

领域前沿 · 中国



胡海岚博士, 中国科学院神经科学研究所研究员。1996年毕业于北京大学生物系, 获生物化学和分子生物学专业学士学位。随后在加州大学伯克利分校师从Corey Goodman博士, 研究神经元轴突导向的信号通路。于2002年获得神经生物学博士学位。2003~2004年和2004~2008年期间分别在美国弗吉尼亚大学Julius Zhu博士的实验室和冷泉港Roberto Malinow博士的实验室进行博士后工作。发现情绪促进记忆的分子细胞机制(Cell, 2008)。先后获得美国霍华修斯博士奖学金和Damon Runyon博士后基金。于2008年12月获中国科学院“百人计划”引进国外杰出人才项目资助, 回国建立实验室。胡海岚博士主要从事情绪与社会行为的分子与神经环路机制研究, 其实验室先后发表了调节社会等级的大脑环路基础(Wang *et al.* Science, 2011)以及抑郁症的分子与神经环路机制(Li *et al.* Science, 2013)的研究成果。2012年获国家杰出青年基金。

外侧缰核中的 β CaMKII介导核心抑郁症状的发生

李坤 周涛 胡海岚*

(中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所, 上海 200031)

抑郁症是现代社会非常普遍的慢性精神类疾病, 影响了全世界10%的人口, 也是当今社会诱发人们自杀的重要因素之一。它的高自杀率, 使其成为威胁人类身体和精神健康的“无形杀手”。然而, 关于抑郁症的成因, 目前仍不明确。

传统的观点认为, 抑郁症的发病原因是由于脑内的化学物质, 尤其是单胺递质的改变所引起的。支持这个假说的证据主要是因为很多有效的抗抑郁药物的作用机理都是增加脑内单胺递质的水平。然而越来越多的证据显示, 这个假说并不能充分解释抑郁症的发病机理。例如: 抗抑郁药物可以在很短的时间内增加脑内的单胺水平, 抑郁情绪的改善却需要几周的时间; 并且研究者在单胺递质的信号通路上, 并不能观察到一致的改变。

近年来, 神经可塑性假说认为抑郁症是由于神经网络对外界刺激产生了适应性的改变, 而这些改

变归根结底是由神经可塑性来介导的。尽管这个假说为人们理解抑郁症的发病机理提供了新的视角, 然而其中一些关键性的问题仍有待解决, 比如: 是哪些神经环路发生了可塑性的改变, 产生了哪种类型的可塑性改变, 导致这些可塑性变化的内在分子机制是什么。我们实验室希望围绕这些问题展开我们的研究。

抑郁症的核心症状之一是快感缺失, 也就是对对奖赏的敏感性减弱。外侧缰核是位于大脑奖赏环路中的一个重要核团, 它是连接前脑边缘系统和大脑单胺中心的核心枢纽。已有的研究工作表明, 缰核可以被负面情绪, 如失望、应激、恐惧等激活^[1-3], 并且它的激活会引起对下游单胺类脑区包括奖赏中心脑腹侧被盖区(VTA)的抑制。在多种抑郁动物模型以及患有抑郁症的病人中, 都可以观察到外侧缰核被过度活化^[4-6]。在天生抑郁的大鼠模型中, 外侧缰核神经元的电活动明显增加, 其投射到中脑腹侧被盖区的突触电流mini EPSC的频率明显增加, 说明外侧缰核神经元在抑郁时发生了可塑性的改变^[7]。

*通讯作者。Tel: 021-54921796, E-mail: hailan@ion.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921796, E-mail: hailan@ion.ac.cn

网络出版时间: 2013-11-25 10:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131125.1045.006.html>

以上种种证据提示了这样一个假说: 在正常状态下, 一个相对安静的缰核对奖赏中心VTA有一个较小的抑制; 而当缰核过度活化时, 这种抑制作用会被极大地增强, 进而导致了奖赏敏感性的减弱, 这就形成了抑郁症的核心症状。因此, 我们实验室希望找出是什么样的分子机制介导了缰核在抑郁时的过度兴奋。

为了研究这个问题, 我们决定首先寻找天生抑郁动物缰核中蛋白组分的差异变化。我们从Fritz Henn实验室引进了天生抑郁大鼠品系, 对其后代进行筛选并选择性地繁殖抑郁动物。并与scripps研究所的John Yates实验室的廖鲁剑(现为中国科学院生物化学与细胞生物学研究所研究员)和黄超兰博士(现为中国科学院生物化学与细胞生物学研究所研究员)开展了合作。John Yates实验室发明了一种基于稳定同位素标记的高通量定量蛋白质谱技术。这项技术的核心是将每一个蛋白样品与 N^{15} 标记的大脑内参进行比较^[8]。经过一系列的质谱分析, 对于每一个蛋白, 在正常和天生抑郁的样本中, 都会产生一个 N^{14}/N^{15} 的比值, 然后将这两个比值做除法运算, 我们就会得到每个缰核蛋白的胎段在抑郁状态下和正常状态的比值。

我们采用蛋白变化的对数值和显著性作为筛选候选蛋白的参数(其中显著性是指蛋白变化的标准平均值减去2倍标准差), 根据变化大于50%和显著性大于0作为筛选标准, 我们共鉴定出8个上调和5个下调的蛋白。上调的蛋白多数是可塑性相关的突触分子, 下调的蛋白大都是参与到基础生物合成过程中的酶分子。当查阅这些上调蛋白的相关文献后, 我们发现很多上调蛋白在过表达时, 可以促进mini frequency的增加或者可以促进突触的生长。然后, 我们用Western blot来验证了这些候选蛋白的变化。在急性习得性无助模型和慢性温和性应激两种动物模型中, 我们发现钙/钙调蛋白激酶II家族中的一个成员—— β CaMKII在抑郁动物的缰核中表达明显增加。同时, 我们在天生抑郁模型中进一步验证了 β CaMKII分子的表达水平, 并得到了和其他抑郁动物模型一致的结果。因此, β CaMKII在缰核的表达增加可能是抑郁症发生的普遍规律, 而不是仅仅局限于某种特定的抑郁诱导方式。缰核还可以细分为更小的外侧和内侧亚核, 我们利用免疫组化的方法直接观察 β CaMKII和它们的磷酸化究竟是在缰核

的哪一部分。结果表明, β CaMKII及其磷酸化的变化局限于外侧缰核。而天生抑郁动物海马组织中, β CaMKII的变化呈现出相反的变化趋势。这说明, β CaMKII在抑郁动物的表达上调具有缰核特异性。

为了研究 β CaMKII是否是导致抑郁症发生的充分和必要条件, 我们克隆出 β CaMKII及与其同家族的另一个成员 α CaMKII的cDNA序列, 并构建了利用ubiquitin的启动子驱动这两个基因表达的AAV病毒载体。经过多次尝试改进转染方法, 我们成功包装出了能够在体内表达目的基因并用于行为学实验的高滴度AAV病毒。我们采用双侧病毒注射的方法, 将AAV- β CaMKII或者AAV- α CaMKII的病毒感染正常小鼠的外侧缰核, 然后在多种抑郁动物模型中检测动物的抑郁症状。

与对照组相比, 外侧缰核过表达 β CaMKII的小鼠, 在强迫游泳实验中, 放弃游泳挣扎的时间明显延长, 而且更早地进入不动状态; 在糖水测试中丧失对糖水的偏好, 分别表现出行为绝望和快感缺乏的状态; 在大鼠的习得性无助实验中, 成功逃避电击的次数明显减少。而在外侧缰核过表达 α CaMKII并不会产生类似的现象。由于 β CaMKII既可以作为激酶又可以作为骨架蛋白发挥功能。当在外侧缰核过表达 β CaMKII的激酶缺失形式, K43R(该分子在过表达后可以起到显性失活的作用, 从而阻断内源性 β CaMKII的功能)并不能诱导出动物的抑郁症状^[9]。这说明, β CaMKII在外侧缰核中起促抑郁作用, 依赖于它的激酶活性。这些来自不同种类的行为学检测结果, 都证实了一个相同的结论: 外侧缰核中 β CaMKII的水平异常增加可以直接导致核心抑郁症状的形成。

为了了解 β CaMKII过表达后影响外侧缰核神经元活性与功能的细胞学机制, 我们通过成对的细胞电生理记录比较了病毒感染后过表达 β CaMKII的缰核神经元及临近的未感染神经元。我们首先记录并比较了这些神经元的微小兴奋性突触后电流(mEPSC), 它由兴奋性的谷氨酸受体AMPA介导, 是反映神经将元突触特性的一个指标。感染了AAV- β CaMKII的外侧缰核神经元, 其微小兴奋性突触后电流(mEPSC)的频率和幅度均有了显著的上调, 而感染了AAV- α CaMKII的神经元则没有类似的变化。为了进一步搞清楚这些神经元的电活动输出, 我们又记录了它们的自发放电活动频率。感染了AAV-

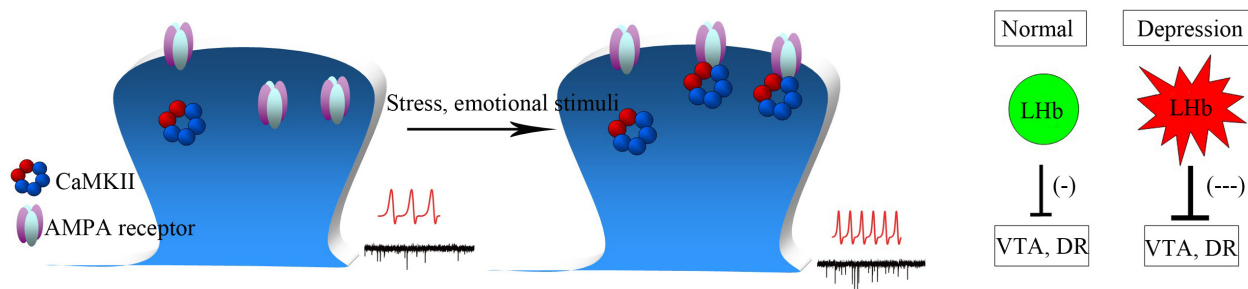
β CaMKII的外侧缰核神经元的自发放电活动输出频率比未感染病毒的神经元上升了3倍之多, 而感染了AAV- α CaMKII病毒或者对照组病毒的神经元则没有这一现象出现。综合以上的电生理记录结果, 我们明确了经过AAV- β CaMKII病毒感染并过表达 β CaMKII后, 外侧缰核神经元的突触能效与动作电位输出均表现出明显增强, 从细胞学层面上揭示了神经元功能的变化。

那么, β CaMKII的过表达是否是引起抑郁症表型的必要因素呢? 为了证明这一问题, 我们通过下调其在外侧缰核的表达或者阻断其功能来看是否可以逆转动物的抑郁行为。首先, 我们使用了RNA干扰的手段特异性地减少 β CaMKII的蛋白表达量。将特异针对 β CaMKII的RNA干扰病毒准确地注射到天生抑郁大鼠的双侧外侧缰核后, 经过一段时间的表达, 我们继续使用强迫游泳和习得性无助测试来检测这些大鼠的抑郁行为。实验结果显示, RNA干扰后, 这些大鼠在强迫游泳中不动的时间显著降低, 而在习得性无助测试中逃避电击的行为则显著增多。习得性无助老鼠的比例也从83%降低到了25%。进一步使用 β CaMKII的激酶失活形式K43R, 并将其通过病毒过表达在天生抑郁大鼠的外侧缰核, 我们观察到了同样的抗抑郁效果。尽管这两种病毒的感染效率略低于 β CaMKII过表达病毒的水平, 但仍然有很强的抗抑郁效果, 这就提示外侧缰核的神经环路有较小的冗余性, 所以只要影响较小比例的神经元就能足够逆转抑郁表型。

是什么样的下游分子介导了 β CaMKII过表达后引起外侧缰核过度兴奋以及抑郁表型的呢? 前人的

研究发现, β CaMKII表达水平的上调会促进海马神经元上GluR1亚型的谷氨酸受体上膜^[10]。因此, 我们首先检测了天生抑郁大鼠外侧缰核内GluR1受体的总量与膜上水平的变化, 并且发现GluR1受体在膜上的水平的确出现了明显上调。抗抑郁药处理可以降低这一水平。为了检测GluR1受体在 β CaMKII介导抑郁过程中的作用, 我们构建了可以同时过表达 β CaMKII与GluR1受体显性失活形式GluR1Ct的病毒载体(GluR1Ct可以阻断GluR1受体的上膜)。将这一病毒注射在双侧外侧缰核后, 小鼠在强迫游泳和糖水偏好实验中表现出与对照组小鼠类似的正常表型, 这就说明, GluR1Ct过表达阻断GluR1上膜后可以阻止由 β CaMKII过表达引起的抑郁表型产生。这一结果提示了GluR1亚型的谷氨酸受体是介导 β CaMKII过表达后引起外侧缰核过度兴奋以及抑郁表型的重要下游分子。

通过综合一系列的分子、行为与电生理实验手段, 我们明确了 β CaMKII是导致外侧缰核过度兴奋与抑郁行为表型的决定性分子。综合我们的实验结果, 我们提出了这样的模型(图1): 因为压力、应激等诱发抑郁的因素导致了外侧缰核中 β CaMKII表达出现上调, 并进一步引起更多的GluR1受体上膜进入突触, 从而提高了突触效能。同时, β CaMKII也可能通过影响缰核神经元上其他通道的特性来一起增强动作电位输出。这些因素综合起来导致了外侧缰核整体的活性上调, 对下游单胺能中心VTA等抑制的加强, 最终导致抑郁行为的产生^[10]。尽管以前有部分研究提示了CaMKII在应激反应及抗抑郁中发挥作用^[12-15], 但是并不明确是具体哪一个CaMKII分



因为压力等刺激导致外侧缰核神经元中 β CaMKII表达出现上调, 从而引起更多的GluR1受体进入突触等变化, 最终导致了外侧缰核整体活性上调, 并加强了对下游单胺能中心(腹侧被盖区VTA及中缝背核DR)的抑制, 继而产生了抑郁行为。

Stress and other aversive emotional stimuli activate LHb neurons and increase the β CaMKII level, which can induce more GluR1 to insert into the synapse and more spontaneous spiking output. The hyper-activated LHb can further inhibit the VTA and DR (Dorsal Raphe), and then lead to the core symptoms of depression.

图1 基于外侧缰核的抑郁模型

Fig.1 The model of depression formation

子在其中起作用, 以及这一特定分子的变化是否是引起抑郁表型的充分与必要条件。我们的工作则为这一问题提供了答案, 同时也为人们进一步认识抑郁症的发病机理并且为今后抑郁症的治疗提供了新的方向和可能的靶点。

参考文献 (References)

- 1 Wirtshafter D, Asin KE, Pitzer MR. Dopamine agonists and stress produce different patterns of Fos-like immunoreactivity in the lateral habenula. *Brain Res* 1994; 633(1/2): 21-6.
- 2 Matsumoto M, Hikosaka O. Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 2007; 447(7148): 1111-5.
- 3 Hikosaka O, Sesack SR, Lecourtier L, Shepard PD. Habenula: Crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci* 2008; 28(46): 11825-9.
- 4 Caldecott-Hazard S, Mazziotta J, Phelps M. Cerebral correlates of depressed behavior in rats, visualized using 14C-2-deoxyglucose autoradiography. *J Neurosci* 1988; 8(6): 1951-61.
- 5 Morris JS, Smith KA, Cowen PJ, Friston KJ, Dolan RJ. Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nuclei following tryptophan depletion. *Neuroimage* 1999; 10(2): 163-72.
- 6 Shumake J, Edwards E, Gonzalez-Lima F. Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior. *Brain Res* 2003; 963(1/2): 274-81.
- 7 Li B, Piriz J, Mirrione M, Chung C, Proulx CD, Schulz D, *et al.* Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* 2011; 470(7335): 535-9.
- 8 Liao L, Park SK, Xu T, Vanderklish P, Yates JR, 3rd. Quantitative proteomic analysis of primary neurons reveals diverse changes in synaptic protein content in *fmr1* knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(40): 15281-6.
- 9 Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium* 2011; 50(1): 1-8.
- 10 Groth RD, Lindskog M, Thiagarajan TC, Li L, Tsien RW. Beta Ca²⁺/CaM-dependent kinase type II triggers upregulation of GluA1 to coordinate adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(2): 828-33.
- 10 Li K, Zhou T, Liao L, Yang Z, Wong C, Henn F, *et al.* β CaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression. *Science* 2013; 341(6149): 1016-20.
- 11 Popoli M, Gennarelli M, Racagni G. Modulation of synaptic plasticity by stress and antidepressants. *Bipolar Disord* 2002; 4(3): 166-82.
- 12 Xing G, Russell S, Hough C, O'Grady J, Zhang L, Yang S, *et al.* Decreased prefrontal CaMKII alpha mRNA in bipolar illness. *Neuroreport* 2002; 13(4): 501-5.
- 13 Suenaga T, Morinobu S, Kawano K, Sawada T, Yamawaki S. Influence of immobilization stress on the levels of CaMKII and phospho-CaMKII in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004; 7(3): 299-309.
- 14 Novak G, Seeman P, Tallerico T. Increased expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIbeta in frontal cortex in schizophrenia and depression. *Synapse* 2006; 59(1): 61-8.