

·实验研究·

海马神经元乙酰胆碱受体通道的动力学特性^①

邹 飞^② 高天明 陈培熹

(中山医科大学生理学教研室,广州,510089)

提 要 用膜片钳技术研究了新生大鼠海马神经元乙酰胆碱受体通道的特性。通道有3种电导状态。本文分析31pS通道有以下特性,①随超极化程度增加,内向电流幅度增加,反转电位为0 mV。②通道开放以单个事件为主,簇状开放不常见。③该通道对钠钾离子无选择性。④开放时间分布直方图需双指数拟合,两个时间常数分别为0.31 ms和1.51 ms,分别占66%和34%。平均关闭时间也需双指数拟合,两个时间常数为0.3 ms和86 ms,各占71%和29%。⑤开放概率为0.0085,无电压依赖性。提示神经元上存在着不同的乙酰胆碱受体通道。

关键词 乙酰胆碱受体;离子通道;海马

中图分类号 R338.8

乙酰胆碱(ACh)是脑内重要的兴奋性递质烟碱型ACh受体(nAChR)在介导学习、记忆和神经发育等功能方面起着重要的作用^[1,2]。生理学与分子生物学的进展已证实nAChR有多种亚型。肌肉与神经节上的nAChR有很大的差异,而肌肉胚胎期和成年期的nAChR也不同^[3]。重组DNA已证实脑内存在两类以上的nAChR。由此看来,即使在一种动物上也至少有5种(2种肌肉型的,3种神经型的)nAChR。已往单通道研究多集中在肌肉和神经节的nAChR^[4],涉及脑内神经元的研究尚不多见。本研究旨在用膜片钳技术,从功能上分析海马神经元nAChR通道的特征,并与我们已往的工作^[5]和文献报道比较,探讨异同点。

1 材料与方 法

1.1 海马神经元培养

实验动物用出生后1~3 d的SD大鼠,雌雄不限(由中山医科大学实验动物中心提

供)。在无菌条件下,取出海马并切成碎片,移到盛有约5ml(改良伊格培养基)(DMEM)的离心管中,先后用火刨光的直径为500 μm和150~200 μm的Pasteur吸管吹打,使细胞游离。将离心管静立约3 min,用吸管取中部细胞悬液,移入另一事先放入5 ml DMEM的10ml离心管中1 000r/min离心3~5 min。去除上清液,加入2ml的培养液,培养液成分是40%DMEM,40%F₁₂,20%胎牛血清,葡萄糖3mg/ml,青霉素100U/ml,链霉素100 μg/ml,KCl 25 mmol/L。用吸管将细胞打散,使之成为细胞悬液,吸取此液加到培养皿内的盖玻片上,盖玻片事先涂有0.1%多聚赖氨酸。5%CO₂,95%空气,饱和湿度,37℃孵箱中培养,5 h后,部分细胞开始生长出突起。实验通常选用2~3 d培养的神经元。

1.2 单通道记录

本实验采用膜片钳技术^[6]的细胞贴附式。细胞外液成分为(mmol/L):NaCl140,CsCl₅,CaCl₂1.8,HEPES 10,葡萄糖10,TT×0.001。电极内液无糖加入1.0 μmol/L

① 国家教委博士点基金资助项目

② 第一作者 35岁,男,博士研究生

ACh, 其余成分与细胞外液相同, pH 7.2。实验前, 所有溶液均用孔径为 $0.15\mu\text{m}$ 的纤维滤膜过滤, 以除去灰尘颗粒和细菌。实验在室温下进行 ($20\sim 27^\circ\text{C}$)。部分实验用内面向外式。记录用火刨光的玻璃微电极, 尖端直径约为 $0.5\sim 1\mu\text{m}$, 电阻 $8\sim 11\text{M}\Omega$, 内插无极化氯化银电极与 CEZ-2200 片膜放大器相连, 反馈电阻 $10\text{G}\Omega$, 低通滤波 (4 poles bessel fitter), 3kHz , 用 PCM 录像机记录资料。

1.3 资料分析

用 125kHz Labmaster DMA 数据采集系统和 5.5 版 pCLAMP 软件 (美国 Axon Instrument), 将记录在录像带上的原始资料输入 IBM PC/AT 计算机, 并用 pCLAMP 分析程序自动测量通道电流幅度及通道开放、关闭时间, 而后进行统计处理, 如幅度直方图, 开放、关闭直方图, 曲线拟合等。数字化水平 $200\mu\text{s}$, 忽视水平 $150\mu\text{s}$, 簇状开放 (burst) 忽视水平 $3\ 000\mu\text{s}$ 。

2 结果

2.1 多电导状态

当含有 $1.0\mu\text{mol/L}$ ACh 的记录电极与神经元胞体接触后, 轻轻负压吸引, 高阻密封形成后, 立即出现内向单通道电流 (30 例膜片)。实验选用的神经元容易从背景细胞中分辨出来, 主要依据它们的大小、形态、突起以及对激动剂的反应性。在对照的 10 例中, 电极内液不含激动剂, 无 1 例出现内向电流活动。而有激动剂时约有 95% 膜片有电流活动。电流幅度在同一钳位电压下变异较大, 不仅在不同膜片上有差异, 常常在同一膜片上就可同时记录到 3 种不同电导通道活动 (图 1)。

从图 1 中还可可见有些通道开放时噪音明显大于关闭时, 电极内给予 $+40\text{mV}$ 电压, 这意味着跨膜电压为 -100mV (静息膜电位约为 -60mV ^[7])。随着超极化程度增加, 内向电流不断加大, 根据电流-电压曲线算出斜率电导分别是 20 、 31 和 52pS 。各类通道占全

部膜片的百分比分别为 58% 、 33% 和 9% 。

目前仍不能肯定这 3 种不同幅度的通道活动究竟是意味着存在 3 种不同类型的通道, 还是一种通道的 3 种不同开放形式。本文着重分析 31pS 通道的动力学特性。

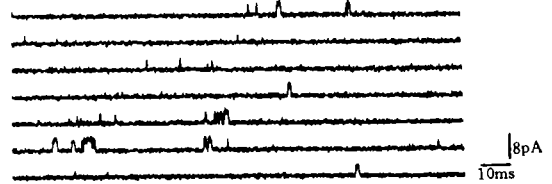


图1 ACh 激活的单通道电流

细胞贴附式记录, 钳制电压为 -100mV 时, 有 3 种不同电导的电流活动。簇状开放噪音明显增大, 其中有闪烁样关闭和亚电导状态

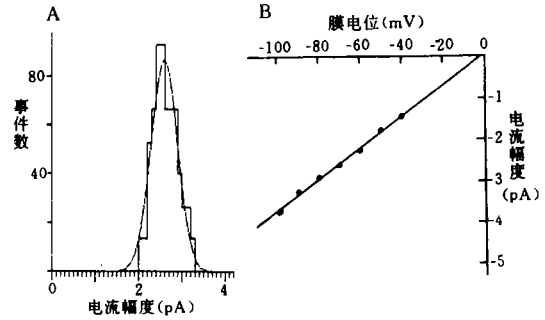


图2 电流幅度和电流-电压曲线图

左图 A 为通道开放电流幅度分布直方图, 膜电位为 -60mV , 实线为高斯拟合。右图 B 为不同钳制电压下电流-电压关系曲线。图中各点为 50 个事件以上的均数, 从曲线斜率中得出电导为 31pS

31pS 通道电流幅度基本相同, 呈时程不等的矩形波或尖波, 其幅度分布直方图呈对称的单峰状, 并能很好地进行高斯拟合。如图 2 所示, (A) 当膜电位为 -60mV 时, 单通道电流幅度为 2.15pA , (B) 电流-电压关系曲线, 此线的延长线与 x 轴相交处电流值为 0, 其横坐标值即为该通道的反转电位 (reversal potential), 约为 0mV 。

2.2 31pS 通道的动力学特性

2.2.1 通道开放时间 开放时程长短不一, 其分布直方图呈指数分布, 符合双指数拟合 (图 3A)。当超极化到 -100mV 时, 两个时间常数分别为 $0.31\pm 0.2\text{ms}$ 和 $1.51\pm 0.39\text{ms}$ ($n=7$)。其中快成分占 66% , 慢成分占 34% 。

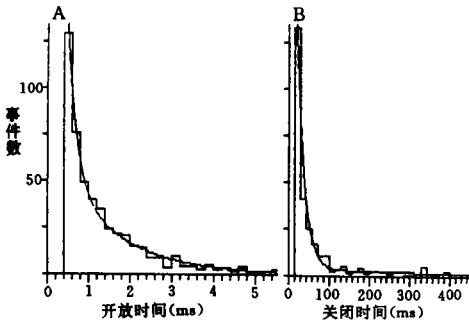


图3 通道开放和关闭特性

左图 A 为通道开放时间分布直方图。右图 B 为通道关闭时间分布直方图。ACh 浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ ，膜电位 -100 mV 。图中曲线为双指数拟合曲线

2.2.2 通道关闭时间 在同一钳位电压下，通道关闭时间也长短不一，有快的闪烁样关闭，也有长时间的关闭，其分布直方图需双指数拟合，两个时间常数分别为 $3.3 \pm 0.49 \text{ ms}$ 和 $86 \pm 18 \text{ ms}$ ($n=7$)，其中快成分占 71%，慢成分占 29%。

2.2.3 通道开放概率 通道开放概率是指通道开放时间与总超极化时间的比值。在膜电位钳制在 -100 mV 时，开放概率为 0.0085 ± 0.0016 。从膜电位 -80 mV 到 -120 mV 开放概率基本不变，提示开放概率不依赖于电压。

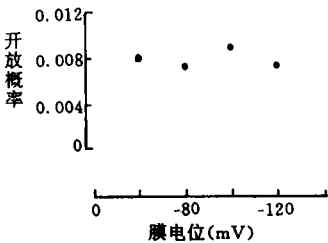


图4 通道开放概率与膜电位的关系

2.2.4 簇状开放 (burst) 31pS 通道有时出现 burst 样开放，但出现频率比 20 pS 通道少，难以进一步作统计学分析。burst 是一组开放，其中被极短的闪烁样关闭所间隔。开放时噪音增大并伴有亚电导状态(图1)。

2.3 对 Na^+ 、 K^+ 离子的选择性

在 4 例膜片上自身对照了内面向外式与细胞贴附式的电导和反转电位。内面向外式膜片两侧离子浓度完全相同，而细胞贴附式为膜内高 K^+ ，膜外高 Na^+ 。两者电导和反转

电位无统计学差异，表明 31pS 通道对 Na^+ 、 K^+ 离子的通透无选择性。

3 讨论

AChR 分为 nAChR 和 mAChR 两类，mAChR 主要参与慢突触反应，当激动剂与之结合后并不直接引起通道开放^[8]，而需通过一些酶促反应才可激活通道。而 nAChR 的激动剂结合位点与离子通道同为一个蛋白大分子，故 ACh 可直接激活通道。本实验用膜片钳技术在培养的大鼠海马神经元膜上记录到的通道是超极化内向流。因电极液内无 K^+ ，且存在 Cs^+ 阻断 K^+ 通道，又有 TTX 阻断 Na^+ 通道，表明该通道不是 K^+ 和 Na^+ 通道。再根据反转电位、电压依赖性和激动剂的反应特点证实了 31pS 通道为 ACh 门控性 nAChR 离子通道。

近年来分子生物学的研究已证实外周肌细胞与神经元 nAChR 有结构上的差异，前者由 4 种不同的亚基组装成五聚体 $\alpha_2\beta\gamma\delta$ ，后者从 cDNA 文库中推导出至少 4 种 α 亚基和 3 种 β 亚基。神经元 nAChR 与肌细胞 nAChR 的药理学性质也有许多不同，特别是对 α -BGT 的反应不同。后来又发现神经元 nAChR 有许多不同的亚群。

本文所述的 31pS nAChR 通道与我们曾报道的 20pS 通道的动力学有差异，主要表现为开放概率较低、电流幅度较高、出现频率较少及簇状开放较少见。与文献报道的肌细胞膜上的 nAChR 通道相比，也有下列的明显差异：①电导低，同种属相比肌细胞 nAChR 通道为 $50 \sim 70 \text{ pS}$ ^[9]；②开放时间短，胚胎肌细胞和去神经肌 nAChR 开放时间通常为 $3 \sim 5 \text{ ms}$ ，成年肌细胞为 2.0 ms 左右^[10]，而我们发现的神经元 nAChR 短成分仅为 0.31 ms ，长成分为 1.51 ms ；③开放概率与超极化水平无关，而肌 nAChR 通道的开放概率常依赖于膜电位；④对 ACh 的反应性较低。

以上提示, 中枢神经元 nAChR 的生理特性与肌细胞的有明显差异. 中枢神经元存在着不同特性的 nAChR 通道。

(叶江鸿副教授在技术方法上给予指导, 特此致谢)

参 考 文 献

- 1 Galzi JL, Revah F, Bessis A, et al. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annu Rev Pharmacol*, 1991, 31: 37~72
- 2 Giacobini E. Cholinergic receptors in human brain: effects of aging and Alzheimer disease. *J Neurosci Res*, 1990, 27: 548~560
- 3 Changeux JP. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci*, 1990, 11: 485~492
- 4 Copper E, Couturier S, Ballivet M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature*, 1991, 350: 235~238
- 5 邹 飞, 叶江鸿, 陈培熹. 新生大鼠海马神经元乙酰胆碱受体单通道特性. *生理通讯*, 1992, 11 (3 Suppl): 5
- 6 Hamill OP, Marty A, Nerher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv*, 1981, 391: 85~100
- 7 Mulle C, Changeux JP. A novel type of nicotinic receptor in the rat central nervous system characterized by patch-clamp techniques. *J Neurosci*, 1990, 10: 169~175
- 8 Hartzell HC. Mechanisms of slow post synaptic potentials. *Nature*, 1981, 291: 536~544
- 9 Brehm P, Kullberg R. Acetylcholine receptor channels on adult mouse skeletal muscle are functionally identical in synaptic and non synaptic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 2550~2554
- 10 Deneris ES, Connolly J, Scott W, et al. Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 1991, 12: 34~40

(1993-05-07收稿 1993-12-20修回)

PROPERTIES OF ACETYLCHOLINE RECEPTOR CHANNEL IN HIPPOCAMPAL NEURONS

Zou Fei Gao Tianming Chen Peixi

(Department of Physiology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

It presents function characterization of neuronal acetylcholine receptor channel in the neonatal rat's hippocampus, using patch-clamp techniques. The nAChR of cultured neurons could assume three distinct conducting states. The salient electrophysiological properties of 31 pS state are in following respects: (1) The inward current amplitudes increased with hyperpolarization and reduced with depolarization which reversed at membrane potential about 0 mV. (2) Channel openings occur as isolated short-duration opening and as a few bursts of

longer duration openings. (3) ACh-gated channels of 31 pS state were cation selective and were permeable to Na⁺ and K⁺. (4) Distribution of open time followed double exponential function. The open time constants were 0.31ms(66%) and 1.51 ms(34%), respectively. Distribution of closed time also followed double exponential function. The closed time constants were 0.3 ms(71%) and 86 ms (29%), respectively. (5) The channel mean open probability was 0.0085 and showed no voltaged-dependence. These results suggest that heterogeneity exists between acetylcholine receptors within a single population of neuronal cells.

Key words acetylcholine receptor; ilon channel; hippocampus

简 报

胃癌的间质反应与组织学类型及预后的关系

周慕珩^① 薛 玲 叶玉玲

(中山医科大学病理学教研室,广州,510089)

关键词 胃癌;层粘蛋白;纤维连接蛋白;Ⅳ型胶原;预后

中图分类号 R735.2

作者共收集了胃癌手术切除标本86例(男64例,女22),并随访患者3~10年。全部病例均进行层粘连蛋白(LAM)、纤维粘连蛋白(FN)、Ⅳ型胶原(CollⅣ)免疫组化染色。结果显示:在肿瘤组织中,LAM、FN、CollⅣ阳性反应的分布及表现有两种形式:①基膜型:在高分化腺癌的腺体周围及低分化腺癌的癌巢周,阳性反应物形成基膜样的结构,呈连续的线状或断续的不完整线状分布,其染色强度不等。②间质型:在肿瘤间质内,可见呈网状或条索状的阳性的反应,以FN染色最明显。基膜型的阳性物常与周围间质的阳性物互相延续,其染色强度向周围逐渐减弱。肌层内浸润的癌巢周的阳性反应有所减弱。统计学检验结果表明:3种抗体的基膜型阳性物在肿瘤的各种组织学类型间有统计学的显著差异($P < 0.01$),其中以高分化腺癌阳性率最高,低分化腺癌较低,未分化癌为阴性,显示这3种抗体的基膜型阳

性反性与胃癌组织的分化程度有关,这与文献报道相一致。而3种抗体的基膜型和间质型阳性率与肿瘤的大体类型,临床分期,患者的生存期以及有否转移间无统计学差异($P > 0.1$)。

本组病例中随访5年以上者共78例,统计学分析表明:患者的预后与肿瘤的大体类型、组织学分型、临床分期及3种基底膜成分抗体的阳性检出率之间无明显关系,但与肿瘤的浸润深度密切相关($P < 0.005$),以浸润粘膜层者预后最好,而浸润肌层及全层者死亡率明显升高。本研究还发现肿瘤间或瘤周组织有明显的浆细胞浸润及淋巴滤泡形成者,其5年生存率明显提高的现象,提示这种间质细胞反应可能与机体的抗肿瘤的免疫反应有关,值得进一步探讨。

(1993-04-22收稿 1994-01-06修回)

^① 第一作者 58岁,女,教授