

PTP α 基因敲除对小鼠海马 CA1 区 突触可塑性的影响*

陈聚涛^{1,2}

(1. 中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230027;

2. Department of Clinical Research, Singapore General Hospital, Singapore 169608)

摘要:通过 PTP α 基因敲除 (knock out) 小鼠来研究海马突触可塑性的变化, 在海马 schaffer collateral-CA1 通路中采用场电位记录的方法研究发现, 与 Wild Type 相比较, 基因敲除小鼠的 Long Term Potentiation (LTP) 增强而 Long Term Depression (LTD) 受到抑制, 去增强效应消失, θ 频率诱导的 LTP 增强, 但是其基本的突触传递性质并没有发生变化。

关键词:PTP α ; 海马; 基因敲除; LTP; LTD; 去增强

中图分类号: Q421 文献标识码: A

Effects of protein tyrosine phosphatase α knock out on Hippocampal CA1 synaptic plasticity

CHEN Ju-tao^{1,2}

(1. School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;

2. Department of Clinical Research, Singapore General Hospital, Singapore 169608)

Abstract: To investigate the role of PTP α in synaptic plasticity, the fEPSP in hippocampal CA1 region was recorded by using the gene targeting deletion mice. Long Term Potentiation (LTP) was significantly enhanced while Long Term Depression (LTD) and depotentiation was diminished in PTP α ^{-/-} mice compared with Wild Type slices. Theta burst stimulation which can induce largest LTP amplitude in hippocampus also induced higher LTP amplitude in PTP α ^{-/-} mice than WT mice in hippocampal CA1 region. But PTP α ^{-/-} shows normal basal synaptic transmission and short term synaptic plasticity. The results indicate that PTP α plays a crucial role in bidirectional synaptic plasticity of the hippocampus, identification of the up- and downstream molecular mechanism should provide more insight into the process of learning and memory.

Key words: PTP α ; Hippocampus; knock out; LTP; LTD; depotentiation

0 引言

蛋白酪氨酸残基的磷酸化是一种重要和关键的信号转导机制, 可以调节细胞的生长、增殖、代谢、分

化、细胞间通讯、细胞迁移以及离子通道活动, 免疫应答等过程。酪氨酸磷酸化作为一个动态过程, 由蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 和蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 协同完成, 前者使其脱磷酸化, 后者则催化酪氨酸磷

* 收稿日期: 2004-06-29; 修回日期: 2005-07-05

作者简介: 陈聚涛 (通讯作者), 男, 1971 年出生, 博士/讲师. 研究方向: 脑学习记忆的细胞和分子机制. E-mail: cjt@ustc.edu.cn;

Tel: 0551-3606374

酸化. 早期认为 PTP 属于为数不多的一类非特异性酶, 但近来研究发现 PTP 组成了一个大家族, 有其结构多样性和复杂性^[1]. PTP α 属于包含一个或者两个 PTP 催化域的受体类亚家族 (receptor-like PTPs, RPTPs), PTP α 含有一个胞外短的受体结合区, 跨膜区和胞内两个 PTP 催化区 (D1, D2), 一般认为膜内近端 D1 负责主要的催化活性而远端 D2 则含有较弱的活性. PTP α 可以通过不同的机制被不同的信号通路所调节, 如钙调素可以在钙离子作用下与 D2 域结合而调节 PTP α 的活性, PTP α 可以识别胞外其他信号分子进而形成复合体而具有动态信号转导功能^[2].

药理学和遗传学研究发现, LTP 和 LTD 都需要激活蛋白磷酸化或者脱磷酸化^[3,4,5]. LTP 诱导以后, NMDA 受体亚型 NR2B 的酪氨酸磷酸化增强, 酪氨酸磷酸酶抑制剂则可以阻断 LTP 和 LTD 的诱导, 降低 NMDA 受体调节的兴奋性突触后电位^[6]. 通过研究另外一种 PTP 基因敲除小鼠 (PTP δ) 发现, 其显示出增强的海马 CA1 与 CA3 区的 LTP^[7]. 近年来的研究表明, PTP α 可能参与了调制神经系统的突触可塑性, PTP α 与电压依赖型钾离子通道 Kv1.2 协调, 可以调控其磷酸化以及对神经递质的反应. PTP α 敲除鼠的行为学研究表明其在 Morris 水迷宫的学习过程中具有缺陷, 活动能力降低, 在海马的发育过程中不能正确引导锥体神经元到达正确位置, 从而造成海马锥体细胞分层^[8,9]; 同时 PTP α 可以调节 Src 家族激酶的活性, 而 Src 可以调节 NMDA 受体的功能^[10,11,12], 从而显示 PTP α 在神经系统特别是海马突触可塑性的形成过程中有一定的作用.

1 材料与方法

1.1 动物提供

基因敲除及对照组 (wild type) 动物都是由 Institute of Molecule and Cell Biology of Singapore (IMCB) 动物房提供, 鼠龄为 5~7 周, 实验者实验时不知道动物的基因型, 实验后用动物尾巴做 PCR 确定.

1.2 实验过程

小鼠断头后剥离海马, 用切片机将海马制备成 400 μm 厚的海马切片, 并在室温下放置于含有人工脑脊液的预置小室里 (BST-1, Harvard Apparatus), 同时通以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体. 人工

脑脊液的组成是: NaCl 126 mM, KCl 2.5 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1.5 mM, NaHCO₃ 26 mM, Glucose 10 mM. 脑片需在室温下稳定 1 h 以上才能用于实验, 实验时将脑片转移到记录小室中 (PSMI, Harvard Apparatus), 持续以 1~2 mL/min 通以 30~31°C 含有饱和和 95% O₂ + 5% CO₂ 的人工脑脊液, 脑片小室上方同时也通入 95% O₂ + 5% CO₂.

玻璃电极灌以 3 M NaCl (阻抗 1~4 M Ω) 作为记录电极, 放置于海马 CA1 区的 stratum radiatum 层, 用来记录场兴奋性突触后电位 (fEPSP). 刺激电极用双极同心圆电极 (FHC, US) 放置在雪氏侧枝 (schaffer collateral) 通路上. 通过调整刺激强度 (波宽 0.2 ms) 的大小来产生输入输出曲线, 基线反应调整到能产生最大反应的 40% 左右, 刺激频率为 0.033 Hz. 双脉冲反应 (paired pulse ratio, PPR) 调节两个刺激的间隔从 10~400 ms, 用第二个反应的斜率与第一个反应斜率比值来衡量 PPR. LTP 诱导用两个持续 1 s 100 Hz 的刺激产生, 两串刺激间隔 20 s. 同突触 LTD 诱导用持续 15 min 的 1 Hz 刺激产生, 去增强效应是先诱导 LTP 后稳定 30 min 后再诱导 LTD.

1.3 数据处理

fEPSP 值以起始反应的斜率表示, 每三个连续波形作平均并表示为基线的百分比. 所有的数据都是通过 Axon Multiclamp 700A (Foster City, US) 放大器采集, 滤波 0.1~5 kHz, 采集频率 10 kHz, 并通过 Axon pClamp8.1 (Axon Instrument, Foster City, US) 软件离线分析数据. 方差分析 (ANOVA) 用来测定是否有明显差异, 并辅以 Bonferroni 作为 post-hoc 分析, $p < 0.01$ 被认为是显著性差别, 实验中所有药品均来自 Sigma-Aldrich (Singapore).

2 实验结果

2.1 PTP α 基因敲除不改变海马 CA1 区的基本突触传递

为了评估敲除 PTP α 后是否会改变海马 CA1 区的基本突触传递效率, 我们测定了雪氏侧枝至 CA1 区的基本输入输出曲线, 如图 1(a) 所示, 在 0~160 μA 刺激范围内, 两种动物都逐渐达到了最大反应值, 但两者之间并没有显著性差异 ($p > 0.05$), 表明 CA1 区的基本突触传递并没有因为敲除 PTP α 而改变. 我们又采用了双脉冲增强反应来检测是否

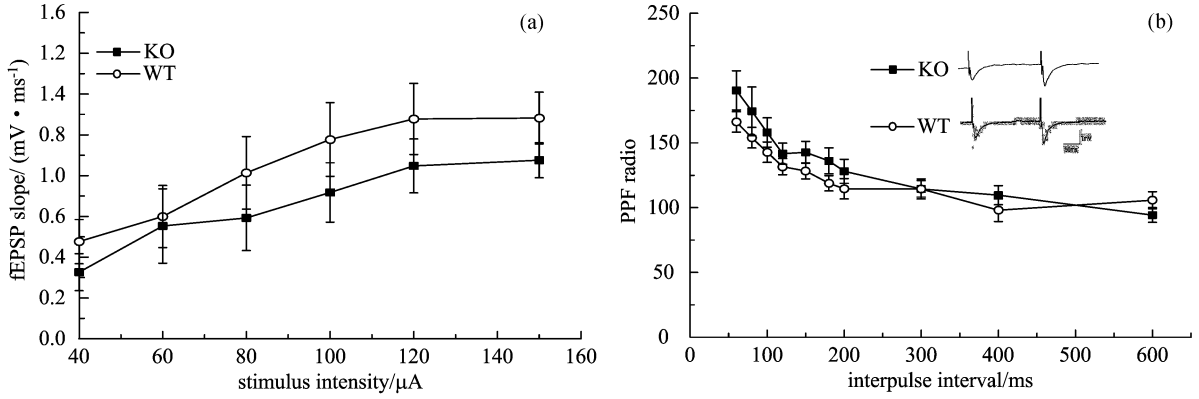


图 1 输入输出曲线(a)和双脉冲曲线(b)

Fig. 1 Input-output curves (a) and paired pulse facilitation(b)

会有突触前的短时程可塑性变化^[13],如图 1(b)所示,两种动物都展示了相类似的曲线,并没有揭示出任何显著差异.以上结果表明,在 PTP α 基因敲除小鼠,基本突触传递和短时程可塑性是正常的,并没有因为基因的敲除而发生变化.

2.2 在 PTP α 敲除小鼠海马 CA1 区中产生增强的 LTP

强直刺激在两种动物中都产生了强直后增强 (PTP),但是在基因敲除鼠上产生的明显要比对照组要大(图 2, $n=15$, $p<0.05$),高频刺激 10 min 后,对照组 LTP 幅度就保持稳定 ($162.53\% \pm 16.21\%$, $n=11$),但是在基因敲除鼠却在接下来的 30 min 内持续增强,在强直后 60 min 达到 $220.47\% \pm 22.64\%$ ($p<0.01$).

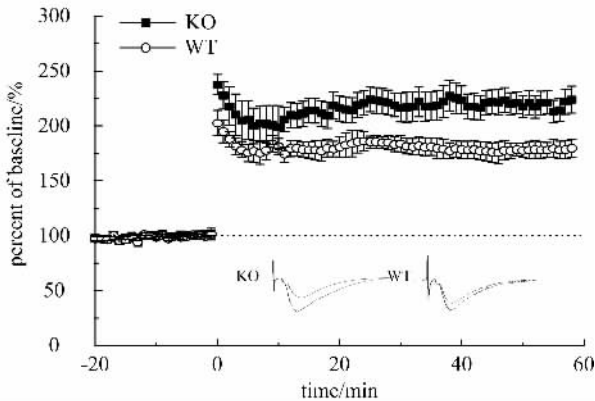


图 2 在两种动物上诱导出的 LTP

Fig. 2 LTP induced in WT and PTP α knock out mice

2.3 在 PTP $\alpha^{-/-}$ 海马 CA1 区中减小的 LTD

接下来我们分析了海马 CA1 区另外一种同突触的突触可塑性表现形式——LTD,低频刺激 (1

Hz, 15 min)可以很容易的诱导出 LTD,但是在基因敲除鼠上诱导出的 LTD 明显要小于对照组 ($79.12\% \pm 11.03\%$ 对照组, $n=9$; $94.55\% \pm 8.11\%$ 基因敲除组, $n=10$, $p<0.01$, 图 3),这些结果表明 PTP α 在海马 CA1 区突触可塑性中有着十分重要的作用.

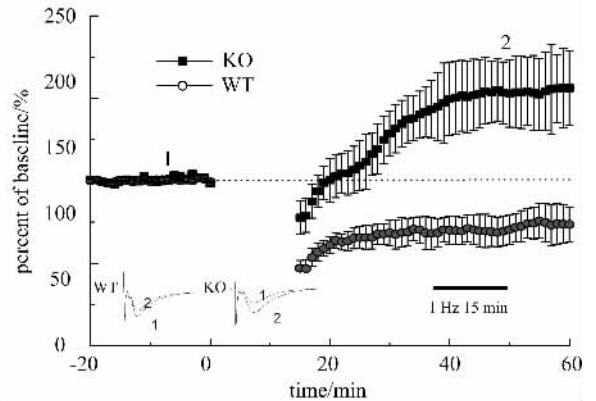


图 3 在两种动物上诱导的 LTD

Fig. 3 LTD induced in WT and PTP α knock out mice

2.4 在 PTP $\alpha^{-/-}$ 中减小的去增强效应

以前的研究表明,去增强效应也是 NMDA 受体依赖性的,是 LTP 与 LTD 相互转换的一种表现形式^[4].为了检测去增强效应在两种动物上是否有区别,首先高频诱导 (100 Hz, 1 s) LTP 并维持 30 min 后,再用低频刺激 (1 Hz, 900 pulses) 看诱导出的抑制效应的变化.低频刺激以后,对照组可以诱导出稳定的去增强效应,但是在基因敲除小鼠上却诱导出比低频刺激前更强的增强效应(图 4(a), WT: $121.42\% \pm 7.85\%$, $n=4$; KO: $205.15 \pm 13.16\%$, $n=5$).为了阐述的更清楚,将 LTP 的最后 10 min

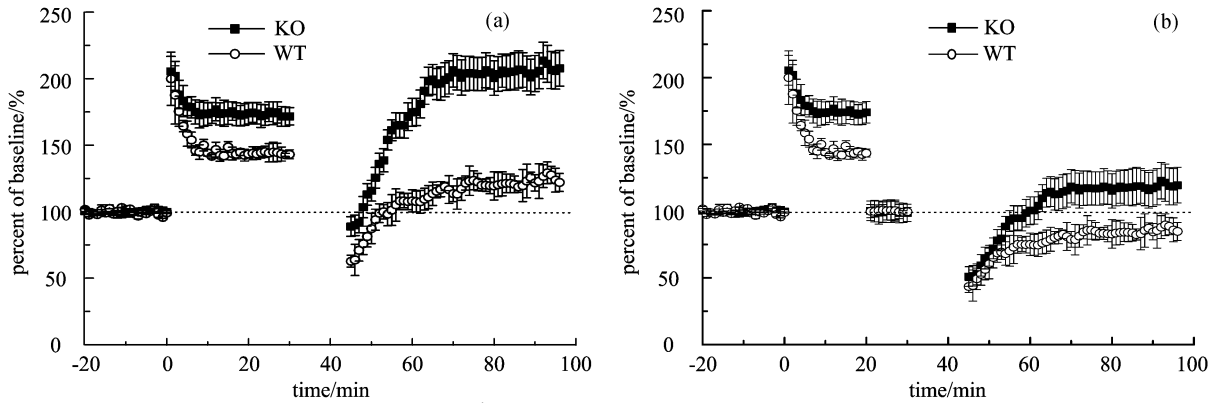


图 4 在两种动物上诱导出的地强效应

Fig. 4 Depotentiation induced in WT and PTP α knock out mice

归一化为 100%，低频刺激后在对照组中产生了 LTD，而在基因敲除鼠中却产生了 LTP (图 4(b), WT: $83.81\% \pm 7.54\%$; KO: $117.37\% \pm 13.06\%$ $p < 0.01$)。

2.5 θ 频率诱导的 LTP

LTP 可以通过不同的频率刺激而诱导出不同的幅度大小，而 theta 频率刺激 (theta burst stimulation, TBS) 是比较接近生理变化的一种刺激，可以诱导出比较大的 LTP 幅度。TBS 含有 10 个 5 Hz 的串刺激，每个串刺激有四个频率为 100 Hz 的单脉冲，TBS 重复 3 次，每次间隔 20 s。TBS 诱导的 LTP 在基因敲除鼠上的要比对照组的大，TBS 刺激 10 min 后，基因敲除鼠的 LTP 幅度明显增强，但在基因敲除鼠上没有 PTP 产生 (图 5, KO: $248.6\% \pm 25.3\%$; WT: $205.7\% \pm 21.8\%$, $p < 0.01$)。

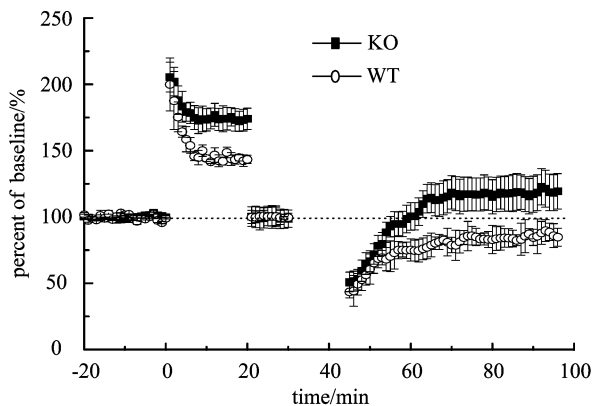


图 5 在两种动物上 TPS 诱导的 LTP

Fig. 5 TBS induced LTP in WT and PTP α knock out mice

3 讨论

电生理结果显示 PTP α 在海马双向突触可塑性

方面有很重要的作用，基因敲除 PTP α 以后，海马 CA1 区的 LTP 增强，LTD 减弱，去增强效应消失，显示 PTP α 可能在这些过程中起到一种抑制作用。酪氨酸磷酸化被认为在基本的突触传递和突触可塑性方面都有重要作用^[14]，但是从 PTP $\alpha^{-/-}$ 与 WT 相比，I/O 曲线和双脉冲反应没有明显差异来看，PTP α 并不包括在基本的突触传递过程中。

LTP 增强一般认为是突触前和突触后共同合作的结果，突触前递质释放量增强，突触后膜受体 AMPA 和 NMDA 受体产生变化。因为在 PTP $\alpha^{-/-}$ 动物中，从反映突触前功能的双脉冲反应以及不变的基本突触传递可以排除这种突触前递质释放量增加的可能。就突触后的机制而言，一般认为有两种可能：一是增强了突触后膜 NMDA 受体的活性。但从全细胞上进行电流记录发现，阻断内源性的 PTP α 抑制了 NMDA 受体活性，而将 PTP α 的两个催化亚基导入神经元则增强 NMDA 受体活性^[12]，所以在 PTP $\alpha^{-/-}$ 增强突触后膜 NMDA 受体活性的解释可以排除。另外一种可能就是 AMPA 受体在 LTP 诱导后在突触后膜表达的增加^[15, 16, 17]，最近的研究表明阻断纹状体丰富的磷酸酶 (STEP) 可以增强强直诱导的 LTP 的幅度，可能机制是因为突触后膜 AMPA 受体的增加^[18]。LTP 在 CA3 区是不依赖于 NMDA 受体的激活，在 PTP δ 缺陷鼠中 CA3 区 LTP 的增强也显示增强的 AMPA 受体的活性^[7]。在 PTP $\alpha^{-/-}$ 小鼠上增加的 LTP 可能与强直刺激后突触后膜上 AMPA 受体表达增多有关。另外最近研究发现 PTP α 可以和突触后致密物 PSD95 的 PDZ2 域直接结合^[12]，而 PSD95 缺陷鼠的电生理结果和 PTP α 缺陷鼠的结果都具有增强的 LTP，降低的 LTD 和去增强效应减弱等特征，而且也显示突触后的磷酸酶

可能导致了 PSD95 缺陷鼠所表现出的这些电生理结果^[19]。所有这些结果暗示在 PSD95 和 PTP α 可能存在相互补偿作用,如果去除其中一个,另外一个或许会有一定程度的补偿作用。

在实验中我们用电生理结果表明,PTP α 在 LTP 和 LTD 双向突触可塑性中都具有重要作用,显示 PTP α 在以海马为主的学习记忆过程中具有一定的调节作用,但是其具体的作用机制尚需要更进一步的研究,如 PTP α 敲除是否影响了 NMDAR 及 AMPA 受体通道特性等方面。

参考文献(References)

- [1] Neel G B, Tonks N K. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction [J]. *Curr. Opin. Cell. Bio.*, 1997,9:193-204.
- [2] Zeng L, D'Alessandri L, Kalousek M B, et al. Protein tyrosine phosphatase alpha and contacting form a novel neuronal receptor complex linked to the intracellular tyrosine kinase fyn[J]. *J Cell. Bio.*, 1999,147(4):707-713.
- [3] Bear M F, Malenka R C. Synaptic plasticity: LTP and LTD[J]. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1994,4:389-399.
- [4] Huang C C, Liang Y C, Hsu K S. Characterization of the mechanism underlying the reversal of long term potentiation by low frequency stimulation at hippocampal CA1 synapses[J]. *J Bio. Chem.*, 2001, 276:48 108-48 117.
- [5] Zeng H K, Chattarji S, Barbarosie M, et al. Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory[J]. *Cell*, 2001,07:617-629.
- [6] Coussens C M, Williams J M, Ireland D R, et al. Tyrosine phosphorylation-dependent inhibition of hippocampal synaptic plasticity [J]. *Neuropharmacology*, 2000,39:2 267-2 277.
- [7] Uetani N, Kato K, Ogura H, et al. Impaired learning with enhanced hippocampal long-term potentiation in PTP δ -deficient mice[J]. *EMBO*, 2000, 19(12): 2 775-2 785.
- [8] Skelton M, Ponniah S, Wang Z M et al. Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPa) knockout mice show deficits in Morris water maze learning, decreased locomotor activity, and decreases in anxiety[J]. *Brain Res.* 2003,984:1-10.
- [9] Petrone A, Battaglia F, Wang C, et al. Receptor protein tyrosine phosphatase a is essential for hippocampal neuronal migration and long-term potentiation[J]. *EMBO*, 2003, 22(16), 4 121-4 131.
- [10] Zheng X M, Wang Y, Pallen C J. Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase[J]. *Nature*, 1992, 359: 336-339.
- [11] den Hertog J, Pals CEGM, Perpelenbosch M P, et al. Receptor protein tyrosine phosphatase α activates pp60c-src and is involved in neuronal differentiation [J]. *EMBO*, 1993,12:3 789-3 798.
- [12] Lei G, Xue S, Chery N, et al. Gain control of N-methyl-D-aspartate receptor activity by receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha[J]. *EMBO*, 2002, 21(12):2 977-2 989.
- [13] Zucker R S. Short-term synaptic plasticity[J]. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1989,12:13-31.
- [14] Boxall A R, Lancaster B. Tyrosine kinases and synaptic transmission [J]. *European Journal of Neuroscience*, 1998,10:2-7.
- [15] Zamanillo D, Sprengel R, et al. Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning [J]. *Science*, 2000, 284: 1 805-1 811.
- [16] Soderling T R, Derkach V A. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP[J]. *Trends Neurosci*, 2000, 23:75-80.
- [17] Lee H K, Barbarosle M, Kameyama K, et al. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity [J]. *Nature*, 2000,405:955-959.
- [18] Pelkey K A, Askalan R, Paul S, et al. Tyrosine phosphatase STEP is a tonic brake on induction of Long term potentiation[J]. *Neuron*, 2002, 34: 127-138.
- [19] Kornau H C, Schenker L T, Kennedy M B, et al. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95 [J]. *Science*, 1995,269:1 737-1 740.