

研究论文

不同浓度降钙素基因相关肽对小鼠海马区长时程增强的影响

武鑫, 郑婉君, 吕明惠, 苏少华, 张松江, 高剑峰*

河南中医药大学基础医学院生理学学科, 郑州 450008

摘要: 本研究旨在探讨不同浓度的降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)对小鼠海马长时程增强的影响。将30日龄C57BL/6J小鼠随机分为空白组、不同浓度(50, 100, 200 nmol/L) CGRP组, CGRP + CGRP阻断剂组, 每组10只。外源性给予海马区脑片不同浓度的CGRP, 用离体细胞外场电位记录检测其对小鼠海马突触传递及长时程增强的影响。结果显示, 给予不同浓度CGRP对小鼠海马突触前递质的释放没有明显的影响, 但100和200 nmol/L CGRP可易化海马长时程增强的诱发, 表现为长时程增强幅度的增加, 并且这一作用可被CGRP特异性阻断剂CGRP₈₋₃₇阻断。以上结果提示, CGRP可通过特异性受体浓度依赖性促进小鼠海马长时程增强的诱发。

关键词: 降钙素基因相关肽; 海马区; 突触可塑性; 学习记忆

中图分类号: R338.64

Effect of different concentrations of calcitonin gene-related peptide on the long-term potentiation in hippocampus of mice

WU Xin, ZHENG Wan-Jun, LV Ming-Hui, SU Shao-Hua, ZHANG Song-Jiang, GAO Jian-Feng*

Department of Physiology, School of Basic Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

Abstract: The purpose of this study was to explore the effects of different concentrations of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on long-term potentiation (LTP) in the hippocampus of mice. C57BL/6J mice (30 days old) were randomly divided into control group, three CGRP groups, and CGRP + CGRP₈₋₃₇ group (10 mice for each group). Different concentrations of CGRP (50, 100 and 200 nmol/L) were given to the hippocampal slices of mice. The presynaptic release of neurotransmitters and the induction of LTP were measured by extracellular field recording techniques. The result showed that different concentrations of CGRP did not affect the presynaptic release of neurotransmitters, but 100 and 200 nmol/L CGRP increased the amplitude of LTP induced in the hippocampus of mice. This facilitation effect of CGRP was blocked by its specific antagonist CGRP₈₋₃₇. These results suggest that CGRP dose-dependently facilitates the induction of LTP in the hippocampus of mice through its specific receptor.

Key words: calcitonin gene-related peptide; hippocampus; synaptic plasticity; learning and memory

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 与降钙素基因同源, 是在 1983 年由 Rosenfeld 等发现的一种新型神经肽类物质^[1]。研究表明 CGRP 在中枢神经系统中分布广泛, 并且与认知及学习记忆功能密切相关^[2, 3]。有研究显示, 在终纹

状核 (bed nucleus of stria terminalis, BNST) 给予 CGRP 可使小鼠焦虑行为增加^[4]。此外, 研究表明 CGRP 可与其他神经递质及神经肽类物质共存并相互作用, 并且对神经元具有一定的营养与保护作用, 可减轻脑部缺血所引起的学习记忆功能的损伤^[5-7]。

Received 2017-04-26 Accepted 2017-08-28

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81373852), the Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province, China (No. 15A310019) and PhD Research Fund of Henan University of Traditional Chinese Medicine, China (No. BSJJ-201510).

*Corresponding author. Tel: +86-371-65676898; E-mail: jc.gjfeng@hotmail.com

而在 2015 年, 日本研究者发现在抑郁模型鼠的脑内 CGRP 表达水平显著下调, 外源性给予 CGRP 可以促进脑内神经生长因子水平的提高, 一定程度减轻抑郁症模型认知及学习能力的损伤, 具有抗抑郁的作用。但是 CGRP 抗抑郁的具体分子学机制尚不明确, 可能与其参与调节功能核团的突触可塑性有关^[8]。本研究组前期的研究显示, 外源性给予 CGRP 可影响小鼠认知及空间学习记忆能力, 主要表现为认知指数的升高及寻找平台潜伏期的缩短^[9]。突触可塑性是公认的学习记忆的分子生物学基础, 也是研究学习记忆机制的有效模型, 可分为结构可塑性和功能可塑性。其中功能可塑性依据其变化性质的不同, 可分为长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 和长时程抑制 (long-term depression, LTD), 它们能选择性地增强或减弱突触连接功能, 因而储存大量的信息, 是学习记忆的神经生物学基础^[10]。研究表明大脑边缘系统是参与调节学习记忆的核心脑区^[11]。海马区作为边缘系统的重要组成部分, 位于颞叶内腹侧, 由海马回和齿状回所组成, 被公认为与空间学习记忆、物体认知和情感恐惧记忆密切相关^[12, 13]。

因此, 在本研究组前期行为学研究结果的基础上进一步研究 CGRP 对突触可塑性的调节作用, 对于阐明 CGRP 在中枢神经系统的生理学作用具有重要的意义。本研究通过外源性给予小鼠脑片不同浓度的 CGRP, 观察其对小鼠海马区突触传递和功能的影响, 探讨 CGRP 参与调节学习记忆功能的分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组 采用健康清洁级的 C57BL/6J 雄性小鼠 (30 日龄) 50 只, 动物由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 (动物合格证号 No. 11400700063049)。本研究的动物实验方案经河南中医药大学实验动物伦理委员会的审核批准, 符合科技部《关于善待实验动物的指导意见》和《河南中医药大学实验动物伦理委员会章程》。将实验动物置于 7:00~19:00 光照, 19:00~7:00 黑暗的实验室中饲养一周, 食水不限, 随机分为空白对照组、50、100 和 200 nmol/L CGRP 组以及 CGRP+CGRP₈₋₃₇ 组, 每组 10 只。

1.2 主要实际和仪器 电子天平 (津岛, 日本); 生物信号处理系统 (成都仪器厂, 成都); 放大器 (成

都仪器厂, 成都); 恒流泵 (金达生物仪器有限公司, 上海); 振动切片机 (型号: 1000S, Leica, 德国); 体视学显微镜 (型号: M205FA, Leica, 德国); α -CGRP (ab142518, Abcam, 美国); CGRP₈₋₃₇ (ab142492, Abcam, 美国)

1.3 电生理记录方法

1.3.1 人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF)

配制 配方可依据具体实验需要进行调整。配方成分为 (mmol/L): 119 NaCl, 3.5 KCl, 1.3 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 1 NaH₂PO₄, 26.2 NaHCO₃ 和 11 葡萄糖。通入混合氧 (95% O₂/5% CO₂) 30 min, 测定 pH 值在 7.4 左右。通气速度既要维持 pH 值的稳定, 同时又要防止脑片晃动对脑片活性的影响。

1.3.2 小鼠海马区脑片制备 用 -80 °C 冰箱冰冻约 300 mL ACSF 30 min 左右, 捣碎冰块, 然后通入 O₂ 20 min。将孵育槽装满 ACSF 并放置于水浴槽中, 加温至 26~28 °C 并保持, 通入足够的 O₂ 以维持 pH 的稳定。固定振荡切片机的刀片, 调节切片机切片速度及频率。小鼠断头后迅速取出脑组织, 浸泡于通入 O₂ 的冰冻 ACSF 中约 10 s 后取出, 并从嗅球端头颅骨横断面横剪, 然后沿颅骨的两侧分别剪开颅骨。用镊子夹住嗅球端的颅骨将其翻开, 取出整个大脑半球, 立即浸泡于冰冻 ACSF 中约 1 min。然后取出大脑, 用刀片切割脑组织, 将包含海马区的脑组织用 502 胶水固定于振荡切片机的载物台上, 沿冠状面连续切片, 厚度为 400 μ m。在切片过程中可调节切片机振动频率。将切好的脑片用勺子或是刷子转移至孵育槽中, 孵育约 1~2 h。

1.3.3 离体细胞外场电位记录 打开恒流泵, 建立 ACSF 循环并通入 O₂。刺激电极与记录电极入水并排除噪声干扰。调节记录槽液面高度, 液面高度要保持适当, 即不可太高防止脑片漂浮影响记录, 也不可太低, 以免影响脑片活性。调节 ACSF 循环速度在 2~4 mL/min。将脑片转移至记录槽内, 并用金属环固定脑片。刺激电极与记录电极入水后, 调节放大器的测量状态至校正状态, 检查记录电极电阻, 记录电极电阻为 2~4 M Ω 。在显微镜下依据小鼠脑图谱定位将刺激电极插入海马 CA3 区, 记录电极插入海马 CA1 区, 记录细胞外场兴奋性突触后电位 (field excitatory postsynaptic potentials, fEPSPs), 记录的电活动为海马区 CA3-CA1 通路的 fEPSPs。在电极安放好后, 调节输出电压刺激, 输出电压幅度由小到大 (1~6 V), 并记录幅度由小变大的 fEPSPs,

即输入-输出反应 (input-output relationship, IOR)。脑片活性要达到最大 fEPSPs > 3 mV。然后调整刺激强度, 使产生的 fEPSP 幅度为最大 fEPSP 幅度的 1/3~1/2, 输出刺激频率为 0.033 Hz, 波宽为 0.1 ms, 延时为 40 ms, 刺激间隔为 30 s, 记录基础 fEPSPs 曲线作为平均基础值。在基础 fEPSPs 稳定记录约 20 min 时, 按照分组分别给予不同浓度药物, 对照组给予 ACSF 液, 给药后 20 min 记录 fEPSPs 曲线。LTP 幅度 (%) = 给药后记录 fEPSPs 斜率平均值 / 给药前 fEPSPs 斜率平均值 × 100%。记录双脉冲易化 (paired-pulse facilitation, PPF) 时, 给予间隔为 25、50、75 和 100 ms 的双刺激模式产生两个 fEPSPs, 第二个 fEPSP 斜率与第一个 fEPSP 斜率的比值为反映 PPF 幅度的指标。每组记录 5 张脑片。

1.4 结果统计与分析 数据用 mean ± SEM 表示,

采用 GraphPad Prism 6.0 统计学软件处理并进行分析, 多组间采用单因素方差分析检验, 两两比较采用 Tukey's multiple comparisons test, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学显著性。

2 结果

2.1 不同浓度 CGRP 对小鼠海马区 LTP 诱发的影响

外源性给予不同浓度 CGRP 孵育后连续记录给药前后的 fEPSPs 图形及相应 LTP 诱发的变化情况, 结果显示, 50 nmol/L CGRP 组 LTP 幅度为 (104.59 ± 1.79)%, 100 nmol/L 组 CGRP 组 LTP 幅度为 (110.95 ± 2.04)%, 200 nmol/L CGRP 组 LTP 幅度为 (128.13 ± 2.47)%。与正常对照组比较, 100 和 200 nmol/L CGRP 组 LTP 幅度明显增加, 差异具有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 1)。此外, CGRP 增加 LTP 诱发

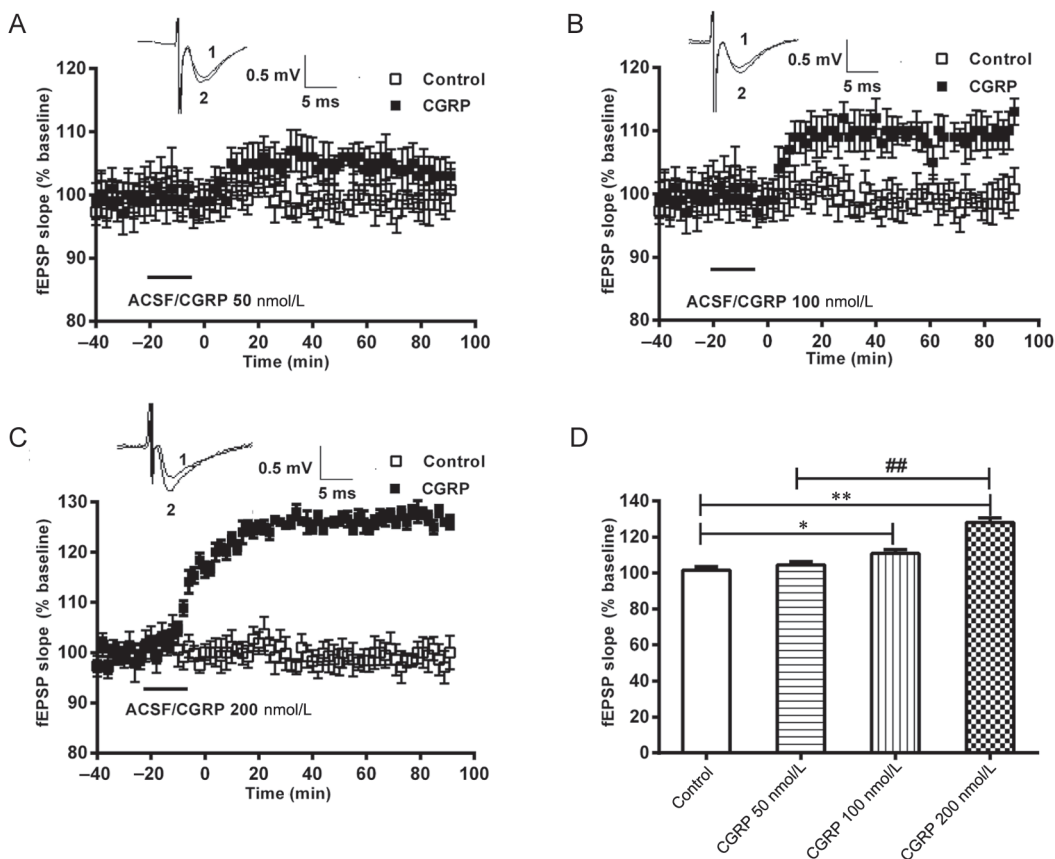


图 1. 不同浓度降钙素相关基因肽(CGRP)对小鼠CA3-CA1通路长时程增强(LTP)诱发的作用

Fig. 1. Effects of different concentrations of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the long-term potentiation (LTP) in the CA3-CA1 pathway of mice. *A*: Application of 50 nmol/L CGRP did not induce LTP in the CA3-CA1 pathway in the hippocampus of mice. *B*: Application of CGRP (100 nmol/L) induced a persistent LTP in the CA3-CA1 pathway. *C*: Application of CGRP (200 nmol/L) induced a persistent LTP in the CA3-CA1 pathway. *D*: CGRP (100 nmol/L and 200 nmol/L) dose-dependently induced the increase in LTP in the CA3-CA1 pathway of hippocampus slices. The bar diagram showed the average amplitudes of LTP in all groups. Mean ± SEM, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ## $P < 0.01$.

幅度的作用具有浓度依赖性, 其中 200 nmol/L 作用最为显著, 与 50 nmol/L CGRP 组比较, 200 nmol/L CGRP 组显著增加 ($P < 0.01$)。上述结果表明, 外源性 CGRP 可浓度依赖性地易化 LTP 的诱发 (图 1)。

2.2 不同浓度 CGRP 对小鼠海马区突触传递及突触后功能的影响

突触可塑性的改变与突触前递质的释放以及突触后蛋白功能的改变相关。为了进一步阐明外源性给予 CGRP 所引起的突触可塑性的改变与哪个方面相关, 本研究利用输入-输出反应、PPF 作为检测指标, 比较了不同浓度 CGRP 对小鼠海马区 CA3-CA1 通路基础突触传递和突触前递质释放的影响, 结果显示, 与正常对照组相比, 给予不同浓度的 CGRP 显著提高了 CA3-CA1 通路输入-输出反应值, 随着输出电压幅度的增加 (40%~100% 刺激强度),

200 nmol/L CGRP 组的 fEPSPs 幅度均显著增加 (均 $P < 0.05$), 而 100 nmol/L CGRP 组的 fEPSPs 幅度仅在 100% 刺激强度下显著增加 ($P < 0.05$) (图 2)。分别给予间隔为 25、50、75 和 100 ms 的双刺激条件下, 各浓度 CGRP 组 PPF 值和正常对照组相比均没有显著变化 (图 2)。上述结果提示 CGRP 没有明显改变突触前递质的释放功能, 其影响突触可塑性的作用可能与突触后功能的改变相关。

2.3 CGRP 阻断剂 CGRP₈₋₃₇ 可阻断其对 LTP 的易化作用

CGRP₈₋₃₇ 是 CGRP 特异性的阻断剂。与 200 nmol/L CGRP 组比较, CGRP+CGRP₈₋₃₇ 组 LTP 幅度显著性下降 ($P < 0.01$) (图 3), 表明高浓度 CGRP 对海马区 CA3-CA1 通路 LTP 的易化作用被 CGRP₈₋₃₇ 阻断, 提示 CGRP 通过与其相应受体结合后在突触可塑性

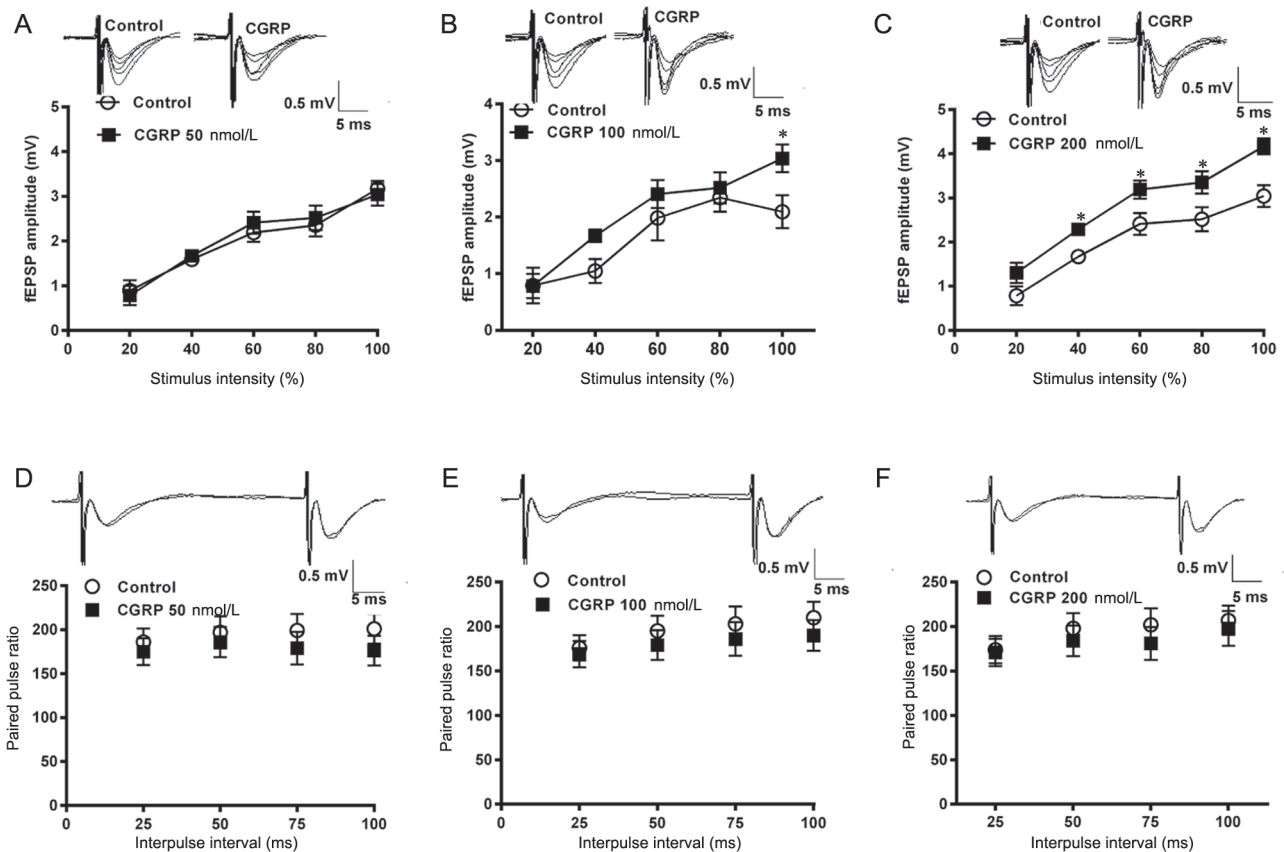


图 2. 不同浓度降钙素相关基因肽(CGRP)对突触传递及突触后功能的作用

Fig. 2. The effect of different concentrations of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the synaptic transmission and post-synaptic function. *A*: Input-output curve in the CA3-CA1 pathway of hippocampus slices. CGRP (50 nmol/L) had no effect on synaptic excitability compared with control. *B*: CGRP (100 nmol/L) had no effect on synaptic excitability compared with control at 20%, 40%, 60% and 80% stimulation intensity, whereas increased synaptic excitability at 100% stimulation intensity. *C*: CGRP (200 nmol/L) increased synaptic excitability at 40%, 60%, 80% and 100% stimulation intensity compared with control. *D*–*F*: Paired-pulse facilitation was not changed by 50 (*A*), 100 (*B*) or 200 nmol/L CGRP (*C*). Mean \pm SEM, $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control.

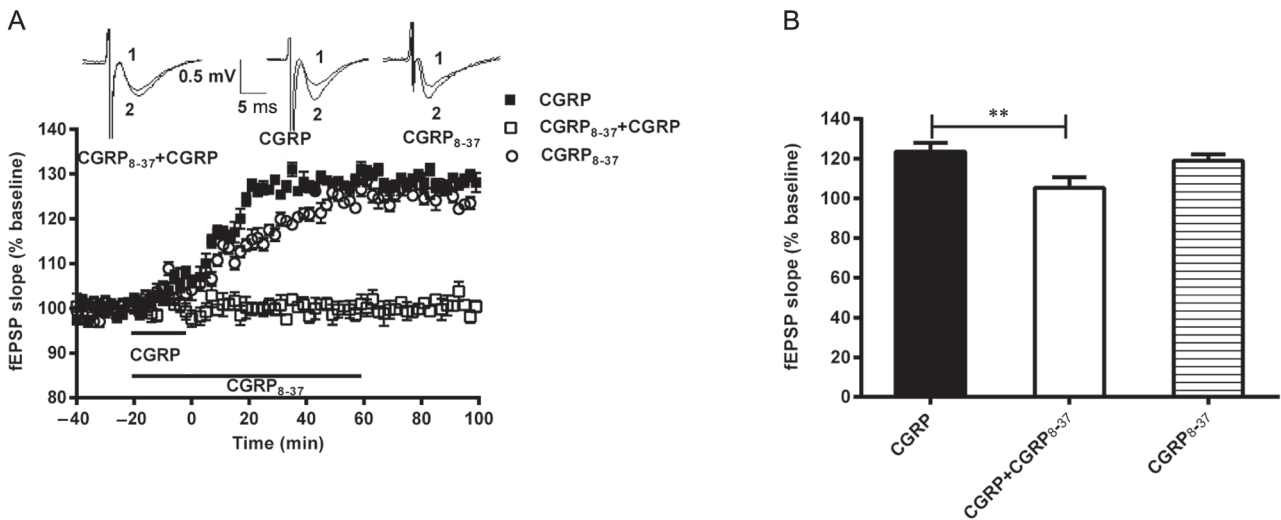


图 3. 降钙素相关基因肽(CGRP)阻断剂CGRP₈₋₃₇对CA3-CA1通路LTP诱发的作用

Fig. 3. The effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) antagonist CGRP₈₋₃₇ on the induction of LTP in the CA3-CA1 pathway. A: Application of CGRP₈₋₃₇ significantly blocked CGRP (200 nmol/L)-induced LTP in the CA3-CA1 pathway of hippocampus slices. However, application of CGRP₈₋₃₇ did not totally block the induction of LTP. B: The bar diagram showed the average amplitudes of LTP in all groups. Mean \pm SEM, $n = 5$. ** $P < 0.01$.

过程中发挥调节作用。而单独给予 CGRP₈₋₃₇ 组 LTP 的诱发幅度略有下降,但是没有显著性差异(图 3),提示在生理条件下,强直刺激诱发的 LTP 不受 CGRP 阻断剂的影响,但 CGRP₈₋₃₇ 可通过阻断 CGRP 与受体结合发挥 LTP 易化调节作用。

3 讨论

CGRP 是人体内分布广泛的一种新型神经肽类物质,通过与特异性受体结合发挥广泛的生理作用^[14]。近些年的研究显示,在中枢神经系统中 CGRP 可参与调节认知及学习记忆过程,是一种与其密切相关的神经肽类物质。我们前期的行为学实验结果显示,外源性给予 CGRP 可提高小鼠空间学习记忆的能力以及认知功能^[9]。本研究进一步的电生理学实验结果显示,外源性给予不同浓度的 CGRP 影响了小鼠海马区 CA3-CA1 通路 LTP 的诱发,而 LTP 是学习记忆行为的蛋白分子基础。因此,通过外源性给予 CGRP 可参与调控海马区突触可塑性的过程,从而在整体上改变了小鼠的学习行为。此外, CGRP 对 LTP 诱发的作用是浓度依赖性的,其中给予 200 nmol/L 的作用最为明显,100 nmol/L 次之,而 50 nmol/L CGRP 组 LTP 幅度虽然有上调的趋势,但与对照组相比没有显著性差异。其次,本研究结果显示, CGRP 易化 LTP 的调节作用可以

被其特异性阻断剂 CGRP₈₋₃₇ 阻断,说明 CGRP 是通过与特异性受体结合后发挥上述易化作用。本研究电生理结果还显示各组之间的 PPF 值不存在显著性差异。PPF 是反映突触前递质释放的主要指标之一。如果突触前递质释放减少,PPF 值会相应下降。因此, CGRP 影响海马区突触可塑性的作用与突触前递质释放没有明显的关联,可能与突触后蛋白功能或是突触后膜受体功能改变相关。但是, Liu 等研究显示,在大鼠脑片上外源性给予 CGRP 可抑制海马区 LTP 的诱发幅度^[3]。上述结果的不同可能与选用的实验动物种属不同、诱发 LTP 所用刺激模式不同、给予 CGRP 浓度不同有关。突触可塑性的分子生物学机制复杂,不同的实验条件可能影响实验结果。本研究结果表明,在小鼠海马区 CGRP 可浓度依赖性地易化 LTP 诱发幅度,其机制可能与 CGRP 增强突触后神经元的兴奋性有关,这一结果与我们前期的行为学结果一致^[9],但具体的蛋白分子生物学机制需要进一步的探索。

突触可塑性的异常对学习记忆功能具有重要的影响。已知的神经系统退行性疾病均与脑内突触结构与功能损伤相关^[15, 16]。因此,阐明 CGRP 在中枢的生理学作用不仅可以加深对这类新型肽类物质的了解,而且可能为相关神经系统疾病的治疗提供新的理论依据及思考的方向。

参考文献

- 1 Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 1983; 304(5922): 129–135.
- 2 Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brin SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2014; 94(4): 1099–1142.
- 3 Liu XD, Zhang JJ, Wang Y, Yu LC. Inhibitory effects of calcitonin gene-related peptide on long-term potentiation induced in hippocampal slices of rats. *Neurosci Lett* 2011; 494(1): 10–13.
- 4 Sink KS, Walker DL, Yang Y, Davis M. Calcitonin gene-related peptide in the bed nucleus of the stria terminalis produces an anxiety-like pattern of behavior and increases neural activation in anxiety-related structures. *J Neurosci* 2011; 31(5): 1802–1810.
- 5 Ruiz G, Banos JE. The effect of endoneurial nerve growth factor on calcitonin gene-related peptide expression in primary sensory neurons. *Brain Res* 2005; 1042(1): 44–52.
- 6 Holland JP, Sydserff SG, Taylor WA, Bell BA. Calcitonin gene-related peptide reduces brain injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 1994; 25(10): 2055–2059.
- 7 Pittman SK, Gracisa NG, Fehrenbacher JC. Nerve growth factor alters microtubule targeting agent-induced neurotransmitter release but not MTA-induced neurite retraction in sensory neurons. *Exp Neurol* 2016; 279: 104–115.
- 8 Hashikawa-Hobara N, Ogawa T, Sakamoto Y, Matsuo Y, Ogawa M, Zamami Y, Hashikawa N. Calcitonin gene-related peptide pre-administration acts as a novel antidepressant in stressed mice. *Sci Rep* 2015; 5: 12559.
- 9 Wu X (武鑫), Zheng WJ, Lv MH, Gao JF. Effect of bilateral injection of calcitonin gene-related peptide into amygdala on learning and memory of mice. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2017; 69(2): 167–171 (in Chinese with English abstract).
- 10 Nicoll RA, Schmitz D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(11): 863–876.
- 11 Sweatt JD. Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. *J Neurochem* 2016; 139 Suppl 2: 179–199.
- 12 Poncer JC. Hippocampal long term potentiation: silent synapses and beyond. *J Physiol Paris* 2003; 97(4–6): 415–422.
- 13 Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 2007; 317(5840): 951–953.
- 14 Aiyar N, Rand K, Elshourbagy NA, Zeng Z, Adamou JE, Bergsma DJ, Li Y. A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. *J Biol Chem* 1996; 271(19): 11325–11329.
- 15 Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H. Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2014; 9: 48.
- 16 Chong SA, Benilova I, Shaban H, De Strooper B, Devijver H, Moechars D, Eberle W, Bartic C, Van Leuven F, Callewaert G. Synaptic dysfunction in hippocampus of transgenic mouse models of Alzheimer's disease: a multi-electrode array study. *Neurobiol Dis* 2011; 44(3): 284–291.