DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.008
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol.25, No.10
858 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)10-0858-04

谷氨酸和GABA对额叶皮质锥体细胞自发性电活动的影响

宋承辉,胡志安,阮怀珍,蔡文琴,吴喜贵,张金海 (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,观察急性分离大鼠额叶皮质Ⅴ、Ⅵ层锥体细胞自发性电活动的特点及其影响因素。方法 采用酶加机械分离法分离8~12 d鼠龄的Wistar大鼠额叶皮质Ⅴ、Ⅵ层锥体细胞,用膜片钳全细胞记录技术测定电生理学特性,观察不同膜电位水平时自发性电活动的特点及谷氨酸和GABA对其影响。结果 73.44%的分离神经元具有自发性电活动($n=64$),膜电位在-40~-60 mV时较易出现。1 mmol/L的谷氨酸显著增加放电活动的频率,100 μmol/L GABA则明显抑制放电活动的产生。结论 急性分离的大鼠额叶皮质锥体细胞有自发性电活动,且受谷氨酸和GABA的调节。

关键词:额叶皮质;锥体细胞;膜片钳;自发性电活动;急性分离
中图法分类号:R338.25;R338.8;R977.4 文献标识码:A

Effects of glutamic acid and GABA on spontaneous activity of pyramidal cells of the frontal cortex in rats

SONG Cheng-hui, HU Zhi-an, RUAN Huai-zhen, CAI Wen-qing, Wu Xi-gui, ZHANG Jin-hai (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the characteristics and factors influencing the spontaneous activity of acutely dissociated pyramidal cells of lays of Ⅴ and Ⅵ of the frontal cortex of Wistar rats. Methods Pyramidal cells were dissociated by a combination of mechanical and enzymatic method from the brain from 8 to 12 day-old Wistar rats. Basic electrophysiology and spontaneous activities under different membrane potential and the influence of glutamate/GABA on the activities were studied based on whole cell patch clamp. Results As many as 73.44% of the isolated neurons ($n=64$) had spontaneous activities mostly appearing between a membrane potential of -40~-60 mV. The firing frequency was greatly increased by 1 mmol/L glutamate and completely inhibited by 100 μmol/L GABA. Conclusion Spontaneous activities are recorded from acutely dissociated FCX pyramidal cells, which can be modulated by glutamate and GABA.

Key words: frontal cortex; pyramidal cell; patch clamp; spontaneous activity; acute dissociation

额叶皮质(Frontal cortex, FCX)在情绪、认知和运动行为的调控中起关键作用。有证据表明FCX的单胺能传入通路紊乱与抑郁、精神分裂症等精神性疾病的发生有关[1]。额叶皮质中还有谷氨酸能(Glu)和γ-氨基丁酸(GABA)能通路的投射,它们与单胺类能系统相互调节,在上述的生理和病理过程中起着重要的作用[2]。

谷氨酸与其受体结合后引起阳离子(钠、钙等)内流,使神经元去极化,产生兴奋性突触后电位(EPSP)[3]。GABA与GABA受体结合后引起氯离子内流,产生抑制性突触后电位(IPSP)[4]。在急性分离的下丘脑神经元,谷氨酸可使细胞产生去极化并使自发性活动(Spontaneous activity)频率明显增加[5]。但对急性分离FCX神经元的直接作用还未见报道。本实验我们应用改进的大鼠额叶皮质Ⅴ、Ⅵ层锥体细胞急性分离方法,用膜片钳全细胞记录技术记录分离神经元的基本电生理指标,并研究了其自发性活动的特点及谷氨酸和GABA对这种活动的影响。

1 材料与方法

1.1 实验用动物

新生8~12 d的Wistar大鼠28只,雌雄不限,由本校实验动

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270443)
作者简介:宋承辉(1972-),男,辽宁省大连市人,硕士,讲师,主要从事睡眠神经生物学方面的研究。电话:(023)68752232
通信作者:胡志安,电话:(023)68753704
收稿日期:2002-10-29;修回日期:2003-01-18

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

物中心提供。

1.2　试剂与溶液

人工脑脊液(ACSF, mmol/L): NaCl 126, KCl 2.5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 2, NaH_2PO_4 1.25, $NaHCO_3$ 26, D-glucose 10, 混合气(95% O_2 5% CO_2)饱和条件下用 NaOH 调 pH 至 7.3~7.4; 电极内液(mmol/L): 葡萄糖酸钾 145, $MgCl_2$ 2, K_2ATP 5, EGTA 0.5, HEPES 5, 用 KOH 调 pH 至 7.2~7.3, 0.22 μm 微孔滤膜过滤分装后−20 ℃冻存备用。

1 mmol/L 谷氨酸、100 μmol/L GABA、50 μmol/L APV、10 μmol/L CNQX、30 μmol/L 荷包牡丹碱(bicuculline), 1.25 mg/ml 的胰蛋白酶(Trypsin)溶液均用新鲜 ACSF 配成。

葡萄糖酸钾、EGTA、谷氨酸、GABA、NMDA 受体阻断剂 APV、AMPA 受体阻断剂 CNQX、GABA 受体阻断剂 bicuculline、trypsin 为 Sigma 公司产品, HEPES 为上海生工(AMRESCO 分装)产品, 其余为市售分析纯试剂。

1.3　大鼠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 30~60 s, 在冰台上将额叶前端(2~4 mm)按冠状面切成约 500 μm 的薄片, 入室温(20~24 ℃)混合气饱和的 ACSF 中孵育 1~6 h; 在胰蛋白酶溶液中消化, 30 ℃ 40 min; ACSF 漂洗 4 次, 在深色背景下分出额叶皮质的深(V、VI)层, 用经热处理的尖端直径分别为 1、0.5、0.1 mm 的 Pasteur 吸管轻轻吹打成 0.5~1 ml 的细胞悬液; 静置 1 min 左右待未吹散的组织块沉下后吸取上层悬液加入自制的有机玻璃灌流槽中, 在相差显微镜(Olympus, IX070, Japan)下观察, 细胞贴壁后通以混合气饱和的 ACSF 灌流, 调节流速(约 2 ml/min)使槽内液体 1 min 之内更新完全。

1.4　给药方式

采用自制的喷射给药装置给药, 药品配成终浓度后灌入尖端直径约 50 μm 的玻璃管中, 调节尖端与记录细胞的距离在 100 μm 以内, 轻轻给予正气压后可见足量的介质流过细胞表面。

1.5　膜片钳记录

采用软质中性无芯玻璃管(直径 1.5 mm, 长 10 cm, 原上海脑研究所)于拉制仪(Narishge, PC-10)上分两步拉制成尖端 1~2 μm 的微电极。充灌电极内液后阻抗为 5~10 MΩ, 封接阻抗为 2~6 GΩ, 串连电阻在 20 MΩ 以下。实验采用 Axopatch 200B 膜片钳放大器, Digidata 1200 模数转换器和 pclamp6(版本: 6.0.4)记录和分析软件(均为 Axon 公司产品)。采样频率 10 kHz, 滤波频率 2 kHz。

实验在 20~24 ℃的室温下进行。灌流槽置于倒置显微镜载物台上, 用显微操纵仪(Narishige, ONM-1)进行操作。选择表面光洁, 有典型锥体细胞样突起的神经元进行膜片钳实验。形成全细胞记录后, 立即记录静息膜电位(RMP)。在电流钳下记到动作电位(AP)或电压钳下记到快速激活和失活钠电流的细胞被认为是正常的神经元, 才进行后面的实验。在观察自发性电活动时, 电流钳记录方式下 RMP 绝对值小于 60 mV 的神经元通过放大器给以一定的注射电流使膜超极化至膜电位接近−60 mV; 电压钳记录均在−60 mV 的钳制电压下进行[5]。

1.6　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2　结果

2.1　基本电生理学特性

相差显微镜下, 急性分离后完整的神经元表面光洁, 有较长的突起。胞体呈锥形或三角形, 有一个顶树突(可达 100 μm)和多个基树突, 见图 1A。完整的锥体细胞形态可维持 8 h 以上, 电生理学特性没有改变。

分离的 FCX 锥体细胞易于形成全细胞记录, 由 Axopatch 200B 放大器记录的静息膜电位(RMP)为(−51.81±10.59) mV (n=95)。串连阻抗(Rs)为(12.42±4.28)MΩ。

电流钳状态下, 通过记录电极给以一系列由超极化到去极化的阶跃电流(−60~+40 pA, step=10, 时长 100 ms)刺激, 得到电压-电流曲线, 92.22%(n=90)的细胞有诱发动作电位(AP)的产生, 见图 1B。平均动作电位幅度(73.99±14.24)mV。

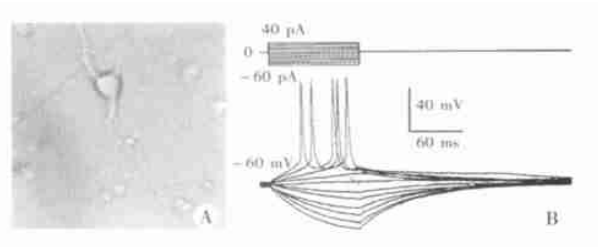


图 1　急性分离的 FCX 锥体细胞(A, ×20)及其动作电位(B)

Fig 1　Dissoclated FCX pyramidal cell (A) and action potentials evoked by hyperpolarizing and depolarizing 100 ms current pulses of −60 to +40 pA(B)

2.2　急性分离 FCX 锥体细胞的自发性电活动

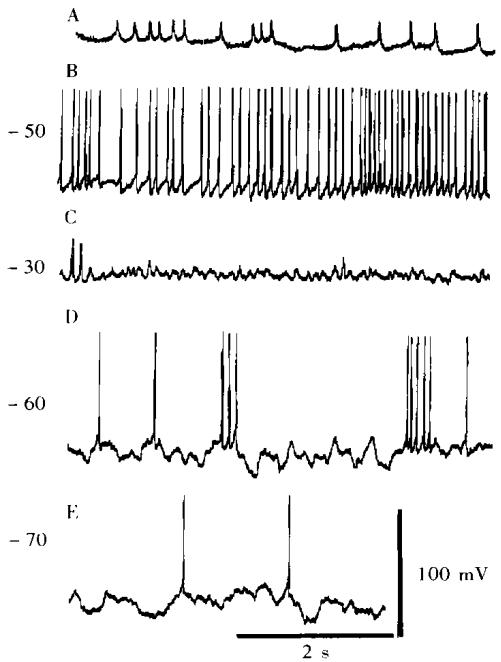
在贴附式(封接电阻 10 GΩ 以上)和全细胞电流钳记录方式下, FCX 锥体细胞均可有自发性电活动的出现。图 2 为一细胞在贴附式及破膜形成全细胞后不同膜电位下的自发性放电。贴附式记录时的自发性放电幅度较小, 见图 2A, 破膜后显著增大, 并且发放频率和幅度随膜电位的不同而改变, 见图 2B~E。只有少数神经元(7.78%)在任何膜电位(−120~+40 mV)状态下都没有放电活动。这种自发性活动不受 APV、CNQX 和 bicuculline 的影响。

2.3　谷氨酸和 GABA 对急性分离的 FCX 锥体细胞自发性活动的影响

所有记录的神经元对 1 mmol/L 的谷氨酸都有反应(n=26)。在电压钳记录方式下, 细胞表面施加谷氨酸后, 可见内向电流并伴有放电的产生(6/21); 停止加药后放电频率很快下降直至消失, 膜电流也逐渐恢复, 见图 3A。电流钳记录方式下, 对记录细胞轻轻给以正气压, 几乎在看到含有谷氨酸的介质流经细胞表面的同时, 即可见到细胞膜产生去极化电位并伴放电频率明显增加(18/18); 停止吹药后, 又很快恢复到加药前状态, 见图 3B。

电流钳记录方式下, 100 μmol/L 的 GABA 使细胞膜发生超极化伴自发性活动的消失(8/8), 见图 3C。

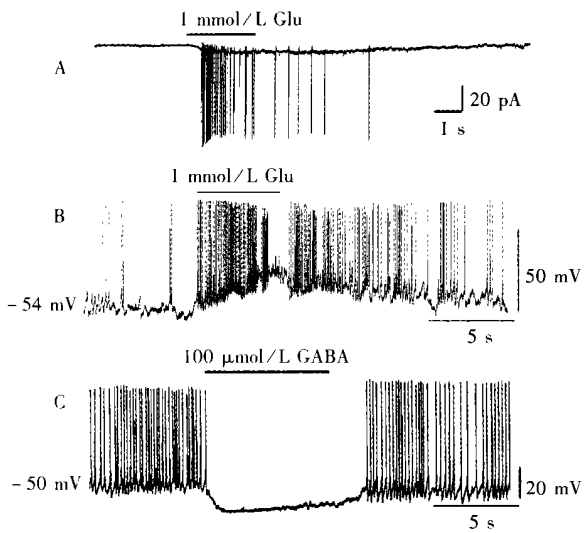
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: Cell-attached mode; B ~ E: Whole-cell mode; RMP= — 50 mV

图 2 正常 FCX 锥体细胞的放电活动

Fig 2 Firing activities of FCX pyramidal cell



Glutamate evoked inward current and firing activities under voltage-clamp (A) and depolarization and increasing activities under current-clamp (B), whereas GABA evoked hyperpolarization accompanied by activities disappeared (C)

图 3 谷氨酸和 GABA 对 FCX 锥体细胞放电活动的影响

Fig 3 Influence of glutamate and GABA on firing activities of FCX pyramidal cell

3 讨论

3.1 大鼠额叶皮质 Ⅴ、Ⅵ层锥体细胞的急性分离

分离出完整的、表面光洁的、存活时间长的神经元是膜片钳记录成功的关键。我们建立的这种大鼠额叶皮质锥体细胞的急性分离方法是根据本室的条件，参考文献[5~7]经过改进实现的。分离时主要注意以下几点：①开颅取脑、制备脑片过程要迅速，切片时要不时地滴加氧饱合的 0~4 ℃的 ACSF 浸润脑块（或在冰水中进行），以防止脑组织缺氧对神经元造成损伤；②孵育、消化和记录过程中都要保证神经元处在氧饱和的环境中；③环境温度对胰酶活性影响很大，要控制好酶浓度、温度和消化时间；④孵育时间不宜过短，吹打过程要轻、慢，尽量避免吹出气泡。

我们分离出的皮层神经元有多个突起，表面光洁，易于封接，且活性维持时间长，适于膜片钳实验。细胞悬液加入有机玻璃灌流槽后贴壁牢固，即使较快的灌流速度也不易将细胞冲走。结果表明 RMP、Rs 均在正常范围，动作电位也较容易引发。

3.2 急性分离大鼠额叶皮质锥体细胞自发性放电的特征

实验表明，状态良好的神经元有自发性放电的产生。这种自发性活动呈电压依赖式，在静息膜电位处较易出现，膜电位向去极化方向变化时频率随之升高幅度变小直至消失，向超极化方向变化时幅度增大但频率降低直至消失。有的细胞在记录过程中膜电位会升高（绝对值下降）而致自发性电活动的消失，这时可通过放大器给以适当的注射电流，使其超极化至－50~－60 mV，自发性电活动又可出现。

从放大的单个放电活动来看，其波形与快启动、慢衰退的突触后电位（PSP）不同[8]，呈慢启动、快衰退，与动作电位的波形相似。因此，这种自发性活动是膜电位超过阈值后自发动作电位的发放。

谷氨酸使细胞膜发生去极化，动作电位的发放频率明显增加；GABA 可使膜超极化而抑制其发放。表明这种急性分离的神经元表面保留了谷氨酸和 GABA 等功能性膜受体，通过受体-配体反应打开了相应的离子通道并分别引起了阳离子和阴离子的内流从而使膜电位发生变化进而影响了动作电位的发放频率。

已有不少关于包括额叶皮质[8]在内的急性分离中枢神经元自发性电活动的报道[5~11]。但目前对皮层神经元自发性放电产生的机制仍然了解较少。根据 Drewe 等[9]，在组织消化和吹打过程中溶液中 1~2 mmol/L 的 $CaCl_2$（本实验中为 1.5 mmol/L）可以防止分离出的神经元突触前成分的储留。本实验结果也证明这种自发性放电不受谷氨酸和 GABA 受体阻断剂所阻断，因此其不是由突触前成分释放谷氨酸等神经递质引发的，而有可能是由于神经元细胞内离子浓度产生波动进而引起膜电位的波动造成的。例如 Terasawa 等[12]发现，培养的恒

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

河猴促黄体激素释放激素(LHRH)神经元胞内钙信号有自发振荡的现象并可形成同步化，并与 LHRH 周期性释放方式相似。皮层神经元自发性放电的产生是否有类似的机制还需进一步的研究。

参考文献：

[1] Millan M J, Lejeune F, Gobert A. Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressant agents[J]. J Psychopharmacol, 2000, 14(2): 114—138.

[2] Lambe E K, Goldman-Rakic P S, Aghajanian G K. Serotonin induces EPSCs preferentially in layer V pyramidal neurons of the frontal cortex in the rat[J]. Cereb Cortex, 2000, 10(10): 974—980.

[3] Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals[J]. Life Sci, 2000, 67(4): 335—364.

[4] Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors[J]. Trends Pharmacol Sci, 2000, 21(1): 16—19.

[5] Kuehl-Kovarik M C, Pouliot W A, Halterman G L, *et al*. Episodic bursting activity and response to excitatory amino acids in acutely dissociated gonadotropin-releasing hormone neurons genetically targeted with green fluorescent protein[J]. J Neurosci, 2002, 22(6): 2313—2322.

[6] Drewe J A, Childs G V, Kunze D L. Synaptic transmission between dissociated adult mammalian neurons and attached synaptic boutons[J]. Science, 1988, 241(4874): 1810—1803.

[7] 许长庆，张宗明，夏作理，等. 大鼠海马 CA1 区锥体细胞的急性分离和鉴定[J]. 中国应用生理学杂志，1999, 15(2): 189—192.

[8] Munakata M, Akaike N. Theophylline affects three different potassium currents in dissociated rat cortical neurones[J]. J Physiol, 1993, 471(1): 599—616.

[9] Fergusong A V, Bicknell R J, Carew M A, *et al*. Dissociated adult rat subfornical organ neurons maintain membrane properties and angiotensin responsiveness for ut to 6 days[J]. Neuroendocrimology, 1997, 66(6): 409—415.

[10] Yang B, Ferguson A V. Orexin-A depolarizes dissociated rat area postrema neurons through activation of a nonselective cationic conductance[J]. J Neurosci, 2002, 22(15): 6303—6308.

[11] Jhamandas J H, Harris K H, MacTavish D, *et al*. Novel excitatory actions of galanin on rat cholinergic basal forebrain neurons: implications for its role in Alzheimer's disease[J]. J Neurophysiol, 2002, 87(2): 696—704.

[12] Tersawa E, Schanhofer W K, Keen K L, *et al*. Intracellular Ca^{2+} oscillations in the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey[J]. J Neurosci, 1999, 19(14): 5898—58909.

（编辑　刘洪娥）

文章编号：1000-5404(2003)10-0861-01

个案与短篇

老年重症患者管饲营养支持效果观察

Effects of the nutritional therapy by tube feeding for the aged critical patients

李明秀，姜学英，王　建　（第三军医大学附属新桥医院营养科，重庆 400037）

由于人口老龄化，高龄老年患者越来越多，重症老年患者常需要依靠管饲供给营养。为了提高整体治疗水平，近年来我们对不能经口进食的危重症老年患者进行了肠内营养支持效果观察。

1　资料与方法

1.1　一般资料

营养治疗的对象为 2000 年至 2002 年 1 月住院的 30 例老年重症患者。其中男性 22 例，女性 8 例，年龄在 60～81 岁(平均年龄 71 岁)，这些患者由于脑溢血、脑梗死、肺性脑病等不能自行经口进食，需要较长时间通过鼻胃管喂食维持生命。肠内营养治疗最短 7 d，最长 1 个月。本组病人所用的鼻饲饮食为自制的匀浆膳。该匀浆膳是由新鲜牛奶、鸡蛋、猪瘦肉、新鲜蔬菜、馒头、麦芽糊精、植物油、食盐等加水煮熟后用高速捣碎机制成匀浆液，每毫升含能量 4.19 kJ，每次 250 ml，每日 6 次胃管注入。匀浆膳配方用最新版营养咨询专用软件进行评价。全天摄入能量 6 280 kJ，其中碳水化合物、蛋白质、脂肪分别占总热能的 60.1%、16%、22.9%，动物蛋白质总量为 69.3%，植物蛋白占 30.7%。热∶氮比值为 121∶1。

1.2　观察指标

1.2.1　人体测量指标　　每例患者营养支持前，营养支持结束后测上臂围(MAC)，和三头肌皮褶厚度(TSF)计算上臂肌围(MAMC)。

1.2.2　实验室检查　　于营养支持前、后分别测血红蛋白、淋巴细胞总数(TLC)、血清总蛋白、白蛋白、血清钠、钾、氯、血糖、胆固醇(Tch)以及血清甘油三酯(TG)。统计学处理用数据库管理系统 FOXBASE 进行。

1.2.3　统计处理　　数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，统计方法用 t 检验。

2　结果

2.1　人体测量结果，见表 1

表 1　人体测量结果($\bar{x}\pm s$)

测量指标	营养支持前		营养支持后		正常值	
	男	女	男	女	男	女
MAC(cm)	23.8±1.85	24.1±1.25	23.8±1.74	23.8±1.65	26.4±3.05	25.6±3.32
TSF(mm)	7.95±0.80	13.2±0.60	7.83±0.91	12.7±0.62	8.3	15.3
MAMC(cm)	21.5±2.12	19.9±1.56	21.5±1.83	19.8±1.56	24.8	23.2

作者简介：李明秀(1950—)女，重庆市人，副主任医师，副教授，主要从事临床营养，药膳食疗，临床营养教学方面的研究，发表论文 30 余篇。电话：(023)68755635

收稿日期：2002-04-17；修回日期：2002-08-10

(下转 869 页)

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