DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.06.010

大鼠皮层神经元NMDA受体通道动力学特性的发育变化*

熊 鹰** 蔡文琴*** 李希成 隋建峰 (第三军医大学基础医学部生理学教研室)重庆,400038

提 要 目的:探讨大鼠发育过程中皮层神经元NMDA受体通道动力学特性的变化。方法:采用细胞贴附式记录急性分离神经元NMDA受体的单通道电流。结果:新生大鼠皮层神经元NMDA受体通道以20 pS通道开放最常见,而且多数是以短开放为主,猝发样开放(burst)为主的长开放通道少见;成年大鼠20 pS通道明显减少,35 pS通道明显增多,并且出现35 pS长开放通道,20、35 pS通道的开放时间和开放概率均明显高于新生大鼠。结论:大鼠皮层神经元NMDA受体通道动力学特性有明显的发育变化。

关键词 皮层神经元;NMDA受体通道;发育

中图法分类号 R338.1;R392.11

兴奋性氨基酸受体与突触的快速传递、神经递质释放、突触的可塑性发育以及学习记忆等生理过程有关。NMDA受体是兴奋性氨基酸受体中重要的一种亚型,也是目前研究最充分的亚型,它是一种具有许多不同变构调控位点并对Ca^{2+}高度通透的配体门控性离子通道[1]。以往研究NMDA受体通道动力学特性多在分离膜片以及培养的神经细胞进行[2],采用急性分离皮层神经元的方法较少。本实验在成功地建立这一方法的基础上,对发育过程中NMDA受体通道动力学特性的变化进行探讨。

1 材料和方法

1.1 动物

Wistar大鼠,年龄分别为1~7 d、2~3月。由本校实验动物中心提供。

1.2 神经元急性分离

根据文献[3]报道方法进行。将吹打后的液体静置5~10 min,吸取上清液,滴于涂有多聚赖氨酸的盖玻片上,静置10~15min使细胞充分贴壁。

1.3 玻璃微电极的拉制及充灌

将外径1.5 mm的玻璃管在微电极拉制器上经2次拉制成尖端直径1 μm的微电极,以0.2 μm的微孔滤膜过滤电极充灌液,用负压充灌微电极的尖端,再用微量注射器充灌电极尾部,用手指将电极尖端的气泡轻轻弹出。充灌后的微电极电阻为8~15MΩ。

1.4 液体与药品

人工脑脊液(mmol/L):NaCl 126,NaH_2PO_4 1.5,$NaHCO_3$ 25,KCl 5,$CaCl_2$ 4,$MgSO_4$ 2,Glucose 10(配时暂不加糖),pH 7.4;浴液(mmol/L):NaCl 140,$CsCl_2$ 5,$CaCl_2$ 1.8,HEPES 10,Glucose 10,TTX 0.001,pH 7.2;电极内液:无Glucose,含20 μmol/L NMDA和1 μmol/L甘氨酸,其余成分同浴液。胰蛋白酶、多聚赖氨酸、HEPES、NMDA、L-甘氨酸均为Sigma公司产品;TTX为河北水产研究所产品。

1.5 单通道电活动的记录

本实验主要采用细胞贴附式(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浴液。在倒置显微镜下选择贴壁良好、细胞膜完整、核明显、有立体感和明显突起的细胞,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,高阻密封即刻形成(阻抗大于10 GΩ)。以Fetchex程序连续采样,采样频率20 kHz,低通滤波为1 kHz。实验室温度20~23℃。

1.6 数据处理和资料分析

以pClamp6.0软件的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,以高斯和指数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。对各拟合分别在最小平方法(Marquardt-LSQ),Simplex-LSQ及最大或然率检验(Simple-MLE)的不同指数水平进行比较。实验数据用单因素方差分析进行统计学处理,结果用$\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

2.1 新生大鼠皮层神经元NMDA受体通道特性

电极液含NMDA(20 μmol/L)和甘氨酸(1 μmol/L),采用细胞贴附式方法可记录到单通道电流($n=35$),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受体的特异阻断剂APV(300 μmol/L)也未记录到这类通道的活动($n=11$)。在新生大鼠(1~3 d)的皮层神经元,观察到多数膜片的NMDA受体通道的开放有两个电导水平,电导分别为20、35 pS,见图1,其中以20 pS通道开放最常见,而且多数是以短开放为主,猝发样开放(burst)为主的长开放通道少见。从表1可见,在膜电位为−80 mV时,20 pS短开放的两个时间常数τ1和τ2分别为0.39±0.26,1.98±1.03,35 pS通道τ1和τ2分别为0.41±0.27和1.65±0.51,

* 国家自然科学基金资助项目,No,39670249

** 熊 鹰,男,33岁,讲师,博士

*** 组织学与胚胎学教研室

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

两者差异不显著。35 pS 无 burst 开放。20 pS burst 开放通道的开放时间和开放概率明显大于短开放通道($P<0.01$)。

2.2　成年大鼠 NMDA 受体通道特性的变化

在成年大鼠(2～3 m)皮层神经元上，以细胞贴附式记录到的 NMDA 受体通道也有 35 pS 和 20 pS 两种电导状态，见图 1，以 35 pS 通道为主，该电流活动可被 300 μmol/L 的 APV 完全阻断。与新生大鼠相比，2 m 大鼠 20 pS 通道明显减少，35 pS 通道明显增多，而且出现 35 pS 长开放通道。通道的开放和关闭时间分布直方图需用双指数拟合。从表 1 可见，20、35 pS 通道的开放时间和开放概率均明显高于新生大鼠($P<0.05$)。



图 1　以细胞贴附的方式记录大鼠急性分离皮层神经元 NMDA 受体单通道电流

钳制电位：－80mV；A1～A2：新生大鼠；B1～B3：成年大鼠

Fig 1　Single channel currents recording of NMDA receptor in the cell-attached configuration from the acutely dissociated cortical neuron of rats

－80mV; A1～A2: neonatal rats; B1～B3: adult rats

表 1　成年大鼠与新生大鼠急性分离皮层神经元 NMDA 受体通道开放和关闭状态的动力学特性的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of the kinetic properties of the open and closed state of NMDA channel in acutely dissociated cortical neurons between adult rats and neonatal rats ($\bar{x}\pm s$)

Channels	Open time(ms)		Close time(ms)		P(open)
	τ1	τ2	τ1	τ2	
Neonatal rats					
20 pS channel					
Single opening	0.39±0.26	1.98±1.03	4.22±2.09	103.2±42.9	0.015±0.011
Burst opening	2.11±1.37	29.3±7.32	1.88±0.22	89.3±28.1	0.092±0.076
35 pS channel	0.41±0.27	1.65±0.51	3.76±1.85	119.3±32.6	0.033±0.006
Adult rats					
20 pS channel					
Single opening	0.65±0.42*	3.75±2.11*	3.82±2.32	92.2±21.9	0.112±0.031*
Burst opening	2.53±0.97	95.1±19.6#	1.21±0.71	56.1±38.3	0.351±0.116#
35 pS channel					
Single opening	0.95±0.32+	4.01±2.81	1.62±0.53+	96.2±21.3	0.108±0.006+
Burst opening	1.87±0.77	63.3±11.2	1.88±0.22	73.3±45.3	0.435±0.096

*：$P<0.05$ *vs* 20 pS single opening of neonatal rats；#：$P<0.05$ *vs* 20 pS burst opening of neonatal rats；+：$P<0.05$ *vs* 35 pS single opening of neonatal rats

3　讨论

细胞的电活动受跨膜离子通道控制，它们由具有变构性质的通道蛋白组成，通道蛋白通过改变其构象来影响配位体结合，膜内电场变化，某些构象允许离子通过，某些构象阻止离子通过，因此，流过单通道的电

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

流形式是一系列等幅矩形脉冲，脉冲时间间隔是指数分布的随机变量，其平均值与控制通道状态转换的分子速率常数有关[4]。膜片钳(Patch clamp)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，对于细胞膜特性的电生理研究有巨大推动作用。

实验在新生大鼠的神经细胞，观察到多数膜片的NMDA受体通道为单一电导状态，少数有多电导开放状态，电导分别为35 pS、20 pS，其中以20 pS通道占多数，而且以短开放为主，通道开放时间及开放概率具有电压依赖性。成年大鼠NMDA受体通道也有多电导状态，但是35 pS通道明显增多，而20 pS通道明显减少。35 pS通道与新生大鼠相比除了数量上的差异外，开放时间和开放概率增高，而且有35 pS长开放通道。这些结果表明在发育过程中，NMDA受体通道的电导，开放时间和开放概率发生明显的变化。NMDA受体是一种具有许多不同变构调控位点并对Ca^{2+}高度通透的配体门控性离子通道。NMDAR1的mRNA几乎分布于脑内的所有神经元，其表达的部位和程度与放射自显影显示的图像基本吻合。而NMDAR2则在发育和成年的脑以及脊髓中有不同的时空表达模式，NMDA受体可能是由NMDAR1与不同的NMDAR2亚基组成的一个异寡聚体，不同亚基组成的异寡聚体既具有NMDA受体的许多共同特性，各自又有独特的性质。如NMDAR1与NMDAR2A或NMDAR2B形成的通道的电导为50 pS和40 pS，有时可见30 pS通道开放；而NMDAR1和NMDAR2C形成的通道的电导为36 pS和19 pS，36 pS为优势电导。因此，NMDA受体亚基在解剖和功能上的差异，是NMDA受体药理和生理特性的多样性的基础[5]。NMDA受体通道开放时内流的阳离子中含有Ca^{2+}，但NMDA受体通道并不是一种电压依赖性的钙通道，也不象传统的钙通道那样对Ca^{2+}有较大的选择性，而是Na^+，K^+等离子占去了NMDA受体通道离子的相当部分。NMDA受体的逆转电位在0 mV左右也显示了这一点。因此，NMDA受体通道开放所引起的Ca^{2+}内流既是递质门控性的，又是电压依赖性的[6]。

参考文献

1 Monaqhan D T, Bridges R J, Cotman C W. The excitatory amino acid recetor: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1989, 29(1): 35

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

3 唐向东，佟振清，扬文俊. 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. 中国科学(C辑), 1997, 27(1): 76

4 Skamann B, Neber G. Single channel recording. New York: Plenum Press, 1983. 503～506

5 Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, *et al*. Molecular characterization of the family of NMDA receptor subunits. J Biol Chem, 1993, 268(4): 2836

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

(收稿：1998-09-22；修回：1999-03-31)

(编辑 王 红)

Developmental changes of the kinetic properties of NMDA receptor channel in cortical neurons in rats*

Xiong Ying, Cai Wenqin, Li Xicheng, Sui Jianfeng (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe the developmental changes of the kinetic properties of NMDA receptor channel in the cortical neurons in rats. Methods: Cell-attached method was employed to record the NMDA receptor channel in the cortical neurons. Results: The 20 pS short open NMDA receptor channel existed in great majority in the cortical neurons of neonatal rats. The number of 20 pS channels was greatly decreased and that of 35 pS ones markedly increased in adult rats in which there were 35 pS long open channels. The open time and open probability were longer and greater in adult rats than in neonatal ones. Conclusion: There are significantly developmental changes of the kinetic properties of NMDA receptor channels in the cotical neurons in rats.

Key words cortical neuron; NMDA receptor channel; development; rat

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670249

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