DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.009

脑缺氧诱导的大鼠大脑皮层神经元大电导NMDA受体通道开放*

王中峰** 黎海蒂 万子兵 罗全生 (第三军医大学基础医学部生理学教研室) 重庆,400038

提 要 目的:研究缺氧对大鼠大脑皮层神经元NMDA受体通道的影响。方法:细胞贴附膜片箝记录法。结果:缺氧除显著增加35 pS和100 pS NMDA受体通道的开放概率外,记录到一种电导达258 pS的NMDA受体通道亚型开放,该通道至少有3种开放状态:长时间开放、短暂开放、长时间和短暂开放在同一膜片上出现。通道在整个记录过程中开放概率较低。结论:缺氧可诱导大鼠大脑皮层神经元出现一大电导NMDA受体通道开放,它可能在缺氧病理过程中起重要作用。

关键词 缺氧;神经元;NMDA受体;离子通道;膜片箝技术;大鼠

中图法分类号 R392.3;R845.22

兴奋性氨基酸是哺乳类动物中枢神经系统内的主要兴奋性神经递质,N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate,NMDA)受体是重要的兴奋性氨基酸受体,它形成阳离子选择性离子通道,即NMDA受体通道,介导广泛的生理和病理过程,包括兴奋性突触传递,突触可塑性和兴奋毒等[1~3]。NMDA通道复合体在结合了两分子的谷氨酸和两分子的甘氨酸后通道开放,产生阳离子的跨膜流动,其中以Ca^{2+}为主[4~6]。通道开放呈多电导状态,其电导一般分为小电导和大电导两组[7]。作者在用膜片箝细胞贴附结构研究缺氧状态下大鼠大脑皮层神经元NMDA受体通道特性时,发现缺氧诱导的大电导NMDA受体通道亚型开放,并对其单通道特性进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 大鼠大脑皮层神经元分离

参照文献[8]进行,将2~4周龄的Wistar大鼠断头取脑,分离脑皮层,并切成400~500 μm的冠状脑片,在通混合氧气(95%O_2+5%CO_2)的人工脑脊液(成分 mmol·L^{-1}:NaCl 126,KCl 5,NaH_2PO_4 1.25,$NaHCO_3$ 26,$CaCl_2$ 2,$MgSO_4$ 2,葡萄糖10,pH7.2)中孵育30 min,后在含0.1%胰蛋白酶的2 ml人工脑脊液中消化30 min。用尖端火抛光的Pasteur吸管吹打,使组织分散。静置10 min后吸取上清液,滴加于事先涂有多聚赖氨酸的盖玻片上使细胞贴壁。加入浴液即可进行记录。分离过程在室温(23±1)℃下进行。

1.2 试剂

胰蛋白酶,多聚赖氨酸,NMDA和L-甘氨酸均为Sigma公司产品,其余均为国产分析纯。

1.3 溶液及缺氧模型

细胞浴液(mmol·L^{-1}):NaCl 140,$CsCl_2$ 5,$CaCl_2$ 1.8,HEPES 10,TTX 0.001,葡萄糖10,pH7.2。电极液:NMDA 20 μmol·L^{-1},L-甘氨酸1 μmol·L^{-1},不含葡萄糖,其余同正常浴液,将贴附有细胞的盖玻片放入培养皿中,加入细胞浴液,记录通道的电活动作为对照。去除细胞浴液中的葡萄糖,通混合氮气(95%N_2+5%CO_2)饱和1 h以上(氧分压9.16 kPa,美国LI-1620血气分析仪)。将此液加入放置有细胞的培养皿中,建立细胞缺氧模型[9]。

1.4 单通道记录

采用膜片箝细胞贴附式结构记录通道电流[10]。用微电极拉制器(PP-83,Narishige,Japan)两步拉制微电极,电极尖端直径1~1.5 μm,经涂胶,热抛光和充灌电极液后,电极电阻4~6 MΩ。单通道电流经膜片箝放大器(CEZ-2200,Nihon Kohedn,Japan)放大,1 kHz低频滤波后,用Digidata 1200采集板和pClamp软件(6.02版,Axon Instrument,USA)将信号采入微机,用Fetchex程序不间断采样,采样频率20 kHz。细胞箝制电位−80 mV。所有实验在室温下进行(23~25 ℃)。

2 结果

在急性分离的大鼠大脑皮层神经元膜上,用细胞贴附式膜片箝记录结构,以NMDA和L-甘氨酸为激动剂,记录到的NMDA受体通道如图1所示,细胞箝制电位在−80 mV时,通道开放的电导值分别为10 pS(图1A,n=6),20 pS(图1B,n=8),35、50 pS(图1C,n=6)和100 pS(图1D,n=8)等。相应的电流水平分别为:(0.78±0.09)pA,(1.63±0.16)pA,(2.79±0.14)pA,(4.12±0.71)pA,(7.97±0.05)pA。各种电导水平的开放以短暂开放模式为主,其中10 pS通道既有短暂开放,也有长时间簇状(Burst)开放,在簇状开放中有短暂的关闭状态。

在缺氧状态下,NMDA受体通道被显著激活,在所记录的21个细胞膜片上,35 pS和100 pS通道最常见,其开放概率比正常情况下显著增加(见图2,四条曲线为不间断记录,另文分析)。有趣的是在9个膜片上记录出一种开放电流达(20.7±

* 重庆市中青年科技专家基金资助项目

** 王中峰,男,34岁,讲师,博士,现为中国科学院上海生理研究所博士后 上海,200031

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

1.5)pA，通道电导达(258±18)pS 的亚型，该通道的开放有 3 种状态：①长时间开放状态，可被短暂的关闭所中断，其开放可与 50 pS 之间相互转换，见图 3A；②短暂的开放状态，通道呈高频率短暂开放，即开关状态快速转化，见图 3B 和 3C；③长时间开放和短暂开放在同一细胞上相继出现，见图 3D。分析通道的开关状态发现，大多数情况下，该通道开放直接由关闭状态转换而来，在簇状开放的过程中，可与其它电导水平转化后关闭。长时间开放状态的出现并不是连续不断的，而是在开放一次经历较长时间后才会再次出现，短暂开放则可重复出现。

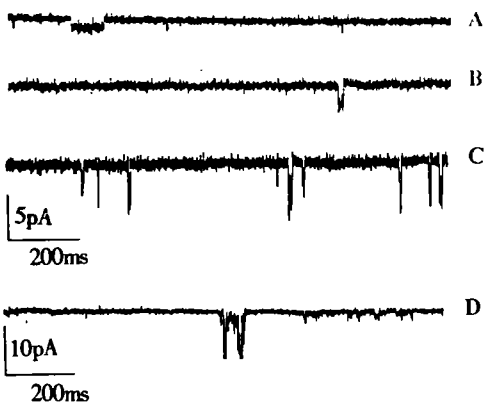


图 1　大鼠大脑皮层神经元 NMDA 受体通道单通道记录图　箝制电位－80 mV

A:10 pS; B:20 pS; C:35 and 50 pS; D:100 pS

Fig 1　Single channel recording of NMDA receptor channels on cerebral cortical neurons of rats Holding potential was set at －80 mV

A:10 pS; B:20 pS; C:35 and 50 pS; D:100 pS

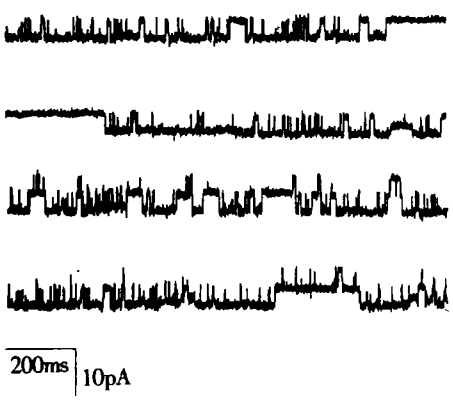


图 2　缺氧状态下大鼠大脑皮层神经元 NMDA 受体通道 35 pS 和 100 pS 单通道记录图　箝制电位－80 mV，四条曲线为不间断记录

Fig 2　Single channel recording of 35 pS and 100 pS NMDA receptor channels on cerebral cortical neurons of rats in anoxic condition Holding potential was set at －80 mV, the 4 traces were recored in gap-free

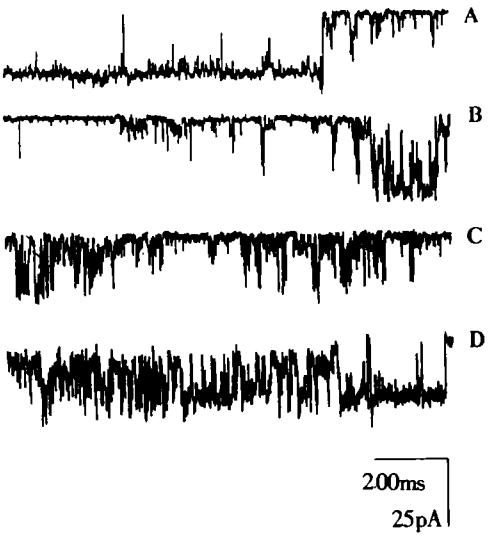


图 3　缺氧状态下大鼠大脑皮层神经元 NMDA 受体通道 258 pS 单通道记录图　箝制电位－80 mV

Fig 3　Single channel recording of 258 pS NMDA receptor channels on cerebral cortical neurons of rats in anoxic condition Holding potential was set at －80 mV

此外，在实验过程中还记录到一例更大电导的 NMDA 受体通道开放，电流达 42.5 pA，电导值为 532 pS。在此细胞膜片上，缺氧诱导的其它电导开放显著减少，仅见到 100 pS 通道的短暂少量开放。因仅此一例，故没有作进一步分析，见图 4。

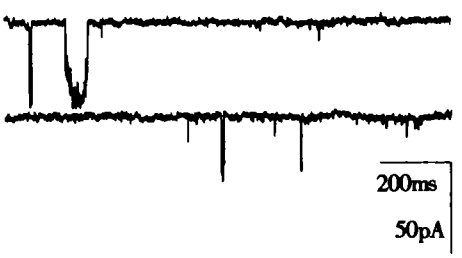


图 4　缺氧状态下大鼠大脑皮层神经元 NMDA 受体通道 532 pS 单通道记录图　箝制电位－80 mV

Fig 4　Single channel recording of 532 pS NMDA receptor channels on cerebral cortical neurons of rats in anoxic condition Holding potential was set at －80 mV

3　讨论

本研究在急性分离的大鼠大脑皮层神经元膜上，用膜片箝单通道记录技术，研究缺氧对 NMDA 受体通道的影响，用 20 μmol·L^{-1}的 NMDA 和 1 μmol·L^{-1}的甘氨酸来激动 NMDA 受体，记录到多个电导水平的通道开放，包括小电导和大电导两大类，此与文献

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

[7]报道的在海马神经元上记录结果基本一致。在缺氧状态下，NMDA 受体通道开放概率显著增加，其中以大电导类的 35 pS 和 100 pS 为主，而非小电导通道亚型，由于大电导 NMDA 受体通道对 Ca^{2+} 有选择性通透，故可导致 Ca^{2+} 内流增加，参与胞内 Ca^{2+} 聚集[11~13]。本实验记录到的电导达 258 pS 的 NMDA 受体通道亚型，是由缺氧诱导的，因为在正常浴液情况下，没有记录到此亚型的通道开放。在缺氧的过程中，其开放的概率不高，往往和其它亚型在同一膜片上诱发开放，而且可以和其它电导水平之间相互转换，但更多的是直接由关闭状态转化开放。出现此大电导开放的可能原因有：一是封接的膜片上有 2 个或更多的通道开放叠加所致；另一是新的亚型通道，而前一种可能性较小，因为所用的电极尖端直径较小，而且在正常情况下，没有观察到此电导水平的开放，因此，作者认为，这是由缺氧诱导的 NMDA 受体通道亚型开放，这种亚型通道的开放可能是加速胞内 Ca^{2+} 增高的因素之一。由于在缺氧状态下胞内 Ca^{2+} 聚集是导致细胞损伤的启动因素之一，因此，大电导 NMDA 受体通道的开放在缺氧细胞病理损伤中可能起有重要作用。但这还需要更多的实验来进一步证实。

参考文献

1 Choi D W, Rothman S M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Annu Rev Neurosci, 1990, 13: 171

2 Contantine-Paton M, Cline H T, Debski E. Patterned activity, synaptic convergence and NMDA receptor in developing visual pathways. Annu Rev Neurosci, 1990, 13: 129

3 Bliss TVP, Collingridge G L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature, 1993, 361(6407): 31

4 Clements J D, Westbrook G L. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine bingding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. Neuron, 1991, 7(4): 605

5 Kohr G, Koninck Y D, Mody I. Properties of NMDA receptor channels in neurons acutely isolated from epileptic (kindled) rats. J Neurosci, 1993, 13(8): 3612

6 高天明，邹 飞，陈培熹. 大脑皮层神经元 NMDA 受体的单通道特性. 生理学报, 1995, 47(2): 133

7 Jahr C E, Stevens C F. Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. Nature, 1987, 325(5): 522

8 唐向东，佟振清，杨文俊. 一种改进的适用膜片箝记录的急性神经元分离方法. 生理学通报, 1994, 11(1): 60

9 Harata N, Wu J, Ishibashi H, *et al*. Run-down of the $GABA_A$ response under experimental ischemia in acutely dissociated CA1 pyramidal neurones of the rat. J Physiol, 1997, 500: 673

10 Hamill O P, Marty A, Neher E, *et al*. Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. Pflugers Arch, 1981, 391(1): 85

11 Salinska E, Pluta R, Puka M, *et al*. Blockade of N-methyl-D-aspartate-sensitive excitatory amino acid receptors with 2-amino-5-phosphovalerate reduces ischemia-evoked calcium redistribution in rabbit hippocampus. Exp Neurol, 1991, 112(1): 89

12 Xia Y X, Zacharias E, Hoff P, *et al*. Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. J Cereb Blood Fluid Metab, 1995, 15(4): 587

13 Mitani A, Yanase H, Sakai K, *et al*. Origin of intracellular Ca^{2+} elevation induced by *in vitro* ischemia-like condition in hippocampal slices. Brain Res, 1993, 601(1): 103

(收稿：1998-09-28；修回：1999-05-10)

(编辑 王 红)

Anoxia in cortical neurons opens large-conductance NMDA receptor channels in rats

Wang Zhongfeng, Li Haidi, Wan Zibing, Luo Quansheng (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To study the effects of anoxia on NMDA receptor channels in the cerebral cortical neurons of rats. Methods: Cell-attached configuration of patch clamp technique. Results: The opening probability of 35 pS and 100 pS NMDA receptor channels was significantly increased during anoxia. The opening of a 258 pS NMDA receptor channel subtype was also recorded. There were at least 3 opening states of this channel subtype: long-lasting opening, brief opening and coexistence of the 2 states in a same patch, and the opening probability of this channel subtype was lower during recordng. Conclusion: A large conductance NMDA receptor channel subtype was induced by anoxia of the cerebral cortical neurons in rats and this channel subtype may play a role in the pathological manifestations of anoxia.

Key words anoxia; neuron; N-methyl-D-aspartate; ion channel; patch clamp technique; rat

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