



钙稳态调节蛋白2 Q87A 突变增加抑郁易感性*

廖洋^{1)**} 潘瑞远^{2)**} 袁增强^{2)***}

(¹⁾ 南华大学医学院, 衡阳 421001; (²⁾ 军事认知与脑科学研究所, 北京 100850)

摘要 钙稳态调节蛋白2 (calcium homeostasis modulator 2, Calhm2) 参与钙离子活动和ATP释放的调控. 本实验室的前期工作已经证实, Calhm2可以介导星形胶质细胞ATP的释放, 在抑郁症的发生发展中起到重要作用. 为了进一步探究Calhm2在抑郁症发生发展中的分子机制, 本文首先预测了Calhm2的ATP结合位点, 即位于第87位点的谷氨酰胺(Q87), 并将其突变为丙氨酸(A), 建立了一个携带calhm2突变(Q87A)的小鼠品系. 随后, 通过对原代星形胶质细胞的胞内和胞外ATP检测, 发现Calhm2 Q87A突变导致星形胶质细胞ATP的释放下降; 此外, 通过对小鼠大脑海马切片的ATP检测, 发现Calhm2 Q87A突变小鼠海马组织的ATP释放较正常小鼠下降; 最后, 通过给予慢性温和不可预知应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)来诱发小鼠抑郁样行为, 发现Calhm2 Q87A突变小鼠抑郁样行为相对野生型小鼠表现得更为严重. 综上所述, 本文发现Q87位点对Calhm2介导的星形胶质细胞ATP释放发挥重要作用, 该位点的突变增加了外界压力刺激诱导抑郁样行为的易感性, 进一步明确了Calhm2蛋白在抑郁症发生发展中的分子机制, 为抑郁症相关疾病的诊断和治疗提供了新的理论基础.

关键词 钙稳态调节蛋白, ATP释放, 星形胶质细胞, 抑郁症

中图分类号 Q5, R74

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0048

抑郁症是危害人类健康的一类重要疾病, 主要临床症状为悲伤、自卑或内疚等消极情绪特征以及睡眠障碍、疲倦感、注意力下降和快感缺乏^[1-3]. 抑郁症的病情是逐渐发展的, 它会严重降低患者的生活质量, 最终将会导致患者自残甚至自杀^[4-6]. 根据世界卫生组织(WHO)的报告, 抑郁症是造成全球疾病负担的第三大原因, 预计到2030年将位居首位^[7].

虽然抑郁症的发病机制尚不明确, 但是现在大多数研究都认为抑郁症的发病与神经递质以及神经元的功能相关^[8]. 其中, ATP作为一个重要的神经递质或神经调质, 可以通过与神经元上的P2X2受体结合, 维持神经元的兴奋性^[9]. 研究表明, 细胞外的ATP大多数来源于星形胶质细胞. 因此, 阻断小鼠脑内星形胶质细胞的ATP释放, 会降低神经元的兴奋性, 最终导致小鼠的抑郁样行为^[9].

钙稳态调节蛋白(calcium homeostasis modulator, Calhm)家族是一类新发现的功能性蛋白, 由Calhm1~6组成. 目前研究认为CALHM家族

蛋白参与钙离子活动以及ATP释放的调节^[10-13], Calhm1的基因突变与老年痴呆的发生发展相关^[10]. Calhm2是CALHM家族一个重要成员, 由11个蛋白亚基聚合形成的4次跨膜通道蛋白^[14-15]. 最近, Calhm2的蛋白质结构被陆续报道, 从结构上支持Calhm2具备介导ATP释放的功能^[14-15]. 本实验室之前的研究证实了Calhm2是一个ATP通道蛋白, 可以介导ATP的释放. 小鼠Calhm2的敲除会减少星形胶质细胞ATP的释放, 从而损害神经元功能, 最终导致小鼠产生抑郁样行为. 通过制备星形胶质细胞特异性Calhm2敲除小鼠, 确认与Calhm2全身敲除小鼠同样的表型, 验证了Calhm2具备介导ATP释放的离子通道功能^[12].

此外, 我们通过生物信息学预测了Calhm2存

* 国家自然科学基金(81930029、81630026、81501200)和北京市自然科学基金(7161009)资助项目.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-55498829, E-mail: zqyuan@bmi.ac.cn; zqyuan620@yahoo.com

收稿日期: 2021-02-27, 接受日期: 2021-05-06

在两个重要的ATP结合位点,分别是位于Calhm2第87号氨基酸位点的谷氨酰胺(Q87)和第132号氨基酸位点的亮氨酸(L132)。Calhm2的结构研究表明,Q87与L132位点都位于细胞的跨膜区域,而Q87位于更接近细胞内侧的位置^[14-15](图1)。我们在HT22细胞系上验证,当Q87或L132突变为丙氨酸(A)时,细胞的Ca²⁺活动和ATP释放下降,提示这两种突变对Calhm2功能造成了破坏。但相较于Calhm2 L132A突变,Calhm2 Q87A突变

对Calhm2介导的ATP释放功能的影响作用更为明显^[12]。因此推测Q87可能对于Calhm2的ATP释放功能起更重要的作用。

为了进一步探索Calhm2调节ATP释放的分子机制,我们选择以Calhm2 Q87A突变为入手点,利用CRISPR/cas9介导的基因组工程方法建立Calhm2位点突变(Q87A)的C57BL/6小鼠,不仅检测Calhm2 Q87A突变小鼠大脑的ATP释放,而且深入研究该突变小鼠是否具有抑郁相关表型。

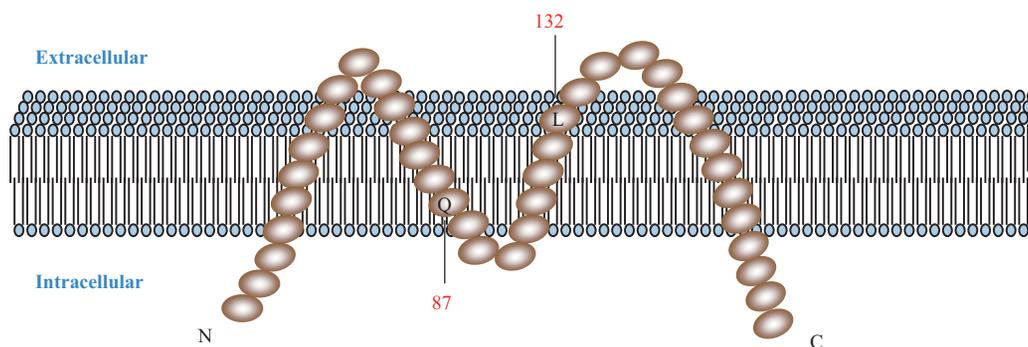


Fig. 1 The predicted 2-dimensional model of Calhm2 in the membrane

Calhm2 is a four-pass transmembrane protein with two putative high-affinity ATP-binding residues Q87 and L132. Q87 and L132 are localized in transmembrane region. This model was predicted with the help of nSITEpred online database and Calhm2 cryo-EM structure^[14].

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取C57BL/6背景(与C57BL/6小鼠回交10代)的Calhm2 Q87A突变雄性成年小鼠和野生型雄性同龄小鼠作为实验对象,小鼠饲养严格遵照北京市实验动物管理办公室的《北京市实验动物管理条例》及其配套规章的规定。

1.2 药品与试剂

0.25%胰蛋白酶, B27添加剂, GlutaMAX添加剂, DMEM培养基, DMEM:F12=1:1培养基, Neurobasal培养基和Phosphate Buffer Saline (PBS)均为美国Gibco公司出产。其他试剂还包括:胎牛血清(BIOIND,以色列), DNA酶I(生工生物工程股份有限公司,中国), ATP检测试剂(Cell Viability Assay, Promega, 美国), 多聚赖氨酸(Thermo Fisher, 美国)。

1.3 实验仪器

酶标仪(TECAN), 动物行为学视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司), 低速离心机(Thermo Fisher, 美国), CO₂细胞培养箱(Thermo Fisher, 美国), 倒置显微镜(Olympus, 日本), 常规PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司, 中国), 水浴锅(北京长风仪器仪表有限公司, 中国), 哈东联恒温摇床(北京海天友诚科技有限公司, 中国), 细胞培养皿, 细胞培养瓶, 96孔细胞培养板, 15 ml/50 ml离心管均为中国NEST公司出产。

1.4 方法

1.4.1 原代海马星形胶质细胞培养

新生小鼠(出生后24 h以内)体表经75%乙醇消毒后,用眼科剪断头,并迅速剥离出大脑组织。将大脑浸泡于冰上预冷的PBS中,置于体视解剖显微镜下,用系结镊配合眼科剪分离左右大脑半球。用镊子撑开大脑皮层和脑干,从大脑皮层包裹

层中识别半圆形海马组织, 用维纳斯剪小心剥离, 去除组织上附着的血丝. 将分离出的海马组织浸泡于新的PBS中, 用维纳斯剪剪碎后转移到培养皿内, 弃去多余液体, 加入1 ml预热的0.25%胰蛋白酶, 置于37°C细胞培养箱. 消化20 min后, 加入1 ml预热含10% FBS的DMEM培养基和5 μ l 10 g/L DNA酶I, 用1 ml移液器反复匀速吹打20次, 用60 μ m的过滤网过滤. 然后, 4°C 600 r/min, 离心5 min, 弃上清, 加入1 ml预热的含10% FBS的DMEM:F12=1:1培养基重悬, 再把细胞接种到用多聚赖氨酸包被好的培养瓶内, 每2 d换一次液. 待细胞密度达到90%时, 将培养瓶密封置于37°C摇床, 200 r/min, 摇6 h. 用预热后的培养基洗两遍, 加入适量预热0.25%胰蛋白酶消化细胞, 按实验需求进行传代培养. 实验方法参考之前文献, 并做部分修改^[16].

1.4.2 原代海马神经元培养

小鼠以及解剖方法与分离海马原代星形胶质细胞相同. 不同点在于重悬时用含2% B27添加剂和1% GlutaMAX添加剂的Neurobasal培养基重悬, 再把细胞种到用多聚赖氨酸包被好的96孔板内, 每2 d更换一半培养基. 实验方法参考之前文献, 并做部分修改^[17].

1.4.3 细胞外ATP检测

实验方法按照先前文献报道, 并做部分调整^[9]. 具体操作步骤如下: 实验前1 d将细胞接种到96孔细胞培养板, 每组细胞5~8个复孔, 细胞密度介于50%~70%. 实验前1 h预热1×HBSS (含20 mmol/L HEPES pH 7.4, 0.5 mmol/L MgCl₂, 0.4 mmol/L MgSO₄, 5 mmol/L 葡萄糖, 2 mmol/L CaCl₂). 实验时, 细胞用1×HBSS洗3次, 最后一次加入100 μ l 1×HBSS置于37°C培养箱, 孵育30 min后取上清25 μ l, 加入25 μ l ATP检测试剂, 按照试剂盒操作检测ATP含量. 同时, 弃去所有上清, 给细胞加入50 μ l RIPA裂解液 (50 mmol/L HEPES pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 1% Triton X-100, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₄, 2 mg/L 抑蛋白酶多肽 (aprotinin), 5 mg/L 亮抑蛋白酶肽 (leupeptin), 2 mg/L 胃蛋白酶抑制剂A (pepstatin A) 提取蛋白质, 测蛋白质含量. 总ATP量比总蛋白质量得到细胞释放的ATP标准化值.

1.4.4 细胞内ATP检测

实验方法参考之前文献, 并做部分修改^[12].

具体操作步骤如下: 实验前1 d将细胞接种到96孔细胞培养板, 每组细胞5~8个复孔, 细胞密度介于50%~70%. 实验时保留一个孔用来检测细胞蛋白质量, 吸净其余待测孔内培养基, 加入100 μ l经PBS稀释一倍后的ATP检测试剂裂解细胞, 然后吸取50 μ l上清, 按照试剂盒操作方法检测ATP含量. 同时, 给保留的孔内加入50 μ l RIPA裂解液提取蛋白质, 测蛋白质含量. 总ATP量比总蛋白质量得到细胞产生的ATP标准化值.

1.4.5 海马组织ATP释放检测

实验方法按照先前文献报道, 并做部分修改^[12]. 具体操作步骤如下: 小鼠颈椎脱臼迅速取出大脑, 在冰浴后的PBS中清洗3遍, 放于小鼠脑模中均匀切片, 分离出小鼠的海马组织. 给分离的组织加入500 μ l预冷人工脑脊液, 置于旋转混合仪上孵育30 min. 然后, 在4°C 5 000 r/min条件下离心5 min, 取上清100 μ l置于新的离心管. 吸取25 μ l上清加入25 μ l ATP检测试剂, 反应10 min后用酶标仪检测荧光信号强度. 余下组织弃去所有上清, 加入RIPA细胞裂解液提取蛋白质. 根据ATP标准曲线计算样品中ATP含量, 再用相应组织总蛋白质量均一化, 得到该组织的ATP释放量.

1.4.6 小鼠慢性抑郁模型建立

选取健康8周龄雄性小鼠作为实验对象, 单笼饲养. 分别对小鼠进行以下刺激, 每天随机两种刺激, 连续刺激28 d. 刺激包括: 4°C冷刺激, 持续1 h; 20°C水强迫游泳刺激, 持续10 min; 鼠笼旋转或震动, 持续1 h; 50 ml离心管束缚, 持续2 h; 剥夺食物和饮水, 处理过夜; 暴露在强光下, 处理过夜; 昼夜颠倒; 异味, 处理过夜; 频闪, 照射过夜; 潮湿垫料, 处理过夜; 鼠笼倾斜45°, 处理过夜. 模型建立完成后, 检测小鼠抑郁类行为学, 评价模型是否成功. 抑郁模型建立方法参考之前文献^[18].

1.4.7 小鼠行为学实验

行为学实验方法均参考之前文献, 并做部分调整^[12].

a. 开放旷场实验. 实验开始前2 h将小鼠转移至实验房间使其适应环境. 实验时将小鼠置于32 cm×32 cm空箱子中 (箱子表面铺一张32 cm×32 cm白色滤纸), 启动程序记录小鼠在5 min内自发活动情况, 根据记录资料分析小鼠总的运动路程和在中心区域的活动时间. 每次更换小鼠之前更换新的滤纸.

b. 高架十字迷宫实验. 实验开始前 2 h 将小鼠转移至实验房间使其适应环境. 实验时将小鼠轻轻放于迷宫中心区 (且头部朝向开放臂), 启动录像装置, 记录小鼠在迷宫中活动情况, 根据记录资料分析小鼠在开放臂的活动时间. 每次更换小鼠之前分别用乙醇和清水清理迷宫.

c. 强迫游泳实验. 实验前小鼠适应 3 d, 每天将小鼠置于 20°C 水中自由游泳 5 min. 实验开始前 2 h 将小鼠转移至实验房间使其适应环境. 实验时将小鼠置于盛有 20°C 水的游泳杯 (直径 10 cm) 中, 实验时间为 6 min, 启动程序记录后 4 min 内小鼠不动的总时间.

d. 糖水偏好实验. 实验小鼠单只单笼饲养, 实验期间给予充足食物和水. 适应期同时给小鼠提供 1 瓶 1% 蔗糖水和 1 瓶纯水, 饲养 3 d, 每天更换水瓶位置. 实验期给予每只小鼠等量 1% 蔗糖水和纯水各 1 瓶, 24 h 后称重计算糖水偏好百分比 (糖水消耗量/总液体消耗量×100%) 连续检测 7 d, 取平均值作为该小鼠糖水偏好程度值.

1.4.8 统计分析

统计分析主要采用 Excel 软件和 GraphPad

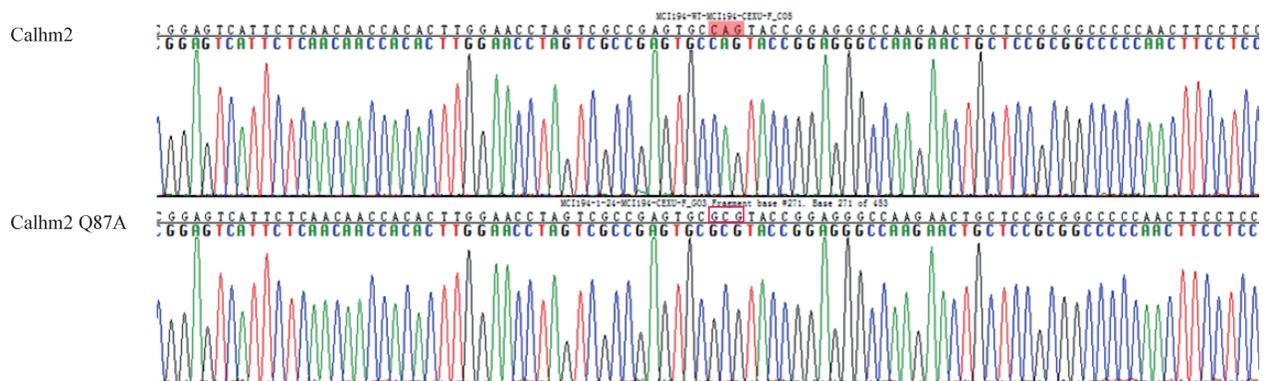


Fig. 2 The partial gene sequence of *calhm2*

The upper panel is wild type (WT) *Calhm2* sequence; the bottom panel is *Calhm2* Q87A mutation sequence. The red box indicates the mutation site.

2.2 *Calhm2* Q87A 突变小鼠海马原代星形胶质细胞 ATP 释放下降

选取 24 h 内新生的状态良好的 *Calhm2* Q87A 突变小鼠, 并挑选同样年龄和状态的 C57 野生型小鼠作为其对照组. 对这些小鼠进行脑组织的分离并解离成单个的星形胶质细胞供实验使用. 细胞培养 1 周, 细胞形态和密度达到实验标准后, 检测两组星形胶质细胞 ATP 的释放与产生, 用 *t* 检验比较两

组细胞之间是否具有显著性差异. 结果表明, *Calhm2* Q87A 突变小鼠的星形胶质细胞比对照组星形胶质细胞 ATP 的释放下降 ($P < 0.05$), 但是 ATP 的产生水平无明显差异 ($P > 0.05$) (图 4a、b).

2 结果与分析

2.1 *Calhm2* Q87A 突变小鼠的制备与鉴定

小鼠的 *calhm2* 基因位于小鼠的第 19 号染色体上. 我们发现了位于该染色体上的 3 个外显子, 其中第 2 外显子的起始密码子为 ATG, 第 3 外显子的终止密码子为 TAA, Q87 位于第 2 外显子上. 因此, 选取第 2 外显子作为靶点, 通过同源定向修复将供体寡核苷酸 (oligo) 中的 Q87A (CAG-GCG) 突变位点引入到第 2 外显子上 (图 2). Cas9 mRNA、sgRNA 和供体 oligo 被共注射到受精卵中用于代孕小鼠的生产. 其子代通过 PCR 和 DNA 测序分析进行基因分型. 阳性基因的小鼠培养到下一代 (F1), 子代再重复以上步骤进行基因分型, 得到 *Calhm2* Q87A 突变小鼠 (图 3). 突变小鼠繁殖符合正常的孟德尔遗传规律.

```

Calhm2
1   MAALIAENFR FLSLFFKSKD VMIFNGLVAL GTVGSQELFS VVAFHCPCSP
51  ARNYLYGLTA IGVPALALFL IGVILNNHTW NLVAECYRR AKNCSAAPNF
101 LLLSSILGRA AVAPVTWSVI SLLRGEAYVC ALSEFVDPSS LTAGDKGFPP
151 AHATEVLARF PCGEGPANLS SFREEVSRRL KYESQLFGWL LIGVVAILVF
201 LTKCLKHYCS PLSYRQEAYW AQYRTNEDQL FQRTAEVHSR VLAANNVRRF
251 FGFVALNKDD EELVAKFPVE GTQPRPQWNA ITGVYLYREN QGLPLY SRLH
301 KWAQGLTGNG TAPDNVEMAL LTA

Calhm2 Q87A
1   MAALIAENFR FLSLFFKSKD VMIFNGLVAL GTVGSQELFS VVAFHCPCSP
51  ARNYLYGLTA IGVPALALFL IGVILNNHTW NLVAECYRR AKNCSAAPNF
101 LLLSSILGRA AVAPVTWSVI SLLRGEAYVC ALSEFVDPSS LTAGDKGFPP
151 AHATEVLARF PCGEGPANLS SFREEVSRRL KYESQLFGWL LIGVVAILVF
201 LTKCLKHYCS PLSYRQEAYW AQYRTNEDQL FQRTAEVHSR VLAANNVRRF
251 FGFVALNKDD EELVAKFPVE GTQPRPQWNA ITGVYLYREN QGLPLY SRLH
301 KWAQGLTGNG TAPDNVEMAL LTA

```

Fig. 3 The amino acid sequences of WT Calhm2 and Calhm2 Q87A mutation mice

Calhm2 is composed of 323 amino acids. We established a mouse line that carried *calhm2* mutation by mutating amino acid 87 from glutamine to alanine (Q87A).

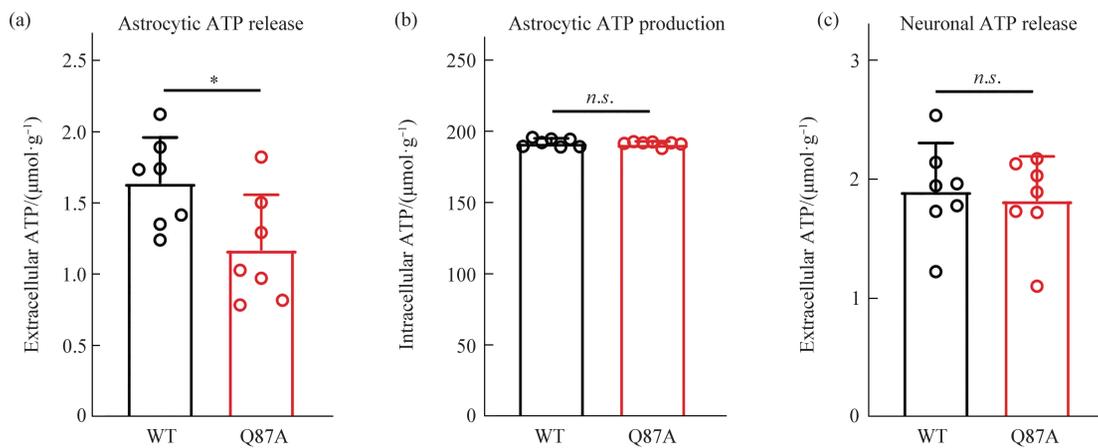


Fig. 4 Measurement of ATP levels in primary cultured astrocytes and neurons

(a) Primary astrocytes were cultured in 96-well plates. After incubated in HBSS 30 min, the ATP level in supernatant was detected ($n=7$ per group). (b) The supernatant of primary astrocytes was removed and the cells were lysed for intracellular ATP detection ($n=7$ per group). (c) Primary neurons were cultured in 96-well plates. After incubated in HBSS 30 min, the ATP level in supernatant was detected ($n=7$ per group). The ATP value was normalized to total protein. Data are presented as $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$; *n.s.*, not significant, Student's *t* test.

2.3 Calhm2 Q87A突变小鼠的海马组织细胞外ATP水平下降

为验证 Calhm2 Q87A 突变小鼠海马组织的 ATP 释放水平是否发生变化, 分别选取 8 周龄的 Calhm2 Q87A 突变雄性小鼠和野生型雄性小鼠各 5 只, 分成两组. 对它们进行颈椎脱臼后迅速取出它们的海马组织, 然后检测海马组织的 ATP 释放水平. 通过 *t* 检验比较, 发现 Calhm2 Q87A 突变小鼠海马组织 ATP 释放水平较野生型小鼠下降

($P<0.05$) (图 5). 此外, 用相同的方法检测并分析了 Calhm2 Q87A 突变小鼠海马原代神经元的 ATP 释放情况, 发现 Calhm2 Q87A 突变小鼠海马原代神经元的 ATP 释放与正常神经元相比无明显差异 ($P>0.05$), 排除了神经元的 ATP 释放对海马组织 ATP 释放的影响 (图 4c).

这些结果表明, Calhm2 Q87A 突变小鼠大脑海马内的星形胶质细胞的 ATP 释放下降导致了海马组织的 ATP 释放下降.

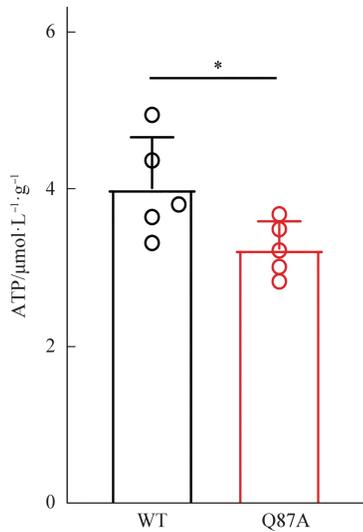


Fig. 5 The extracellular ATP levels of hippocampal slice

The hippocampus from 8-weeks old WT and Calhm2 Q87A mutation mice were isolated and incubated in artificial cerebrospinal fluid (ASCF) for 30 min. After centrifugation, the supernatants were collected and used for ATP measurement ($n=5$ per group). The ATP value was normalized to total protein. Data are presented as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, Student's t test.

2.4 Calhm2 Q87A 突变增加不可预知应激 (CUMS) 诱导的小鼠抑郁易感性

为探索海马组织的 ATP 释放下降是否影响小鼠的行为表现, 对小鼠进行行为学检测. 为了研究 Calhm2 Q87A 突变小鼠是否有运动功能障碍和焦虑样行为表现, 选取 15 只 8 周龄 Calhm2 Q87A 突变小鼠为实验组, 并以同样年龄和状态的同窝野生型小鼠作为对照组. 在开放旷场实验中, 分别统计两组小鼠在 5 min 之内的运动距离以及在中心区域的时间, 并用 t 检验进行比较和分析, 发现两组小鼠的运动距离以及它们在中心区域的时间均无明显差异 (P 值均大于 0.05) (图 6a). 在高架十字迷宫实验中, 用同样的方法分别比较两组小鼠在 5 min 之内进入开放臂的次数以及在中心区域和开放臂的时间, 发现两组小鼠的上述数据均无明显差异 (P 值均大于 0.05) (图 6b). 这些结果提示, Calhm2 Q87A 突变小鼠没有运动功能障碍以及焦虑样行为表现.

强迫游泳和糖水偏好实验是检测小鼠抑郁样行为的重要实验. 对这批小鼠进行强迫游泳实验和糖

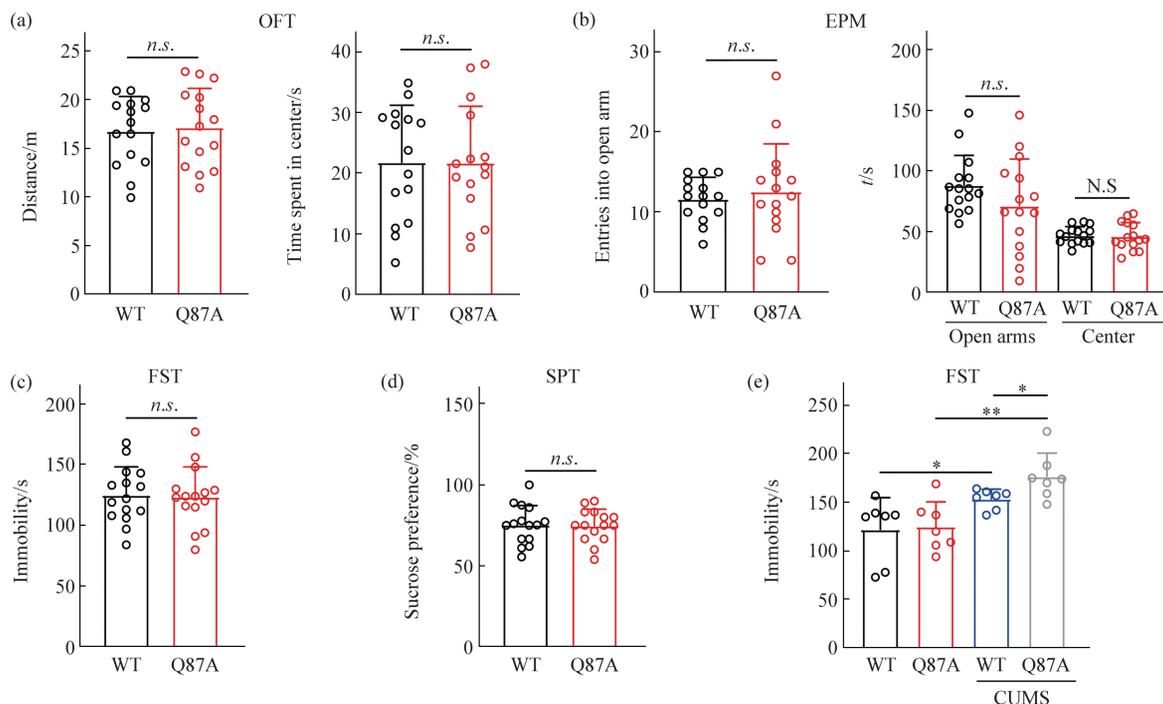


Fig. 6 Behavioral tests of Calhm2 Q87A mutation mice

(a) In the open field test (OFT), the total motional distance (left panel) and time spent in the center region (right panel) were recorded and analyzed ($n=15$ per group). (b) In the elevated plus maze (EPM) test, the open arms entries (left panel) and the time spent in the open arms and center region (right panel) were recorded and analyzed ($n=15$ per group). (c) In the force swimming test (FST), the total immobility time was recorded and analyzed in the last 4 min during 6 min of the test ($n=15$ per group). (d) In the sucrose preference test (SPT), the proportion of sucrose consumption within a day ($n=15$ per group). (e) FST after CUMS ($n=7$ per group). Data are presented as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n.s.$, not significant, Student's t test (a-d) or one-way ANOVA analysis (e).

水偏好实验,并用 t 检验分别分析两组小鼠在强迫游泳实验中的不动时间以及在糖水偏好实验中对糖的偏好值,发现两组小鼠的不动时间以及对糖的偏好值均无明显差异(P 值均大于0.05),说明Calhm2 Q87A突变小鼠没有抑郁样行为特征(图6c、d)。

为了进一步确认该突变小鼠是否对压力诱导的抑郁样行为易感,选取同窝、数量相同、状态相近的8周龄Calhm2 Q87A突变小鼠和野生型小鼠,分别给予CUMS处理来诱导抑郁样行为,28 d后进行强迫游泳实验.首先用单因素方差分析分别比较CUMS处理前后的野生型小鼠及Calhm2 Q87A突变小鼠在强迫游泳实验中的不动时间,结果显示CUMS处理的野生型小鼠和Calhm2 Q87A突变小鼠的不动时间都较非CUMS处理组增加(CUMS WT组与非CUMS WT组比 $P<0.05$; CUMS Q87A组与非CUMS Q87A组比 $P<0.01$),证实小鼠抑郁模型建立成功.通过单因素方差分析比较CUMS处理后的Calhm2 Q87A突变小鼠和野生型小鼠在强迫游泳实验中的不动时间,发现CUMS处理后的Calhm2 Q87A突变小鼠的不动时间高于CUMS处理后的野生型组小鼠($P<0.05$),提示Calhm2 Q87A突变小鼠对CUMS诱导的抑郁样行为易感(图6e)。

这些结果提示,在正常情况下,Calhm2 Q87A突变小鼠大脑内的ATP释放下降并不会导致小鼠出现抑郁样表型.但是当处在外界压力刺激条件下,Calhm2 Q87A突变小鼠比正常小鼠更容易产生抑郁样表型。

3 讨 论

本研究是在实验室前期工作的基础上,对Calhm2 Q87A突变在体功能的探索,证实了Calhm2 Q87A突变通过影响Calhm2的ATP释放功能,引起小鼠大脑海马组织的ATP释放下降,最终增加小鼠抑郁样行为发生的易感性。

从分子与细胞层面上看,抑郁症被认为是基于神经胶质的突触功能障碍,因为它与星形胶质细胞功能低下所致的突触功能异常如突触传递有着密切联系^[19]。

在正常情况下,ATP不仅可以作为细胞内的能量传递介质,还可以作为神经细胞间的信号传递物质^[20].在中枢神经系统中,ATP可以通过胞吐和非胞吐机制从神经胶质细胞(主要是星形胶质细胞)

中释放出来^[9].这部分ATP可以作为神经胶质递质与突触上的P2X2受体结合,维持突触的正常功能^[9, 21-23].细胞外ATP的减少会损害突触的功能,进而引起小鼠抑郁样症状的发生,而ATP的补充可以挽救抑郁样症状^[9, 24].同时,敲低P2X2受体可以抑制ATP的抗抑郁作用^[9].然而,病理情况下,如大脑内的细胞死亡或星形胶质细胞的过度激活导致大脑内ATP水平的异常升高,ATP也会与ATP结合亲和力较小的位于小胶质细胞上的P2X7受体结合(P2X2受体的ATP结合亲和力是P2X7受体的100倍),继而上调IL-1 β 、caspase-1和NLRP3等促炎因子,介导神经炎症和神经毒性^[25-28]。

本实验室之前的工作已经证实,Calhm2可以作为星形胶质细胞上的ATP通道,维持正常的神经元功能^[12].当Calhm2敲除时,细胞外的ATP水平下降引起突触可塑性受损,最终导致小鼠的抑郁样行为^[12].Calhm2敲除引起的小鼠抑郁样行为可以通过氟西汀的治疗或ATP的补充改善,并且未在Calhm2敲除小鼠体内观察到神经炎症相关表现^[12, 29].因此,认为Calhm2敲除引起小鼠ATP释放下降所致的抑郁样症状是基于ATP的神经胶质递质功能,而与神经炎症无关.而本工作发现,Calhm2 Q87A突变小鼠并未表现出抑郁样症状.通过比较Calhm2 Q87A突变和Calhm2敲除对星形胶质细胞ATP释放的影响程度,发现Calhm2 Q87A突变对ATP释放的影响程度较小.这表明,Calhm2 Q87A突变对小鼠大脑神经元的功能影响较小,还不足以导致小鼠的抑郁样表型,但证实Calhm2 Q87A突变增加了小鼠在压力刺激条件下的抑郁样行为易感性.同时,Calhm2 Q87A突变小鼠未表现出焦虑样表型,与Calhm2敲除小鼠的这一表型是一致的^[12]。

Calhm2 Q87A突变作为Calhm2的一个氨基酸位点突变,会明显影响Calhm2的ATP释放功能,提示了Q87氨基酸位点的重要性.本实验室在之前的工作通过体外细胞系实验证实了Calhm2 Q87A突变和L132A突变会影响Calhm2的钙离子调节和ATP释放功能,但是Q87A突变的影响程度更大^[12].结合最近发表的Calhm2结构相关文章,可知Q87和L132位于细胞跨膜区域,但Q87更接近细胞内侧位置^[14].由此推测细胞内的ATP更容易与Q87位点接触然后启动ATP释放.由于Calhm2是一个ATP通道蛋白,所以它的功能改变只会影响ATP的释放而不会影响ATP的产生.星形胶质细

胞释放的ATP是中枢神经系统中细胞外ATP的主要来源,我们在证实Calhm2 Q87A突变导致星形胶质细胞ATP释放下降的同时,验证了该突变对神经元的ATP释放无影响,还发现Calhm2 Q87A突变小鼠海马组织的ATP释放下降.这表明星形胶质细胞的ATP释放下降导致海马组织ATP释放下降.就目前动物水平的研究结果来看,基于Calhm2介导ATP释放,参与抑郁症的发生发展,我们认为,临床抑郁症患者中Calhm2的突变或表达水平是值得深入研究的.

综上所述,本研究工作进一步证实了Calhm2作为ATP通道的功能以及在抑郁症发生发展中的重要意义,提示Calhm2可能是治疗抑郁症和减轻抑郁症易感性的重要靶点.

致谢 在此特别感谢中国科学院生物物理研究所赵永芳研究员对Calhm2蛋白ATP结合位点的分析和预测.

参 考 文 献

- [1] Cui R. Editorial: a systematic review of depression. *Curr Neuropharmacol*, 2015, **13**(4): 480
- [2] Gaynes B. Assessing the risk factors for depression: difficult-to-treat depression and treatment-resistant. *J Clin Psychiatry*, 2016, **77**(Suppl 1):4-8
- [3] Rice F, Riglin L, Lomax T, *et al.* Adolescent and adult differences in major depression symptom profiles. *J Affect Disord*, 2019, **243**:175-181
- [4] Hawton K, Casañas I C C, Haw C, *et al.* Risk factors for suicide in individuals with depression: a systematic review. *J Affect Disord*, 2013, **147**(1-3): 17-28
- [5] Franke I, Shenar R, Nigel S, *et al.* Self-aggression as mediator between depression and aggression. *Psychiatr Prax*, 2019, **46**(6): 332-337
- [6] Oliffe J L, Rossnagel E, Seidler Z E, *et al.* Men's depression and suicide. *Curr Psychiatry Rep*, 2019, **21**(10): 103
- [7] World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization, 2017
- [8] Peng G J, Tian J S, Gao X X, *et al.* Research on the pathological mechanism and drug treatment mechanism of depression. *Curr Neuropharmacol*, 2015, **13**(4): 514-523
- [9] Cao X, Li L P, Wang Q, *et al.* Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat Med*, 2013, **19**(6): 773-777
- [10] Dreses-Werringloer U, Lambert J C, Vingtdoux V, *et al.* A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell*, 2008, **133**(7): 1149-1161
- [11] Taruno A, Vingtdoux V, Ohmoto M, *et al.* CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*, 2013, **495**(7440): 223-226
- [12] Ma J, Qi X, Yang C, *et al.* Calhm2 governs astrocytic ATP releasing in the development of depression-like behaviors. *Mol Psychiatry*, 2018, **23**(4): 883-891
- [13] Kashio M, Gao W Q, Ohsaki Y, *et al.* CALHM1/CALHM3 channel is intrinsically sorted to the basolateral membrane of epithelial cells including taste cells. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 2681
- [14] Choi W, Clemente N, Sun W, *et al.* The structures and gating mechanism of human calcium homeostasis modulator 2. *Nature*, 2019, **576**(7785): 163-167
- [15] Syrjanen J L, Michalski K, Chou T H, *et al.* Structure and assembly of calcium homeostasis modulator proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, **27**(2): 150-159
- [16] Shu X, Sun Y, Sun X, *et al.* The effect of fluoxetine on astrocyte autophagy flux and injured mitochondria clearance in a mouse model of depression. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(8): 577
- [17] Maday S, Holzbaur E L. Compartment-specific regulation of autophagy in primary neurons. *J Neurosci*, 2016, **36**(22): 5933-5945
- [18] Zhang S S, Tian Y H, Jin S J, *et al.* Isoflurane produces antidepressant effects inducing BDNF-TrkB signaling in CUMS mice. *Psychopharmacology*, 2019, **236**(11): 3301-3315
- [19] Rial D, Lemos C, Pinheiro H, *et al.* Depression as a glial-based synaptic dysfunction. *Front Cell Neurosci*, 2015, **9**:521
- [20] Illes P, Burnstock G, Tang Y. Astroglia-derived ATP modulates CNS neuronal circuits. *Trends Neurosci*, 2019, **42**(12): 885-898
- [21] Zhang J M, Wang H K, Ye C Q, *et al.* ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron*, 2003, **40**(5): 971-982
- [22] Bowser D N, Khakh B S. ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *J Neurosci*, 2004, **24**(39): 8606-8620
- [23] Yang J, Yang H, Liu Y, *et al.* Astrocytes contribute to synapse elimination via type 2 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-dependent release of ATP. *Elife*, 2016, **5**:e15043
- [24] Cai W, Xue C, Sakaguchi M, *et al.* Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior. *J Clin Invest*, 2018, **128**(7): 2914-2926
- [25] Rodrigues R J, Tomé A R, Cunha R A. ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front Neurosci*, 2015, **9**:148
- [26] Iwata M, Ota K T, Li X Y, *et al.* Psychological stress activates the inflammasome via release of adenosine triphosphate and stimulation of the purinergic type 2X7 receptor. *Biol Psychiatry*, 2016, **80**(1): 12-22
- [27] Yue N, Huang H, Zhu X, *et al.* Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *J Neuroinflammation*, 2017, **14**(1): 102
- [28] Farooq R K, Tanti A, Ainouche S, *et al.* AP2X7 receptor antagonist reverses behavioural alterations, microglial activation and neuroendocrine dysregulation in an unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression in mice. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, **97**:120-130
- [29] Wong D T, Bymaster F P, Engleman E A. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci*, 1995, **57**(5): 411-441

Calcium Homeostasis Modulator 2 Q87A Mutation Promotes Depression Susceptibility*

LIAO Yang^{1)**}, PAN Rui-Yuan^{2)**}, YUAN Zeng-Qiang^{2)***}

¹⁾*School of Medicine, University of South China, Hengyang 421001, China;*

²⁾*Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Beijing 100850, China)*

Abstract Calcium homeostasis modulator 2 (Calhm2) is involved in the modulation of Ca²⁺ activity and ATP release. Our previous work has demonstrated that Calhm2 plays a crucial role in the progression of depression by regulating the astrocytic ATP release. In order to further explore the role and mechanism of Calhm2 in the development of depression, we firstly predicted the ATP binding site (glutamine, amino acid 87) of Calhm2, and established a mouse line that carried calhm2 mutation by mutating the glutamine to alanine (Q87A). Secondly, by using the primary culture of astrocyte and ATP detection analysis, we found that Calhm2 Q87A mutation resulted in a significant decrease of ATP release in astrocytes. Furthermore, we found that the ATP release decreased in hippocampal slice from Calhm2 Q87A mutated mice. Importantly, Calhm2 Q87A mutated mice showed a higher susceptibility to develop depression-like symptoms than that of wild type mice when exposed to chronic unpredictable mild stress (CUMS). Taken together, we identified that Q87 site is important for Calhm2-mediated ATP release in astrocytes and this point mutation of Calhm2 promotes depression susceptibility induced by stress in mice. The present work further defines the molecular mechanism of Calhm2 in the development of depression, with the implication of a potential avenues for the diagnosis and therapeutics of depression-related diseases.

Key words calcium homeostasis modulator, ATP release, astrocytes, depression

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0048

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81930029, 81630026, 81501200) and The Beijing Nature Science Foundation (7161009).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-10-55498829, E-mail: zqyuan@bmi.ac.cn; zyuan620@yahoo.com

Received: February 27, 2021 Accepted: May 6, 2021