

慢性孵育 β -淀粉样肽₍₂₅₋₃₅₎ 对培养大鼠海马神经元外向钾电流的影响

金宏伟, 王晓良*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研究慢性孵育 β -淀粉样肽₍₂₅₋₃₅₎ (β AP₂₅₋₃₅) 对海马神经元上瞬时外向钾电流 (I_A) 和延迟整流钾电流 (I_K) 的影响。方法 在培养的大鼠海马神经元上用膜片钳全细胞记录钾通道电流。结果 β AP₂₅₋₃₅ $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 孵育细胞 24 h, I_K 电流幅度增加 (44.3 ± 5.4) %, 电流密度由 (30.4 ± 6.4) $\text{pA} \cdot \text{PF}^{-1}$ 增加至 (43.8 ± 4.7) $\text{pA} \cdot \text{PF}^{-1}$; β AP₂₅₋₃₅ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 孵育 12 h, I_K 电流幅度增加 (69.8 ± 4.1) %, 电流密度增加至 (51.6 ± 7.9) $\text{pA} \cdot \text{PF}^{-1}$, 呈浓度依赖性; β AP₂₅₋₃₅ 引起的 I_K 增加对 TEA $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 敏感; β AP₂₅₋₃₅ 上调 I_K 的作用主要发生在 β AP₂₅₋₃₅ 用药后 48 h 内。 β AP₂₅₋₃₅ 对 I_A 无显著性影响。结论 β AP₂₅₋₃₅ 选择性地增加海马神经元上 I_K , 这一作用可能与 β AP 的神经毒性有关。

关键词: β -淀粉样肽₍₂₅₋₃₅₎; 钾通道; 膜片钳技术; 海马神经元

中图分类号: R965; R338 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2001)12-0898-04

β -淀粉样肽 (β AP) 的纤维化沉积是老年痴呆 (Alzheimer disease, AD) 患者的主要病理特征之一。研究表明 β AP 不仅对神经元有直接的毒性, 而且能增加神经元对神经毒性物质的敏感性。所以, β AP 在 AD 的发生和发展中起重要作用, 但其作用机制目前仍不清楚。学习和记忆障碍是临床诊断 AD 的主要指标。Landfield 等^[1] 首先报道钾通道参与与老年化有关认知功能的损伤, 并且认为钾通道在学习和记忆过程中起重要作用。目前关于 β AP 对钾通道作用的报道很少且有争论。AD 的病理损伤是否涉及钾通道的活性尚属未知。因此, 为进一步探讨钾通道在 β AP 神经毒性中的作用, 本研究用培养海马神经元与 β -淀粉样肽₂₅₋₃₅ (β AP₂₅₋₃₅) 慢性孵育, 用全细胞膜片钳的方法观察 β AP₂₅₋₃₅ 对电压依赖性外向钾电流 (I_K) 的影响。

材 料 和 方 法

实验动物 新生 (d 1) Wistar 大鼠, ♀ ♂ 各半, 由中国医学科学院实验动物中心提供。

药品 β AP₂₅₋₃₅, TEA, TTX, HEPES, $\text{Na}_2\text{ATP} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 胰蛋白酶均购于 Sigma 公司。DMEM 培养基, 标准胎牛血清, 马血清购于 Gibco 公司, 其余试剂均

为国产分析纯。

海马神经元原代培养 按文献^[2] 从新生 Wistar 乳鼠分离出海马组织, 剪碎, 胰酶消化; 用培养液 (DMEM, 10% 马血清, 10% 胎牛血清, 青霉素 $1.00 \text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$, 链霉素 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 洗涤, 稀释, 将细胞稀释成 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬液, 将细胞悬液接种预先用多聚赖氨酸铺底的 35 mm 培养皿 (Costar) 每皿 1 mL, 放入 5% $\text{CO}_2 + 95\% \text{O}_2$ 的 CO_2 培养箱中培养。3 d 后, 加入阿糖胞苷 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑制胶质细胞生长。细胞培养至 8 - 13 d, 进行电生理实验。

全细胞膜片钳实验 将培养皿放置于倒置显微镜 (IMF-2 型, OLYMPUS) 上, 将培养皿内的培养液换成人脑脊液 2mL ($\text{NaCl } 150 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KCl } 144 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgCl}_2 1.1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{HEPES } 10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{D-glucose } 192 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{TTX } 500 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.3), 选取海马锥体神经元细胞进行实验。微电极 (中国科学院上海脑研究所) 由 PP-83 型拉制仪 (Narishige Co, Japan) 分两步拉制, 充灌电极内液 ($\text{KCl } 140 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{EGTA } 10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{HEPES } 10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgCl}_2 0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{ATP} \cdot 3\text{H}_2\text{O } 2.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 用 KOH 调至 pH 7.2) 后, 电阻为 2 - 5 $\text{M}\Omega$, 采用高阻抗封接技术, 负压打孔, 形成全细胞钳制。pClamp 6.0 程序 (AXON) 通过 AD/DA 转换板 (Digidata 1200, Axon) 支持 EPC-7 放大器进行刺激发放和信号采集, 并存储于 IBM PC486 计算机中。

数据分析与统计 所有电流的测量, 拟和等分析均在 pClamp 6.0, CLAMPFIT, Ori 5.0 等软件上完成, 数据均以平均数 \pm 标准差表示, 采用 t 检验进行

收稿日期: 2001-04-23.

基金项目: 国家“973 计划”项目资助 (G1998051106); 国家杰出青年科学基金资助 (39425014).

作者简介: 金宏伟 (1968 -), 男, 博士研究生;

王晓良 (1955 -), 男, 研究员, 博士生导师.

* 通讯作者 Tel: (010) 63165193, Fax: (010) 63017757,

E-mail: Wangxl @imm.ac.cn

统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结 果

1 大鼠海马神经元钾通道亚型

当海马神经元给予保持电位在 -50 mV, 去极化至 $+40$ mV, 波宽为 400 ms 的刺激后, 正常细胞上可引出延迟整流钾电流 (I_K), 其稳态电流峰值为 (1368 ± 289) pA, 电流密度为 (30 ± 6) pA·pF⁻¹ ($n = 20$)。该电流对 TEA 5 mmol·L⁻¹ 敏感(图 1A); 当保持电位变为 -80 mV, 去极化至 $+40$ mV, 波宽为 400 ms 的刺激后, 此时可记录到的电流至少含有两种成分, 即瞬时外向钾电流 (I_A) 和 I_K , 在这两种钳制电位下记录到的电流借助 CLAMPFIT 软件相减, 即可得到 I_A ,

最大峰电流值为 (1378 ± 345) pA, 电流密度为 (31 ± 8) pA·pF⁻¹ ($n = 20$) 该电流对 2 mmol·L⁻¹ 的 $4-AP$ 敏感(图 1B)。

2 慢性孵育 β -AP₂₅₋₃₅ 对延迟整流钾电流的影响

β -AP₂₅₋₃₅ 3 μ mol·L⁻¹ 与细胞孵育 24 h 后, 使去极化至 $+40$ mV 时的 I_K 电流幅度增加 $(44 \pm 5)\%$, 电流密度增至 (44 ± 5) pA·pF⁻¹ ($n = 10, P < 0.05$); β -AP₂₅₋₃₅ 10 μ mol·L⁻¹ 孵育 12 h 后, I_K 电流幅度增加达 $(70 \pm 4)\%$, 电流密度增至 (52 ± 8) pA·pF⁻¹ ($n = 10, P < 0.01$), 呈浓度依赖性(图 2)。TEA 5 mmol·L⁻¹ 对 β -AP₂₅₋₃₅ 3 μ mol·L⁻¹ 孵育后的 I_K 仍敏感, 抑制率达 $(53 \pm 3)\%$, 见图 3。

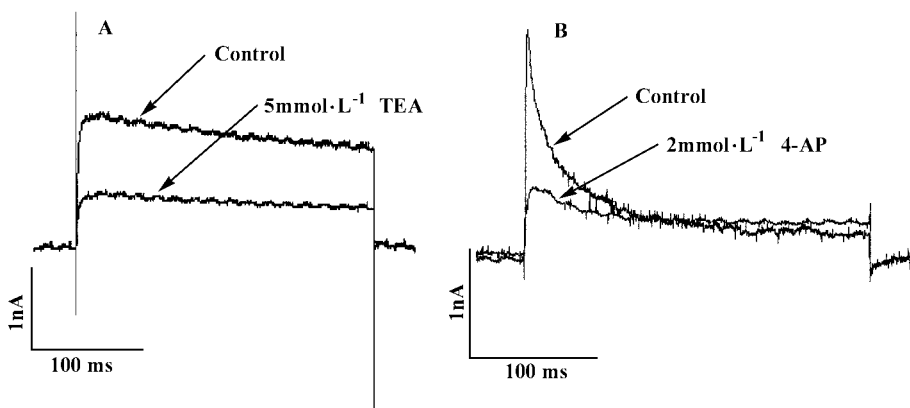


Figure 1 Voltage-gated outward K⁺ current in the cultured rat hippocampal neurons
A. I_K current was activated by stepping from a holding potential of -50 mV to $+40$ mV for 400 ms. I_K was blocked by 5 mmol·L⁻¹ TEA. B. I_A current was obtained by subtraction of I_K from the total K⁺ current which was activated by stepping from a holding potential of -80 mV to $+40$ mV for 400 ms. I_A was blocked by 2 mmol·L⁻¹ $4-AP$

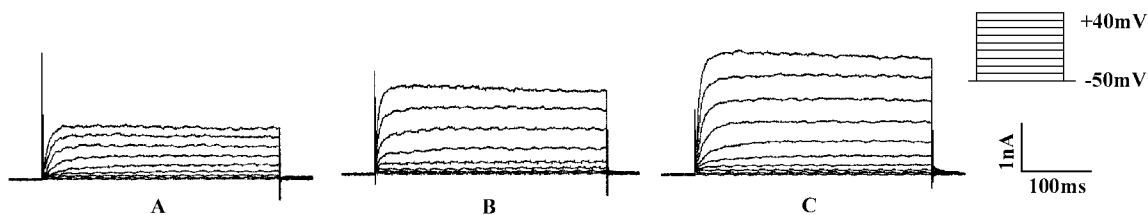


Figure 2 Delayed rectifier potassium current (I_K) in cultured rat hippocampal neurons
A. I_K recorded from normal neurons; B. I_K recorded from neurons after exposed to 3 μ mol·L⁻¹ beta-amyloid peptide₂₅₋₃₅ for 24 h; C. I_K recorded from neurons after exposed to 10 μ mol·L⁻¹ beta-amyloid peptide₂₅₋₃₅ for 12 h

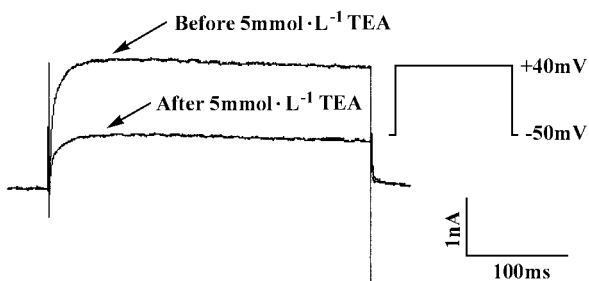


Figure 3 Effect of 5 mmol·L⁻¹ TEA on beta-amyloid peptide₂₅₋₃₅ enhanced potassium channel outward current

3 β -AP₂₅₋₃₅ 孵育不同时间对钾电流的影响

β -AP₂₅₋₃₅ 3 μ mol·L⁻¹ 与海马神经元孵育 12 h 后, I_K 电流值显著增加, 24 h 后达到高峰。并持续至 48 h 以上, 而同样处理对 I_A 无显著影响, 至 48 h 几乎未发生变化(图 4), 当 β -AP₂₅₋₃₅ 浓度增至 10 μ mol·L⁻¹ 时, I_A 仍无显著改变(图略)。这说明 β -AP₂₅₋₃₅ 选择性地影响延迟整流钾电流。 β -AP₂₅₋₃₅ 孵育 60 h 后, 在相差显微镜下观察发现大量细胞出现

胞体萎缩,晕光消失,突触变短等现象,全细胞钳制很难进行。

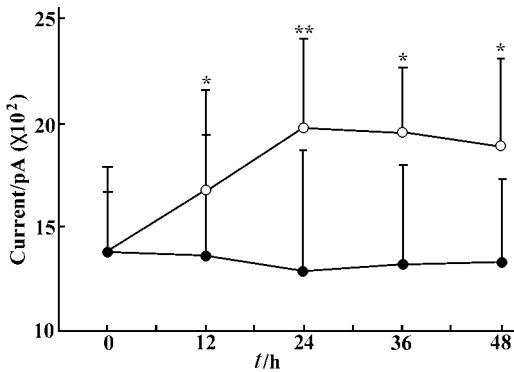


Figure 4 The changes of I_k (○—○) and I_A (●—●) after chronic exposure to beta-amyloid peptide₂₅₋₃₅ $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, each point represents data from 10 cells

讨 论

海马神经元上主要有两种电压依赖性外向钾电流 (K_V),一种是瞬时外向钾电流 I_A ,有快速激活,快速失活,对 4-AP 敏感等特性;另一种是延迟整流钾电流 I_K ,衰减缓慢,对 TEA 敏感。本研究表明,在培养大鼠海马神经元(8 - 13 d)上同样观察到以上两种钾电流,这与文献报道基本一致^[3]。由于 K_V 有控制细胞静息膜电位,参与形成动作电位,调节神经元重复放电以及神经递质的释放等作用^[4],所以它对于维持细胞正常生理功能有重要的作用。神经元上的钾通道的变化,可引起膜兴奋性的改变,最终导致细胞死亡^[5]。海马是学习记忆的加工场,在记忆严重减退的 AD 患者的海马区域内,人们发现淀粉样蛋白的沉积极为严重,这表明海马是 β AP 毒性的易损区域之一^[6]。因此研究 β AP 对海马神经元上 K_V 电流的影响对于阐述 β AP 的神经毒性以及 AD 患者认知功能衰退机制均具有重要意义。

本研究首次报道了慢性孵育 β AP₂₅₋₃₅ 对培养新生大鼠海马神经元上 K_V 的影响。结果表明慢性孵育 β AP₂₅₋₃₅ 12 h 以上可浓度依赖地选择性增加 I_K ,而对 I_A 无影响。这与 β AP 对皮层和 SN56 细胞株上对 K_V 影响的结果^[7,8]基本一致。目前越来越多的证据表明:通过电压依赖性钾通道引起钾大量外流可能是一些中枢神经程序化死亡(包括 β AP 毒性所致)的重要环节。无血清培养,星形孢菌素以及 β AP 所造成的皮层神经元的凋亡,均选择性地增强 I_K 电流^[7,9];另外在皮层星型胶质细胞上, β AP 也同样可引起 I_K 的增加^[10];在 AD 病人的原发部位如神

经细胞上也可出现 β AP 上调引起钾通道的改变^[11]。Mattson 等^[12]报道可溶性 β AP 前体蛋白 (sAPPs) 可通过激活大电导,CTX 敏感的钾通道,而减慢动作电位,产生超极化。因此,通过电压依赖性钾通道增加钾离子的大量外流,产生超极化,导致神经元膜电位的改变,最终引起细胞的死亡可能是 β AP 产生神经毒性的原因之一。

文献^[3]报道急性脉冲式应用 β AP_(1-39,1-40) 可选择性阻断 I_A ,而对 I_K 无明显作用,这与我们的实验结果相反。我们知道,AD 是属于慢性神经退行性病变, β AP 的蓄积也是一长期渐进的过程,因此,慢性孵育 β AP 较急性脉冲式给药更能准确地反映 β AP 神经毒性的全过程,我们的实验更接近这一病理过程。

本研究发现 β AP 上调 I_K 的作用主要发生在 β AP 应用后 48 h 内,因此,我们提出:在 β AP 最终导致细胞功能损伤,甚至死亡的过程中, β AP 上调 I_K 的作用很可能是这种级联放大反应早期阶段中的一个重要启动因素。所以,进一步研究 β AP 上调作用的机制及选择性,对治疗和预防 AD 具有重要的指导意义。通过提高细胞外 K^+ 浓度或者应用 TEA 均能明显降低 β AP 对原代培养的神经元以及 SN56 细胞株的神经毒性^[7,9]。这进一步证实增强延迟整流钾电流可导致细胞死亡,而抑制这些电流可有效地防止细胞死亡。Goodman 等^[13]报道一些钾通道开放剂(diazoxide 和 levochromakalim)在高浓度下(10 - 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)也能保护神经元对 β AP 的损伤,但这种保护作用不是由于其激活钾通道而产生的,更主要的可能是发挥其抗氧化的作用。虽然目前尚不清楚 β AP 与钾通道之间的作用关系,但是可以肯定地讲这是一个多因素多途径参与的病理机制。氧化应激很可能参与 β AP 对钾通道的损伤作用。例如, β AP 可通过对膜产生脂质过氧化作用来损伤 $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的功能,从而触发 I_K 途径钾的大量外流, $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ 交换的反向转运,造成胞内钙的超载和钾的丢失,加速细胞死亡^[14]。

钾通道阻断剂过去曾在短期临床实验中用来治疗 AD,这主要是依赖其增加乙酰胆碱释放的作用,但由于其副作用较大,难以广泛使用^[15]。目前一些证据表明:临床上治疗 AD 的药物如他克林,丙戊茶碱(待发表)等均对 I_K 有明显的抑制作用^[16]。因此,本研究结果进一步提示:抑制外向钾电流,尤其是 I_K 可能是未来寻找治疗 AD 药物的新途径。

REFERENCES:

- [1] Landfield PW, Piltner TA. Prolonged Ca^{2+} -dependent after hyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats [J]. *Science*, 1984, **226**(4678):1089 - 1092.
- [2] Trussell LO, Jackson MB. Dependence of an adenosine-activated potassium current on a GTP-binding protein in mammalian central neurons [J]. *J Neurosci*, 1987, **7**(10): 3306 - 3316.
- [3] Good TA, Smith DO, Murphy RM. β amyloid peptide block the fast-inactivating K^+ current in rat hippocampal neurons [J]. *Biophys J*, 1996, **70**:296 - 304.
- [4] Hille B. Potassium and Chloride channels [A]. Hill B. *Ionic Channels of Excitable Membranes* [M]. Sunderland: Sinauer, 1992. 115 - 139.
- [5] Lockery SR, Spitzer NC. Reconstruction of action potential development from whole-cell currents of differentiating spinal neurons [J]. *J Neurosci*, 1992, **12**(6):2268 - 2287.
- [6] Patrick CM, Leonard NB, Kimberly SF. Neurotoxicity of human amylin in rat primary hippocampal cultures: similarity to Alzheimer's disease amyloid- β neurotoxicity [J]. *J Neurochem*, 1993, **61**(6):2330 - 2333.
- [7] Yu SP, Farhangrazi ZS, Ying HS, et al. Amyloid- β induced enhancement of delayed rectifier K^+ current and attenuation of β amyloid- β induced neuronal death by tetraethylammonium [J]. *Soc Neurosci Abstr*, 1997, **23**:1629.
- [8] Colom LV, Diaz ME, Beers DR, et al. Role of potassium channels in amyloid- β induced cell death [J]. *J Neurochem*, 1998, **70**(5):1925 - 1934.
- [9] Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, et al. Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current [J]. *Science*, 1997, **278**(3):114 - 117.
- [10] Jalonen TO, Charniga CJ, Wielt DB. β Amyloid peptide-induced morphological changes coincide with increased K^+ and Cl^- channel activity in rat cortical astrocytes [J]. *Brain Res*, 1997, **746**(1-2):85 - 97.
- [11] Etcheberrigaray E, Payne JL, Alkon DL. Soluble beta-amyloid induces Alzheimer's disease feature in human fibroblasts and neuronal tissues [J]. *Life Sci*, 1996, **59**(5-6):491 - 498.
- [12] Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, et al. Activation of K^+ channels and suppression of neuronal activity by secreted β amyloid- β precursor protein [J]. *Nature*, 1996, **379**(4):74 - 78.
- [13] Goodman Y, Mattson MP. K^+ channel openers protect hippocampal neurons against oxidative injury and amyloid β peptide toxicity [J]. *Brain Res*, 1996, **706**(2):328 - 332.
- [14] Keller JN, Germeyer A, Begley JG, et al. 17β estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na^+/K^+ -ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid- β peptide and iron [J]. *J Neurosci Res*, 1997, **50**(4):522 - 530.
- [15] Lavretsky EP, Jarvik LF. A group of potassium channel blocker α -acetylcholine releasers: new potential for Alzheimer diseases? A review [J]. *J Clin Psychopharmacol*, 1992, **12**(2):110 - 118.
- [16] Kralzic D, Singh S. Selective blockade of the delayed rectifier potassium current by tacrine in drosophila [J]. *J Neurobiol*, 1997, **32**(1):1 - 10.

EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO BETA AMYLOID PEPTIDE₂₅₋₃₅ ON VOLTAGE GATED POTASSIUM OUTWARD CURRENT IN CULTURED RAT HIPPOCAMPAL NEURONS

JIN Hong-wei, WANG Xiao-liang

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of chronic exposure to beta-amyloid peptide₂₅₋₃₅ (β AP₂₅₋₃₅) on transient outward (I_A) and delayed rectifying (I_K) current in cultured rat hippocampal neurons. **METHODS** Voltage-gated potassium outward current was recorded using whole-cell patch clamp techniques in the cultured rat hippocampal neurons. **RESULTS** Cells were exposed to β AP₂₅₋₃₅ $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h. The I_K current amplitude was increased by $(44 \pm 5) \%$ ($n=10$, $P<0.05$), current density increased from $(30 \pm 6) \text{ pA} \cdot \text{PF}^{-1}$ to $(44 \pm 5) \text{ pA} \cdot \text{PF}^{-1}$ ($n=10$, $P<0.05$) at the membrane potential of 40 mV. When β AP₂₅₋₃₅ was $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, I_K was increased by $(70 \pm 4) \%$ ($n=10$, $P<0.01$), current density increased by $(52 \pm 8) \text{ pA} \cdot \text{PF}^{-1}$ ($n=10$, $P<0.01$). The effect of β AP₂₅₋₃₅ was shown to be in a dosage-dependent manner. The increment of I_K current by β AP₂₅₋₃₅ was sensitive to $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEA. The increase of I_K mainly happened within 48 h after exposure to β AP₂₅₋₃₅. I_A did not change obviously after exposure to β AP₂₅₋₃₅ ($n=10$, $P>0.05$). **CONCLUSION** Beta-amyloid peptide enhanced I_K current selectively. This may be related to β AP induced neurotoxicity in the hippocampal neurons.

KEY WORDS: beta-amyloid peptide₂₅₋₃₅; potassium channels; patchclamp techniques; hippocampal neuron