

NMDA 对 GABA_A 受体的抑制作用由钙-钙调素 依赖性蛋白激酶 II 介导*

王殿仕^{①②} 吕 辉^① 徐天乐^{①**}

(^① 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027; ^② 第四军医大学基础部, 西安 710032)

摘要 应用制霉菌素(nystatin)穿孔全细胞记录方法, 研究了 *N*-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)对新鲜分离的大鼠骶髓后连合核(SDCN)神经元 γ -氨基丁酸(GABA)激活的全细胞电流的调控. 实验结果如下: (i) 在无 Mg^{2+} 及含 $1 \mu\text{mol/L}$ 甘氨酸的标准细胞外液中, 当钳制电位为 -40 mV 时, NMDA($100 \mu\text{mol/L}$)可抑制 GABA 和 muscimol (Mus)在 SDCN 神经元激活的全细胞电流 (I_{GABA} 和 I_{Mus}), 且 NMDA 受体的竞争性拮抗剂 D-2-amino-5-phosphonovalerate(APV, $100 \mu\text{mol/L}$)可完全阻断 NMDA 激活的电流, 并可消除 NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用. (ii) 当细胞外液中无 Ca^{2+} 及待测神经元被 Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA AM 预处理 2 h 后, NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用消失; 而用电压依赖性钙通道阻断剂 Cd^{2+} ($10 \mu\text{mol/L}$)或 La^{3+} ($30 \mu\text{mol/L}$)预处理后, NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用仍然存在. (iii) NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用可被钙-钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMK II)的抑制剂 KN-62 所阻断. 提示在大鼠 SDCN 神经元, NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用为一 Ca^{2+} 依赖性的过程, 这一过程的“下游”机制与细胞内 CaMK II 有关. 揭示了 Ca^{2+} 和 CaMK II 分别作为细胞内第二信使和第三信使将 NMDA 受体和 GABA_A 受体的功能联系起来.

关键词 骶髓后连合核 *N*-甲基-D-门冬氨酸受体 γ -氨基丁酸受体 钙-钙调素依赖性的蛋白激酶 II 交互作用

谷氨酸是哺乳动物中枢神经系统(CNS)中一种主要的神经递质. 谷氨酸受体介导大多数脑区的兴奋性突触传递, 且在参与脊髓感觉信息的传递中起重要作用. 谷氨酸受体分为离子型受体(iGluRs)和代谢型受体(mGluR)两大类, 其中 iGluRs 又包括 α -氨基-3-羧基-5-甲基异噁唑-4-丙酸(AMPA)、红藻氨酸(KA)和 *N*-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体. 最近几年, 应用分子生物学和膜片钳技术, 人们对包括 NMDA, AMPA 和 KA 受体在内的 Glu 受体亚型的分子结构和 Ca^{2+} 通透性做了全面分析^[1, 2]. 研究表明, 激活 NMDA 受体以及 Ca^{2+} 可通透性的 AMPA 和 KA 受体, 可引起细胞内游离 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_i$)的升高. Ca^{2+} 内流可触发或/和增强细胞内的许多 Ca^{2+} 依赖性过程, 对神经元信号传递产生深刻影响.

γ -氨基丁酸(GABA)是哺乳动物 CNS 中一种重要的抑制性神经递质. GABA 受体有 3 类: GABA_A, GABA_B 和 GABA_C. 在这几类受体中, GABA_A 受体的突触后激活已被认为是大多数脑

1999-07-23 收稿, 2000-02-25 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 39970200, 39770248)和中国科学院“百人计划”基金资助项目

** 联系人(E-mail: xutianle@ustc.edu.cn)

区中抑制性突触后电位的基础,具有重要的生理功能.自从 1986 年 Akaike 研究组报道 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化可调节 GABA_A受体的功能以来,对 GABA_A受体的细胞内调控机制已进行了大量研究^[3].到目前为止,有关细胞内 Ca^{2+} 对 GABA_A受体是具有正性还是负性调控作用的问题,还存在着争议.如在小脑 Parkinje 细胞^[4]及小鼠皮层神经元^[5], $[Ca^{2+}]_i$ 可增强 GABA_A受体介导的电流;而在小脑颗粒细胞, $[Ca^{2+}]_i$ 则降低 GABA_A受体介导的电流^[6].另有研究表明低浓度的 $[Ca^{2+}]_i$ 增强 GABA_A受体介导的反应,而高浓度的 $[Ca^{2+}]_i$ 则使其抑制^[7].此外, Ca^{2+} 调控 GABA_A受体的机制仍不清楚.

我们最近的研究证明,大鼠骶髓后连合核(sacral dorsal commissural nucleus, SDCN)神经元表达功能性 GABA_A^[8]和高 Ca^{2+} 通透性 NMDA 受体^[9]. NMDA 受体引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高是否影响 SDCN 神经元 GABA_A受体的功能?为此,本实验采用制霉菌素穿孔全细胞记录方法,在新鲜分离的大鼠 SDCN 神经元上研究了 NMDA 对 GABA_A受体间的交互作用(cross talk)及其细胞内途径.初步结果已经作过报告^[10].

1 材料与方 法

1.1 标本

两周龄 SD 大鼠在腹腔内注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 的深麻醉下,快速取出脊髓 L₅-S₃ 节段.振动切片机(DTK-1000; Dosaka, 日本)横切脊髓,制成 400 μm 厚的脊髓片,并在充氧饱和的标准细胞外液中孵育 50 min (22 ~ 25℃).然后,在链霉蛋白酶和嗜热菌蛋白酶中分别消化 20 和 15 min (31℃),两酶均由充氧饱和的标准细胞外液配制而成,终浓度为 1~1.2 mg /5 mL.酶处理后,脊髓片在标准细胞外液中继续孵育 1 h.然后用电抛光的注射针头穿出 SDCN 区,并移入充满标准细胞外液的培养皿中(Falcon).使用热抛光的 Pasteur 系列微玻管(直径 100 ~ 700 μm)机械分离神经元,新鲜分离的神经元在 20 min 内即可贴壁.选取形态学特征保持完好的神经元(如具有树突、胞体无肿胀等)进行膜片钳记录.

1.2 溶液

标准细胞外液的离子组成为(mmol/L): NaCl 150, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10 及 glucose 10, 用 Tris-base 调 pH 值至 7.4. 电极内液的离子组成为(mmol /L): CsCl 150, HEPES 10, 用 Tris-base 调 pH 值至 7.2. 制霉菌素(nystatin)储备液以酸化甲醇配制,浓度为 10 g/L,保存在-20℃.使用前将储备液加入到电极内,使电极内制霉菌素浓度为 0.4 g/L.

1.3 全细胞记录

在室温下(22~25℃),使用制霉菌素穿孔全细胞记录的方法^[11].微玻管电极是用两步电极拉制仪(PB-7; Narishige, 日本)由玻璃毛细管(Narishige, 日本)两次拉制而成.记录电极的阻抗为 4 ~ 6 MΩ.采用水压机微操纵器(WR-3; Narishige)和 CEZ-2300 膜片钳放大器(Nihon Kohden, 日本)记录.电流、电压变化以笔式记录仪(Omniace RT 3100; San-ei, 日本)监测,1 kHz 低通滤波后用 Digidata 1200A 及 PCLAMP 6.0.2 软件(Axon Instruments, USA)进行数据采集和分析.细胞膜钳制电位为-40 mV.

1.4 药物及给药方法

链霉蛋白酶购自 Calbiochem, 其余药物均购自 Sigma. NMDA 在使用前以无 Mg^{2+} 液及含 1 μmol/L 甘氨酸的细胞外液配制成终浓度,其余药物均用标准细胞外液配制.应用“Y”管系统

给药^[9], “Y”管尖端距记录细胞约 100 μm, 故可使神经元周围的药液在 20 ms 内彻底换掉。

1.5 统计处理

实验数据以 $X \pm s$ 表示. 用配对 t 检验比较两组数据之间的差异性.

2 结果

2.1 NMDA 受体的激活抑制 GABA_A 受体

新鲜分离 SDCN 神经元的形态学和电生理学特性与以往报道一致^[8, 9]. 当钳制电压为 -40 mV 时, 在所有被检测的 SDCN 神经元上给予 NMDA 或 GABA 分别可引起内向电流(I_{NMDA} 和 I_{GABA}). 在较高浓度 GABA 作用下, I_{GABA} 有脱敏(desensitization)^[8]. 为方便观察和分析 NMDA 对 I_{GABA} 的作用, 我们选用 3 μmol/L 的 GABA 作为对照刺激, 该浓度 I_{GABA} 脱敏较小(图 1). 此外, 本研究采用了制霉菌素穿孔膜片钳记录技术, 有效地防止了 GABA 作用期间 I_{GABA} 的 run-down^[8]. 在这样的实验条件下, 对照 I_{GABA} 的幅值不随记录时间而变化(未显示). 图 1(a)中的 1 显示给予 100 μmol/L 的 NMDA 之后, 4~6 s 内给予 3 μmol/L GABA, 则 I_{GABA} 减小, 为对照的(65±9)% (图 1(b)). 在给予 NMDA 20~30 s 后, 其抑制效应逐渐消失. 因此, 本实验中, 在给予 NMDA 之后, 待测神经元均在 4~6 s 内给予 GABA. 以往的电生理学和药理学研究已经证明, 大鼠 SDCN 神经元不表达功能性 GABA_C 和 GABA_B 受体^[8]. 图 1(a)中的 3 显示 I_{GABA} 可被 GABA_A 受体阻断剂荷包牡丹碱(bicuculline, BIC)阻断, 且 NMDA 也可抑制 GABA_A 受体特异性激动剂 muscimol(Mus)所激活的电流(I_{Mus})(图 1(a)中的 2, (b)), 表明在大鼠 SDCN 神经元上, NMDA 可

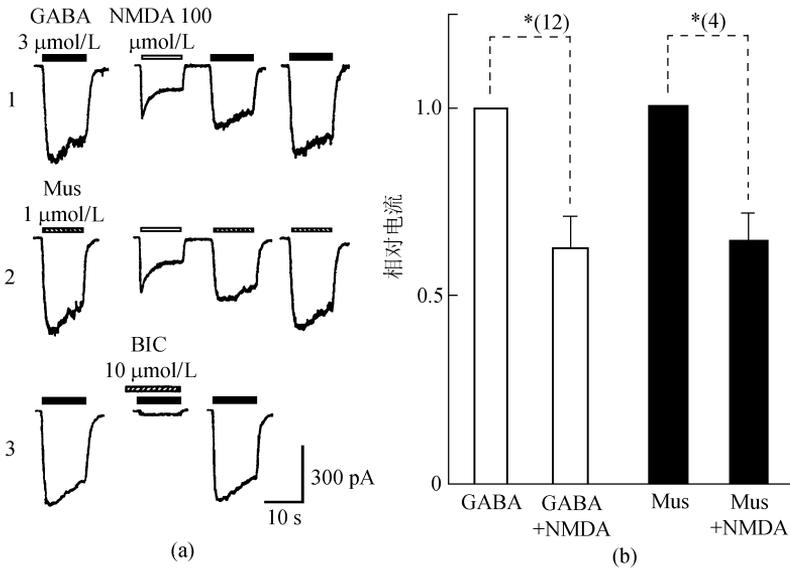


图 1 NMDA 对 I_{GABA} 的可逆性抑制作用

(a)中 1 示 NMDA(100 μmol/L)可逆地抑制 3 μmol/L GABA 诱导的电流(I_{GABA}). 2 示 NMDA 对 1 μmol/L muscimol (Mus) 诱导的电流(I_{Mus})有同样的作用. 在本图及随后的实验中, NMDA 与 GABA 施药的间期为 4~6 s. 3 示 I_{GABA} 几乎被 10 μmol/L 荷包牡丹碱(BIC)完全阻断. 1~3 的记录分别取自不同的细胞. 最右边的记录显示洗脱 NMDA 3 min 后得到的结果. (b)示 NMDA 抑制 I_{GABA} 和 I_{Mus} 的统计结果. 纵轴代表 I_{GABA} 或 I_{Mus} 的相对值, 以给予 NMDA 之前的电流值作为对照. 在本图及随后的图中, (a)中的水平条带表示给药期间, (b)中的垂直线代表平均标准差. 实验组和对照组之间的比较采用配对 t 检验(* $P < 0.01$), 实验例数标在图旁

抑制 GABA_A 受体介导的反应. NMDA 受体的特异性拮抗剂 D-2-amino-5-phosphonovale-
 erate(AP-V, 100 μmol/L)在阻断 I_{NMDA} 的同时, 亦使 NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用消失(图 2(a)中
 的 1, (b)). 上述结果表明, 在大鼠 SDCN 神经元激活 NMDA 受体可抑制 GABA_A 受体的反应.

2.2 细胞内 Ca²⁺参与 NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用

最近的研究证明, SDCN 神经元表达高 Ca²⁺通透性 NMDA 受体^[9]. 本实验研究了 NMDA
 受体介导的 Ca²⁺内流对 I_{GABA} 的作用. 图 2(a)中的 2,3 和(b)显示, 当标准细胞外液中无 Ca²⁺, 或

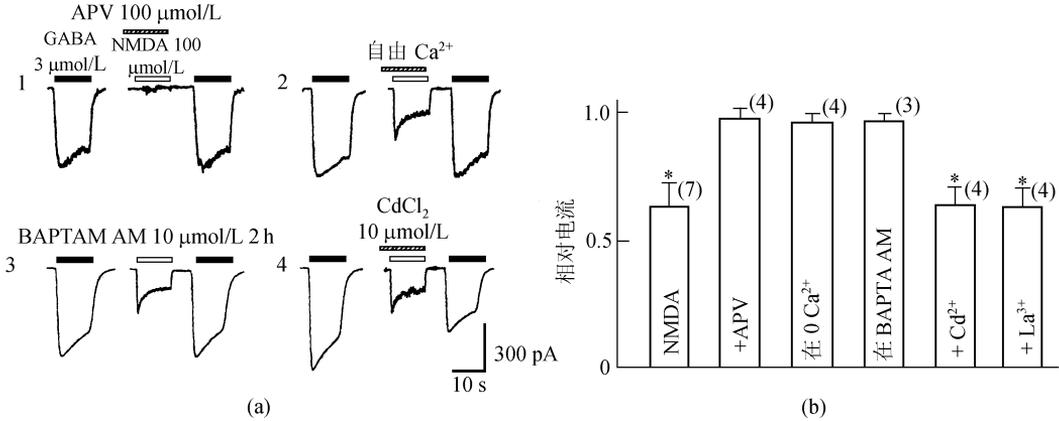


图 2 细胞内 Ca²⁺介导 NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用

(a) 原始记录结果显示 APV(100 μmol/L)(1), Ca²⁺外液(2)或 BAPTA AM(10 μmol/L)(3)取消 NMDA 对 I_{GABA}
 的抑制作用, 但 CdCl₂(10 μmol/L)不影响 NMDA 的作用(4); (b) 在图示的各种条件下, NMDA (100 μmol/L)
 抑制 3 μmol/L I_{GABA} 的百分比

当待测神经元被可通透胞膜的 Ca²⁺螯合剂 BAPTA AM 预处理 2 h 后, NMDA(100 μmol/L)对 I_{GABA}
 的抑制作用消失. 该结果表明胞外 Ca²⁺可能通过 NMDA 受体通道进入胞内, 并参与了抑制
 I_{GABA} 的作用. 为确定电压依赖性 Ca²⁺通道是否也参与了胞外 Ca²⁺的进入, 在胞外液含有电压
 依赖性 Ca²⁺通道的阻断剂 CdCl₂(10 μmol/L)或 LaCl₃(30 μmol/L)的条件下, 再做类似于图 1(a)
 的实验. 结果是, 施加 NMDA 之后的 I_{GABA} 为对照组 I_{GABA} 的(67±8)% (图 2(a)中的 4, (b)), 或(64
 ±7) % (图 2(b)), 这与无 CdCl₂ 或 LaCl₃ 的图 1 的结果相似. 上述结果表明胞外 Ca²⁺主要是通

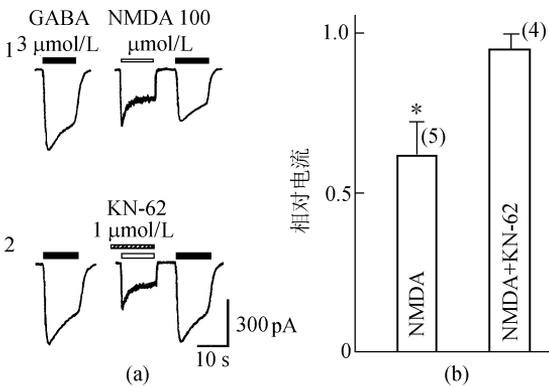


图 3 CaMK II 参与了介导 NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作
 用

(a)CaMK II 抑制剂 KN-62 (1 μmol/L)阻断 NMDA 对 I_{GABA} 的抑制

过 NMDA 受体通道进入胞内, 从而引起[Ca²⁺]_i 的升高, 介导 NMDA 对 I_{GABA}
 的抑制作用.

2.3 NMDA 抑制 I_{GABA} 的可能机制

以上结果表明, NMDA 对 I_{GABA} 的
 抑制作用依赖于[Ca²⁺]_i. 最近的研究表
 明, 在新鲜分离的大鼠 SDCN 神经元上,
 钙-钙调素依赖性的蛋白激酶 II (CaMK
 II)参与介导了[Ca²⁺]_i 对甘氨酸激活电
 流的增强作用^[12], 因此本文进一步研究
 了 CaMK II 在 NMDA 对 I_{GABA} 抑制过程
 中的作用. 图 3 显示未经 CaMK II 抑制

剂 KN-62 预处理的神经元, NMDA(100 $\mu\text{mol/L}$)可抑制 I_{GABA} 大约 35%(图 3(a)中的 1,(b)). 用 1 $\mu\text{mol/L}$ KN-62 预处理神经元 8~10 min 后, NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用基本消失(图 3(a)中的 2, (b)); 在 KN-62 洗脱后 8~12 min, NMDA(100 $\mu\text{mol/L}$)对 I_{GABA} 的抑制作用可完全恢复. 此结果表明 CaMK II 参与了介导 NMDA 对 I_{GABA} 的抑制.

3 讨论

本研究发现, 在新鲜分离的大鼠 SDCN 神经元, NMDA 可抑制 GABA_A 受体介导的全细胞电流, 且此作用可被 NMDA 受体的特异性拮抗剂 APV 所阻断, 这表明激活 NMDA 受体可下调 GABA_A 受体的功能. 这一作用是由于胞外 Ca^{2+} 通过 NMDA 受体通道内流, 使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 从而激活了 CaMK II. CaMK II 则通过某些未知位点的磷酸化过程抑制 I_{GABA} . 因此, 本文揭示了 Ca^{2+} 和 CaMK II 分别作为细胞内第二信使和第三信使将 NMDA 受体和 GABA_A 受体的功能联系起来.

正常生理状态下, 大多数神经元 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 维持在 100 nmol/L 左右, 而当细胞受到外界刺激时, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 可迅速增加. Ca^{2+} 的增加主要通过两个途径: 一是外界 Ca^{2+} 通过镶嵌于质膜上的钙通道进入胞内; 二是来自胞内钙库贮存钙的释放^[13]. 大多数神经元质膜上主要表达至少两类钙通道: 电压依赖性钙通道(voltage-dependent calcium channel, VDCC)和 NMDA 受体通道. 本实验中有 3 点提示 NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用是由通过 NMDA 受体通道内流的 Ca^{2+} 所引起的. (i) 当细胞外液中无 Ca^{2+} 时, 这两种受体间即不存在功能联系. (ii) 当待测神经元被 Ca^{2+} 螯合剂前体 BAPTA AM 预处理 2 h 后, 激活 NMDA 受体不再抑制 I_{GABA} . 因为胞内 BAPTA 可螯合 Ca^{2+} , 使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 不受 Ca^{2+} 内流的显著影响^[12], 从而避免了 CaMK II 的激活. (iii) 即使 VDCCs 被 Cd^{2+} 或 La^{3+} 阻断后, NMDA 仍然能抑制 I_{GABA} (图 2). 已有证据表明, Ca^{2+} 内流途径不同, 其生物学效应可能截然不同. 例如, Ca^{2+} 经 VDCC 进入细胞有利于胚胎神经元的生长发育; 然而, NMDA 受体介导的 Ca^{2+} 内流产生兴奋性氨基酸毒性作用, 可导致新生动物神经元死亡^[13]. 最近 Wu 等人^[14]报道, 即使同是经 VDCC 进入细胞的, 但是如果介导 Ca^{2+} 内流的 VDCC 亚型不同, 则产生的生物效应也不同. 因此, 在本实验中, 通过 NMDA 受体进入的 Ca^{2+} 有效, 而通过 VDCC 进入的无效, 可能是由于 Ca^{2+} 内流途径的差异所造成的. 此外, 经 SDCN 神经元 NMDA 受体内流的 Ca^{2+} 分量很大^[9]. 本实验条件下, 通过 VDCC 进入的 Ca^{2+} 分量可能较经 NMDA 受体内流的小, 因此不足以激活 CaMK II.

大量的研究表明, 细胞内外的多种物质均可通过变构调控、磷酸化或脱磷酸化机制影响 GABA_A 受体的功能^[3, 15, 16]. 本研究表明激活 NMDA 受体引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 进一步激活 CaMK II, 从而可能通过磷酸化过程抑制了 I_{GABA} . 但是 Chen 等人^[17]报道, 在急性分离的豚鼠海马神经元 NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用是通过胞内脱磷酸化过程实现的. 本研究中, 我们注意到在 NMDA 作用 20~30 s 后, 其对 I_{GABA} 的抑制作用即消失. 据此我们推测, NMDA 对 I_{GABA} 的抑制作用可能是由 Ca^{2+} 引起的短暂的磷酸化过程所介导的, 而 Ca^{2+} 在激活 CaMK II 的同时, 可能也激活了胞内 Ca^{2+} 依赖性的蛋白磷酸酶, 从而通过脱磷酸化过程使 I_{GABA} 迅速恢复.

GABA 是脊髓中的一种重要抑制性神经递质. 细胞内 Ca^{2+} 对 SDCN 神经元 GABA_A 受体的调控可能具有重要的生理意义. 首先, 最近的研究表明在发育过程中的某些脑区 GABA_A 受体本身的激活可使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高^[18], 因此在 CNS 中可能存在 GABA 能神经传递的自调节机制.

其次, NMDA 受体介导的 Ca^{2+} 内流可产生兴奋性毒性作用, 导致神经元的死亡. 由于 SDCN 神经元接受谷氨酸能初级传入和脊髓后角 GABA 能中间神经元的双重支配^[8, 9], 一旦 NMDA 和 GABA_A 受体被同时激活, NMDA 受体介导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度升高, 可能进一步通过激活 CaMK II 来抑制 GABA 能的抑制性传入, 导致突触后细胞的兴奋性过度升高. NMDA 对 GABA_A 受体的抑制效应是否与谷氨酸引起的神经细胞死亡有关, 有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 梁秦川, 徐天乐. AMPA 和 KA 受体通道的分子结构和功能特性. 生理科学进展, 1997, 28: 352 ~ 355
- 2 王 文, 徐天乐. NMDA 受体通道的结构和功能. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24: 321 ~ 326
- 3 庞志平, 徐天乐, 李继硕. GABA_A 受体的细胞内调控及其机理. 中国药理学通报, 1998, 14(综述专辑): 60~62
- 4 Llano I, Leresche N, Marty A. Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron*, 1991, 6: 565~574
- 5 Aguayo L G, Espinoza F, Kunos G, et al. Effects of intracellular calcium on GABA_A receptors in mouse cortical neurons. *Pflügers Arch*, 1998, 435: 382~387
- 6 Martina M, Kilic G, Cherubini E. The effects of intracellular Ca^{2+} on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture. *J Membr Biol*, 1994, 142: 209~216
- 7 Mouginot D, Feltz P, Schlichter R. Modulation of GABA-gated chloride currents by intracellular Ca^{2+} in cultured porcine melanotrophs. *J Physiol*, 1991, 437: 109~132
- 8 Xu T L. γ -Aminobutyric acid-induced responses in acutely dissociated neurons from the rat sacral dorsal commissural nucleus. *J Autonomic Nerv Syst*, 1999, 75: 156~163
- 9 Xu T L, Li J S, Akaike N. Functional properties of the ionotropic glutamate receptor channels in the rat sacral dorsal commissural neurons. *Neuropharmacology*, 1999, 38: 659~670
- 10 Xu T L, Dong X P, Wang D S. N-inethyl-D-aspartate enhancement of the glycine response in the rat sacral dorsal commissural neurons. *Eur J Neurosci*, 2000, 12: 1 647~1 653
- 11 Xu T L, Akaike N. Suppression of NMDA response in rat sacral dorsal commissural neurons by AMPA receptor activation: a study by the nystatin perforated patch technique. *Chin J Neuroanat*, 1996, 12: 349~360
- 12 Xu T L, Li J S, Jin Y H, et al. Modulation of the glycine response by Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in rat spinal neurons. *J Physiol*, 1999, 514: 701~711
- 13 徐天乐. 神经元钙信号的分子机制. 神经解剖学杂志, 1998, 14: 195~198
- 14 Wu L G, Westenbroek R E, Borst J G G, et al. Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci*, 1999, 19:726~736
- 15 Xu T L, Pang Z P, Li J S, et al. 5-HT potentiation of the GABA_A response in the rat sacral dorsal commissural neurones. *Br J Pharmacol*, 1998, 124: 779~787
- 16 Xu T L, Imanishi T, Akaike N. Modulation of the GABA_A response in rat ventromedial hypothalamic neurons by pregnanolone. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 117A: 219~226
- 17 Chen Q X, Wong R K S. Suppression of GABA_A receptor responses by NMDA application in hippocampal neurones acutely isolated from the adult guinea-pig. *J Physiol*, 1995, 482: 353~362
- 18 Obrietan K, van den Pol A N. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca^{2+} elevating to depressing. *J Neurosci*, 1995, 15: 5 065~5 077