

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00233

促肾上腺皮质激素释放激素对原代培养海马神经元谷氨酸诱发电流的调节作用

盛 慧¹, 马 蓓¹, 闫坚强², 孙婷婷¹, 倪 鑫^{1*}

1. 第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433

2. 上海体育学院运动科学学院, 上海 200438

[摘要] **目的:** 研究促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)对原代培养海马神经元谷氨酸诱发电流(I_{GLU})的调节作用, 并初步探讨其可能机制。 **方法:** 应用免疫荧光细胞化学方法观察原代培养的大鼠海马神经元 CRH 两型受体的表达; 通过全细胞膜片钳技术研究 CRH 对海马神经元 I_{GLU} 的调节作用及其可能涉及的胞内信号通路。 **结果:** CRH 作用 2 min 明显抑制海马神经元 I_{GLU} , 且呈剂量依赖性; 细胞外给予 CRH 受体广谱拮抗剂 α -helical CRH 或 CRHR1 特异性拮抗剂 antalarmin 能完全阻断 CRH 对 I_{GLU} 的抑制作用, CRHR2 特异性拮抗剂 astressin-2B 对此没有明显作用; 细胞内给予蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的抑制剂 G66976 可阻断 CRH 对 I_{GLU} 的抑制作用。 **结论:** 多肽类激素 CRH 可抑制原代培养的海马神经元 I_{GLU} , 这种作用由 CRHR1 介导, 并可能涉及 PKC 信号通路。

[关键词] 促肾上腺皮质激素释放激素; 谷氨酸; 海马; 电生理学

[中图分类号] R 338 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0233-05

Regulatory effect of corticotrophin-releasing hormone on glutamate-mediated current in cultured hippocampal neurons

SHENG Hui¹, MA Bei¹, LÜ Jian-qiang², SUN Ting-ting¹, NI Xin^{1*}

1. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438

[ABSTRACT] **Objective:** To examine the regulatory effect of corticotrophin-releasing hormone (CRH) on glutamate-mediated current (I_{GLU}) in cultured hippocampal neurons and to study the related mechanism. **Methods:** Immunofluorescence analysis was used to investigate whether the cultured hippocampal neurons express CRH receptors, and the whole-cell patch-clamp technique was used to examine the direct modulation of CRH on I_{GLU} and the possible intracellular signal pathway. **Results:** Two minutes' exposure to CRH obviously depressed I_{GLU} in the neurons in a dose-dependent manner. CRH receptor antagonist α -helical CRH or CRH receptor type 1 (CRHR1) antagonist antalarmin completely blocked CRH-induced depression of I_{GLU} ; whereas, CRH receptor type 2 (CRHR2) antagonist astressin-2B failed to block the effects of CRH. Application of the PKC inhibitor G66976 totally blocked the CRH-induced decrease of I_{GLU} . **Conclusion:** CRH can inhibit I_{GLU} in primary cultured hippocampal neurons, which is mediated by CRHR1 and may involve the PKC signal pathway.

[KEY WORDS] corticotrophin-releasing hormone; glutamate; hippocampus; electrophysiology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3): 233-237]

促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)由 41 个氨基酸残基组成, 是下丘脑分泌的一种调节下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis)功

能的多肽类激素, 也是机体发生应激反应时发挥神经内分泌调节作用的关键激素。CRH 神经元和 CRH 受体广泛分布于海马, 参与和影响了海马的众多生理功能^[1-3]。CRH 功能十分复杂, 其既能抑制

[收稿日期] 2008-07-08 **[接受日期]** 2008-11-23

[基金项目] 教育部长江学者与创新团队计划(IRT0528). Supported by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in Universities(IRT0528).

[作者简介] 盛 慧, 博士生, 讲师. E-mail: huisheng7979@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81870978, E-mail: nxljq2003@yahoo.com.cn

β -淀粉样肽或谷氨酸(glutamate, GLU)引起的原代培养大鼠海马神经元凋亡,也能参与脑缺血或 GLU 引起的海马损伤。

GLU 是海马最主要的兴奋性神经递质,海马富含各型 GLU 受体,包括:促代谢型受体和促离子型受体。促离子型受体依据其药理特性又可分为 NMDA 受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor)、AMPA 受体(α -amino-3-hydroxy-4-isoxazoleproionate receptor)、KA 受体(kainic acid receptor)等。GLU 及其受体在海马功能的发挥中扮演了重要的角色,对海马依赖性学习记忆功能及海马神经元的损伤有着重要意义^[4-5],且受多种因素的调节。

鉴于 CRH 和 GLU 都与海马众多生理功能密切相关,而目前有关 CRH 对 GLU 功能的调控尚无文献报道。故本研究针对 GLU 诱发电流,运用全细胞膜片钳等技术,观察 CRH 对原代培养的大鼠海马神经元 GLU 诱发电流的调节作用,并初步探讨其作用的内在机制,以进一步了解海马上 GLU 相关生理功能的调节因素。

1 材料和方法

1.1 海马神经元培养

取新生 24 h 内 SD 大鼠 1~2 只,以 75%乙醇消毒,无菌条件下断头、取双侧海马,剪碎后以 0.125%胰蛋白酶消化 14~16 min,用完全培养液(80%DMEM+10%胎牛血清+10%马血清)终止消化,吹打后以完全培养液稀释成 5×10^5 /ml 的细胞悬液,接种于 24 孔培养板的孔洞内、经 0.1%多聚赖氨酸处理过的盖玻片上,将培养板置于 37℃、5%CO₂ 孵箱内,3 h 后,每孔加入 250 μ l 完全培养液,24 h 后,去除完全培养液,改加 B27 无血清培养液 500 μ l,以后每 3 d 换液 1 次,每次更换一半的新鲜 B27 无血清培养液,培养 7~10 d 的细胞用于实验研究。

1.2 免疫荧光化学染色法

将接种在 24 孔培养板中的玻片取出,放入 48 孔板中。PBS 吹洗 3 次,每次 10 min;以 4%多聚甲醛固定 1 h,PBS 吹洗 3 次,每次 10 min;加入用 PBS 稀释的 5% BSA,室温封闭 30 min;加入 1:500 稀释的 CRHR1/CRHR2 抗体,阴性对照组加入同等稀释度的正常羊血清,湿盒,4℃过夜;PBS 吹洗 3 次,每次 10 min;加入 1:100 稀释的罗丹明偶联的驴抗羊 IgG,37℃孵育 60 min;PBS 吹洗 3 次,每次 10 min;倒置荧光显微镜下观察结果。

1.3 全细胞膜片钳记录

采用常规高阻抗封接的全细胞记录方式,封接电阻为 G Ω 水平。记录细胞的电信号经膜片钳放大器放大。原始数据经模数转

换仪输入计算机,以 pCLAMP9.2 软件进行分析、统计结果。全细胞记录通常维持 40 min 以上。记录在 20~24℃室温下进行。记录电极采用软质中性无芯玻璃管,于拉制仪(PC-10)上分两步拉制成尖端 1.0~2.0 μ m 的微电极。电极内液(mmol/L):K-D-Gluconate 120、KCl 10、NaCl 5、EGTA 11、CaCl₂ 1、MgCl₂ 2、HEPES 10、Mg-ATP 2、Li-GTP 1,用 NaOH 调节 pH 至 7.2。电极电阻 3~5 M Ω 。药物及给药方法:细胞外灌流成分(mmol/L):NaCl 140、KCl 5、CaCl₂ 2.5、HEPES 10、Glucose 10,用 NaOH 调节 pH 至 7.3~7.4。实验中以细胞外给药方式提供的药物如谷氨酸、CRH 等用细胞外灌流液配制所需浓度,通过软件控制正压给药系统给药。细胞内给药,如以含 Gö6976 的电极内液充灌电极并稳定 10 min,然后开始记录。

1.4 统计学处理

由 pClamp 9.2 软件采样系统获得的图形,直接进入 Clamfit 9.2 软件数据处理系统进行测量、分析、作图。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两项差别采用配对 *t* 检验,多项之间的差别采用单因素方差分析等方法进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CRH 在原代培养大鼠海马神经元上均有表达

对培养至第 8 天的海马神经元进行 NSE、MAP2、GFAP 免疫荧光细胞化学染色,结果显示 95%细胞呈 NSE、MAP2 免疫反应阳性,而仅少数细胞呈 GFAP 免疫反应阳性,提示本研究中原代培养的海马神经元纯度可达 95%。

哺乳类动物 CRH 受体分为两型:CRHR1 和 CRHR2。本研究应用免疫荧光细胞化学的方法,证实 CRHR1 和 CRHR2 在原代培养的大鼠海马神经元上染色呈阳性(图 1)。

2.2 原代培养大鼠海马神经元谷氨酸诱发电流(I_{GLU})的基本特性

培养 7~10 d 的海马神经元,其静息膜电位为 $-(56 \pm 10)$ mV,膜电容为 (45 ± 10) pF。钳制电压为 -60 mV 时,给予 3~300 μ mol/L GLU,均可诱发一内向电流(图 2),其幅值呈剂量依赖关系。40 min 内 I_{GLU} 衰减不超过 1%。

2.3 CRH 抑制海马神经元 I_{GLU}

当钳制电压为 -60 mV 时,细胞外单独给予 CRH ($10^{-12} \sim 10^{-8}$ mol/L)不能诱发出电流。当细胞外持续给予 CRH (10^{-10} mol/L) 2 min,在结束前 5 s 给予 GLU (10^{-4} mol/L),I_{GLU} 被显著抑制,其峰值为给药前的 $(60.2 \pm 2.1)\%$ 。洗去 CRH 后,I_{GLU} 可恢复(图 3)。

CRH($10^{-12} \sim 10^{-8}$ mol/L)对 I_{GLU} 的抑制效应呈剂量依赖关系(图4)。

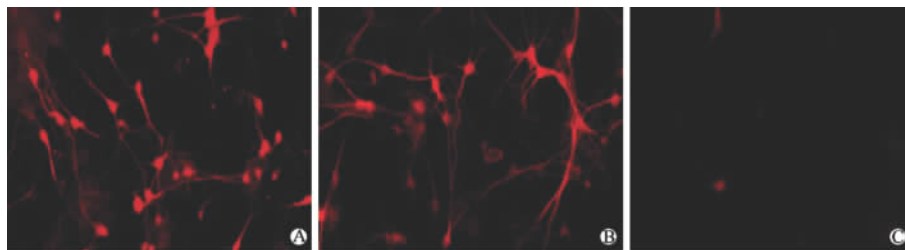


图1 CRH受体在原代培养大鼠海马神经元上的表达

Fig 1 Immunofluorescence analysis of CRH receptors in cultured hippocampal cells

Immunostained with antibody against CRHR1(A) and CRHR2(B);C:Normal goat IgG. Original magnification: $\times 200$

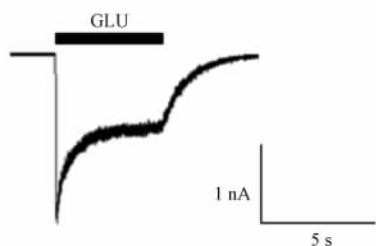


图2 大鼠海马神经元上 10^{-4} mol/L GLU 诱发的电流

Fig 2 Current elicited by 10^{-4} mol/L GLU in cultured hippocampal neurons

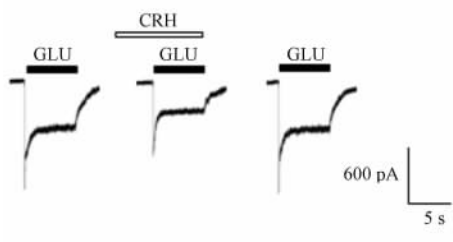


图3 $CRH(10^{-10}$ mol/L)对海马神经元 I_{GLU} 的抑制作用

Fig 3 Representative current traces showing $CRH(10^{-10}$ mol/L) reduced $GLU(10^{-4}$ mol/L)-elicited currents in a hippocampal neuron

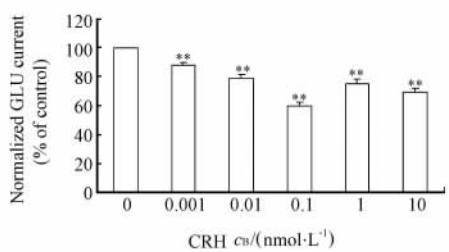


图4 不同浓度的CRH对 I_{GLU} 的抑制作用

Fig 4 Concentration-response of CRH -induced decrease of GLU currents

** $P < 0.01$ vs control(0 group); $n = 8, \bar{x} \pm s$

2.4 介导CRH抑制海马神经元 I_{GLU} 的CRH受体在钳制电压为 -60 mV 时,细胞外单独给予CRH受体广谱拮抗剂 α -helical CRH(10^{-8} mol/L)、CRHR1特异性拮抗剂 antalarmin(10^{-8} mol/L)、CRHR2特异性拮抗剂 astressin-2B(10^{-8} mol/L)均不能诱发出电流。当 α -helical CRH(10^{-8} mol/L)或 Antalarmin(10^{-8} mol/L)和CRH(10^{-10} mol/L)同时作用2 min,CRH对 I_{GLU} 的抑制作用被完全阻断(图5、图6)。当 astressin-2B(10^{-8} mol/L)和CRH(10^{-10} mol/L)同时作用2 min, I_{GLU} 峰值为给药前的(59.6 ± 3.3)%,与单独给予CRH相比,无统计学差异($n = 6, P > 0.05$),提示CRH对 I_{GLU} 的抑制作用不能被 astressin-2B所阻断(图6)。

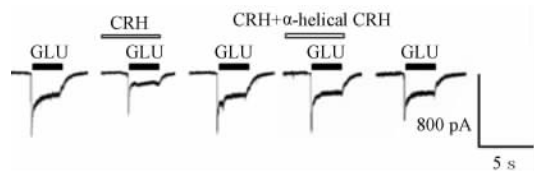


图5 α -helical CRH对CRH抑制 I_{GLU} 作用的影响

Fig 5 Influence of α -helical CRH on inhibitory effect of CRH against I_{GLU}

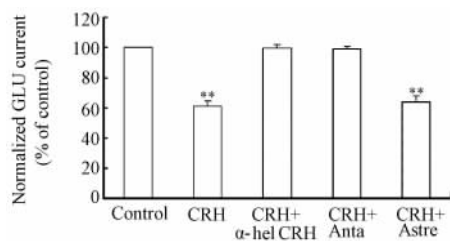


图6 CRH受体拮抗剂对CRH抑制 I_{GLU} 作用的影响

Fig 6 Effects of CRH receptor antagonists on CRH -induced depression of GLU currents

α -helCRH: α -helical CRH; Anta: Antalarmin; Astre: Astressin-2B.

** $P < 0.01$ vs control; $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.5 PKC 通路在 CRH 抑制海马神经元 I_{GLU} 中的作用 细胞内给予蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 抑制剂 Gö6976 (10^{-6} mol/L), 对 I_{GLU} 无明显影响。在此基础上, 细胞外给予 CRH (10^{-10} mol/L) 作用 2 min, I_{GLU} 峰值与给予 CRH 前无明显变化, 提示 CRH 对 I_{GLU} 的抑制作用可完全被 Gö6976 阻断 (图 7)。为进一步确定 PKC 的作用, 本研究又观察了 PKC 激动剂 PMA 的作用。在钳制电压为 -60 mV 时, 细胞外单独给予 PMA (10^{-7} mol/L) 不能诱发出电流。当细胞外持续给予 PMA (10^{-7} mol/L) 2 min, I_{GLU} 峰值被抑制, 为给药前的 (87.3 ± 1.6)%。洗去 PMA 后, I_{GLU} 恢复 (图 7)。

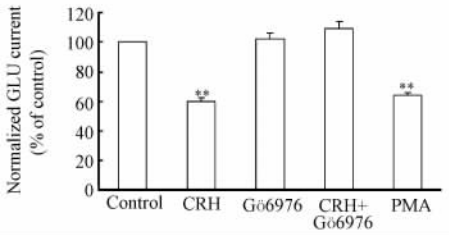


图 7 PKC 通路在 CRH 抑制 I_{GLU} 作用的影响

Fig 7 Effect of PKC signaling pathway on CRH-induced suppression of GLU currents

** $P < 0.01$ vs control; $n = 8, \bar{x} \pm s$

3 讨论

海马神经元上存在各型促离子型 GLU 受体, 包括 NMDA 受体、AMPA 受体和 KA 受体等。它们激活时伴发非特异性的阳离子通道的开放, 产生膜电流。其中, NMDA 受体是一类非常重要而有特色的促离子型受体, 在一定的离子及 pH 值条件下, 可同时结合 2 个 GLU 分子和 2 个甘氨酸分子后开放, 对 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 表现出高通透性。AMPA 受体和 KA 受体是相互独立的受体复合体, 一般对 Na^{+} 、 K^{+} 高通透。而缺乏 GLUR2 亚基的 AMPA 受体对 Ca^{2+} 亦有通透性。故本研究所记录到的 I_{GLU} 可能是 3 种受体通道共同开放的结果。

GLU 受体是中枢神经系统兴奋性突触的突触后膜最重要组成部分之一, 参与突触传导和突触可塑性, 与海马功能等密切相关。有关 GLU 受体的调节已有大量文献报道。Ireland 等^[6] 研究证实, 5-羟色胺受体和代谢型谷氨酸受体激活均能上调 NMDA 受体功能。Grishin 等^[7] 利用大鼠海马 CA3 区脑片标本也证实, M1 型乙酰胆碱受体激活可抑制 NMDA 诱发电流。本实验结果显示, 多肽类激素 CRH 可明显抑制大鼠海马神经元 I_{GLU} , 这种作用呈

CRH 剂量依赖性。考虑到 I_{GLU} 成分复杂, CRH 是针对何种受体介导的电流起作用尚需进一步研究。CRH 受体有两种类型: CRHR1 和 CRHR2。CRH 通过其不同类型的受体在中枢神经系统发挥着不同的生理功能。Radulovic 等^[2] 研究发现, CRH 注入背侧海马可通过 CRHR1 增强小鼠学习和记忆能力; 注入侧中隔区则通过 CRHR2 削弱学习和记忆能力。CRH 还可通过 CRHR1 抑制 β -淀粉样肽或 GLU 引起的原代培养的大鼠海马神经元凋亡, 具有神经保护作用。Steckler 等^[8] 还报道下丘脑 CRHR2 参与调节动物的摄食行为。我们的研究结果显示, CRH 受体广谱的拮抗剂和 CRHR1 特异性拮抗剂可以完全阻断 CRH 对 I_{GLU} 的抑制作用, 而 CRHR2 特异性拮抗剂不能阻断 CRH 的这种抑制作用, 提示 CRH 可通过 CRHR1 抑制海马神经元 I_{GLU} 。而 CRH 的这种效应是否与 CRHR1 所介导的 CRH 对抗 GLU 神经毒性的作用有关尚不清楚。

蛋白质磷酸化对 GLU 受体活性的调控具有重要意义, NMDA 受体、AMPA 受体和 KA 受体上含有多个磷酸化位点, PKC 等多种蛋白激酶均可使这些受体的活性发生显著改变, 进而影响其功能。CRH 受体是 G 蛋白偶联受体超家族成员, 可与不同类型 G 蛋白偶联, 介导细胞内不同的信号转导途径。已证实 CRH 受体可偶联 G_s 、 G_i 、 $G_q/11$ 、 G_o 、 G_z 等, 而 CRH 与其受体结合后可活化 AC 和 PLC, 增加细胞内 cAMP、 IP_3 和 DAG 等的含量, 激活 PKA、PKC 等多条胞内信号转导通路。MacDonald 等^[9] 发现 G 蛋白偶联受体可以通过激活 PKA 和 PKC 等通路调节海马 CA1 区 NMDA 受体功能。Shin 等^[10] 证实, PKC 通路能调节大脑皮质锥体神经元 AMPA 受体的功能。本实验结果表明, PKC 的抑制剂 Gö6976 可以完全阻断 CRH 对海马神经元 I_{GLU} 的抑制作用; 与 CRH 类似, PKC 激动剂 PMA 也可抑制海马神经元 I_{GLU} 。以上结果提示, CRH 对海马神经元 I_{GLU} 的抑制作用涉及 PKC 通路。PKC 包括 Ca^{2+} 和 DAG-依赖的亚型 (α 、 β I、 β II 和 γ)、 Ca^{2+} -非依赖的和 DAG-依赖的亚型 (δ 、 ϵ 、 η 、 θ 、 ν 和 μ) 以及 Ca^{2+} 和 DAG-非依赖的亚型 (ζ 和 λ) 等。Gö6976 只对 PKC α 和 PKC β I 有抑制作用, 故 CRH 抑制海马神经元 I_{GLU} 的作用可能由 PKC α 和 PKC β I 通路介导, 至于 PKC 的其他亚型有无参与 CRH 的这种抑制作用, 尚需进一步研究。

本研究发现多肽类激素 CRH 可抑制原代培养的海马神经元 I_{GLU} , 这种作用由 CRHR1 介导, 并可能涉及 PKC 信号通路。至于 CRH 的这种作用是否

涉及其他胞内信号转导通路,以及可能的生理意义,尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Blank T, Nijholt I, Eckart K, Spiess J. Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress; implications for hippocampus-dependent learning[J]. *J Neurosci*, 2002, 22:3788-3794.
- [2] Radulovic J, Rühmann A, Liepold T, Spiess J. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2[J]. *J Neurosci*, 1999, 19:5016-5025.
- [3] Charron C, Fréchette S, Proulx G, Plamondon H. *In vivo* administration of corticotropin-releasing hormone at remote intervals following ischemia enhances CA1 neuronal survival and recovery of spatial memory impairments; a role for opioid receptors[J]. *Behav Brain Res*, 2008, 188:125-135.
- [4] Kwon H B, Castillo P E. Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses[J]. *Neuron*, 2008, 57:108-120.
- [5] Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid

- J, et al. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors[J]. *J Cell Biol*, 2008, 181:551-565.
- [6] Ireland D R, Guevremont D, Williams J M, Abraham W C. Metabotropic glutamate receptor-mediated depression of the slow after hyperpolarization is gated by tyrosine phosphatases in hippocampal CA1 pyramidal neurons[J]. *J Neurophysiol*, 2004, 92:2811-2899.
- [7] Grishin A A, Benquet P, Gerber U. Muscarinic receptor stimulation reduces NMDA responses in CA3 hippocampal pyramidal cells *via* Ca²⁺-dependent activation of tyrosine phosphatase[J]. *Neuropharmacology*, 2005, 49:328-337.
- [8] Steckler T, Holsboer F. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion[J]. *Biol Psychiatry*, 1999, 46:1480-1508.
- [9] MacDonald J F, Jackson M F, Beazely M A. G protein-coupled receptors control NMDARs and metaplasticity in the hippocampus[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768:941-951.
- [10] Shin J, Shen F, Huguenard J. PKC and polyamine modulation of GluR2-deficient AMPA receptors in immature neocortical pyramidal neurons of the rat[J]. *J Physiol*, 2007, 581(Pt 2): 679-691.

[本文编辑] 贾泽军

· 读者 作者 编者 ·

中草药名称中文、拉丁文及英文对照表(十四)

汉语拼音名	中文名	拉丁名	英文名
Lingxiaohua	凌霄花	<i>Flos Campsis</i>	Chinese Trumpet creeper Flower Common Trumpet creeper Flower
Lingyangjiao	羚羊角	<i>Cornu Saigae Tataricae</i>	Antelope Horn
Lingyinchen	铃茵陈	<i>Herba Siponostegiae</i>	Chinese Siphonostegia Herb
Lingzhi	灵芝	<i>Ganoderma Lucidum seu Sinensis</i>	Lucid Ganoderma
Liuhuang	硫磺	<i>Sulphur</i>	Sulphur
Liujinu	刘寄奴	<i>Herba Artemisiae Anomalaе</i>	Diverse Wormwood Herb
Liulan	柳兰	<i>Herba Epilobii Angustifolii</i>	Great Willowherb Herb
Liushenqu	六神曲	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	Medicated Leaven
Liuyuexue	六月雪	<i>Herba Serissae</i>	Snow of June Herb
Lizhicao	荔枝草	<i>Herba Salviae Plebeiae</i>	Common Sage Herb
Lizhihe	荔枝核	<i>Semen Litchi</i>	Lychee Seed
Longdan	龙胆	<i>Radix Gentianae</i>	Chinese Gentian
Longgu	龙骨	<i>Os Draconis / Fossilia Ossia Mastodi</i>	Dragon's Bones, Fossilized
Longkui	龙葵	<i>Herba Solani Nigri</i>	Black Nightshade Herb
Longliye	龙利叶	<i>Folium Sauropi</i>	Dragon's Tongue Leaf
Longxucao	龙须草	<i>Herba Junci Setchuensis</i>	Devil's Rush Herb
Longyanrou	龙眼肉	<i>Arillus Longan</i>	Dried Longan Pulp
Lougu	蝼蛄	<i>Gryllotalpa</i>	Mole Cricket
Loulu	漏芦	<i>Radix Rhapontici</i>	Uniflower Swisscentaury Root
Lucao	路草	<i>Herba Humuli Scandentis</i>	Japanese Hop Herb
Ludoule	露兜勒	<i>Radix Pandani Tectorii</i>	Thatch Screwpine Root
Luerling	鹿耳翎	<i>Herba Laggerae Alatae</i>	Winged Laggera Herb
Luganshi	炉甘石	<i>Calamina</i>	Calamine
Lugen	芦根	<i>Rhizoma Phragmitis</i>	Reed Rhizome
Luhui	芦荟	<i>Aloe</i>	Aloes
Lulutong	路路通	<i>Fructus Liquidambaris</i>	Beautiful Sweetgum Fruit
Luobumaye	罗布麻叶	<i>Folium Apocyni Veneti</i>	Dogbane Leaf