

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.27.005

CNQX 在小鼠脑不同类型突触分泌中的作用 *

余 意 梅 颖 荣 伊 林显光 阳小飞[△]

(中南民族大学生物医学工程学院, 脑认知国家民委重点实验室, 医学信息分析及肿瘤诊疗湖北省重点实验室, 膜离子通道与药物研发实验室 湖北 武汉 430074)

摘要 目的:探讨 6- 氨基 -7- 硝基喹啉 -2,3- 二酮(CNQX)在小鼠脑不同类型突触分泌中的作用。**方法:**体外培养新生小鼠大脑皮层神经细胞与海马神经细胞, 在加有不同浓度的 CNQX 的细胞外液中对细胞进行电生理记录, 分别记录 mEPSC 的频率和 eEPSC 的幅值。**结果:**CNQX 作用于诱发性神经递质释放的半抑制浓度(IC₅₀)显著大于自发性神经递质释放的半抑制浓度, CNQX 对自发性神经递质的释放作用效果更加明显。但对于不同脑区, CNQX 的作用效果差异并不明显。**结论:**CNQX 在阻断兴奋性神经递质自发释放和诱发释放时可能有不同的机制, 但是并不具有脑区特异性。

关键词:6- 氨基 -7- 硝基喹啉 -2,3- 二酮; 大脑皮层细胞; 海马细胞; 神经递质释放

中图分类号:R-33; R338 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)27-5219-04

The Role of CNQX in the Different Types of Synaptic Release in Mice*

YU Yi, MEI Ying, RONG Yi, LIN Xian-guang, YANG Xiao-fei[△]

(Key Laboratory of Cognitive Science, Key laboratory of Medical information analysis and tumor diagnosis and treatment, Laboratory of Membrane Ion Channels and Medicine, College of Biomedical Engineering, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei, 430074, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role of 6-CYANO-2,3-DIHYDROXY-7-NITROQUIN OXALINE (CNQX) in different types of synapse secretion. **Methods:** The spontaneous mEPSCs and eEPSCs at different extracellular concentrations of CNQX in cultured cortical or hippocampal neurons were recorded respectively. **Results:** The half inhibitory concentration (IC₅₀) of CNQX in evoked neurotransmitter release was significantly higher than that of spontaneous release, indicating that the spontaneous neurotransmitter release was more sensitive to CNQX. No apparent difference was observed between cortical and hippocampal cells, suggesting that the blocking effect of CNQX was similar in different brain regions. **Conclusion:** CNQX might have differential regulating mechanisms between excitatory spontaneous and evoked neurotransmitter release, but without brain regions specificity.

Key words: CNQX; Cortex; Hippocampus; Neurotransmitter release

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R338 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)27-5219-04

前言

神经细胞之间通过释放神经递质进行信号传导与输出, 神经细胞自发释放神经递质的现象是很常见的。微小抑制性突触后电流(mIPSC)与微小兴奋性突触后电流(mEPSC)是由神经细胞自发释放的单个囊泡内的递质与相应的受体结合时产生的^[1,2]。诱发释放神经递质是在细胞去极化刺激条件下由大量囊泡释放的。我们通过给神经细胞一个电刺激, 诱发神经细胞释放神经递质, 产生兴奋性突触后电流(eEPSC)或者抑制性突触后电流(iEPSC)。有研究表明神经递质的自发和诱发释放产生的作用机制不同, 它们分别由不同的信号传导通路来完成^[3,4], 但是目前尚无定论。本研究中, 我们主要探讨了兴奋性神经递质的自发释放与诱发释放之间是否存在差异。

CNQX 是 AMPA 受体拮抗剂, 为探究 CNQX 在阻碍神经

递质的自发与诱发释放中是否有差异以及 CNQXd 的作用是否有脑区特异性, 我们分别用不同浓度的 CNQX 作用于小鼠大脑皮层细胞与海马细胞, 然后再分别记录不同浓度 CNQX 下上述细胞产生的 mEPSC 与 eEPSC。实验结果显示 CNQX 阻断诱发性神经递质释放的半抑制浓度(IC₅₀)高于阻断自发性神经递质释放的半抑制浓度, 即自发性神经递质释放对阻断剂更为敏感。

1 材料与方法

1.1 材料

B-27、运铁蛋白(Transferrin)、MEM、牛血清(FBS)、胰蛋白酶在 Gibco 公司购买; 葡萄糖(Glucose)、HEPES、盐酸阿糖胞嘧啶(Ara-C)、多聚-L- 赖氨酸、胰岛素(Insulin)、EGTA、NaCl、CaCl₂、MgCl₂、CsCl、KCl、NaHCO₃、Na₂GTP、Na₂ATP、Hanks 在 Sig-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31300892); 湖北省自然科学基金项目(2014CFA027, 2014CFB455)

作者简介: 余意(1993-), 硕士, 主要研究方向: 神经信号转导, E-mail: alisa_yy1@163.com

[△] 通讯作者: 阳小飞, 教授, 博士, 电话: 027-67841231, E-mail: sunlittlefly@hotmail.com

(收稿日期: 2017-01-30 接受日期: 2017-02-26)

ma 公司购买;PTX、CNQX、QX-314 在 Tocris 公司购买;TTX 在上海玉博生物科技有限公司购买。

1.2 仪器

荧光倒置显微镜、膜片钳系统、细胞培养箱、电极拉制仪分别购于奥林巴斯、HEKA、赛默飞世尔科技、普升科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实验溶液配制 配制神经元培养基、神经元 plating 培养基、神经元无 Ara-C 生长培养基、神经元含 4 μM Ara-C 生长培养基、电生理记录外液、电生理记录内液、神经元解剖液^[21]。

1.3.2 小鼠大脑皮层细胞与海马细胞的培养 分离新生野生型小鼠大脑皮层与海马细胞,用 0.25% Trypsin-EDTA 消化酶消化 12 min,消化完成后用培养基终止消化,然后将大脑皮层细胞与海马细胞吹打下来,加入镀有多聚赖氨酸的玻片上进行培养,分别在培养第 1、4、9 天进行换液,第 1 天换神经元无 Ara-C 生长培养基,第 4、9 天换神经元含 4 μM Ara-C 生长培养基,在细胞培养第 13-14 天进行电生理记录。

1.3.3 电生理记录 在大脑皮层神经细胞与海马神经细胞培养的第 13-14 天可以对细胞进行电生理记录。我们采用全细胞电压钳记录模式,给 -70 mV 的钳制电压^[5-7],外液中加入 100 μM PTX 来阻断 GABA- 受体,50 μM NMDA 受体阻断剂 APV 阻断 NMDA 电流,在记录 eEPSC 时,内液中加入 5 mM QX-314 阻断钠离子通道,然后再分别记录加入 0 μM 、0.2 μM 、1 μM 、2 μM 、4 μM 、10 μM 、20 μM CNQX 后的 eEPSC。记录 mEPSC 时为抑制动作电位,加入 1 μM TTX 阻断钠离子通道,再分别在外液含有 0 μM 、0.2 μM 、1 μM 、2 μM 、4 μM 、10 μM 、20 μM CNQX 的环境中记录 mEPSC。

1.4 统计学分析

分别用 Pclamp 10、Igor Pro Folder、GraphPad Prism 对记录到的数据进行分析与统计,得到半抑制浓度(IC₅₀)并进行 t 检验,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CNQX 对神经细胞兴奋性神经递质释放的阻断作用

为了检验在小鼠大脑神经细胞中 CNQX 的工作浓度,我们先培养小鼠脑皮层神经细胞,在细胞培养第 13-14 天,对细胞进行电生理记录。当外液中加入 PTX、APV,10 μM 的 CNQX 环境下,内液中加入 QX-314,eEPSC 基本被完全阻断,结果如图 1A,B 所示。与此类似,在含有 PTX、APV 和 TTX 的外液中分别加入 0 μM 与 10 μM CNQX 后记录细胞的 mEPSC 的频率,结果如图 1C,D 所示,在含有 10 μM CNQX 时基本记录不到 mEPSC。这些结果表明 10 μM 的 CNQX 浓度下,细胞的兴奋性神经递质释放基本被阻断。

2.2 不同浓度 CNQX 对大脑皮层神经细胞不同类型分泌的影响

CNQX 作为 AMPA 受体拮抗剂,一定浓度的 CNQX 能够有效的阻断 AMPA 电流。但是对于大脑皮层神经细胞不同类型的分泌,CNQX 的作用效果目前还不清楚。

在大脑皮层神经细胞培养的第 14 天,记录其细胞突触后电流,进行了三次独立重复实验。在外液中加入 PTX、APV,细胞内液中加入 QX-314 时,然后分别再加入 0 μM 、0.2 μM 、1

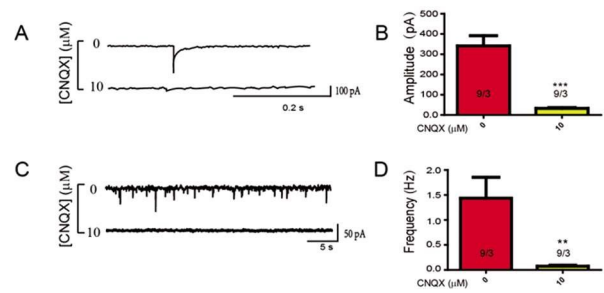


图 1 CNQX 阻断兴奋性神经递质释放

Fig.1 CNQX blocks the excitatory neurotransmitter release Representative examples (A) and summary graphs (B) of eEPSC recorded in cortical neurons with 0 μM or 10 μM CNQX, respectively; Representative examples (C) and summary graphs (D) of mEPSC recorded in cortical neurons with 0 μM or 10 μM CNQX, respectively. Data are means $\pm$ SEM; numbers of cells/independent cultures analyzed are listed in the bars. Statistical assessments were performed by Student's t-test comparing each condition to control (**, P<0.01; ***, P<0.001).

μM 、2 μM 、4 μM 、10 μM 、20 μM CNQX,分别记录在不同 CNQX 浓度下,细胞 eEPSC 的幅值。实验结果显示,随着 CNQX 的浓度增加,eEPSC 的幅值逐渐减小。图 2A 为不同 CNQX 浓度下记录到的 eEPSC 的代表曲线,B 将各浓度幅值通过希尔方程拟合得的曲线。与此类似,在细胞外液中加入 PTX、APV 和 TTX 后,分别在外液中再加入 0 μM 、0.2 μM 、1 μM 、2 μM 、4 μM 、10 μM 、20 μM CNQX,记录上述 CNQX 浓度下细胞的 mEPSC 的频率,实验结果显示,随着 CNQX 浓度的增加,细胞的 mEPSC 的频率逐渐降低。图 2C,D 分别为不同浓度下记录到的 mEPSC 的代表曲线和对频率拟合得到的曲线图。统计上述各组实验拟合结果,获得 IC₅₀。

IC₅₀ 是指待测拮抗剂的半抑制浓度,能够表示一种抑制剂抑制某种生物活动一半时所需的量,可以很好地衡量药物的作用效果。我们将获得的 eEPSC 组和 mEPSC 组的 IC₅₀ 进行统计并对其进行 T 检验,统计结果如图 2E 显示,eEPSC 组的半抑制浓度明显高于 mEPSC 组,说明 CNQX 对抑制自发神经信号的释放效果更为明显。每批次实验的 IC₅₀ 均值结果如图 2F 所示,三批实验结果趋势一致。另外,10 μM 的 CNQX 能阻断很大部分的 AMPA 电流,但是还是会有残留,但是在 20 μM 的 CNQX 环境中,CNQX 基本阻断全部的 AMPA 电流,所以对阻断 AMPA 电流,20 μM 浓度的 CNQX 更加可靠。

2.3 不同浓度 CNQX 对海马神经细胞不同类型分泌的影响

为探讨 CNQX 对抑制神经递质的释放是否有脑区特异性,我们培养了小鼠海马神经细胞重复进行了上述实验。

我们在小鼠海马神经细胞培养第 14 天,对它进行全细胞电生理记录,记录条件与上述实验相同,分别记录海马神经细胞 eEPSC 的幅值和 mEPSC 的频率,三次独立重复实验结果都显示,海马神经细胞的 eEPSC 的幅值会随着 CNQX 浓度的增加而逐渐减小,mEPSC 的频率也逐渐降低。我们将获得的 eEPSC 组与 mEPSC 组的 IC₅₀ 进行统计,统计结果与上述实验结果类似,eEPSC 组的半抑制浓度也明显高于 mEPSC 组,说明在海马神经细胞中,CNQX 对两种不同神经递质释放的作用机制影响效果也是不同的。

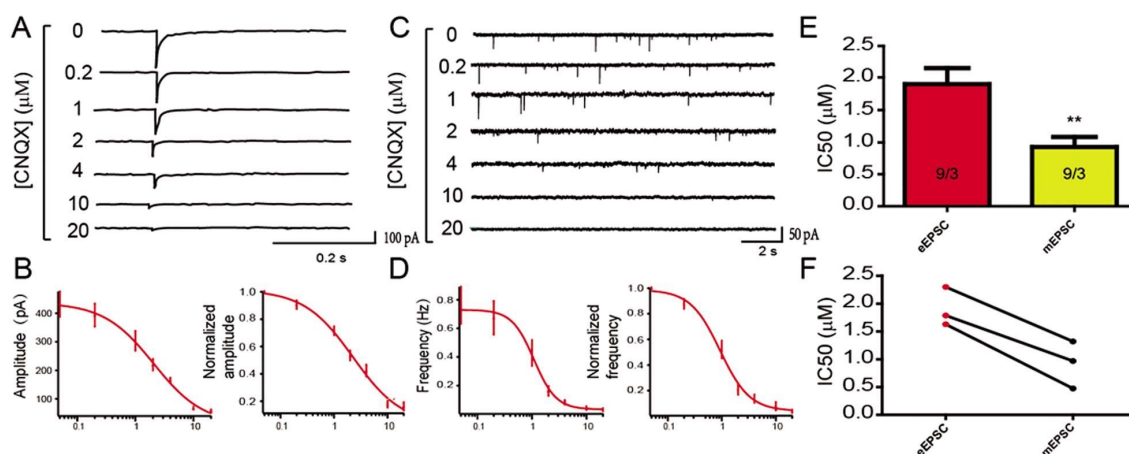


图2 不同浓度 CNQX 阻断大脑皮层神经细胞自发和诱发分泌的效率

Fig.2 The efficiency of different concentrations of CNQX block spontaneous and evoked neurotransmitter release in cortical neurons

A: Representative examples of eEPSC recorded in cortical neurons at 0 μM , 0.2 μM , 1 μM , 2 μM , 4 μM , 10 μM , 20 μM , respectively; B: Absolute (left) or normalized values (right) of eEPSC were summarized as described in panel A; C: Representative examples of mEPSC recorded in cortical neurons at 0 μM , 0.2 μM , 1 μM , 2 μM , 4 μM , 10 μM , 20 μM , respectively; D: Absolute (left) or normalized values (right) of mEPSC were summarized as described in panel C; E: Summary of IC₅₀ of eEPSCs and mEPSCs recorded from cortical neurons described in panel A and C, respectively; F: Mean value of each independent batch of cortical neurons described in panel A and C, respectively; Data are means $\pm$ SEM; numbers of cells/independent cultures analyzed are listed in the bars. Statistical assessments were performed by Student's t-test comparing each condition to control (**, $P < 0.01$).

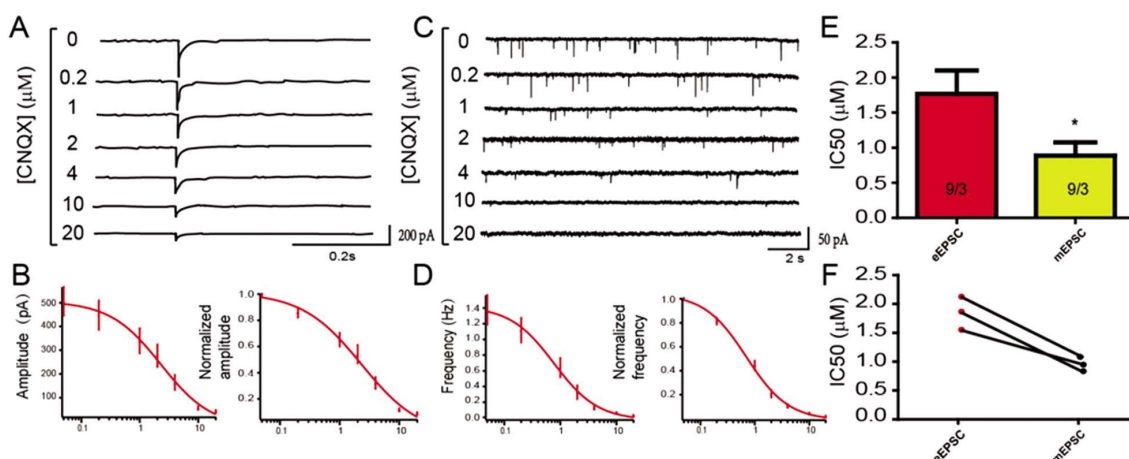


图3 不同浓度 CNQX 阻断海马神经细胞自发和诱发分泌的效率

Fig.3 The efficiency of different concentrations of CNQX block spontaneous and evoked neurotransmitter release in hippocampal neurons

A: Representative examples of eEPSC recorded in hippocampal neurons at 0 μM , 0.2 μM , 1 μM , 2 μM , 4 μM , 10 μM , 20 μM , respectively; B: Absolute (left) or normalized values (right) of eEPSC were summarized as described in panel A; C: Representative examples of mEPSC recorded in hippocampal neurons at 0 μM , 0.2 μM , 1 μM , 2 μM , 4 μM , 10 μM , 20 μM , respectively; D: Absolute (left) or normalized values (right) of mEPSC were summarized as described in panel C; E: Summary of IC₅₀ of eEPSCs and mEPSCs recorded from hippocampal neurons described in panel A and C, respectively; F: Mean value of each independent batch of hippocampal neurons described in panel A and C, respectively; Data are means $\pm$ SEM; numbers of cells/independent cultures analyzed are listed in the bars. Statistical assessments were performed by Student's t-test comparing each condition to control (*, $P < 0.05$).

将皮层细胞与海马细胞的 eEPSC 组和 mEPSC 组的实验结果统计求均值,然后再计算其 IC₅₀,结果如表 1 所示,皮层细胞的 eEPSC 组和 mEPSC 组和海马细胞的 eEPSC 组和 mEPSC 组相比,其 IC₅₀ 的差异并不明显。所以,我们认为 CNQX 对不同脑区的神经细胞作用效果是类似的,CNQX 对不同突触分泌的作用具有普遍性。

3 讨论

在神经细胞分泌神经递质这一过程中,钙离子起到了重要作用,钙离子浓度的升高会促使神经递质的释放,突触后电流

的产生就是由于释放的神经递质与相应受体结合后产生的^[8,9]。神经递质的分泌又可以分为自发释放与诱发释放,主要区别是看神经递质的释放是否需要动作电位的触发,诱发释放需要动

表 1 大脑皮层神经细胞和海马神经细胞 eEPSC 组和 mEPSC 组 IC₅₀ 的比较

	eEPSC(μM)	mEPSC(μM)
Cortex	1.90716 $\pm$ 0.31533	0.94548 $\pm$ 0.12256
Hippocampus	1.76678 $\pm$ 0.51233	0.88759 $\pm$ 0.10534

作电位的触发,而自发释放不需要^[10-12]。

很多文献记载,神经递质的自发释放与诱发释放的机制可能不一样。例如,抑制 GTP 水解的 dynamin 并不影响自发神经递质的释放,但是会影响诱发神经递质的释放^[13]。这说明,自发与诱发的信号可能是独立存在的^[1]。与此类似,某些与 NO 相似的物质可以在增强自发神经信号释放的同时抑制诱发神经信号的释放^[14]。

神经递质的自发释放和诱发释放的调控途径是不一样的^[2,3],突触囊泡库的多样性可能是导致这种现象的原因之一^[1-3,15],因为突触的回收与储蓄囊泡库不能同时维持自发和诱发神经递质的释放^[16-18],由于囊泡的这种特性导致了自发与诱发两种不同的递质释放形式^[2,19]。

本文关心的核心问题是 CNQX 对自发与诱发这两种不同的递质释放的影响是否不同。通过对实验数据的分析与观察,我们发现 CNQX 对这两种不同类型的突触分泌的影响是有显著差异的。将皮层细胞 eEPSC 组与 mEPSC 组相比较,eEPSC 组的 IC₅₀ 明显大于 mEPSC 组的 IC₅₀,海马细胞结果与此类似。所以,在实验中,我们需要更高浓度的 CNQX 来阻断 eEPSC。将皮层细胞与海马细胞的 eEPSC 组进行比较,我们发现其差异较小,皮层细胞与海马细胞的 mEPSC 组之间比较的结果与此类似,差异并不明显。实验结果表明 CNQX 对不同脑区的神经细胞的突触分泌影响效果是类似的。这些结论与之前报道的 PTX 对不同脑区、不同类型的突触分泌的影响相似^[20]。因此,无论对于兴奋性突触还是抑制性突触,自发神经递质释放都比诱发神经递质释放对阻断剂敏感。

综上所述,CNQX 在阻断兴奋性神经递质自发释放和诱发释放时可能有不同的机制,但是并不具有脑区特异性。

参考文献(References)

- [1] Sara Y, Bal M, Adachi M, et al. Use-Dependent AMPA Receptor Block Reveals Segregation of Spontaneous and Evoked Glutamatergic Neurotransmission[J]. The Journal of Neuroscience, 2011, 31(14): 5378-5382
- [2] Ramirez D M, Kavalali E T. Differential regulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release at central synapses[J]. Current Opinion in Neurobiology, 2011, 21(2): 275-282
- [3] Melom J E, Akbergenova Y, Gavornik J P, et al. Spontaneous and evoked release are independently regulated at individual active zones [J]. J Neurosci, 2013, 33(44): 17253-17263
- [4] Peled E S, Newman Z L, Isacoff E Y. Evoked and spontaneous transmission favored by distinct sets of synapses [J]. Curr Biol, 2014, 24 (5): 484-493
- [5] Kaeser-Woo YJ, Yang X, Südhof TC. C-terminal complexin sequence is selectively required for clamping and priming but not for Ca²⁺ triggering of synaptic exocytosis[J]. J Neurosci, 2012, 32(8): 2877-2885
- [6] Yang X, Cao P, Südhof TC. Deconstructing complexin function in activating and clamping Ca²⁺-triggered exocytosis by comparing knock-out and knockdown phenotypes [J]. PNAS, 2013, 110 (51): 20777-20782
- [7] Zhou P, Bacaj T, Yang X, et al. Lipid-anchored SNAREs lacking transmembrane regions fully support membrane fusion during neurotransmitter release[J]. Neuron, 2013, 80(2): 470-483
- [8] SM Smith, W Chen, NP Vyleta, et al. Calcium regulation of spontaneous and asynchronous neurotransmitter release [J]. Cell Calcium, 2012, 52(3-4): 226-233
- [9] J Yao, J Gaffaney, SE Kwon, et al. Doc2 is a Ca²⁺ sensor required for asynchronous neurotransmitter release[J]. Cell, 2011, 147(3): 666-677
- [10] Yang X, Kaeser-Woo Y J, Pang Z P, et al. Complexin clamps asynchronous release by blocking a secondary Ca²⁺ sensor via its accessory alpha helix[J]. Neuron, 2010, 68(5): 907-920
- [11] GE Song, LI Ru-xin, QI Lei, et al. Spontaneous Neurotransmitter Release Depends on Intracellular Rather than ER Calcium Stores in Cultured Xenopus NMJ [J]. Tsinghua Science and Technology, 2006, 11 (4): 440-446
- [12] 倪炜,王正朝,黄晓红. 钙调蛋白及其结合蛋白对神经递质释放的调控作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(4): 316-324
Ni Wei, Wang Zheng-chao, Huang Xiao-hong. Roles of Calmodulin and Calmodulin-binding Proteins in Neurotransmitter Release [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 29(4): 316-324
- [13] Ege T Kavalali. The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2015, 16(1): 5-16
- [14] Pan Z H, Segal M M, Lipton S A. Nitric oxide-related species inhibit evoked neurotransmission but enhance spontaneous miniature synaptic currents in central neuronal cultures [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(26): 15423-15428
- [15] DC Crawford, ET Kavalali. Molecular underpinnings of synaptic vesicle pool heterogeneity[J]. Traffic, 2015, 16(4): 338-364
- [16] Chung C, Barylko B, Leitz J, et al. Acute dynamin inhibition dissects synaptic vesicle recycling pathways that drive spontaneous and evoked neurotransmission[J]. J Neurosci, 2010, 30(4): 1363-1376
- [17] PS Kaeser, WG Regehr. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release [J]. Annual Review of Physiology, 2014, 76(1): 333-363
- [18] Y Sara, T Virmani, F Deák, et al. An Isolated Pool of Vesicles Recycles at Rest and Drives Spontaneous Neurotransmission[J]. Neuron, 2005, 45(4): 563-573
- [19] S Truckenbrodt, SO Rizzoli. Synaptic vesicle pools: Classical and emerging roles[J]. Springer Japan, 2015: 329-359
- [20] 阳小飞,梅颖,余意,等. 印防己毒素在不同类型突触分泌中的作用[J]. 中南民族大学学报, 2016, 35(3): 80-84
Yang Xiao-fei, Mei Ying, Yu Yi, et al. The role of Picrotoxin in the different types of synapses secretion[J]. Journal of South-Central University for Nationalities, 2016, 35(3): 80-84