

## 氯通道阻断剂对 NMDA 诱导培养海马神经元凋亡的保护作用

常全忠, 胡德辉, 陈明, 王颖, 高天明(南方医科大学神经生物学教研室, 广东广州 510515)

**摘要:** NMDA 受体的激活在缺血性脑损伤神经元死亡中起重要作用。本研究利用 NMDA 诱导大鼠培养海马神经元凋亡, 模拟建立缺血性脑损伤的细胞模型, 观察了 3 种氯通道阻断剂对神经元凋亡的保护作用。离体培养 12 d 的 SD 大鼠海马神经元, 在 NMDA 处理前和处理后使用氯通道阻断剂, 对神经元的存活率影响不同, 仅 NMDA 处理前给药才有保护作用。SITS 对 NMDA 诱导神经元凋亡的保护作用最强并有浓度依赖性, DIDS 次之, NPPB 没有明显的保护作用。结果表明, SITS 和 DIDS 可阻断 NMDA 的毒性效应, 作用机制可能与 NMDA 的效应和氯通道活动均被阻断有关。

**关键词:** 氯通道阻断剂; NMDA; 海马神经元; 凋亡; 大鼠

**中图分类号:** R322.81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4254(2006)02-0158-04

## Neuroprotection of chloride channel blockers against NMDA-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons

CHANG Quan-zhong, HU De-hui, CHEN Ming, WANG Ying, GAO Tian-ming

Department of Neurobiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Activation of N-methyl-d-aspartic acid (NMDA) receptor plays an important role in neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia but the underlying mechanisms are still unclear. The present study examined the neuroprotection of three chloride blockers in an *in vitro* cell model of cerebral ischemia established by treatment of cultured rat hippocampal neurons with NMDA. Hoechst 33258 staining and MTT assay were used to detect neuronal apoptosis and cell viability, respectively. The neuroprotective effects of chloride channel blockers on the cell viability and neuronal apoptosis were only observed when the blockers were applied before NMDA exposure. In comparison with DIDS, SITS showed more potent protective effect in a dose-dependent manner, whereas NPPB showed no significant neuroprotective effect. The results demonstrate that pretreatment with both SITS and DIDS have protective effect against neuronal apoptosis, which is achieved by blocking both NMDA receptor and chloride channel.

**Key words:** chloride channel blocker; N-methyl-d-aspartic acid; hippocampal neuron; apoptosis; rat

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<sup>[1-2]</sup>。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量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 Ca<sup>2+</sup> 和 K<sup>+</sup> 参与神经元凋亡的研究报告较多, 而对 Cl<sup>-</sup> 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<sup>[3]</sup>。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 Hoechst 33258 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

CO<sub>2</sub> 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

收稿日期: 2005-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(30125013, 30330240); 教育部长江学者奖励计划资助项目

Supported by National Natural Science Foundation of China (30125013, 30330240)

作者简介: 常全忠(1965-), 男, 副教授, 在读博士研究生, 现工作单位为新乡医学院生理学教研室, E-mail: qzchang@tom.com

通讯作者: 高天明, 电话: 020-61648216, E-mail: tgao@fimmu.com

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  $1\text{ mm}^3$  小块。用 5 倍组织体积的 0.25% 胰蛋白酶  $37\text{ }^\circ\text{C}$  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%  $\text{CO}_2$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  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  $300\text{ }\mu\text{mol/L}$  NMDA、 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$  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  $0.1\text{ mol/L}$ 、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 ( $0.25\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 染色 15 min; 用  $0.1\text{ mol/L}$ 、pH 7.4 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  $5\text{ mg/ml}$ 。 $37\text{ }^\circ\text{C}$  下继续培养 4 h, 小心吸去培养液, 加入 DMSO ( $150\text{ }\mu\text{l/孔}$ ), 振荡 10 min, 使甲斐颗粒完全溶解。以不加细胞的培养液空白孔作对照, 酶标仪检测  $D(\lambda)$  ( $\lambda=570\text{ nm}$ ),  $D(\lambda)$  值的大小反映细胞的存活情况。细胞存活率 (%) = [实验组  $D(\lambda)$  - 空白对照  $D(\lambda)$ ] / [对照组  $D(\lambda)$  - 空白组  $D(\lambda)$ ]  $\times 100\%$ 。

#### 1.8 统计学处理

实验数据用均数  $\pm$  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)。凋亡计数显示, 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 未发现显著抗凋亡作用。

### 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)。

### 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  $250\text{ }\mu\text{mol/L}$  时, SITS 没有明显的保护作用,  $250$ 、 $500$  和  $1000\text{ }\mu\text{mol/L}$  三种浓度对抗 NMDA 诱导凋亡作用没有明显差别 (图 3)。

## 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<sup>[8]</sup>。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<sup>[9-10]</sup>。在非神经细胞凋亡研究中, Szabo 等<sup>[11-12]</sup>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<sup>[13-14]</sup>。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  $\text{TNF}\alpha$ /CHX 诱导的多种细胞 (HeLa、U937、NG108-15 和 PC12 细胞) 的凋亡<sup>[15-16]</sup>。在神经系

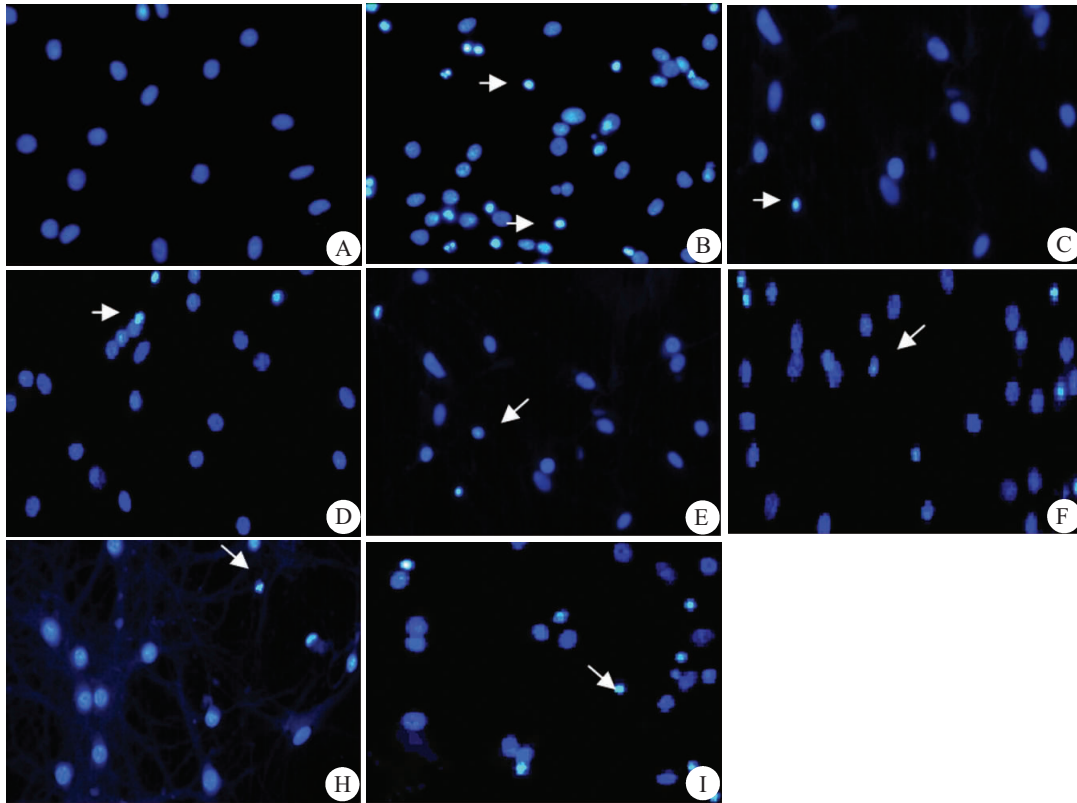


图 1 NMDA 诱导神经元凋亡 Hoechst33258 染色后的核形态学变化

**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  $\mu\text{mol/L}$ +serine 5  $\mu\text{mol/L}$ ), showing numerous apoptotic nuclei; C,D: SITS (500  $\mu\text{mol/L}$ ) application before and after NMDA treatment respectively, demonstrating that SITS pretreatment could reduce apoptosis; E, F: DIDS (100  $\mu\text{mol/L}$ ) administration before and after NMDA treatment respectively, showing that DIDS pretreatment reduced apoptosis; H, I: NPPB (500  $\mu\text{mol/L}$ ) administration before and after NMDA treatment respectively, showing no obvious protective effect in either group.

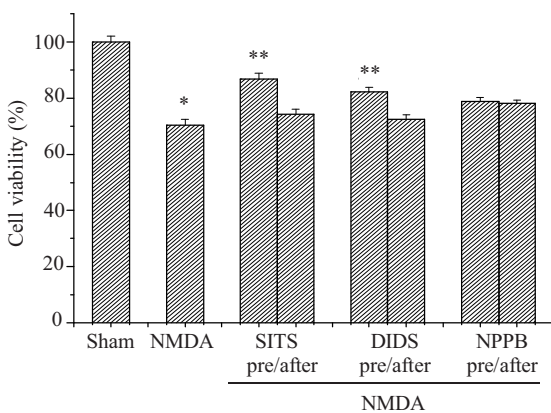


图 2 3 种氯通道阻断剂对 NMDA 处理神经元后细胞存活率的影响

**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.

统,Wei 等<sup>[9]</sup>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

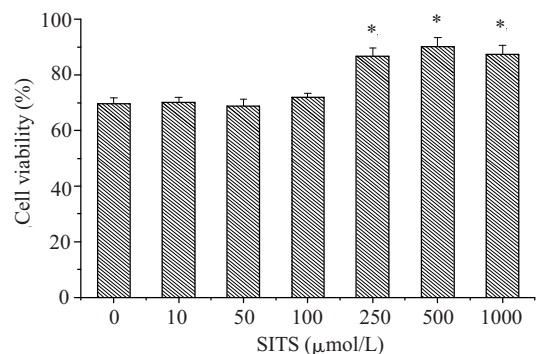


图 3 不同浓度 SITS 对 NMDA 诱导神经元凋亡的浓度效应  
**Fig.3 Effect of SITS at different concentrations on NMDA-induced apoptosis (n=6)**

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.

显保护作用。有研究认为,不是  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{K}^{+}$  的活动而是  $\text{Cl}^{-}$  通道的活动参与了 STS 诱导的大鼠皮层神经

元的凋亡<sup>[17]</sup>。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<sup>[18]</sup>。Inglefield 等<sup>[19]</sup>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<sup>[9]</sup>和 Small<sup>[17]</sup>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 μmol/L 浓度开始有明显保护作用,但以 500 μmol/L 效果更明显,与在大鼠皮层神经元凋亡的文献报道一致<sup>[17]</sup>。

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): 1431-568.
- [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]. *Pflügers 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] Sieuwerts 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]. *Pflügers Arch*, 2004, 448(3): 325-34.
- [10] Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, et al. The CIC chloride channel family [J]. *Pflügers 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] Thinnies 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]? *Pflügers 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 Cl<sup>-</sup> and cell volume [J]. *J Neurochem*, 1998, 71(16): 1396-404.