

急性酒精作用影响中枢神经系统突触前囊泡循环动力学研究

摘要：成瘾性药物的作用机制是神经生物学中一个的热点问题。酒精作为一种常见的成瘾性物质，其对中枢神经系统信号联系的调控机制并不清楚。本课题利用大鼠体外培养的海马神经元，观察急性酒精作用对神经元形态及树突分枝的影响。同时，利用全细胞膜片钳技术，探究急性酒精作用对脑干谷氨酸能花萼状突触囊泡循环的动力学调控。我们的实验结果表明 20 mM 的急性酒精作用对弱刺激下钙电流和囊泡循环没有显著影响；但在强刺激下，急性酒精作用可引起囊泡回收速率的显著降低，从而降低突触传递效率。我们还进一步通过遗传学筛选得到了酒精不耐受小鼠，为进一步了解急性酒精作用对突触传递乃至整个神经网络联系的调控提供了有利的工具。综上，本课题研究结果表明急性酒精作用可以减慢高强度刺激下突触前囊泡循环，从而对突触传递的维系产生重要影响。

关键词：急性酒精作用；囊泡循环；花萼状突触；海马神经元；膜片钳；钙电流

1 前言

酒精作为一种具有成瘾性的活性物质，其在人类社会文化中的使用已有上千年的历史。酒精的滥用可对社会造成沉重的负担。《2014年酒精与健康全球状况报告》中显示，全世界每年因滥用酒精导致了330万人的死亡，占全年非正常死亡人数的5.9%[1]。

在生物学研究领域，酒精对于中枢神经系统也有重要的调控作用，直接或间接参与了大脑中多种神经活动（如睡眠、学习和记忆），但其对作为神经网络结构和功能基本单元的突触传递的调控并不清楚。由于长期以来无法对微小的突触前神经末梢直接进行研究，因此目前已有的关于急性酒精作用对突触传递影响的研究，主要集中于突触后的功能研究上，并且由此推测其对突触前，以至整个突触传递过程的影响：如在小脑及腹侧被盖区（Ventral tegmental area, VTA）中的研究表明酒精可能通过与胞内钙信号相互作用，促进囊泡释放[2]；在海马神经元的研究中发现，急性酒精作用能提高突触前囊泡的释放概率[3]。大鼠脑干区域的花萼状突触（calyx of Held）不仅具有传统突触的一般特性（如动作电位、钙通道、突触可塑性等），还因其具有巨大的突触前末梢而有利于直接在突触前进行膜片钳记录[4]。本课题以该突触为标本，通过全细胞膜片钳记录，研究急性酒精作用对钙电流、囊泡循环等重要突触前特征的调控，从而为急性酒精作用调控突触传递提供有益的突触前信息。

为了探寻急性酒精作用的分子生物学机制，我们进一步通过遗传学实验筛选酒精耐受表型异常小鼠，寻找相关调控基因。目前初步结果发现一个相关基因，081218046 基因。该基因缺失小鼠表现为急性酒精不耐受，急性酒精注射后与野生型相比需要更长的时间才能恢复清醒，并且该基因缺失小鼠的代谢指标并无异常。我们将在后续对该品系小鼠进行进一步的电生理功能研究，揭示其内在调控机制，为寻找药物靶点提供有价值的参考。

2 实验材料和方法

2.1 实验材料和仪器

2.1.1 材料：形态学和电生理实验分别使用出生后0-2天和8-10天的大鼠（SD），基因筛选实验以小鼠（FVB）为材料

2.1.2 仪器：震动切片机（Leica, Germany），膜片钳系统（Scientifica, USA），显微镜（Olympus, Japan）

2.2 材料制备

2.2.1 取出生后 8-10 天的大鼠脑干中含有斜方体内侧核（medial nucleus of the trapezoid body, MNTB）的组织区域，冠状切取 200 μm 厚的脑组织切片，具体方法参照[5]；进行电生理实验前需在 37 $^{\circ}\text{C}$ 人工脑脊液（95% 氧气，5% 二氧化碳混合气体）中孵育 30 分钟以上（实验组中加入酒精）。

2.2.2 取出生后 0-2 天的大鼠海马区域备用，在 0 mM、20 mM 和 40 mM 的酒精浓度梯度下进行原代培养。

2.3 实验步骤

2.3.1 形态学观察

在显微镜下观察海马神经元生长状况，对比不同酒精浓度下树突分枝数量的差异。

2.3.2 电生理记录

对花萼状突触进行全细胞膜电容膜片钳记录。由于囊泡释放回收机制不同，实验采用两种去极化方波模拟弱刺激和强刺激两种刺激模式：1) 弱刺激，即 $\text{depol}_{20\text{ms}}$ ，-80 mV 去极化到+10 mV 方波，持续 20 ms；2) 强刺激，即 $\text{depol}_{20\text{ms}*10}$ ，10 个-80 mV 去极化到+10 mV 方波，每个持续 20 ms，频率为 10 Hz。通过记录突触前的钙信号（弱刺激：钙电流；强刺激：钙电量），囊泡释放量（胞吐）及囊泡回收速率（胞吞速率）等动力学参数，来表征突触前囊泡循环的动力学特征。

2.3.3 遗传学筛选

实验方法参照[6]，通过测量小鼠注射酒精后的沉睡时间，筛选酒精耐受表型异常品系，通过分子生物学手段鉴定相关基因。

2.4 数据处理

实验数据使用 Igor pro (WaveMetrics, USA) 程序分析并统计作图，并利用 t-test 进行统计学检验， $p < 0.05$ 时认为有显著性差异。

3 实验结果

3.1 急性酒精作用对海马神经元形态学影响

实验选取新生大鼠的海马神经元，以不同酒精浓度梯度原代培养三天。显微镜观察结果显示，对照组中单个神经元一级树突分枝数量为 9.4 ± 2.1 ($n = 7$, Fig. 1A)，10 mM 酒精处理后，一级树突分枝显著减少 (4.8 ± 1.6 , $n = 7$, $p < 0.05$, Fig. 1B)，20 mM 酒精处理后，单个神经元一级树突分枝相比对照组同样显著减少 (4.1 ± 1.2 , $n = 7$, $p < 0.05$, Fig. 2C)，但与 10 mM 酒精处理组无显著性差异 ($p = 0.3$)，而经过 40 mM 酒精处理后海马神经元已经全部死亡 (Fig. 3D)，表明其浓度已超过海马神经元耐受能力。我们结果表明，急性酒精作用能够显著减少海马神经元一级树突分枝，暗示急性酒精可能对突触传递有调控作用。接下来我们将利用全细胞膜电容记录，直接在突触前研究急性酒精作用对囊泡循环的动力学调控。我们在电生理实验中选择 20 mM 的酒精浓度进行突触前囊泡循环动力学的研究，并且 20 mM 酒精浓度也接近生理醉酒情况 (20 mM 酒精浓度相当于 0.09 g/100 ml，醉酒浓度标准为 0.08 g/100 ml，数据来自维基百科)。

3.2 急性酒精作用调控突触前囊泡循环

在实验中分别给对照组以及实验组弱刺激 ($\text{depol}_{20\text{ms}}$) 以及强刺激 ($\text{depol}_{20\text{ms}*10}$)，在全细胞模式下记录突触前膜的钙信号 (ICa 或者 QICa)，囊泡释放 (以膜电容变化 ΔC_m 表征) 以及囊泡回收速率 (Rate_endo)。

3.2.1 急性酒精作用不改变弱刺激条件下突触前囊泡循环动力学

实验中，突触前膜电容的变化可以反映囊泡回收和释放的过程[7]，钙电流的大小可以反映刺激后突触前内流钙量，以此表征刺激强度 (Fig. 2)。在对照组中， $\text{depol}_{20\text{ms}}$ 可引起相应的钙电流 (1.9 ± 0.3 nA, $n = 4$)，在突触前产生囊泡释放 (458 ± 120 fF, $n = 4$) 和回收 (43.4 ± 12.1 fF/s, $n = 4$; Fig. 2B-D)。而加入 20 mM 后，实验组在弱刺激下记录到的钙电流，胞吐和胞吞速率并无显著性差异 (ICa: 1.8 ± 0.1 nA, $n = 5$, $p = 0.4$; ΔC_m :

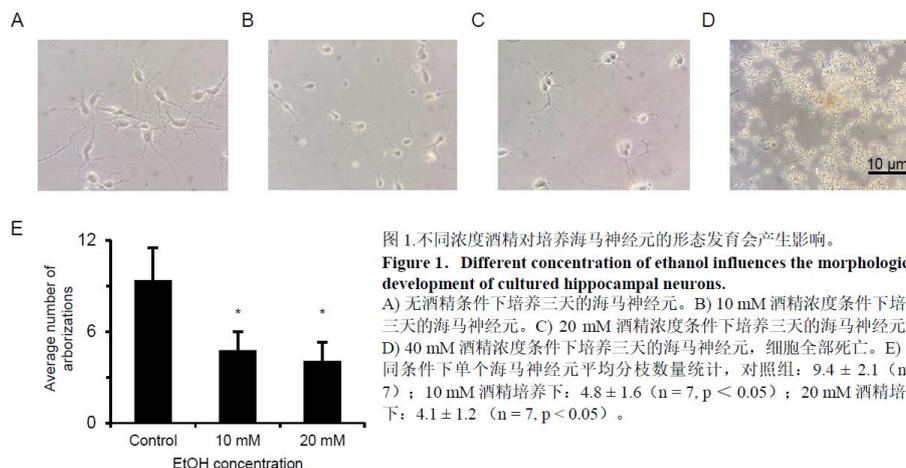


图 1. 不同浓度酒精对培养海马神经元的形态发育会产生影响。

Figure 1. Different concentration of ethanol influences the morphological development of cultured hippocampal neurons.

A) 无酒精条件下培养三天的海马神经元。B) 10 mM 酒精浓度条件下培养三天的海马神经元。C) 20 mM 酒精浓度条件下培养三天的海马神经元。D) 40 mM 酒精浓度条件下培养三天的海马神经元，细胞全部死亡。E) 不同条件下单个海马神经元平均分枝数量统计，对照组: 9.4 ± 2.1 ($n = 7$)；10 mM 酒精培养下: 4.8 ± 1.6 ($n = 7$, $p < 0.05$)；20 mM 酒精培养下: 4.1 ± 1.2 ($n = 7$, $p < 0.05$)。

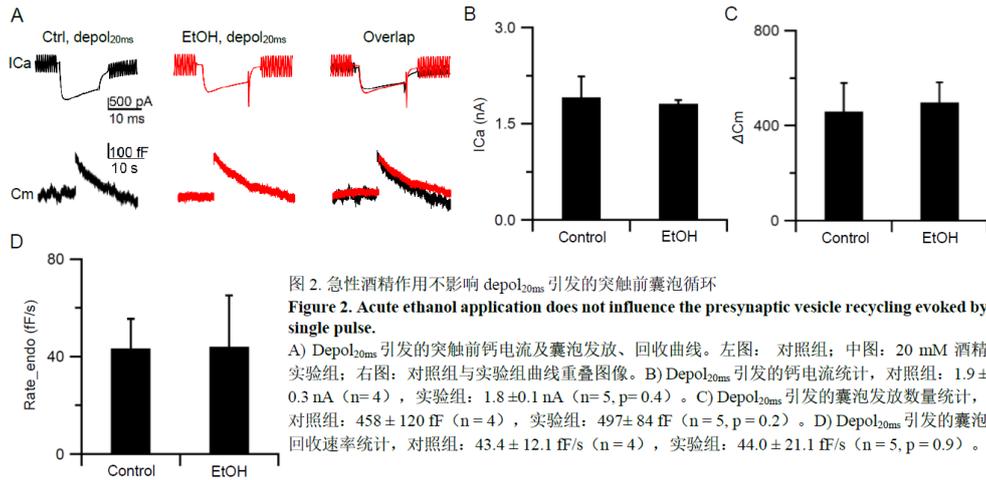


图 2. 急性酒精作用不影响 depol_{20ms} 引发的突触前囊泡循环

Figure 2. Acute ethanol application does not influence the presynaptic vesicle recycling evoked by single pulse.

A) Depol_{20ms} 引发的突触前钙电流及囊泡发放、回收曲线。左图：对照组；中图：20 mM 酒精实验组；右图：对照组与实验组曲线重叠图像。B) Depol_{20ms} 引发的钙电流统计，对照组：1.9 ± 0.3 nA (n=4)，实验组：1.8 ± 0.1 nA (n=5, p=0.4)。C) Depol_{20ms} 引发的囊泡发放数量统计，对照组：458 ± 120 fF (n=4)，实验组：497 ± 84 fF (n=5, p=0.2)。D) Depol_{20ms} 引发的囊泡回收速率统计，对照组：43.4 ± 12.1 fF/s (n=4)，实验组：44.0 ± 21.1 fF/s (n=5, p=0.9)。

497 ± 84 fF, n = 5, p = 0.2; Rate_endo: 44.0 ± 21.1 fF/s, n = 5, p = 0.9; Fig. 2B-D)。我们结果表明，急性酒精作用在弱刺激条件下不影响突触前囊泡回收的动力学。

3.2.2 急性酒精作用能抑制强刺激引发的突触前囊泡循环

在强刺激 (depol_{20ms*10}) 下，花萼状突触前会产生更多的囊泡释放和更快的囊泡回收速率 (包括不依赖网格蛋白的快速回收和依赖网格蛋白的慢速回收)。在对照组中，depol_{20ms*10} 可引起比 depol_{20ms} 更大的钙电流 (以电量为征: 279 ± 43 pC, n = 3)，在突触前产生囊泡释放 (1431 ± 222 fF, n = 3) 和回收 (227 ± 62 fF/s, n = 3; Fig. 3B-D)。而加入 20 mM 后，实验组在弱刺激下记录到的钙电流，胞吐和胞吞速率并无显著性差异 (QI_{Ca}: 247 ± 48 pC, n = 9, p = 0.2; ΔC_m : 1318 ± 125 fF, n = 9, p = 0.3; Rate_endo: 144 ± 35 fF/s, n = 9, p < 0.05; Fig. 3B-D)。我们的实验结果表明，20 mM 酒精作用可以显著减慢囊泡回收速率。突触前的囊泡数量十分有限，在高强度刺激下及时有效的回收是维系突触传递的关键。急性酒精作用减缓强刺激下囊泡回收，暗示其可能对高频刺激下突触传递的维系产生重要影响。

3.3 筛选与急性酒精作用相关的基因并探究其调控机制

上述实验结果表明急性酒精作用会影响突触传递效能，但其内在分子机制并不清楚。我们进一步通过遗传学手段筛选得到酒精耐受表型异常小鼠，探索其基因机制。我们的初步实验结果发现，基因 081218046 在全脑和脑干区域高表达 (Fig. 4A)。急性注射酒精后，在野生型 (WT) 小鼠上该基因表达量有所上调 (Fig. 4B)，且基因缺失 (KO) 小鼠表现出酒精不耐受。急性酒精注射后，基因缺失 (KO) 小鼠与野生型相比，需要更长的时间才能恢复清醒 (WT: 18 ± 6 min, n = 10; KO: 63 ± 9 min, n = 10; p < 0.05, Fig. 4C)。

为了排除该 081218046 基因通过调控代谢影响酒精耐受，我们分别检测了 WT 和 KO 小鼠肝脏匀浆液中乙醇脱氢酶的含量。结果显示，WT 和 KO 小鼠乙醇脱氢酶含量无明显差异 (WT: 97.5 ± 7.5 U/ml, n = 10; KO:

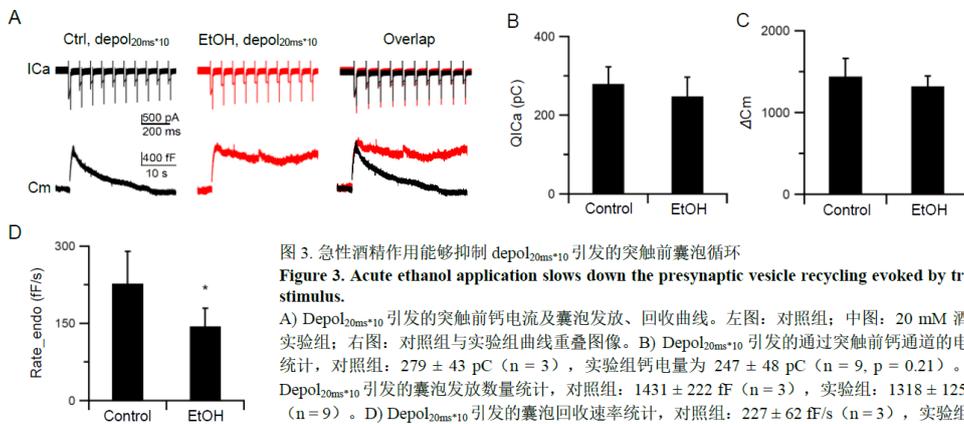


图 3. 急性酒精作用能够抑制 depol_{20ms*10} 引发的突触前囊泡循环

Figure 3. Acute ethanol application slows down the presynaptic vesicle recycling evoked by train stimulus.

A) Depol_{20ms*10} 引发的突触前钙电流及囊泡发放、回收曲线。左图：对照组；中图：20 mM 酒精实验组；右图：对照组与实验组曲线重叠图像。B) Depol_{20ms*10} 引发的通过突触前钙通道的电量统计，对照组：279 ± 43 pC (n = 3)，实验组钙电量为 247 ± 48 pC (n = 9, p = 0.21)。C) Depol_{20ms*10} 引发的囊泡发放数量统计，对照组：1431 ± 222 fF (n = 3)，实验组：1318 ± 125 fF (n = 9)。D) Depol_{20ms*10} 引发的囊泡回收速率统计，对照组：227 ± 62 fF/s (n = 3)，实验组：144 ± 35 fF/s (n = 9, p < 0.05)。

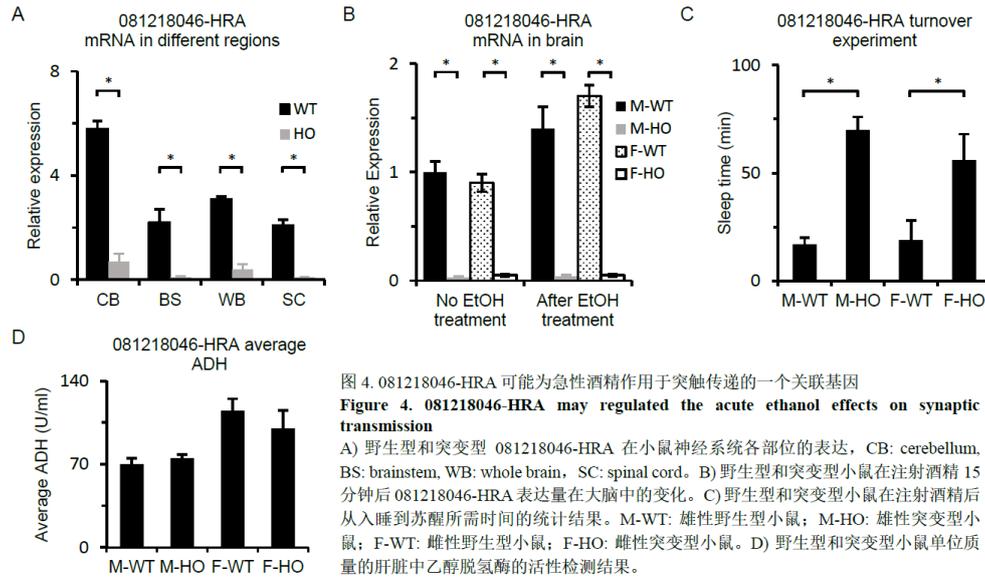


图 4. 081218046-HRA 可能为急性酒精作用于突触传递的一个关联基因
Figure 4. 081218046-HRA may regulated the acute ethanol effects on synaptic transmission
 A) 野生型和突变型 081218046-HRA 在小鼠神经系统各部位的表达, CB: cerebellum, BS: brainstem, WB: whole brain, SC: spinal cord. B) 野生型和突变型小鼠在注射酒精 15 分钟后 081218046-HRA 表达量在大脑中的变化. C) 野生型和突变型小鼠在注射酒精后从入睡到苏醒所需时间的统计结果. M-WT: 雄性野生型小鼠; M-HO: 雄性突变型小鼠; F-WT: 雌性野生型小鼠; F-HO: 雌性突变型小鼠. D) 野生型和突变型小鼠单位质量的肝脏中乙醇脱氢酶的活性检测结果。

87.5 ± 9.0 U/ml, n = 10 ; p = 0.3, Fig. 4D)。这表明该基因调控酒精耐受和代谢途径无关。下一步实验中，我们将利用电生理的实验手段，直接检测081218046 KO小鼠与WT小鼠在突触传递功能上的差异，进一步阐明急性酒精作用对突触传递的影响过程及机制。

4 讨论

酒精能从多种途径影响中枢神经系统的功能。急性、大量的酒精摄入（血液酒精浓度> 300 mg/100 ml）会引发嗜睡进而昏迷，当血液酒精浓度高于400 mg/100 ml时甚至可能导致死亡。在神经领域，有报道显示长期摄入酒精会抑制未成年猴海马中的神经干细胞分裂[8]。此外，酒精中毒会导致脑部发生病变，引起柯萨可夫综合征（Wernicke-Korsakoff syndrome）[9]。过去研究多关注突触后变化，倒推可能机制。本研究直接研究突触前膜生理特性的改变。

实验选择花萼状突触进行研究。这种位于脑干的突触具有传统突触的普遍特性，如钠钾通道产生的动作电位，钙通道激活引起的神经递质释放，以及短时程抑制等突触可塑性特性，因此该突触上的实验结果对其他突触也具有参考价值[10]。

中枢神经系统突触前囊泡回收分为慢速回收和快速回收两类：一类是由弱刺激引发的，由网格蛋白介导的囊泡回收；另外一种是由强刺激引发的，不依赖网格蛋白的快速囊泡回收。由于突触前囊泡数量有限，及时高效的囊泡回收速率对维系突触传递有重要意义。我们的实验结果表明急性酒精作用可以显著减慢快速囊泡回收的速率，暗示其可能对强刺激情况下突触传递的维系产生重要影响。

为进一步研究急性酒精调控神经网络的内在机制，我们筛选了酒精不耐受的基因缺陷小鼠并发现急性酒精作用涉及到081218046基因。该基因不影响酒精代谢，而是可能直接影响到中枢神经系统的功能。

除了内在基因调控机制，急性酒精由于作用时间较短，可能通过其他机制影响神经突触传递，例如参与突触前囊泡循环的SNARE蛋白等[11]。本课题研究结果显示急性酒精作用减缓快速囊泡回收的速率，对慢速囊泡回收没有影响，因此在此过程酒精可能参与调控囊泡回收相关蛋白，如dynamin, Munc13等。此外，有研究报道称酒精会影响微丝重组[12]。胆固醇分子也参与到酒精调控通路中，前期研究表明胆固醇参与了细胞的信号传导和生物膜运输[13]，影响着膜的流动性，进而调控囊泡回收[14]。同时，酒精能够改变神经元在内的多种细胞的膜胆固醇水平[15]，因此胆固醇很可能是酒精的一个下游靶分子。

急性酒精作用关系到短时间内摄入大量酒精对中枢神经系统的影响。在本实验中，20 mM酒精抑制10 Hz高频刺激下的囊泡回收，这一刺激模式在生理状况下十分常见，例如脑干神经元的基础发放可到几十Hz，兴奋时可以高达800 Hz，这对高强度刺激下突触传递的有效维持提出了很高要求。因此，本课题的研究结果将为阐明急性酒精作用调控中枢神经系统突触传递效率提供有价值的参考，为寻找治疗酒精滥用的相关药物靶点提供理论基础。

5 参考文献:

- [1] 徐猛. 酒精饮料对国民经济的危害初探. 商业经济. (2008),87-89.
- [2] Lovinger DM, Roberto M. Synaptic effects induced by alcohol. *Curr Top Behav Neurosci.* (2013)13,31-86.
- [3] Kelm MK, Criswell HE, Breese GR. The role of protein kinase A in the ethanol-induced increase in spontaneous GABA release onto cerebellar Purkinje neurons. *J Neurophysiol.* (2008)100,3417-3428.
- [4] Borst JG, Soria van Hoeve J. The calyx of held synapse: from model synapse to auditory relay. *Annu Rev Physiol.* (2012)74,199-224.
- [5] Edwards F A, Konnerth A, Sakmann B, et al. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurons of the mammalian central nervous system. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology.* (1989)414(5),600-612.
- [6] Xiaohui Wu *et al*, Disruption of *Gpr45* causes reduced hypothalamic POMC expression and obesity. *The Journal of Clinical Investigation.* (2016)126,3192-3206.
- [7] Neher E, Marty A. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1982)79,6712-6716.
- [8] Taffe MA, Kotzebue RW, Crean RD, Crawford EF, Edwards S, Mandyam CD. Long-lasting reduction in hippocampal neurogenesis by alcohol consumption in adolescent nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (2010)107,11104-11109.
- [9] McIntosh C, Chick J. Alcohol and the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2004)75 Suppl 3,iii16-21.
- [10] Borst JG, Soria van Hoeve J. The calyx of held synapse: from model synapse to auditory relay. *Annu Rev Physiol.* (2012)74,199-224
- [11] Marin MP, Esteban-Pretel G, Ponsoda X, Romero AM, Ballestin R, Lopez C, et al. Endocytosis in cultured neurons is altered by chronic alcohol exposure. *Toxicol Sci.* (2010)115,202-213.
- [12] Guasch RM, Tomas M, Minambres R, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C. RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *Journal of neuroscience research.* (2003)72,487-502.
- [13] Maxfield FR, Mondal M. Sterol and lipid trafficking in mammalian cells. *Biochemical Society transactions.*(2006)34,335-339.
- [14] Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology.*(2007)8,603-612.
- [15] Parmahansa M, Reddy KR, Varadacharyulu N. Changes in composition and properties of erythrocyte membrane in chronic alcoholics. *Alcohol Alcohol.* (2004)39,110-112.