



原代培养神经细胞膜经N-甲基-D-天冬氨酸和MK-801作用后原子力显微镜观察

在颅脑创伤,特别是重型颅脑损伤中,继发性脑水肿是其最基本、最重要、也是最复杂的病理生理变化。研究发现兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAAs),包括谷氨酸和天门冬氨酸,是中枢神经系统最主要的兴奋性神经介质,它们除了本身具有的神经毒性作用以外,其最主要受体—N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAr)在介导EAAs激发Ca²⁺细胞内流中起重要作用,也是脑水肿所致神经细胞死亡的关键环节[1][2][3]。目前的研究在NMDAr的分子生物学、神经电生理学、药理学研究等方面取得了很大进展,但是对NMDAr在生理、病理情况下对体细胞膜外三维空间构象变化的动态形态学研究还很少涉及,本实验应用分辨率为0.1~0.01 nm的原子力显微镜(AFM)观测了正常状态下、NMDA损伤时以及经NMDA受体拮抗剂MK-801保护作用后的神经元膜表面构象的不同变化,旨在探讨NMDA受体构象的纳米水平变化规律。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生12 h以内的Wistar大鼠(性别不拘),由军事医学科学院动物中心提供。

1.1.2 试剂 胎牛血清、马血清、DMEM粉剂购自 Gibco-Brl 公司,胰蛋白酶、多聚赖氨酸、阿糖胞苷、谷氨酰胺、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)、MK-801购自 Sigma公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 设备 二氧化碳细胞培养箱购自日本三洋公司, NanoScope III型 AFM购自美国DI公司。

1.2 方法

1.2.1 AFM样品飞片制作 在进行细胞培养前将云母片剪成0.5 cm²大小圆片,以透明胶裂解出新鲜的云母面。用双面胶将其贴附在AFM样品不锈钢圆形载物片上,压紧。再浸入3%丙酮溶液中30 min以溶解双面胶中有机成分,纯水反复冲洗,浸泡30 min。置入高压灭菌箱中消毒后放入清洁培养皿中待用。

1.2.2 皮层神经细胞培养 参照Choi等[4]的方法加以改进。于无菌条件下切取鼠头并以75%酒精浸泡1 min,解剖出完整鼠脑,预冷解剖液中分离去除软膜、血管、取大脑皮质漂洗,用眼科剪将皮质反复剪切成大小为0.5 mm³的碎块。移入培养皿中,吸除解剖液。加入0.25%胰蛋白酶2 ml,37 °C培养箱中消化30 min后,将皮层组织碎块移入离心管,弃去剩余消化液,用接种液洗3次。每次洗涤后使组织块充分沉降到试管底,弃去上清液,最后再用接种液1 ml混悬。反复吹打上述混悬液中组织块,力度适中,至浑浊后将上清液移入培养瓶待用。加入1 ml接种液后再次吹打,如此反复3~4次,组织块逐渐消化后弃去最终残块。收集含单细胞悬液的上清液约4~5 ml于培养瓶中。以接种液重新悬浮细胞,细胞计数,接种1×10⁷个细胞于35 mm培养皿和24孔培养板中。培养24 h至细胞贴壁后,换全培养液培养4~5 d,观察神经元生长良好,换用阿糖胞苷培养液(4 mg/ml,换半液)培养48~72 h以抑制神经胶质细胞及杂细胞生长,获得单纯培养的原代神经细胞。以后每隔3~4 d换液1次,每次换半液。至10~12 d行NMDA损伤保护测定。

1.2.3 NMDA毒性损伤和MK-801保护作用 [5][6] 神经细胞培养10 d后进行实验,分为对照、NMDA

和NMDA损伤后MK-801保护组(简称MK-801组), 每组3皿。吸干培养液后对上述3组分别以培养液、200 $\mu\text{mol/L}$ NMDA、200 $\mu\text{mol/L}$ NMDA+200 $\mu\text{mol/L}$ MK-801各2 ml作用于培养神经细胞30 min, 吸干作用液, 再加入培养液作用24 h后进行检测。

1.2.3 AFM观测 贴有云母飞片的载物片可直接用于AFM观测。由于细胞贴壁生长, 附着牢固, 应用AFM CONTACT 模式(悬臂弹性系数为0.6 N/m, 针尖曲率半径为3 nm, 水平最大扫描范围为10 mm)观察。先应用附带光镜随机找到神经细胞, 移动针尖至扫描范围内, 接触压力调整后对其膜表面进行3 000~ 100万倍的三维形态扫描检测。每一样品扫描三个神经元。

2 结果

在分辨率为300~500 nm时, 正常神经元膜表面突起大小均匀, 直径约为30~60 nm, 高度为10~20 nm, 相对平滑, 偶有高于50 nm团状隆起(图1); 而NMDA作用后的神经元膜表面可见短柱状犄角形分叉状突起, 高约80 nm, 直径约30 nm, 边缘为直径为10~20 nm孔洞状凹陷, 大于一般的离子通道直径(2 nm), 考虑为膜受体蛋白变构后, 由于膜外周蛋白弹性模量大于膜脂, 因此膜脂表现为典型的孔状凹陷(图2); MK-801组表面明显隆起, 直径高度增加, 间距增宽, 平均在80~100 nm(图3)。在分辨率为50~100 nm时, 正常神经元膜表现为平坦的粗糙平面, 平缓起伏, 丘陵状改变(图4)。NMDA组神经元膜可见高于40 nm, 宽约80 nm的隆起, 凹陷深约为10~20 nm, 考虑神经元膜完整性破坏, 细胞器逸出(图5)。MK-801组则介于二者之间(图6)。

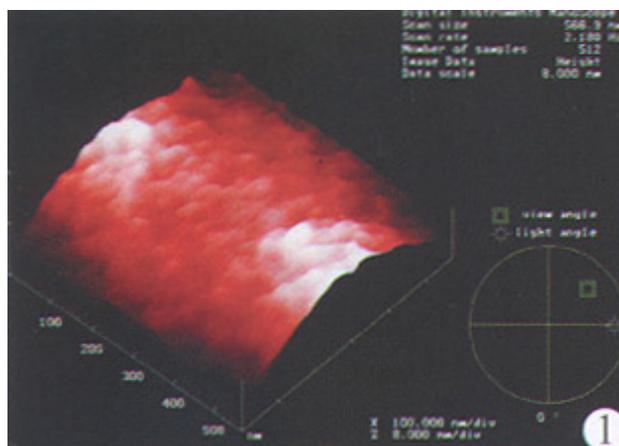


图1 正常培养神经元膜表面形态原子力显微镜观察 (分辨率=500 nm)

Fig.1 Observation under atomic force microscope of cultured normal neuron membrane (resolution ratio=500 nm)

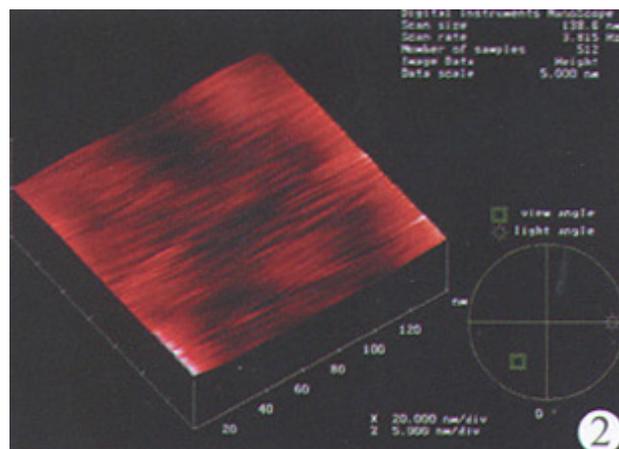


图2 NMDA作用后神经元表面形态原子力显微镜观察 (分辨率=300 nm)

Fig.2 Observation under atomic force microscope of the membrane of cultured neurons after NMDA treatment (resolution ratio=300 nm)

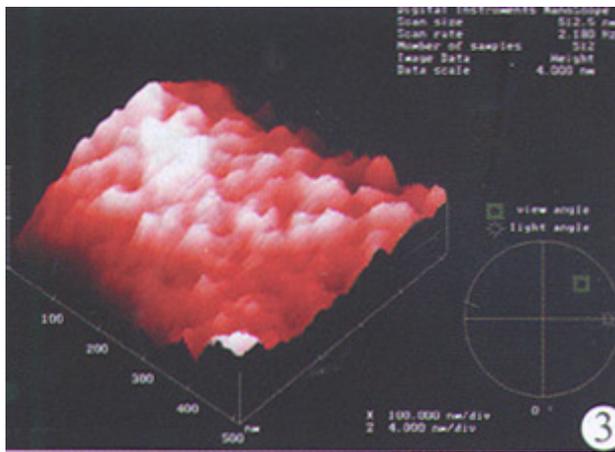


图3 NMDA+MK-801作用后神经元表面形态原子力显微镜观察 (分辨率=500 nm)
 Fig.3 Observation under atomic force microscope of the membrane of cultured neurons after successive NMDA and MK-801 treatment (resolution ratio=500 nm)

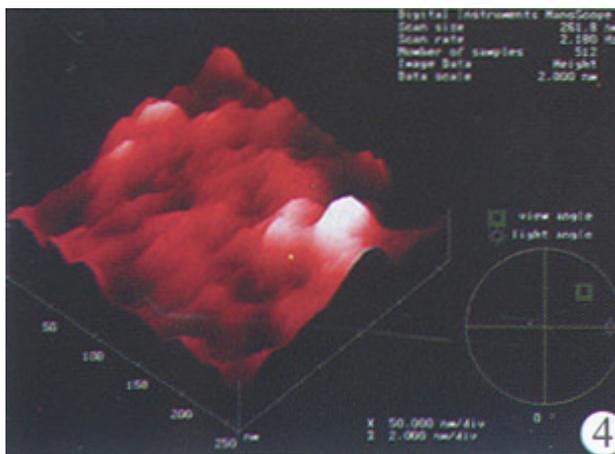


图4 正常培养神经元膜表面形态原子力显微镜观察 (分辨率=120 nm)
 Fig.4 Observation under atomic force microscope of cultured normal neuron membrane (resolution ratio=120 nm)

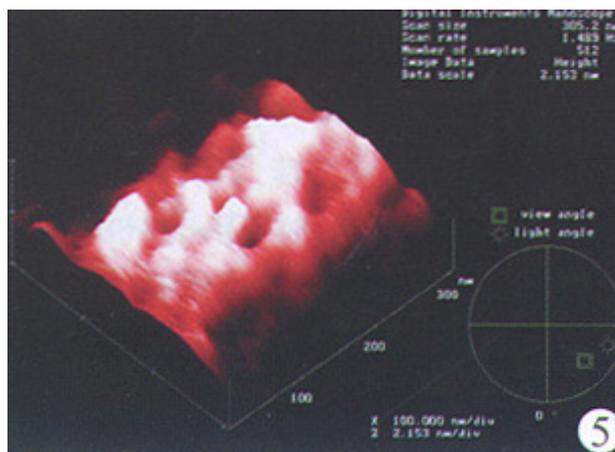


图5 NMDA作用后神经元表面形态原子力显微镜观察 (分辨率=200 nm)
 Fig.5 Observation under atomic force microscope of the membrane of cultured neurons after NMDA treatment (resolution ratio=200 nm)

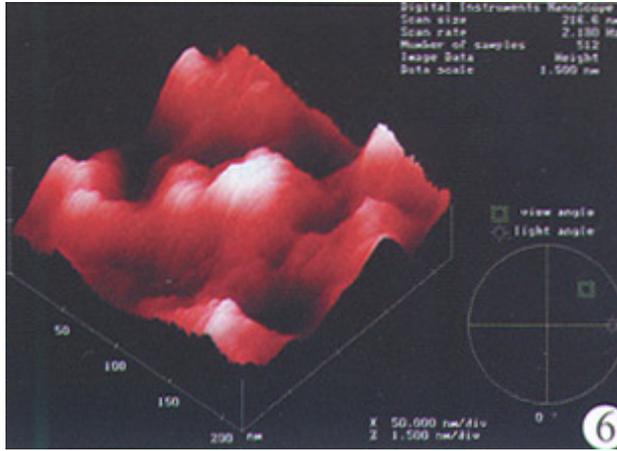


图6 NMDA+MK-801作用后神经元表面形态原子力显微镜观察 (分辨率=250 nm)
 Fig.6 Observation under atomic force microscope of the membrane of cultured neurons after successive NMDA and MK-801 treatment (resolution ratio=250 nm)

3 讨论

AFM在生物医学中的应用为在纳米水平观察细胞形态创造了条件[7]。原子力显微镜是通过检测样品表面和针尖相互作用力的变化来获得样品表面信息的，其基本原理是探针安置于悬臂上，有一束激光打在悬臂上，当探针在样品上扫描时，由于样品表面原子结构起伏不平，悬臂也就有起伏，此时激光束反射也就有起伏，通过光测器将之接收、放大，便可获得样品表面起伏的原子结构图像。

目前，AFM不仅可在分子、原子水平对物质进行直接观察，对DNA、蛋白质进行形态分析，还可进行直视下的分子剪辑、DNA特殊位点的定位等高水平研究，因而在生物学领域，尤其在核酸及其他生物大分子的精细结构方面的应用已成为普遍关注的热点[8]。

Dufrene[9]认为AFM可以在自然的生理的状态下观测微生物、细胞表层结构，达到纳米尺度的分辨率，还可以测定生物大分子之间的作用力。AFM目前逐渐应用于：(1)微生物表层的三维立体结构的成像，包括细菌S层蛋白、紫膜等；(2)监测膜蛋白的构象改变，包括受体、离子通道、泵等；(3)在纳米尺度揭示活的微生物的表面结构，如酵母菌、放线菌；(4)揣测生物大分子之间相互作用力，如DNA、氨基酸；(5)探查细胞表面局部结构的物理性质，如硬度、韧性。Lal[10]应用AFM对生物膜上的功能蛋白质大分子如受体、离子通道和离子泵的三维构象进行纳米尺度的精确成像，并以纳米操纵技术将其表面结构移位、变构，为研究NMDAR提供了理论依据。

细胞膜以膜脂为主要构架，膜蛋白具有重要的生物学功能，加上少量的糖组成了液态镶嵌模型。其本身具有流动性，依靠能量的支持，可维持膜的完整性。由于生物样品的柔性，AFM还不能达到对晶体物质所具有的0.1~0.01 nm的分辨率。本研究中观察到膜表面是由颗粒状物排列成的凹凸表面，与文献报道一致[10]，比较明确的是由于膜蛋白的弹性模量远高于膜脂。因此，膜蛋白的形态通过不同的突起表现出来，而对于膜脂的极性头基难以清晰成像。

NMDA是NMDAR的兴奋剂，二者结合后产生NMDAR蛋白膜外区蛋白质三维构象的改变，Sobolevsky证实NMDA受体离子通道平均直径是1.7 nm[12]，而在活化区域的通道直径约为1.1 nm[13]。了解离子通道和配体是如何结合、如何变化的，对于研究NMDA受体拮抗剂具有重要的意义。

从生物信息学角度来看，AFM是对NMR、X线衍射方法的直观动态的补充。我们目前可以得到纯化的NMDA受体并且测定出其构象，但由于受体的活性状态存在于膜结构上，故分离纯化后其构象发生改变而非活性状态[11]。

应用AFM能够实时测定在自然状态下神经细胞膜活性状态的蛋白质构象，具有重要的理论实践意义。我们

通过以上的研究可以证明以下几点：(1)NMDA 损伤后神经元膜蛋白聚集成团，间距增大，膜脂完整性遭到破坏；(2)MK-801可以对其损伤程度予以减轻；(3)膜蛋白的构像变化可以定量分析，建立模型，指导拮抗剂的设计；(4)AFM相比具有分辨率高、制样简单，在自然条件下成像的优点；(5)目前由于AFM应用于生物学研究还是新的方法，因此在制样、提高分辨率等技术手段上还需要进一步摸索。我们的下一步研究将进行其三维形态统计学测量及建模并在AFM条件下有效标记所需要的目的蛋白。

参考文献：

- [1] 高天明, 陈培熹. 中枢兴奋性氨基酸受体分子特性的研究[J]. 生理科学进展, 1994, 25(3): 259-271.
- [2] 罗成义, 王清华, 徐如祥. 大鼠大脑损伤后皮质NMDA受体活性变化与脑水肿的关系[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(4): 203-5.
- Luo CY, Wang QH, Xu RX. Relationship between changes of N- methyl-D-aspartate receptor activity on cerebral cortex and brain edema after brain injury in rats[J]. Chin J Traumatol, 1998, 14(4): 203-5.
- [3] Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders[J]. N Engl J Med, 1994, 330(9): 613-22.
- [4] Choi DW, Maulucci Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture[J]. J Neurosci, 1987, 7(2): 357.
- [5] 姜亚军, 周君富, 何家声, 等. 谷氨酸的神经毒性作用及其作用机制[J]. 铁道医学, 1998, 26(5): 286-9.
- Jiang YJ, Zhou FJ, He JS, et al. Neurotoxicity of glutamate and its mechanism[J]. Railway Med, 1998, 26(5): 286-9.
- [6] 母敬郁, 熊文, 杨世杰, 等. 自由基介导兴奋性氨基酸对培养神经细胞毒性的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1996, 13(1): 2-5.
- Mu JY, Xong W, Yang SJ, et al. Free radical mediates glutamate neurotoxicity in primary culture of rat cortical neuron[J]. J Apoplexy Nervous Dis, 1996, 13(1): 2-5.
- [7] Engel A, Muller DJ. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope[J]. Nat Struct Biol, 2000, 7(9): 715-8.
- [8] 白春礼. 扫描隧道显微技术及其应用[M]. 上海科学技术出版社, 1992.
- [9] Dufrene YF. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells[J]. Micron, 2001, 32(2): 153-65.
- [10] Lal R. Imaging molecular structure of channels and receptors with an AFM[J]. Scanning Microsc Suppl, 1996. 10: 81-95.
- [11] 邹冈. 基础神经药理学[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [12] Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI. Molecular size and hydrophobicity as factors which determine the efficacy of the blocking action of amino-adamantane derivatives on NMDA channels[J]. Membr Cell Biol, 1999, 13(1):79-93.
- [13] Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI. Probing of NMDA channels with fast blockers[J]. J Neurosci, 1999, 19(24): 10611-26.

参考文献：

- [1] 高天明, 陈培熹. 中枢兴奋性氨基酸受体分子特性的研究[J]. 生理科学进展, 1994, 25(3): 259-271.
- [2] 罗成义, 王清华, 徐如祥. 大鼠大脑损伤后皮质NMDA受体活性变化与脑水肿的关系[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(4): 203-5.

- Luo CY, Wang QH, Xu RX. Relationship between changes of N-methyl-D-aspartate receptor activity on cerebral cortex and brain edema after brain injury in rats[J]. Chin J Traumatol, 1998, 14(4): 203-5.
- [3] Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders[J]. N Engl J Med, 1994, 330(9): 613-22.
- [4] Choi DW, Maulucci Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture[J]. J Neurosci, 1987, 7(2): 357.
- [5] 姜亚军, 周君富, 何家声, 等. 谷氨酸的神经毒性作用及其作用机制[J]. 铁道医学, 1998, 26(5): 286-9.
- Jiang YJ, Zhou FJ, He JS, et al. Neurotoxicity of glutamate and its mechanism[J]. Railway Med, 1998, 26(5): 286-9.
- [6] 母敬郁, 熊文, 杨世杰, 等. 自由基介导兴奋性氨基酸对培养神经细胞毒性的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1996, 13(1): 2-5.
- Mu JY, Xong W, Yang SJ, et al. Free radical mediates glutamate neurotoxicity in primary culture of rat cortical neuron[J]. J Apoplexy Nervous Dis, 1996, 13(1): 2-5.
- [7] Engel A, Muller DJ. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope[J]. Nat Struct Biol, 2000, 7(9): 715-8.
- [8] 白春礼. 扫描隧道显微技术及其应用[M]. 上海科学技术出版社, 1992.
- [9] Dufrene YF. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells[J]. Micron, 2001, 32(2): 153-65.
- [10] Lal R. Imaging molecular structure of channels and receptors with an AFM[J]. Scanning Microsc Suppl, 1996. 10: 81-95.
- [11] 邹冈. 基础神经药理学[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [12] Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI. Molecular size and hydrophobicity as factors which determine the efficacy of the blocking action of amino-adamantane derivatives on NMDA channels[J]. Membr Cell Biol, 1999, 13(1):79-93.
- [13] Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI. Probing of NMDA channels with fast blockers[J]. J Neurosci, 1999, 19(24): 10611-26.