

苯巴比妥急性干预对海马 CA1 区长时程增强不同阶段的影响及其机制

吴鹏¹ 蒋莉^{1*} 陈恒胜²

(¹ 重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 重庆 400014; ² 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 重庆 400014)

摘要 采用急性海马脑片, 分别于长时程增强诱导前、诱导后早期及晚期进行苯巴比妥干预、早期及晚期干预, 检测其对长时程增强诱导与维持两阶段的影响及其可能机制。膜片钳技术检测发现苯巴比妥干预可抑制长时程增强的诱导, 但对双脉冲易化现象无明显影响, 而早期及晚期干预未能抑制长时程增强, 提示苯巴比妥可能通过突触后机制抑制长时程增强的诱导, 但对维持阶段无明显影响。对长时程增强关键蛋白的 Western blot 检测发现, 干预组 p-CaMK II 表达降低, 而 CaMK II 表达无变化; 早期及晚期干预组 CaMK II 及 p-CaMK II 表达均无明显变化, 提示苯巴比妥可能通过降低突触后 CaMK II 磷酸化抑制诱导过程, 其对维持阶段无抑制作用可能与 CaMK II 自我磷酸化及新蛋白质合成无抑制作用密切相关。

关键词 苯巴比妥; 海马脑片; 认知障碍; 长时程增强; 双脉冲易化

苯巴比妥(phenobarbital, PB)是一种巴比妥类的镇静安眠药, 自 1912 年问世以来一直是一线抗癫痫及镇静药物, 用以治疗癫痫、癫痫持续状态以及镇静。在部分难以控制的癫痫综合征如急性脑炎伴难以控制、反复发作癫痫(acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures, AERRPS)的药物治疗中, PB 仍作为首选药物。然而, 现有的临床研究与动物实验均发现, PB 可在人与动物造成明显的认知功能障碍。特别是在婴幼儿阶段, 即使短期应用亦可能通过诱导认知相关脑区(如海马、内嗅皮层、皮层等部位)神经元凋亡与坏死, 导致以海马为主的脑结构性损伤或发育障碍, 最终导致认知损伤^[1]。结构性损伤外, PB 干预是否导致突触功能的变化, 目前少有研究报道。

海马是学习记忆的关键脑区。近年的研究证实, 海马脑区突触间信息传递效能在较长时间内维持较高水平的现象即长时程增强(long-term potentiation, LTP)现象是学习记忆的基本功能性电生理机制, 在体行为学训练可诱发 LTP 现象的出现, 而抑制已产生的 LTP 则可损伤实验动物已建立起来的学习记忆能力^[2]。对应于学习与记忆两个不同的认知阶段, LTP 分为诱导与维持两个不同阶段, 后者根据分子机制的不同维持阶段又分为早期 LTP(E-LTP)与晚期 LTP(L-LTP)^[3]。鉴于 PB 主要通过抑制神经元突触间异常信号转导而发挥抗癫痫作用, 推测 PB 可能在发挥抗癫痫作用的

同时通过抑制 LTP 引起认知功能损伤。有效治疗浓度范围内 PB 是否对 LTP 现象的不同阶段具有不同的作用, 其可能的分子机制是什么, 目前均不清楚。为此, 本研究通过制作未成熟脑的急性海马脑片, 给予有效治疗浓度 PB 20 $\mu\text{g/ml}$ ^[4,5], 采用膜片钳技术进行相应研究。

1 材料与方法

1.1 动物与主要试剂

生后 15 天雄性 Wistar 大鼠(海马结构与功能发育相当于人类婴幼儿时期), 由重庆医科大学实验动物中心提供。苯巴比妥、ATP-Mg、丙酮酸钠购自美国 Sigma 公司, 切片液和记录液其他试剂均为成都科龙分析纯试剂, 蛋白裂解试剂盒购自 Biotime 公司, 蛋白浓度 BCA 测定试剂盒购自 Pierce 公司, PVDF 膜(0.45 μm)购自 Millipore 公司, 分子量 Marker 购自 Fermentas 公司, ECL 显影试剂盒购自 Bioworld 公司, 钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)及磷酸化 CaMK II (p-CaMK II)抗体购自 Cell Signaling 公司。

1.2 急性海马脑片制备

大鼠乙醚麻醉, 心脏灌注 50 ml 冰冷氧饱和人工

脑脊液(ACSF),快速断头取脑,放入氧饱和0~4℃切片液中。于大脑半球腹内侧迅速分离出双侧海马,用振动切片机(WPI,美国)将其切成400 μm厚的脑片。将切好的脑片置于持续通氧混合气的记录液中,35℃下孵育30~45 min后转至室温24℃下孵育至少1 h。ACSF的成分为(mmol/L): NaCl 120、KCl 3、NaH₂PO₄ 1.8、NaHCO₃ 26、CaCl₂ 2、MgCl₂ 2、葡萄糖 10;切片液成分为(mmol/L): KCl 2.8、CaCl₂ 1、MgCl₂ 1、MgSO₄ 2、NaH₂PO₄ 1.5、NaHCO₃ 24、ATP-Mg 2、维生素C 0.4、丙酮酸钠 2、葡萄糖 10、蔗糖 198;记录液成分为(mmol/L): NaCl 124、KCl 2.8、NaH₂PO₄ 1.5、NaHCO₃ 24、CaCl₂ 2、MgSO₄ 2、ATP-Mg 2、维生素C 0.4、丙酮酸钠 2、葡萄糖 10,调节pH值均至7.3~7.4。

1.3 海马脑片电生理检测

将脑片移至记录浴槽,持续灌流氧饱和记录液,速率1.5 ml/min,温度35℃。双极刺激钨电极置于海马CA3区的Schaffer侧支路径上,刺激强度为0.1~0.25 mA。玻璃微电极(内充2 mol/L NaCl溶液,阻抗1~2 MΩ)置于CA1区辐射层,记录电刺激诱发的场兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP),经MultiClamp 700 B放大器(Axon公司,美国)放大,应用pCLAMP 9.2软件(Axon公司,美国)进行采样处理并保存。选取诱发fEPSP最大反应值50%的刺激强度作为基础刺激,待基线稳定30 min后给予高频强直刺激(HFS)诱发LTP。HFS后fEPSP斜率增大20%以上并且维持30 min以上为LTP诱发成功的标准。HFS的参数为两组100 Hz的100个脉冲,组间隔30 s。为观察PB对LTP诱导与E-LTP、L-LTP的影响,根据PB干预时间点的不同分为PB干预组、PB早期干预组及PB晚期干预组,分别于给予HFS前30 min与HFS后30 min、180 min给予有效治疗浓度范围的PB(20 μg/ml),对照组记录液中不加PB。为观察PB对双脉冲易化(paired pulse facilitation, PPF)的影响,给予间隔50 ms的双脉冲刺激,以第二次刺激后fEPSP最大幅度(R2)与第一次刺激fEPSP最大幅度(R1)比值为PPF指数(R2/R1),观察PB给药与撤药过程中R2/R1的变化。

1.4 Western blot 检测

取成功诱导LTP的各组海马脑片,以未给予HFS的海马脑片为阳性对照,加预冷的蛋白裂解液冰上研磨至液态,然后低温高速离心(4℃, 12 000 g, 30 min)留取上清液。取20 μl上清液以BCA法进行蛋白定量测定,所剩上清液按蛋白定量结果稀释,使各组蛋

白浓度一致,然后按4:1体积比加入四分之一上样缓冲液,100℃水浴10 min。取蛋白样品(100 μg)采用10% SDS-PAGE 100V垂直电泳(Bio-Rad,美国)90 min进行分离,然后以1 mA/cm² 55 min半干转(Bio-Rad,美国)至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入CaMK II一抗(1:1 000)或p-CaMK II一抗(1:1 000)或β-actin一抗(1:1 000),4℃孵育过夜。加入相应辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(1:5 000),室温孵育2 h。ECL化学发光法显色,结果经自动凝胶电泳成像分析系统(Bio-Rad,美国)采集并进行图像分析测定吸光度值。利用Quantity One软件计算各组目的蛋白与β-actin的吸光度,取其比值即为目的蛋白的相对值。

1.5 统计学处理

所有数据均用均数±标准差(mean±SEM)表示,两组间比较采用SPSS13.0软件Student's-t检验,以P<0.05认为有统计学意义。

2 结果

2.1 PB对LTP诱导的影响

为观察PB是否影响LTP的诱导,选取基础刺激下fEPSP幅度大于0.3 mv的脑片纳入实验,以给药前fEPSP的斜率为基础值。PB干预组在基线稳定30 min后于记录液中加入20 μg/ml PB,30 min后fEPSP幅度为基础值的23.55%±7.21% (n=51),而对照组fEPSP幅度为基础值的98.02%±13.18% (n=29) (P<0.01)。以HFS前fEPSP斜率为基础值,给予HFS后PB干预组与对照组LTP诱发成功率分别为25.49% (13/51)和41.38% (12/29),可见PB可明显降低LTP的诱发成功率(P<0.05)。在LTP诱发成功的脑片中,HFS后即刻记录fEPSP斜率,PB干预组fEPSP斜率为基础值的183%±19%,明显低于对照组(287%±16%基础值,30 min) (P<0.05) (图1);对照组自HFS后30 min fEPSP斜率未发生明显变化(183%±17%基础值,60 min; 181%±18%基础值,90 min),而PB干预组fEPSP斜率逐渐减小至基础值水平(138%±16%基础值,60 min; 106%±19%基础值,90 min) (P<0.05) (图1)。

2.2 PB对PPF的影响

PPF已被证实仅由突触前神经递质释放引起而与突触后活动无关,常应用于不同实验条件下LTP诱发过程中突触前活动变化的检测^[6]。与干预前比较,PB干预过程中双脉冲刺激后R1、R2值均逐渐减小(PB给药后10 min, n=13, P<0.01),撤药后R1、R2

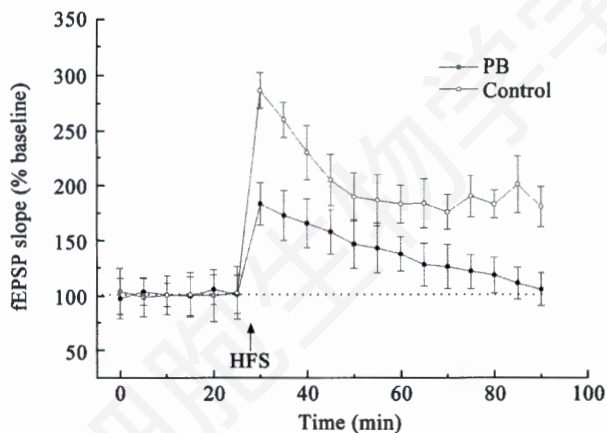


Fig.1 The effect of PB pre-treatment on the LTP induction
LTP was induced by HFS after 30 min of PB perfusion, which was delivered at the time point indicated by an arrow.

值均逐渐恢复(图 2A); 然而, R2/R1 在给药前、给药后及撤药后均未出现明显变化(图 2B)。PPF 诱发成功后给予 PB 干预引起可逆性的 R1、R2 降低, 而 R2/R1 未出现明显变化, 提示 PB 对突触前神经递质的释放可能没有影响, 其主要通过影响突触后机制抑制 LTP 的诱导。

2.3 PB 对 E-LTP 的影响

LTP 分为诱导与维持两个阶段, 诱发成功后 1~3 h 是 LTP 维持的早期阶段, 即 E-LTP 阶段^[3]。以 LTP 维持 30 min 时 fEPSP 斜率为自身对照, 随后给予 PB 干预并记录 fEPSP 斜率的变化。PB 干预 180 min 后 fEPSP 斜率为基础值的 178%±28% (240 min, n=7), 与自身对照无明显区别(189%±13% 基础值, 60 min, n=7), 与非 PB 干预组对照组亦无明显差异(186±25%

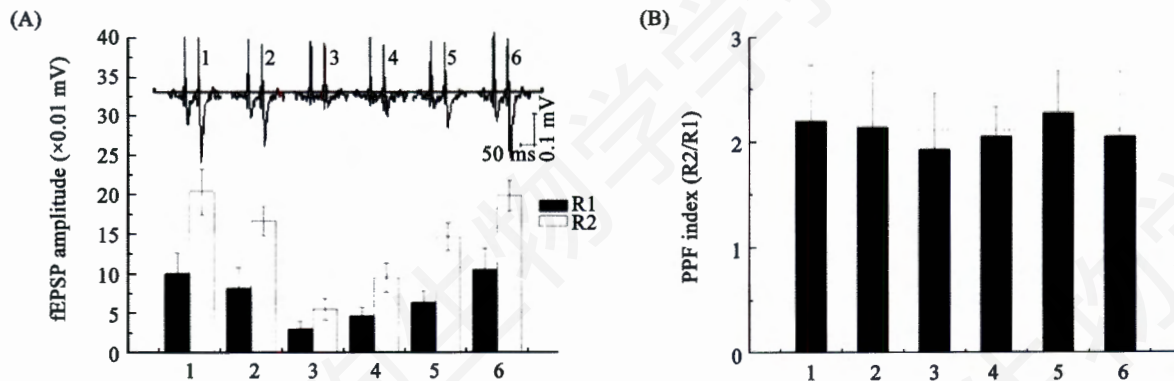


Fig.2 PB did not inhibit PPF

A: PB at therapeutic dose induced a reversible R1 and R2 reduction. Gradually reduced R1 and R2 before (1) and 5,10min (2,3) after drug application and progressively recovered R1 and R2 5,10,15min (4,5,6) after drug washout were presented in the graph. Above were the sample traces of PPF recorded before, during, after drug application; B: represents the averaged PPF index (R2/R1) before, during and after PB superfusion, which had no significant difference in above six time points. The numbers below the graph represent the same as in graph (A).

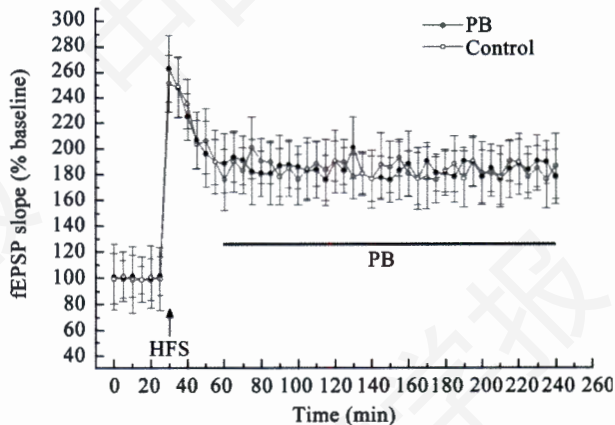


Fig.3 The effect of PB on the early-phase of LTP maintenance
The horizontal dark bar in the graph indicates the time at which PB application occurred.

基础值, 240 min, n=5) (图 3)。

2.4 PB 对 L-LTP 的影响

L-LTP 是 LTP 诱发成功>3 h 后的晚期维持阶段^[3]。以 LTP 维持 3 h 时 fEPSP 斜率为自身对照, 随后给予 PB 干预并记录 fEPSP 斜率的变化。PB 干预后 120 min 后 fEPSP 斜率为基础值的 180%±15% (360 min, n=7), 与自身对照无明显区别(178%±23% 基础值, 360 min, n=7), 与非 PB 干预组对照组亦无明显差异(190%±19% 基础值, 360 min, n=7) (图 4)。

2.5 CaMK II 及 p-CaMK II 蛋白表达的变化

设阳性对照组 CaMK II 及 p-CaMK II 吸光度与 β-actin 的吸光度的比值为 1, PB 预干预后 p-CaMK II 的表达量相对值为 1.16±0.21, 明显低于非 PB 干预组

(2.25 ± 0.47 , $P < 0.05$); 而 LTP 诱发成功后 PB 早期干预组及晚期干预组 p-CaMK II 蛋白的表达与其非 PB 干预组相比, 均未出现明显变化。CaMK II 的表达在 PB 预干预组、PB 早期干预组及 PB 晚期干预组均未出现明显变化(图 5)。

3 讨论

LTP 是突触水平上的一种信息储存方式, 指突触链接在接受一定量的强化刺激后突触传递效能的增强, 主要表现为 fEPSP 的增强^[7]。在海马中, 强直刺激后突触前神经元释放兴奋性神经递质谷氨酸, 后者

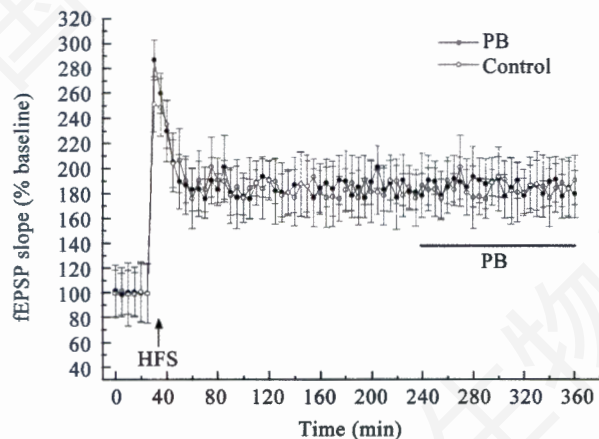


Fig.4 The effect of PB on the late-phase of LTP maintenance
The horizontal dark bar in the graph indicates the time at which PB application occurred.

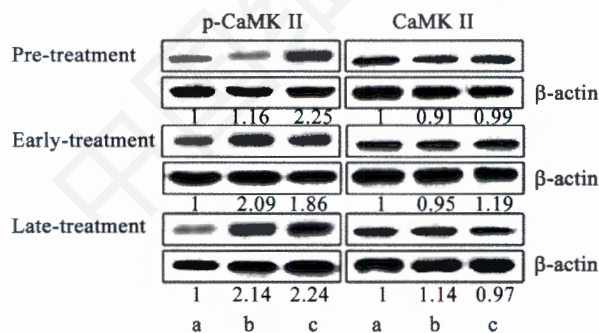


Fig.5 The expression of CaMK II and p-CaMK II in PB pre-treatment group, PB early-treatment group and PB late-treatment group

The letter a, b, c represent respectively positive control group, PB-treated group and PB-untreated group. Values under the bands of PB pre-treatment group, PB early-treatment group and PB late-treatment group were normalized using β -actin expression. The values from positive control groups were arbitrarily assigned a value of 1 and the other values indicated represent relative fold increase (decrease) as compared to positive control groups.

结合突触后膜相应受体进而激发突触后神经元电生理信号转导而产生 fEPSP; 而 PB 控制海马神经元异常放电的机制亦是通过抑制兴奋性信号在突触间的传递发挥抗癫痫作用, 因此 PB 对 LTP 表达过程中兴奋性电生理信号的转导可能具有抑制作用。本研究发现, 有效血药浓度范围内的 PB 可以明显抑制 fEPSP 的幅度与斜率。PPF 是化学突触间最简单的短时活动依赖性突触可塑性, 与 LTP 现象密切相关, PPF 指数越大, HFS 后突触长时程增强幅度越大。PPF 已被证实仅由突触前神经递质释放引起而与突触后活动无关, 常应用于不同实验条件下 LTP 诱发过程中突触前活动变化的检测^[6]。为进一步检测 PB 抑制 fEPSP 是通过突触前抑或突触后机制, 本研究观察 PB 干预下仅与突触前机制有关的 PPF 的变化情况, 发现 PB 虽能明显降低双脉冲刺激下 R1、R2, 但对 PPF 参数 R2/R1 值却没有明显影响, 证实 PB 抑制 fEPSP 可能主要通过突触后机制, 而对突触前神经递质的释放可能没有明显影响。

如前所述, 对应于学习与记忆两个不同的认知阶段, LTP 的形成包括诱导与维持两个阶段^[8], 本研究进而观察 PB 对 LTP 不同阶段的影响。对于 LTP 诱导阶段的研究显示, HFS 前给予 PB 可明显抑制 LTP 诱发成功率; 在 LTP 诱发成功的海马脑片, HFS 后 fEPSP 斜率在 PB 预干预组明显降低, 且随时间延长干预组 fEPSP 斜率逐渐降低, 而对照组 fEPSP 斜率自 LTP 维持 30 min 后未发生明显变化, 提示 PB 可抑制海马脑区 LTP 的诱导过程。国外研究已证实, 神经元内 CaMK II 蛋白 Thr286 位点磷酸化是 LTP 诱发成功的必要因素, 也是 LTP 诱发成功的充分条件^[2]。本研究利用磷酸化 Thr286 位点特异性抗体, 采用 Western blot 蛋白半定量技术检测, 发现 PB 预干预组 p-CaMK II 蛋白表达明显低于对照组, 而 CaMK II 蛋白表达在两组无明显区别, 说明 p-CaMK II 蛋白表达降低缘于 CaMK II 蛋白磷酸化的减少而非 CaMK II 蛋白表达的降低。JM French-Mullen 等的研究发现 PB 可抑制神经元电压依赖性 Ca^{2+} 电流^[9], 而 CaMK II 磷酸化依赖于神经元内 Ca^{2+} 浓度的升高, 提示 PB 可能通过降低 HFS 后海马神经元 Ca^{2+} 内流抑制 CaMK II 蛋白的磷酸化过程。同时, 有研究发现, 突触后膜兴奋性氨基酸受体(NMDA 受体等)介导的 Ca^{2+} 内流并不足以诱导 LTP, 需要神经元内钙库内 Ca^{2+} 的释放以增强受体介导的 Ca^{2+} 内流^[10], 因而 PB 是否影响海马神经元内钙库内 Ca^{2+} 的释放参与其抑制 LTP 诱导的过程也需进一步研究。

LTP诱导成功后在体实验可维持数天, 离体海马脑片水平亦能维持数小时, 根据其形成机制的不同可将LTP维持阶段分为E-LTP与L-LTP两个阶段^[11,12]。在LTP诱导过程的最后阶段, 神经元内Ca²⁺浓度的升高可激活CaMK II并使其Thr286位点磷酸化, 而CaMK II的磷酸化是触发长时程突触性改变的分子开关, 仅仅激活CaMK II就足以出现LTP现象。CaMK II蛋白Thr286位点磷酸化后可启动非Ca²⁺依赖性的自我磷酸化过程, 且持续时间在1 h以上, 该特性是LTP维持1~3 h即E-LTP的必需关键分子机制^[7,13]。本研究在LTP诱发成功30 min后给予PB早期干预, 发现fEPSP斜率并未出现明显降低, Western blot检测发现与对照组比较p-CaMK II及CaMK II蛋白表达均未出现明显变化, 提示PB急性干预对CaMK II的自我磷酸化过程无明显抑制作用。LTP维持阶段由E-LTP向L-LTP(>3 h)的过渡需要新的蛋白质的合成, 有研究发现LTP维持3 h后神经元即会合成新的蛋白质, 且阻断CaMK II的合成可使LTP现象消失^[14-16]。本研究在LTP诱发成功3 h后给予PB晚期干预, 发现fEPSP斜率亦未出现明显降低, Western blot检测发现与对照组比较p-CaMK II及CaMK II蛋白表达亦均未出现明显变化, 提示PB急性干预对LTP过程中新生蛋白质的形成无明显抑制作用。

综上, 急性给予有效血药浓度范围的PB对突触前神经递质的释放没有明显影响, 可能主要通过突触后机制减少Ca²⁺内流而降低CaMK II蛋白的磷酸化, 进而抑制LTP现象的诱导; 对诱导成功的LTP即其维持阶段, PB没有明显抑制作用, 推测可能与PB无法抑制CaMK II蛋白Thr286位点磷酸化后的自我磷酸化过程, 及对新生蛋白质的转录翻译无抑制作用有密切联系。

参考文献(References)

- 1 Drane DL, Meador KJ. Cognitive and behavioral effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Behav* 2002; 3(5S): 49-53.
- 2 Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361(6407):31-9.
- 3 Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 2004; 84(1): 87-136.
- 4 Löscher W. The pharmacokinetics of antiepileptic drugs in rats: consequences for maintaining effective drug levels during prolonged drug administration in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48(7): 1245-58.
- 5 Czapp M, Bankstahl JP, Zibell G, Potschka H. Brain penetration and anticonvulsant efficacy of intranasal phenobarbital in rats. *Epilepsia* 2008; 49(7): 1142-50.
- 6 Commins S, Gigg J, Anderson M, O'Mara SM. Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in the projection from hippocampal area CA1 to the subiculum. *Neuroreport* 1998; 9(18): 4109-13.
- 7 Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 1999;285(5435):1870-4.
- 8 Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, Hanna J, *et al.* Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 2006; 313(5790): 1141-4.
- 9 ffrench-Mullen JM, Barker JL, Rogawski MA. Calcium current block by (-)-pentobarbital, phenobarbital, and CHEB but not (+)-pentobarbital in acutely isolated hippocampal CA1 neurons: comparison with effects on GABA-activated Cl⁻ current. *J Neurosci* 1993; 13(8): 3211-21.
- 10 Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA. NMDA application potentiates synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 1988; 334(6179): 250-2.
- 11 Bliss TV, Gardner-Medwin AR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232(2): 357-74.
- 12 Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232(2): 331-56.
- 13 Lisman J, Malenka RC, Nicoll RA, Malinow R. Learning mechanisms: the case for CaM-KII. *Science* 1997; 276(5321): 2001-2.
- 14 Frey U, Morris RG. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 1997; 385(6616): 533-6.
- 15 Nguyen PV, Abel T, Kandel ER. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 1994; 265(5175): 1104-7.
- 16 Fazeli MS, Corbet J, Dunn MJ, Dolphin AC, Bliss TV. Changes in protein synthesis accompanying long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo*. *J Neurosci* 1993; 13(4): 1346-53.

The Effects of Acute Phenobarbital Application on the Different Phases of Long-term Potentiation in Rat Hippocampal CA1 Area

Peng Wu, Li Jiang*, Heng-Sheng Chen

(Department of Neurology, Children's Hospital of Chongqing Medical University,
Chongqing 400014, China)

Abstract To explore the effect of phenobarbital on the different phases of long-term potentiation at the therapeutic concentration in rat hippocampal CA1 area and its possible mechanisms, hippocampal slices prepared from male Wistar rats on postnatal 15 days were divided into three groups: PB pre-treatment group, PB early-treatment group and PB late-treatment group. The effects of PB on field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) after high-frequency stimulation (HFS) or double-pulse stimulation were examined with patch clamp technique. The expression of calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) and phosphorylated CaMK II (p-CaMK II) were examined by Western blot analysis. We found that: (1) PB inhibited fEPSPs without modifying paired-pulse facilitation (PPF) which solely occurred presynaptically as a simple form of synaptic plasticity; (2) pretreatment with PB before HFS decreased the fEPSPs slope; (3) no significant effects of PB on fEPSPs slope were found in two maintenance phases of LTP; (4) expression of p-CaMK II but not CaMK II decreased in PB pre-treatment group, and however no differences were detected of p-CaMK II and CaMK II expression in PB early-treatment group and PB late-treatment group. The results indicated that PB inhibited the induction of LTP postsynaptically through inhibiting the expression of p-CaMK II without modifying presynaptic neurotransmitter release and PB had no significant influence on the two maintenance phases of LTP with no effects on the expression of CaMK II and p-CaMK II.

Key words phenobarbital; cognitive impairments; long-term potentiation; hippocampal slices; paired-pulse facilitation

Received: November 09, 2009 Accepted: May 21, 2010

*Corresponding author. Tel: 86-23-63624424, Email: dr_jiangli@126.com