

慢性脑缺血海马 CA1 区 HCN1 蛋白表达下调与学习记忆损伤研究

孙莉 李进 郭莲军 陈玉华

【摘要】 目的 探讨慢性脑缺血导致大鼠认知功能障碍与 HCN1 通道亚型蛋白表达变化的内在关系。**方法** 健康成年雄性 SD 大鼠 20 只,随机分为假手术组、缺血组,每组各 10 只。各组缺血 4 周后采用 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆功能,免疫组化检测 HCN1 表达水平,进一步用蛋白印迹检测 HCN1 蛋白表达水平。**结果** 与假手术组相比,缺血组大鼠逃避潜伏期明显延长($P<0.05$);缺血组大鼠海马 CA1 区 HCN1 蛋白表达水平明显降低,与模型组比较有明显差异($P<0.05$)。**结论** 慢性脑缺血海马 CA1 区存在 HCN1 通道亚型表达下调且参与大鼠认知功能损伤,可能为治疗慢性脑缺血所致认知功能障碍的新靶点。

【关键词】 慢性脑缺血 学习记忆 水迷宫实验 HCN1 通道亚型

【中图分类号】 R749.1+3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)04-0255-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.04.010

Down-regulation and damage of learning and memory in chronic ischemic hippocampal CA1 area HCN1 protein expression Sun Li, Li Jin, Guo Lianjun, et al. Department of Neurology, General Hospital of the Yangtze River (Wuhan Brain Hospital), Wuhan 430010

【Abstract】 Objective To investigate the expression changes of HCN1 channel subtypes protein in chronic cerebral ischemia rats with cognitive dysfunction. **Methods** Twenty healthy male SD rats were randomly divided into control group, the ischemia group. Four weeks after ischemia, we use Morris water maze to test Learning and memory function and detect HCN1 expression level through immunohistochemistry. Western Blotting further detect HCN1 protein expression level. **Results** Compared with the control group, the escape latency in ischemic group was significantly prolonged ($P<0.05$). In ischemia group, HCN1 protein expression level in hippocampal CA1 area decreased significantly, which has significant difference ($P<0.05$) compared with model group. **Conclusion** Hippocampal CA1 area with chronic ischemic exists HCN1 channel expression down-regulation, participating in cognitive impairment in rats. It might be a new target of the treatment of cognitive dysfunction caused by chronic cerebral ischemia.

【Key words】 Chronic cerebral ischemia Learning and memory Morris water maze HCN channel subtypes

血管性痴呆(VD)是指由脑血管疾病所引起与学习记忆认知功能障碍有关综合征^[1]。我国 VD 的患病率为逐年上升,严重影响中老年人的生活质量^[2]。深入阐明血管性痴呆发生的病理生理生理机制为临床治疗寻找有效的干预措施极为重要。

超极化激活环核苷酸门控阳离子(hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation

channels,HCN)通道是电压门控通道超家族中的一员,自上世纪末被发现以来,一直是神经科学工作者研究的热点课题。HCN 通道在中枢神经系统分布极为广泛,对神经元兴奋节律、神经网络振荡、树突整合、突触可塑性、递质释放等均有重要的调节作用^[3]。分子生物学研究已发现 HCN 通道有 4 个亚型(HCN1-HCN4)^[4],在啮齿类动物的中枢神经系统均有广泛分布,其中 HCN1 在海马、前额皮层等表达最为丰富^[5]。文献报道,HCN 通道参与学习和记忆的形成过程,HCN1 缺失可引起学习记忆功能损伤,其机制可能与树突整合有关^[6]。然而,在脑缺血诱发的血管性痴呆情况下 HCN1 在海马 CA1

基金项目:交通运输部长江航务管理局课题(201210011);武汉市卫计委临床医学科研项目(WX14D12)

作者单位:430010 武汉,长江航运总医院·武汉脑科医院[孙莉 李进 陈玉华(通信作者)];华中科技大学同济医学院药理学(郭莲军)

发生怎样的变化尚未见报道。

本研究采用双侧颈总动脉永久性结扎(2VO)制备慢性脑低灌性脑缺血模型,评价 HCN1 通道亚型在海马 CA1 区的蛋白表达水平的改变,进一步探究 2VO 大鼠海马 CA1 区 HCN 通道对学习记忆功能的调节作用,为血管性痴呆的防治提供新的干预靶点。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

水合氯醛,粉剂,购于国药集团化学试剂有限公司(货号:30037527,批号:20141011),HCN1 抗体(生产厂家:Novus(诺伟司);货号:NBP1-20250,实验时稀释比例为 1:800),所用其它试剂均为市售分析纯。

1.2 实验动物

SD 大鼠,雄性,清洁级(2~3 月龄,体质量 220~250 g),由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供(合格证编号:SCXK(E) 2010-0009, No. 42000600005370)。大鼠分笼饲养,自由进食,饮水,昼夜交替 12 h,室温控制在 $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$,适应性喂养 1 周后进行实验。将大鼠随机分成假手术组,2VO 模型组。所有大鼠实验操作均按华中科技大学动物伦理委员会有关条例规定执行。

1.3 方法

1.3.1 慢性脑低灌注模型的制备

大鼠称重,水合氯醛(350 mg/kg, ip)麻醉,切开颈部皮肤,钝性分离双侧颈总动脉,用 4-0 手术缝线结扎双侧颈总动脉的近心端和远心端并剪断,即 2 血管永久性结扎(2VO),制备慢性脑低灌注缺血模型。假手术组大鼠仅暴露双侧颈总动脉,不结扎。在整个手术期间大鼠体温保持在 $(37.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,待大鼠清醒后单笼饲养。大鼠 2VO 4 周后应用 Morris 水迷宫(MWM)实验评估各组大鼠空间学习记忆能力及取脑进行免疫组化和分子生物学实验。

1.3.2 Morris 水迷宫实验

用于评价大鼠的空间学习记忆能力;实验时将大鼠放入一圆柱形水槽[直径 2 m,高 35 cm,水深为 21 cm,水温 $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$]内;水槽平面分为 4 个象限,将一直径为 8 cm,高 20 cm 的玻璃平台置于第 II 象限;实验于每天上午 10:00~12:00 进行;每只大鼠每天进行 4 次,每次随机从 1 个象限入水 1 次,连续 5 d,记录每天大鼠找到平台的时间,4 个象限记录

的时间的平均值作为逃逸潜伏期(评价大鼠空间学习能力);实验第 6 d 撤去平台,记录大鼠在 60 s 内在原平台放置象限(第 II 象限,即为目标象限)的停留时间,作为评价空间记忆能力;大鼠游泳轨迹采用成都泰盟科技有限公司 MT-200 水迷宫图像追踪系统视频监测。

1.3.3 免疫组织化学染色

水迷宫实验结束后每组取 3 只大鼠麻醉,用 4%多聚甲醛的 PBS 对大鼠进行灌流后断头取脑,快速冰冻切片($40\ \mu\text{m}$);脑片用 0.3% Triton X-100 的 PBS 进行漂洗,随后用 5%的 BSA 封闭,4 $^\circ\text{C}$ 过夜孵育一抗 anti-HCN1 (MAB1572, Millipore; 1:800 浓度),一抗孵育洗涤后室温孵育二抗 2 h,二抗分别为 DyLight 488 Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (A23210-1, Abbkine, 1:200 浓度),二抗孵育后用 Olympus Fluo View 1200 共聚焦显微系统拍照(放大倍数 400 \times)。

1.3.4 蛋白印迹实验

水迷宫实验结束后每组取 7 只大鼠麻醉迅速断头,分离海马,冰冻切片(厚 $400\ \mu\text{m}$),进一步在体视显微镜下分离出 CA1 区组织,用膜蛋白试剂盒提取海马 CA1 区膜蛋白;应用 BCA 试剂盒测定蛋白水平。取 $80\ \mu\text{g}$ 提取液,用 10% SDS/PAGE 电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 漂洗 3 次,各 5 min;anti-HCN1 (1:800),用 0.1% Tween-20 TBST 漂洗 3 次($3 \times 5\ \text{min}$),将 PVDF 膜室温下在 HRP 标记的二抗中孵育 1 h;用 0.1% Tween-20 TBST 漂洗 3 次($3 \times 5\ \text{min}$),曝光,用 NIH Image J 统计软件测定蛋白条带光密度值。

1.3.5 统计学处理

所有计量资料以均数 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示,运用 one/two-way ANOVA 分析组间差异, $P < 0.05$ 表示显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠慢性脑低灌注对学习记忆功能损伤的影响

水迷宫实验显示,假手术组与缺血组大鼠的游泳速度无显著差异($P > 0.05$)。缺血组与假手术组相比,缺血组大鼠找到平台的潜伏期,显著延长($n = 10, P < 0.05$)(图 1)。空间记忆实验显示,大鼠在目标象限(第 II 象限:Q2)的停留时间占总时间的百分率作为评估记忆残留的指标。假手术组大鼠在目标

象限 Q2 的停留时间显著长于缺血大鼠(假手术组: $39.53 \pm 5.08\%$, 缺血组: $20.19 \pm 5.03\%$, $P < 0.01$) (图 2)。

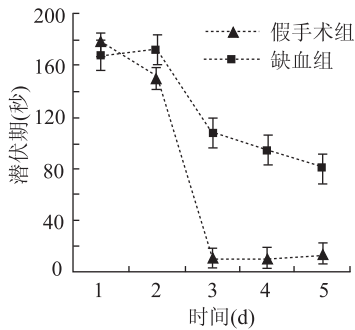


图 1 水迷宫实验第 1 d 到第 5 d 2 组大鼠找到平台的潜伏期 与假手术组大鼠相比,缺血组大鼠的潜伏期显著延长($n = 10$)

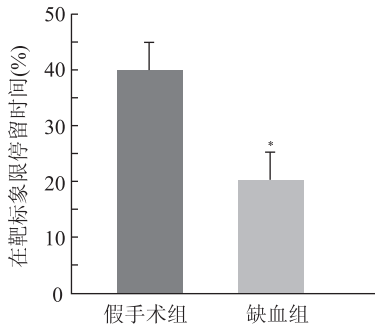


图 2 水迷宫实验第 6 d 大鼠空间记忆能力检测 与假手术组相比,缺血组大鼠在靶标象限停留的时间显著缩短(* $P < 0.01$)

2.2 慢性脑低灌注大鼠海马 CA1 区 HCN1 表达水平的变化

免疫组化实验显示,大鼠慢性脑低灌注 4 周后 HCN1 蛋白在海马 CA1 区神经细胞的表达明显减少(图 3)。

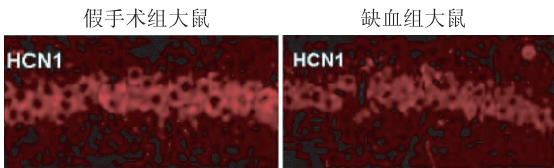


图 3 大鼠海马 CA1 区 HCN1 和 HCN2 组织化学染色 ($\times 400$ 倍)

经蛋白印迹实验结果显示,2VO 4 周后海马 CA1 区神经元 HCN1 膜蛋白表达显著减少($n = 5$, 与假手术组相比, $P < 0.05$) (图 4)。

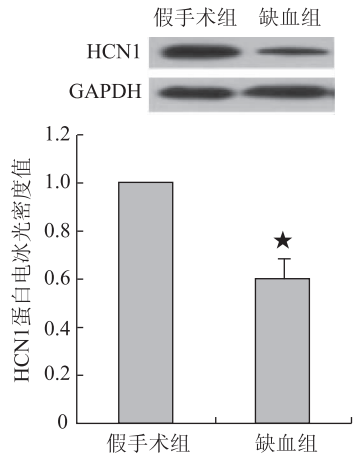


图 4 2 组大鼠海马 CA1 区 HCN1 蛋白表达水平变化 与假手术组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

以脑组织供血不足为病理特征而导致认知功能障碍称为血管性痴呆,是痴呆发生的另一重要原因,临床发现其发病率仅次于老年性痴呆。本研究发现,大鼠双侧颈总动脉永久性结扎 4 周后在空间学习记忆能力明显受损时海马 CA1 区 HCN1 表达水平显著降低,提示 HCN1 通过亚型可能参与慢性脑低灌注所致学习记忆损伤的病理调节过程。

超极化激活环核苷酸门控阳离子(HCN)通道是电压门控通道超家族中的一员,其包含 HCN1-4 四种亚型,广泛分布于心脏和神经系统。大量研究表明,在正常大鼠海马 HCN1 亚型与其他几种亚型共同介导产生 Ih 电流。电生理记录显示,Ih 存在于少数突触前膜,对突触传递的调控有重要作用。有报道在小龙虾运动神经元终板当 cAMP 依赖性的 Ih 表达上调,突触传递发生长时程易化,而突触传递发生长时程易化是学习记忆形成的电生理基础^[7]。Phillips 等报道 Ih 参与突触整合和传递、而影响学习记忆的形成和巩固^[8]。近年来,研究还发现与癫痫^[9]、阿尔茨海默病^[9]、帕金森综合症^[10]、神经性疼痛、精神情感障碍等疾病的发生、发展有较为密切的联系^[11]。

HCN 通道功能受细胞内 cAMP 水平调控,cAMP 结合到通道的特定结合域(CNBD)上加速通道的开放^[12]。在正常大鼠海马 HCN1 亚型介导产生 Ih 电流对突触传递的调控有重要作用。而在脑缺血缺氧的情况下由于缺血缺氧,细胞内 cAMP 水平减少,HCN 通道功能减弱。本研究结果发现,海

马 CA1 区 HCN1 蛋白表达下调,神经元的 Ih 电流减弱,可能引起整个海马神经突触传递发生改变,而导致海马依耐性的空间学习记忆功能受损。HCN1 亚型参与介导的相关作用机制还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Desmond DW. Vascular dementia[J]. Clin Neurosci Res, 2004, 3: 437-448.
- [2] Pape HC. Specific bradycardic agents block the hyperpolarization-activated cation current in central neurons [J]. Neuroscience, 1994, 59(2): 363-373.
- [3] Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, et al. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels[J]. Nature, 1998, 393(6685): 587-591.
- [4] Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, et al. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function[J]. Physiol Rev. 2009, 89(3): 847-885.
- [5] Anon. From genes to function[J]. Physiol Rev, 2009, 89: 847-885.
- [6] Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, et al. A behavioral role for dendritic integration: Hcn1 channels constrain spatial inputs to distal dendrites memory and plasticity at of ca1 pyramidal neurons[J]. Cell, 2004, 119: 719-732.
- [7] Chan CS, Glajch KE, Gertler TS, et al. HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(1): 85-92.
- [8] Phillips AM, Kim T, Vargas E, et al. Spike-and-wave discharge mediated reduction in hippocampal HCN1 Channel function associates with learning deficits in a genetic mouse model of epilepsy[J]. Neurobiol Dis, 2014, 64: 30-35.
- [9] Wang J, Chen S, Siegelbaum SA. Regulation of hyperpolarization-activated HCN Channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions[J]. J Gen Physiol, 2001, 118(3): 237-250.
- [10] Wainger BJ, Degennaro M, Santoro B, et al. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels[J]. Nature, 2001, 411(6839): 805-810.
- [11] Hammond C, Bergman H, Brown P. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments [J]. Trends Neurosci, 2007, 30(7): 357-364.
- [12] He C, Chen F, Li B, et al. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations[J]. Prog Neurobiol, 2014, 112: 1-23.

(2016-01-03 收稿 2016-04-25 修回)