

· 论 著 ·

S14G-Humanin 对 β -淀粉样蛋白致小鼠海马 CA1 区突触长时程增强抑制效应的影响

杜婴¹, 李川¹, 赵超¹, 纪光晰², 张巍¹

1. 第四军医大学唐都医院神经内科, 陕西 西安 710038; 2. 西安市第五人民医院内科, 陕西 西安 710082

摘要: **目的** 探讨 S14G-Humanin (HNG) 对 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 致海马 CA1 区突触长时程增强 (LTP) 抑制的影响。**方法** 制备小鼠海马脑片 ($n=20$), 分为 4 组: 正常对照组、400 nM $A\beta_{25-35}$ 组、400 nM $A\beta_{25-35}$ + 200 nM HNG 组、400 nM $A\beta_{25-35}$ + 400 nM HNG 组。应用多通道细胞外记录系统 (MED 系统) 记录各组海马脑片兴奋性突触后电位 (EPSP) 的斜率, 并与基础对照的 EPSP 斜率相比, 计算相应的百分比作为 LTP 数值, 观察可溶性 $A\beta_{25-35}$ 对海马 CA1 区 LTP 的抑制作用以及不同浓度 HNG 对 $A\beta_{25-35}$ 致 LTP 抑制效应的影响。**结果** 400 nM $A\beta_{25-35}$ 组 LTP 值较正常对照组显著减少 [$(102.5 \pm 2.0)\%$ vs $(148.1 \pm 8.0)\%$, $P < 0.01$], 表明其可显著抑制海马 CA1 区 LTP 的产生; 400 nM $A\beta_{25-35}$ + 200 nM HNG 组较 400 nM $A\beta_{25-35}$ 组 LTP 值显著增加 [$(121.3 \pm 2.9)\%$ vs $(102.5 \pm 2.0)\%$, $P < 0.01$], 表明其可部分减少 400 nM $A\beta_{25-35}$ 对海马 CA1 区 LTP 的抑制效应; 而 400 nM $A\beta_{25-35}$ + 400 nM HNG 组较 400 nM $A\beta_{25-35}$ 组 LTP 显著增加 [$(143.0 \pm 4.3)\%$ vs $(102.5 \pm 2.0)\%$, $P < 0.01$], 并与正常对照组相比无统计学差异 [$(143.0 \pm 4.3)\%$ vs $(148.1 \pm 8.0)\%$, $P > 0.05$], 表明其可以完全逆转 400 nM $A\beta_{25-35}$ 对海马 CA1 区 LTP 的抑制效应。**结论** HNG 能够逆转可溶性 $A\beta_{25-35}$ 对海马 CA1 区 LTP 的抑制作用, 提示 HNG 对 $A\beta$ 所致的突触可塑性损害具有神经保护作用。

关键词: S14G-Humanin; β -淀粉样蛋白; 海马; 长时程突触增强; 阿尔茨海默病; 小鼠

中图分类号: R 749.1⁺6 R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)12-1593-04

Influence of S14G-Humanin on inhibiting action of β -amyloid protein-induced synaptic long-term potentiation of hippocampal CA1 region in mice

DU Ying*, LI Chuan, ZHAO Chao, JI Guang-xi, ZHANG Wei

* Department of Neurology, Tangdu Hospital Affiliated to the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710038, China

Corresponding author: Zhang wei, E-mail: 3127035918@qq.com

Abstract: Objective To investigate the influence of S14G-Humanin (HNG) on β -amyloid protein ($A\beta$)-induced inhibiting action of synaptic long-term potentiation (LTP) in hippocampal CA1 region of mice. **Methods** Twenty mice hippocampal slices were made and divided into normal control group, 400 nM $A\beta_{25-35}$ group, 400 nM $A\beta_{25-35}$ + 200 nM HNG group, 400 nM $A\beta_{25-35}$ + 400 nM HNG group. By multi-channel extracellular recording system (MED system), the slope of the excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) was measured, and its value was represented by the percentage of measured EPSP slope to the EPSP slope of base control, and the inhibiting effect of soluble $A\beta_{25-35}$ on synaptic LTP of hippocampal CA1 region and the influence of different concentrations of HNG on inhibiting action of $A\beta_{25-35}$ -induced synaptic LTP in hippocampal CA1 region were observed. **Results** Compared with normal control group, the LTP of mice hippocampal CA1 region in 400 nM $A\beta_{25-35}$ group decreased significantly [$(102.5 \pm 2.0)\%$ vs $(148.1 \pm 8.0)\%$, $P < 0.01$], namely, 400 nM $A\beta_{25-35}$ can significantly inhibit the generation of LTP in hippocampal CA1 region. The LTP value in 400 nM $A\beta_{25-35}$ + 200 nM HNG group increased significantly compared with 400 nM $A\beta_{25-35}$ group [$(121.3 \pm 2.9)\%$ vs $(102.5 \pm 2.0)\%$, $P < 0.01$], namely, 200 nM HNG can partially decrease the inhibition effect of 400 nM $A\beta_{25-35}$ on LTP in hippocampal CA1 region. The LTP value in 400 nM $A\beta_{25-35}$ + 400 nM HNG group increased significantly compared with 400 nM $A\beta_{25-35}$ group [$(143.0 \pm 4.3)\%$ vs $(102.5 \pm 2.0)\%$, $P < 0.01$] and similar with the level of normal control group

$[(143.0 \pm 4.3)\% \text{ vs } (148.1 \pm 8.0)\%, P > 0.05]$, namely, 400 nM HNG can completely reversed the inhibition effect of 400 nM $A\beta_{25-35}$ on LTP in hippocampal CA1 region. **Conclusions** HNG could reverse soluble $A\beta_{25-35}$ -induced inhibition effect on LTP in hippocampal CA1 region, and this suggests that HNG has neuroprotective effect against $A\beta$ -induced synaptic plasticity damage.

Key words: S14G-Humanin; β -amyloid protein; Hippocampus; Synaptic long-term potentiation; Alzheimer disease; Mouse

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种以进行性记忆减退、认知障碍、人格改变为主要临床表现的神经退行性疾病, 脑内 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 的广泛沉积及其神经毒性作用, 被认为是其形成和发展的重要病理基础。已有的研究表明, 在 AD 发病早期阶段, 可溶性 $A\beta$ 对于突触可塑性的损害远远早于其他病理性损害, 主要表现为显著减少或完全抑制突触长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 的产生, 并与 AD 早期认知功能障碍密切相关, 迄今仍缺乏特异性的防治措施^[1-2]。

近年来, 体外实验发现 Humanin (HN) 及其衍生物 S14G-Humanin (HNG) 能够特异性地抑制目前所知 AD 致病因子的神经细胞毒性作用, 且 HNG 的生物活性较 HN 强 1 000 倍^[3]; 在体实验表明 HNG 能够改善可溶性 $A\beta_{25-35}$ 导致的小鼠学习记忆障碍, 被誉为“抗 AD 特异性神经肽”, 但其特异性保护作用的机制仍不清楚^[4]。本项研究应用小鼠海马脑片, 通过观察 HNG 对可溶性 $A\beta_{25-35}$ 致海马 CA1 区 LTP 抑制效应的影响作用, 首次从突触可塑性的角度探讨 HNG 在 AD 中的神经保护作用。

1 资料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 C57Bl/6 小鼠, 体重 25 ~ 30 g, 由第四军医大学实验动物研究中心提供。

1.2 主要试剂和仪器 $A\beta_{25-35}$ 和 HNG 购自 Sigma 公司。多通道细胞外记录系统 (MED 系统) 及 MED-P515A 电极由 Panasonic 公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠海马脑片的制备 25% 乌拉坦麻醉小鼠后断头取脑, 于大脑半球腹内侧分离出双侧海马, 放入 0 °C 的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中, 其成份为 NaCl 117 mmol/L、KCl 3.6 mmol/L、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.2 mmol/L、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 7 mmol/L、 $NaHCO_3$ 25 mmol/L、Glucose 11 mmol/L; pH 值为 7.3 ~ 7.4, 并持续通入混合氧气 (95% O_2 和 5% CO_2)。使用振动切片机, 沿海马长轴垂直方向, 制备海马脑片 (厚度为 400 μm), 并将其置于持续通入混合氧气的 ACSF 中, 室温 (22 ~ 25 °C) 下孵育

2 h。

1.3.2 实验分组 共记录 20 张海马脑片, 分为 4 组: 正常对照组、 $A\beta_{25-35}$ 组 (浓度 400 nM)、 $A\beta_{25-35}$ (浓度 400 nM) + HNG (浓度 200 nM) 组、 $A\beta_{25-35}$ (浓度 400 nM) + HNG (浓度 400 nM) 组。

1.3.3 电生理记录 将孵育后的海马脑片移至 MED64 恒温记录浴槽内, 使用温控灌流系统, 持续灌流各组脑片, 速度为 2 ml/min, 温度为 34 °C, 并持续通入混合氧气, 孵育 1 h。在显微镜下将刺激电极放置于海马 CA3 区 Schaffer 侧支, 记录电极放置于海马 CA1 区辐射层内。以 30 μA 为初始刺激强度, 然后以 30 μA 为间距逐渐增加刺激强度, 刺激间隔 2 min 以上, 并记录相应的兴奋性突触后电位 (excitatory postsynaptic potential, EPSP)。根据所得结果选择能够引起最大 EPSP 斜率 50% 左右的刺激强度作为基础刺激强度。参照 Oka 等^[5]方法, 以 θ 频率刺激之前 10 min 内所记录的 EPSP 为基础对照, 在 Schaffer 侧支上给予 θ 频率刺激 (4 个 100 Hz 脉冲刺激为一组短串, 间隔 200 ms, 共 10 组), 并记录相应的 EPSP 变化情况。各组分别记录 5 张脑片。

1.4 统计学分析 使用 MED64 分析软件测量所记录各组海马脑片 EPSP 的斜率, 并与基础对照的 EPSP 斜率相比, 计算相应的百分比作为 LTP 数值, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。参照 Trommer 等^[6]的方法统计各组最后 10 min 的 LTP 数值, 并使用 SPSS13.0 统计软件包进行 ANOVA 分析, 检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

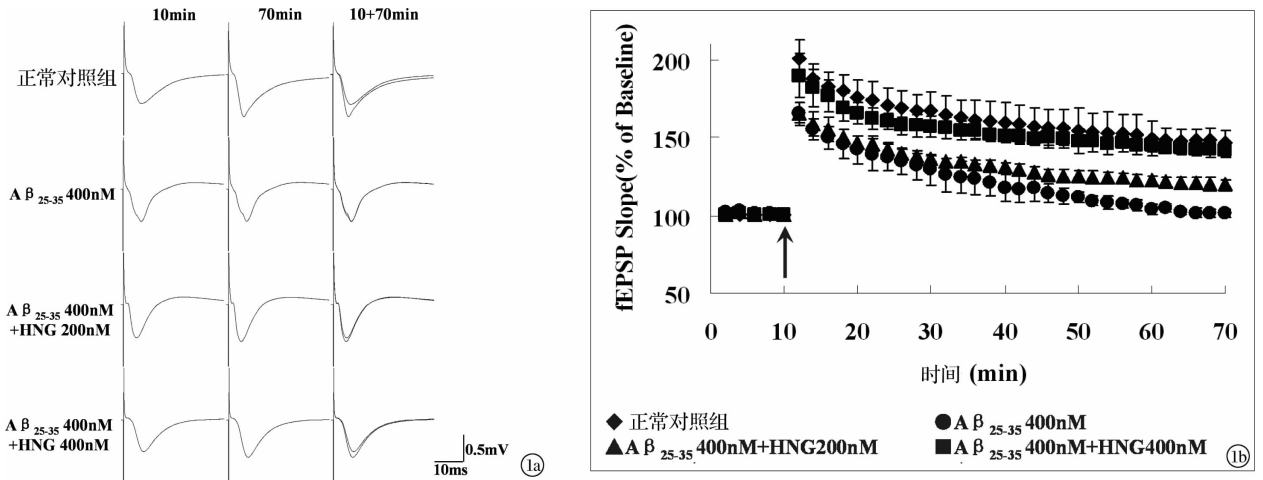
2 结果

2.1 各组 θ 频率刺激前 10 min 和刺激后 1 h 的 EPSP 图形及相应 LTP 的变化情况 各组灌流液孵育 1 h, 记录 θ 频率刺激前 10 min 和刺激后 1 h 的 EPSP 图形及相应 LTP 的变化情况 (图 1)。正常对照组中 θ 频率刺激前 10 min 和刺激后 1 h 海马 CA1 区 EPSP 曲线斜率增加超过 40%, 维持时间 1 h 以上, 成功诱发出 LTP。而在 $A\beta_{25-35}$ 浓度 400 nM 时, θ 频率刺激前 10 min 和刺激后 1 h 海马 CA1 区 EPSP 曲线基本重合, LTP 随时间逐渐衰减, 在刺激 1 h 后基本被完全抑制; 浓度为 200 nM 的 HNG 可轻度增加 θ 频率刺

激 1 h 后 EPSP 曲线的斜率,部分改善 $A\beta_{25-35}$ (浓度 400 nM) 对 LTP 的抑制效应,而浓度为 400 nM 的 HNG 则可明显增加 θ 频率刺激 1h 后 EPSP 曲线的斜率,完全逆转 $A\beta_{25-35}$ (浓度 400 nM) 对 LTP 的抑制效应,与正常对照组基本相当。

2.2 最后 10 min 所记录的 LTP 数值 浓度为 400 nM 的 $A\beta_{25-35}$ 组 LTP 值较正常对照组显著减少 $[(102.5 \pm 2.0)\% \text{ vs } (148.1 \pm 8.0)\%, P < 0.01]$,表明其可显著抑制海马 CA1 区 LTP 的产生;400 nM $A\beta_{25-35} + 200$ nM HNG 组较浓度为 400 nM 的 $A\beta_{25-35}$

组 LTP 值显著增加 $[(121.3 \pm 2.9)\% \text{ vs } (102.5 \pm 2.0)\%, P < 0.01]$,表明其可部分减少 $A\beta_{25-35}$ (浓度 400 nM) 对海马 CA1 区 LTP 抑制效应;而 400 nM $A\beta_{25-35} + 400$ nM HNG 组较浓度为 400 nM 的 $A\beta_{25-35}$ 组 LTP 显著增加 $[(143.0 \pm 4.3)\% \text{ vs } (102.5 \pm 2.0)\%, P < 0.01]$,并与正常对照组相比无统计学差异 $[(143.0 \pm 4.3)\% \text{ vs } (148.1 \pm 8.0)\%, P > 0.05]$,表明其可以完全逆转 $A\beta_{25-35}$ (浓度 400 nM) 对海马 CA1 区 LTP 抑制效应。见图 2。



注:1a:各组在给予 θ 频率刺激前 10 min 和 1 h 后的 EPSP 曲线及其叠加图形。1b:各组在给予 θ 频率刺激前后 LTP 变化情况(箭头示给予 θ 频率刺激)。

图 1 各组 θ 频率刺激前 10 min 和刺激后 1 h 的 EPSP 图形及相应 LTP 的变化情况

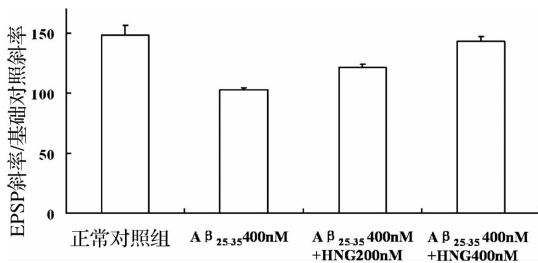


图 2 各组最后 10 min 的 LTP 数值比较

3 讨论

LTP 是神经突触可塑性的主要形式之一,反映了突触水平上的信息储存过程,被视为学习记忆的神经电生理基础^[7]。海马组织是与学习记忆功能密切相关的重要结构,也是 AD 早期损伤的主要区域,其 LTP 的变化比较客观地反映了学习记忆功能的减退^[8]。现有的研究表明,脑内可溶性 $A\beta$ 在 AD 早期即对中枢神经系统的突触产生可塑性毒性损害作用,显著减少或完全抑制海马 LTP 的产生,导致学习记忆功能障碍^[9]。相关临床研究也提示,AD 患者认知功能障碍程度与脑内可溶性 $A\beta$ 水平及突触数量的减少密切相关^[10]。由此可见,可溶性 $A\beta$ 蛋白对于

突触可塑性的损害在 AD 早期认知功能障碍的发病过程中具有极其重要的作用。如何有效地抑制可溶性 $A\beta$ 蛋白对于突触可塑性的损害,将直接关系到 AD 早期的预防与治疗效果。

Matsuoka 等^[11]发现并命名的由 24 个氨基酸残基组成的线性多肽 HN 能够特异性地抑制多种家族性 AD 基因突变、 $A\beta$ 前体蛋白抗体以及 $A\beta$ 蛋白所诱发的神经元死亡,其一级结构序列为 Met-Ala-Pro-Arg-Gly-Phe-Ser-Cys-Leu-Leu-Leu-Thr-Ser-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala,当第 14 位的 Ser 被 Gly 取代后,其衍生物 HNG 的神经保护活性作用较 HN 可提高 1 000 倍。动物行为学研究亦表明,HNG 能够有效改善可溶性 $A\beta_{25-35}$ 侧脑室注射所导致的学习记忆障碍,提示 HN 和 HNG 对于可溶性 $A\beta$ 所致认知功能障碍具有保护作用,但其机制仍不明确^[4]。

本实验首次从突触可塑性损害角度,探讨 HNG 的神经功能保护机制。研究发现,随着 HNG 浓度的增加,可部分改善直至完全逆转可溶性 $A\beta_{25-35}$ 对海马 CA1 区 LTP 的抑制作用,两者之间存在剂量依赖关系,提示 HNG 对可溶性 $A\beta$ 所致海马 CA1 区突触可塑性损害具有保护作用,并可能因此改善 AD 早期

由于突触可塑性损害所导致的认知功能障碍。由于可溶性 A β 通过胶质细胞和/或神经元上可能存在的 A β 受体和代谢型谷氨酸受体 5 (mGluR5) 联合作用激活应激活蛋白激酶 (JNK)、有丝分裂素激活性蛋白激酶 (p38 MAPK) 和细胞周期素依赖激酶 5 (Cdk5) 等信号传导通路, 引发一系列下游事件, 进而抑制 LTP 或增强长时程抑制 (LTD) 的产生^[12-13]。因此推测本次实验中 HNG 对于海马突触可塑性的保护作用可能与负向调控上述信号传导通路有关, 但确切的作用机制仍有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Pasic MD, Diamandis EP, McLaurin J, et al. Alzheimer disease: advances in pathogenesis, diagnosis, and therapy [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(5):664-669.
- [2] Chong SA, Benilova I, Shaban H, et al. Synaptic dysfunction in hippocampus of transgenic mouse models of Alzheimer's disease: a multi-electrode array study [J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 44(3):284-291.
- [3] Terashita K, Hashimoto Y, Niikura T, et al. Two serine residues distinctly regulate the rescue function of Humanin, an inhibiting factor of Alzheimer's disease-related neurotoxicity: functional potentiation by isomerization and dimerization [J]. *J Neurochem*, 2003, 85(6):1521-1538.
- [4] Tauima H, Kawasumi M, Chiba T, et al. A humanin derivative, SG-ly14-Humanin, prevents amyloid-beta-induced memory impairment in mice [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 79(5):714-723.
- [5] Oka H, Shimono K, Ogawa R, et al. A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice [J]. *J Neurosci Methods*, 1999, 93(1):61-67.
- [6] Trommer BL, Shah C, Yun SH, et al. ApoE isoform-specific effects on LTP: blockade by oligomeric amyloid-beta1-42 [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 18(1):75-82.
- [7] Park JM, Jung SC, Eun SY. Long-term synaptic plasticity: circuit perturbation and stabilization [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18(6):457-460.
- [8] Wiera G, Mozrzymas JW. Extracellular proteolysis in structural and functional plasticity of mossy fiber synapses in hippocampus [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9:427.
- [9] Tu S, Okamoto S, Lipton SA, et al. Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2014, 9:48.
- [10] Olichney JM, Yang JC, Taylor J, et al. Cognitive event-related potentials: biomarkers of synaptic dysfunction across the stages of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 26 Suppl 3:215-228.
- [11] Matsuoka M, Hashimoto Y. Humanin and the receptors for humanin [J]. *Mol Neurobiol*, 2010, 41(1):22-28.
- [12] 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 c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5 [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(13):3370-3378.
- [13] Chen X, Lin R, Chang L, et al. Enhancement of long-term depression by soluble amyloid β protein in rat hippocampus is mediated by metabotropic glutamate receptor and involves activation of p38MAPK, STEP and caspase-3 [J]. *Neuroscience*, 2013, 253:435-443.

收稿日期: 2016-07-13 编辑: 王国品