



## 氯通道阻断剂对NMDA诱导培养海马神经元凋亡的保护作用

脑卒中是当今人类第三大死亡疾病和首位的致残原因,目前对缺血缺氧性脑损伤后神经元的死亡机制尚未完全阐明,临床也无理想的治疗手段。在缺血缺氧性脑损伤和多种神经系统退行性疾病中,脑细胞的程序性死亡是脑功能退化和损伤的主要诱因[1][2]。脑损伤的机制目前有多种学说,其中之一为神经末梢释放大谷氨酸等兴奋性氨基酸,激活NMDA受体对神经元产生神经毒性作用。在离子研究方面,对 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{K}^+$ 参与神经元凋亡的研究报告较多,而对 $\text{Cl}^-$ 的作用目前报告较少。近些年大量实验证据表明,氯离子通道参与非神经细胞的凋亡[3]。本研究模拟缺血性脑损伤的发生机制,在NMDA诱导离体大鼠海马神经元凋亡的模型上,观察氯离子通道的活动是否参与了神经元的凋亡过程,探讨缺氧敏感性神经细胞凋亡与氯离子通道活动之间的关系。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物和试剂

新生1 d SD大鼠由南方医科大学南方医院实验动物中心提供;DMEM/Ham's F12培养基(Gibco BRL公司),多聚赖氨酸(PLL)、阿糖胞苷、4-acetamido-4'-isothiocyanato-stibene-2,2'-disulfonic acid (SITS)、4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid(DIDS)、5-nitro-2-2-3-phenylpropylamino-benzoate(NPPB)、MTT和Hoechst33258等试剂购自美国Sigma公司;胎牛血清(杭州四季青公司);DMSO(香港试剂公司)。

#### 1.2 主要仪器

$\text{CO}_2$ 细胞培养箱(台湾ESPEC),倒置显微镜(OLYMPUS),酶标仪(Bio-Tec)。

#### 1.3 海马神经元的培养

参照文献[4]。取新生1 d内的SD大鼠,雌雄不拘,无菌断头取脑。在冰冷D-Hank's里分离双侧海马,剔除血管和脑膜,剪成约1 mm<sup>3</sup>小块。用5倍组织体积的0.25%胰蛋白酶37℃消化15 min,加基础培养基终止消化,机械吹打分散细胞,500目筛网过滤,制成单细胞悬液。1 000 r/min室温离心10 min,去上清液,加完全培养基,尖嘴吸管吹打分散细胞后,制成 $4 \times 10^5$ 个/ml的单细胞悬液。接种在预先包被有PLL的24孔或96孔培养板内,通以95%空气、5% $\text{CO}_2$ ,37℃饱和湿度下培养。培养液中含有90% DMEM/F12、10%胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、100 IU/ml青、链霉素。接种48 h后更换培养液,同时加入 $1 \times 10^{-5}$  mol/L阿糖胞苷作用48 h,以抑制胶质细胞的过度增殖。以后每周更换培养液2次,每次更换原液体的1/3。

#### 1.4 实验分组

取培养12 d的海马神经元,随机分为正常对照组(仅用DMEM/F12完全培养基)和NMDA处理组(NMDA处理时加氯通道阻断剂和NMDA处理后加氯通道阻断剂组)。NMDA作用时间10 min,氯通道阻断剂作用时间18 h。

#### 1.5 NMDA诱导海马神经元凋亡模型和氯通道阻断剂的作用

参考文献[5]取培养12 d的海马神经元,弃去培养液,PBS冲洗1次,再用培养液冲洗1次,加入含有300  $\mu\text{mol/L}$  NMDA、5  $\mu\text{mol/L}$ 丝氨酸的培养液,作用10 min后更换培养液。氯通道阻断剂的使用分在NMDA作用时

与作用后两种方式。处理后的神经元继续置原条件下培养，18 h后观察神经元凋亡的形态变化并进行细胞生存率测定。

### 1.6 细胞凋亡的形态学检测

参照文献[6]。取各组培养神经元，用0.1 mol/L、pH 7.4的PBS冲洗1次，4%多聚甲醛固定15 min，空气干燥5 min，DNA荧光素Hoechst 33258(0.25 μg/ml)染色15 min；用0.1 mol/L、pH7.4的PBS冲洗2次。倒置荧光显微镜观察细胞核的形态。每次随机数3个视野内200个细胞左右，记阳性凋亡细胞(%)。

### 1.7 MTT法测定细胞存活率

参照文献[7]。取96孔培养板培养12 d的海马神经元，加入MTT，终浓度为5 mg/ml。37 °C下继续培养4 h，小心吸去培养液，加入DMSO(150 μl/孔)，振荡10 min，使甲赞颗粒完全溶解。以不加细胞的培养液空白孔作对照，酶标仪检测D(λ) (λ=570 nm)，D(λ)值的大小反映细胞的存活情况。细胞存活率(%)=[实验组D(λ)-空白对照D(λ)]/[对照组D(λ)-空白组D(λ)]×100%。

### 1.8 统计学处理

实验数据用均数±标准差表示，组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

## 2 结果

### 2.1 氯通道阻断剂对NMDA诱导培养海马神经元凋亡的影响

神经元用Hoechst 33258 染色后，正常神经元的细胞核呈卵圆形，荧光显微镜下呈现均匀的蓝色荧光；凋亡的细胞皱缩变圆、染色质浓集或碎裂或出现凋亡小体，呈强亮的蓝色荧光(图1)。凋亡记数显示，NMDA组有31.7%凋亡发生率，与正常对照组相比有显著性差异(P<0.05)。在NMDA处理神经元的同时，使用SITS和DIDS可明显减少神经元的凋亡，与NMDA组相比有显著性差异(P<0.05)。NPPB未发现有显著抗凋亡作用。

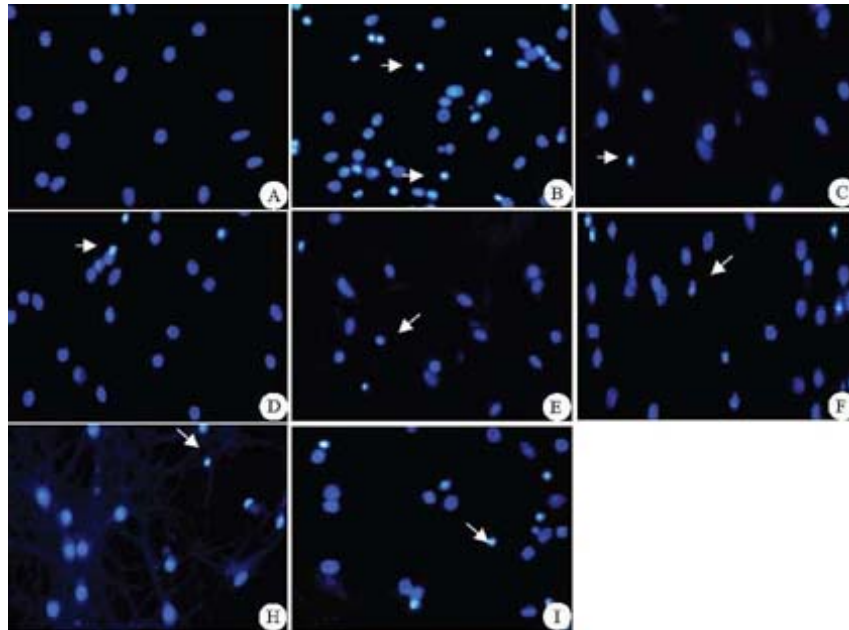


图1 NMDA诱导神经元凋亡Hoechst33258染色后的核形态学变化

Fig.1 Morphological changes of the nuclei of NMDA-induced rat hippocampal neurons visualized by Hoechst 33258 staining (Original magnification: ×200)

The arrows indicate the apoptotic nuclei. The nuclei of normal neurons are ovoid with blue fluorescence, while the apoptotic neurons show irregular, shrunk, and condensed nuclei with bright fluorescence. A: Control group; B: NMDA group (NMDA 300 μmol/L+serine 5 μmol/L), showing numerous apoptotic nuclei; C,D: SITS (500 μmol/L) application before and after NMDA treatment respectively, demonstrating that SITS pretreatment could reduce apoptosis; E, F: DIDS (100 μmol/L) administration before and after NMDA treatment respectively, showing that DIDS pretreatment reduced apoptosis; H, I: NPPB (500 μmol/L)

administration before and after NMDA treatment respectively, showing no obvious protective effect in either group.

## 2.2 氯通道阻断剂对NMDA诱导培养海马神经元存活率的影响

NMDA处理后的细胞存活率明显下降，与正常对照组相比有显著性差异( $P < 0.05$ )；SITS和DIDS可明显抑制NMDA诱导神经元死亡，在NMDA处理前后使用氯通道阻断剂对细胞的生存率有不同的影响，未发现NPPB有明显抗神经元死亡的作用(图2)。

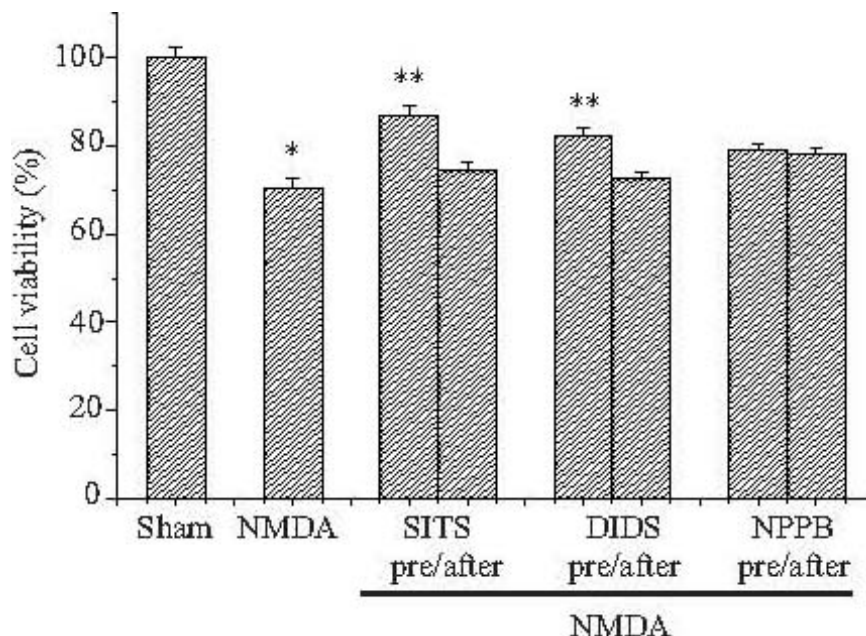


图2 3种氯通道阻断剂对NMDA处理神经元后细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of the 3 chloride channel blockers on viability of the neurons exposed to NMDA (n=6)

\* $P < 0.05$  vs sham group, \*\* $P < 0.05$  vs NMDA group.

## 2.3 SITS抗凋亡的浓度依赖效应

为观察SITS对NMDA诱导海马神经元凋亡的浓度效应，本实验观察了7种不同SITS浓度对神经元存活率的影响。结果显示，浓度低于250  $\mu\text{mol/L}$ 时，SITS没有明显的保护作用，250、500和1000  $\mu\text{mol/L}$ 三种浓度对抗NMDA诱导凋亡作用没有明显差别(图3)。

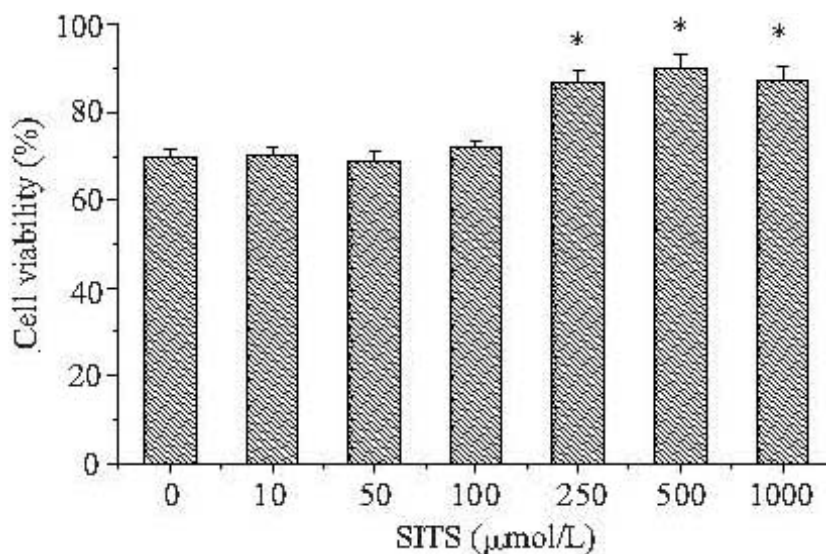


图3 不同浓度SITS对NMDA诱导神经元凋亡的浓度效应

Fig.3 Effect of SITS at different concentrations on NMDA-induced apoptosis (n=6) SITS were applied before neuronal exposure to NMDA. Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  group, no significant protective effect was observed for SITS at the concentration below 100  $\mu\text{mol/L}$ , and SITS above 250  $\mu\text{mol/L}$  showed significant protective effect. \* $P < 0.05$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  group.

### 3 讨论

氯离子是体内含量最多的阴离子，在细胞兴奋性调节、跨上皮物质转运、细胞容积调节、细胞器酸化作用、细胞免疫应答、细胞增殖、分化、凋亡等多种生理过程中发挥重要作用[8]。目前认为，氯通道主要有9个家族，在海马神经元上的电压门控氯通道主要是CIC-2和CIC-3，分别表现为外向整流和内向整流特性。化学门控氯通道主要是GABA激活的氯通道和甘氨酸激活的氯通道[9][10]。在非神经细胞凋亡研究中，Szabo等[11][12]研究发现，外向整流氯通道(ORCC)参与了CD-95诱导的T淋巴细胞的凋亡过程。酪氨酸蛋白激酶p56lck和cAMP可激活淋巴细胞膜上的ORCC[13][14]。ORCC开通剂可引起人B淋巴细胞和HeLa细胞肿胀，给予DIDS、NPPB等氯通道阻断剂能够抑制由STS或TNF $\alpha$ /CHX诱导的多种细胞(Hele\ U937\ NG108-15和PC12细胞)的凋亡[15][16]。在神经系统，Wei等[9]研究发现在STS诱导小鼠皮层神经元凋亡模型上，氯通道阻断剂DIDS对神经元的凋亡有明显保护作用。有研究认为，不是Ca<sup>2+</sup>和K<sup>+</sup>的活动而是Cl<sup>-</sup>通道的活动参与了STS诱导的大鼠皮层神经元的凋亡[17]。另有报道，氯通道蛋白与促分裂因子激活蛋白激酶(MAPK)存在结构上的直接连接[18]。Inglefield等[19]研究认为，暴露NMDA 10 min的大鼠海马切片能引起明显的氯离子内流，氯离子内流可引起细胞水肿。用氯离子敏感的荧光探针和细胞容积变化敏感的荧光探针进行细胞共聚焦成像研究发现，NMDA的细胞毒性所引起的氯离子细胞内大量聚集先于细胞容积的增大，并且氯离子的内流是细胞外液Cl<sup>-</sup>和Na<sup>+</sup>依赖性的，而与细胞外液Ca<sup>2+</sup>是非依赖性的。Wei[9]和Small[17]等在STS诱导的大鼠皮层神经元凋亡中，认为是氯离子的活动明显参与了神经细胞的凋亡。由此我们推测，氯通道的活动可能也参与了缺血缺氧性脑损伤后海马神经元的凋亡过程。本研究在较接近自然脑缺血性神经元损伤状态用NMDA诱导神经元凋亡，观察了氯通道的活动在神经元凋亡中的作用，实验结果基本与上述一致。

DNA荧光染色是目前常用的用于判断细胞凋亡的形态学方法。本实验用荧光染料 Hoechst33258对神经元胞核染色，结合MTT细胞存活率的测定分别观察了3种不同的氯通道阻断剂对NMDA诱导的海马神经元凋亡的影响，并对NMDA处理前后使用氯通道阻断剂的效果作了比较。3种氯通道阻断剂以SITS的保护作用较佳，DIDS次之，NPPB没有明显的保护神经元凋亡作用。SITS和DIDS对NMDA处理前后细胞的生存率分别是86.79%、82.17%和74.17%、72.34%。Hoechst凋亡细胞核染色也显示两种氯通道阻断剂抑制细胞凋亡的效应在NMDA使用前后有明显差别。在3种氯通道阻断剂中，SITS的抗凋亡效果相对较好，不同浓度SITS对NMDA诱导的细胞凋亡的作用显示，250  $\mu\text{mol/L}$ 浓度开始有明显保护作用，但以500  $\mu\text{mol/L}$ 效果更明显，与在大鼠皮层神经元凋亡的文献报道一致[17]。

本研究显示，若在NMDA作用的同时使用氯通道阻断剂可明显保护神经元的死亡，提示氯通道阻断剂有可能阻断NMDA的效应。由于目前尚无特异性的氯通道阻断剂，氯通道阻断剂对神经元凋亡的保护作用是通过阻断NMDA受体起保护作用，还是仅仅阻断了氯通道尚不能完全肯定。另外，氯通道的活动是如何触发细胞凋亡或者氯通道在细胞凋亡通路中的位置如何是我们进一步研究的内容。本研究揭示氯通道在神经元凋亡中的作用，将为凋亡的发生机制从离子通道方面赋予新的理论，为临床缺血性脑损伤的治疗提供新的理论依据。

#### 参考文献:

[1]Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(4): 1431-

[2]Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. Nature, 2000, 407(6805): 802-9.

[3]Monnerie H, Shashidhara S, Le Roux PD. Effect of excess extracellular glutamate on dendrite growth from cerebral cortical neurons at 3 days in vitro: Involvement of NMDA receptors[J]. J Neurosci Res, 2003, 74(5): 688-700.

[4]Lang F, Lang KS, Wieder T, et al. Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte[J]. Pflugers Arch, 2001, 447(2): 121-5.

[5]Ma XC, Gottschall PE, Chen LT, et al. Role and mechanisms of interleukin-1 in the modulation of neurotoxicity[J]. Neuroimmunomodulation, 2003, 10(4): 199-207.

[6]Wang C, Kaufmann JA, Sanchez-ross MG, et al. Mechanism of NMDA-induced apoptosis in phencyclidine-treated cultured forebrain neurons[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294(1): 287-95.

[7]Siewewerts AM, Klijin JGM, Peters HA, et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristic. IC50-values and cell survival[J]. Eur J Chem Clin Biochem, 1995, 33(11): 813-23.

[8]张光平, 施玉梁. 背景氯离子通道研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25 (4): 324-8.

[9]Wei L, Xiao AY, Jin C, et al. Effects of chloride and potassium channel blockers on apoptotic cell shrinkage and apoptosis in cortical neurons[J]. Pflugers Arch, 2004, 448 (3): 325-34.

[10]Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, et al. The CIC chloride channel family[J]. Pflugers Arch, 1999, 437(6): 783-95 .

[11]Szabo I, Lepple WA, Kaba KN, et al. Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(11): 6169-74.

[12]Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, et al. Normotonic cell shrinkage because of disorder volume regulation is an early prerequisite to apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(17): 9487-92.

[13]Albrecht LW, Szabo I, Ulrich W, et al. Tyrosine kinases open lymphocyte chloride channels[J]. Cell Physiol Biochem, 2000, 10(2): 307-12.

[14]Chen JH, Schulman H, Gardner P. A cAMP-regulated chloride channel in lymphocytes that is affected in cystic fibrosis[J]. Science, 1989, 243(4891): 657-60.

[15]Thinnes FP, Walter G, Hellmann KP, et al. Gadolinium as an opener of the outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channel(ORCC), Is there relevance for cystic fibrosis therapy[J]? Pflugers Arch, 2001, 443: S111-6.

[16]Nietsch HH, Roe MW, Fiekers JF, et al. Activation of potassium and chloride channels by tumor necrosis factor alpha. Role in liver cell death[J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20556-61.

[17]Small DL, Tauskela J, Xia ZL. Role for chloride but not potassium channels in apoptosis in primary rat cortical cultures[J]. Neurosci Lett, 2002, 334(2): 95-8.

[18]Qian Z, Okuhara D, Abe MK, et al. Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel[J]. J Biol Chem, 1999, 274(3): 1621-7.

[19] Inglefield JR, Schwartz-Bloom RD. Activation of excitatory amino acid receptors in the rat hippocampal slice increases intracellular  $\text{Cl}^-$  and cell volume[J]. J Neurochem, 1998, 71(16): 1396-404.

---

[回结果列表](#)