

## 突触内 NMDAR 通道电流在培养神经元发育中的变化

田映红, 胡德辉, 李树基, 陈 明, 高天明

(南方医科大学基础医学院神经生物学教研室, 广东 广州 510515)

**摘要:** 【目的】观察培养大鼠海马神经元突触内 NMDA 受体(NMDAR)通道电流在发育中的变化。【方法】取新生 1 d SD 大鼠海马制成细胞悬液,接种在培养板上进行培养。培养到 1 周和 2 周时,采用膜片钳全细胞模式记录神经元突触内自发的微小兴奋性突触后电流(mEPSC)。【结果】培养 2 周海马神经元突触内 NMDA 受体介导的 mEPSC(mEPSC<sub>NMDA</sub>)幅度比培养 1 周神经元小,对 NR2B 的特异拮抗剂 ifenprodil 的敏感性降低。Ifenprodil 对培养 1 周神经元 mEPSC<sub>NMDA</sub> 的抑制作用达到(80.47 ± 6.12)%,却只抑制(12.27 ± 2.02)%培养 2 周神经元的 mEPSC<sub>NMDA</sub>。【结论】培养海马神经元突触内 NMDA 受体通道电流有发育变化,提示培养 1 周神经元突触内 NMDA 受体 NR2 亚单位主要为 NR2B;而神经元培养到 2 周时,突触内 NR2B 亚单位逐渐被 NR2A 取代。

关键词: 海马神经元; N-甲基-D-天冬氨酸受体; 膜片钳记录; 突触; mEPSC

中图分类号: R338.8

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)-0246-04

## Developmental Changes of Synaptic NMDA Receptor Channel Currents in Cultured-hippocampal Neurons

TIAN Ying-hong, HU De-hui, LI Shu-ji, CHEN Ming, GAO Tian-ming

(Department of Neurobiology, School of Basic Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate developmental changes of synaptic NMDAR mediated-currents in cultured-hippocampal neurons. 【Methods】 Hippocampal neurons of P0 SD rats were dissociated and cultured. Whole-cell recordings were performed to record miniature excited postsynaptic currents (mEPSC) after neurons were cultured for 1 week and 2 weeks. 【Results】 The amplitude of NMDAR mediated mEPSC (mEPSC<sub>NMDA</sub>) decreased in 2 weeks cultivation compared to that of 1 week, and was less sensitive to selective NR2B blocker ifenprodil. Ifenprodil decreased (80.47 ± 6.12)% of mEPSC<sub>NMDA</sub> in 1 week neurons, while only (12.27 ± 2.02)% in 2 weeks. 【Conclusion】 There are developmental changes of synaptic NMDAR channel currents in cultured-hippocampal neurons. The results indicate that different NR2 subtypes are expressed in synaptic regions during development of cultured-hippocampal neurons. In immature neurons, NR2B are prominent, then replaced by NR2A when neurons become older.

Key words: hippocampal; NMDAR; patch-clamp recording; synapse; mEPSC

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):246-249]

N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)是中枢神经系统中谷氨酸受体的一种类型,主要由 2 个 NR1 和 2 个 NR2 亚单位组成。NR2 分为 4 种亚型,分别是 NR2A, NR2B, NR2C 和 NR2D,海马和皮层神经元主要是 NR2A 和 NR2B。近年来的研究提示突触内和突触外 NMDAR 在突触可塑性、细胞内信号级

联及兴奋毒方面的作用不同<sup>[1-3]</sup>,因此明确突触内、外 NMDAR 的亚单位组成对研究突触内、外 NMDAR 参与不同功能具有重要作用。以前的研究发现突触内、外 NMDAR 存在发育变化,但对突触内 NMDAR 在发育中变化的研究基本都采用全细胞模式记录诱发的兴奋性突触后电流(evoked-excitatory post-synaptic current, eEPSC)<sup>[4,5]</sup>。这种方

收稿日期: 2006-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30330240)

作者简介: 田映红(1974-),女,湖南邵阳人,博士,讲师, E-mail: tianyh@fimmu.com; 高天明,博士生导师,课题负责人, E-mail: tgao@fimmu.com

法往往会激活一部分突触外 NMDAR, 并且不是真正意义上的生理活动, 因此本文采用膜片钳全细胞模式记录培养 1 周和 2 周海马神经元突触内 NMDAR 介导的自发的 mEPSC, 同时利用 NR2B 的特异拮抗剂 ifenprodil 来观察培养海马神经元突触内 NMDAR 通道电流在发育中的变化, 为探讨不同亚型 NMDAR 参与不同作用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

新生 1 d SD 大鼠。试剂: DMEM/F12、neurobasal 培养基(Gibco); 胎牛血清(杭州四季青公司); 乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA, 上海生工); 多聚赖氨酸、阿糖胞苷、胰蛋白酶、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES)、甘氨酸、荷包牡丹碱(bicuculline methiodide)、土的宁(strychnine)、河豚毒(TTX)、ifenprodil、6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮(CNQX)、2-氨基-5-磷酸基戊酸(d-APV)、钾盐(K<sub>2</sub>ATP)均为 Sigma 产品; 余为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠海马神经元的分离和培养 新生 1 d SD 大鼠, 分离海马并去除血管及脑膜, 将海马剪成小块, 经 2.5 g/L 胰蛋白酶作用 15 min(37 °C), 用含胎牛血清的完全培养基(DMEM/F12)终止消化, 吸管轻轻吹打组织块以分散细胞。将细胞悬液经 400 目尼龙网过滤, 900 ×g 离心 7 min, 沉淀加完全培养基重悬, 调细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup>/mL, 然后将细胞悬液加入事先包被多聚 L-赖氨酸的培养板中, 置于 37 °C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。24 h 后将完全培养基换成 neurobasal 培养基(含 2% B-27), 并加入 5 μmol/L 阿糖胞苷以抑制胶质细胞增殖。以后每 3 d 换液 1 次。

1.2.2 膜片钳记录 原代海马细胞培养到 6~7 d 或 13~15 d, 用来进行膜片钳实验。所有实验均在室温下进行(22~25 °C)。记录用的玻璃微电极用硬质厚壁玻璃拉成玻璃毛坯, 再用 P97 微电极拉制器分 3~4 步拉制微电极, 电极尖端直径为 1 μm 左右。用 pClamp 9.0 进行记录。记录到的信号经 1~2 kHz 低通滤波, 并用 digdata 1320 进行 10 kHz 数字滤波。采集到的数据存入计算机以备以后分析处理。全细胞模式记录自发的 mEPSC, 钳制电压为 -60 mV, 玻璃微电极的充灌电阻为 3~5 MΩ。浴槽液成分包括(mmol/L): 140 氯化钠, 5 氯化

钾, 1.3 氯化钙, 25 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES), 33 葡萄糖, 0.02 荷包牡丹碱(抑制 L-氨基丁酸受体), 0.001 土的宁(抑制甘氨酸受体), 0.001 氨基酸, 0.001 TTX(抑制动作电位), pH 7.4, 调渗透压为 320 mmol/L。电极内液成分包括(mmol/L): 140 氯化钾, 2 氯化镁, 2.5 乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA), 2 四乙铵, 4 三磷酸腺苷钾盐(K<sub>2</sub>ATP), 10 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES), pH7.4, 调渗透压为 300~310 mmol/L。

在整个实验过程中监测输入电阻和串联电阻。输入电阻为 500~800 MΩ, 串联电阻为 20~30 MΩ。若实验中输入电阻或串联电阻变化超过 20%, 则弃去该细胞。每个神经元记录到的事件数要大于 30, 用软件 Minianalysis 6.0 进行分析。分析时幅度小于三倍基线噪声的事件被排除。

1.2.3 数据统计 实验数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。SPSS 11.0 软件包进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 mEPSC 幅度随发育的变化

mEPSC 包括一快速衰减的成分和后面跟着的一缓慢衰减的成分(图 1B 中实线)。快速衰减的成分由 α-氨基-甲基-异恶唑-丙酸受体(AMPA)介导(mEPSC<sub>AMPA</sub>), 可被 5 μmol/L CNQX(AMPA 特异阻断剂)快速阻断; 缓慢衰减的成分由 NMDAR 介导(mEPSC<sub>NMDA</sub>), 可被 100 μmol/L d-APV 完全抑制(图 1B 中点线)。由于 mEPSC<sub>NMDA</sub> 的幅度小, 很难从背景噪声分离出来, 因此我们将 d-APV 作用前后的电流相减, 即可间接得到 mEPSC<sub>NMDA</sub>(图 1B 中点线)。统计结果显示培养 2 周的海马神经元 mEPSC<sub>NMDA</sub> 的平均幅度比培养 1 周小 ( $t = -3.645$ ,  $P = 0.004$ ), 但 mEPSC<sub>AMPA</sub> 的幅度相应增大( $t = 3.162$ ,  $P = 0.009$ ), 而总 mEPSC 的幅度无差异(图 1C、D,  $t = 0.281$ ,  $P = 0.780$ )。这些结果表明突触内 mEPSC 的幅度存在发育变化。

### 2.2 NR2B 特异拮抗剂 ifenprodil 对突触内 mEPSC<sub>NMDA</sub> 的影响

10 μmol/L NR2B 特异拮抗剂 ifenprodil 使培养 1 周的海马神经元 mEPSC<sub>NMDA</sub> 幅度平均减小 ( $80.47 \pm 6.12\%$  ( $n = 6$ )), 仅阻断了 ( $12.27 \pm 2.02\%$ ) 培养 2 周神经元的 mEPSC<sub>NMDA</sub> ( $n = 7$ ), 二者差别有统计学意义 ( $t = -2.360$ ,  $P = 0.030$ )。

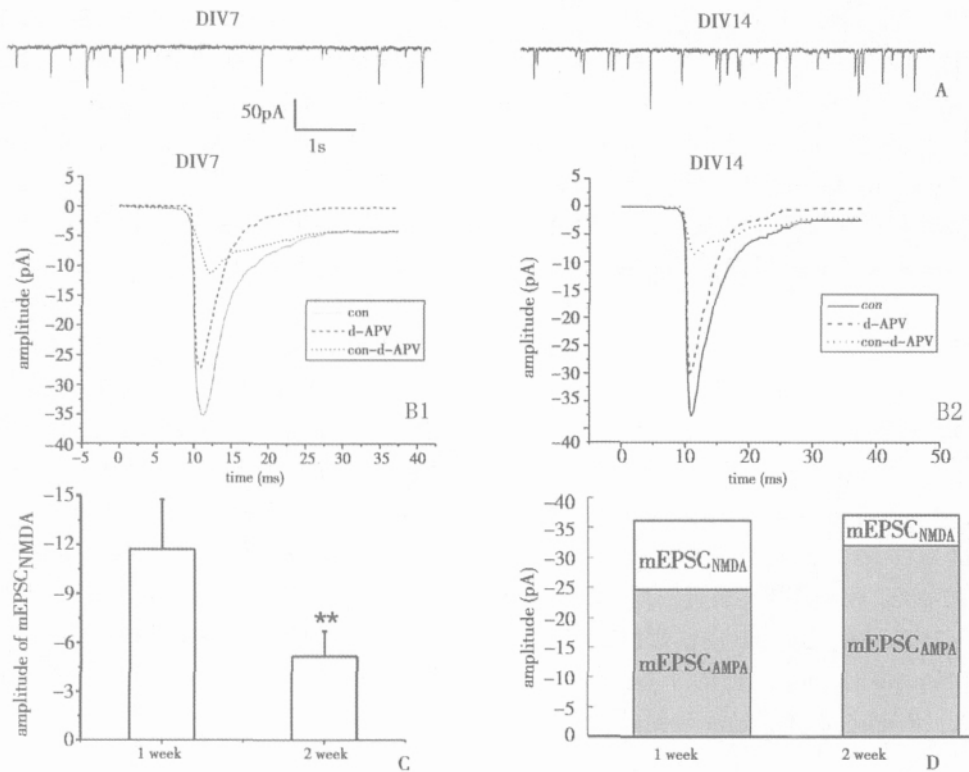


图 1 mEPSC 幅度在培养海马神经元发育中的变化

Fig.1 The change of mEPSC amplitude in developmental hippocampal neurons

A: An example mEPSC of DIV7 and DIV14 hippocampal neuron; B: Average traces of consecutive mEPSCs (black curve). 100  $\mu\text{mol/L}$  d-APV completely abolished the slow decay component (dashed curve). The dotted curve was the mEPSC<sub>NMDA</sub>; C: Mean amplitude of mEPSC<sub>NMDA</sub> decreased with development ( $t = -3.645$ ,  $P = 0.004$ , 6-7 patches); D: Amplitude of total mEPSC, mEPSC<sub>AMPA</sub>, and mEPSC<sub>NMDA</sub> of the different age groups.

### 3 讨论

#### 3.1 突触内 NMDAR 的发育变化

我们发现 10  $\mu\text{mol/L}$  ifenprodil 阻断了 (80.47  $\pm$  6.12)% 培养 1 周海马神经元的 mEPSC<sub>NMDA</sub>, 与阻断重组 NR1/NR2B 的效果一致。Ifenprodil 对 NR1/NR2B 的特异性高, 对重组的 NR1/NR2B 的阻断效应比重组的 NR1/NR2A 高 400 倍, 因此 ifenprodil 可作为检测 NR1/NR2B 是否存在及占多大比例的药物<sup>[6]</sup>。但即便如此, ifenprodil 也只能阻断 80% 左右的 NR1/NR2B 的反应。由于海马和皮层神经元 NR2 主要是 NR2A 和 NR2B<sup>[2-4]</sup>, 因此我们的结果提示培养 1 周神经元突触内的 NMDAR 主要为 NR1/NR2B。10  $\mu\text{mol/L}$  ifenprodil 只阻断了培养 2 周神经元 mEPSC<sub>NMDA</sub> 的 (12.27  $\pm$  2.02)%, 提示此时突触内 NMDAR 主要为 NR1/NR2A。我们的结果与 NR2 亚单位的表达存在发育变化一致。胚胎晚期及出生后海马主要表达 NR2B, NR2D 有少量表达。出生 1 周后才出现 NR2A 的表达。但出生 2 周

后, NR2A 的表达超过 NR2B 的表达, 占主要地位。以前的研究结果提示在突触内同一受体复合物存在异源的 NR1/NR2A/NR2B<sup>[4,7]</sup>。由于 NR1/NR2A/NR2B 对 ifenprodil 的敏感性也很低<sup>[4,6]</sup>, 因此我们推测培养 2 周的海马神经元突触内可能存在 NR1/NR2A 异二聚体和 NR1/NR2A/NR2B 异三聚体。我们的结果与以前的报道略有差异。Tovar<sup>[4]</sup>和 Thomas<sup>[5]</sup> 等认为培养 2 周的海马神经元突触内也主要为 NR1/NR2A, 但他们发现 ifenprodil 仍可阻断 40% 左右的 NMDAR 介导的 EPSC, 因此推测突触内仍存在一部分 NR1/NR2B。存在差异的原因可能是采用的标本和记录的方式不同。他们采用低密度法培养细胞, 记录的是自身突触。这种模型虽然可用来记录突触内和突触外电流, 但在生物体中毕竟不可能只存在自身突触。此外, 他们记录的是诱发的 EPSC, 这种方法在激活突触内 NMDAR 的同时也可能激活一部分突触外 NMDAR, 而突触外 NMDAR 主要为 NR1/NR2B, 因此诱发的 EPSC<sub>NMDA</sub> 对 ifenprodil 的敏感性较高。而我们记录自发的 mEPSC, 完全是由突触内受体介

导的,并且更体现生理状态的突触活动。

### 3.2 突触内NMDAR发育变化的可能机制

以前人们发现突触的形成首先需要NR2B,是一种非活动依赖性的方式。随着活动发生,当配体与突触处的NR1/NR2B结合,这些受体会发生内吞,被NR1/NR2A取代。NMDAR位于兴奋性突触的突触后膜,由NR2亚单位C-末端PDZ结合区与突触后膜一些脚手架蛋白如PSD-95家族结合形成突触后致密斑(postsynaptic density, PSD)<sup>[8]</sup>。C-末端作为调节蛋白或附属蛋白的靶区,在促进受体组装、分类或靶向中起作用,并参与不同通道的形成及功能调节,是NMDAR定位在突触处的关键。NR2A和NR2B的胞内C-末端区域不同,分别是627和644个氨基酸,因此它们与不同的PSD蛋白有不同的亲和力, NR2A更易与PSD-95结合,而NR2B更易与SAP-102结合。PSD-95与NR2A结合后能增加NR2A在突触处的表达并减少突触内NR2B的表达<sup>[9]</sup>。发育过程中最初的突触活动可导致NR2A与PSD-95的结合迅速增加<sup>[10]</sup>,并且PSD-95的表达也随发育增加<sup>[11]</sup>,因此可促进突触处NR2A的增加及NR2B的减少。此外NR2A和NR2B的C末端有不同内吞模块,这些内吞模块与笼形蛋白适配器有不同亲和力<sup>[12]</sup>。成年突触处NR2B的内吞多于NR2A,因而NR2A在突触的表达更稳定。由于突触内和突触外NMDAR之间会发生侧移<sup>[13]</sup>,我们推测发育后期突触内NR2B被NR2A取代还可能是NR2B侧向移动到突触外的结果。我们确实发现培养2周海马神经元突触外NMDAR介导的单通道电流的幅度、开放概率都比培养1周神经元增大,对ifenprodil的敏感性也比1周神经元高(待发表)。

### 3.3 突触内NMDAR发育变化的意义

由于NMDAR是诱导依赖活动的突触修饰的关键<sup>[14]</sup>,并且NR1/NR2A失活快<sup>[15]</sup>,可限制通道开放时间,因此突触处NMDAR亚单位的发育变化可能在突触可塑性和对兴奋毒的敏感性方面起重要作用。

参考文献:

- [1] HARDINGHAM G E, FUKUNAGA Y, BADING H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(5): 405-414.
- [2] LIU L, WONG T P, POZZA M F, et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity [J]. *Science*, 2004, 304(5673): 1021-1024.
- [3] MASSEY P V, JOHNSON B E, MOULT P R, et al.

Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(36): 7821-7828.

- [4] TOVAR K R, WESTBROOK G L. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(10): 4180-4188.
- [5] THOMAS C G, MILLER A J, WESTBROOK G L. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons [J]. *J Neurophysiol*, 2006, 95(3): 1727-1734.
- [6] WILLIAMS K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors [J]. *Mol Pharmacol*, 1993, 44(4): 851-859.
- [7] LUO J, WANG Y, YASUADA R P, et al. The majority of N-Methyl-D-Aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B) [J]. *Mol Pharmacol*, 1997, 51(1): 79-86.
- [8] SHENG M. The postsynaptic NMDA-receptor-PSD-95 signaling complex in excitatory synapses of the brain [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(pt 7): 1251.
- [9] LOSI G, PRYBYLOWSKI K, FU Z, et al. PSD-95 regulates NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons of the rat [J]. *J Physiol*, 2003, 548(pt 1): 21-29.
- [10] SANS N, PETRALIA R S, WANG Y X, et al. A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(3): 1260-1271.
- [11] YOSHII A, SHENG M H, CONSTANTINE-PATON M. Eye opening induces a rapid dendritic localization of PSD-95 in central visual neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(3): 1334-1339.
- [12] ROCHE K W, STANDLEY S, MCCALLUM J, et al. Molecular determinants of NMDA receptor internalization [J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(8): 794-802.
- [13] TOVAR K R, WESTBROOK G L. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses [J]. *Neuron*, 2002, 34(2): 255-264.
- [14] MALENKA R C, NICOLL R A. Long-term potentiation—a decade of progress? [J]. *Science*, 1999, 285(5435): 18701-18704.
- [15] MONYER H, SPRENGEL R, SCHOEPFER R, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes [J]. *Science*, 1992, 256(5060): 1217-1221.

(编辑 张恩健)