

皮质酮对大鼠海马神经元电压门控性钙通道及其突触活动的影响

郑建全*, 杨爱珍, 周建政, 刘传绩
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要:目的 研究皮质酮对海马神经元电压门控性钙通道和突触活动的影响,以阐明其作用机理。方法 以培养的新生大鼠海马神经元为标本,使用膜片钳技术的全细胞记录方式,通过压力注射给药的方法观察皮质酮对神经元电压门控性钙通道及其自发性突触活动的影响。结果 皮质酮 1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可使神经元电压门控性钙电流的幅度分别增加 $(14\pm 8)\%$ 、 $(41\pm 13)\%$ 和 $(58\pm 9)\%$,其增强效应具有明显的浓度依赖性特征,但没有电压依赖性,也不改变钙通道的电学特征。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 皮质酮可使海马神经元突触活动的发生频率增加约 4 倍。在使用河豚毒素阻断神经元的突触传递活动后,皮质酮仍然可以诱发低频 $(4.6\pm 1.0)\text{Hz}$ 低幅 $(0.18\pm 0.09)\text{nA}$ 的兴奋性突触后电流。结论 皮质酮对海马神经元电压门控性钙电流及其突触活动有明显的增强作用。皮质酮的即刻增强效应可能与其调节基因表达的作用无关。

关键词:皮质酮;海马;神经元;钙通道;突触;膜片钳技术;细胞,培养的

中图分类号: R964

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)03-0182-06

海马与学习记忆和情感行为等中枢神经系统的高级功能密切相关。海马具有高密度的肾上腺皮质激素受体,是糖皮质激素的主要靶组织之一^[1]。糖皮质激素在靶细胞质中与其可溶性受体结合,通过调节基因和诱导蛋白合成作用,影响细胞的生物功能以及电活动^[2~6]。皮质激素还可通过激活细胞膜上与G蛋白耦联的受体来影响电压门控性钙离子

通道^[7]。最近有实验报道,大鼠海马神经元高电位激活钙通道的电流幅度与血浆中皮质酮的水平密切相关^[8]。由于海马在学习记忆中的重要地位以及钙离子所具有的广泛的生物学效应,皮质激素对海马神经元钙通道的影响受到了极大的关注。许多实验室对此课题进行了系统的研究。但由于采用的实验动物和条件不同等原因,各实验室报道的皮质酮对海马神经元电压门控性钙通道的作用不尽一致^[3~5, 8~10]。作者曾观察到皮质酮对海马神经元电压依赖性钙通道的即刻增强效应^[10],本实验仍使用直接向细胞表面快速喷射给药的方法,进一步观察皮质酮对海马神经元兴奋性突触传递活动的即刻效应。

1 材料和方法

1.1 神经元的培养

选用当日生 Wistar 大鼠(本院动物中心提供),断头取出全脑后,在解剖显微镜下分离出海马,用剪刀将海马分成数小块。放入含有 0.2% 胰蛋白酶的磷酸盐缓冲液(PBS)中消化 30 min。用细口径吸管将海马碎片吹打散开。加入含 10% 马血清、10% 胎牛血清等营养成分的 DMEM 培养液。将含有分散细胞的 DMEM 液 2 mL 滴入预先涂被多聚赖氨酸的培养皿中,放入 5% CO_2 、36.5℃ 孵温箱中培养。以后每 3 d 半量换液一次。培养至 6 d 时加入阿糖胞苷 $(3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 以抑制胶质细胞的分裂生长。取培养 9~12 d 的细胞进行电生理实验。

1.2 电信号的记录

将培养皿内的培养液置换成预先配制好的细胞外液 [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: NaCl 140、KCl 5、 MgCl_2 1、HEPES 10、 CaCl_2 3、四乙铵(tetraethylammonium, TEA) 10、葡萄糖 10、河豚毒素(tetrodotoxin, TTX) 0.0005; pH 7.3~7.4],在相差显微镜(Olympus, IMT-2)下,将记录电极轻轻压向细胞表面,通过施加负压,使记录电极尖端与细胞膜之间形成高阻封接($> 3\text{ G}\Omega$),再给

收稿日期: 2001-11-16 接受日期: 2002-01-14

作者简介: 郑建全(1957-),男,安徽省全椒人,副研究员,医学博士,主要从事神经生物学及药理学研究。

* 联系作者 Tel: (010)66931624, Fax: (010)68211656, E-mail: jqzh@yahoo.com

一负压或短时电脉冲撕破细胞膜,即形成膜片钳的全细胞记录方式^[11]。膜片钳放大器 Axopatch 1-D (美国)所采集的信号,经低通贝塞尔滤波后储存在计算机硬盘上。 $-3B$ 频率为 $2 \sim 5$ kHz,使用的计算机采样、分析软件为美国 Axon 公司提供的 pClamp 7.0 程序。记录电极开口约 $1 \mu\text{m}$,电极电阻 $2 \sim 3$ M Ω 。记录电极内液成分为 (mmol \cdot L $^{-1}$): CsCl 140、HEPES 10、EGTA 10、ATP 2, pH 7.2。在记录神经元突触活动时,去除细胞外液中 TEA 和 TTX 成分。

1.3 给药方法和药物

使用由多根玻璃管拉制成的给药微玻管,每根管开口 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ 。实验前将用细胞外液配制的不同浓度的皮质酮,分别充灌于微玻管内。给药微玻管与 BH-2 压力注射仪(美国)相连,对记录细胞进行气压(N_2)喷射给药。给药微玻管距记录细胞的距离为 $20 \sim 30 \mu\text{m}$,压力为 $10 \sim 30$ kPa。为了减少给药微玻管尖端可能漏出的药物对细胞的影响,微玻管只有在给药时移至细胞旁,给完药后立即将微玻管移出液面。皮质酮和 TEA 从美国 Sigma 公司购买。TTX 从中国河北省水产研究所购买。

1.4 统计学处理和分析

使用 pCLAMP 7.0 软件,激活和记录电压门控性钙电流及突触活动。记录在微机硬盘上的数据文件转入统计和作图软件 (Origin 6.0) 进行分析、处理。统计资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用了自身对照 t 检验,双因素方差分析等统计学方法。使用法国 Pierre Vincent 教授惠赠的 Acspluof 软件,分析突触电流各项指标的改变。使用累积概率分布图绘出记录到的所有突触电流数据,即将单位时间内记录到的所有突触电流的活动间歇期由小到大排序,以各自序号 (i) 与最大序号 (n) 的比值 (i/n) 计算出累积频率,以突触电流的活动间歇期为 X 值,以累积频率为 Y 值作图。突触电流活动间歇期呈非正态分布^[12],本实验使用非参数 K-S 检验法 (Kolmogorov-Smirnov test) 检验给药前后突触电流活动间歇期的改变是否存在统计学意义。

2 结果

2.1 皮质酮对电压门控性钙电流的影响

在形成全细胞记录方式后,将膜电位钳制在 -70 mV,通过记录电极向胞内注射一系列增加步幅

为 10 mV,时程为 150 ms 的去极化刺激脉冲,以激活细胞膜上电压门控性离子通道。由于细胞外液中的 TTX 选择性地阻断了钠通道,外液中的 TEA 和电极内液中的 Cs^+ 选择性地阻断了钾通道,所记录到的内向电流为钙电流(图 1A),与文献报道的高电位激活电压门控性钙通道具有相似的电学特征^[8, 13]。但对钙通道的亚型未作进一步的鉴定。

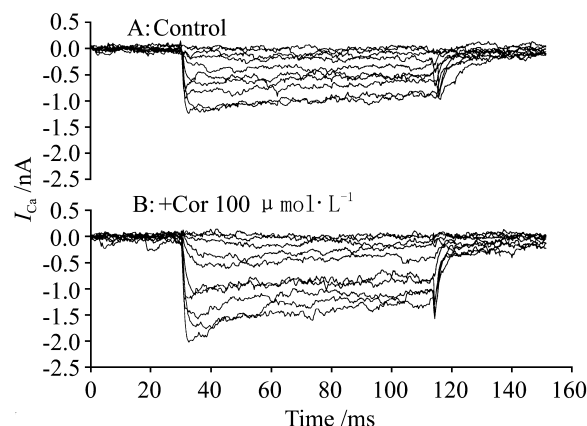


Fig 1. The potentiation of corticosterone (Cor) on the voltage-gated calcium channel. The inward currents were elicited by depolarizing the membrane potential from -70 mV to 20 mV at 10 mV increase. The currents in A and B were recorded from the same neuron.

结果显示,单纯向细胞喷射皮质酮 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,未能诱发出任何可见反应。在喷射皮质酮的同时,以去极化脉冲激活钙通道,可见钙电流幅度明显增加(图 1B)。向细胞喷射皮质酮 1 、 10 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的同时使细胞膜从 -70 mV 去极化到 10 mV 以激活钙通道,可见钙电流幅值由对照组的 $-(0.74 \pm 0.38) \text{nA}$ ($n = 6$) 分别增加到 $-(0.91 \pm 0.37) \text{nA}$, $-(1.11 \pm 0.73)$ 和 $-(1.20 \pm 0.25) \text{nA}$ 。不同浓度皮质酮升高钙电流的百分率分别为 $(14 \pm 8)\%$ 、 $(41 \pm 13)\%$ 和 $(58 \pm 9)\%$ 。皮质酮的加强效应可被洗脱,重复使用皮质酮可获得相同的效应(资料未显示)。双因素方差分析表明,随着膜电位由 -70 mV 升至 20 mV,钙电流的幅度随之明显增高 ($F = 22.52$, $P < 0.001$);不同浓度皮质酮对钙电流的增强效应有明显的浓度依赖性 ($F = 4.42$, $P < 0.01$);但膜电位的改变与皮质酮的增强效应之间没有明显的交互作用 ($F = 0.21$, $P = 0.99$),提示皮质酮对钙电流的增强效应没有明显的电压依赖性。

从图2可以观察到,皮质酮虽然使钙电流的幅

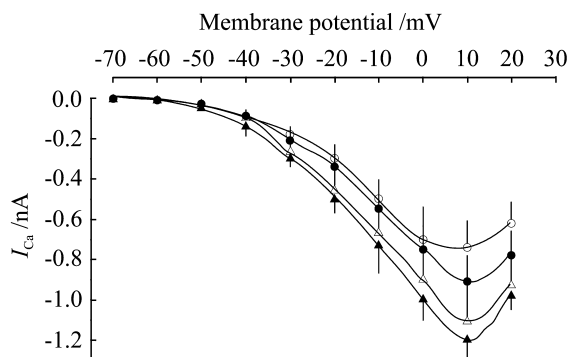


Fig 2. I - V relationship of voltage-gated calcium channel in the presence of different concentration of corticosterone. (\circ) control, (\bullet , \triangle , \blacktriangle) Cor 1, 10 and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Two-way analysis of variance revealed that the amplitudes of I_{Ca} increased with depolarized membrane potential ($F = 22.52, P < 0.001$). Cor facilitated I_{Ca} in a significant concentration-dependent manner ($F = 4.42, P < 0.01$). However, there was no interacted potentiation between the depolarized membrane potential and increased concentration of corticosterone ($F = 0.21, P = 0.99$). $\bar{x} \pm s, n = 6$.

度明显增加,但钙通道的激活阈电位水平和电流峰值所在的膜电压水平均未发生明显的改变,仍然分别保持在大约 -50 mV 和 10 mV 水平。

2.2 皮质酮对突触活动的影响

当细胞外液中去除 TTX 成分后,可以观察到海马神经元存在活跃的突触活动(图 3A)。本室以前的工作表明,这些兴奋性突触电流可被非 NMDA 亚型谷氨酸受体拮抗剂 6,7 二硝喹啉 2,3-二酮 (6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione) 所完全阻断^[12]。可见这些突触活动主要是由非 NMDA 亚型谷氨酸受体介导的自发兴奋性突触后电流。将装有 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 皮质酮的给药微玻管移到细胞附近,并持续向细胞喷射药物时,可使海马神经元自发突触活动的发生频率增加大约 4 倍(图 3 B),突触电流活动的间歇期由对照组的 (498 ± 144) ms ($n = 5$) 缩短至 (114 ± 40) ms ($P < 0.01$, K-S 检验,图 4),突触活动的发生频率则由 (3.4 ± 1.3) Hz 增加至 (12.9 ± 3.2) Hz ($P < 0.05, t$ 检验)。重复使用皮质酮可获得相同的作用。

2.3 皮质酮对存在河豚毒素时海马神经元突触活动的影响

在细胞外液中加入 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TTX 后,由于选择性地阻断了突触前神经元的钠离子通道,突

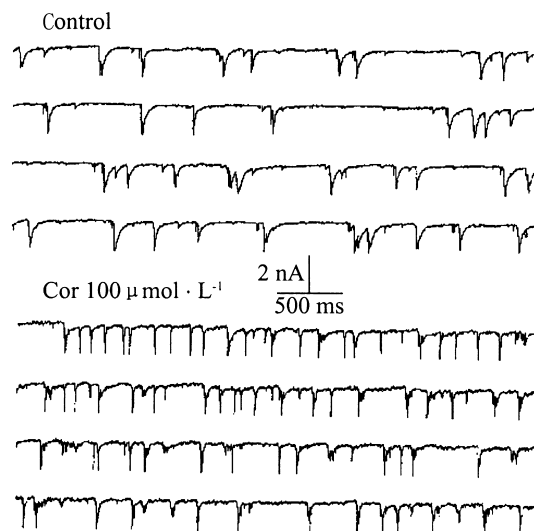


Fig 3. Effect of corticosterone on the spontaneous excitatory synaptic activities of hippocampal neurons. Cor $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ increased the frequency of spontaneous synaptic activities from (3.4 ± 1.3) Hz to (12.9 ± 3.2) Hz ($n = 5, P < 0.05$).

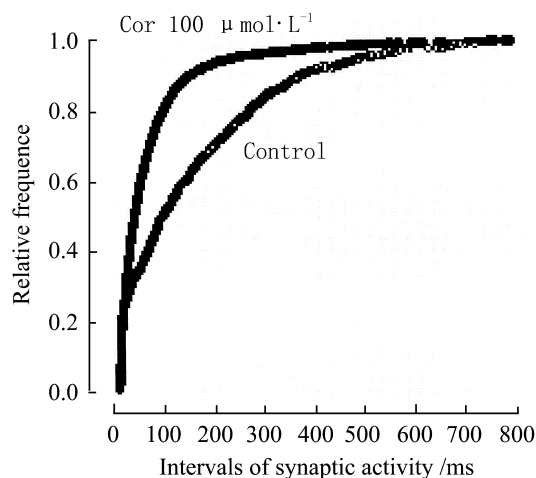


Fig 4. Effect of corticosterone on the interval of synaptic activity. In the presence of $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cor, the intervals of synaptic activity were shortened from (498 ± 144) ms to (114 ± 40) ms ($n = 5, P < 0.01$).

触前膜电压门控性钙离子通道无法被激活,神经递质释放被阻断,海马神经元的突触活动基本终止(图 5A)。但在施加皮质酮 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,仍可诱发低幅 (0.18 ± 0.09) nA 兴奋性突触后电流(图 5B),频率为 (4.6 ± 1.0) Hz。

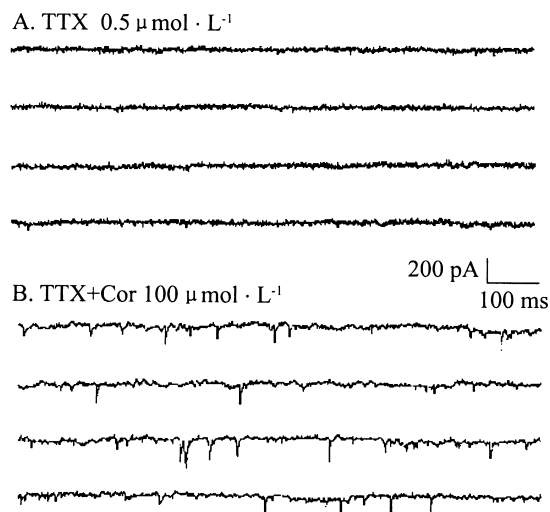


Fig 5. Effect of corticosterone on the synaptic activities of hippocampal neurons in the presence of tetrodotoxin (TTX). The spontaneous excitatory postsynaptic activities were blocked in the presence of TTX $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (A). When Cor $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ was administrated with TTX, small excitatory postsynaptic currents with low frequency (4.6 ± 1.0) Hz, and low amplitude [$(0.18 \pm 0.09) \text{nA}$] were elicited (B). $n = 4$.

3 讨论

本实验使用膜片钳全细胞记录技术,在培养的新生大鼠海马神经元上观察到,皮质酮可即刻增加电压门控性钙电流的幅度。与作者以前报道的结果^[10]相比,除了观察到皮质酮对钙通道的增强效应具有明显的浓度依赖性,且不改变钙通道的某些电学特征(如激活阈电位和最大电流所在的膜电位水平均未发生明显改变)外,进一步发现皮质酮可迅速增强海马神经元的兴奋性突触传递活动,在钠通道阻断剂 TTX 存在的情况下仍然有效。

皮质酮可与胞浆内皮质激素受体结合,通过基因调节作用,来加强或抑制电压门控性钙电流。如长时间使用高浓度的皮质酮,可促进海马神经元内电压门控性钙通道亚基(L型和P型钙通道)mRNA的高表达^[6]。糖皮质激素受体选择性激动剂RU28362可增加电压门控性钙电流的幅度,其效应可被蛋白合成抑制剂所阻断^[14]。但也有相反的报道,如在摘除肾上腺的大鼠,即体内皮质酮含量极低的情况下,海马脑片细胞电压门控性钙电流的幅度却明显增加^[4,5,9]。更有趣的是,大鼠海马高电位激活钙通道电流的幅度受体内皮质酮水平昼夜节律变

化的影响。白天,体内皮质酮水平逐渐升高时,钙电流的幅度较低;而在傍晚皮质酮水平达到最高和凌晨皮质酮水平降到最低点时,钙电流的幅度却明显升高^[8]。另有报道,在预先使用百日咳杆菌毒素处理动物 48 h 后,皮质酮对钙电流的抑制效应明显减弱。细胞内透析蛋白激酶 C 抑制剂或抑制 G 蛋白激活的 GDP-β-S 均可阻断皮质酮对钙电流的抑制效应^[7]。提示皮质酮通过激活 G 蛋白耦联的蛋白激酶 C 抑制电压门控性钙通道。

对海马神经元突触传递活动,皮质酮表现出兴奋与抑制双向调节效应。在低水平皮质酮存在时,主要是盐皮质激素受体被激活,海马突触传递活动表现为加强,高水平时,盐皮质激素受体和糖皮质激素受体同时被激活,对突触活动的综合效应表现为抑制^[3,15]。

纵上所述,皮质激素对海马神经元电压门控性钙通道和突触传递活动的调节,涉及到不同的信号转导途径和受体系统,如基因调控和蛋白质合成,G 蛋白耦联受体、糖、盐皮质激素受体等,这可能是皮质激素对电压门控性钙通道和神经元突触活动调节作用表现出复杂性和多样性的重要原因。

许多实验表明,皮质激素对基因表达的调节作用通常在给药 1 h 后方可观察到^[6,8,16]。而本实验采取了快速给药和立即观察药效的方法,所记录的是皮质酮对海马神经元电压门控性钙电流和突触传递活动的即刻效应,提示皮质酮可能通过不同于以上的作用机理来影响电压门控性钙通道。首先,从皮质酮作用发生的时间-效应关系上,可以排除基因调节机理的参与。另外,皮质酮通过某种途径激活 G 蛋白来抑制钙通道^[7],这和本实验结果相反,因而推测本实验观察到的皮质酮增强钙通道电流的作用可能不涉及 G 蛋白信号转导系统。

在使用 TTX 阻断了海马神经元突触传递活动后,皮质酮仍然可以诱发突触电流的产生,提示皮质酮不但具有直接加强电压门控性钙电流的作用,还可以通过某种其他非基因调节机理,增加细胞膜的钙电导或促进胞内 Ca^{2+} 释放,从而促进递质的释放和突触活动的产生,其可能的作用机理尚需进一步的研究探讨。

钙离子与神经递质的释放、突触效能的改善、心血管功能的增强密切相关。在处于应激状态时,机体将分泌大量的糖皮质激素。本实验所观察到的皮质酮对海马神经元电压门控性钙通道和突触活动的

快速兴奋性效应,可能有利于机体在应激状态下,迅速调节神经系统及其他器官的功能,以适应体内外环境所产生的强烈刺激。

4 参考文献:

- [1] Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: micro-distribution and differential occupation[J]. *Endocrinology*, 1985, **117**(6):2505 – 2512.
- [2] Dwivedi Y, Rizavi HS, Rao JS, Pandey GN. Modifications in the phosphoinositide signaling pathway by adrenal glucocorticoids in rat brain: focus on phosphoinositide-specific phospholipase C and inositol 1, 4, 5-trisphosphate[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, **295**(1):244 – 254.
- [3] Joels M, de Kloet ER. Corticosteroid actions on amino acid-mediated transmission in rat CA1 hippocampal cells[J]. *J Neurosci*, 1993, **13**(9):4082 – 4090.
- [4] Karst H, Wadman WJ, Joels M. Corticosteroid receptor-dependent modulation of calcium currents in rat hippocampal CA1 neurons[J]. *Brain Res*, 1994, **649**(1 – 2):234 – 242.
- [5] Werkman TR, Van der Linden S, Joels M. Corticosteroid effects on sodium and calcium currents in acutely dissociated rat CA1 hippocampal neurons[J]. *Neuroscience*, 1997, **78**(3):663 – 672.
- [6] Nair SM, Werkman TR, Craig J, Finnell R, Joels M, Eberwine JH. Corticosteroid regulation of ion channel conductances and mRNA levels in individual hippocampal CA1 neurons[J]. *J Neurosci*, 1998, **18**(7):2685 – 2696.
- [7] French-Mullen JM. Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C[J]. *J Neurosci*, 1995, **15**(1 Pt 2):903 – 911.
- [8] Kole MH, Koolhaas JM, Luiten PG, Fuchs E. High-voltage-activated Ca^{2+} currents and the excitability of pyramidal neurons in the hippocampal CA3 subfield in rats depend on corticosterone and time of day[J]. *Neurosci Lett*, 2001, **307**(1):53 – 56.
- [9] Landfield PW, Campbell LW, Hao SY, Kerr SD. Aging-related increases in voltage-sensitive, inactivating calcium currents in rat hippocampus[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1989, **568**:95 – 105.
- [10] Zhou JZ, Zheng JQ, Zhang YX, Zhou JH. Corticosterone impairs cultured hippocampal neurons and facilitates Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channel. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, **21**(2):156 – 160.
- [11] Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patchclamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches[J]. *Pflugers Arch*, 1981, **391**(2):85 – 100.
- [12] Liu QS, He XP, Liu CG. Opposite actions of ACh on excitatory and inhibitory synaptic transmission in cultured rat cortical neurons[J]. *Chin J Physiol Sci*, 1997, **13**(1):57 – 63.
- [13] Thompson SM, Wong RKS. Development of calcium current subtypes in isolated rat hippocampal pyramidal cells[J]. *J Physiol*, 1991, **439**:671 – 689.
- [14] Kerr DS, Campbell LW, Thibault O, Landfield PW. Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca^{2+} conductances: relevance to brain aging[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(18):8527 – 8531.
- [15] Kerr DS, Campbell LW, Hao SY, Landfield PW. Corticosterone modulation of hippocampal potentials: increased effect with aging[J]. *Science*, 1989, **245**(4925):1505 – 1509.
- [16] De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease[J]. *Endocr Rev*, 1998, **19**(3):269 – 301.

Effects of corticosterone on voltage-gated calcium channel and spontaneous synaptic activities in cultured hippocampal neurons from neonatal rat

ZHENG Jian-Quan, YANG Ai-Zhen, ZHOU Jian-Zheng, LIU Chuan-Gui

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: AIM Investigating the effects of corticosterone on the voltage-gated calcium channel

and synaptic transmission in the cultured hippocampal neurons to clarify the reasonable mech-

anisms. **METHODS** The cultured hippocampal neurons from neonatal rats were served as preparation. The effect of corticosterone on the voltage-gated calcium channel and synaptic activity was observed by using whole-cell recording technique just after corticosterone was administrated by a pressure ejector. **RESULTS** The amplitudes of voltage-gated calcium currents were increased $(14 \pm 8)\%$, $(41 \pm 13)\%$ and $(58 \pm 9)\%$, when 1, 10 and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of corticosterone was applied, respectively. The potentiation was concentration-dependent, but voltage-independent. The characteristics of calcium channel were not influenced. Corticosterone ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) increased the frequency of spontaneous synaptic activity to

about 4-fold of the control. Excitatory synaptic currents with low frequency $[(4.6 \pm 1.0)\text{Hz}]$ and small amplitude $[(0.18 \pm 0.09)\text{nA}]$ could be still elicited by corticosterone in the presence of tetrodotoxin. **CONCLUSION** Corticosterone facilitated the voltage-gated calcium current and the synaptic transmission in the cultured hippocampal neurons. The immediate potentiation excluded the possibility that the gene modulation of corticosterone was involved.

Key words: corticosterone; hippocampus; neurons; calcium channels; synapse; patch clamp technique; cells, cultured

(本文编辑 董立春)

2002 年中日毒理学和药理学联合研讨会 (CJJCTP)

China-Japan Joint-Congress on Toxicology and Pharmacology

2002 年 12 月 2 ~ 4 日 深圳

December 2 - 4, 2002, Shenzhen, China

报名请寄往会议秘书处: 邮编 100850 北京太平路 27 号

北京放射医学研究所 中国毒理学会办公室: 周平坤教授

Please contact:

Prof. Pingkun ZHOU Secretariat, CJJCTP 2002

Beijing Institute of Radiation Medicine

27 Taiping Road, Beijing 100850 China

Fax: (8610)68183899 E-mail: Chntox@nic.bmi.ac.cn