DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.015
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)03-0219-03

论著

严重烫伤后大鼠海马NMDA受体通道特性的变化

陆建华[1],黎海蒂[1],高京生[2],万子兵[1],赵邦云[1],熊加祥[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生理学教研室;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究严重创伤对海马NMDA受体功能的影响,为控制创伤后的过度应激反应提供实验依据。方法 以大鼠背部30%TBSA Ⅲ度烫伤作为严重创伤过度应激模型,利用细胞贴附式膜片钳技术,观察严重烫伤后0.5、1、2、4、8、24、48 h海马NMDA受体单通道电流的变化。结果 在35 pS电导水平的开放中,各烫伤组海马NMDA受体的电流幅度与对照组相比无显著差异,但开放概率增加非常显著,烫伤后0.5、1、2、4、8 h组开放时间常数τ1和τ2均比对照组显著增加,各烫伤组关闭时间无明显变化。在100 pS电导水平的开放中,各烫伤组电流幅度与对照组相比无显著改变,但通道开放概率增加非常显著。2 h烫伤组开放时间常数τ1和τ2也比对照组显著增加,通道的关闭时间无明显差异。结论 严重烫伤主要引起海马NMDA受体通道开放概率显著增加,导致NMDA受体通道显著激活。

关键词:烧伤;应激;海马;NMDA受体通道
中图法分类号:R338.26;R392.11;R644.02 文献标识码:A

Changes of kinetic properties of hippocampal NMDA receptor in rats after severe scald burn

LU Jian-hua, LI Hai-di, GAO Jing-sheng, WAN Zi-bing, ZhAO Bang-yun, XIONG Jia-xiang (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of kinetic properties of hippocampal NMDA receptor in rat following scald burn stress. Methods Adult male Wistar rats were inflicted with 30% TBSA full thickness scalding, which was applied as severe trauma stress model. Kinetic properties of hippocampal NMDA receptor channel were detected by cell-attached patch clamp technique. Results Open-state probability of 35pS and 100 pS NMDA-receptor channels increased markedly at 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, and 48 h after burn. Significant change was found at 2 h. Open time of these channels also increased in some burn groups. No significant changes of NMDA receptor current amplitude and close time were found in each burn group. Conclusion Scald burn induces significant changes of kinetic properties of hippocampal NMDA receptor, resulting in hyperactivation of hippocampal NMDA receptor.

Key words: burn; stress; hippocampus; NMDA receptors

严重创伤往往导致过度的应激反应,其主要表现形式之一就是下丘脑-垂体-肾上腺轴(Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA轴)的亢进。HPA轴的亢进可导致机体免疫麻痹,诱发系统性炎性反应综合症(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)。近年的研究表明,海马是控制应激时HPA轴兴奋性的主要脑区[1,2],因此,海马功能的改变可能会影响其神经冲动的传导从而影响HPA轴。海马功能的改变尤其是海马的损伤又往往与NMDA受体(N-methyl-D-aspartate receptor)密切相关,提示严重创伤时海马NMDA受体的变化可能会影响HPA轴的兴奋程度。然而,严重创伤应激状态下海马NMDA受体通道的变化及规律如何?有关内容迄今国内外鲜见报道。本研究以大鼠背部30%TBSA Ⅲ度烫伤作为严重创伤过度应激模型,利用膜片钳技术,观察严重烫伤早期NMDA受体通道特性的变化特点,为进一步探讨海马NMDA受体在严重创伤HPA轴中作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

NMDA、胰蛋白酶为Sigma公司产品,膜片钳放大器(CEZ-

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
作者简介:陆建华(1966-),男,江苏省南通市人,博士,主治医师,主要从事创伤应激不良发生机制方面的研究。电话:(023)68752254
通信作者:黎海蒂,电话:(023)68752253
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-11-16

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

2200)为日本光电公司产品, pClamp 6.02 软件为美国 Axon 公司产品。

1.2 动物模型及分组

本校实验动物中心提供的Wistar 大鼠64 只, 随机分为对照组(n= 8)和烫伤组(n=8), 烫伤组又分为烫伤后 0.5、1、2、4、8、24、48 h 组共 7 个时相点, 每个时相点 8 只动物。烫伤组动物背部剃毛, 以剃毛区浸入 90 ℃水 10 s 造成 30%TBSA Ⅲ度烫伤; 对照组动物背部剃毛后浸入 37℃温水 10 s 作为对照。

1.3 海马神经元急性分离[3]

各时相点大鼠快速断头取海马, 切成 0.5 mm 厚的冠状脑片, 置入含 0.1%胰蛋白酶的 2 ml 人工脑脊液内消化, 消化约 30 min 后将脑片移至不含酶的人工脑脊液内的反复冲洗, 剪碎脑片, 移入 2 ml 人工脑脊液中重复吹打, 至悬液中看不见明显的组织块为止, 将此液静置 7~10 min, 吸取上清液, 滴加于事先涂有 0.1%多聚赖氨酸的盖玻片上, 静置 10~15 min 使细胞充分贴壁。加入 2~3 ml 浴液即可开始膜片钳记录。

1.4 单通道电流的记录

本实验主要采用细胞贴附式膜片钳方法记录 NMDA 受体的单通道电流。将贴有细胞的盖玻片放入培养皿中, 加入 2 ml 浴液, 在倒置显微镜下选择贴壁良好、细胞膜完整、有立体感、突起明显的细胞, 用微推进器驱动电极接近细胞, 当微电极尖端刚刚碰到细胞时, 稍加负压, 高阻封接即可形成。以 pClamp 6.02 软件中的 Fetchex 程序连续采样, 采样频率 20 kHz, 放大器低通滤波为 1 kHz。

1.5 资料分析

以 pClamp 6.0 软件的 Fetchan 分析程序进行开关事件的测量, 测量的结果用 pS TAT 程序进行分析处理, 以 Gaussion 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, The least squares method), Simplex-LSQ 及 Simple-MLE(最大或然率检验, Maximum likelihood)的不同指数水平进行比较, 用 Viewresiduals 进行拟合优度检验。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 利用SPSS 10.0 统计软件对组间数据进行单因素方差分析和 χ^2 检验。

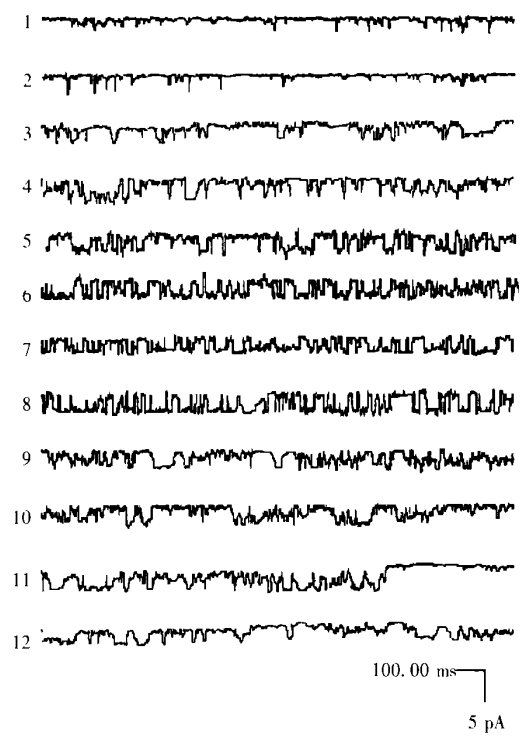
2 结果

2.1 各组 NMDA 受体的单通道电流波形的记录

利用在电极内液内加入微量的 NMDA 和甘氨酸, 采用细胞贴附法记录到了对照组及烫伤后 0.5、1、2、4、8、24、48 h 大鼠海马NMDA 受体通道的电流, 见图 1。不含激动剂的电极形成高阻封接后, 细胞没有出现单通道电流, 在电极液中加入 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂 MK-801 后也未记录到这类通道的电流。

2.2 利用相关软件分析NMDA 受体单通道的电特性

对照组及烫伤后大鼠 NMDA 受体通道的开放一般有 35 pS 及100 pS 两个电导水平, 以 35 pS 电导水平的通道开放为主。在 35 pS 电导水平的开放中, 各烫伤组的电流幅度与对照组相比无显著差异, 但开放概率增加非常显著(P<0.01), 通过双指数拟合, 烫伤后 0.5、1、2、4、8 h 组开放时间常数 τ1 和 τ2 均比对照组显著增加, 而 24 h 及 48 h 组虽比对照组有所增加, 但无统计学意义, 见表 1。在 100 pS 电导水平的开放中, 各烫伤组电流幅度与对照组相比无显著改变, 通道开放呈簇状, 但通道开放概率增加非常显著, 通过双指数拟合, 2 h 烫伤组开放时间常数 τ1 和 τ2 分别比对照组增加 21.5%、30.1%(P< 0.05), 其余各组均无明显改变, 见表 2。两个电导水平的关闭时间常数有一个, 且各组关闭时间无明显变化, 见表 1。在烫伤组中偶然可以记录到 135 pS 电导通道的开放。



1~2: Control group; 3~4, 5~6, 7~8, 9~10, 11~12: 1, 2, 8, 24, 48 h post-burn group, respectively

图 1 各组海马NMDA受体单通道电流波形

Fig 1 Single channel current recording of hippocampal NMDA receptor in rats after burn

表 1 烫伤对海马 NMDA 受体 35pS 电导水平通道特性的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The changes of 35pS NMDA receptor channel open time, current amplitude, open-state probability and close time in each group($\bar{x}\pm s$)

Group	Open time(t/ms)		Current amplitude	Open-state probability	Close time
	τ_1	τ_2			
Control	0.516±0.092	3.41±0.381	-2.81±0.19	0.086±0.006	99.5±35.8
0.5 h	0.645±0.106*	3.96±0.394*	-2.90±0.18	0.346±0.005**	96.3±28.6
1 h	0.648±0.113*	3.85±0.379*	-2.87±0.11	0.325±0.009**	93.9±23.7
2 h	0.713±0.098**	5.01±0.731**	-2.79±0.21	0.498±0.009**	93.1±42.1
4 h	0.657±0.102*	3.92±0.354*	-2.85±0.15	0.332±0.012**	97.5±24.5
8 h	0.628±0.101*	4.53±0.464*	-2.81±0.19	0.212±0.008**	98.9±21.2
24 h	0.557±0.012	3.81±0.479	-2.84±0.13	0.325±0.007**	95.1±28.7
48 h	0.545±0.021	3.72±0.631	-2.88±0.20	0.213±0.005**	94.2±35.6

*: P<0.05, **: P<0.01 *vs* Control

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

表 2　烫伤对海马 NMDA 受体 100 pS 电导水平通道特性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　The changes of 100 pS NMDA receptor channel open time, current amplitude, open-state probability in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Open time		Current amplitude	Open-state probability
	τ_1	τ_2		
Control	1.534 ±0.121	43.67 ±11.81	-5.98±1.06	0.076±0.006
0.5 h	1.532 ±0.281	41.26 ±23.45	-5.90±1.18	0.385±0.005 **
1 h	1.587 ±0.365	49.73 ±19.29	-5.87±1.11	0.425±0.019 **
2 h	1.698 ±0.121 *	56.81 ±8.39 *	-5.86±1.22	0.498±0.021 **
4 h	1.557 ±0.302	47.27 ±11.38	-5.69±1.15	0.372±0.112 **
8 h	1.601 ±0.201	49.13 ±12.99	-5.91±1.17	0.253±0.018 **
24 h	1.557 ±0.122	49.91 ±10.62	-6.01±2.03	0.363±0.011 **
48 h	1.505 ±0.229	45.77 ±18.65	-5.88±1.20	0.209±0.009 **

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* Control

3　讨论

谷氨酸是哺乳动物中枢神经系统中的一种主要兴奋性神经递质, 其受体分为离子型和代谢型两类。离子型受体进一步分成 NMDA 受体和非 NMDA 受体。NMDA 受体是一种具有许多不同变构调控位点的配体门控性离子通道[4]。NMDA 受体通道开放时, 主要介导阳离子内流, 尤其是 Ca^{2+} 的内流。由于 NMDA 受体是一种离子通道, 因此, 膜片钳可以较理想地记录其通道电特性的变化。

膜片钳是一种测量膜结构中单通道离子电流和电导的技术, 至今已发展了多种记录模式, 如全细胞模式、细胞贴附式、内面向外、外面向外模式、穿孔膜片钳等。我们通过细胞贴附式膜片钳实验发现: 在电极内液内加入微量的 NMDA (20 μmol/L)和甘氨酸(1 μmol/L), 以激动 NMDA 受体, 记录到 NMDA 受体通道的开放一般有 35 pS 及 100 pS 两个电导水平, 以 35 pS 电导水平的通道开放为主。开放时电流幅度、开放概率、开放时间常数及关闭时间与文献[5] 报道基本一致。而不含激动剂的电极形成高阻封接后, 细胞没有出现单通道电流, 在电极液中加入 NMDA 受体的拮抗剂后也未记录到这类通道的电流, 这些证明我们实验所记录到的通道是典型的 NMDA 受体通道。

NMDA 受体参与兴奋性突触传递、神经递质释放、突触长时程增强等生理活动, 其过度激活还参与一系列病理过程[6]。最近的一些研究表明, 脑创伤、脑缺血等直接导致脑损伤的因素可激活 NMDA 受体。那么, 作为一种不直接导致脑损害的严重烫伤对脑尤其是海马 NMDA 受体活性影响如何仍不清楚。我们的研究发现, 大鼠严重烫伤后 NMDA 受体通道的开放也呈现 35 pS 和 100 pS 两个电导水平, 以 35 pS 电导水平的通道开放为主, 在 35 pS 电导水平的开放中, 各烫伤组的开放概率比对照组增加, 且增加非常显著, 烫伤后 0.5、1、2、4、8 h 组开放时间常数 τ1 和 τ2 也比对照组显著增加。在 100 pS 电导水平的开放中, 通道开放呈簇状, 各烫伤组通道开放概率亦增加非常显著。2 h 烫伤组开放时间常数 τ1 和 τ2 分别比对照组增加 21.5%、30.1%, 这些结果说明严重烫伤主要导致了 NMDA 受体通道开放概率的显著增加, 开放时间常数有不同程度的增加; 同时说明严重烫伤可显著激活 NMDA 受体通道, 即 NMDA 受体通道活性的显著增加。

研究表明, 激活 NMDA 受体可兴奋 HPA 轴[7], 因此严重烫伤导致的 NMDA 受体的激活可能会增强烫伤 HPA 轴的兴奋性, 从而参与烫伤后 HPA 轴的亢进。

严重烫伤为什么主要引起 NMDA 受体通道开放概率的显著增加仍不清楚。Bickler 等[8] 发现: NMDA 受体的开放概率往往与 NMDA 受体胞内 C-末端磷酸化的变化有关, 因此严重烫伤导致的 NMDA 受体通道开放概率的显著增加可能与其磷酸化水平的变化有关。此有待于进一步证明。

参考文献:

[1] De Kloet E R, Vreugdenhil E, Oitzl M S, *et al*. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease[J]. Endocr Rev, 1998, 19(3): 269-301.

[2] Korte S M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2001, 25(2): 117-142.

[3] 唐向东, 佟振清, 杨文俊. 急性分离大鼠新皮质神经元 ATP 敏感钾通道的双闸门控机制与多样性[J]. 中国科学·C 辑, 1997, 27(1): 76-82.

[4] Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function[J]. Science, 1992, 258(5082): 597-603.

[5] Gibb A J, Colquhoun D. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus[J]. J Physiol, 1992, 456: 143-179.

[6] Liu Y, Zhang J T. Recent development in NMDA receptors[J]. Chin Med J, 2000, 113(10): 948-956.

[7] Chautard T, Boudouresque F, Guilhaume V, *et al*. Effect of excitatory amino acid on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat during the stress-hyporesponsive period[J]. Neuroendocrinology, 1993, 57(1): 70-78.

[8] Bickler P E, Donohoe P H, Buck L T. Hypoxia-induced silencing of NMDA receptors in turtle neurons[J]. J Neurosci, 2000, 20(10): 3522-3528.

(编辑　郭建秀)

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