

## 基础研究

## 大鼠前额叶锥体神经元的 NMDA 受体的单通道特性

王福顺, 冯鉴强, 郭瑞鲜, 王艳, 陈培熹  
(中山大学中山医学院生理教研室, 广东广州 510089)

**摘要:**【目的】探讨大鼠前额叶皮层神经元 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体通道的特性, 为研究人脑前额叶锥体神经元的 NMDA 通道提供动物实验依据。【方法】对急性分离的大鼠前额叶的神经元进行细胞贴附式单通道膜片钳记录。【结果】前额叶神经元 NMDA 受体通道的开放呈现多电导状态, 表现为 55.1, 36.5, 18.6 pS 3 种状态, 以 18.6 pS 为优势电导。开放时间主要表现为快时程和慢时程两种状态, 时间常数均值分别为:  $(0.55 \pm 0.38)$  ms 和  $(13.59 \pm 3.26)$  ms, 以短时程为主。关闭时间常数为  $(0.34 \pm 0.27)$  ms 和  $(19.73 \pm 2.41)$  ms。开放概率为  $(0.25 \pm 0.09)$ 。【结论】前额叶神经元 NMDA 受体通道呈多电导, 以低电导 18.6 pS 为优势。开放时程短者占优势, 关闭时间短暂, 开放概率高, 表明前额叶锥体神经元 NMDA 受体通道的活动以快速短暂样开放为主。

**关键词:** 前额叶皮层/生理学; *N*-甲基-*D*-天冬氨酸; 信号传递/生理学; 膜片钳技术

**中图分类号:** R338.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-257X(2002)05-0321-04

**Single Channel Properties of NMDA Receptors in Pre-Frontal Cortex Neurons of the Rats** WANG Fu-shun, FENG Jian-qiang, GUO Rui-xian, WANG Yan, CHEN Pei-xi. (Department of Physiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the single channel properties of *N*-methyl-*D*-aspartate(NMDA) receptors in prefrontal cortex neurons of the rats.【Methods】Single channel currents were recorded from newly dissociated pre-frontal cortex neurons with cell attached configuration of patch clamp.【Results】Three conductances were observed from the frontal cortex neurons which are referred as large, medium, and small conductance channels. The mean single conductances were 55.1, 36.5, 18.6 pS respectively, with 18.6 pS as the predominant one. The mean open time histograms were adequately fitted with two-exponentials. The mean open time constant were  $(0.55 \pm 0.38)$  ms and  $(13.59 \pm 3.26)$  ms. The open probability was  $(0.25 \pm 0.09)$ .【Conclusion】The low conductance and short openings are predominant in prefrontal cortex, but the opening probability is high.

**Key words:** prefrontal cortex/physiology; *N*-methyl-*D*-aspartate; signal transduction/physiology; patch clamp techniques

前额叶(prefrontal cortex)是大脑皮层中功能最复杂的部位。人的各种高等心理活动,如意识、思维、想象、运动的组织和计划、注意等等都和前额叶皮层的功能有关<sup>[1]</sup>。该部位的功能损伤和许多精神疾病有关<sup>[2]</sup>。近年发现前额叶最主要的功能就是工作记忆(working memory),也就是暂时储存信息并进行在线(on-line)处理的过程<sup>[3,4]</sup>。谷氨酸能神经元对前额叶的投射在工作记忆中起到十分重要的作用<sup>[5,6]</sup>。谷氨酸神经元和皮层锥体神经元形成突触联系,其中 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体通道起着重要的作用<sup>[3]</sup>。上世纪 80 年代以来,大量的实验证明 NMDA 受体和突触可塑性及学习记忆等功能密切相关,这在海马中已经研究得比较透彻<sup>[7,8]</sup>,可是前额叶中 NMDA 通道的特

性并不明确。本实验室高天明<sup>[9,10]</sup>曾报道大脑皮层(不分前后部)神经元 NMDA 受体的多电导单通道,但未能代表前额叶神经元的特性。因此,本实验用出生后 14~18 d 发育比较完善大鼠,取前额叶部位锥体神经元进行膜片钳研究,以探讨前额叶锥体神经元 NMDA 受体通道的特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

HEPES, TRIZMA Base, Dopamine, *N*-Methyl-*D*-Aspartic Acid, Glycine, Cesium Chloride, Protease, TTX 均为美国 Sigma 公司生产,其余试剂均为国产市售分析纯。HEPES 人工脑脊液(mmol/L):氯化钠 126,氯化钾 5,氯化钙 2,硫酸镁 2,HEPES

收稿日期: 2002-05-17

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(001322)

作者简介: 王福顺(1968-),男,山东泰安人,博士,讲师;冯鉴强,教授,博士生导师,本课题负责人。

©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

10, 葡萄糖 10。细胞外液 (mmol/L): 氯化钠 140, 氯化钾 5, 氯化钙 1.1, HEPES 10, 葡萄糖 10, 河豚毒 0.001。电极内液 (mmol/L): 氯化钠 140, 氯化钾 5, 氯化钙 1.8, HEPES 10, 河豚毒 0.001, *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 0.02, 甘氨酸 0.001。以上溶液均用 Tris 调 pH 至 7.2~7.4。每次实验前电极内液和细胞外液均用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的纤维滤膜过滤, 以除去灰尘颗粒和细菌。

### 1.2 脑片的制备和神经元的急性分离

实验动物选用出生后 14~18 d 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雌雄不限。断头取脑, 置 0~4  $^{\circ}\text{C}$  的高蔗糖溶液中冰冻约 2 min, 再用振动切片机切取前额叶皮层为约 400  $\mu\text{m}$  厚的脑片。将切好的脑片置于通以体积分数 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  混合气的 HEPES 人工脑脊液中孵育 1~6 h (室温)。然后将脑片放入 32  $^{\circ}\text{C}$  的通以体积分数 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  混合气的 HEPES 人工脑脊液中, 用细菌蛋白酶 (protease, 1.1~1.4 g/L) 消化 20~35 min。取出脑片, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  的人工脑脊液中冲洗 3 次。移入到盛有约 3~4 mL 的人工脑脊液的离心管中, 用尖端经火抛光处理的口径依次为 500, 300, 150  $\mu\text{m}$  的吸管将之轻轻吹打, 使组织分散, 细胞游离。待充分打散后, 将离心管竖直静止 2 min, 使大块组织下沉, 取上部悬液, 加于预先涂有多聚赖氨酸的盖玻片, 静止 10~20 min, 待细胞贴壁后, 吸去孵育液, 使用细胞外液清洗 1~2 遍。然后把清洗干净的盖玻片放入浴槽内, 加入适量的细胞外液, 进行实验。

### 1.3 通道电流记录

实验采用膜片钳技术中的细胞贴附式记录单通道电流。记录用玻璃微电极的制作, 是采用硬质厚壁无心玻璃毛细管 (直径 1.5 mm, 中国科学院上海生理所生产) 经微电极拉制仪 (Narishige, Japan) 分两步拉制而成, 电极尖端直径约 0.5~1  $\mu\text{m}$ , 充灌电极内液后电极阻抗约 10  $\text{M}\Omega$ , 其内插入乏极化氯化银电极, 并与膜片钳放大器探头相连。实验时, 在倒置显微镜下, 用微电极操纵器 (Narishige CX-4) 驱动电极接近细胞。在微电极尖端刚刚与细胞接触时, 稍加负压, 高阻密封可在瞬间形成。实验选用密封电阻大于 10  $\text{G}\Omega$  的膜片为研究对象。高阻密封形成后, 通过改变电极电位而控制电极下的小片细胞膜的跨膜电位, 从而观察此小片膜上的离子通道电流随电压改变而产生的变化。单通道电流用膜片钳放大器 (日本光电 CEZ-2300) 放大

波 (3 kHz), 经 DigiData 1200 数模转换板, 将信号输入计算机, 采用 Pclamp 7.0 采集数据, 使用 Pclamp 6.0 的 Fetchan 和 pSTAT 分析统计程序自动测量通道电流幅度、幅度分布直方图、开放和关闭时间、开放时间 and 关闭时间分布直方图及曲线拟合等。实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结 果

### 2.1 前额叶皮层神经元 NMDA 受体的单通道特性

实验记录选用胞体较大、形态有突起的细胞。当含有激动剂 (20  $\mu\text{mol/L}$  NMDA) 的记录电极与神经元胞体形成高阻密封后, 膜电位在 20~100 mV 之间改变时, 可记录到内向通道电流。在电极内液不含激动剂的 15 个细胞上, 均未记录到内向电流活动, 而在有激动剂时记录的 40 个细胞中, 有 36 个记录到单通道电流, 表明记录到的内向电流为 NMDA 激活的通道电流。

NMDA 受体的单通道电流, 在同一钳制电位下, 可见有几类幅度不等的通道电流, 但同类幅度的幅值基本相等, 单通道电流曲线呈时间不等的矩形波。其幅度分布直方图呈对称的单峰状, 可以很好地进行高斯拟合。当膜电位极化程度加大时, 单通道电流的幅度也随之增大。以跨膜电位为横坐标, 相应的电流幅度为纵坐标画出电流-电压关系斜线。根据斜率可以算出单通道电导, 其电导为 35.4 pS。电流值为 0 pA 时, 所对应的电压值也就是通道的翻转电位, 为 -2 mV。

### 2.2 前额叶皮层神经元 NMDA 受体通道的多电导状态

在我们所记录的 36 个细胞上, 可以观察到 3 种不同电导开放的通道, 分别称为大、中和小电导通道。其中大电导为主的有 4 例, 平均电导为 (54.6  $\pm$  3.7) pS; 中电导为主的有 8 例, 平均电导为 (34.5  $\pm$  3.1) pS; 低电导为主的有 24 例, 平均电导为 (17.5  $\pm$  2.5) pS。在同一钳制电压下, 在同一膜片上就可以观察到不同幅度的电流, 在膜电位为 -80 mV 时, 在同一膜片上记录到的 3 种不同电导的通道活动 (图 1)。使用三级高斯曲线拟合, 它们的高斯拟合值分别为: 1.76, 2.96, 4.41 pA。其中大电导通道的电导为 55.1 pS, 中电导通道的电导为 36.5 pS, 小电导通道的电导为 18.6 pS。分别占全部开放事件数的 19%、36% 和 45%。

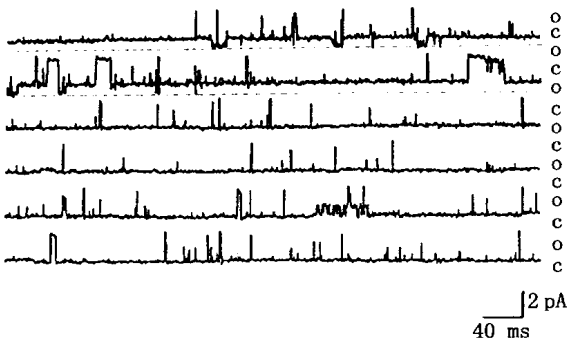


图 1 电压 -80 mV, 3 种不同 NMDA 受体通道的电导电流及其转换

Fig 1 Three conductances of NMDA receptor channel currents and their switch at -80 mV

### 2.3 通道的动力学特性

2.3.1 通道的开放时间 通道的开放时间长短不一, 短的小于 1 ms, 长的为几十毫秒。开放时间分布直方图呈指数状, 不能进行单指数拟合, 只能用双指数拟合, 表明通道存在两个开放状态。图 2 所示为膜电位在 -80 mV 时通道的开放时间分布图, 通道的平均开放时间为  $(5.5 \pm 0.35)$  ms, 拟合的两个时间常数分别为 0.77 ms 和 9.58 ms, 各自占开放时间的 70% 和 30%。对 24 例以 19.5 pS 为优势的膜片进行动力学分析发现, 在膜电位为 -80 mV 时, 双指数拟合的两个时间常数的均值分别为  $(0.58 \pm 0.38)$  ms 和  $(13.59 \pm 3.26)$  ms。

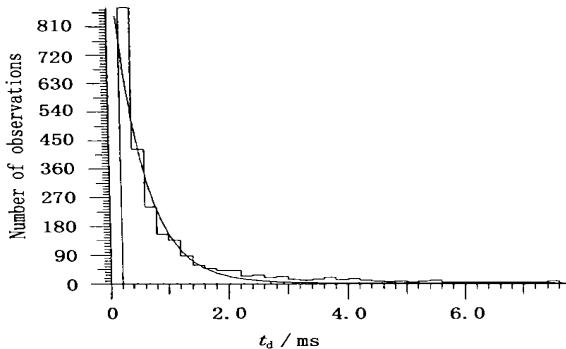


图 2 NMDA 受体通道的开放时间分布

Fig 2 Opening time distributions of NMDA channel currents  $t_d$ : dwell time

2.3.2 通道的关闭时间 通道的关闭时间差异也很大, 有短于 1 ms 的闪烁样关闭, 也有长达数百毫秒的长时程关闭。通道的关闭时间也可以使用二级指数拟合(图 3), 说明通道的关闭时间也呈现两种状态: 快速的短暂关闭和长时程的通道活动静息

期。对 24 例以 19.5 pS 为优势的膜片进行动力学分析表明, 在膜电位为 -80 mV 时, 双指数拟合的两个时间常数平均值为:  $(0.34 \pm 0.27)$  ms 和  $(19.73 \pm 2.46)$  ms。

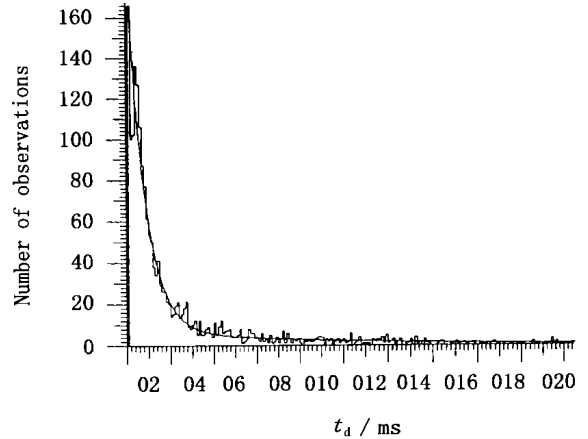


图 3 NMDA 受体通道的关闭时间分布图

Fig 3 Closing time distributions of NMDA channel currents  $t_d$ : dwell time

2.3.3 通道的开放概率 通道的开放概率是指在某一钳位电压下, 通道的总开放时间占通道持续去极化或超极化过程的比值。以 19 pS 为优势电导的通道中, 在膜电位为 -80 mV 时, 通道的平均开放概率为  $(0.25 \pm 0.09)$ 。

2.3.4 通道的猝发样开放和簇状开放 通道的开放常常被短暂的关闭所打断, 呈猝发样开放 (burst)。这种开放有时又可以呈现簇状 (cluster), 即彼此相隔一定的时间间隔的连续数个 burst 样开放串。在两串簇状开放之间有较长时间的关闭。在簇状开放期间通道的开放概率非常大, 通道在大部分时间是处于开放状态。这种簇状开放的膜片上有 4 例见到二级开放。

## 3 讨论

作者在新鲜分离大鼠前额叶锥体神经元上记录到的单通道电流, 是在膜超极化状态下的内向电流。由于记录电极内无  $K^+$ , 且存在  $Cs^+$  阻断  $K^+$  通道, 因此, 所记录的电流不是  $K^+$  通道电流。由于电极液内存在 TTX 阻断  $Na^+$  通道, 说明不是  $Na^+$  通道电流实验证明只有在电极液内含有 NMDA 时才能记录到通道电流, 说明电流是 NMDA 受体通道电流。

### 3.1 NMDA 受体通道呈多电导状态

本实验观察到大鼠前额叶皮层神经元 NMDA

受体通道的电流呈现多电导状态, 优势电导为 19 pS。NMDA 受体通道电流的多电导状态在许多部位的神经元中已有文献报道, 但是, 各个部位的优势电导不同。小脑浦肯野神经元为 35 pS<sup>[11]</sup>, 海马神经元为 50 pS<sup>[7, 8]</sup>。说明前额叶皮层低电导通道出现的频率明显高于小脑和海马神经元。高天明<sup>[9, 10]</sup>报道的大脑皮层(不分前后区域)神经元的优势电导为 35 pS, 比本文所观察到的前额叶神经元的 NMDA 受体通道的优势电导要高。表明在大脑皮层不同部位神经元中前额叶神经元 NMDA 受体通道的优势电导最低。Stem 等<sup>[12]</sup>报道, 不同部位的 NMDA 受体含有不同的亚基, NMDAR2A 主要存在于大脑皮层和海马, NMDAR2B 主要存在于前脑, 而 NMDAR2C 主要存在于小脑和间脑以及低位脑干。可能由于不同的亚基组成导致了不同部位神经元 NMDA 通道的不同特性。优势电导还可能与大脑的发育程度有关, 高天明等<sup>[9, 10]</sup>使用的是出生后 1~3 d 的大鼠, 而我们使用的是 14~18 d 的大鼠, 大脑前额叶发育较为完善, 低电导通道出现的频率更高, 提示工作记忆与低电导优势的关系值得进一步探讨。

### 3.2 NMDA 受体通道的开放动力学特性

本文在大鼠前额叶锥体神经元上所记录到的 NMDA 受体通道, 平均开放时间为 5.5 ms, 这和报道的大鼠小脑浦肯野神经元的 NMDA 通道平均开放时间 5.2~7.1 ms 接近, 比小脑颗粒细胞 NMDA 通道的开放时间 4.0~4.8 ms 要长<sup>[10]</sup>, 但是比海马神经元开放时间要短, 比高天明记录的大脑皮层(不分前后)神经元的 NMDA 受体通道平均开放时间(12.45±2.87) ms 要短。通道开放时间分布曲线都可以使用双指数拟合, 提示通道至少存在两种开放状态, 一种是几个毫秒的短开放, 另一种为几十个毫秒以上的长开放。从曲线拟合的两个时间常数平均值分别是: 0.58 ms 和 13.59 ms。Jahr 和 Stevens<sup>[7]</sup>对所观察到的新生大鼠海马神经元 NMDA 受体通道的开放时间使用双指数拟合, 得到的两个时间常数分别为 1~3 ms 和 10~15 ms, 短时程时间常数比本文观察到的要长, 长时程时间常数相近。高天明等<sup>[9, 10]</sup>报道大脑皮层锥体神经元的开放时间常数分别是 (0.69±0.61) ms 和 (16.07±1.58) ms, 比本文作者观察到的前额叶 NMDA

通道的开放时间常数稍大。本文报告通道的关闭时间为: (0.34±0.27) ms 和 (19.59±2.41) ms, 明显地比不分前后部位皮层神经元的关闭时间常数 4.72 ms 和 260.3 ms 要短, 比海马的关闭时间 (2.82±0.63) ms 和 (50.34±20.42) ms 要短。另外, 前额叶神经元的 NMDA 通道的开放概率为 0.25±0.09, 而海马神经元的通道的开放概率为 0.05±0.04, 大脑皮层(不分区域)为 0.098±0.095 要高。表明前额叶皮层神经元 NMDA 受体通道的开放频率较高。

### 参考文献:

- [1] Cohen J D, Perstein W M, Braver T S, *et al.* Temporal dynamics of brain activation during a working memory task[ J ]. *Nature* 1997, 386(6625): 604.
- [2] Dolan R J, Fletcher P, Frith C D, *et al.* Dopaminergic modulation of impaired cognitive activation in the anterior cingulate cortex in schizophrenia[ J ]. *Nature* 1995, 378(6553): 180.
- [3] Courtney S M, Ungerleider L G, Keil K, *et al.* Transient and sustained activity in a distributed neural system for human working memory[ J ]. *Nature* 1997, 386(6625): 608.
- [4] Durstewitz D, Kele M, Gunturkun O. A neurocomputational theory of the dopaminergic modulation of working memory functions[ J ]. *J Neurosci* 1999, 19(7): 2807.
- [5] Romanides A J, Duffy P, Kalivas P W. Glutamatergic and dopaminergic afferents to the prefrontal cortex regulate spatial working memory in rats[ J ]. *Neuroscience* 1999, 92(1): 97.
- [6] Verma A, Moghaddam B. NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine[ J ]. *J Neuroscience*, 1996, 16(1): 373.
- [7] Jahr C E, Stevens C E. Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons[ J ]. *Nature* 1987, 325(6104): 522.
- [8] Wimpsey T L, Chavkin C. Opioids activate both an inward rectifier and a novel voltage-gated potassium conductance in the hippocampal formation[ J ]. *Neuron*, 1991, 6(2): 281.
- [9] 高天明, 邹飞, 陈培熹. 大脑皮层神经元 NMDA 受体的多电导单通道[ J ]. *生理学报*, 1995, 47(2): 133.
- [10] 高天明, 邹飞, 陈培熹. 在无 Mg<sup>2+</sup> 条件下大脑皮层完整神经元 NMDA 通道的动力学的电压依赖性[ J ]. *中山医科大学学报*, 1994, 15(1): 6.
- [11] Cull-Candy S G, Usowicz M M. On the multiple-conductance single channels activated by excitatory amino acids in large cerebellar neurons of the rat[ J ]. *J Physiol* 1989, 415(1): 555.
- [12] Stern P V, Behe P, Schoepfer R, *et al.* Single channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors[ J ]. *Proc R Soc* 1992, 250(1329): 271.

(编辑 张敏瑞)