

谷氨酸和 γ -氨基丁酸对爪蟾胚胎神经肌肉 接点乙酰胆碱自发释放的作用*

谢佐平 汤云贵 Ron Stoop** 毛 健 赵南明

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

吕广能 杨世若

何湘平 汪 海 刘传绩

(华西医科大学生理教研室, 成都 610044)

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘 要

在培养的爪蟾胚胎神经肌肉细胞的接点上, 探测到由于神经末梢自发释放乙酰胆碱(Ach)而在肌细胞上造成的微终板电流(MEPC)活动. 灌流 $10 \mu\text{mol/L}$ 谷氨酸后, 这种活动的频率和幅度都有明显的增加, 去除谷氨酸后, 这种效应仍能保持相当长时间, 我们将这一现象称为长时程易化作用. 与谷氨酸相反, $20 \mu\text{mol/L}$ 的 γ -氨基丁酸(GABA)对这一电活动的频率和幅度均有明显的抑制作用, 去除 GABA 后, 这一电活动反而比加药前更活跃, 呈现出一种后增强作用(post potentiation). 局部施加药物证明谷氨酸的作用部位在接头. 而 GABA 的作用部位在神经元胞体.

关键词 谷氨酸易化 MEPP、GABA 抑制 MEPP

1952 年, Fatt 和 Katz 在蛙运动终板处记录到微终板电位(MEPP), 并证明了这是由于神经末梢自发释放乙酰胆碱(Ach)造成的^[1]. 他们用量子释放学说解释了这种自发释放的性质, 但它的生理学意义和产生的机制至今还不清楚. 这种神经递质的自发释放现象在两栖类胚胎中也可观察到^[2-4]. 以前的工作表明当神经元突起没有接触到肌细胞前, 自发释放较少^[5], 我们曾证明当它与肌细胞接触后, 自发释放活动就变得很活跃^[3]. 自发释放的这种接触依赖性提示它不仅仅是一种随机的突触小泡与突触前膜物理碰撞和融合的过程, 而且是一种肌细胞诱导的生物学过程. 虽然关于自发释放的生理意义还不明确, 但它可能是细胞间的一种信号, 这种信号对运动神经元与肌细胞在胚胎期的发育成熟和在成体中的存活都是极其重要的^[3]. 尽管目前还无法揭示这种诱导作用的分子生物学机制, 但已发现许多因素能够影响自发释放活动. 系统地研究这些因素, 可能会对理解自发释放现象提供一些线索. 现发现一些神经递质如 5-羟色胺(5-HT)^[6] 和 γ -氨基丁酸(GABA)^[7] 能影响交感节前纤维 Ach 的释放,

1991-07-05 收稿, 1991-11-04 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目

** 现地址: College of pharmacy University of florida Gainesville, 32610, Florida, U.S.A.

Poo 等 1991 年在发育中的爪蟾胚胎神经肌肉接点上观察到与 Ach 共释放的 ATP 能增强 MEPP 的频率和幅度^[8], 然而神经递质对 MEPP, 特别是发育过程中 MEPP 的作用尚无人报道, 本文主要研究了两种重要的神经递质谷氨酸和 γ -氨基丁酸对爪蟾胚胎神经肌肉接点乙酰胆碱自发释放的作用。

一、材 料 与 方 法

1. 细胞培养方法^[9, 10]

采用人工注射性激素的方法获得非洲爪蟾的受精卵。待发育到 20—23 期时(受精后约 24 h), 剥除卵膜, 用吸管在无菌溶液中清洗 4 次, 将背部中段的神经管(脊髓)和相联的少量中胚层细胞解剖下来, 放在无 Ca^{++} 和 Mg^{++} 的生理溶液中, 剥除外皮, 放置 20—30 min 后细胞自然散开。将细胞接种到干净的盖玻片上, 此盖玻片放在塑料培养皿并浸没在 2 ml 培养液中。培养 20—30 h 后进行电生理学实验。培养基组成如下: Leibovitz Medium (L15) 30%: 胎牛血清 2%; 任氏液 68% (115 mmol/L NaCl, 2 mmol/L CaCl_2 , 2.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L Hepes), pH 7.2。

2. 记录 MEPP 的膜片钳技术^[11]

使用千兆密封技术, 尤其是其中的全细胞钳制技术进行细胞内记录。这与传统的胞内微电极相比较具有噪音小, 稳定度大等优点。但由于采用电压钳位, 所以记录到的电信号是终板电流而不是终板电位, 两者的生理意义并无区别。用细胞外灌流技术或使用充灌药物的微电极施加药物。

细胞电信号由单通道放大器(List Epc-7)记录, 显示于记忆示波器(Textronix 5113)进行监视, 并同步输入到磁带记录仪中存储(TEAC-XR 30-c), 实验结果由双道记录仪(Gould 2200)或 PC/AT 微计算机绘出。记录工作在上述培养基中进行。电极内液为: 82 mmol/L KCl, 35 mmol/L KOH, 1 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L MgCl_2 , 11 mmol/L EGTA, 5 mmol/L Hepes KOH 缓冲液, pH 7.2。

在培养皿中可以观察到多种形态的神经元, 直径一般 10 μm 左右, 有细长且多带分枝的突起, 胞体有圆形、椭圆形、圆锥形, 神经突有双极、多极和单极等等。此外还有许多肌肉细胞, 多呈梭形、椭圆形或圆形, 直径一般 30—50 μm , 经常还可以看到神经细胞的突起与肌肉细胞相接触, 有时甚至还可以观察到肌肉细胞在不停地收缩。将一根电阻 3—7 M Ω , 尖端烤光滑、清洁的电极用微操纵器小心地移向已被神经元突起或胞体接触的肌细胞, 在电极尖端与胞体接触的瞬间给予电极内一个很小的负压(通常是用嘴向连通管轻轻吸一下), 使电极尖端与细胞膜形成 10 G Ω 以上的密封。然后进行电压钳制由 0 到 -80 mV, 此时常常可以看到单通道活动。这就是膜片钳(patch clamp)技术中的所谓细胞贴附式膜片(on-cell patch)。此后给予电极一短促有力的负压吸破细胞, 成为全细胞钳制(whole cell clamp), 实验中通常钳位于 -70 mV 至 -80 mV(接近肌细胞实际静息电位值), 此时经常可以记录到由于神经元自发释放 Ach 而造成的微终板电流(MEPC)活动(若使用电流钳制则可记录到微终板电位)。不同的神经元或同一神经元的不同发育时期自发释放 Ach 的频率有所不同, 由数秒一次到每秒十数次不等。但在 1—2 h 的实验记录期间内, 频率会相当的稳定。图 1(a)显示了约 20 min 连续记录, 频率的波动是很小的, 前 10 min 与后 10 min 的活动频率在统计学上没有显著性差异($p > 0.05$, $n = 14$)。

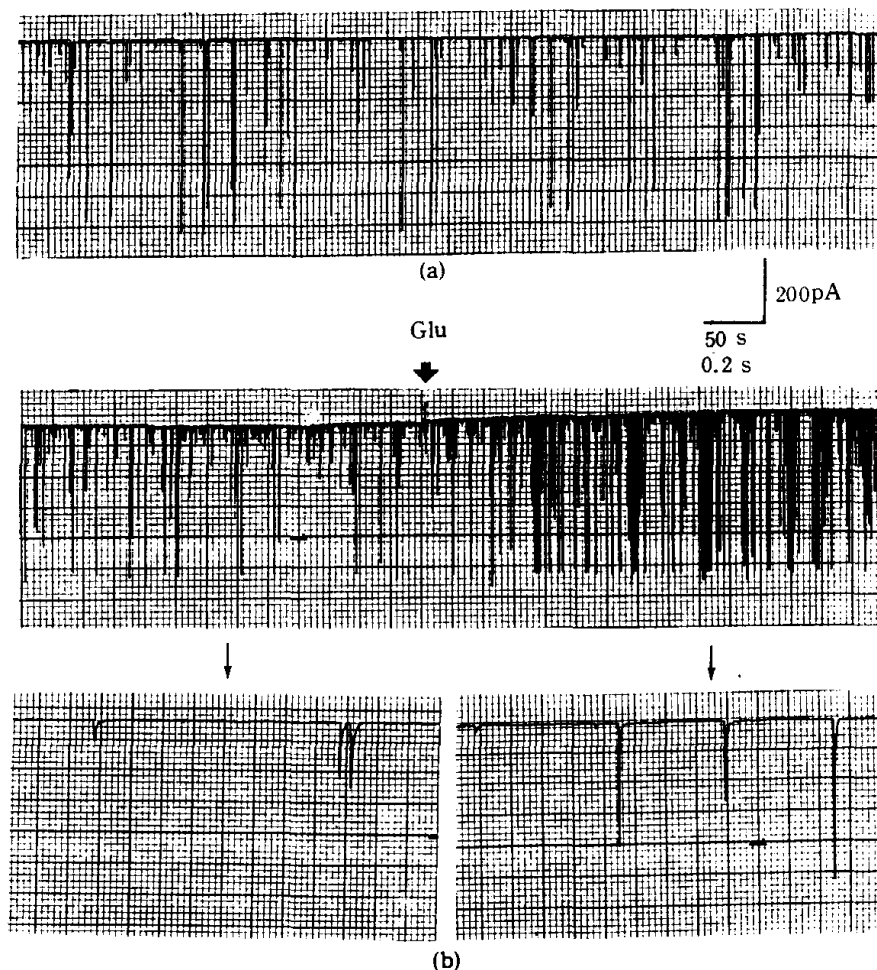


图1 谷氨酸对MEPC的易化作用

(a)对照: 爪蟾胚胎培养肌细胞的全细胞钳位记录, 钳位于 -80 mV 可观察到频率稳定的由于神经元自发释放 Ach 造成的MEPC 活动。

(b)箭头示开始灌流 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸的时间, MEPC 频率增加近一倍。下图为 MEPC 活动的波形

细胞培养和电生理记录均在室温 $20\text{—}23^{\circ}\text{C}$ 下进行。

二、结 果 与 讨 论

1. 谷氨酸对 MEPC 的易化作用

实验中, 在 MEPC 频率和振幅都相当稳定的情况下, 用含有 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸的任氏液进行灌流, 这时我们观察到: 在灌流开始后几秒钟, MEPC 的频率即有明显的增加(图 1(b)), 频率由原来的 0.33 Hz 增加到 0.58 Hz , 即约增加了 76% 。我们将谷氨酸的这种增频作用称为对神经元自发释放 Ach 的易化作用。

在另一批同类实验中($n=9$), 我们将灌流液谷氨酸的浓度提高到 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$, MEPC 的释放频率增加到 6 倍以上。30 s 后, 去除谷氨酸, 出现了 20 s 的安静期——MEPC 变得非常稀少。但是接着 MEPC 频率再次升高, 约为加谷氨酸前频率的 3 倍, 这种高频率的介质释放一直持续下去, 3—4 h 后仍然没有什么变化。我们将这种现象称为长时程易化作用。这很接近德培和李宗汉^[12]在研究依色林对终板电位的增强作用时所提出的后增强易化概念。

2. GABA 对 MEPC 的抑制作用

我们用同样的方法研究了 GABA 的作用. 在频率稳定的 MEPC 记录的基础上以含 50 $\mu\text{mol/L}$ GABA 的任氏液进行灌流, 这时 MEPC 的频率在几秒钟内急剧下降, 由 0.4 Hz 变为 0.16 Hz, 下降了 60%. 洗去 GABA 后, MEPC 的频率很快恢复, 并且明显地高于加药前, 为 0.8 Hz, 比对照频率增加了 1 倍(图 2), 这种抑制后增强的现象在我们先前的关于去除钙离子后重新用正常任氏液灌流的实验中也曾观察到^[13]. 其机制尚不明瞭.

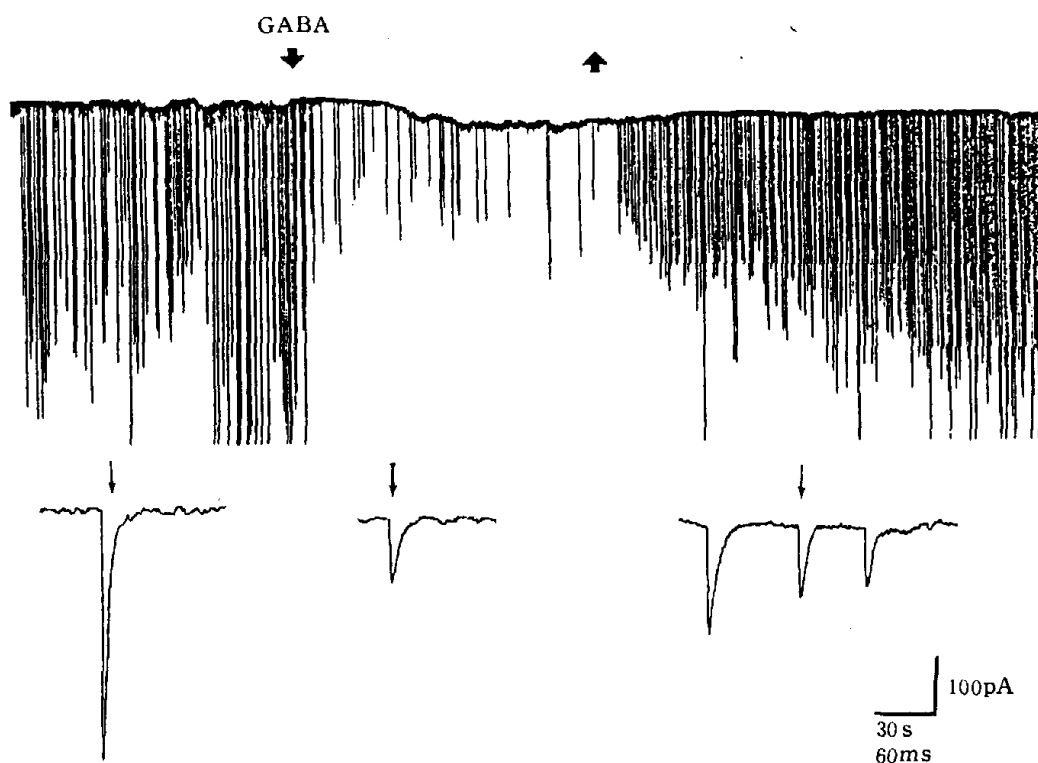


图 2 GABA 对 MEPC 的抑制作用

上图: 箭头分别指示加 GABA 和洗去 GABA 的时间,

下图: 上图中相应三部分 MEPC 的波形

应该指出的是, 并非所有神经元都对谷氨酸和 GABA 敏感, 根据我们的实验观察, 对两者敏感的神经元为椭圆形的双极神经元. 但是对 GABA 敏感的神经元两极较对称, 而对谷氨酸敏感的神经元一极分支繁复, 另一极很短. 形态大致如图 3 所示.

3. 谷氨酸和 GABA 影响 Ach 自发释放的机制

采用谷氨酸微电极局部加药的办法, 我们确定出对谷氨酸敏感的部位在神经肌肉接点处. 实验安排如图 3 所示, 开口 2 μm 并充灌有 0.2 mmol/L 谷氨酸的微电极对准神经元胞体时, 观察不到易化作用, 随后将它移近接点处, MEPC 的频率增高约 4 倍, 将谷氨酸电极移出水面后, 频率仍比对照高出 2 倍, 而且持续到实验结束(约 2 h). 我们推测, 谷氨酸的易化作用可能是突触前膜存在有谷氨酸受体造成的, 尤其是 NMDA(N-甲基-D-天门冬氨酸)型受体. 当这种受体与谷氨酸结合后, 造成钙离子内流, 从而引发了神经末梢一系列细胞内反应, 进一步的研究结果我们将在随后报道. Baxter 等 1985 年^[4]在喇蛄的肌接头处成功地诱导出长时程突触增强. 这与我们观察到的现象可能有相似的机制, 也由此可推测这种神经肌接点上的长时程易化机制在动物界是广泛存在的. 庞素珍等最近观察到谷氨酸对星形神经胶质细胞摄取

Na, K 等离子起刺激作用^[15], 亦提示谷氨酸的作用同离子跨膜移动相关联.

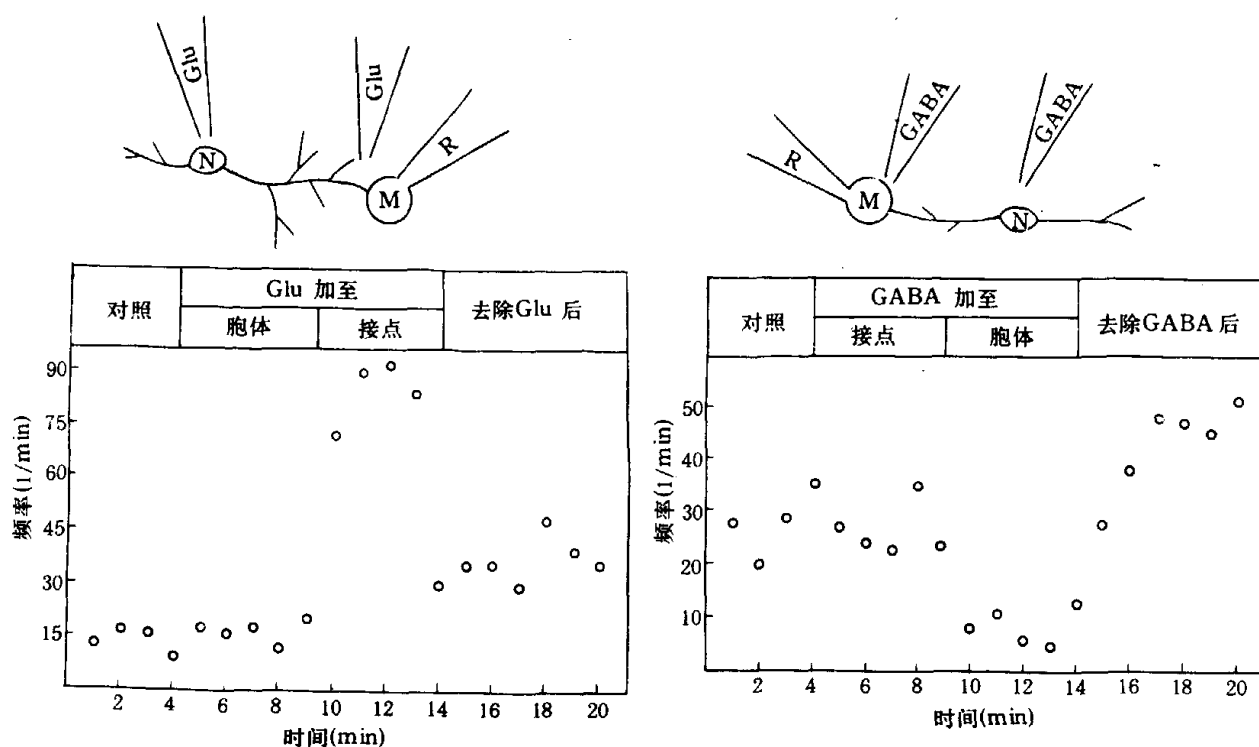


图3 谷氨酸和GABA作用部位的研究

上图为实验设计示意图, N——神经元, M——肌细胞, R——记录电极, Glu 和 GABA 分别为谷氨酸电极和 GABA 电极, 药物浓度 0.2 mmol/L, 电极开口 2—3 μm ;

下图为实验结果, 谷氨酸加于拉点部位时有作用(左图), 而 GABA 则加到神经元胞体时才有作用(右图)

用充灌 0.2 mmol/L GABA 的微电极局部加药确定了对 GABA 敏感的部位不是在接头处, 而是在神经元胞体(图3), 说明 GABA 的作用机制与谷氨酸不同. Bixby 和 Spitzer 等曾报道过 GABA 对 35% 的爪蟾胚胎脊髓神经元有超极化作用^[16]. 我们也有类似的实验结果: 50 μm 的 GABA 能使神经元超极化约 9 mV(图4). Katz 等人在 1954 年曾观察到: 当使运

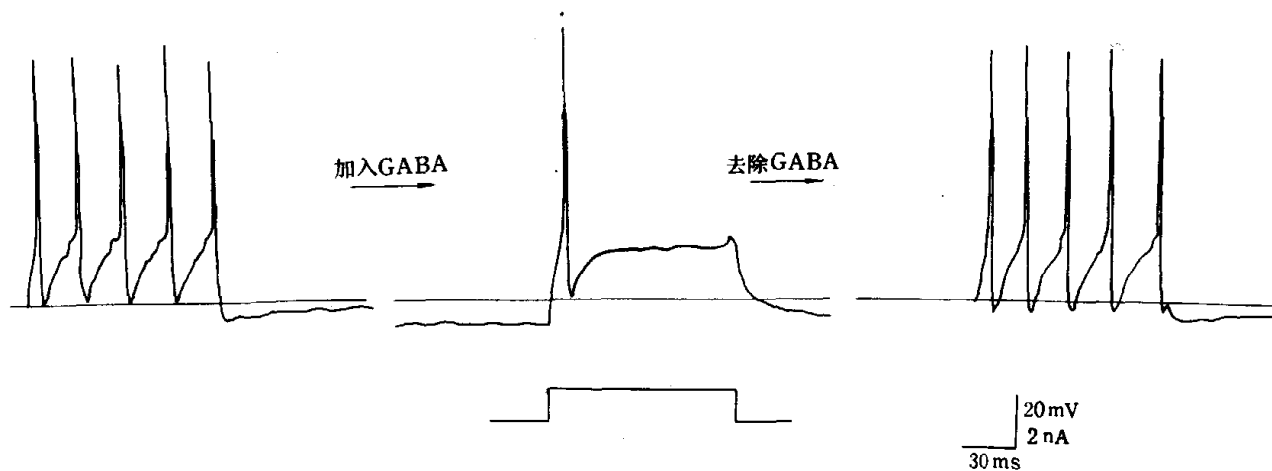


图4 GABA对神经元静息电位和动作电位的作用

神经元电流钳制记录, 静息电位加药前为 -59 mV , 加 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ GABA 后为 -68 mV , 洗去 GABA 后仍恢复为 -59 mV . 但动作电位的后电位比对照要负 4 mV(解释见正文). 3 次胞内刺激电流强度均为 2 nA, 持续时间 100 ms

动神经元末梢在一定程度上去极化时, MEPP 的频率有很大的增加. 这一结果使他得到了如下结论: 改变运动神经轴索末梢部位的膜电位, 可以很大范围地改变发放频率^[17]. 由这一理论很容易推论出轴突超极化时 MEPP 的频率应降低, 虽然至今尚未看到这方面的实验证据. GABA 的抑制作用可用上述理论加以解释, 并且还可以作为上述推论的一个例证, 但仍有一些不同的特点, 那就是后增强作用, 这反映了单纯物理去极化作用与化学神经介质引起的去极化作用不同, 后者可能触发了一系列细胞内反应. 仔细观察图 4 可以看出一些征兆, 尽管洗去 GABA 后静息电位完全恢复正常, 但给予胞内刺激后每个动作电位的后电位比对照要负 4 mV, 说明钾电导仍处于较活动的水平.

此外, 谷氨酸和 GABA 对 MEPC 的幅度也都有明显的作用, 概括起来说, 谷氨酸有增幅作用, 而 GABA 却使 MEPC 的幅度降低. 幅度的改变涉及到的机制颇为复杂, 我们将另文专题阐述.

致谢 美国哥伦比亚大学蒲慕明教授给予了多方面的帮助; 上海生理研究所冯德培、朱培阁教授提出了富有启示性的意见, 在此表示感谢.

参 考 文 献

- [1] Fatt, P. & Katz, B., *J. Physiol.*, **117**(1952), 109 — 128.
- [2] Blackshaw, S. E. & Warner, A. E., *J. Physiol.*, **255**(1976), 209 — 230.
- [3] Xie, Z. -p. & Poo, M. -m., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**(1986), 7069 — 7073.
- [4] Chow, E. & Poo, M. -m., *J. Neurosci.*, **5**(1985), 1076 — 1082.
- [5] Young, S. H. & Poo, M. -m., *Nature*, **305**(1983), 634 — 637.
- [6] Kato, E. & Kuba, K., *J. Physiol. (london)*, **298**(1980), 271 — 283.
- [7] Hirai, K. & Koketsu, K., *Br. J. Pharmacol.*, **70**(1980), 499 — 450.
- [8] Fu, W. -m., & Poo, M. -m., *Neuron*, **6**(1991), 1 — 20.
- [9] Spitzer N. C. & Lamborghini, J. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**(1976), 1641 — 1645.
- [10] 谢佐平、王 堤、竺煜杰, 中国科学B 辑, 1988, 11:1169 — 1173.
- [11] Hamil, O. et al., *Pflugers Archiv.*, **391**(1981), 85 — 100.
- [12] Feng, T. P. & Li, T. H., *Chin. J. Physiol.*, **16**(1949), 37 — 56.
- [13] Evers, J. et al., *J. Neurosci.*, **9**(1989), 1540 — 1554.
- [14] Baxter, D. A., Bittner, G. D. & Brown, T. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**(1985), 5978 — 5982.
- [15] 庞素珍, Kimelberg, H. K., 生物物理学报, **6**(1990), 349 — 355.
- [16] Bixby, J. L. & Spitzer, N. C., *J. Physiol.*, **353**(1984), 143 — 155.
- [17] Del Castillo, J. & Katz, B., *J. Physiol.*, **124**(1954), 586 — 604.