

* 专题评述 *

β -淀粉样蛋白 31-35 及 25-35 片段对海马 CA1 细胞兴奋性和抑制性受体通道电流的影响^{*}

张俊芳¹ 侯磊² 高秀萍¹ 郭芬¹ 景玮³ 乔健天¹ 祁金顺^{1**}

1. 山西医科大学生理学系, 太原 030001; 2. 山西省肿瘤医院麻醉科, 太原 030013;

3. 上海交通大学生物医学工程系, 上海 200240

摘要 在 Alzheimer 病(AD)出现神经变性前的早期记忆功能障碍中, 可溶性 β -淀粉样蛋白($A\beta$)发挥了重要作用。 $A\beta$ 及其活性片段对海马长时程增强(LTP)的压抑效应与其对学习记忆认知行为的伤害作用具有密切联系, 但其机制仍不清楚。鉴于突触后兴奋性和抑制性受体/通道在突触传递、包括 LTP 的诱导中起着关键性调制作用, 利用全细胞膜片钳技术观察了 β -淀粉样蛋白 31-35 片段($A\beta_{31-35}$)和 25-35 片段($A\beta_{25-35}$)对急性分离的海马 CA1 区锥体细胞谷氨酸(Glu)受体、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体和 γ -氨基 酸(GABA)受体通道电流的影响。结果显示: 急性给予 $A\beta_{25-35}$ 或 $A\beta_{31-35}$ 可对 Glu 受体电流和 GABA 受体电流产生相反的调制作用。 $A\beta_{25-35}$ 预处理剂量依赖性减小了 Glu 和 NMDA 引起的全细胞内向电流, 相反, GABA 受体电流被明显增强; 小片段的 $A\beta_{31-35}$ 也选择性抑制了 Glu 和 NMDA 受体电流, 增强了 GABA 受体电流; 然而, 给予 $A\beta_{31-35}$ 的反序列 $A\beta_{35-31}$ 预处理后, Glu, NMDA 和 GABA 引起的受体电流均未出现明显改变。这些结果表明, $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 片段急性处理可导致海马锥体细胞 NMDA 受体和 GABA_A受体分别受到抑制和易化影响, 这可能有助于解释 AD 早期可溶性 $A\beta$ 对海马 LTP 及认知行为造成的伤害作用。同时, $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 片段具有的类似效应提示, 31-35 序列很可能是 $A\beta$ 发挥神经毒性作用的活性中心。

关键词 β -淀粉样蛋白($A\beta$) Glu 受体电流 GABA 受体电流 全细胞膜片钳 海马

Alzheimer 病(AD)是一种慢性神经系统退行性疾病, 早期临床表现为短时性记忆伤害和轻微认知功能障碍, 经过数年后, 可逐渐发展为智力减退乃至完全痴呆。有证据显示, 在 AD 出现神经变性前, 可溶性的 β -淀粉样蛋白($A\beta$)寡聚体已经在突触可塑性和早期记忆功能的损害中发挥了重要作用^[1]。海马长时程增强(LTP)是突触可塑性的功能性指标之一, 突触后的 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体和

α -氨基羟甲基异恶唑丙酸(AMPA)受体在 LTP 的诱导和维持过程中起关键作用^[2, 3]。一些研究包括我们先前的实验表明, 可溶性的全长 $A\beta$ ($A\beta_{1-42}$)和它的一些片段, 如 β -淀粉样蛋白 31-35 片段($A\beta_{31-35}$)和 25-35 片段($A\beta_{25-35}$)可压抑海马 LTP^[4-7]。尽管有资料显示, $A\beta$ 及其片段可能通过影响离子通道的功能从而影响细胞自身调节和信号转导^[8], 然而, $A\beta$ 压抑 LTP 的机制目前尚不清楚, 甚至还有相反的

2008-10-06 收稿, 2009-02-09 收修修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 30740095, 30840085)、山西省自然科学基金(批准号: 200601105)、山西省青年科学基金(批准号: 2008021045-2)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20060114004)资助项目

** 通信作者, E-mail: jinshunqi2006@yahoo.com

©1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

报道。例如, Chen 等^[4]发现, $A\beta$ 压抑 LTP 和 NMDA 受体有关, 即 $A\beta_{1-42}$ 减小了齿状回细胞 NMDA 受体介导的突触后电流幅度。相反, Wu^[9] 等报道, 将 $A\beta_{1-40}$ (200 nM) 细胞外孵育或经记录电极细胞内注入 (100 nM) 都可增强齿状回细胞 NMDA 受体电流。同时, Raymond 等^[6] 报道 $A\beta$ 压抑大鼠海马 LTP 与 NMDA 受体的调节无关。另外, γ -氨基丁酸 (GABA) 受体是否参与 $A\beta$ 对 LTP 的伤害, 目前尚不清楚。有研究提示, $A\beta$ 可能通过抑制 GABA 介导的 Cl^- 电流, 增加哺乳动物中枢神经系统神经元的兴奋性^[10]。

另外, $A\beta$ 分子的活性中心尚未完全确认。尽管 $A\beta_{25-35}$ 的神经毒性作用已被广泛报道^[5, 11, 12], 并据此把 $A\beta$ 分子的 25-35 序列视为 $A\beta$ 发挥毒性作用的活性中心, 但尚缺乏关于 $A\beta_{25-35}$ 对谷氨酸 (Glu) 受体和 GABA 受体通道影响的报道。特别是, 本实验室近年来发现, 较 $A\beta_{25-35}$ 更短的 $A\beta_{31-35}$, 具有类似于 $A\beta_{25-35}$ 的致大脑皮层细胞凋亡作用^[13], 且可压抑大电导 Ca^{2+} 激活钾通道 (BK)^[14] 和延迟整流钾通道 (I_k)^[15]。另有研究报道, $A\beta$ 分子 31 号位置上的异亮氨酸, 33 号上的甘氨酸和 35 号上的蛋氨酸被其他氨基酸取代后, $A\beta$ 的氧化应激效应和神经毒性作用被全部取消^[16]。我们还进一步发现, 与 $A\beta_{25-35}$ 相似, $A\beta_{31-35}$ 也可压抑离体^[7] 或在体^[17] 条件下海马 LTP 的诱导。因此, 有理由推测, 31-35 片段可能是全长 $A\beta$ 分子发挥神经毒性作用的更短的一个活性序列。但是, $A\beta_{31-35}$ 是否直接影响突触后的 NMDA/GABA 受体, 尚未见报道。

因此, 我们利用全细胞膜片钳技术观察了急性给予 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 对急性分离的海马 CA1 区锥体细胞 Glu, NMDA 和 GABA 受体通道电流的影响, 以揭示 $A\beta$ 伤害海马 LTP 和认知行为的可能机制; 通过 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 两段效应的比较, 进一步证实 31-35 片段是全长 $A\beta$ 分子发挥神经毒性作用的更短的活性中心。

1 材料与方法

1.1 海马神经元分离

取 7—15 d 的 Wistar 大鼠 (山西医科大学动物中心提供), 雌雄不拘, 乌拉坦麻醉后快速取出大脑并置于氧饱和后的低钙脑脊液 (0—4 °C) 中 1—2 min。随后取出置于冰枕上, 分离出海马, 将其切成 400—

600 μ m 的脑片。将脑片放入盛有 100 mL 人工脑脊液的浴槽中孵育 1 h, 并通以 O_2 和 CO_2 。将孵育好的海马脑片用细针头分离出 CA1 区, 并切成 2—4 片放入含 pronase E (1 mg/mL) 细胞外液的试管中酶解 30 min, 温度 33 °C, 上方通以 O_2 。将酶解好的脑片用细胞外液冲洗 2 次, 放入含 1 mL 细胞外液的试管中, 用尖端热处理过的直径为 300 和 150 μ m 的 Pasteur 吸管连续吹打, 使组织分散, 细胞游离。试管静置 1—2 min, 取上部细胞悬液, 加到培养皿上。待细胞贴壁后, 用吸管轻轻吸出多余的组织碎片和未贴壁的细胞, 加入 2 mL 洁净细胞外液。此时即可在倒置显微镜下观察细胞形态, 选择表面光洁、突起相对完整、胞体呈锥形或椭圆形的锥体细胞进行膜片钳记录。整个实验在室温为 25 ± 1 °C 的条件下进行。

1.2 溶液

实验中所用到的溶液成分如下 (mmol/L): (1) 人工脑脊液: NaCl 126, KCl 5, $MgSO_4$ 2, $CaCl_2$ 2, 葡萄糖 10, $NaHCO_3$ 25, NaH_2PO_4 1.5 (用 NaOH 将 pH 值调至 7.4); (2) 低钙人工脑脊液: NaCl 126, KCl 5, $MgSO_4$ 2, $CaCl_2$ 0.2, 葡萄糖 10, $NaHCO_3$ 25, NaH_2PO_4 1.5 (用 NaOH 将 pH 值调至 7.4); (3) 细胞外液: NaCl 130, KCl 5.4, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1, 葡萄糖 25, HEPES 10 (用 NaOH 将 pH 值调至 7.4); (4) 记录 NMDA 受体电流的细胞外液: NaCl 128, 葡萄糖 30, HEPES 25, KCl 5, $CaCl_2$ 2, CNQX 10 μ mol/L, 甘氨酸 20 μ mol/L (用 NaOH 将 pH 值调至 7.3); (5) 电极液 1 (记录 Glu 和 NMDA 受体电流): K^+ -Gluconate 125, KCl 10, EGTA 2, HEPES 10, Tris-phosphocreatine 10, MgATP 4, Na_2GTP 0.5 (用 KOH 将 pH 值调至 7.3); (6) 电极液 2 (记录 GABA 受体电流): KCl 135, Tris-phosphocreatine 10, EGTA 2, HEPES 10, MgATP 4, Na_2GTP 0.5 (用 KOH 将 pH 值调至 7.3)。

1.3 全细胞膜片钳记录

记录用玻璃微电极经两步垂直微电极拉制仪 (PP-830, Narishinge) 拉制而成, 内充电极液后电极阻抗为 5—10 M Ω 。记录前, 将河豚毒 (TTX) 0.2 μ mol/L 加入细胞外液 (当记录 NMDA 受体电流时使用记录 NMDA 受体电流的细胞外液) 以阻断电

压门控 Na^+ 通道. 在记录电极浸入细胞外液之前, 先给电极施加正压, 接触细胞膜时, 释放正压并给以连续负压, 使玻璃微电极尖端与细胞膜之间形成高阻抗封接(达 $1\text{ G}\Omega$ 以上), 负压破膜, 使电极液与细胞内液相通. 实验过程中膜电位被钳制在 -60 mV . 待电流反应稳定后即开始记录. 使用 NMDA 受体拮抗剂 MK801 和 GABA_A 受体拮抗剂荷包牡丹碱(bicuculline)分别验证 NMDA 受体和 GABA_A 受体开放时引起的全细胞电流. 跨膜电流经滤波(5 kHz)、放大(Axopatch 200B, USA)、数模转换(Digidata 1200B, USA)和观察记录(Clampex 6.04)后, 全部数据存于计算机硬盘. 离线分析采用 Clampfit 9.0 软件.

1.4 药物应用

$\text{A}\beta_{25-35}$, $\text{A}\beta_{31-35}$, $\text{A}\beta_{35-31}$, Glu, NMDA, GABA 和甘氨酸(Gly)均购自美国 Sigma 公司; pronase E 购自德国 Merck 公司, 所有药物贮存于 -20°C . 给药前, 用细胞外液将药物稀释到终浓度(当记录 NMDA 受体电流时, 所使用的药物被溶解在记录 NMDA 所需的细胞外液中). 应用平行排管快速重力给药系统将终浓度药物直接给在被记录神经元胞体周围, 给药管尖端与被记录神经元胞体之间的距离约 $100\ \mu\text{m}$.

1.5 统计分析

测量受体激动剂(Glu, NMDA, GABA)诱发的受体通道电流幅度的峰值, 根据电流幅度和神经元膜电容计算出电流密度(pA/pF). 以 $\text{A}\beta$ 预处理前 pA/pF 作为 100% , 计算 $\text{A}\beta$ 预处理后 pA/pF 变化的百分比值. 数据以均数 \pm 标准误($\bar{X} \pm \text{SE}$)表示, 统计分析采用 SPSS 12.0 软件行配对 t 检验和单因素方差分析(ANOVA), $p < 0.05$ 为显著性标准.

2 结果

2.1 $\text{A}\beta_{25-35}$ 和 $\text{A}\beta_{31-35}$ 压抑谷氨酸受体电流

兴奋性氨基酸(EAA)受体在海马 LTP 诱导中发挥有重要作用, 故本实验首先观察了 $\text{A}\beta_{25-35}$ 或 $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理前后 Glu 电流(I_{Glu})的变化. 我们发现, 单独给予高浓度($10\ \mu\text{mol/L}$)的 $\text{A}\beta_{31-35}$, $\text{A}\beta_{25-35}$ 或 $\text{A}\beta_{35-31}$ 均不出现任何明显的跨膜电流, 但 $\text{A}\beta_{25-35}$ 或 $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理显著地减小了 Glu 引起的全细胞内向

电流. 图 1 显示了 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对 I_{Glu} 的抑制效应. 不同浓度 $\text{A}\beta_{25-35}$ 预处理前后 Glu (1 mmol/L) 诱发的原始全细胞电流见图 1(a)–(c). 可见, $0.1\ \mu\text{mol/L}$ (a), $1\ \mu\text{mol/L}$ (b) 和 $10\ \mu\text{mol/L}$ (c) $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理后, I_{Glu} 显著减小; $\text{A}\beta_{25-35}$ 洗脱后 10 min 时, I_{Glu} 基本恢复到对照水平即给药前水平, 表明 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对 I_{Glu} 的抑制效应具有可逆性. 统计学处理(图 1(d))表明, $\text{A}\beta_{25-35}$ 剂量依赖性地压抑了 I_{Glu} . 使用不同浓度的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 预处理后 5 min 时, I_{Glu} 的 pA/pF 值由 $\text{A}\beta_{25-35}$ 预处理前的对照值 (100%), 分别下降到 $(59.5 \pm 4.5)\%$ ($p < 0.01$), $(47.4 \pm 2.9)\%$ ($p < 0.01$) 和 $(42.0 \pm 4.4)\%$ ($p < 0.01$), 和对照相比均有统计学差异, 且 $0.1\ \mu\text{mol/L}$ 和 $10\ \mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 组相比也有统计学差异 ($p < 0.05$). 图 1(e) 显示了 $\text{A}\beta_{25-35}$ 预处理对 I_{Glu} 的压抑还具有时间依赖性特征. 如 $\text{A}\beta_{25-35}$ ($0.1\ \mu\text{mol/L}$) 预处理 30 s , I_{Glu} 减小到对照的 $(80.8 \pm 4.2)\%$ ($n=11$, $p < 0.05$), 而 5 min 后, 进一步下降到 $(59.5 \pm 4.5)\%$ ($p < 0.01$).

与 $\text{A}\beta_{25-35}$ 的效应类似, $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理也显著减小了 I_{Glu} (图 2). 在相同的实验条件下, $\text{A}\beta_{31-35}$ ($1\ \mu\text{mol/L}$) 预处理 5 min 可逆性地减小了 Glu (1 mmol/L) 诱发的电流(图 2(a)); 而 $\text{A}\beta_{31-35}$ 的反式序列, 即 $\text{A}\beta_{35-31}$ ($1\ \mu\text{mol/L}$) 预处理, 对 Glu (1 mmol/L) 诱发的电流没有明显影响(图 2(b)). 正如图 2(c) 所示, 和预处理前相比, $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理 5 min 后的平均 I_{Glu} 下降到 $(59.7 \pm 7.0)\%$ ($n=8$, $p < 0.01$), 而 $\text{A}\beta_{35-31}$ 预处理后 I_{Glu} 仍然维持在 $(93.0 \pm 6.4)\%$ ($p > 0.7$).

2.2 $\text{A}\beta_{25-35}$ 和 $\text{A}\beta_{31-35}$ 选择性地压抑 NMDA 受体电流

NMDA 受体的激活在海马 LTP 诱导过程中是至关重要的, 故本实验进一步观察了 $\text{A}\beta$ 是否影响 NMDA 受体电流(I_{NMDA}). 在含 $20\ \mu\text{mol/L}$ 甘氨酸和无 Mg^{2+} 的细胞外液中 NMDA 受体能被充分激活. 图 3(a)–(c) 显示了钳制电位在 -60 mV 时典型的 NMDA ($100\ \mu\text{mol/L}$) 诱发的海马锥体细胞 I_{NMDA} . $1\ \mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 或 $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理显著压抑了 I_{NMDA} , 而 $\text{A}\beta_{35-31}$ 预处理对 I_{NMDA} 无显著影响. 应用 $\text{A}\beta_{25-35}$ ($1\ \mu\text{mol/L}$) 和 $\text{A}\beta_{31-35}$ ($1\ \mu\text{mol/L}$) 预处理 5 min 后, NMDA 受体 pA/pF 值分别由对照组的 100% 下降到 $(58.5 \pm 6.4)\%$ ($n=5$, $p < 0.01$) 和 $(48.2 \pm 4.8)\%$ ($n=5$, $p < 0.01$); 然而, $\text{A}\beta_{35-31}$ 预处理后

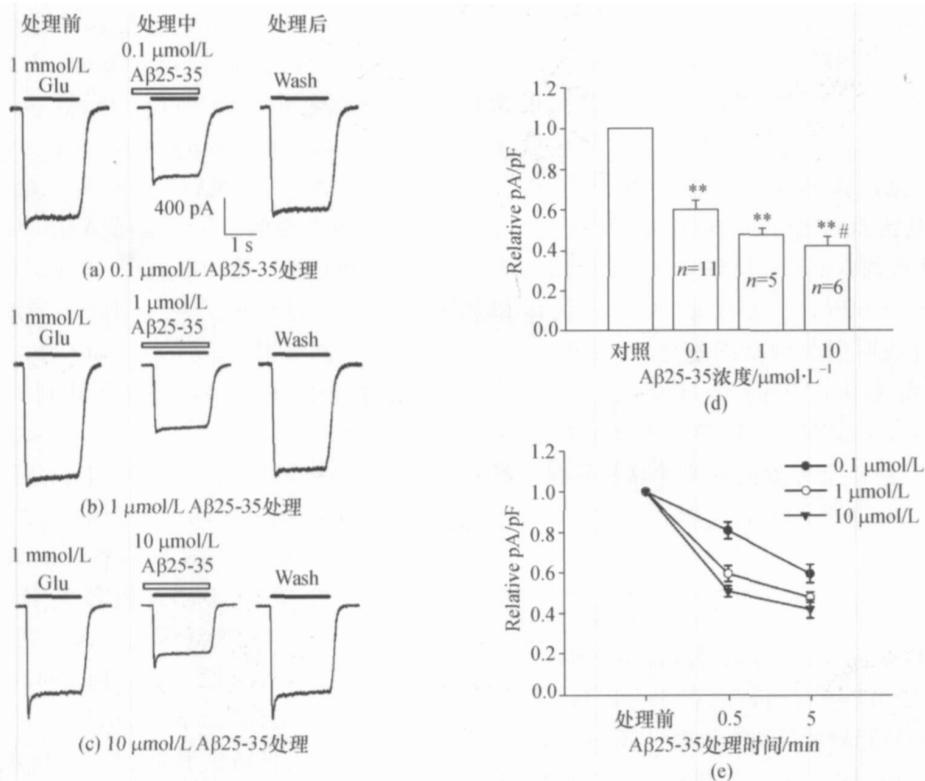


图 1 Aβ₂₅₋₃₅抑制海马 CA1 锥体细胞 I_{Glu}

(a), (b), (c) Aβ₂₅₋₃₅处理前、处理中及洗脱后典型的 I_{Glu}记录。获得的电流图均来自同一神经元；(d) 不同浓度的 Aβ₂₅₋₃₅预处理对 I_{Glu}效应的统计学结果比较。* 代表和对照组比 p<0.01。# 代表和 0.1 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅组比 p<0.05；(e) 增加 Aβ₂₅₋₃₅预处理时间可加强 I_{Glu}压抑效应

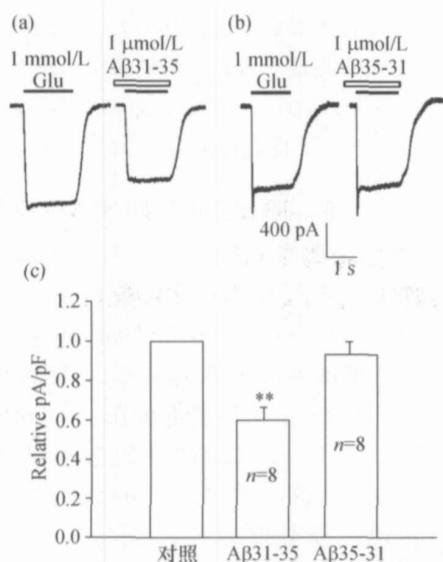


图 2 Aβ₃₁₋₃₅和反序列 Aβ₃₅₋₃₁预处理对 Glu 诱发电流效应的比较

(a) Aβ₃₁₋₃₅和 (b) Aβ₃₅₋₃₁预处理前后的 I_{Glu}典型原始图，所有记录均来自同一神经元；(c) Aβ₃₁₋₃₅和 Aβ₃₅₋₃₁预处理对 I_{Glu}效应的统计学结果比较。* 代表和对照组比 p<0.01

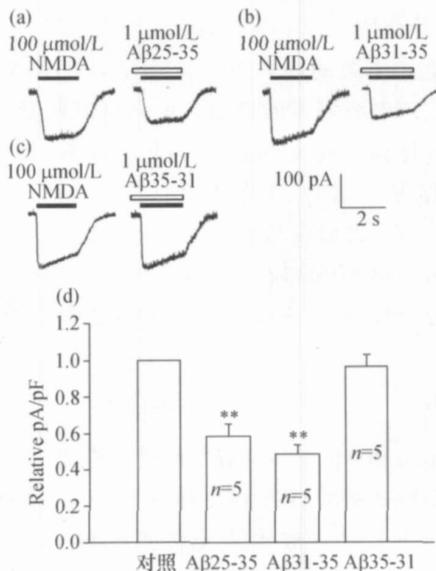


图 3 Aβ₂₅₋₃₅和 Aβ₃₁₋₃₅有效抑制海马 CA1 锥体细胞 I_{NMDA}图

(a) Aβ₂₅₋₃₅；(b) Aβ₃₁₋₃₅和 (c) Aβ₃₅₋₃₁预处理前后 NMDA (100 μmol/L) 引起的 I_{NMDA}。所有记录来自同一神经元。(d) 3 种 Aβ 片段预处理对 I_{NMDA}效应的统计学结果比较。* 代表和对照组比 p<0.01

I_{NMDA} 为 $(95.9 \pm 8.2)\%$ ($n=5, p > 0.05$), 没有显著影响(图 3(d)). 同时, 两种 $A\beta$ 片段 ($A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$) 对 I_{NMDA} 的压抑效应仍然表现出可逆性特征(未示). 该结果提示, $A\beta$ 短期处理能够直接影响突触后神经元 NMDA 受体的功能活动, 而和突触前谷氨酸的释放无关.

2.3 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 增强 GABA 受体电流

为了了解 $A\beta$ 片段是否影响海马锥体细胞 GABA_A 受体的功能活动, 我们观察了急性给予 $A\beta_{25-35}$, $A\beta_{31-35}$ 和 $A\beta_{35-31}$ 对 GABA ($100 \mu\text{mol/L}$ 和 1mmol/L) 所引起的 GABA 受体电流 (I_{GABA}) 的影响. 在钳制电位为 -60mV , 使用高 Cl^- (135mmol/L) 电极内液以保证 Cl^- 具有足够的外向电化学驱动力的条件下, 我们可靠地记录到了 GABA 受体通道开放时的全细胞内向电流. 图 4(a) 显示了在同一神经元上, 应用不同浓度 GABA 诱发的 I_{GABA} . 图 4(b) 比较了不同浓度 GABA 引起的 I_{GABA} 的剂量效应关系. $10 \mu\text{mol/L}$, $50 \mu\text{mol/L}$, $100 \mu\text{mol/L}$ 和 1mmol/L GABA 诱发的 I_{GABA} 平均 pA/pF 值分别为 83.0 ± 17.6 , 149.2 ± 33.6 , 191.1 ± 35.5 和 230.5 ± 36.7 ($n=12$). 有趣的是, 与 I_{Glu} 和 I_{NMDA} 相反, 应用 $A\beta_{25-35}$ ($1 \mu\text{mol/L}$) 或 $A\beta_{31-35}$ ($1 \mu\text{mol/L}$) 预处理后, GABA ($100 \mu\text{mol/L}$) 诱发的 I_{GABA} 被显著增强了. 图 5 示 $A\beta_{25-35}$ ($1 \mu\text{mol/L}$) 预处理 30 s 后, GABA ($100 \mu\text{mol/L}$) 引起的电流略有增加, 达对照组的

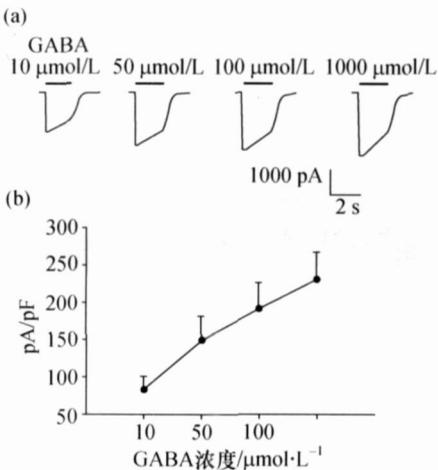


图 4 不同浓度 GABA 诱导的海马锥体细胞 I_{GABA} 图
(a) 不同浓度 GABA 引起的代表性的 I_{GABA} , 各电流记录均来自同一神经元; (b) I_{GABA} 的剂量依赖性效应观察

($116.5 \pm 18.6\%$) ($n=5, p > 0.05$); 预处理 5 min 后, GABA 受体电流进一步增大到 $(150.3 \pm 34.8)\%$ ($p < 0.05$), 显著大于处理前的对照值(图 5(a)). 同样浓度的 $A\beta_{31-35}$ 也具有增强 I_{GABA} 的效应. $A\beta_{31-35}$ ($1 \mu\text{mol/L}$) 预处理 30 s 后, GABA 电流即明显增加 ($(145.8 \pm 15.3)\%$, $n=6, p < 0.05$); 预处理 5 min 后, 达 $(138.1 \pm 18.6)\%$ ($p < 0.05$) (图 5(b)). 而在相同时间点, $A\beta_{35-31}$ 预处理没有引起 I_{GABA} 的增加 ($(103.5 \pm 3.7)\%$, $(93.5 \pm 5.8)\%$, $p > 0.05, n=6$) (图 5(c)). 图 5(d) 显示了不同 $A\beta$ 片段预处理 5 min 后的 I_{GABA} 平均 pA/pF 值.

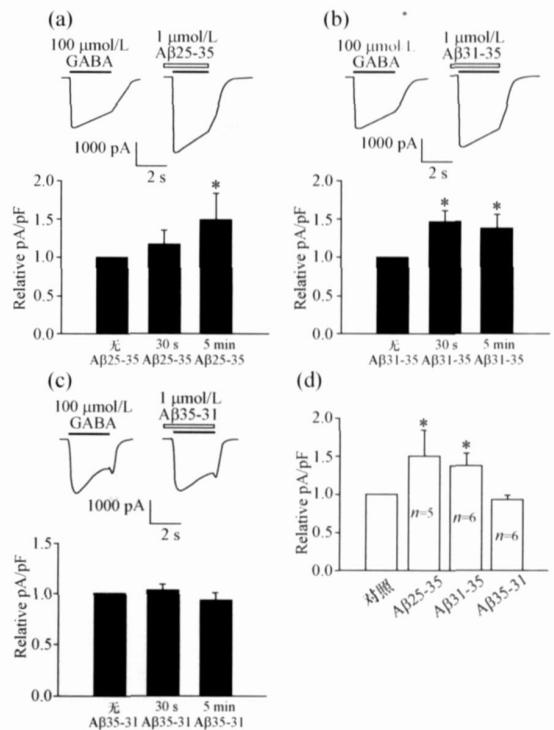


图 5 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 增强了 $100 \mu\text{mol/L}$ GABA 诱发的 I_{GABA} 图
(a) — (c) 上方分别显示 $A\beta_{25-35}$, $A\beta_{31-35}$ 和 $A\beta_{35-31}$ 预处理前后具有代表性的 I_{GABA} . 下方柱状图分别显示不同 $A\beta$ 片段预处理 30 s 和 5 min 后平均 pA/pF 值的变化; (d) 不同 $A\beta$ 片段预处理 5 min 后 I_{GABA} 比较. * 代表和对照组比 $p < 0.05$

在相同的实验条件下, 给予高浓度 GABA (1mmol/L) 作为激动剂时, $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 也同样具有增强 I_{GABA} 的作用. $A\beta_{25-35}$ 预处理 30 s 和 5 min 后(图 6(a)), 高浓度 GABA 引起的 I_{GABA} 分别增加到 $(117.9 \pm 16.4)\%$ ($n=5, p > 0.05$) 和 $(160.5 \pm 24.1)\%$ ($p < 0.01$). 高浓度 GABA 激发的 I_{GABA} 在

同浓度 $A\beta_{31-35}$ 预处理条件下分别是 $(112.2 \pm 8.1)\%$ ($n=6$, $p>0.05$) 和 $(133.2 \pm 6.4)\%$ ($p<0.05$) (图 6(b)). 反序列的 $A\beta_{35-31}$ 预处理后, 高浓度 GABA 引起的 I_{GABA} 无明显改变, 分别为 $(91.2 \pm 3.9)\%$ 和 $(95.2 \pm 10.6)\%$ (图 6(c), $n=5$, $p>0.05$). 图 6(d) 总结并比较了不同 $A\beta$ 片段预处理 5 min 后 1 mmol/L GABA 诱发的 I_{GABA} 平均 pA/pF 值.

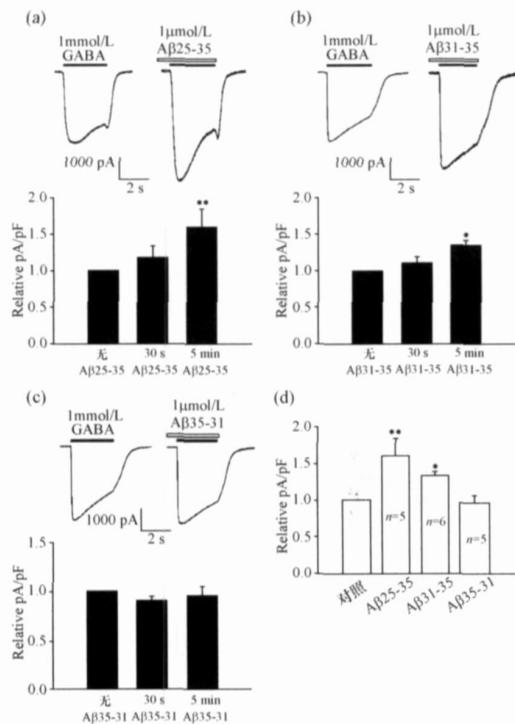


图 6 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 对高浓度 GABA (1 mmol/L) 诱发的 I_{GABA} 的影响

(a) — (c) 上方分别显示 $A\beta_{25-35}$, $A\beta_{31-35}$ 和 $A\beta_{35-31}$ 预处理前后具有代表性的 I_{GABA} . 下方柱状图分别显示不同 $A\beta$ 片段预处理 30 s 和 5 min 后平均 pA/pF 值的变化. (d) 不同 $A\beta$ 片段预处理 5 min 后 I_{GABA} 变化比较. * 和对照组比 $p<0.05$ ** 和对照组比 $p<0.01$

3 讨论

先前的实验包括我们的研究已经证实, 急性给予 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 可显著压抑海马 LTP 的诱导. 为了进一步明确其细胞分子机制, 本研究利用全细胞膜片钳技术观察了 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 对急性分离的海马 CA1 锥体神经元兴奋性和抑制性受体, 包括 Glu 受体、NMDA 受体和 GABA_A 受体电流的影响. 结果发现急性给予 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 对海马锥体细胞

Glu 受体和 GABA 受体电流分别具有抑制和易化作用.

3.1 $A\beta$ 片段对兴奋性受体电流的影响

尽管 $A\beta$ 对 LTP 的影响报道不一, 但多数文献报道无论在体^[15, 18, 19] 或离体^[4, 6, 12, 20, 21] 条件下 $A\beta$ 均可抑制海马 LTP. 本研究发现, 急性给予 $A\beta_{25-35}$ 或 $A\beta_{31-35}$ 可减小海马锥体细胞 Glu 受体电流, 这可能有助于解释 $A\beta$ 对海马 LTP 产生的抑制效应.

目前, 关于 $A\beta$ 分子毒性作用的研究大多集中在与 Glu 受体相关的神经元变性及其机制研究方面, 且报道不一. 例如, $A\beta_{25-35}$ 可增强 Glu 引起的海马神经元变性^[22]; $A\beta_{1-42}$ 或 $A\beta_{25-35}$ 可增强海马神经元对 NMDA 的反应性^[23]; $A\beta_{25-35}$ 通过增强海马神经元 NMDA 受体活性而使得细胞内 Ca^{2+} 浓度增加^[24, 25]. 总之, 这些研究认为 $A\beta$ 参与了 Glu 引起的细胞兴奋毒过程, 最终引发神经变性和细胞死亡. 然而, 也有不同的实验报道. Szegedi 等^[26] 发现 $A\beta_{1-42}$ 增强了 NMDA 引发的动作电位发放, 而降低了 AMPA 受体介导的反应; Chen 等^[4] 报道, 新鲜配制的亚神经毒浓度的 $A\beta_{1-42}$ ^[27, 28] 可抑制海马齿状回 LTP 和降低齿状回颗粒细胞 NMDA 受体介导的突触电流幅度. 我们的实验结果支持 Chen 等的结论: NMDA 受体通道的抑制可能是早期 AD 中 $A\beta$ 伤害 LTP 的机制之一. 最近有文献报道, 蛋白激酶 C (PKC) 可能介导了 $A\beta$ 引起的额叶皮质锥体细胞 NMDA 受体通道电流的抑制^[29]. 另外, 本研究室最近的实验结果也提示 PKC 可能介导了 $A\beta_{31-35}$ 引起的海马 LTP 压抑^[30]. 这些资料表明, PKC 活性的改变可能是 $A\beta$ 引起 NMDA 受体电流减小的原因之一.

在突触活动过程中, NMDA 受体^[31], AMPA 受体^[32] 或电压门控 Ca^{2+} 通道^[33] 开放引起的 Ca^{2+} 内流可使 NMDA 受体通道失活或脱敏^[34], 缩短通道开放的时程^[35]. 有研究发现在培养的大鼠海马神经元, NMDA 受体通道脱敏是钙调素依赖性的. Chen 等^[4] 进一步证实了钙调素使 NMDA 受体脱磷酸化参与了 $A\beta$ 引起的海马 LTP 损害. 据此我们推测, $A\beta$ 引起 Ca^{2+} 内流甚至钙超载可激活钙调素, 进而促进 NMDA 受体脱敏, Ca^{2+} 内流减少, 从而表现出对 NMDA 受体依赖性的 LTP 的压抑效应^[36-38].

因此, $A\beta$ 抑制海马神经元 Glu 和 NMDA 受体通道电流可较好地解释 $A\beta$ 引起的海马 LTP 损害. 但 Nomura 等^[39] 和 Raymond 等^[6] 认为, $A\beta$ 对 LTP 的伤害是 NMDA 受体或 L 型电压依赖性钙通道(VD-CC)非依赖性的. 综合这些结果进行分析, 我们认为, 不同的结论可能是由于 NMDA 亚基在受体发育的不同阶段表达不同所造成的. 众所周知, NMDA 受体是一个多亚基复合物, 包含一个 NR1 亚单位和一个或多个 NR2(NR2A, 2B, 2C 和 2D)亚单位. 中枢神经系统发育的不同时期, NMDA 受体亚型的表达存在选择性, 这一动态变化可影响 NMDA 受体的功能, 从而影响突触可塑性^[40]. 本实验采用小于 2 周龄的大鼠, 此阶段 NR2B 亚单位是 NMDA 受体的主要组成成分. 因此, 我们的结果中, $A\beta$ 对 NMDA 受体电流的调制作用可能是基于 NR2B 亚单位的成分.

3.2 $A\beta$ 片段对 GABA 受体电流的影响

在引起早期 AD 海马 LTP 伤害的突触后因素的研究中, 对于抑制性突触的改变了解甚少. GABA 能中间神经元释放的 GABA 是哺乳动物中枢神经系统重要的抑制性神经递质, 分别和锥体细胞膜上的两种不同亚型的受体结合, 即 $GABA_A$ 和 $GABA_B$ 受体^[41, 42]. GABA 与 $GABA_A$ 受体结合激活了 Cl^- 通道使细胞膜超极化; 与 $GABA_B$ 受体结合, 通过 G 蛋白耦联受体激活 K^+ 通道, 降低神经兴奋性^[43]. 抑制性突触环路的减弱如同突触后细胞兴奋性的增加, 在调节 LTP 过程中发挥着重要作用. 因此, 使用 Picrotoxin 阻断 GABA 受体可增强兴奋性突触后电位(EPSP)^[44]. 另有研究报道, Ca^{2+} 内流通过激活 Ca^{2+} 依赖性磷酸酶 2B 压低了 GABA 能信号转导通路, 并由此易化了 EPSP 和动作电位的偶联^[45]. 相反, 如果海马 GABA 受体功能活动增强, 势必会影响突触后神经元的兴奋性, 进而影响突触传递和 LTP. 本研究首次发现急性给予 $A\beta_{25-35}$ 或 $A\beta_{31-35}$ 显著增强了 GABA 诱导的全细胞电流. 由此我们推测, $A\beta$ 增强 GABA 受体电流进而抑制兴奋性突触后受体活性可能是 $A\beta$ 压抑海马 LTP 的机制之一.

总之, 本实验结果证实, 急性给予 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 可对急性分离的海马 CA1 锥体细胞兴奋性的 NMDA 受体和抑制性的 $GABA_A$ 受体产生相反的调

制作用. 这一结果有助于解释 $A\beta$ 引起的海马 LTP 伤害, 有助于进一步认识 AD 早期 $A\beta$ 对突触可塑性和认知行为造成伤害的神经机制. 同时, 实验结果也支持我们先前的假设: 31-35 片段可能是 $A\beta$ 分子发挥神经毒性作用的活性中心. 然而, 伴随 AD 病程的发展, $A\beta$ 对突触传递的效应可能不同于 AD 的早期阶段^[46, 47], $A\beta$ 对兴奋性和抑制性受体的调制作用在不同阶段也可能有不同的表现.

参 考 文 献

- Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 2002, 298(5594): 789-791
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*, 1983, 334: 33-46
- Kullmann DM. Amplitude fluctuations of dual-component EPSCs in hippocampal pyramidal cells; Implications for long-term potentiation. *Neuron*, 1994, 12(5): 1111-1120
- Chen QS, Wei WZ, Shimahara T, et al. Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem*, 2002, 77(3): 354-371
- Freir DB, Holscher C, Herron CE. Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. *J Neurophysiol*, 2001, 85(2): 708-713
- Raymond CR, Ireland DR, Abraham WC. NMDA receptor regulation by amyloid-beta does not account for its inhibition of LTP in rat hippocampus. *Brain Res*, 2003, 968(2): 263-272
- Ye L, Qiao JT. Suppressive action produced by beta-amyloid peptide fragment 31-35 on long-term potentiation in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-independent: it's offset by (-)-huperzine A. *Neurosci Lett*, 1999, 275(3): 187-190
- Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Ionic effects of the Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein and its metabolic fragments. *Trends Neurosci*, 1997, 20(2): 67-72
- Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport*, 1995, 6(17): 2409-2413
- Sawada M, Ichinose M. Amyloid beta proteins reduce the GABA-induced Cl^- current in identified Aplysia neurons. *Neurosci Lett*, 1996, 213(3): 213-215
- Brorson JR, Bindokas VP, Iwama T, et al. The Ca^{2+} influx induced by beta-amyloid peptide 25-35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. *J Neurobiol*, 1995, 26(3): 325-338
- Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y, et al. Impairment of hipp

- ocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *J Neurosci Res*, 2000, 60(1): 65—72
- 13 Yan XZ, Qiao JT, Dou Y, et al. Beta-amyloid peptide fragment 31-35 induces apoptosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience*, 1999, 92(1): 177—184
 - 14 Qi JS, Qiao JT. Amyloid beta-protein fragment 31-35 forms ion channels in membrane patches excised from rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 2001, 105(4): 845—852
 - 15 Qi JS, Ye L, Qiao JT. Amyloid beta-protein fragment 31-35 suppresses delayed rectifying potassium channels in membrane patches excised from hippocampal neurons in rats. *Synapse*, 2004, 51(3): 165—172
 - 16 Misiti F, Sampaiolese B, Pezzotti M, et al. Abeta(31-35) peptide induce apoptosis in PC 12 cells: Contrast with Abeta(25-35) peptide and examination of underlying mechanisms. *Neurochem Int*, 2005, 46(7): 575—583
 - 17 Zhang JM, Wu MN, Qi JS, et al. Amyloid beta-protein fragment 31-35 suppresses long-term potentiation in hippocampal CA1 region of rats *in vivo*. *Synapse*, 2006, 60(4): 307—313
 - 18 Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, et al. Block of LTP in rat hippocampus *in vivo* by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport*, 1997, 8(15): 3213—3217
 - 19 Cullen WK, Wu J, Anwyl R, et al. beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport*, 1996, 8(1): 87—92
 - 20 Itoh A, Akaïke T, Sokabe M, et al. Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of beta-amyloid-infused rats. *Eur J Pharmacol*, 1999, 382(3): 167—175
 - 21 Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, et al. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases cJun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci*, 2004, 24: 3370—3378
 - 22 Gray CW, Patel AJ. Neurodegeneration mediated by glutamate and beta-amyloid peptide: A comparison and possible interaction. *Brain Res*, 1995, 691(1—2): 169—179
 - 23 Molnar Z, Soos K, Lengyel I, et al. Enhancement of NMDA responses by beta-amyloid peptides in the hippocampus *in vivo*. *Neuroreport*, 2004, 15(10): 1649—1652
 - 24 Mogensen HS, Beatty DM, Morris SJ, et al. Amyloid beta-peptide(25-35) changes $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal neurons. *Neuroreport*, 1998, 9(7): 1553—1558
 - 25 Qiu Z, Gruol DL. Interleukin-6, beta-amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons. *J Neuroimmunol*, 2003, 139(1—2): 51—57
 - 26 Szegedi V, Juhasz G, Budai D, et al. Divergent effects of Abeta(1-42) on ionotropic glutamate receptor-mediated responses in CA1 neurons *in vivo*. *Brain Res*, 2005, 1062(1—2): 120—126
 - 27 Pappolla MA, Sos M, Omar RA, et al. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci*, 1997, 17(5): 1683—1690
 - 28 Ueda K, Shinohara S, Yagami T, et al. Amyloid beta protein potentiates Ca^{2+} influx through L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels: A possible involvement of free radicals. *J Neurochem*, 1997, 68(1): 265—271
 - 29 Tyszkiewicz JP, Yan Z. beta-Amyloid peptides impair PKC-dependent functions of metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortical neurons. *J Neurophysiol*, 2005, 93(6): 3102—3111
 - 30 Zhang JF, Qi JS, Qiao JT. Protein kinase C mediates amyloid beta-protein fragment 31-35-induced suppression of hippocampal late-phase long-term potentiation *in vivo*. *Neurobiol Learn Mem*, 2009, 91(3): 226—234
 - 31 Tong G, Shepherd D, Jahr CE. Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science*, 1995, 267(5203): 1510—1512
 - 32 Kyzozis A, Goldstein PA, Heath MJ, et al. Calcium entry through a subpopulation of AMPA receptors desensitized neighbouring NMDA receptors in rat dorsal horn neurons. *J Physiol*, 1995, 485(2): 373—381
 - 33 Legendre P, Rosenmund C, Westbrook GL. Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium. *J Neurosci*, 1993, 13(2): 674—684
 - 34 McBain CJ, Mayer ML. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev*, 1994, 74(3): 723—760
 - 35 Liebeman DN, Mody I. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca^{2+} -dependent phosphatase. *Nature*, 1994, 369(6477): 235—239
 - 36 Colino A, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths *in vitro*. *J Neurophysiol*, 1993, 69(4): 1150—1159
 - 37 Nguyen PV, Kandel ER. A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J Neurosci*, 1996, 16(10): 3189—3198
 - 38 Xie CW, Lewis DV. Opioid-mediated facilitation of long-term potentiation at the lateral perforant path-dentate granule cell synapse. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991, 256(1): 289—296
 - 39 Nomura I, Kato N, Kita T, et al. Mechanism of impairment of long-term potentiation by amyloid beta is independent of NMDA receptors or voltage-dependent calcium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci Lett*, 2005, 391(1—2): 1—6
 - 40 Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, et al. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 2005, 46(5): 745—760

- 41 DeFeudis FV. GABA-receptors in the vertebrate nervous system. *Prog Neurobiol*, 1977, 9(3): 123—145
- 42 Bowerly NG, Hudson AL, Price GW. GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 1987, 20(2): 365—383
- 43 Sivilotti L, Nistri A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 1991, 36(1): 35—92
- 44 Abraham WC, Gustafsson B, Wigstrom H. Long-term potentiation involves enhanced synaptic excitation relative to synaptic inhibition in guinea-pig hippocampus. *J Physiol*, 1987, 394: 367—380
- 45 Lu YM, Mansuy IM, Kandel ER, et al. Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron*, 2000, 26(1): 197—205
- 46 Louzada PR, Paula Lima AC, Mendonca-Silva DL, et al. Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and glutamate receptor agonists; activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders. *FASEB J*, 2004, 18(3): 511—518
- 47 Zhong P, Gu Z, Wang X, et al. Impaired modulation of GABAergic transmission by muscarinic receptors in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 2003, 278(29): 26888—26896