DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.029
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0429-03

论著

缺氧及谷氨酸对大鼠下丘脑神经元NMDA通道的影响

陈鹏慧,阮怀珍,吴喜贵 (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 研究缺氧和N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)通道激动剂谷氨酸对大鼠下丘脑神经元NMDA通道开放动力学的影响。方法 运用膜片钳技术的细胞吸附式方法记录NMDA通道的单通道电流。结果 在急性缺氧条件下,NMDA通道的开放增大,开放时间常数τ_1,τ_2分别由(0.33±0.10)ms,(4.36±0.26)ms变为(0.93±0.22)ms,(7.64±0.72)ms,关闭时间常数τ_1,τ_2分别由(18.03±3.50)ms,(171.50±19.10)ms变为(3.42±1.02)ms,(19.39±3.07)ms。平均开放概率由0.12±0.05变为0.66±0.36。谷氨酸浓度增加,NMDA通道开放时间常数增大、关闭时间常数减小,开放概率增大。结论 缺氧及谷氨酸能提高下丘脑神经元NMDA通道的兴奋性,促进NMDA通道开放增加。

关键词:缺氧;膜片钳技术;下丘脑神经元;NMDA受体通道
中图法分类号:R322.81;R329.2;R845.22;R977.4 文献标识码:A

The roles of hypoxia and glutamic acid on NMDA receptor channel of hypothalamic neuron in rats

CHEN Peng-hui, RUAN Huai-zhen, WU Xi-gui (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of hypoxia and glutamic acid on the kinetic properties of NMDA receptor channel of the hypothalamic neurons in rats. Methods Cell-attached mode patch clamp technique was employed to record the single channel current of the NMDA receptor. Results The open probability of NMDA receptor channel was increased after acute hypoxia compared with that of normal state, the open time τ_1, τ_2 was changed from (0.33±0.10)ms, (4.36±0.26)ms to (0.93±0.22)ms, (7.64±0.72)ms, and the close time τ_1, τ_2 was from (18.03±3.50)ms, (171.50±19.10)ms to (3.42±1.02)ms, (19.39±3.07)ms. The mean open probability was changed from 0.12±0.05 in normal state to 0.66±0.36 in hypoxia state. Furthermore, glutamic acid can increase open time and open probability of NMDA receptor channel, decrease close time. Conclusion The excitability and the open probability of NMDA receptor channel of hypothalamic neurons increased by hypoxia is related to glutamate.

Key words: hypoxia; patch clamp; hypothalamic neuron; NMDA receptor channel

兴奋性氨基酸是中枢神经系统中重要的兴奋性神经递质。其受体按激动剂的类型可以分为NMDA型和非NMDA型,非NMDA型包括使君子酸型、海人藻酸型和L-2-氨基膦酸基丁酸型等[1]。其中以NMDA型受体尤为重要,它与长时程增强(LTP)、学习与记忆、神经系统生长发育的可塑性、缺血缺氧损伤及老年性痴呆等神经退化性疾病都有密切关系[2]。因此,研究NMDA受体的通道特性对于阐述中枢神经系统在特殊的病理条件下的机制具有重要的理论与现实意义。随着近年来分子生物学技术的发展,已经证实NMDA受体的多种亚型及各亚型在脑内的区域性分布。但是,以往大多都是基于正常的生理条件下来研究NMDA受体的特性,以及生理条件下NMDA受体通道的开关动力学特征[3]。本实验运用膜片钳技术的单通道记录模式观察在缺氧条件下,急性分离的大鼠下丘脑神经元NMDA受体通道开关动力学特征,并与正常条件下的通道特性对比,从而进一步阐述缺氧对神经系统损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 神经元的分离

7~10 d的Wistar大鼠,雌雄不拘。快速断头取脑,置于低温人工脑脊液(Artificial cerebrospinal fluid, ACSF)中,温度0~4℃。同时通以混合气(95%O_2+5%CO_2),孵育10 min。取出大脑,剥取下丘脑,手工切成厚度500 μm的冠状脑片,边切边置入通混合气的250 ml人工脑脊液内。取孵育1 h以后的脑片1~2片置入含0.1%胰蛋白酶的2 ml消化液中,消化过程仍通混合气,30 min后用含HEPES(10 mmol/L)的ACSF中冲洗3次。用眼科剪取下直径1 mm左右的脑片,移入预涂多聚赖氨酸(Sigma产品)且含有ACSF的35 mm培养皿中,分别用直径300 μm和150 μm的尖端火抛光的Pasteur吸管依次吹打,使组织分散,细胞游离。静置10 min,用通混合气的浴槽液灌流,洗去培养皿中组织碎片及未贴壁的细胞。进行膜片钳记录。

1.2 溶液配置

人工脑脊液(mmol/L):NaCl 126, $NaHCO_3$ 26, NaH_2PO_3 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。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670283)
作者简介:陈鹏慧(1975—),男,陕西省武功县人,硕士研究生,助教,主要从事电生理方面的研究。电话:(023)68752232
收稿日期:2000-05-12;修回日期:2000-10-15

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

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)。

电极充灌液(mmol/L)：NaCl 140，KCl 5，$CaCl_2$ 1.8，HEPES 10，pH 7.2(NaOH 调制)。除测定浓度曲线，电极内液还需加 20 μmol/L 的 L-谷氨酸(L-Glutamate，L-Glu)和 1.0 μmol/L 甘氨酸(Glycine，Gly)。

胰蛋白酶、HEPES、TTX、TEA-Cl、L-Glu 和 Gly 为 Sigma 产品，其余均为国产分析纯。

1.3 数据采集与分析

记录用无芯硬质玻璃毛坯(GG-15，中科院上海生理研究所)经全自动拉制仪(PC-10，Narishige，Japan)拉制。玻璃电极尖端用加热的铂丝抛光，处理后尖端直径 1.0 μm 左右，颈长 2 mm 左右。内插泛极化氯化银电极，电阻约 8～10 MΩ。

记录方式为细胞贴附式[4]，所得单通道电流经膜片钳放大器(Axopatch 200B，Axon，美国)放大，滤波频率 1 kHz，探头 CV203BU。用 pCLAMP(6.04 版，Axon，美国)软件经 AD/DA 接口板(Digidata 1200B，Axon，美国)将原始数据采入微型计算机，采样频率 10 kHz。用 pCLAMP 软件在微机上对原始数据进行分析、统计结果和多种曲线拟合。

1.4 缺氧模型

在实验前，用自制的通气系统对含细胞的浴槽通 95%O_2+5%CO_2 的混合气 10 min，实施封接，记录正常状态下 NMDA 通道的单通道电流活动。然后，在保持巨欧姆封接阻抗的条件下，用灌流系统对浴槽持续、缓慢地通以 95%N_2+5%CO_2 混合气，5 min 后开始观察神经元在急性缺氧环境下通道电活动的变化。实验中保持通气灌流状态。

1.5 实验分组

实验分为 5 组：①对照组：浴槽通 95%O_2+5%CO_2 的混合气，电极填充液中含有 20 μmol/L 的 L-Glu 和 1.0 μmol/L 的 Gly。②浴槽通 95%O_2+5%CO_2 的混合气，电极填充液中含有 50 μmol/L 的 L-Glu 和 1.0 μmol/L 的 Gly。③浴槽通 95%O_2+5%CO_2 的混合气，电极填充液中含有 100 μmol/L 的 L-Glu 和 1.0 μmol/L 的 Gly。④浴槽通 95%O_2+5%CO_2 的混合气，电极填充液中含有 200 μmol/L 的 L-Glu 和 1.0 μmol/L 的 Gly。⑤缺氧组：浴槽通 95%N_2+5%CO_2 混合气，电极内液含 20 μmol/L 的 L-Glu 和 1.0 μmol/L 的 Gly。

2 结果

分离后形态佳、活性好的神经元细胞呈不规则的梭形，有多个突起，较长的轴突可达 100 μm 以上。神经元胞体明亮，倒置相差显微镜下反光强，封接时细胞膜弹性好，容易形成亿欧姆阻抗封接。选取封接阻抗 5 GΩ 以上的细胞进行记录。

2.1 正常状态下 NMDA 通道的特性

电极内液含有 L-谷氨酸(20 μmol/L)和甘氨酸(1 μmol/L)，可以观察到内向的单通道电流(n=18)，而不含激动剂形成高阻抗封接，无单通道电流(n=12)。观察到 NMDA 通道的开放以短开放为主，burst 样长开放少见。以不同膜电位下的单通道电流幅度，得到单通道的电流-膜电位关系(I-V 曲线)。曲线斜率反映 NMDA 受体通道的电导，约为 20 pS。I-V 曲线反转电位为 0 mV 左右。对 20 pS 的单通道电流进行单指数拟合(Marquardt-LSQ，最小二乘法)，可见在膜电位－80mV 时通道开放的时间常数 τ_1，τ_2 分别为(0.331±0.096)ms，(4.362±0.258)ms。通道平均开放概率[P(open)]为 0.129±0.052，见表 1。

2.2 激动剂浓度的影响

分别在电极内液加入不同浓度的激动剂，观察到随着 L-Glu 的浓度增加，NMDA 通道开放概率及频率都增加，见图 1。表 1 显示单指数拟合后，各种条件下通道开放和关闭时间常数的变化。

2.3 缺氧后 NMDA 通道开放的变化

维持电极内激动剂浓度 20 μmol/L Glu＋1 μmol/L Gly，在形成高阻抗封接后，对细胞的浴槽环境进行急性缺氧，观察到通道的开放频率和开放概率都明显大于正常状态($P<0.05$)，见图 2。指数拟合后单通道开放时间常数增加，关闭时间常数减少，见表 1。

表 1 不同条件下急性分离大鼠下丘脑神经元 NMDA 受体通道开关动力学比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of the kinetics of the open and close state of NMDA channel in acutely dissociated hypothalamic neurons of rat in different conditions($\bar{x}\pm s$)

Group	Mean probality$_{(open)}$	Open time(t/ms)		Close time(t/ms)	
		τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
Oxygenic extracellular and pipette contain 20 μmol/L L-Glu	0.12±0.05	0.33±0.10	4.36±0.26	18.03±3.50	171.50±19.10
Oxygenic extracellular and pipette contain 50 μmol/L L-Glu	0.28±0.09	0.42±0.05	4.47±0.13	12.83±4.14	107.63±24.01
Oxygenic extracellular and pipette contain 100 μmol/L L-Glu	0.33±0.06	0.49±0.05	6.48±0.09	10.08±2.48	32.33±0.81
Oxygenic extracellular and pipette contain 200 μmol/L L-Glu	0.54±0.13	0.57±0.29	8.28±0.84	8.33±1.04	29.30±0.61
Hypoxia extracellular and pipette contain 20 μmol/L L-Glu	0.66±0.36*	0.93±0.22*	7.64±0.72*	3.42±1.02	19.39±3.07

*：$P<0.05$ *vs* oxygenic extracellular and pipette contain 20 μmol/L L-Glu

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

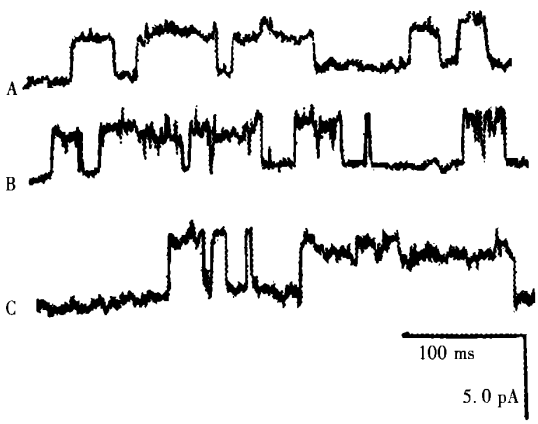


图 1　电极内液含有不同激动剂浓度下急性分离大鼠下丘脑神经元 NMDA 受体单通道电流

Fig 1　Single channel current recording of NMDA receptor different concentration of stimulants in pipette in the acutely dissociated hypothalamic neuron of the rats

A: 50 μmol/L Glu + 1.0 μmol/L Gly; B: 100 μmol/L Glu + 1.0 μmol/L Gly; C: 200 μmol/L Glu + 1.0 μmol/L Gly; Membrane potential: − 80 mV



图 2　缺氧时 NMDA 受体单通道电流变化

Fig 2　Single channel currents recording of NMDA receptor in hypoxia

A: Normal state; B, C: Hypoxia state; Membrane potential: − 80 mV

3　讨论

下丘脑是联系脑与躯体的重要部位, 来自高级中枢的信息可在此整合并通过神经分泌和自主调节系统将信息传至周围[5]。免疫组织化学手段及形态学资料表明, 下丘脑室旁核、视上核、弓状核等脑区含有大量的谷氨酸免疫阳性神经元[6]。下丘脑的传入切断和谷氨酸脱羧酶活性研究在下丘脑核发现了谷氨酸和 NMDA 连接点[7]。

膜片钳技术(Patch clamp technique)是一种以记录通过离子通道的离子电流来反应细胞膜上单一的(或几个)离子通道分子活动的技术; 随后巨阻抗封接方法的确立和多种记录模式的建立, 对细胞和分子水平的生理学研究起了巨大的推动作用。细胞吸附式(Cell-attached mode)的单通道记录方法能够很直观地记录到配体门控离子通道的电活动。NMDA 受体通道是一种典型的受体—通道复合体。谷氨酸是 NMDA 受体通道的特异性激动剂, 膜片钳技术能证实在电极内液中不含谷氨酸时 NMDA 受体通道罕见开放。本实验证实: 作为 NMDA 受体特异性激动剂的谷氨酸, 能够增强大鼠下丘脑神经元 NMDA 受体通道活性, 使通道开放时间延长、开放频率增加, 并且这种增大具有浓度依赖性。而 NMDA 受体通道的激活会介导 Ca^{2+} 大量内流入胞, 细胞内 Ca^{2+} 超载导致神经元坏死[8]。这是中枢神经系统的损伤机制之一。

缺氧作为一种病理性损害, 已经被证实能引起大鼠下丘脑谷氨酸大量释放, 并能在一段时间维持这一水平[9,10]。细胞周围谷氨酸的积聚促进 NMDA 通道开放, 产生细胞兴奋性毒性作用。

本实验进一步证实, 在保持同样浓度的谷氨酸情况下, 缺氧作为一种病理性条件也能提高细胞膜 NMDA 受体的兴奋性。相对比于正常供氧的环境, 在这种急性缺氧条件下, NMDA 受体通道的开放会增加, 同样能引起 Ca^{2+} 的内流, 导致神经元坏死。这说明, 急性缺氧对中枢神经系统损伤的机制, 不仅仅在于促进前体谷氨酸分泌, 同时在于它本身能提高后体细胞膜 NMDA 受体的兴奋性, 使 NMDA 通道大量开放介导 Ca^{2+} 内流。缺氧究竟通过什么方式激活 NMDA 受体通道开放, 其分子生物学机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Ishii T, Moriyoshi K. Molecular characterization of the family of NMDA receptor subunits[J]. J Biol Chem, 1993, 268(4): 2 836—2 843.

[2] Lester R A, Jahr C E. NMDA channel behavior depends on agonist affinity [J]. J Neurosci, 1992, 12(2): 635—643.

[3] Shonis C A, Waldrop T G. *In vitro* effects of GABA and hypoxia on posterior hypothalamic neurons from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats[J]. Brain Res Bull, 1995, 36(5): 461—466.

[4] Sakmann B, Neher G. Single channel recording[M]. New York: Planum Press, 1983. 503—506.

[5] Kramer J M, Nolan P C, Waldrop T G. *In vitro* responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia[J]. Brain Res, 1999, 835(2): 197—203.

[6] 范晓棠, 阮怀珍, 张金海, 等. 急性低温低氧对大鼠下丘脑 NOS 及 c-fos 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(4): 245—248.

[7] Ryan J W, Waldrop T G. Hypoxia sensitive neurons in the caudal hypothalamus project to the periaqueductal gray[J]. Respir Physiol, 1995, 100(3): 185—194.

[8] Olteanu A, Grosu L, Vlasie N, *et al*. The renin-angiotensin system and the effect of propranolol upon the cerebral cortical and hypothalamic circulation in hypoxia[J]. Rom J Physiol, 1997, 34(1—4): 25—33.

[9] 阮怀珍, 范晓棠. 兴奋性氨基酸加强高原低氧大鼠下丘脑前生长抑素原 mRNA 的表达[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(3): 42—44.

[10] Horn E M, Dillon G H, Fan Y P, *et al*. Developmental aspects and mechanisms of rat caudal hypothalamic neuronal responses to hypoxia[J]. J Neurophysiol, 1999, 81(4): 1 949—1 959.

(编辑　薛国文)

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