

# 慢性孵育 $\beta$ 淀粉样肽<sub>25-35</sub> 对培养大鼠海马神经元电压依赖性外向钾通道亚型 mRNA 表达的影响

金宏伟, 张 炜, 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  $\beta$  淀粉样肽<sub>25-35</sub> ( $\beta$  AP<sub>25-35</sub>) 对海马神经元电压依赖性外向钾通道亚型 mRNA 表达的影响。方法 用 RT-PCR 方法检测 mRNA 的表达, 用光密度扫描法半定量测定表达变化。结果 在正常培养的海马神经元上延迟整流 ( $Kv2.1, Kv1.5$ ), 瞬间外向 (A 型) ( $Kv4.2, Kv1.4$ ), 钙激活的大电导 (rSlo) 钾通道亚型均有表达。 $\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  孵育细胞 24 h 后,  $Kv2.1$  mRNA 的表达明显上调, 其它亚型则无显著性变化;  $\beta$  AP<sub>25-35</sub> 上调  $Kv2.1$  mRNA 的作用主要发生在  $\beta$  AP<sub>25-35</sub> 应用后 48 h 内; 60 h 后  $Kv2.1$  mRNA 表达水平显著下调。结论  $Kv2.1$  转录水平的上调可能参与  $\beta$  AP<sub>25-35</sub> 选择性地增加海马神经元上延迟整流钾电流 ( $I_K$ ) 的作用。

关键词: RT-PCR; 淀粉样  $\beta$  肽<sub>25-35</sub>; 电压依赖性外向钾通道; 海马神经元

中图分类号: R965; Q424 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)08 - 0598 - 05

$\beta$  淀粉样肽 ( $\beta$  AP) 是造成阿尔茨海默病 (AD) 患者认知功能的减退或丧失的主要原因, 而海马是脑内最易受到  $\beta$  AP 毒性损害的区域之一<sup>[1]</sup>。众所周知, 许多功能各异的电压依赖性钾通道 ( $Kv$ ) 亚型广泛分布在哺乳动物的海马神经元上, 包括延迟整流钾通道 ( $I_K$ ), 瞬间外向 (A 型) 钾通道 ( $I_A$ ), 以及钙激活的大小电导钾通道 ( $BK_{Ca}, SK_{Ca}$ ) 等, 他们参与调节静息膜电位, 控制动作电位时程, 影响神经元的重复放电。通过这些作用, 钾通道调节神经元的整和作用, 输出功能及神经递质的释放, 参与海马区域认知功能的加工和处理<sup>[2]</sup>。

钾通道通过调节钾的外流而影响细胞内的离子浓度, 细胞的兴奋性和细胞容积, 这种变化可能参与神经元的凋亡过程<sup>[3]</sup>。最近的研究表明慢性孵育  $\beta$  AP 能选择性地上调海马, 皮层等神经元上的延迟整流钾电流<sup>[4,5]</sup>。因此, 钾通道的改变可能参与 AD 患者神经元的退行性病变。

由于  $Kv$  通道亚型的分类复杂,  $\beta$  AP 损伤神经元的作用与何种钾通道亚型相关尚未见报道。为此, 本研究采用慢性孵育  $\beta$  AP<sub>25-35</sub> 与海马神经元和

RT-PCR 的方法, 旨在从 mRNA 水平探讨何种  $Kv$  通道亚型参与  $\beta$  AP 的神经毒性作用。

## 材 料 和 方 法

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

药品  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>, 胰蛋白酶, MIT 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。 $\beta$  AP<sub>25-35</sub> 用灭菌去离子双蒸水, 配成  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  储备溶液,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存待用。

海马神经元的原代培养 按文献<sup>[6]</sup>法从新生 (d 1) 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  $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 链霉素  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 洗涤, 稀释, 将细胞稀释成  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的细胞悬液, 将此液接种于预先用 0.1% 多聚赖氨酸铺底的多孔培养皿 (Costar), 放入 5%  $\text{CO}_2 + 95\% \text{O}_2$  的  $\text{CO}_2$  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, 进行实验。

MTT 法检测  $\beta$  AP<sub>25-35</sub> 的神经毒性 按文献<sup>[7]</sup>将细胞以每孔  $10^5$  接种于 24 孔板中, 每孔体积 1 mL。培养至 8 d 后, 加入  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  继续孵育 12, 24, 36, 48, 60 及 72 h 后, 每孔分别加入 5

收稿日期: 2001-09-10.

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); 高等学校博士学科点专项科研基金资助 (98002332).

\* 通讯作者 Tel: (010) 631 65183, Fax: (010) 6301 7757,

E-mail: Wangxl @imm.ac.cn

mg·mL<sup>-1</sup> MTT 溶液 100 μL, 继续孵育 4 h 后加入 1 mL 脱色液(50% 二甲基甲酰胺, 20% SDS) 溶解蓝色结晶, 过夜, 使结晶物充分溶解, 在 μQuant 酶标仪(BIO-TEK INSTRUMENTS, INC.) 570 nm 波长处测量各孔吸光度。

Table 1 Sequences of the set of primers used in RT-PCR experiments for genes encoding the Kv channels

Kv channels gene	Sense primer	Antisense primer
Kv1.4	5'-CGCAGTCAGTTGCCATACC-3'	5'-CTCTCCTCGGGACCACCTTF-3'
Kv4.2	5'-AAACCAACGAGCGGACA-3'	5'-GTGACTTGAAGGGCGATTAAC-3'
Kv2.1	5'-GCTCTGGTTTCTTCGTGGAG-3'	5'-CACGCTGTAGAGCAGCTGAG-3'
Kv1.5	5'-CCAAGCTGGTGGTAGTAGTGTCT-3'	5'-GGTGTGTGGGTTCTCGAAGG-3'
BKca (rSlo)	5'-ATGACCCCTTGTAATTCC-3'	5'-GGTCATCATCATCTTGG-3'
β Actin	5'-CATCTCTGTCTGAAGTCCA-3'	5'-ATCATGTTTGAGACCTCAACA-3'

总 RNA 提取和 RT-PCR (1) 收获单层海马神经元细胞。(2) 用 Trizol 法(博大公司)提取总 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 用 TAE 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量。提取的总 RNA 于 -20℃ 保存。(3) 逆转录反应: 取适量总 RNA, 加随机引物 0.5 μL; 加无 RNAase 水至 9 μL, 70℃ 变性 5 min, 置冰中 1 min, 然后分别加入下列成分: 5X 缓冲液 4 μL; dNTPs 混合物 (10 mmol·L<sup>-1</sup>) 2 μL; DIT (0.1 mol·L<sup>-1</sup>) 2 μL; RAN 酶抑制剂 (30 U·μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL; 加无 RNAase 水至 19 μL, 42℃ 反应 5 min 后, 每管中加入 M<sup>MLV</sup> 酶 (10 000 U) 1 μL, 使总反应体系为 20 μL, 于 42℃ 反应 60 min, 72℃ 变性 10 min 后冰浴, 进行扩增反应, 或 -20℃ 保存待用。(4) PCR 反应: 在 0.5 mL PCR 管中依次加入无 RNAase 水 30.5 μL, 逆转录产物 2 μL, 10X PCR 缓冲液 5 μL, 3', 5' 端引物 (终浓度 1 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 5 μL, d NTP 2 μL, Taq DNA 聚合酶 (2 U·μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL, 总体系 50 μL, 混匀。94℃ 变性 3 min。设置反应程序: 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 周期为 35 个循环, β-actin 为 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 周期为 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。(5) PCR 产物定量: PCR 反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 Koda 凝胶图像分析系统进行图像分析, 然后计算待测基因与内标 β-actin 吸光度的比值。

统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间均数比较用 *t* 检验。

## 结 果

### 1 β-AP<sub>25-35</sub> 神经毒性的评估

通过测量 MTT 的减少是判定神经元的存活率

引物设计合成 根据 Genebank 的序列, 用 Primer 5.0 软件分别设计 Kv1.4, Kv4.2, Kv1.5, Kv2.1, rSlo 的引物(表 1), 并由上海生工生物工程公司合成, 内标 β-actin 的引物购自鼎国生物公司。

的常用方法。结果表明, 随着 β-AP<sub>25-35</sub> 3 μmol·L<sup>-1</sup> 孵育的时间延长, 海马神经元存活率逐渐降低。在 β-AP<sub>25-35</sub> 3 μmol·L<sup>-1</sup> 应用 48 h 内, 神经元的减少仅为 26.2% ± 9.1%; 而孵育 72 h 后, 神经元胞体出现萎缩, 光晕消失, 突触变短等现象, 约 46.9% ± 5.7% 的神经元死亡(图 1)。

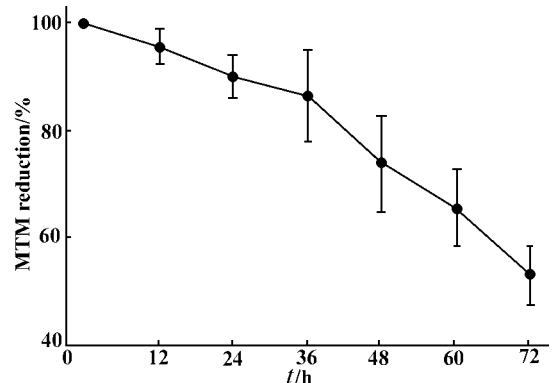


Figure 1 Effect of β-AP<sub>25-35</sub> 3 μmol·L<sup>-1</sup> on cultured rat hippocampal neurons. Cell viability was evaluated by MTT reduction assay. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$

### 2 正常海马神经元上 Kv 亚型的表达

在原代培养的大鼠海马神经元上同样存在有 Kv2.1, Kv1.5, Kv1.4, KV4.2 及 rSlo 通道亚型 mRNA 的表达, 通过光密度扫描分析表明: Kv2.1, KV4.2, Kv1.4, rSlo 的表达水平相对较高(图 2)。

### 3 β-AP<sub>25-35</sub> 对培养海马神经元上 Kv 亚型表达的影响

用 RT-PCR 对比观察了对照组和 β-AP<sub>25-35</sub> 3 μmol·L<sup>-1</sup> 对海马神经元上 Kv2.1, Kv1.5, Kv1.4, KV4.2, rSlo 的表达, 以 β-actin 作为内对照。结果发

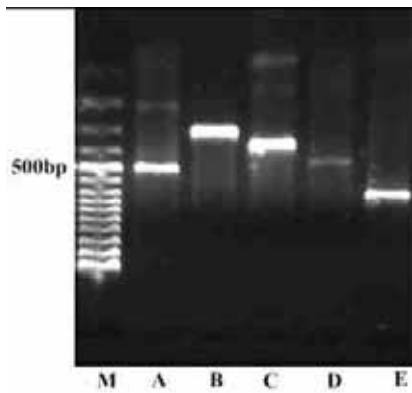


Figure 2 Gel electrophoresis in 1.5 % agarose gel of the RT-PCR fragments of Kv channel subunits mRNA in cultured normal rat hippocampal neurons  
M. PCR marker (100 bp ladder) ; A. Kv1.4 (501 bp) ; B. Kv4.2 (310 bp) ; C. Kv2.1 (364 bp) ; D. Kv1.5 (457 bp) ; E. rSlo (783 bp)

现,  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  损伤 24 h 后, 海马神经元上 Kv2.1 mRNA 表达水平 (Kv2.1/ $\beta$  actin) 为  $1.04 \pm 0.26$ , 明显高于对照组 ( $0.74 \pm 0.15$ )。而 Kv1.5 的表达水平为  $0.39 \pm 0.12$ , 略大于对照组 ( $0.27 \pm 0.11$ ), 但无显著性差异。其他各型钾通道 mRNA 表达水平: Kv1.4 ( $0.48 \pm 0.03$ ), Kv4.2 ( $0.95 \pm 0.11$ ), rSlo ( $0.53 \pm 0.03$ ) 分别与其对照组 ( $0.47 \pm 0.04$ ,  $0.91 \pm 0.08$ ,  $0.49 \pm 0.04$ ) 相比均无明显差别 (图 3 和图 4)。

4  $\beta$  AP<sub>25-35</sub> 孵育不同时间对 Kv2.1 表达的影响

$\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  孵育神经元后, 24 h 时的 Kv2.1 mRNA 的表达增强最明显。随着孵育时间的延长, Kv2.1 mRNA 上调作用逐渐减弱, 60 h 后, Kv2.1 mRNA 显著降低。上调作用主要发生在  $\beta$  AP<sub>25-35</sub> 孵育后 48 h 内 (图 5)。

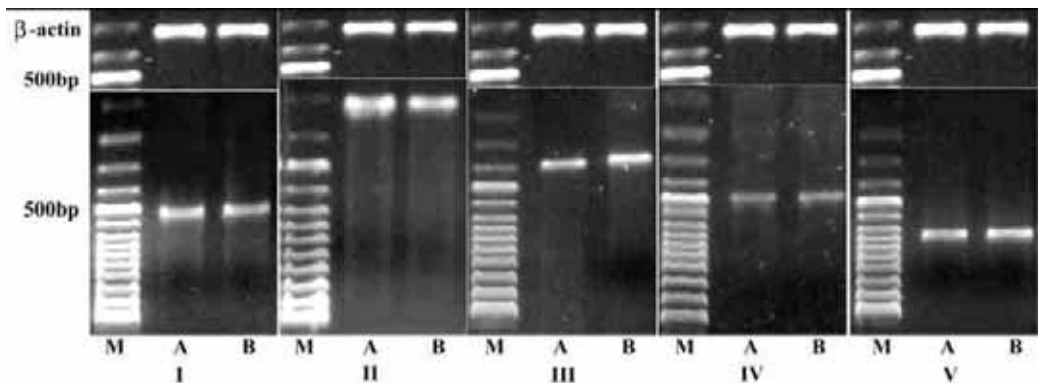


Figure 3 Gel electrophoresis in 1.5 % agarose gel of the RT-PCR fragments of Kv channel subunits mRNA and  $\beta$  actin served as internal standard in cultured rat hippocampal neurons before and after exposure to  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   
M. PCR marker (100 bp ladder) ; A. Control ; B.  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  . I. Kv1.4 (501 bp) ; II. Kv4.2 (310 bp) ; III. Kv2.1 (364 bp) ; IV. Kv1.5 (457 bp) ; V. rSlo (783 bp) ; Upper pane.  $\beta$  actin (300 bp)

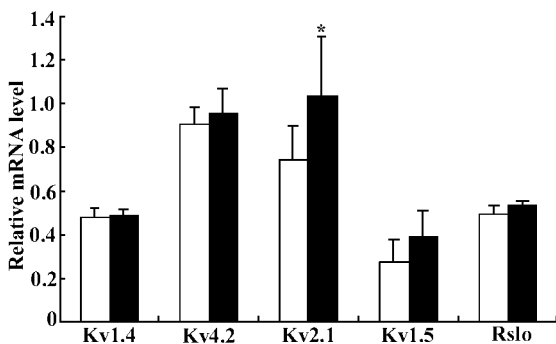


Figure 4 The change of Kv channel subunits relative mRNA levels (gene/ $\beta$  actin) in the cultured hippocampal neurons after exposure to  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $\square$  Control ;  $\blacksquare$   $\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  
\*  $P < 0.05$  vs control

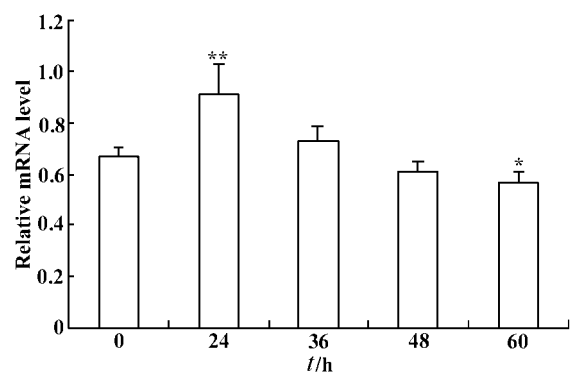


Figure 5 Time course of Kv2.1 channel relative mRNA levels (gene/ $\beta$  actin) change in the cultured hippocampal neurons after exposure to  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control

## 讨 论

钾离子通道与神经元的种类、放电、兴奋性及信号传导密切相关。因此,从 mRNA 水平研究脑内特定区域内通道亚单位的表达情况及病理状态下表达的变化,对于阐述通道亚单位在特定脑区内的生理和病理功能具有重要意义。

本实验证实,在培养的大鼠海马神经元上,延迟整流钾通道(Kv2.1 和 Kv1.5),瞬间外向(A型)钾通道(Kv1.4 和 Kv4.2)及钙激活的大电导钾通道(rSlo)均有不同程度的表达,以 Kv2.1, Kv4.2, Kv1.4, rSlo 的表达较为丰富,这与文献<sup>[8,9]</sup>报道基本一致。

本研究发现, $\beta$ -AP<sub>25-35</sub>可明显上调 Kv2.1 mRNA 的表达水平。这与我们最近发现  $\beta$ -AP<sub>25-35</sub>可选择性增加海马神经元细胞上延迟整流钾电流( $I_K$ )的作用相一致。这表明, $\beta$ -AP<sub>25-35</sub>上调  $I_K$  电流的作用很可能是由 Kv2.1 的 mRNA 和蛋白质表达增加引起的。36 h 后,Kv2.1 mRNA 表达降低,可能与神经元存活率下降有关。本实验中由于 Kv1.5 在正常培养海马神经元上的表达相对较弱, $\beta$ -AP<sub>25-35</sub>作用后虽有上调趋势,但无统计学差异,原因尚待进一步研究。

Kv2.1 钾通道在哺乳动物大脑内的神经元上高表达,它已被认为是脑内神经元活性的主要决定因素。研究表明 Kv2.1 在海马神经元上表达也最为广泛,是决定延迟整流钾电流的主要成分,它产生慢失活外向电流,这在决定大鼠大脑神经元放电作用中起着重要作用<sup>[10]</sup>。Yu 等<sup>[5,11,12]</sup>证实无血清培养,星形孢菌素及  $\beta$ -AP 等所造成的皮层神经元,SN56 细胞株的凋亡均选择性地增强延迟整流钾( $I_K$ )电流;另外在皮层星型胶质细胞上, $\beta$ -AP 也同样可引起  $I_K$  的增加<sup>[11]</sup>;  $\beta$ -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<sup>[14]</sup>。目前越来越多的证据表明:通过电压依赖性钾通道引起钾的大量外流可能是一些中枢神经程序化死亡的重要环节。并可能参与老年化过程,甚至 AD 的神经退行性病变。

通过阻断 Kv 通道,从而导致膜去极化并且增加神经递质释放,这些均在一定程度上增加神经元的兴奋性,有利于改变痴呆症状,减少神经元的凋亡和退行性改变。最近发现一些非甾体类抗炎药物在治疗 AD 的同时,也表现出抑制 Kv 通道的作用,对 Kv2.1 通道有明显的抑制作用<sup>[15]</sup>。因此我们推测,Kv 通道尤其是 Kv2.1 通道可能是治疗 AD 的新靶

## 点。

## REFERENCES:

- [1] Patrick CM, Leonard NB, Kimberly SF. Neurotoxicity of human amylin in rat primary hippocampal cultures: similarity to Alzheimer's disease amyloid  $\beta$  neurotoxicity [J]. *J Neurochem*, 1993, **61**(6): 2330 - 2333 .
- [2] Hille B. Potassium and chloride channels [A]. Mille B. *Ionic Channels of Excitable Membrances* [M]. Sunderland: Sinauer, 1992. 115 - 139 .
- [3] 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 .
- [4] Jin HW, Wang XL. Effects of chronic exposure to beta-amyloid peptide<sub>25-35</sub> on voltage-gated potassium outward current in cultured rat hippocampal neurons [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, **36**(12): 898 - 901 .
- [5] Yu SP, Farhangrazi ZS, Ying HS, et al. Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death [J]. *Neurobiol Dis*, 1998, **5**(2): 81 - 88 .
- [6] 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 .
- [7] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill [J]. *J Immunol Methods*, 1989, **119**(2): 203 - 210 .
- [8] Miletic-Savatic M, Lenn NJ, Trimmer JS. Differential spatiotemporal expression of  $K^+$  channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing *in situ* and *in vitro* [J]. *J Neurosci*, 1995, **15**(5): 3840 - 3851 .
- [9] Ha TS, Jeong SY, Cho SW, et al. Functional characteristics of two BKca channel variants differentially expression in rat brain tissues [J]. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(3): 910 - 918 .
- [10] Murakoshi H, Trimmer JS. Identification of the Kv2.1 K channel as a major component of delayed rectifier K current in rat hippocampal neurons [J]. *J Neurosci*, 1999, **19**(5): 1728 - 1735 .
- [11] 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 .
- [12] Colom LV, Diaz ME, Beers DR, et al. Role of potassium channels in amyloid-induced cell death [J]. *J Neurochem*, 1998, **70**(5): 1925 - 1934 .
- [13] Jalonen TO, Charniga CJ, Wielt DB.  $\beta$  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 .
- [14] Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, et al. Activation of  $K^+$  channels and suppression of neuronal activity by secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein [J]. *Nature*, 1996, **379**(4): 74 - 78 .

[15] Wang Q, Lee YT. Inhibition of hKv2.1, a major human neuronal voltage-gated  $K^+$  channel, by meclofenamic acid

[J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 378(3) :349 - 356.

## EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO BETA AMYLOID PEPTIDE<sub>25-35</sub> ON THE mRNA EXPRESSIONS OF VOLTAGE GATED OUTWARD POTASSIUM CHANNEL SUBUNITS IN CULTURED RAT HIPPOCAMPAL NEURONS

JIN Hong-wei, ZHANG 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 mRNA expression changes of voltage-gated outward potassium channel subtypes in cultured rat hippocampal neurons after chronic exposure to  $\beta$  amyloid peptide<sub>25-35</sub> ( $\beta$  AP<sub>25-35</sub>). **METHODS** mRNA expression was detected by RT-PCR, comparative expression levels were determined by imaging densitometer. **RESULTS** Delayed rectifying (Kv2.1, Kv1.5), transient outward (Kv1.4, Kv4.2) and large conductance calcium-activated (rSlo) potassium channel mRNA were expressed in cultured rat hippocampal. In the presence of  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h, the relative expression level of Kv2.1 was significantly increased ( $n=3$ ,  $P<0.05$ ); the other subtypes were not changed obviously ( $n=3$ ,  $P>0.05$ ). The increase of Kv2.1 mRNA mainly happened between 24 and 36 h after exposure to  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>. After exposure to  $\beta$  AP<sub>25-35</sub> for 60 h, Kv2.1 mRNA decreased significantly ( $n=3$ ,  $P<0.01$ ). **CONCLUSION** The upregulation of Kv2.1 on transcription levels may be involved in the enhancement of delayed rectifying outward potassium ( $I_K$ ) current induced by  $\beta$  AP<sub>25-35</sub>.

**KEY WORDS:** RT-PCR; beta amyloid peptide<sub>25-35</sub>; voltage-gated outward potassium channel; hippocampal neuron