

小鼠海马内 HDAC2 的表达及其与 NMDA 受体、PSD-95 的共定位

姚志刚, 张玲, 刘羽, 黄澜, 马春梅, 许艳峰, 盛树力, 秦川

(北京协和医学院比较医学中心, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨组蛋白去乙酰化酶 2(HDAC2)在成年 C57BL/6 小鼠海马内的分布及其与突触后致密区(PSD)蛋白成员的共定位,为揭示 HDAC2 与 PSD 蛋白复合物之间的内在联系及在海马相关的学习记忆过程中可能起到的调控作用提供形态学依据。**方法** 应用免疫组化方法观察 HDAC2 在 C57BL/6 小鼠海马各区的表达分布。应用免疫荧光双标技术研究 HDAC2 与 PSD 蛋白成员 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体亚单位 1(NR1)、PSD-95 之间是否存在共定位。**结果** HDAC2 在小鼠海马 CA1~CA3 区锥体细胞和齿状回颗粒细胞均具有明显表达,而在各区的始层、辐射层、腔隙-分子层以及齿状回多形细胞层表达均较少。免疫荧光双标染色图片的重叠表明,HDAC2 与 NR1、PSD-95 在小鼠海马 CA1~CA3 区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层内均可见显著共表达现象,其他区域偶见散在分布的双染神经元。**结论** HDAC2 在小鼠海马锥体细胞层和颗粒细胞层表达丰富,并与 PSD 蛋白成员间存在共定位现象。本实验结果为探讨 HDAC2 对谷氨酸能突触后神经元依赖的突触可塑性的调节机制提供了形态学依据。

【关键词】 突触后致密区; PSD-95; 突触可塑性; HDAC; 小鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.001

Distribution of HDAC2 and Co-Expressions with NMDA Receptor 1 and PSD-95 in the Hippocampus of Mice

YAO Zhi-gang, ZHANG Ling, LIU Yu, HUANG Lan, MA Chun-mei, XU Yan-feng, QIN Chuan
(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of histone deacetylase 2 (HDAC2) in the hippocampus of adult C57BL/6 mice and the co-localizations of HDAC2 and PSD components, such as N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor 1 (NR1) and PSD-95, and provide morphological evidence for inherent relationship between postsynaptic density (PSD) components in synapses and HDAC2 in nucleus. **Methods** The morphology and distribution of HDAC2 positive neurons in the hippocampus were observed by immunohistochemistry. The hippocampal distributions of NR1 and PSD-95, as well as co-location with HDAC2 were detected using double immunofluorescence staining. **Results** HDAC2

[基金项目]北京协和医学院博士创新基金(2010-1001-001)。

[作者简介]姚志刚(1982-),男,博士研究生,研究方向:阿尔茨海默病的比较医学。E-mail: yaozhigang-2003@163.com。

[通讯作者]秦川,教授,博士生导师, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

immunoreactivity was mainly observed in hippocampal CA1-CA3 pyramidal cells and dentate gyrus granule cells. The scattered positive cells were accidentally present in the oriens layer, radiate layer and lacunosum-moleculare layer of CA1-CA3 and molecular layer and polymorphic layer of dentate gyrus. The distributions of NR1 and PSD-95 positive neurons are similar to that of HDAC2 positive neurons in the hippocampus. The co-location analysis showed that almost all HDAC2 immunoreactive neurons observed in pyramidal cells of CA1-CA3 and granule cells of dentate gyrus. **Conclusions** HDAC2 is rich in hippocampal pyramidal cell layer and granule cell layer, and co-located with PSD proteins. The results provide a morphological clue to explain the role of HDAC2 in postsynaptic glutamatergic neuron-dependent synaptic plasticity.

【Key words】 Postsynaptic density; PSD-95; Synaptic plasticity; HDAC; Mice

突触后致密区 (postsynaptic density, PSD) 是指在电镜下中枢神经系统内沿突触后膜胞质面分布的一种均匀而致密的带状或盘状结构。该结构厚约 25 ~ 50 nm, 直径约 250 ~ 500 nm^[1]。最近的研究发现, 人脑中的 PSD 含有 1461 种蛋白, 包括膜神经递质受体 (NMDA 受体、AMPA 受体、mGluR 受体等)、信号蛋白 (CaMKII、SynGAP 等)、支架蛋白 (PSD-95、Homer、Shank 等)、细胞骨架蛋白 (tubulin 等)、调节蛋白及修饰酶类 (CaN、PKC、PKA 等) 等^[2,3]。这些蛋白整合在一起形成的蛋白复合物有利于它们之间的相互作用和活性调节, 使突触后信号快速并特异地向胞质和胞核传递以影响蛋白质合成、突触可塑性调节和记忆形成。

组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 能够介导组蛋白赖氨酸残基去乙酰化, 导致带正电荷的赖氨酸残基与带负电荷的 DNA 分子之间的结合力增强、染色质发生固缩, 使启动子不易接近转录调控元件, 从而抑制基因转录^[4]。目前已知 HDACs 包含四大类 18 个亚型, 其中 I 类中的 HDAC2 对突触可塑性和学习记忆能力具有显著的负调控作用, 但具体的分子机制尚未阐明^[5]。而且, 有关 HDAC2 在海马部位的分布及其与 PSD 蛋白复合物是否存在相互作用的报道较少。本实验对 C57BL/6 小鼠海马内 HDAC2 的分布及其是否与多种 PSD 蛋白成员具有共表达关系进行形态学的观察和研究, 以期为进一步探讨 HDAC2 与 PSD 蛋白复合物之间的内在联系及在海马相关的学习记忆过程中可能起到的调控作用提供形态学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 月龄健康雌性 C57BL/6 小鼠 7 只, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 体重 (20 ± 2) g, 合格证号为 SCXK(京)2009-0007。动物饲养于恒温

(25℃) 动物房独立通风系统 (IVC-II 型, 苏州市苏杭科技器材有限公司), 光照 14 h, 黑暗 10 h, 自由饮水取食。小鼠脱臼处死后取全脑, 入恒冷冰冻切片 (Leica CMI850, 德国) 行 10 μm 连续冠状面切片, 隔 3 片取 1 片。切片于 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min, 再在 0.01 mol/L PBS 中放置 30 min, 最后经纯乙醇脱水 2 min, 放入 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.2 实验试剂

小鼠抗小鼠 HDAC2 多克隆抗体及兔抗小鼠 NMDA 受体亚单位 1 (NR1) 多克隆抗体均购自 Abcam 有限公司, 兔抗小鼠 PSD-95 多克隆抗体由首都医科大学北京宣武医院多肽合成室提供。超敏型抗小鼠二步法检测试剂盒、DAB 显色试剂盒、异硫氰荧光素 (FITC) 标记的山羊抗兔 IgG、罗丹明 (TRITC) 标记的山羊抗小鼠 IgG、含有 DAPI 的水溶性封片剂均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组化染色

HDAC2 的组化染色按照试剂盒说明书步骤进行, HDAC2 一抗稀释比例为 1:50。图像拍照及分析应用 ProgRes CCD 摄像头及分析软件。

1.4 免疫荧光双标染色

冰冻切片经 20% 山羊血清室温封闭 20 min 后直接滴加稀释好的两个一抗 (不同种属来源), HDAC2、NR1、PSD-95 的稀释比例分别为 1:50、1:100、1:100, 4℃ 过夜。次日 0.01 mol/L PBS 洗涤后加入混合稀释的荧光标记二抗 (稀释比例均为 1:100), 37℃ 水浴箱内孵育 30 min (注意避光), 0.01 mol/L PBS 充分洗涤后用含有 DAPI (353 nm 波长激发产生蓝色荧光) 的水溶性封片剂封片。阴性对照分别用正常兔和小鼠血清代替一抗, 其余与上述步骤相同。样品利用激光共聚焦显微镜系统 (Leica TCS-SP5) 对免疫荧光染色切片进行分析和拍照, 光源分别用 488 nm 和 550 nm 波长的激光器激发绿色和红色荧光, 扫描分辨率为 1 024 × 1 024 pixel, 计

计算机数据采集,数字成像。

2 结果

2.1 海马内 HDAC2 阳性神经元的分布

HDAC2 免疫组化反应阳性细胞呈棕黄色,以胞核着色为主。在小鼠海马 CA1 ~ CA3 区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层的神经元胞核内,HDAC2 均有较高的表达量;在海马始层、辐射层、腔隙-分子层、分子层和多形层散在分布着少量的 HDAC2 阳性细胞;而在海马槽和海马伞部位罕有 HDAC2 阳性着色细胞。

2.2 NR1、PSD-95 阳性神经元在海马内的分布

由 FITC 绿色荧光基团标记的 NR1 以胞膜着色为主,胞质淡染。阳性染色神经元主要集中在海马 CA1 ~ CA3 区锥体细胞及齿状回(DG)颗粒细胞中,始层、辐射层、腔隙-分子层和多形层可见少量散在分布的阳性神经元(图 1)。PSD-95 为胞质蛋白, FITC 绿色荧光基团标记的阳性神经元主要分布于各区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层,此外始层、辐射层、腔隙-分子层和多形层亦有散在表达(图 2)。但在海马室床和海马伞细胞中均少见有 NR1、PSD-95 阳性染色细胞分布(图 1,2 见彩插 1)。

2.3 HDAC2 与 NR1、PSD-95 的共表达

拍照后的图像叠加处理发现,如图 1 和 2 所示, NR1、PSD-95 染色阳性(绿色)的海马 CA1 ~ CA3 区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层的神经元胞核均有 HDAC2 的表达(红色),且在 CA1 ~ CA3 区始层、辐射层和腔隙-分子层亦可见少量散在分布的双染神经元。此外,DAPI 复染细胞核形成的蓝色区域与红色区域的重叠证实 HDAC2 主要表达于核内。

3 讨论

海马属于边缘系统,是人类和其他哺乳动物大脑的重要组成部分。大量的实验资料和临床观察表明,海马结构与空间和识别记忆密切相关^[6]。C57BL/6 小鼠常被认作是“标准”的近交系小鼠,可为许多基因工程动物提供遗传背景。最近的研究显示,C57BL/6 小鼠海马在 3 月龄后基本发育成熟^[7]。因此,本实验选取 3 月龄 C57BL/6 小鼠海马作为研究 NMDA 受体、PSD-95、HDAC2 表达及共定位的结构基础。NMDA 受体属于亲离子型谷氨酸受体,属于突触后致密区的组成成分之一。NMDA 受体与谷氨酸结合,迫使 NMDA 受体离子孔道中的镁

离子斥出而打开 NMDA 受体孔道,Na⁺ 与 Ca²⁺ 内流使突触后神经元内 Ca²⁺ 浓度升高,激活多种 Ca²⁺ 依赖的信号转导途径,如 Ca²⁺/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II(CaMKII),后者激活细胞核内转录因子诱导基因表达和突触可塑性的改变。突触可塑性能够诱导新神经回路的建立,因此被认为是学习记忆的基本神经机制^[8]。PSD-95 是位于突触后致密区的一种支架蛋白,属于膜相关的鸟苷酸激酶家族。PSD-95 能够形成多聚体与 NMDA 受体亚单位相结合并锚定于突触后的特定部位,并通过与 NMDA 受体信号通路中一系列相关蛋白结合将信号分子、调节分子和靶蛋白有机地整合于谷氨酸能突触结构并形成信号复合体,影响突触结构和功能可塑性^[9]。研究表明,在海马依赖的空间记忆形成过程中,NMDA 受体亚单位 NR1, NR2A 和 PSD-95 可被招募至突触膜表面,以增强突触可塑性过程中突触传递的效能^[10]。并且 PSD-95 还有助于 NMDA 受体的簇集和锚定^[11]。本实验研究发现 NMDA 受体亚单位 NR1 和 PSD-95 在 7 只成年小鼠海马 CA1 ~ CA3 区锥体神经元和齿状回颗粒神经元内均有广泛分布,这与已有的报道相一致^[12,13],表明 PSD 蛋白复合物在海马依赖的学习和记忆过程中起着重要的作用。

近年来,染色质重塑对学习记忆的调控作用越来越成为研究的热点^[14]。本研究发现,HDAC2 在 7 只小鼠海马 CA1 ~ CA3 区锥体细胞和齿状回颗粒细胞核内均有丰富表达,且与 NR1、PSD-95 存在明显共定位现象。Guan 等^[5]发现脑内 HDAC2 过表达时,小鼠海马神经元树突棘密度降低、突触形成减少、CA1 区 LTP 形成障碍、空间记忆和工作记忆障碍。而 HDAC2 敲除或给予了 HDACs 抑制剂的小鼠则表现出了与上述相反的改变。这提示 HDAC2 对突触可塑性和学习记忆具有负调控作用。最近的研究证实,正常小鼠经学习记忆行为训练后海马神经元内 PSD-95、CaMKII α 、CREB 等突触可塑性相关基因启动子区存在组蛋白 H3 和/或 H4 的乙酰化修饰现象^[15,16]。因此,推测在 HDAC2 过表达的小鼠模型中,这些突触可塑性相关基因启动子区组蛋白 H3 和/或 H4 的乙酰化水平下降引起相应蛋白表达减少并导致突触可塑性障碍。相反,在 HDAC2 敲除或给予 HDACs 抑制剂的小鼠脑中,升高的组蛋白乙酰化水平使 PSD-95、CaMKII α 等突触可塑性相关基因表达增加,最终促进突触结构和功能的可塑

性。而在野生型小鼠的学习记忆过程中, PSD 蛋白活化介导的信号转导途径可能参与了对 HDAC2 活性的调节。如甲基化 CpG 结合蛋白 2 (MeCP2) 可结合于基因启动子区并募集 REST、CoREST 和 HDAC2 等形成复合物抑制基因的转录。由 NMDA 受体激活的信号通路可活化 CaMKII, 后者又可进入胞核诱导 MeCP2 磷酸化, 导致转录抑制复合物不稳定性增加而解离, 从而促发基因转录^[17]。最近的研究发现, C57BL/6 小鼠在 16 月龄时海马组蛋白 H3 和 H4 乙酰化水平显著降低并且情景恐惧记忆存在缺陷, 推测其 HDACs (包括 HDAC2) 的表达和/或活性可能有所增高^[18]。

目前有关 HDAC2 对学习记忆的调控机制尚有诸多问题需要深入研究, 例如, HDAC2 参与调控哪些突触可塑性相关基因的表达以及 HDAC2 的上游信号转导通路的识别。结合已有的文献资料 and 我们的实验结果, 从形态学角度推测在学习和记忆过程中, PSD 蛋白成员可能通过信号转导影响核内 HDAC2 转录抑制复合物的装配而促进突触可塑性相关基因的表达, 并且这一机制可能又反过来影响 PSD 蛋白成员的表达水平, 最终导致突触结构和功能的变化以调节学习记忆过程。本研究为探讨染色质修饰在学习记忆中的调节作用提供了细胞学基础, 并为以 C57BL/6 小鼠为遗传背景、具有认知障碍表现的转基因动物的研究提供了形态学线索。

参考文献:

- [1] 冯波, 胡鹏, 王蓉. 突触后致密区与突触可塑性 [J]. 首都医科大学学报, 2010, 31(1):84-87.
- [2] Bayés A, van de Lagemaat LN, et al. Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density [J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14(1):19-21.
- [3] Husi H, Ward MA, Choudhary JS, et al. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes [J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3(7):661-669.
- [4] 林华型, 盛树力. 阿尔采末病发病机制与表观遗传学研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(5):570-573.
- [5] Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity [J]. *Nature*, 2009, 459(7243):55-60.
- [6] Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(40):14515-14520.
- [7] 张敬坤, 张莉, 郭敏. C57/BL6 小鼠海马的发育和衰老 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2010, 31(5):544-547.
- [8] Josselyn SA, Nguyen PV. CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges [J]. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005, 4(5):481-497.
- [9] Lee I, Kesner RP. Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(2):162-168.
- [10] Delint-Ramírez I, Salcedo-Tello P, Bermudez-Rattoni F. Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts [J]. *J Neurochem*, 2008, 106(4):658-668.
- [11] Lim IA, Merrill MA, Chen Y, et al. Disruption of the NMDA receptor-PSD-95 interaction in hippocampal neurons with no obvious physiological short-term effect [J]. *Neuropharmacology*, 2003, 45(6):738-754.
- [12] Maekawa M, Namba T, Suzuki E, et al. NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production of mature granule neurons in the adult hippocampus [J]. *Neurosci Res*, 2009, 63(4):259-266.
- [13] Shao CY, Mirra SS, Sait HB, et al. Postsynaptic degeneration as revealed by PSD-95 reduction occurs after advanced A β and tau pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2011, 122(3):285-292.
- [14] 盛树力. 表观遗传学与阿尔茨海默病研究趋势 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2010, 17(6):395-398.
- [15] Wang L, Lv Z, Hu Z, et al. Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKIIalpha in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(4):913-928.
- [16] Shibasaki M, Mizuno K, Kurokawa K, et al. Enhancement of histone acetylation in midbrain of mice with ethanol physical dependence and its withdrawal [J]. *Synapse*, 2011. doi: 10.1002/syn.20947.
- [17] Zhou Z, Hong EJ, Cohen S, et al. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation [J]. *Neuron*, 2006, 52(2):255-269.
- [18] Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, et al. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice [J]. *Science*, 2010, 328(5979):753-756.

[修回日期]2011-12-27