



## 红藻氨酸对海马CA1区突触传递的作用

哺乳动物中枢神经系统中离子型谷氨酸受体有3种亚型：N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)、 $\alpha$ -氨基羟甲基恶唑丙酸(AMPA)和红藻氨酸(KA)受体[1]，目前对NMDA和AMPA的研究已经比较深入。虽然已经肯定KA通过激活海马的KA受体，可使神经元产生高度兴奋性而导致癫痫，然而KA受体广泛分布于海马神经元的突触前和突触后膜[2]，由于缺乏高度选择性激动剂和拮抗剂阻碍了对KA受体的进一步研究，对其致痫的电生理机制尚不清楚。本研究对海马CA1区神经元(锥体细胞)采用全细胞电压钳记录，旨在研究KA对兴奋性和抑制性突触递质的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~7周龄SD大鼠(第一军医大学实验动物中心)8只，体质量140~180 g。

1.1.2 试剂 红藻氨酸、荷包牡丹碱、士的宁、AP-5、CNQX、EGTA、K-gluconate、Mg-ATP、HEPES和四乙铵购自Sigma公司，余均为国内化工产品。

#### 1.2 方法

大鼠在乌拉坦(1.5 g/kg·b.w.)，静脉注射)麻醉下快速断头，并小心、轻柔地完整剥出大脑，迅速浸入混合气( $O_2$  95%+ $CO_2$  5%)饱和的4℃ Krebs溶液[成分(mmol/L)：NaCl 117, KCl 3.6,  $CaCl_2$  2.5,  $MgCl_2$  1.2,  $NaH_2PO_4$  1.2,  $NaHCO_3$  25.0, glucose 11.0]。解剖镜下去除残留的蛛网膜和软膜，振动切片机(DTK-1000, Japan)切取厚度500  $\mu$ m、包含海马CA1区的横断脑片。Krebs溶液[(36.0 $\pm$ 0.5)℃，持续充以混合气体]中平衡和恢复1 h，取结构清晰(活力好)的脑片移于记录槽中尼龙网上。将脑片透明带(神经元所在位置)走向尽量调整到与记录电极长轴一致，以U形铂丝轻压固定，予上述Krebs溶液持续灌流，流速1~2 ml/min。透射光照射标本，体视显微镜下辨别CA1、CA3区所在区域，二者之间以尖刀切割分隔。CA1传入纤维导入吸吮电极，以备刺激用。尖端直径为1.0~1.5  $\mu$ m的微电极(记录电极)，充以电极内液[成分(mmol/L)：K-gluconate 130, NaCl 5,  $CaCl_2$  1,  $MgCl_2$  1, EGTA 11, HEPES 10, Mg-ATP 4, 四乙铵20]。采用盲插法与CA1区锥体细胞形成“高阻封接”，获得全细胞电压钳记录模式。所有实验药物均按预定浓度溶解于不同灌流液中，通过三通道开关转换分别给予。为记录兴奋性突触后电流(EPSCs)，钳制电位为-70 mV，灌流液中含荷包牡丹碱(10  $\mu$ mol/L, GABA受体拮抗剂)、士的宁(1  $\mu$ mol/L, 甘氨酸受体拮抗剂)和AP-5(10  $\mu$ mol/L, NMDA受体拮抗剂)，以分别封闭GABA能突触电流、甘氨酸突触电流和NMDA受体介导突触电流；为记录抑制性突触后电流(IPSCs)，钳制电位为0 mV，灌流液中含CNQX(10  $\mu$ mol/L, 非NMDA受体拮抗剂)、士的宁(1  $\mu$ mol/L)和AP-5(10  $\mu$ mol/L)，其中CNQX用于封闭非NMDA受体介导突触电流。全细胞电压钳记录按照Blanton[3]所描述方法进行。全细胞记录电信号由Axopatch 200B放大器(Axon Instruments, USA)放大，pClamp5.5软件采集，5 kHz低频滤波，333 kHz采样，并由A/D转换器(Digidata 1200, USA)转化为数字信号储存于计算机上。

### 1.3 统计学处理

采用自身对照，同一海马脑片药物作用前后分别测电流幅度，对两者均值进行比较。在Apple-7200微机上由Axon Graph (Axon Instruments, USA) 软件分析。统计学方法采用student's t检验。

## 2 结果

### 2.1 KA对EPSCs的影响(图1)

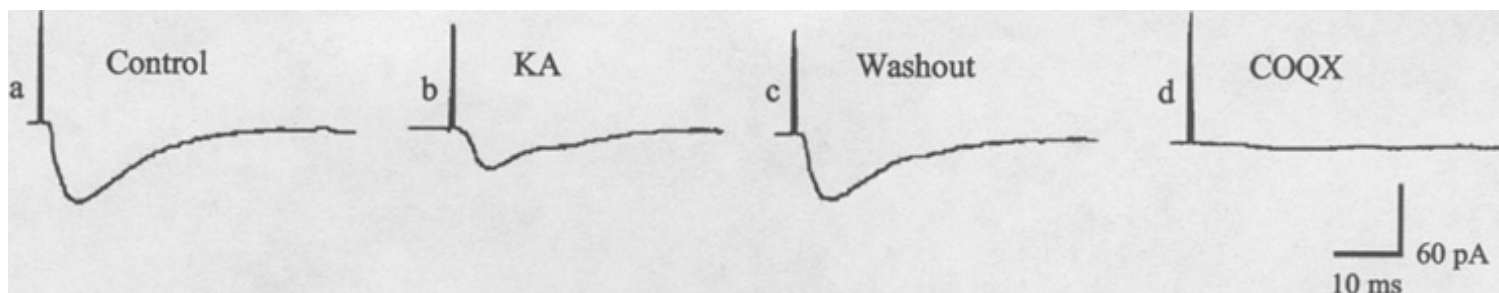


图1 红藻氨酸抑制刺激引起的海马神经元谷氨酸能兴奋性突触后电流

Fig.1 Inhibition of kainate treatment on focally-evoked glutamatergic excitatory postsynaptic currents (EPSCs) in hippocampal neurons

Glutamatergic EPSCs were obtained at the holding potential of -70 mV

a: Control; b: Depressed amplitude of EPSCs by kainite treatment (10  $\mu\text{mol/L}$ , 2 min); c: Reversion of the depression after washout; d: EPSCs weakened by CNQX(10  $\mu\text{mol/L}$ , 5 min), a non-NMDA receptor antagonist

(1) 正常灌流液中，通过刺激CA1传入纤维引出CA1区锥体细胞的EPSCs呈内向性。刺激强度为200  $\mu\text{A}$ 时，EPSCs的平均幅度为(99.2 $\pm$ 16.7) pA(图1a)；(2) 同样刺激强度下，灌流液中加入KA(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2 min后，电流平均幅度为(40.3 $\pm$ 11.4) pA，下降至正常对照的(40.6 $\pm$ 7.9)%，呈显著性抑制(P<0.01)(图1b)；(3) 正常灌流液将KA洗脱后，电流平均幅度为(76.9 $\pm$ 15.1) pA，呈现逆转(P<0.01)(图1c)；(4) 灌流液中加入CNQX(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 5 min后，对EPSCs产生明显阻断作用(P<0.01)(图1d)。

### 2.2 KA对IPSCs的影响(图2)

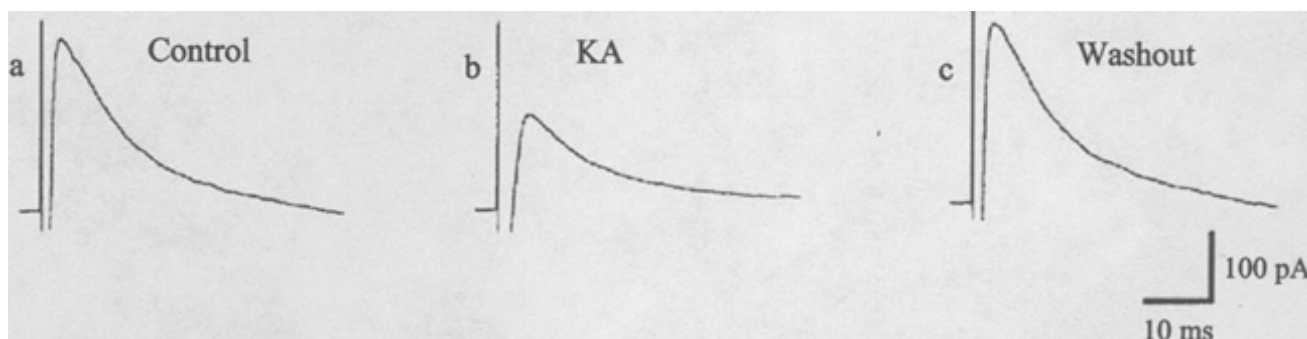


图2 红藻氨酸抑制刺激引起的海马神经元GABA能抑制性突触后电流

Fig.2 Kainate inhibits focally-evoked GABAergic inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) in the hippocampal neurons

GABAergic IPSCs were obtained at the holding potential of 0 mV

a: Control; b: Depressed amplitude of IPSCs by kainate (10  $\mu\text{mol/L}$ , 2 min); c: Reversion of the depression after washout

(1) 正常灌流液中, 通过刺激CA1传入纤维引出CA1区锥体细胞的IPSCs呈外向性。刺激强度200  $\mu$ A时, IPSCs的平均幅度为(117.8 $\pm$ 23.0) pA(图2a); (2) 同样刺激强度下, 灌流液中加入KA(10  $\mu$ mol/L) 2 min后, 电流平均幅度为(66.3 $\pm$ 11.7) pA, 下降至正常对照的(56.3 $\pm$ 13.2) %, 呈显著性抑制( $P < 0.01$ ) (图2b); (3) 正常灌流液将KA洗脱后, 电流的平均幅度为(127.2 $\pm$ 31.7) pA, 出现逆转( $P < 0.01$ ) (图2c)。

### 3 讨论

KA可对中枢神经元产生持续的兴奋性反应, 引起动物急性癫痫发作[4]。KA选择性作用于脑内兴奋性氨基酸(谷氨酸、门冬氨酸)能神经轴突末梢的突触前膜的KA受体上, 引起兴奋性氨基酸的释放, 并抑制其再摄取, 从而提高细胞外液中兴奋性氨基酸水平, 再通过激活突触后膜上的兴奋性氨基酸受体而发挥作用[5]。哺乳动物脑内大多数兴奋性传递是由谷氨酸受体介导的, 已知在离子型谷氨酸受体3种亚型(NMDA、AMPA和KA受体)中, 前两者分别介导快和慢EPSCs[6], 后者也直接参与突触传递过程[7][8]。脑内 $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)是最具代表性的一种抑制性神经递质, 在脑组织中广泛分布, 作用于突触后膜GABA受体, 使抑制性突触后电位增强, 起到抑制神经元异常放电的作用, 其功能状态与癫痫密切相关[9]。已有海马脑片实验证明, 激动KA受体可以下调GABA受体介导的IPSCs[11][10]。既然致病机制涉及到上述脑内神经元兴奋性的增高和抑制性的降低, 可假设KA作为离子型谷氨酸受体的激动剂, 可能会导致在兴奋性突触传递的增强和抑制性突触传递的抑制。

在正常人工脑脊液中, 通过刺激CA1传入纤维可引出混合的EPSCs和IPSCs[12]。本实验中, 通过钳制电位为-70 mV, 灌流液中应用荷包牡丹碱、士的宁和AP-5, 分别封闭了GABA、甘氨酸(抑制性氨基酸)能和NMDA受体介导突触电流, 以获得非NMDA受体介导EPSCs; 通过钳制电位为0 mV, 灌流液中予CNQX、士的宁和AP-5, 分别封闭了非NMDA、甘氨酸能和NMDA受体介导突触电流, 获得了GABA能IPSCs。通过给予KA在这两种突触后电流变化对比的结果可以观察到, 作为AMPA之外的另一种接受谷氨酸能突触递质的非NMDA受体, KA受体的激活同时直接对海马神经元兴奋性突触、抑制性突触的传递产生抑制性作用。由此, 通过对兴奋性突触传递的抑制减少了兴奋性的传入, 结果表现为对海马神经元产生抑制性效应; 通过对抑制性突触传递的抑制减少了抑制性的传入, 使得对神经元产生“脱抑制”, 即兴奋性效应。作为兴奋性氨基酸谷氨酸受体亚型的一种, 理论上可假设KA受体的激活应该是增强兴奋性突触的传递。然而, 从上述前一种效应结果来看, 与之正好相反。但是另一方面, 后一种效应可能在这两者中占主导地位, 掩盖(或强于)前者, 两种效应的总和最终产生兴奋性效应, 因而其“净作用”是兴奋。因此, KA诱导癫痫的机制可能是: KA分别产生的这种突触前抑制和脱抑制, 打破了海马神经元兴奋和抑制的动力学平衡, 呈高兴奋状态, 因而促使海马癫痫的形成。据此可以推测, KA诱发癫痫的核心机制可能是使海马GABA系统产生了脱抑制。因GABA能神经元数量减少或功能下降令所介导的抑制性功能减弱, 使得GABA的主要靶细胞(海马CA1、CA3区锥体细胞和齿状回颗粒细胞)产生脱抑制, 可能成为癫痫发作的首要因素。有几种可能来解释这种对兴奋性突触的抑制: (1) 持续的外源性KA使兴奋性突触前神经末端去极化后的相对不应期和绝对不应期延长, 而在相对不应期发生动作电位的阈值升高; (2) 持续的外源性KA使兴奋性突触前神经末端产生后超极化; (3) 持续的外源性KA使兴奋性突触前神经末端的后放电阈值增高; (4) 锥体细胞突触后膜的KA受体介导EPSCs, 兴奋局部突触回路中的抑制性神经元(中间神经元), 中间神经元转而抑制锥体细胞, 形成负反馈。因此, KA受体的激活对动作电位向兴奋性神经末端的传入产生阻滞作用。但本假说的具体机制, 尚待进一步研究。

致谢: 本实验结果的分析得到第四军医大学梁録璐脑研究中心杨鲲博士的大力帮助, 特致谢忱。

(责任编辑: 黄开颜)

参考文献:

[1] Ritter LM, Vazquez DM, Meador-Woodruff JH. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 139(2): 227-36.

[2] Frerking M, Nicoll RA. Synaptic kainate receptors[J]. Curr Opin Neurobiol, 2000,

- [3] Blanton MG, Turco JJ, Kriegstein AR. Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex[J]. *J Neurosci Methods*, 1989, 30(2): 203-10.
- [4] Marti E, Blasi J, Ferrer I. Early induction of secretoneurin expression following kainic acid administration at convulsant doses in the rat and gerbil hippocampus [J]. *Hippocampus*, 2002, 12(2): 174-85.
- [5] Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK, et al. Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate-putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors[J]. *Synapse*, 1998, 30(2): 227-35.
- [6] Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, et al. Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus[J]. *Nature*, 1996, 379(6560): 78-81.
- [7] Vignes M, Collingridge GL. The synaptic activation of kainate receptors[J]. *Nature*, 1997, 388(6638): 179-82.
- [8] Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons[J]. *Nature*, 1997, 388(6638): 182-6.
- [9] Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(Suppl 3): 8-12.
- [10] Clarke VRJ, Ballyk BA, Hoo KH, et al. A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission[J]. *Nature*, 1997, 389 (6651): 599-603.
- [11] Ali AB, Rossier J, Staiger JF, et al. Kainate receptors regulate unitary IPSCs elicited in pyramidal cells by fast-spiking interneurons in the neocortex[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(9): 2992-9.
- [12] Hajos N, Freund TF. Pharmacological separation of cannabinoid sensitive receptors on hippocampal excitatory and inhibitory fibers[J]. *Neuropharmacology*, 2002, 43 (4): 503-10.

#### 参考文献:

- [1] Ritter LM, Vazquez DM, Meador-Woodruff JH. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 139 (2): 227-36.
- [2] Frerking M, Nicoll RA. Synaptic kainate receptors[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, 10(3): 342-51.
- [3] Blanton MG, Turco JJ, Kriegstein AR. Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex[J]. *J Neurosci Methods*, 1989, 30(2): 203-10.
- [4] Marti E, Blasi J, Ferrer I. Early induction of secretoneurin expression following kainic acid administration at convulsant doses in the rat and gerbil hippocampus [J]. *Hippocampus*, 2002, 12(2): 174-85.
- [5] Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK, et al. Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate-putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors[J]. *Synapse*, 1998, 30(2): 227-35.
- [6] Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, et al. Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus[J]. *Nature*, 1996, 379(6560): 78-81.
- [7] Vignes M, Collingridge GL. The synaptic activation of kainate receptors[J]. *Nature*, 1997, 388(6638): 179-82.

[8] Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons[J]. *Nature*, 1997, 388(6638): 182-6.

[9] Treiman DM. GABAergic mechanisms in epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(Suppl 3): 8-12.

[10] Clarke VRJ, Ballyk BA, Hoo KH, et al. A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission[J]. *Nature*, 1997, 389 (6651): 599-603.

[11] Ali AB, Rossier J, Staiger JF, et al. Kainate receptors regulate unitary IPSCs elicited in pyramidal cells by fast-spiking interneurons in the neocortex[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(9): 2992-9.

[12] Hajos N, Freund TF. Pharmacological separation of cannabinoid sensitive receptors on hippocampal excitatory and inhibitory fibers[J]. *Neuropharmacology*, 2002, 43(4): 503-10.

---

[回结果列表](#)