DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.018
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
226 2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)03-0226-04

ACTH和吗啡对创伤痛大鼠海马锥体神经元NMDA受体通道的抑制

庞 勇[1],李希成[1],黎海蒂[1],阮怀珍[2],熊 鹰[1],陈鹏辉[2] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室;[2]神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨创伤痛大鼠海马锥体神经元NMDA受体通道动力学特性的变化及ACTH和吗啡的作用。方法 实验以双侧踝关节离断大鼠为创伤痛模型,应用细胞贴附式膜片钳技术。结果 在正常7~10 d大鼠急性分离的海马CA1区锥体神经元上,记录到多数膜片的NMDA受体通道有两个电导水平,分别为50 pS及38 pS,以50 pS占多数,且以短开放为主,但也有长开放通道。38 pS电导仅有短开放通道。大鼠双侧踝关节完全离断后2 h,50 pS及38 pS短开放通道、50 pS长开放通道的开放概率和开放时间均比正常对照组显著增加,还出现了38 pS长开放通道。在50 pS短开放通道的记录中,$ACTH_{1-24}$和吗啡可显著抑制创伤大鼠海马CA1区锥体神经元NMDA受体通道的开放概率和开放时间;预先加入阿片受体拮抗剂纳络酮能阻断上述的抑制效应。结论 ACTH和吗啡对伤害性信息传递的调制作用可能与其通过阿片受体抑制创伤大鼠海马NMDA受体通道动力学特性的变化有关。

关键词:创伤痛;膜片钳技术;NMDA受体通道;海马锥体神经元;ACTH;吗啡
中图法分类号:R338.1;R338.26;R641.02 文献标识码:A

The inhibitory effects of ACTH and morphine on NMDA receptor channel of hippocampal pyramidal neurons in rats suffering from traumatic pain

PANG Yong, LI Xi-cheng, LI Hai-di, RUAN Huai-zhen, XIONG Ying, CHEM Peng-hui (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of kinetic properties of N-methyl-D-asparate (NMDA) receptor channel in acutely dissociated hippocampal pyramidal neurons in rats suffering from traumatic pain and the effects of $ACTH_{1-24}$ and morphine. Methods Model of trauma resulting from amputation in bilateral ankles was established in rats. Cell-attached patch clamp technique was used. Results In acutely dissociated normal rat hippocampal CA1 pyramidal neurons, two conductance levels which were 50 pS and 38pS were found in NMDA receptor channel with 50pS prevailing. The forms of 50 pS channel included short opening and burst opening, but the 38 pS channel included only short opening. At 2 h after amputation in bilateral ankles, the open times and open probabilities of 50 pS and 38 ps short opening channel and 50 ps burst opening channel increased significantly as compared with those of the control. Furthermore, the 38 pS burst opening channel emerged. In the recording of 50 pS short opening channel, $ACTH_{1-24}$ as well as morphine markedly reduced the open time and open probabilities of NMDA receptor channel after amputation, which could be blocked by naloxone, the opiate receptor antagonist. Conclusion The modulation of ACTH and morphine on transmission of nociceptive information may be related to their inhibitory effects mediated by opiate receptor on the changes of kinetic properties of NMDA receptor channel of hippocampus in traumatic rats.

Key words: traumatic pain; patch clamp technique; NMDA receptor channel; hippocampal pyramidal neurons; ACTH; morphine

兴奋性氨基酸(EAA)是脊椎动物中枢神经系统主要的兴奋性神经递质。NMDA受体是EAA受体最重要的一个亚型,其介导了脊髓伤害性刺激的传导;脊髓背角谷氨酸能系统在中枢疼痛易化状态的发生和持续中起重要作用。多种类型的损害从神经损伤到化学性和脊髓缺血性的痛觉异常和痛觉过敏状态,都可以被脊髓应用NMDA受体拮抗剂所阻断[1]。然而以往对NMDA受体在脊髓水平的伤害性刺激传入调制作用研究得比较充分,对脊髓以上水平,尤其是NMDA受体分布密度最高的海马[2],NMDA受体通道与伤害性感受的关系目前少见报道。已知ACTH在中枢神经系统

作者简介:庞 勇(1972—),男,四川省西充县人,博士,助教,主要从事慢性痛的神经内分泌机制方面的研究。电话:(023)68752254

收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-14

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

参与痛觉调制, 其可抑制甲醛和佐剂性关节炎大鼠的痛反应[3,4]。为此本实验采用膜片钳技术, 研究伤害性刺激对急性分离的大鼠海马 CA1 区锥体神经元 NMDA 受体通道的影响, 同时观察 $ACTH_{1-24}$ 及吗啡的作用。

1　材料与方法

1.1　神经元的急性分离

7～10 d 的 Wistar 大鼠 18 只, 雌雄不拘, 随机分为踝关节离断及正常对照组。根据文献[5]的方法进行海马 CA1 区锥体细胞的急性分离, 将吹打后的细胞悬液静置 5～10 min, 吸取上清液, 滴于涂有多聚赖氨酸的盖玻片上, 静置 10 min, 使细胞充分贴壁。加入 2～3 ml 浴液即可进行单通道记录。

1.2　溶液与药品

人工脑脊液(ACSF, mmol/L): NaCl 126, $NaHCO_3$ 26, NaH_2PO_4 1.25, KCl 5, $CaCl_2$ 2, $MgSO_4$ 2, 葡萄糖 10, pH 7.4; 葡萄糖与 $CaCl_2$ 用时再加。胰蛋白酶消化液: 胰蛋白酶 2 mg, 加入 2 ml 无钙含糖的 ACSF, 用时现配。浴槽液(mmol/L): NaCl 140, KCl 5, $CaCl_2$ 1.8, HEPES 10, 葡萄糖 10, TTX 0.001, TEA-Cl 20, pH 7.2(Tris base)加入 TTX 及 TEA-Cl 的目的在于分别阻断电压依赖性的 Na^+ 和 K^+ 通道。电极内液(mmol/L): NaCl 140, KCl 5, $CaCl_2$ 1.8, HEPES 10, 20 μmol/L 的 L-谷氨酸(L-Glutamate, L-Glu), 1.0 μmol/L 甘氨酸(Glycine, Gly), pH 7.2 (NaOH 调制)。膜蛋白酶, HEPES、TTX、TEA-Cl、L-Glu、Gly、ACTH1-24、Morphine、Naloxone 和 APV 均为 Sigma 产品, 其余为国产分析纯药品。

1.3　创伤痛模型的制备[6]

迅速将 7～10 d Wistar 大鼠自双后肢踝关节处完全离断, 丝线结扎创面止血, 2 h 后迅速断头进行膜片钳实验。

1.4　单通道电活动的记录

本实验采用细胞贴附式(Cell-attached)记录单通道电流。将贴附有细胞的盖玻片放入培养皿中, 加入 2 ml 浴槽液。在倒置显微镜下选择贴壁良好, 细胞膜完整, 形态为锥形或梭形, 有顶树突和基树突特征的锥体细胞, 用微推进器(No-202, Narishige, Japan)推动电极接近细胞。当微电极尖端接触细胞时, 稍加负压, 高阻抗封接即刻形成(阻抗大于 10 GΩ)。以 Fetchex 程序连续采样, 采样频率 10 kHz, 低通滤波器滤波频率为 1 kHz。膜片钳放大器型号为 Axopatch 200B(Axon, 美国)。探头型号: CV203BU。实验室温度 20～25 ℃。

1.5　统计学处理

以 Pclamp(6.04 版, Axon, 美国)的 Fetchan 分析程序进行开关事件(events)的测量, 测量的结果用 pSTAT 程序进行分析处理, 以 Gaussian 和 Exponential 方式对通道的电流幅值及通道的开关时间分布直方图进行拟合。对各拟合分别在 Marquardt-LSQ(最小平方法), Simplex-LSQ 及 Simple-MLE(最大或然率检验)的不同指数水平进行比较, 用 ViewResiduals 进行拟合优度检验。使用 Batchplt 程序打印单通道电流及各种统计结果。实验数据 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析(PDA－2 程序)进行统计学处理。

2　结果

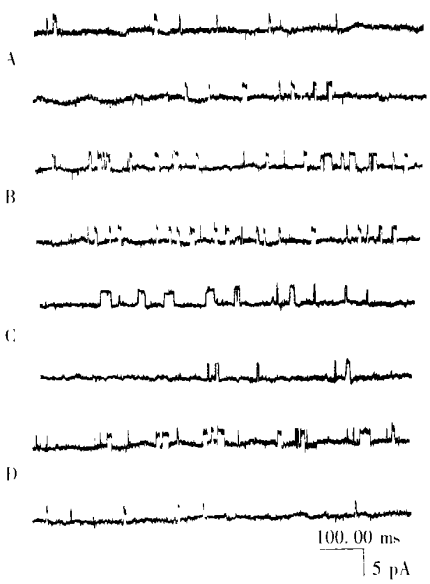
2.1　幼龄大鼠海马 CA1 区锥体神经元 NMDA 受体通道特性

当含 L-谷氨酸(20 μmol/L)和甘氨酸(1 μmol/L)电极内液的记录电极与神经元胞体形成高阻封接后, 膜电位在－40～－140 mV 改变时, 采用细胞贴附方式可记录到内向的单通道电流。如电极内液不含激动剂或加入 NMDA 受体的特异阻断剂 APV(300 μmol/L)则记录不到这类单通道电流。

在 7～10 d 大鼠海马 CA1 区锥体神经元, 记录的多数 NMDA 受体通道为单一电导开放状态, 电导分别为 50 pS 及 38 pS。少数膜片有两种电导开放形态, 50 pS 及 38 pS 电导可以相互转换, 以 50 pS 电导通道开放最常见, 而且多数以短开放为主, 猝发性开放(Burst opening)式的长开放通道较少见。不同电导的通道开放时程及关闭时程分布直方图需用双指数拟合。表 1 列出了膜电位为－80 mV 时, 50 pS 及 38 pS 电导通道开放、关闭的两个时间常数 τ_1、τ_2 及通道开放概率 P_0 值。38 pS 未出现长开放通道。

2.2　伤害性刺激对NMDA 受体通道电流的影响

7～10 d 大鼠双侧踝关节完全离断后 2 h, 急性分离海马 CA1 区锥体神经元, 以细胞贴附式记录 NMDA 通道电流, 与正常对照组相比有以下改变: ①50 pS 短开放通道开放时间常数 τ_1、τ_2 及开放概率明显高于正常大鼠($P<0.01$), 见表 1, 图 1; 50pS burst 长开放通道的开放时间常数 τ_1、τ_2 及开放概率与正常大鼠相比也有显著升高。②38 pS 短开放通道的开放概率及开放时间常数 τ_1 明显高于正常大鼠, 其关闭时间常数 τ_2 较正常大鼠 38 pS 短开放通道明显缩短($P<0.01$), ③出现了 38 pS 长开放通道, 见表 1。



A: 50 pS short opening channel in normal rats; B: 50 pS short opening channel in amputated rats; C: Effect of $ACTH_{1-24}$ on 50 pS short opening channel in amputated rats; D: Effect of Morphine on 50pS short opening channel in amputated rats

图 1　大鼠海马 CA1 区锥体神经元 NMDA 受体 50 pS 电导通道电流

Fig 1　50 pS NMDA receptor channel currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons

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

表1 踝关节离断大鼠海马 CA1 区锥体神经元 NMDA 受体通道动力学特性的变化($n=4\sim5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of kinetic properties of NMDA receptor channel in hippocampal CA1 pyramidal neurons in amputated rats($n=4\sim5$, $\bar{x}\pm s$)

Channels	Open time(t/ms)		Close time(t/ms)		P(open)
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2	
Normal rats					
50 pS channel					
short opening	0.74±0.34	5.80±0.86	6.48±1.09	99.06±23.86	0.083±0.027
burst opening	1.36±0.48	8.14±1.08	5.03±0.16	88.55±14.88	0.117±0.038
38 pS channel					
short opening	0.49±0.19	5.13±1.05	6.60±1.06	134.90±16.15	0.060±0.017
Amputated rats					
50 pS channel					
short opening	1.20±0.55**	8.29±0.47**	5.42±1.60	92.28±22.42	0.30±0.13**
burst opening	2.83±1.25**	16.64±3.48*	3.90±2.20	77.87±22.40	0.448±0.150**
38 pS channel					
short opening	2.03±0.49*	6.33±0.59	5.73±1.76	58.69±14.52*	0.276±0.12*
burst opening	2.50±1.03	15.96±4.80	3.90±2.06	66.52±36.99	0.40±0.12

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* corresponding group in normal rats

2.3 $ACTH_{1\text{-}24}$ 及吗啡的作用

7~10 d 大鼠双侧踝关节完全离断后 2 h, 在急性分离的海马 CA1 区锥体神经元上, 采用细胞贴附式记录方法, 以 50 pS 电导短开放通道为对象, 观察 $ACTH_{1\text{-}24}$ 及吗啡的作用。结果显示: 在 3 ml 浴槽液中加入 0.01 mmol/L $ACTH_{1\text{-}24}$ 0.3 ml 后, 50 pS 短开放通道的开放时间常数 τ_1、τ_2 及开放概率(P_0)比加药前明显减少, 见表 2, 图 1。在加入 $ACTH_{1\text{-}24}$ 之前提前给予 0.01 mmol/L 纳络酮 0.3 ml 可以阻断 $ACTH_{1\text{-}24}$ 的作用。在 3 ml 浴槽液中加入 0.01 mmol/L 吗啡 0.3 ml 后, 50 pS 短开放通道的开放时间常数 τ_1、τ_2 及开放概率(P_0)比对照组明显减少, 而关闭时间常数 τ_2 比对照组明显增加, 见表 3, 图 1; 提前给予 0.01 mmol/L 纳络酮 0.3 ml 可以阻断吗啡的作用。

表 2 $ACTH_{1\text{-}24}$ 对踝关节离断大鼠海马 CA1 区锥体神经元 50 pS 短开放通道的作用($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of $ACTH_{1\text{-}24}$ on 50 pS short opening channel of hippocampal CA1 pyramidal neurons in amputated rats ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

50 pS short opening channel	Open time(t/ms)		Close time(t/ms)		P(open)
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2	
Amputated rats	1.07±0.49	8.44±1.52	6.50±2.15	82.69±29.56	0.273±0.140
Amputated+ACTH	0.55±0.15##	5.52±1.60#	5.62±2.70	113.63±34.06	0.095±0.042##
Amputated+Naloxone+ACTH	1.31±0.56**	8.34±1.33*	6.50±2.20	94.99±24.92	0.268±0.101**

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* Amputated rats; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Amputated+ACTH

表 3 吗啡对踝关节离断大鼠海马 CA1 区锥体神经元 50 pS 短开放通道的作用($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of Morphine on 50 pS short opening channel of hippocampal CA1 pyramidal neuronsin amputated rats ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

50 pS short opening channel	Open time(t/ms)		Close time(t/ms)		P(open)
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2	
Amputated rats	1.03±0.47	8.22±1.75	6.23±1.67	94.21±33.08	0.285±0.103
Amputated+Morphine	0.48±0.21##	5.05±1.08#	5.71±3.23	139.39±16.68#	0.054±0.018##
Amputated+Naloxone+Morphine	0.98±0.12**	8.13±0.35*	6.66±0.42	97.03±22.81*	0.281±0.028**

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* Amputated rats; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Amputated+morphine

3 讨论

在正常急性分离的海马 CA1 区锥体神经元, 我们观察到多数膜片的 NMDA 受体通道为单一电导状态, 电导分别为 50 pS 及 38 pS, 其中以 50 pS 占多数, 而且以短开放为主, 同时有长开放通道。38 pS 电导的 NMDA 受体通道为短开放通道, 未发现长开放通道。少数膜片为多电导状态, 50 pS 及 38 pS 电导可以发生相互转换。NMDA 受体是一种具有多种不同的变构调控位点并对 Ca^{2+} 高度通透的配体门控离子通道。Gibb 等[7] 在海马神经元的记录显示 NMDAR_1 与 NMDAR_2A 或 NMDAR_2B 形成的通道电导为 50 pS 及 40 pS, 本实验结果也是以 50 pS 为优势电导, 不同电导状态之间可以发生直接转换。NMDA 受体亚基在解剖学分布和功能上的差异为 NMDA 受体生理特性的多样性提供了分子基础。

自从谷氨酸被认为是中枢主要的兴奋性神经递质后, NMDA 受体就成为伤害性感受和疼痛研究的主要

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

目标。兴奋性氨基酸——谷氨酸通过 NMDA 受体, 在疼痛发生中有重要作用, 其可导致神经末梢及中枢敏感化, 最终引起痛觉过敏和痛觉异常。以往我室的研究证实海马可对伤害性信息起调制作用[4]。许多创伤伴有持续性疼痛和痛觉过敏, 常用大鼠截肢造成的创伤性持续疼痛作为创伤痛的动物模型[6]。本实验研究了 7 ~ 10 d 大鼠双侧踝关节完全离断后 2 h, 海马 CA1 区锥体神经元 NMDA 受体通道电流的变化, 观察到 50 pS 短开放及长开放通道的开放概率和开放时间明显大于正常大鼠; 38 pS 短开放通道的开放时间及开放概率也有明显增加, 同时出现了 38 pS 长开放通道。创伤痛大鼠海马 CA1 区锥体神经元 NMDA 受体通道动力学特性的改变表明: NMDA 受体通道不但在脊髓水平伤害性刺激的感受中发挥作用, 而且在脊髓以上水平如海马也参与了伤害性信息的传递和调控过程。

促肾上腺皮质激素除存在于垂体外, 中枢神经系统内也含有促肾上腺皮质激素能神经元, 其神经纤维在中枢具有较广泛的投射。脑内内源性 ACTH 与佐剂性关节炎慢性痛的发生密切相关[8], 而外源性 ACTH 则可抑制伤害性刺激传入和疼痛的发生[3, 4]。文献[9]指出 ACTH 可加强吗啡的镇痛效应并可防止吗啡耐受的发生。本实验显示 $ACTH_{1-24}$ 可以显著减少组织及神经元损伤后大鼠海马 CA1 区锥体神经元 50 pS 短开放通道和开放概率和开放时间, 预先给予阿片受体拮抗剂纳络酮可以阻断 $ACTH_{1-24}$ 的作用, 与经典的镇痛药物吗啡对双侧踝关节离断大鼠海马锥体神经元NMDA 受体通道电流的抑制作用相似。结果表明: $ACTH_{1-24}$ 和吗啡可能通过阿片受体改变海马 NMDA 受体通道动力学特性而发挥其对伤害性信息的传递调控作用。

参考文献:

[1] Chaplan S R, Malmberg A B, Yaksh T L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 280(2): 829—838.

[2] Cotman C W, Monaghan D T. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their properties[J]. Adv Exp Med Biol, 1986, 203: 237—252.

[3] 武　强, 李希成, 阮怀珍, 等. 促肾上腺皮质激素对慢痛大鼠脊髓生长抑素, c-fos 表达及痛反应的影响[J]. 生理学报, 1999, 51(1): 60—64.

[4] Xu H W, Li X C, Li H D, *et al*. Effects of corticotropin on pain behavior and BDNF, CRF levels in frontal cortex of rats suffering from chronic pain [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(7): 600—604.

[5] 周英杰, 佟振清, 高天明. 成年大鼠海马 CA1 区锥体细胞 K_{ATP} 通道的特性[J]. 生理学报, 2001, 53(5): 344—348.

[6] 孙文颖, 佟振清, 黄彰海. 创伤痛对大鼠下丘脑背内侧及尾状核单位放电的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 1993, 9(3): 265—267.

[7] Gibb A J, Colquhoun D. Activation of NMDA receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus[J]. J Physiol Lond, 1992, 456: 143—179.

[8] 庞　勇, 李希成, 黎海蒂, 等. 电针和吗啡对慢性痛大鼠下丘脑, 桥-延脑内 ACTH 含量和痛反应的影响[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(8): 720—723.

[9] Hendrie C A. ACTH: a single pretreatment enhances the analgesic efficacy of and prevents the development of tolerance to morphine[J]. Physiol Behav, 1988, 42(1): 41—45.

（编辑　郭建秀）

（上接 225 页）

不一, 导致稀释过度的一侧盐水吸收后乳房的体积变小。术后 2 周可进行补充注射。

2.5　材料漏出

术后 1 ~ 3 d 在注射的针孔出现组织液及凝胶外溢, 针孔长期不愈合。材料漏出的原因部分是感染引起, 处理措施同感染的处理原则。另外注射针道留有凝胶, 凝胶稀释过渡, 术中注入凝胶量大导致腔内压力过高, 术后早期乳房呈受较大压力, 是诱发凝胶溢出的另一个原因。较重的材料漏出, 可以抽出部分凝胶, 乳房下皱襞加压包扎, 3 个月后恢复注射。

2.6　创伤性无菌性炎症

多在术后 1 周至 1 个月左右发生, 存在明确的外伤史。早期抗炎治疗加用皮质类激素, 愈后良好。晚期应尽可能全部抽出凝胶, 大量抗生素盐水反复冲洗, 放置引流及必要的营养支持和抗感染治疗。

2.7　胸大肌炎

表现以患侧上肢外展明显受限和牵拉痛, 多伴有散在或局限性硬结。主要是由于凝胶注射过深, 进入了胸大肌筋膜。可以部分或全部抽出凝胶, 局部理疗、热敷。

3　讨论

上述并发症多数因为手术操作不当引起, 所以加强注射式隆乳的正确操作, 改进手术器械是防止并发症的有效途径。当出现不满意的隆乳效果或并发症时, 可在局部麻醉下将 HPAMG 部分或全部抽出。抽吸前向包膜腔内注射一定量的无菌生理盐水稀释, 辅以必要的按摩和挤压。乳腺内的散在硬结处理较为困难, 所以应避免注射时位置不正确。

关键词: 乳房充填术; 并发症; 聚丙烯酰胺凝胶
中图法分类号: R655.806　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 汪晓蕾, 余　江. 聚丙烯酰胺水凝胶生物性能的实验研究[J]. 实用美容外科学, 2000, 11(1): 7—9.

[2] 栾　杰, 扬佩瑛. 乳房深部动脉供应及乳房内部血管构筑的显微解剖[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1992, 8(3): 204—207.

（编辑　郭建秀）

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