

文章编号 1006-8147(2017)04-0285-05

论著

贝沙罗汀拮抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的海马 CA1 区锥体神经元谷氨酸能突触传递的抑制效应

陈文博¹, 寇亚芬², 张引国³, 赵景霞¹, 张玲¹

(1.天津医科大学生理学与病理生理学系, 天津 300070; 2.天津医科大学一中心临床学院放射科, 天津 300192; 3.武警后勤学院生理学及病理生理学教研室, 天津 300309)

摘要 目的:初步探讨 β 淀粉样蛋白 $A\beta_{25-35}$ 损伤海马 CA1 区兴奋性突触的靶点及贝沙罗汀的可能拮抗效应。方法:以出生 7~14 d Wistar 大鼠海马脑片为研究对象,采用全细胞膜片钳技术,在电压钳模式下记录大鼠海马脑片 CA1 区锥体细胞自发兴奋性突触后电流(sEPSCs)和微小兴奋性突触后电流(mEPSCs),分析不同组神经元 sEPSCs 和 mEPSCs 幅度及频率的差异。结果:与对照组相比,经 $A\beta_{25-35}$ (1 $\mu\text{mol/L}$) 处理后,海马神经元 sEPSCs 与 mEPSCs 平均幅度和平均频率都显著降低(均 $P < 0.05$)。向 $A\beta_{25-35}$ 处理过的海马脑片中加入贝沙罗汀(5 $\mu\text{mol/L}$)后,sEPSCs 与 mEPSCs 平均幅度和平均频率较 $A\beta_{25-35}$ 组都显著提高(均 $P < 0.05$)。贝沙罗汀处理组 sEPSCs 与 mEPSCs 平均频率和平均幅度与对照组水平无显著性差异(均 $P > 0.05$)。结论: $A\beta_{25-35}$ 可作用于 CA1 区,导致海马锥体神经元兴奋性突触后电位降低,突触功能损伤,贝沙罗汀通过作用于突触前和突触后位点拮抗 $A\beta_{25-35}$ 的损伤效应。

关键词 阿尔茨海默病; β 淀粉样蛋白; 贝沙罗汀; 自发性兴奋性突触后电流; 微小兴奋性突触后电流

中图分类号 R338.8

文献标志码 A

Antagonistic effect of bexarotene on $A\beta_{25-35}$ -induced inhibiting action in glutamatergic synaptic transmission of hippocampal CA1 pyramidal neurons

CHEN Wen-bo¹, KOU Ya-fen², ZHANG Yin-guo³, ZHAO Jing-xia¹, ZHANG Ling¹

(1. Department of Physiology and Pathophysiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Radiology, The First Center Clinic College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 3. Department of Physiology and Pathophysiology, Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China)

Abstract Objective: To explore the damage effect target of $A\beta_{25-35}$ on hippocampal CA1 excitatory synapses and the possible antagonistic effect of bexarotene. **Methods:** Postnatal 7-14-day-old Wistar rats were used as the research subjects. Using a whole-cell patch clamp technique, and in voltage-clamp mode, spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) and miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded in CA1 pyramidal neurons of hippocampal slices. The changes of the amplitude and frequency of the sEPSCs and mEPSCs in each group were analyzed. **Results:** After $A\beta_{25-35}$ (1 $\mu\text{mol/L}$) application, the average amplitude and frequency of sEPSCs and mEPSCs were significantly reduced compared with the control group ($P < 0.05$). Following application of bexarotene (5 $\mu\text{mol/L}$) to $A\beta_{25-35}$ group, the average amplitude and frequency of sEPSCs and mEPSCs were significantly increased compared with the $A\beta_{25-35}$ group ($P < 0.05$); and compared with the control group, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** $A\beta_{25-35}$ has a damage effect on CA1 pyramidal neurons, resulting in the decrease of excitatory postsynaptic potential and synaptic function damage, while bexarotene has a presynaptic and postsynaptic site of action to antagonize $A\beta_{25-35}$ -induced synaptic dysfunction in hippocampal CA1 pyramidal neurons.

Key words Alzheimer's disease; amyloid beta-protein; bexarotene; spontaneous excitatory postsynaptic currents; miniature excitatory postsynaptic currents

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)亦称老年性痴呆症,是一种神经退行性疾病,常伴有认知

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81271224);天津市自然科学基金资助项目(15JCYBJC25400);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(2014)

作者简介 陈文博(1991-),男,硕士在读,研究方向:生理学;通信作者:张玲,E-mail: zhangls1@tmu.edu.cn;赵景霞,E-mail: zhaojingxia@tmu.edu.cn。

功能障碍和记忆力衰退等特征^[1]。目前 AD 的具体发病机制并不十分清楚,但大量研究表明大脑内 β 淀粉样蛋白(amyloid beta-protein, $A\beta$)的过度产生、聚集是 AD 形成的重要原因之一^[2-3]。海马突触传递与人类学习和记忆密切相关,有研究表明可溶性 $A\beta$ 寡聚体可与突触部位的作用位点相结合,造成大脑突触传递功能受损^[4-5],这是研究 AD 早期发病机制

的关键。体内外实验已经证实, A β 寡聚体的第 25–35 位氨基酸序列即 A β_{25-35} 片段是 A β 寡聚体发挥毒性作用的主要片段^[6]。2012 年, Cramer 等^[7]发表在《Science》的研究结果表明视黄醇类 X 受体(RXR)激动剂贝沙罗汀(bexarotene)可快速降低阿尔茨海默症小鼠模型中可溶性 A β 的含量, 并逆转 AD 所导致的神经退行性症状。该研究组发现大脑中载脂蛋白 E(ApoE)可促进 A β 的清除。ApoE 是血浆中主要的载脂蛋白之一, 主要在肝脏中合成, 与神经系统的修复和再生有关。ApoE 通过内在的蛋白水解酶在细胞外和细胞内(小胶质细胞的吞噬作用)对 A β 进行降解以清除 A β 在脑内的沉积。而 ApoE 的生成依赖于核受体 RXR 的激活, 作为 RXR 的激动剂贝沙罗汀可通过刺激 RXR 起作用, 促进 ApoE 的生成, 进而清除 A β 。这项成果为阿尔茨海默症药物的研究提供了新的希望。但其具体的作用位点和机制尚不明确。为进一步探究其作用位点是否在突触部位, 本研究通过电生理膜片钳技术, 记录大鼠海马 CA1 区神经元 α -氨基羧甲基噁唑丙酸 (AMPA) 受体介导的自发兴奋性突触后电流(spontaneous excitatory postsynaptic currents, sEPSCs) 和微小兴奋性突触后电流(miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs), 检测贝沙罗汀对 β 淀粉样蛋白所致的大鼠海马神经元突触功能损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验液体配方 人工脑脊液(ACSF)成分为(mmol/L): NaCl 120, KCl 2.5, CaCl₂ 2, MgSO₄ 2, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.25, 葡萄糖 10, 用 NaOH 将 pH 调至 7.4; 电极内液成分为(mmol/L): KCl 130, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2, EGTA 10, HEPES 10, Mg-ATP 2, 用 KOH 将 pH 调至 7.2。

1.1.2 药品与试剂 河豚毒素(TTX)购于河北水产研究所; A β_{25-35} , 贝沙罗汀, Bicuculline, Mg-ATP, HEPES, EGTA 购于美国 Sigma 公司, 其余普通化学试剂均为国产分析纯, 购于北京鼎国生物公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠海马脑片的制备 选用出生 7~14 d 健康 Wistar 大鼠(军事医学科学院卫生环境医学研究所动物中心提供), 雌雄不限。快速断头取脑, 置于 0~4 °C 通氧的 ACSF 中冷却 3 min, 然后用振动式切片器(Leica, VT1000S, 德国)在 0~4 °C 通氧 ACSF 中切出厚度为 350 μ m 的海马脑片, 随后将海马脑片转至 32 °C 装有通氧 ACSF 的孵育槽中孵育 1 h, 1 h 后孵育温度调为 28 °C, 实验过程中通氧浓度为

95% O₂ + 5% CO₂。

1.2.2 sEPSCs 和 mEPSCs 记录 实验在室温下(22~25 °C)进行。将孵育 1 h 后的海马脑片转移至记录槽中, 将记录槽放置于正置显微镜(Zeiss, 德国)下, 通过蠕动泵以 95% O₂ + 5% CO₂ 饱和的 ACSF 持续灌流。采用水平电极拉制仪(Sutter, Puller-97, 美国)将硼硅玻璃毛细管(Sutter, 美国)拉制成尖端开口直径在 1~2 μ m 的实验用记录电极, 将电极内液注入记录电极后入水电阻值在 3~5 M Ω 。40 倍物镜下利用 CCD 图像采集系统(Dage, 美国)选取细胞表面光洁、立体感强的 CA1 区锥体细胞进行钳制封接, 全细胞记录形成后在电压钳模式下记录 sEPSCs 和 mEPSCs, 记录采用 gap free 模式, 钳制电压为 -70 mV。记录 sEPSCs 和 mEPSCs 时向 ACSF 灌流液中提前加入终浓度为 30 μ mol/L 的 Bicuculline 抑制 γ -氨基丁酸(GABA)受体的作用。记录 mEPSCs 时还需向 ACSF 灌流液中提前加入终浓度为 1 μ mol/L 的 TTX 抑制钠电流和动作电位。全细胞记录形成后稳定 5 min 开始记录, 各组记录时间为 5 min。实验放大器采用 MultiClamp 700B(Axon, 美国), 数据采集接口为 Digidata1440(Axon, 美国), 数据记录软件为 pClamp 10.4(Axon, 美国)。实验记录过程中采样频率为 10 kHz, 滤波频率为 2 kHz。记录过程中以串联电阻值变动幅度小于 20% 的数据为有效数据。

1.3 实验分组 实验分为对照组, A β_{25-35} 组和贝沙罗汀处理组($n=7$)。数据开始记录的 5 min 为对照组, 对照组不加任何药物; 然后加入终浓度为 1 μ mol/L 的 A β_{25-35} , 稳定 5 min 后开始记录, 记录时间 5 min, 作为 A β_{25-35} 组; 然后加入终浓度为 5 μ mol/L 的贝沙罗汀, 同样稳定 5 min 后开始记录, 记录时间 5 min, 作为贝沙罗汀处理组。

1.4 统计学方法 采用 Clampfit 10.4 对 sEPSCs 和 mEPSCs 数据进行幅度和频率分析, 结果以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示, 统计采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, 作图用 Graphpad-prism 5 软件, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

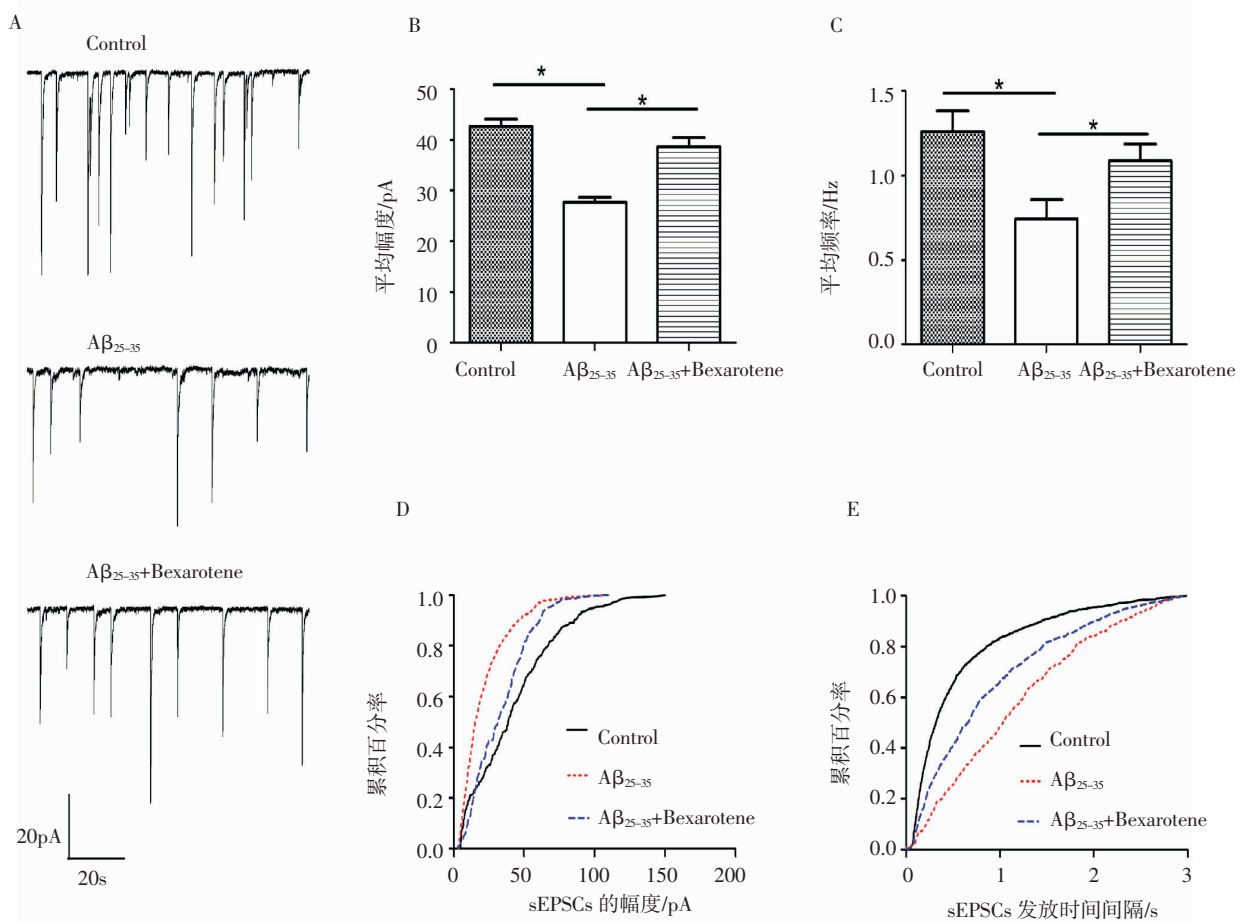
2 结果

2.1 各组海马 CA1 区神经元 AMPA 受体介导的 sEPSCs 幅度和频率的变化 在 Bicuculline(30 μ mol/L)存在条件下, 将 A β_{25-35} (1 μ mol/L)加入到 ACSF 灌流液中, 电压钳模式下记录海马神经元 sEPSCs。结果显示: 与对照组相比, 海马神经元 sEPSCs 幅度和频率都显著降低(图 1A)。sEPSCs 平均幅度由 (42.63 ± 1.45) pA 减小到 (27.68 ± 1.05) pA ($n=7, P < 0.05$), 平均

幅度降低了 35.1%(图 1B);sEPSCs 平均频率由 $(1.26\pm 0.13)\text{Hz}$ 减小到 $(0.74\pm 0.12)\text{Hz}$ ($n=7, P<0.05$), 平均频率降低了 41.3%(图 1C)。经 $A\beta_{25-35}$ 处理后, 振幅累积分布曲线左移, 幅度减小(图 1D);sEPSCs 出现时间间隔变长, 时间间隔累计分布曲线右移, 频率减小(图 1E)。向 $A\beta_{25-35}$ 处理过的海马脑片中加入贝沙罗汀 ($5\text{ }\mu\text{mol/L}$), 然后记录海马神经元 sEPSCs。结果显示:贝沙罗汀可增加 sEPSCs 频率和幅度, 且接近于对照组(图 1A)。与 $A\beta_{25-35}$ 组相比, 经贝沙罗汀 ($5\text{ }\mu\text{mol/L}$) 处理后, sEPSCs 平均幅度由 $(27.68\pm 1.05)\text{pA}$ 增加到 $(38.58\pm 1.90)\text{pA}$ ($n=7, P<0.05$), 平均幅度增高了 39.4%(图 1B), 振幅累积分布曲线右移, 幅度升高(图 1D);sEPSCs 频率由 $(0.74\pm 0.12)\text{Hz}$ 增加到 $(1.08\pm 0.10)\text{Hz}$ ($n=7, P<0.05$), 频率增高了 45.9%(图 1C), sEPSCs 出现时间间隔缩小, 时间间隔累计分布曲线左移, 频率增加(图 1E)。

2.2 各组海马 CA1 区神经元 AMPA 受体介导的 mEPSCs 幅度和频率的变化 在 TTX ($1\text{ }\mu\text{mol/L}$)、

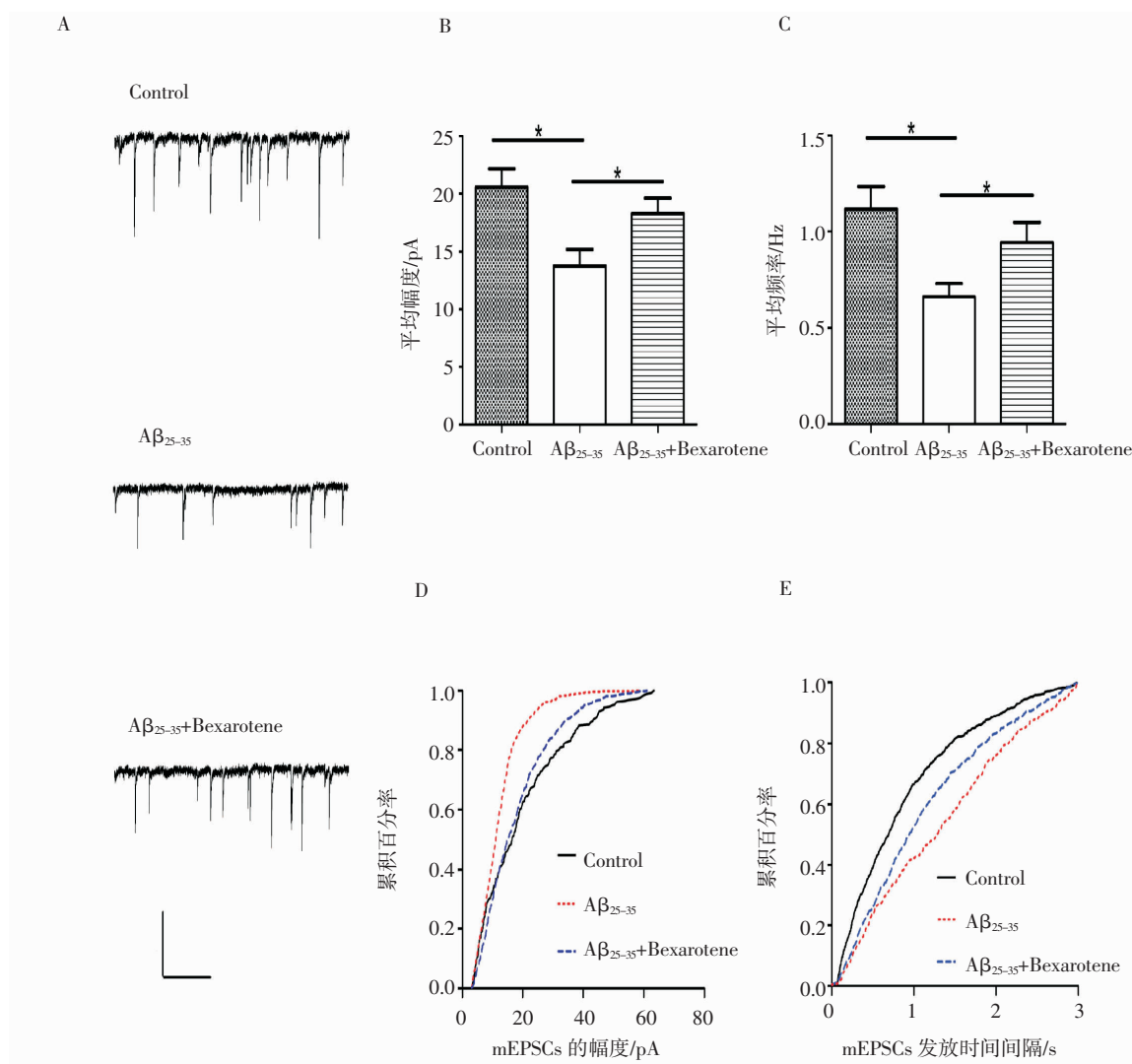
Bicuculline ($30\text{ }\mu\text{mol/L}$) 存在条件下记录海马神经元 mEPSCs。向脑片中加入 $A\beta_{25-35}$ ($1\text{ }\mu\text{mol/L}$) 后, 海马神经元 mEPSCs 幅度和频率同样都显著降低(图 2A)。与对照组相比, mEPSCs 平均幅度由 $(20.59\pm 1.57)\text{pA}$ 减小到 $(13.73\pm 1.42)\text{pA}$ ($n=7, P<0.05$), 幅度降低了 33.3%(图 2B);mEPSCs 平均频率则由 $(1.12\pm 0.12)\text{Hz}$ 减小到 $(0.66\pm 0.10)\text{Hz}$ ($n=7, P<0.05$), 频率降低了 41.1%(图 2C)。经 $A\beta_{25-35}$ 处理后, 振幅累积分布曲线左移, 幅度减小(图 2D);mEPSCs 出现时间间隔变长, 时间间隔累计分布曲线右移, 频率减小(图 2E)。与 $A\beta_{25-35}$ 组相比, 经贝沙罗汀 ($5\text{ }\mu\text{mol/L}$) 处理后, 海马神经元 mEPSCs 平均幅度由 $(13.73\pm 1.42)\text{pA}$ 增加到 $(18.30\pm 1.33)\text{pA}$ ($n=7, P<0.05$), 平均幅度增高了 33.3%(图 2B), 振幅累积分布曲线右移, 幅度升高(图 2D);mEPSCs 平均频率由 $(0.66\pm 0.10)\text{Hz}$ 增加到 $(0.94\pm 0.11)\text{Hz}$ ($n=7, P<0.05$), 平均频率增高了 42.4%(图 2C), sEPSCs 出现时间间隔缩小, 时间间隔累计分布曲线左移, 频率增加(图 2E)。



A: 海马 CA1 区锥体神经元细胞上记录到的 sEPSCs 原始波形图; B: 各组 sEPSCs 平均幅度柱状图 (* $P<0.05$); C: 各组 sEPSCs 平均频率柱状图 (* $P<0.05$); D: 各组 sEPSCs 振幅累积分布曲线; E: 各组 sEPSCs 时间间隔累积分布曲线

图 1 3 组神经元 sEPSCs 频率和幅度值比较

Fig 1 Comparison of sEPSCs amplitude and frequency among three groups



A: 海马 CA1 区锥体神经元细胞上记录到的 mEPSCs 原始波形图; B: 各组 mEPSCs 平均幅度柱状图 (* $P < 0.05$); C: 各组 mEPSCs 平均频率柱状图 (* $P < 0.05$); D: 各组 mEPSCs 振幅累积分布曲线; E: 各组 mEPSCs 时间间隔累积分布曲线

图 2 3 组神经元 mEPSCs 频率和幅度值比较

Fig 2 Comparison of mEPSCs amplitude and frequency among three groups

3 讨论

研究表明, β 淀粉样蛋白对突触的神经毒性作用在阿尔茨海默症病理进程中发挥着重要作用^[8], A β 寡聚体对 AD 影响的假说把 AD 发病过程中认知功能障碍的发生机制归因于可溶性 A β 寡聚体对突触和神经元的毒性作用, 突触减少以及功能受损是 AD 发展的关键所在, 而这一过程与 A β 寡聚体有直接关系^[9-10], 因此抑制 A β 寡聚体对突触的损伤是研发治疗 AD 药物的重要途径。贝沙罗汀作为抗癌药物, 2000 年获美国 FDA 批准上市, 临床主要用于治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤^[11]。Cramer^[7]团队研究表明贝沙罗汀可通过增强大脑 ApoE 的表达, 进而清除脑中的 A β , 并逆转 AD 所导致的神经退行性症状, 但贝沙罗汀逆转 AD 所导致的神经退行性症状的作用靶点还需进一步研究证明。

兴奋性突触后电流 (EPSCs) 是衡量突触传递功能的可靠指标, 主要是通过谷氨酸能 AMPA 受体和 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体介导的, 其中 AMPA 受体起着关键作用。由 AMPA 受体介导的 EPSCs 有两类, 分别是 sEPSCs 和 mEPSCs。sEPSCs 和 mEPSCs 都是反映兴奋性突触传递功能的指标, sEPSCs 是突触前钙通道开放钙离子内流引发谷氨酸递质释放引起的兴奋性突触后电流^[12], 可被 TTX 阻断; 而 mEPSCs 不依赖于突触前钙离子的流入, mEPSCs 是单个突触前囊泡随机自发释放递质并作用于突触后膜造成突触后膜电位变化, 由此引发的一类兴奋性突触后电流^[13], 不能被 TTX 阻断。在海马脑片上通常记录的 sEPSCs 和 mEPSCs 都是由谷氨酸能 AMPA 受体介导的电流变化, 不涉及 NMDA 受体介导的电流变化, 因为 NMDA 受体通道通常被

Mg^{2+} 阻滞,其激活需要突触前施加强烈的刺激^[14]。

本实验以 AMPA 受体介导的 sEPSCs 和 mEPSCs 为观测指标,检测了 $A\beta_{25-35}$ 对大鼠海马 CA1 区神经元兴奋性突触后电流的影响,结果显示: $A\beta_{25-35}$ 可显著降低 sEPSCs 和 mEPSCs 的频率和幅度。sEPSCs 和 mEPSCs 频率和幅度值的变化分别与突触前及突触后效应相关。sEPSCs 和 mEPSCs 的频率与突触前谷氨酸递质的释放概率有关,频率的增高或减小反映了单位时间内谷氨酸量子释放的数目增加或减少,由突触前因素决定;而 sEPSCs 和 mEPSCs 的幅度与突触后膜 AMPA 受体敏感性和数目有关,幅度的变大或降低反映突触后膜 AMPA 受体敏感性增加或降低及受体数目的增多或减少,因而由突触后因素决定^[15-16]。 $A\beta_{25-35}$ 可降低 AMPA 受体介导的 sEPSCs 和 mEPSCs 的频率和幅度,提示 $A\beta$ 的作用靶点包括突触前和突触后位点,即既减少突触前谷氨酸递质的释放,又降低突触后谷氨酸能 AMPA 受体数目以及敏感性,从而降低海马神经元突触的兴奋性,造成海马突触损伤,此结果也印证了可溶性 $A\beta$ 可对突触产生神经毒性作用。将贝沙罗汀加入 $A\beta_{25-35}$ 处理过的海马脑片后,AMPA 受体介导的 sEPSCs 和 mEPSCs 的频率和幅度都明显回升,且接近于对照组,提示贝沙罗汀拮抗可溶性 $A\beta$ 对突触的毒性作用是通过作用于突触前和突触后位点,即一方面提高神经元突触前谷氨酸递质的释放,另一方面增加突触后谷氨酸 AMPA 受体的数目以及敏感性,从而发挥保护作用。

综上所述,本实验记录 AMPA 受体介导的 sEPSCs 和 mEPSCs,初步证实了贝沙罗汀可通过突触前和突触后位点对可溶性 $A\beta$ 所致的突触损伤发挥拮抗作用,但其具体机制还有待深入研究。

参考文献:

- [1] Masuzzo A, Dinetti V, Cavanagh C, et al. Amyloidosis in retinal neurodegenerative diseases[J]. *Front Neurol*, 2016, 7:127
- [2] Querfurth H W, Laferla F M. Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 329
- [3] 李靖,付雪斐,孙凤仙,等. β 片层阻断肽 H102 对双转基因 AD 模型小鼠脑内 LPL 和 PPAR- γ 表达的影响[J]. *天津医科大学学报*, 2016, 22(5): 396
- [4] Wang D B, Kinoshita Y, Kinoshita C, et al. Loss of endophilin-B1 exacerbates Alzheimer's disease pathology[J]. *Brain*, 2015, 138(7): 2005
- [5] 王冰艳,孙凤仙,林来祥,等. β 片层阻断肽 H102 对 PAP 小鼠脑内 ERK 信号转导通路的影响[J]. *天津医药*, 2014, 42(7): 650
- [6] Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, et al. A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(14): 4845
- [7] Cramer P E, Cirrito J R, Wesson D W, et al. ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models[J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1503
- [8] Kwon B, Gamache T, Lee H K, et al. Synergistic effects of β -amyloid and ceramide-induced insulin resistance on mitochondrial metabolism in neuronal cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(9): 1810
- [9] 袁小涌,王超,孙凤仙,等. β 片层阻断肽 H102 对双转基因 AD 小鼠突触可塑性相关蛋白的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(4): 293
- [10] Edgar J R, Willén K, Gouras G K, et al. ESCRTs regulate amyloid precursor protein sorting in multivesicular bodies and intracellular amyloid- β accumulation[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(14): 2520
- [11] Jawed S I, Myskowski P L, Horwitz S, et al. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome): part II. Prognosis, management, and future directions[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2014, 70(2): 223.
- [12] Zhaowei L, Yongling X, Jiajia Y, et al. The reduction of EPSC amplitude in CA1 pyramidal neurons by the peroxynitrite donor SIN-1 requires Ca^{2+} influx via postsynaptic non-L-type voltage gated calcium channels[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(2): 361
- [13] Yuan C, Zhang Y, Zhang Y, et al. Effects of ketamine on neuronal spontaneous excitatory postsynaptic currents and miniature excitatory postsynaptic currents in the somatosensory cortex of rats[J]. *Iran J Med Sci*, 2016, 41(4): 275
- [14] Hsieh H, Boehm J, Sato C, et al. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss[J]. *Neuron*, 2006, 52(5): 831
- [15] Tang B, Luo D, Yang J, et al. Modulation of AMPA receptor mediated current by nicotinic acetylcholine receptor in layer I neurons of rat prefrontal cortex[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:14099
- [16] 林杭,孙梅琴,张涛,等.不同阿片受体激动剂对海马培养神经元微小兴奋性突触后电流的影响[J]. *中国临床神经科学*, 2010, 18(1): 10

(2016-11-30 收稿)