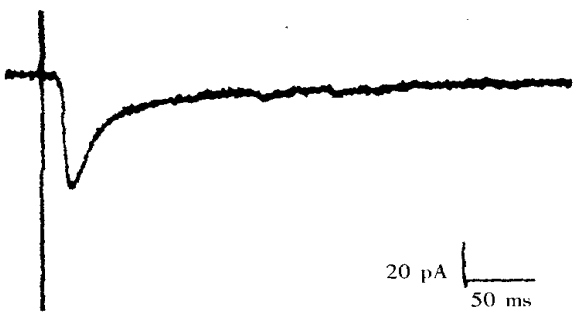


图 4 与图 3 为同一细胞,为阻断 nonNMDA 受体后记录到的 NMDA 受体电流成分

Fig 4 NMDA-PSCs the same neuron with that in Fig 3 recorded by blocking nonNMDA receptors

表 2 大鼠视皮层神经元 NMDA 受体和谷氨酸受体峰电流比率的发育变化(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The developmental changes of the ratio of NMDA-EPSCs to glutamate-EPSCs in rat visual cortex (%, $\bar{x}\pm s$)

Group	Cell number	Ratios of NMDA-EPSCs to glutamate-EPSCs
Postnatal day 14	13	0.65±0.26
Postnatal day 21	14	0.46±0.22 *
Postnatal day 28	13	0.40±0.18 *

*: $P<0.05$ *vs* postnatal day 14

3 讨论

在视觉发育早期,视觉输入的增加引起 NMDA 受体介导的场电位的时程缩短和只含 NR2B 的 NMDA 受体表达下降[4]。我们在全细胞记录水平上发现,视皮层神经元 NMDA 受体介导的 EPSCs 的时程缩短主要体现在下降时间上,上升时间的变化并不显著。睁眼前,大鼠的视觉输入为光觉,没有形觉输入,这时的视皮层 NMDA-EPSCs 的下降时间较长。睁眼后,大鼠的视觉输入既有光觉又有形觉,视皮层 NMDA-EPSCs 的下降时间逐渐变短。这种电生理学改变受许多因素调控[5~7],例如,在出生后头几周内,视皮层的 NR2A/B 比率经验依赖性增大[6],NR2A 亚单位表达的变化与 NMDA-EPSCs 时程的变化吻合[8]。另外,视觉输入的增加还影响视皮层受体激动剂受点亲和性、脱敏速度和脱敏恢复速度等[9],进而引起 NMDA-EPSCs 电学特性的变化。

既往文献中,尚未见从受体介导的成分电流的角度研究视觉发育可塑性关键期内视皮层神经元谷氨酸电流的成分变化。我们药理地分离出谷氨酸受体电流,并继续在同一细胞上分离 NMDA 受体电流。结果显示,在生后 14~28 d,大鼠视皮层神经元 NMDA 受体和谷氨酸受体的峰电流比率随天龄增加而减小。由于谷氨酸受体电流包括 NMDA 受体电流和 nonNMDA 受体电流两大类成分,从我们的结果中可以看出,在谷氨酸受体电流中,NMDA 受体电流成分在关键期早期占优,而 nonNMDA 受体电流成分随着发育增加,在关键期后期(28 d)占优。这一结果类似于在皮质丘脑突触上的研究:随着视觉经验的增加,nonNMDA 受体介导的皮质丘脑突触传递逐渐增强[10]。在大鼠视皮层,NMDA 受体电流成分在关键期早期占优可能与形觉输入缺乏或不足而产生的其它发育变化有关。既往研究认为[10~12],在关键期早期视皮层神经元静息突触较多,此时 NMDA 受体比 nonNMDA 受体对谷氨酸的亲和力高,NMDA 受体可能被不足以引起 nonNMDA 受体电流的低浓度谷氨酸激活,即使静息突触不能释放出谷氨酸,其周围存在着一些功能性突触,也可能提供低浓度的谷氨酸,从而激活 NMDA 受体。也有认为,刺激不能诱导出反应是由于突触前末梢去极化和囊泡排出之间的某位置发生障碍[10],接近递质释放的区域缺乏足够的 Ca^{2+} 通道[11]。视觉发育早期,尽管突触后膜上存在有 nonNMDA 受体,谷氨酸能的突触主要通过 NMDA 受体传递,nonNMDA 受体却很少参与突触传递[10,12]。还有一种解释认为可能是由于缺乏某些相关的蛋白(比如谷氨酸受体反应蛋白)或缺乏必需的翻译后修饰(如磷酸化),致使早期的 nonNMDA 受体在功能上处于静止,不能与谷氨酸结合[13]。

(本实验承蒙中国科技大学生命科学学院周逸峰研究员、李祥瑞副研究员给予技术性支持,特此致谢!)

参考文献:

[1] Hubel D H, Wiesel T N. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens[J]. J Physiol, 1970, 206(2): 419-436

[2] Elizabeth B, Roberts E B, Ramoa A S. Enhanced NR2A subunit expression and decreased NMDA receptor decay time at the onset of ocular dominance plasticity in the ferret[J]. J Neurophysiol, 1999, 81: 2587-2589.

[3] Flint A C, Maisch U S, Weishaupt J H, *et al*. NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex[J]. J Neurosci, 1997, 17(10): 2469-2476.

[4] Benjamin D P, Aarti K S, Harel Z S, *et al*. Visual experience and depri-

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

vation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex[J]. Neuron, 2001, 29(1): 157—196.
[5] White S A, Livingstone F S, Mooney R. Androgens modulate NMDA receptor-mediated PSCs in the zbro finch song system[J]. J Neurophysiol, 1999, 82: 2221—2234.
[6] Beaver C J, Ji Q H, Daw N W, *et al*. Effect of the group Ⅱ metabotropic glutamate agonist, 2R, 4R-0APDC, varies with age, layer, and visual experience in the visual cortex[J]. J Neurophysiol, 1999, 82(1): 86—93.
[7] Cao Z, Lickey M E, Liu L, *et al*. Postnatal development of NR1, NR2A and NR2B immunoreactivity in the visual cortex of the rat[J]. Brain Res, 2000, 859(1): 26—37.
[8] Philpot B D, Sekhar A K, Shouval H Z, *et al*. Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex[J]. Neuron, 2001, 29(1): 157—169.
[9] Lester R A, Jahr C E. NMDA channel behavior depends on agonist affinity [J]. J Neurosci, 1992, 12(2): 635—643.
[10] Golshani P, Warren R A, Jones E G. Progression of change in NMDA, non-NMDA, and metabotropic glutamate receptor function at the developing corticothalamic synapse[J]. J Neurophysiol, 1998, 80(1): 143—154.
[11] Kielland A, Heggelund P. AMPA receptor properties at the synapse between retinal afferents and thalamocortical cells in the dorsal lateral genicurlate nucleus of the rat[J]. Neurosci Lett, 2001, 316(2): 59—62.
[12] Rupel S, Hatt H, Gottman K. Silent synapse in the developing rat visual cortex: evidence for postsynaptic expression of synaptic plasticity[J]. J Neurosci, 1998, 18(21): 8863—8874.
[13] Yasuda H, Kinoshita S, Tsumoto T, *et al*. Localized contribution of N-methyl-D-aspartate receptors to synaptic input-induced rise of calcium in apical dendrites of layer Ⅱ/Ⅲ neurons in rat visual cortex[J]. Neurosci, 1998, 85(4): 1011—1023.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2003)10-0857-01

个案与短篇

先天性右冠状动脉右心室瘘 1 例

A case report of congenital right coronary artery fistula draining into the right ventricle

陈红勤 （第三军医大学附属西南医院心血管内科，重庆 400038）

患者，男性，26 岁。因“劳力性心悸、呼吸困难 10 年，加重半年”入院。既往无剧烈胸痛及活动后青紫、蹲踞史。查体：体温 37.5 ℃，脉搏 108 次/min，呼吸 20 次/min，血压 158/83 mmHg。颈静脉怒张，双肺(－)，心尖搏动位于左侧第 6 肋间锁骨中线外 1 cm 处，心尖搏动呈抬举样，胸骨右缘 3、4 肋间可触及收缩期震颤。心浊音界向两侧扩大。心率 108 次/min，心律齐，A2＜P2，心尖区可闻及Ⅱ/Ⅵ级吹风样收缩期杂音，胸骨右缘 3、4 肋间闻及Ⅳ—Ⅴ/Ⅵ级连续性杂音，杂音较表浅、柔和。周围血管征阳性。肝脏肋下 1 cm，剑下未触及。双下肢轻度凹陷性水肿。入院后摄 X 线胸片示：肺淤血，双心室增大，主动脉增宽、迂曲。心脏超声示：双心室增大，肺动脉瓣赘生物伴脱垂。心电图提示：窦性心律，左室大。因诊断不清于入院后行心腔及主动脉造影术，造影结果为先天性右冠状动脉右心室瘘。后患者在我院胸心外科行开胸探察手术，术中证实为右冠状动脉右心室瘘，伴双心室增大及肺动脉瓣赘生物。进行瘘口修补及赘生物清除。手术效果良好。

讨论

右冠状动脉右心室瘘是一种非常见的冠状动脉异常，属左向右分流型先天性心脏病[1]。由于右心室压力低，故收缩期及舒张期均有分流。听诊多为胸骨左右缘的连续性杂音，杂音常比较柔和、表浅。须与其他有连续性杂音的先天性心脏病进行鉴别。具有连续性杂音的先天性心脏病中，比较常见的为动脉导管未闭。其杂音的部位较高，多位于胸骨左缘第 2 肋间，杂音的性质比较粗糙响亮，呈机器声。可触及连续性震颤。此外，瓦氏窦瘤破裂、主肺动脉间隔缺损亦可出现连续性杂音。但瓦氏窦瘤破裂的杂音多在胸骨左缘，患者常有剧烈胸痛史。主肺动脉间隔缺损的杂音则较粗糙，与第一心音几乎同时出现，且因分流量大，心功能减退更明显，早期即出现肺动脉高压、艾森曼格综合征。在本病例中，由于左向右分流，左室回心血量增多，前负荷增加，故左室增大明显，收缩压也高于正常；且因肺动脉瓣脱垂伴关闭不全，故右室也有一定程度的增大。根据杂音的性质、杂音的最响部位及病史，可对冠状动静脉瘘作出初步诊断[2]。心血管造影检查能达到确诊的目的[3]。本病预后一般较好，如病程迁延，可导致心肌缺血或心力衰竭。及早手术修补瘘口是治疗本病的惟一途径。

关键词：先天性心脏病；冠状动静脉瘘
中图法分类号：R541.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] Angelini P, Velasco J A, Flamm S. Coronary anomalies: incidence, pathophysiology, and clinical relevance[J]. Circulation, 2002, 105(20): 2449—2454.
[2] Alfredo Z, Fabio M, Gennaro S, *et al*. Coronary arteriovenous aneurysmatic fistula draining into the right atrium[J]. Circulation, 1998, 98(18): 1946—1948.
[3] Andrew M T, Sara A T, Michael B R, *et al*. Coronary artery imaging in grown up congenital heart disease: complementary role of magnetic resonance and X-Ray coronary angiography[J]. Circulation, 2000, 101(14): 1670—1678.

（编辑 汪勤俭）

作者简介：陈红勤(1972—)，女，四川省巴中市人，硕士研究生，主治医师，讲师。电话：(023)65419729

收稿日期：2003-03-26；修回日期：2003-04-17

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