

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

郁毅刚¹袁徐如祥¹袁以铨¹袁姜晓丹¹袁刘少君²袁杨延莲³渊第一军医大学珠江医院神经外科袁广东 广州 510282曰军事医学科学院基础研究所神经生物研究室袁北京 100850曰北京大学化学与分子工程学院纳米科技中心纳米化学实验室 北京 100871冤

摘要目的 对比观察正常培养皮层神经元在 N- 甲基 -D- 天冬氨酸(NMDA)及其受体拮抗剂要MK-801 作用下膜表面三维构像形态的改变遥方法 利用分辨率为 0.1~0.01nm 的原子力显微镜(AFM)对原代培养大鼠皮层神经细胞膜表面进行纳米尺度的扫描观测遥结果 正常神经元膜表面光滑袁起伏均匀袁隆起的颗粒状蛋白密集袁间隔规律曰NMDA 损伤后神经元破碎袁膜失去连续性曰NMDA+MK-801 作用下神经元膜皱折增加袁边缘粗糙袁起伏程度介于两者之间遥结论 AFM 具有分辨率高袁操作简单特点遥AFM 能细微地分辨损伤保护作用后引起的细胞膜表面三维形态改变遥NMDA 作用后膜结构开始解体袁膜蛋白颗粒聚集增大袁脂质凹陷加深袁间距增宽袁表面粗糙度增加遥
关键词细胞膜 / 超微结构曰神经元曰氨基酸类 / 药物作用
中图分类号R329.24 文献标识码B 文章编号院000-2588渊002冤1-0988-04

Atomic force microscopic observation of the neurons membrane in primary culture after treatment with N-Methyl-D-Asph

YUYi-gang¹,XURu-xiang¹,KEYi-quan¹,JIANGXiao-dan¹,LIUShao-jun²,YANGYan-lian³

¹Department of Neurosurgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Neurobiology Laboratory, Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; ³Nanochemistry Laboratory, College of Chemistry and Molecular Engineering, Center for Nanoscale Science and Technology, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract: Objective To observe the changes in three-dimensional morphology of the membrane of the cortex neurons in primary culture in response to treatment with N-Methyl-D-Asp (NMDA) and MK-801 using atomic force microscope (AFM). Methods Following NMDA treatment, the changes in the membrane of the neurons fixed by glutaraldehyde were examined, and the protective effect of MK-801 on the neurons was also observed using an AFM at the resolution of 0.01-0.1 nm. Results Normal neurons presented smooth membrane surface with regular undulation and densely but well arrayed protein granules. In response to NMDA treatment, the neurons were disrupted, falling into small pieces, and their membrane appeared discontinuous. MK-801 treatment increased the folds of the membrane that showed rough edges, with membrane undulation only secondary to normal condition. Conclusions AFM, with the merit of high resolution and easy sample preparation, can finely display the three-dimensional morphology of the surface of the neurons, which, after NMDA treatment, becomes disintegrated with increased bulk of the protein granules, deepened caving of the lipids, and rougher membrane surface.

Key word: cell membrane/ultrastructure; neurons; amino acids/drug effects

在颅脑创伤袁特别是重型颅脑损伤中袁继发性脑水肿是其最基本尧最重要尧也是最复杂的病理生理变化遥研究发现兴奋性氨基酸渊excitatory amino acids, EAAs冤包括谷氨酸和天门冬氨酸袁是中枢神经系统最主要的兴奋性神经介质袁它们除了本身具有的神经毒性作用以外袁其最主要受体要 N- 甲基 -D- 天冬氨酸受体渊NMDAr冤在介导 EAAs 激发 Ca²⁺ 细胞内流中

起重要作用袁也是脑水肿所致神经细胞死亡的关键环节遥遥目前的研究在 NMDAr 的分子生物学尧神经电生理学尧药理学研究等方面取得了很大进展袁但是对 NMDAr 在生理尧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袁本实验应用分辨率为 0.1~0.01nm 的原子力显微镜(AFM)观测了正常状态下尧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袁旨在探讨 NMDA 受体构象的纳米水平变化规律遥

收稿日期院002-07-17

基金项目院国家自然科学基金 (30170961)曰全军医药卫生科研基金 (01Z054)

作者简介院郁毅刚 (1970-)袁男袁浙江宁波人袁现为第一军医大学在读博士研究生袁电话院10-66932379袁mail:Mr.jessie@163.net

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 胎牛血清尧马血清尧MEM 粉剂购自 Gibco-Brl 公司胰蛋白酶尧聚赖氨酸尧阿糖胞苷尧氨酰胺尧-N-甲基-D-天冬氨酸 MDA尧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 芋型 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紧固再浸入 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^[1]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尧血管尧大脑皮质漂洗尧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去除解剖液加入 0.25% 胰蛋白酶 2 ml 7 益培养箱中消化 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记数接种 1伊0⁷ 个细胞于 35 mm 培养皿和 24 孔培养板中避光培养 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 1 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^[2] 神经细胞培养 10 d 后进行实验分为对照尧 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 组分别以培养液尧 200 滋mol/L NMDA尧 00 滋mol/L NMDA+200 滋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

AFMCONTACT 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好对其膜表面进行 3000~100 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 100 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 而 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 而 MK-801 组则介于二者之间图 6

3 讨论

AFM 在生物学中的应用为在纳米水平观察细胞形态创造了条件^[3]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即可获得样品表面起伏的原子结构图像

目前 AFM 不仅可在分子尧原子水平对物质进行直接观察对 DNA尧蛋白质进行形态分析还可进行直视下的分子剪辑尧 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^[4]

Dufrene^[5]认为 AFM 可以在自然的生理的状态下观测微生物尧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 目前逐渐应用于尧微生物表层的三维立体结构的成像尧包括细菌 S 层蛋白尧紫膜等尧尧监测膜蛋白的构象改变尧包括受体尧离子通道尧等尧尧在纳米尺度揭示活的微生物的表面结构尧酵母菌尧放线菌尧尧尧测生

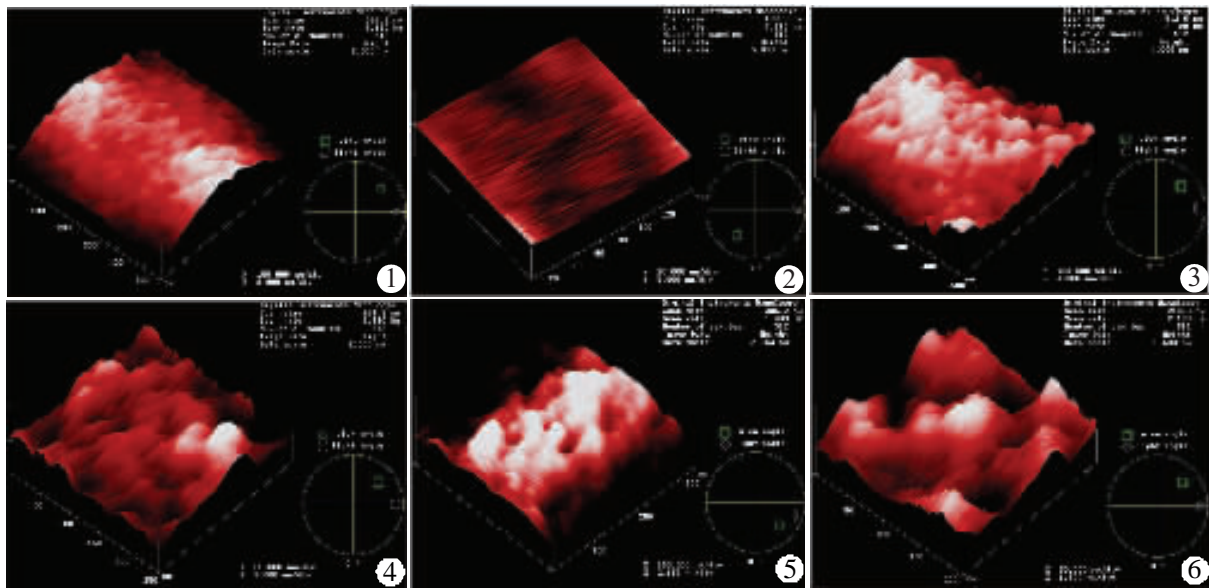


图 1 正常培养神经元膜表面形态原子力显微镜观察 分辨率 =500nm

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

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

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

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 =500nm

Fig.3 Observation under atomic force microscope of the membrane of cultured neurons after successive NMDA and MK-801 treatment (resolution ratio=500nm)

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 =120nm

Fig.4 Observation under atomic force microscope of cultured normal neuron membrane(resolution ratio=120nm)

图 5 NMDA 作用后神经元表面形态原子力显微镜观察 分辨率 =200nm

Fig.5 Observation under atomic force microscope of the membrane of cultured neurons after NMDA treatment (resolution ratio=200nm)

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 =250nm

Fig.6 Observation under atomic force microscope of the membrane of cultured neurons after successive NMDA and MK-801 treatment (resolution ratio=250nm)

物大分子之间相互作用力。DNA 氨基酸。探索细胞表面局部结构的物理性质。硬度。刚性。弹性。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 0.1~0.01nm 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。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 1.7nm。而在活化区域的通道直径约为 1.1nm。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 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。分离纯化后其构象发生改变而非活性状态。

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。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。MK-801 可以对其损伤程度予以减轻。膜蛋白的构象变化可以定量分析。建立模型。指导拮抗剂的设计。AFM 相比具有分辨率高。制样简单。在自然条件下成像的优点。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

- 高天明, 陈培熹. 中枢兴奋性氨基酸受体分子特性的研究. *生理科学进展*, 1994, 25(3): 259-271.
- 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. *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. *Chin J Traumatol*, 1998, 14(4): 203-5.
- Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, 1994, 330(9): 613-22.
- Choi DW, Maulucci Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *Neurosci*, 1987, 7(2): 357.
- 姜亚军, 周富富, 何家声, 等. 谷氨酸的神经毒性作用及其作用机制. *铁道医学*, 1998, 26(5): 286-9.
- Jiang YJ, Zhou FJ, He JS, et al. Neurotoxicity of glutamate and its

mechanism. *Railway Med*, 1998, 26(5): 286-9.

- 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. *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 neurons. *Apoplexy Nervous Dis*, 1996, 13(1): 2-5.
- Engel A, Muller DJ. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 715-8.
- 白春礼. 扫描隧道显微技术及其应用. *上海科学技术出版社*, 1992.
- Dufrene YF. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface cayer to living cells. *Micron*, 2001, 32(2): 153-65.
- Lal R. Imaging molecular structure of channels and receptors with an AFM. *Scanning Microsc Suppl*, 1996, 10: 81-95.
- 鄧冈. 基础神经药理学. *北京: 科学出版社*, 1999.
- 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. *Membr Cell Biol*, 1999, 13(1): 79-93.
- Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI. Probing of NMDA channels with fast blockers. *J Neurosci*, 1999, 19(24): 10611-26.

连接 987 页冤

损伤能同时直接对特异性 CTL 进行定性定量分析和分离纯化。对于一定的 HLA 表型和肽表位而言, 系统不受 TCR 多样性的限制, 可识别任何的肽特异性 CTL。因此在短短几年里, 已在国外广泛应用于微生物感染、肿瘤、自身免疫性疾病等的细胞免疫学研究和 DNA 疫苗接种效果监测。但目前国内尚未有应用该技术的报道。

基因工程技术制备 HLA-I 表位肽四聚复合物检测系统的前提之一。国外研究表明克隆的 HLA-I 基因在大肠杆菌中以包涵体形式表达的产物经透析复性后可用于 HLA-I 表位肽四聚复合物检测系统的构建。我们在应用 RT-PCR 成功克隆 HLA-I 基因的基础上, 通过选择含 PRPL 启动子的表达载体 pBV220 构建融合表达载体 pBV220-HLA-I, 转化至大肠杆菌 BL21 中, 经温度诱导大量表达。电泳鉴定发现目的蛋白主要存在于包涵体中, 占菌体蛋白的 45%, 且表达稳定。

本研究通过酶切位点 Nde I 和 Sap I 实现 HLA-I 基因与表达载体的连接。融合蛋白经过纯化柱并切下标签蛋白后, 由于标签蛋白能特异性地与纯化柱结合, 洗脱下的溶液中只溶有不含额外氨基酸的 HLA-I, 优于国外同类研究。由于 HLA-I 是与标签蛋白融合表达, 极大地简化了产物的纯化程序, 节省了时间

和费用, 提高了产物回收效率。

参考文献

- 周最明, 郭亚兵, 骆抗先. HLA-I 表位肽四聚复合物检测系统在研究 HBV/HCV 抗原特异性 CTL 中的应用. *国外医学流行病学传染病学分册*, 2001, 28(3): 112-4.
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T 著. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 55-6.
- He XS, Greenberg HB. CD8⁺ T-cell response against the hepatitis C virus. *Viral Immunol*, 2002, 15(1): 121-31.
- Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *Exp Med*, 2000, 191(8): 1269-80.
- Valmori D, Dutoit V, Rubio-Godoy V, et al. Frequent cytolytic T-cell responses to peptide MAGE-A10(254-262) in melanoma. *Cancer Res*, 2001, 61(2): 509-12.
- Amrani A, Verdager J, Serra P, et al. Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population. *Nature*, 2000, 406: 739-42.
- Roy MJ, Wu MS, Barr LJ, et al. Induction of antigen-specific CD8⁺ T cells, Thelper cells, and protective level of antibody in human by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine. *Vaccine*, 2000, 19(7-8): 764-78.
- Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996, 274(5284): 94-6.
- 张智清, 姚立红, 侯云德. 含 P₆P₁ 启动子的原核高效表达载体的构建及其应用. *病毒学报*, 1990, 6(2): 111-5.