

KN-93 抑制脊髓背角 C-纤维诱发电位 LTP 的诱导和早期维持

杨红卫¹, 胡晓东¹, 张红梅¹, 黎明涛², 张彤¹, 周利君¹, 刘先国¹
(中山大学中山医学院 1. 生理学教研室, 2. 药理学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨钙-钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 在脊髓背角 C-纤维诱发电位长时程增强 (LTP) 的诱导和维持中的作用。【方法】用钨丝微电极在脊髓腰膨大部背角浅层神经元细胞外记录 C-纤维诱发电位, 强直刺激坐骨神经诱导背角 C-纤维诱发电位的 LTP。在 LTP 诱导前后, 在暴露的脊髓表面局部给予 CaMK II 的选择性抑制剂 KN-93, 观察 C-纤维诱发电位的变化。【结果】50 $\mu\text{mol/L}$ 的 KN-93 不影响脊髓背角 C-纤维诱发电位的幅度, 但可完全阻断脊髓背角 LTP 的诱导 ($n=6$)。KN-93 呈时间依赖性翻转脊髓背角 LTP。在 LTP 诱导后 30 min, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 KN-93 对 LTP 的早期表达无影响 ($n=4$), 而 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 KN-93 在用药后, LTP 逐渐降低, 于 3 h 降至对照水平 ($n=6$); 在 LTP 诱导后 1 h 脊髓局部给予 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 KN-93, 7 例动物中有 5 例 LTP 被抑制; 但同样浓度的 KN-93, 在 LTP 诱导后 3 h, 不能翻转业已建立的 LTP ($n=5$), 且增加 KN-93 的浓度至 200 $\mu\text{mol/L}$ 也不能抑制脊髓背角 LTP。【结论】CaMK II 参与脊髓背角 C-纤维诱发电位 LTP 的诱导和早期维持, 但 KN-93 对晚期 LTP 无抑制作用。

关键词: 钙-钙调蛋白依赖性蛋白激酶; KN-93; 长时程增强; 脊髓背角; 神经纤维

中图分类号: R338.2

文献标识码: A

文章编号: 11672-3554 (2003)04-0321-04

KN-93 Blocked the Induction and Early-phase Maintenance of LTP of C-Fiber-Evoked Field Potentials in Spinal Dorsal Horn

YANG Hong-wei¹, HU Xiao-dong¹, ZHANG Hong-mei¹, LI Ming-tao², ZHANG Tong¹,
ZHOU Li-jun¹, LIU Xian-guo¹

(1. Department of Physiology, 2. Department of Pharmacology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the role of calcium / calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) in the induction and maintenance of spinal long-term potentiation (LTP). 【Methods】The C-fiber evoked field potentials were recorded at the superficial layers of spinal dorsal horn at the lumbar enlargement. LTP of C-fiber evoked field potentials was induced by delivering tetanic stimulation to the sciatic nerve of Sprague-Dawley rats. KN-93, a selective and membrane-permeant CaMK II inhibitor was applied directly to the spinal cord at the recording segments before and after LTP induction. 【Results】KN-93 (50 $\mu\text{mol/L}$) completely blocked LTP induction in all 6 rats tested. KN-93 reversed spinal LTP in a time-dependent manner. 30 min after LTP induction, KN-93 (100 $\mu\text{mol/L}$) depressed LTP in 6 rats. KN-93 (100 $\mu\text{mol/L}$), when applied 60 min after LTP induction, depressed LTP in 5 of 7 rats tested. The same concentration of KN-93, applied at 3 h after LTP induction, did not affect LTP in 5 rats. 【Conclusion】Activation of CaMK II may be crucial for the induction and the early-phase but not for the late-phase maintenance of LTP of C-fiber evoked field potentials in spinal

收稿日期: 2003-03-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070256; 30200076); 美国中华医学会 (CMB) 基金资助项目 (1998-766)

作者简介: 杨红卫 (1968-), 男, 湖北宜昌人, 博士生; 刘先国, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: xgliu@gzsums.edu.cn

dorsal horn.

Key words: calcium-calmodulin-dependent protein kinase II; KN-93; long-term potentiation; spinal dorsal horn; nerve fibers

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003, 24(4): 321 ~ 324, 328]

脊髓背角 C-纤维诱发电位的长时程增强(long-term potentiation, LTP)是初级传入 C-纤维与脊髓背角 II 板层神经元的一种活动依赖性兴奋性突触传递效率增强的表现^[1, 2]。电刺激及自然伤害性刺激 C-纤维或急性神经损伤可使脊髓背角 C-纤维诱发电位产生 LTP^[1, 3]。因此,脊髓背角 C-纤维诱发电位 LTP 很可能与中枢敏感化有关^[4],在痛觉过敏中可能起重要作用。迄今为止,对海马 LTP 的研究发现,钙-钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calcium-calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 在 LTP 的诱导中起关键作用^[5],强直刺激引起的 LTP 可被 CaMK II 抑制剂所阻断^[6]。目前对 CaMK II 持续激活是否是 LTP 维持的原因尚存在争议^[6, 7]。因此, CaMK II 在海马和脊髓 LTP 维持中的作用尚不清楚。为阐明 CaMK II 在脊髓背角 C 纤维诱发电位 LTP 的诱导和维持中的作用,我们应用 CaMK II 的选择性抑制剂 KN-93,在 LTP 诱导前、后,直接局部作用于脊髓节段表面,观察 KN-93 对 LTP 的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及准备

实验采用 SD 雄性大鼠(250 ~ 280 g) 51 只,将其分为 4 组。第 1 组为 7.0 mmol/L 的二甲亚砜(DMSO)实验对照组($n=8$);第 2 组为 KN-93 加强直刺激组($n=6$);第 3 组为 KN-92 加强直刺激组($n=6$);第 4 组为强直刺激加 KN-93 组($n=25$);第 5 组为强直刺激加 KN-92 组($n=6$)。乌拉坦(1.4 g/kg)腹腔注射麻醉,行常规气管插管和颈静脉插管。在胸₁₃~腰₁(T₁₃~L₁)行椎板切除术,暴露脊髓腰膨大。游离左侧坐骨神经,使用双极氯化银电极刺激坐骨神经。除用于记录的脊髓节段外,暴露的神经组织均用石蜡油覆盖。颈外动脉插管持续监测动脉血压 10.67~13.33 kPa(80~100 mmHg)。用热反馈系统使大鼠肛温维持在 37.0~37.5℃。

1.2 药 物

在暴露的脊髓表面局部单独给予 KN-93 (Sigma)与 KN-92(Sigma)。KN-93 或 KN-92 溶解于少量二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO, Sigma)后,均配制成 1 mmol/L 的储存液。根据需要,取储存液用人工脑脊液(artificial cerebral spinal fluid, ACSF)将 KN-93 分别稀释成 50 μmol/L、100 μmol/L 和 200 μmol/L 的工作液;临用前取 KN-92 的储存液用 ACSF 稀释为 100 μmol/L 的工作液。工作液中的 DMSO 的终浓度不超过 7.0 mmol/L。

1.3 电生理记录和神经刺激

脊髓背角 C-纤维诱发电位的记录方法如文献[1, 2]所述。用钨丝微电极(电阻 0.5~1 MΩ)进行细胞外记录,电极深度在脊髓表面下 100~500 μm。用数/模转换器(DT2821-F-16SE)以 10 kHz 速度处理和储存数据。以 C-纤维诱发电位的幅度作为参数。单方波(10~20 V, 0.5 ms, 1 min⁻¹)刺激分离的左侧坐骨神经诱发脊髓背角电位,强直刺激(40 V, 0.5 ms, 100 Hz, 持续 1 s, 间隔 10 s, 4 次)诱导 C-纤维诱发电位 LTP。坐骨神经的刺激点到脊髓背角记录点的距离约 11 cm。

1.4 统计学处理

所有数据以 C-纤维诱发电位幅度的 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间差异显著性检验采用组内配对 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 KN-93 阻断 C-纤维诱发电位 LTP 的诱导

在脊髓背角 II 板层引导出 C-纤维诱发电位后,记录 30 min 作为对照。在坐骨神经上施加强直刺激,可诱导出 C-纤维 LTP, 30 min 后 C-纤维诱发电位幅值增加到 (178.0 ± 10.2)% ($n=21$),并可持续 4~8 h。设立实验对照组,即在诱导 LTP 之前或之后加入 7.0 mmol/L 的 DMSO,观察其对 C-纤维诱发电位的影响。结果发现, DMSO 并不影响 C-纤维诱发电位(资料未显示)。

另取 6 只动物,记录 30 min 对照后,在记录节

段脊髓表面加入 KN-93(50 $\mu\text{mol/L}$),作用 30 min, 其对 C-纤维诱发电位幅值无明显影响 ($105.4 \pm 10.8\%$) ($n=6$)。随后在坐骨神经上施加强直刺激,可见 C-纤维诱发电位 LTP 被完全抑制,强直刺激后 1 h 的 C-反应幅值为 ($107.0 \pm 9.8\%$) ($n=6$, $P > 0.05$, 图 1a)。为排除 KN-93 抑制脊髓 LTP 是通过药物的非特异性效应而不是直接抑制 CaMK II 这种可能性,我们观察了 KN-93 的非活性类似物 KN-92 (50 $\mu\text{mol/L}$) 对脊髓 LTP 诱导的影响,发现强直刺激前 30 min 给与 KN-92 对脊髓 LTP 的诱导不起作用 ($n=6$, $P < 0.05$, 图 1b)。

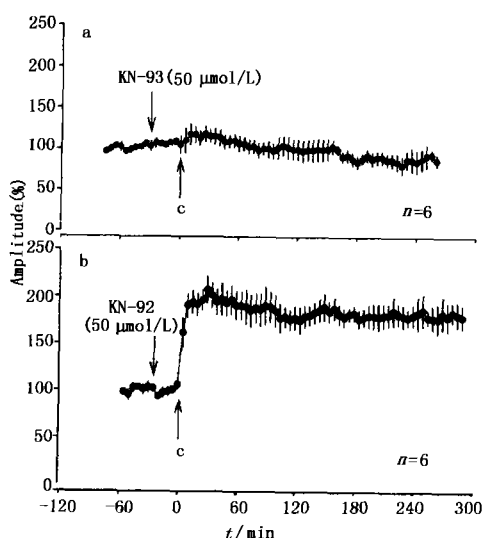


图 1 KN-93 与 KN-92 对脊髓 LTP 诱导的影响

Fig. 1 Effects of KN-93 or KN-92 on the induction of spinal LTP

The mean response of C-fiber evoked field potentials prior to tetanic stimulation serves as control. The amplitudes are expressed as percentage of control. Each data represents the mean amplitudes of five consecutively-recorded C-fiber evoked field potentials. Summary data, expressed as mean \pm SEM, are plotted versus time. The downward arrow indicates the time point in which KN-93 (Fig. 1a) or KN-92 (Fig. 1b) is applied and the upward indicates the time point when tetanic stimulation (0.5-ms duration, 50 V, 100 Hz, given in 4 trains of 1-s duration at 10-s interval) to the sciatic nerve is delivered

2.2 KN-93 时间依赖性翻转 C-纤维诱发电位 LTP

诱导出 LTP 30 min 后,记录节段脊髓表面加入 KN-93(50 $\mu\text{mol/L}$) 对 LTP 无明显影响, C-反应对照值为 ($220.3 \pm 19.3\%$), 而 KN-93 作用 5 h 后为 ($243.5 \pm 22.0\%$) ($P > 0.05$, $n=4$)。但较大剂量的 KN-93(100 $\mu\text{mol/L}$) 则显著抑制 LTP, 药物作用 90 min 后 C-反应幅值由 ($176.7 \pm 13.4\%$) 降至

($146.4 \pm 11.8\%$) ($P < 0.01$, $n=6$), 并使 C-纤维诱发电位逐渐下降至对照水平(图 2d)。但是,同样浓度的 KN-92 对脊髓 LTP 的维持并没有抑制作用。LTP 30 min 给予 KN-92 时的幅值为 ($193.5 \pm 14.2\%$), 在 KN-92 用药后 4 h, 其幅值没有显著性改变 ($n=6$, $P > 0.05$, 图 2e)。

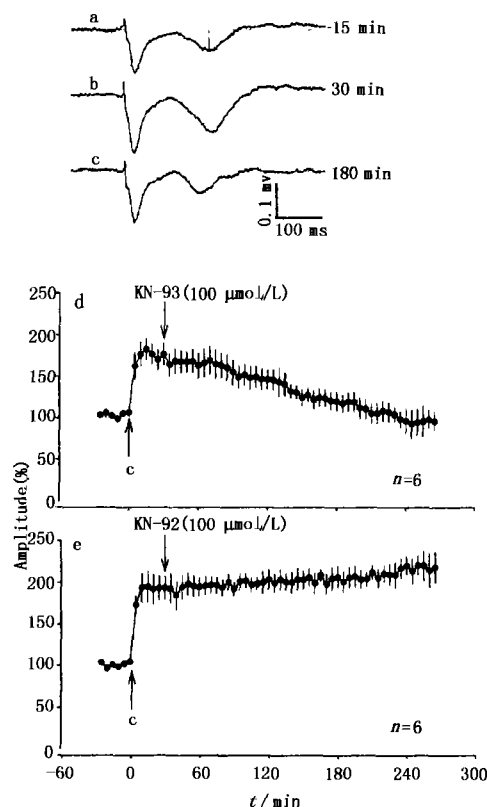


图 2 强直刺激后 30 min 给予 KN-93 或 KN-92 对脊髓 LTP 维持的影响

Fig. 2 Effects of KN-93 or KN-92, applied at 30 min after tetani, on the maintenance of spinal LTP

a, b and c: the original recordings taken at 15 min before tetani, 30 min and 180 min after tetani, respectively. The amplitude of C-fiber evoked field potential, indicated by vertical dashed line, is determined automatically by parameter extraction. d: KN-93; e: KN-92

诱导出 LTP 1 h 后,记录节段脊髓表面加入 KN-93(100 $\mu\text{mol/L}$), 发现 2 只动物 LTP 未见明显的变化, 但另外 5 只动物 LTP 被显著抑制, 药物作用 90 min 后 C-纤维诱发电位幅值由 ($181.6 \pm 13.7\%$) 降低至 ($148.4 \pm 13.7\%$) ($P < 0.05$, $n=5$), 随后 C-反应幅值逐渐恢复到对照水平并维持至少 4 h(图 3)。

诱导出 LTP 3 h 后,记录节段脊髓表面加入 KN-93(100 $\mu\text{mol/L}$) 对晚期 LTP 的维持无明显抑

制作用 ($P > 0.05$, $n = 5$), 结果见图 4; 大剂量的 KN-93 (200 $\mu\text{mol/L}$) 也不能降低 C-纤维诱发电位幅值 ($n = 3$)。

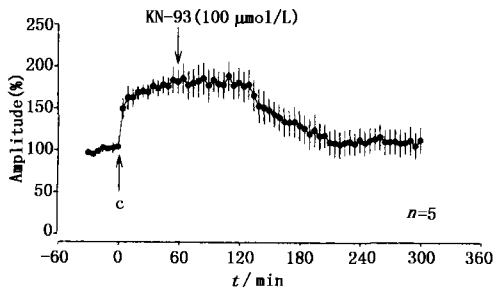


图 3 诱导 LTP 1 h 后给予 KN-93 对脊髓 LTP 维持的影响
Fig. 3 Effects of KN-93, applied at 1 h after tetani, on the maintenance of spinal LTP

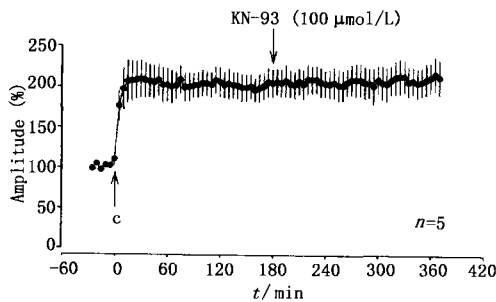


图 4 诱导 LTP 3 h 后给予 KN-93 对脊髓 LTP 维持的影响
Fig. 4 Effects of KN-93, applied at 3 h after tetani, on the late-phase maintenance of spinal LTP

3 讨论

CaMK II 是神经元突触后致密质 (PSD) 中的主要蛋白质,在海马和脊髓中含量丰富。当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高后,钙/钙调素可激活 CaMK II。活化的 CaMK II 可发生自身磷酸化反应。即使细胞内 Ca^{2+} 浓度恢复正常水平, CaMK II 仍能够持久地保持活性状态。海马研究结果表明,使用 CaMK II 抑制剂或敲除 CaMK II 基因^[6,7],可完全抑制海马 LTP 的诱导;而且突触后神经元内给予 CaMK II 或其激活物钙/钙调素能够增强突触传递^[6],说明 CaMK II 在海马突触可塑性变化中发挥重要作用。已经有研究表明,预先给予 KN-93 可抑制辣椒素 (capsaicin) 诱发的中枢敏化^[8]。本文研究结果进一步显示,KN-93 能够完全阻断脊髓背角 C-纤维诱发电位 LTP 的诱导,说明 CaMK II 活性增强在

LTP 的诱导中发挥重要作用。磷酸化的 CaMK II 可通过多种途径增强突触传递,包括增加细胞膜表面 AMPA 受体数目,增强 AMPA 受体电导等。

已经有实验表明^[5,6],诱导出海马 LTP 后, CaMK II 活性显著升高,并可维持至少 1 h。这一现象也存在于脊髓背角神经元中。CaMK II 被认为是一种记忆分子,可能参与海马 LTP 的表达,但是突触后神经元内给予 CaMK II 抑制剂并不能抑制海马 LTP 的维持^[5]。与此相反,脊髓背角 LTP 诱导后 30 min 或 60 min 给予 KN-93 可显著抑制 LTP 的表达。由于 KN-93 能够阻断 Ca^{2+} -依赖性 CaMK II 活性,提示自身磷酸化后 CaMK II 的持久激活参与脊髓 LTP 的早期表达。迄今为止, CaMK II 是否参与晚期 LTP 尚存在较大的争论。在海马中研究 CaMK II 对 LTP 的作用,一般是在离体条件下应用脑片观察。CaMK II 在 LTP 诱导后 1 h 仍然保持其活性,这是到目前为止对其活性研究的已知的最长时间^[5]。而我们的痛觉过敏实验模型,应用脊髓背角 C-纤维诱发电位场电位的记录技术可以较长时间地研究 CaMK II 抑制剂在晚期 LTP 中的作用。本文结果显示,在诱导 LTP 后 3 h 再给予 KN-93,对 LTP 的维持无影响,提示晚期 LTP 的维持可能不同于早期 LTP, CaMK II 不再对 LTP 的维持发挥关键作用。大量实验提示,晚期 LTP 的维持需要新蛋白质的合成,表现出翻译依赖特性^[9]。我们的前期研究结果也证明,记录节段脊髓表面给予蛋白合成抑制剂茴香霉素或放线菌酮可选择性地抑制晚期 LTP 的维持。

脊髓背角 C 纤维诱发电位 LTP 很可能与中枢敏化有关^[4],翻转 LTP 可缓解病理性疼痛。本文结果表明, CaMK II 的抑制剂不仅能阻断 C-纤维诱发电位 LTP 的诱导,而且可时间依赖性地抑制脊髓 LTP。但如何抑制或者翻转脊髓背角的晚期 LTP 从而缓解中枢病理性疼痛,还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Liu X G, Sandkühler J. Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors [J]. *J Neurophysiol*, 1997, 78 (4): 1973.
- [2] Liu X G, Sandkühler J. Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal *N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor

(下转第 328 页 to page 328)

白酶,不易分散。我们在实验中尝试过机械分离、胰蛋白酶、胶原酶及木瓜酶消化传代,但无明显效果。寻找有效的消化传代和扩增方法,有待进一步研究。

从人流组织中寻找、分离 hPGCs 是实验中要特别注意的问题之一。在孕 5~7 周,胚体尚未成人形,而 9 周,hPGCs 开始性分化。通常,由蜕膜、绒毛膜及胚体组成的人流组织中的胚体已碎,极其不容易寻找到完整的胚体,特别是腰骶部组织(含 hPGCs 的生殖嵴)。此外,取人流标本时,要注意在胚胎发育过程中会出现胚胎停止发育或空孕囊妊娠,因此,最好有 B 超检查结果。取到材料后,需尽快分离培养,在 3 h 内完成为好。

参考文献:

- [1] Weissman I L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution[J]. *Cell*, 2000, 100(1): 157.
- [2] Matsui Y, Zsebo K, Hogan B L. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture[J]. *Cell*, 1992, 70(5): 841.
- [3] Resnick J L, Bixler L S, Cheng L, *et al.* Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture[J]. *Nature*, 1992, 359(6395): 550.
- [4] Goto T, Adjaye J, Rodeck C H, *et al.* Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis[J]. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(9): 851.
- [5] Shambloot M J, Axelman J, Wang S, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13726.
- [6] 邱观婷,黄冰,唐仕波,等. 探讨保持胚胎干细胞全能性的体外培养条件[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(2): 100.
- [7] Kelly S J. Studies of the developmental potential of 4-and 8-cell stage mouse blastomeres[J]. *J Exp Zoo*, 1977, 200(3): 365.
- [8] 李晓红,丛笑倩,汪铮,等. 人多潜能胚胎生殖细胞的分离和培养[J]. *实验生物学报*, 2002, 35(2): 142.
- [9] De-Felici M, Pesce M. Growth factors in mouse primordial germ cell migration and proliferation[J]. *Prog Growth Factor Res*, 1994, 5(2): 135.

(编辑 张恩健)

(上接第 324 页 from page 324)

- blockage[J]. *Neurosci Lett*, 1995, 191(1-2): 43.
- [3] Sandkuhler J, Liu X G. Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury[J]. *Eur J Neurosci*, 1998, 10(7): 2476.
- [4] Kenshalo D R Jr, Leonard R B, Chung J M, *et al.* Facilitation of the response of primate spinothalamic cells to cold and to tactile stimuli by noxious heating of the skin[J]. *Pain*, 1982, 12(2): 141.
- [5] Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(3): 175.
- [6] Malinow R, Schulman H, Tsien R W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMK II blocks induction but not expression of LTP[J]. *Science*, 1989, 245(4920): 862.
- [7] Feng T P. The involvement of PKC and multifunctional CaM kinase II of the postsynaptic neuron in induction and maintenance of long-term potentiation[J]. *Prog Brain Res*, 1995, 105(1): 55.
- [8] Fang L, Wu J, Lin Q, *et al.* Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(10): 4196.
- [9] Bliss T V, Collingridge G L. A synaptic model of memory: termilong-term potentiation in the hippocampus[J]. *Nature*, 1993, 361(6407): 31.

(编辑 张敏瑞)