

β -淀粉样肽₂₅₋₃₅致记忆障碍大鼠中枢双孔钾通道亚型 mRNA 表达的改变

潘雅萍, 徐向华, 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 研究聚集态 β -淀粉样肽₂₅₋₃₅ (β -AP₂₅₋₃₅) 致记忆障碍大鼠模型中枢双孔钾通道亚型 mRNA 表达的变化。方法 Morris 水迷宫实验检验大鼠空间学习记忆能力, 用 RT-PCR 方法检测大脑皮层和海马中 3 种双孔钾通道 TREK-1, TREK-2 和 TRAAK mRNA 的表达。结果 在 Morris 水迷宫实验中, β -AP₂₅₋₃₅ 注射组大鼠 d 1, d 2 和 d 4 的潜伏期均比对照组显著延长。 β -AP₂₅₋₃₅ 注射组大鼠大脑海马中 TREK-1, TREK-2 和 TRAAK mRNA 的表达比对照组明显升高; 而在皮层中的表达变化不显著。结论 侧脑室注射聚集态 β -AP₂₅₋₃₅ 致大鼠学习记忆障碍的同时可诱发中枢双孔钾通道亚型的表达改变。

关键词: β -淀粉样肽; 双孔钾通道; 逆转录聚合酶链式反应

中图分类号: R965; Q344.13

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2003)10 - 0721 - 04

mRNA expression alteration of two pore potassium channels in the brain of β -amyloid peptide₂₅₋₃₅-induced memory impaired rats

PAN Ya-ping, XU Xiang-hua, WANG Xiao-liang*

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

Abstract: **Aim** To study mRNA expression alteration of two pore potassium channels in the brain of β -amyloid peptide₂₅₋₃₅ (β -AP₂₅₋₃₅)-induced memory impaired rats. **Methods** Memory impairments induced in rats by single icv injection of β -AP₂₅₋₃₅ ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $5 \mu\text{L}$ were assessed in the Morris water maze test. The mRNA expression levels of three two pore potassium channels TREK-1, TREK-2 and TRAAK were detected in rat cerebral cortex and hippocampus by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** In the Morris water maze test, the escape latencies of the β -AP₂₅₋₃₅-treated rats were longer than those of the control group in 1st, 2nd and 4th training day, suggesting that the memory of β -AP₂₅₋₃₅-treated rats was obviously impaired. Compared with the control group, the mRNA levels of TREK-1, TREK-2 and TRAAK in the hippocampus of the β -AP₂₅₋₃₅-treated rats were increased by 40.0%, 27.9% and 18.9%, respectively; while no significant change of TREK-1, TREK-2 and TRAAK mRNA levels was observed in the cortex. **Conclusion** The mRNA expression levels of two pore potassium channels were increased significantly in the brain of β -AP₂₅₋₃₅-induced memory impaired rats.

Key words: β -amyloid peptide; two pore potassium channel; RT-PCR

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经系统退行性疾病, 其确切病因目前还不清楚, β -

淀粉样肽 (β -amyloid peptide, β -AP) 的增加已被广泛接受为中枢病因性过程。 β -AP 作用最为关键的部分是位于第 25 ~ 35 位的氨基酸残基, 它有在体内或体外聚合为淀粉样纤维的能力, 当它以 β 折叠结构的聚集态存在时, 可对细胞发生神经毒性作用^[1]。

钾通道是目前已知亚型最多的一类细胞扭离子

收稿日期: 2002-10-11.

基金项目: 国家“973 计划”项目资助 (G1998051106).

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63165193, Fax: 86 - 10 - 63017757,

E-mail: wangxl @imm.ac.cn

通道,不同的通道亚型对细胞功能的影响不同^[2]。中枢神经系统钾离子通道与学习记忆关系密切,在神经元细胞膜静息电位的形成、动作电位的产生和信息传递过程中发挥重要作用,与神经元的自律性、神经冲动发放的频率、神经递质的释放等密切相关,其功能失调可能导致记忆障碍^[3]。双孔钾通道是一类具有4个跨膜片段和2个孔道结构域的钾通道家族,主要编码背景钾电流,在中枢有相对特异和高水平的表达^[4],其活性受到细胞内外酸碱度、花生四烯酸、挥发性麻醉剂等条件的调控,具有重要的生理、病理和药理学意义,可能与维持神经元静息膜电位稳定、体温调节、脑缺血缺氧保护以及中枢麻醉等功能密切相关^[5]。本文用大鼠一次性侧脑室注入聚集态 β -AP₂₅₋₃₅ 制备记忆障碍模型,用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法研究 β -AP₂₅₋₃₅ 损伤对几种中枢双孔钾通道亚型(TREK-1, TREK-2 和 TRAAK) mRNA 表达的影响。

材料与方 法

动物 体重 220 ~ 250 g 健康 δ Sprague-Dawley 大鼠,由中国医学科学院动物研究中心提供。

试剂 β -AP₂₅₋₃₅ 购于 Sigma 公司,溶于灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)中,终浓度为 2 mmol·L⁻¹,密封后置 37 °C 培养箱中 96 h。DNA marker 100 bp 购自 MBI; DEPC 为 Sigma 产品;Taq DNA 聚合酶、dNTPs、琼脂糖(agarose)、RNasin、M-MLV 逆转录酶、寡聚六核苷酸随机引物购自 Promega 公司。TRIzol 由 Gibco 公司提供。PCR 特异引物由上海 Sangon 公司合成,其他均为国产分析纯试剂。

仪器 Morris 水迷宫由本所提供;UV-260 型紫外分光光度计购自日本 SHIMADZU 公司;Gene Amp 2400 型 PCR 仪购自美国 PERKIN ELMER 公司;电泳凝胶定量分析系统 EDAS290 购自美国柯达公司。

动物模型的建立^[6] 将大鼠随机分成 2 组,分别为磷酸盐缓冲液(PBS)空白溶剂对照组和 β -AP₂₅₋₃₅ 侧脑室注入组,每组 10 只。PBS 和 β -AP₂₅₋₃₅ 的注射体积均为 5 μ L。所有动物均采用同侧脑室注射。

Morris 水迷宫实验^[6] 大鼠术后 d 8 开始进行水迷宫实验,每只动物连续训练 4 d,每天训练 2 次,间隔 15 min,每次采用不同的入水点,每次训练 3 min。动物找到并爬到站台后让其停留 20 s,若入水后 3 min 内未能找到或爬上站台,则将其放置于站台上站立 20 s,之后将动物从站台上取下休息。结果以大鼠寻找站台的潜伏期及所采取的策略表示。

组织总 RNA 的提取 水迷宫实验结束即手术后 d 12,大鼠断头后迅速取出大脑皮层、海马,置于液氮中保存,用 TRIzol 按一步法提取总 RNA。所提的总 RNA 在 A₂₆₀/A₂₈₀ 大于 1.8,且 EB 染色后 28 s 和 18 s 两条带清晰可见呈 2:1,并无基因组污染时可用。

RT-PCR 反应 调整各管总 RNA 量一致,用随机引物进行逆转录,方法参照 M-MLV 逆转录酶说明书。取逆转录产物进行扩增反应,反应条件均为:起始变性 94 °C 4 min,循环时 94 °C 1 min,57 °C 45 s,72 °C 1 min,共进行 30 轮循环,最后延伸 72 °C 8 min。将 TREK-1, TREK-2, TRAAK 或 β -actin(内对照)等量的 PCR 扩增产物(10 ~ 20 μ L)上样,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳辨认、拍照。特异引物的序列见表 1。

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR

Gene	Gene bank No.		Primer sequence (5' to 3')	Product length/ bp
TREK-1	NM-053804	Sense	ACAGAACTTCATAGCCCAGCAT	673
		Antisense	TCCCACCTCTCCTTCGTCT	
TREK-2	NM-023096	Sense	CGTCCATCGTCCCAAATT	57
		Antisense	TTGGAGGAGTTTCTACCG	
TRAAK	AF302842	Sense	AACTGGTTGCGAGCGGTGTC	378
		Antisense	GGGCTTCTTCGTTGGTTGG	
β -Actin	NM-031144	Sense	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	540
		Antisense	CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTCT	

bp: Base pair

数据统计 通过光密度扫描仪(Kodak Digital Science 1 D v3.0)检测并计算出各组中的钾通道电泳条带与内对照 β -actin 条带(灰度为 100%)的表达

量象素灰度的比值,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验进行统计。

结果

1 侧脑室注射 β AP₂₅₋₃₅ 对大鼠空间学习记忆的影响

大鼠侧脑室注射 β AP₂₅₋₃₅ 可以诱导学习记忆功能障碍模型。在 Morris 水迷宫的实验中, 两组大鼠的运动速度组间无明显差异, 假手术组为 $(18.2 \pm 2.5) \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$; β AP₂₅₋₃₅ 注射组为 $(20.2 \pm 1.9) \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。随着训练天数的增加, 各实验组动物搜寻站台的潜伏期均不断缩短, 但是 β AP₂₅₋₃₅ 注射组与空白对照组相比, 在 d 1, d 2 和 d 4 的潜伏期均显著延长 ($P < 0.05$) (图 1), 4 d 平均潜伏期从 $(36 \pm 5) \text{ s}$ 延长至 $(68 \pm 8) \text{ s}$ ($P < 0.01$)。Morris 水迷宫实验证实, 侧脑室注射 β AP₂₅₋₃₅ 可以引起大鼠空间学习记忆障碍。

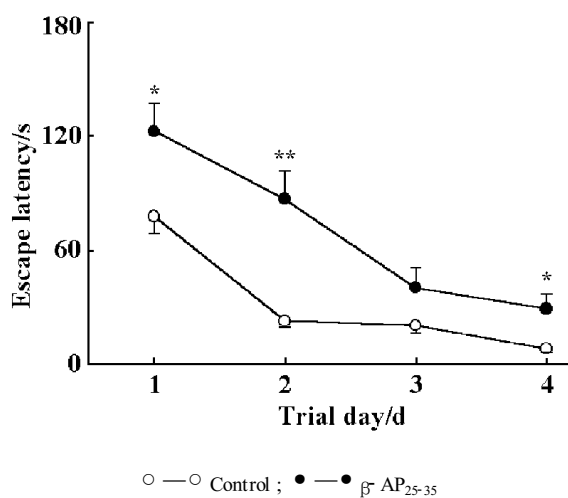


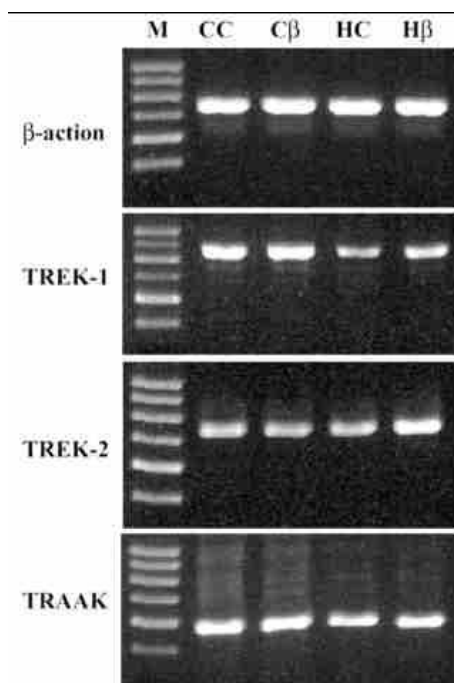
Figure 1 Effect of icv injection of β amyloid peptide₂₅₋₃₅ (β AP₂₅₋₃₅) on Morris water maze in rats. Mean latencies to escape from water onto the hidden platform are shown. Each rat was subjected to two trials per day for 4 consecutive days. $n = 10$ for each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs phosphate-buffered saline controls

2 双孔钾通道亚型在大鼠皮层中的表达

大鼠侧脑室注射 β AP₂₅₋₃₅ 11 d 后取大鼠皮层组织, 提取总 RNA, 采用 RT-PCR 检测中枢双孔钾通道亚型的表达改变。发现与对照组相比, β AP₂₅₋₃₅ 注射组 TREK-1, TREK-2 和 TRAAK mRNA 表达的变化均不显著 (图 2, 3)。

3 双孔钾通道亚型在大鼠海马中的表达

大鼠侧脑室注射 β AP₂₅₋₃₅ 11 d 后取大鼠海马组织, 提取总 RNA, 采用 RT-PCR 检测中枢双孔钾通道亚型的表达改变。发现 β AP₂₅₋₃₅ 注射组 TREK-1 的表达比对照组升高 40.0% ($P < 0.05$), TREK-2 的表达升高 27.9% ($P < 0.01$), TRAAK 的表达升高 18.9% ($P < 0.05$) (图 2, 3)。



M: DNA marker; CC, C β , HC, H β : Cortex and hippocampus from control group and β AP₂₅₋₃₅ group

Figure 2 RT-PCR amplification of two pore potassium channels mRNA and β actin from rat cerebral cortex and hippocampus after icv injection of β AP₂₅₋₃₅

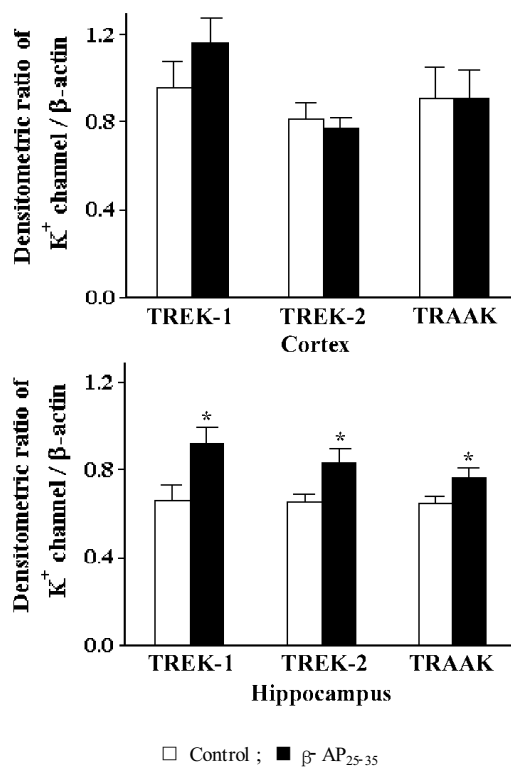


Figure 3 Comparative mRNA expression levels of two pore potassium channels in rat cerebral cortex and hippocampus. mRNA levels of two pore potassium channels were quantified by densitometric scanning and normalized to β actin. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control group

讨论

在 Morris 水迷宫实验中, 两组大鼠的运动速度间无明显差异, 说明聚集态 β -AP₂₅₋₃₅ 侧脑室注射不影响大鼠的运动功能, 同时也说明将搜寻平台的潜伏期作为衡量大鼠空间学习记忆能力的指标是可靠的。实验表明, 一次性注射聚集态 β -AP₂₅₋₃₅ 造成了模型大鼠空间学习记忆障碍, 这与 Yamaguchi 等^[7]的报道相一致。

钾通道在 β -AP 相关的老年性痴呆发病中的作用报道较少。钾离子通道的亚型很多, 本研究组曾进行研究并报道电压依赖和内向整流钾通道某些亚型在 β -AP 引起的痴呆中的改变^[6], 而双孔钾通道的变化国内外尚未见报道。双孔钾通道亚型 TREK-1, TREK-2 和 TRAAK 通道具有一个非常独特的性质, 就是可以被多不饱和脂肪酸盐和机械张力所激活。不饱和脂肪酸盐(如油酸盐、亚油酸盐、花生四烯酸盐等)都可以激活这些通道, 而饱和脂肪酸盐(如棕榈酸盐、硬脂酸盐等)对它们则没有影响^[8]。此外, 作用于细胞膜的机械张力(如剪切张力、细胞膨胀和负压等)也可以有效地激活 TREK 和 TRAAK 通道^[9,10]。这些特性提示 TREK-1, TREK-2 和 TRAAK 通道有可能在病理状态下具有重要的保护作用。

由于大脑皮层和海马在学习和记忆过程中有非常重要的作用, 本实验着重研究了双孔钾通道亚型在 β -AP₂₅₋₃₅ 注射引起的学习和记忆障碍大鼠大脑皮层和海马中的 mRNA 表达情况。研究结果表明双孔钾通道亚型 TREK-1, TREK-2 和 TRAAK 通道在 β -AP₂₅₋₃₅ 注射组大鼠皮层中的表达无明显改变, 而它们在海马中的表达均有显著升高。TREK-1, TREK-2 和 TRAAK 通道的开放增加可以导致神经元的超极化, 抑制电压依赖性钙离子通道以及 NMDA 受体相关的钙通道, 减少细胞外 Ca^{2+} 的内流。通过降低细胞内 Ca^{2+} 蓄积, 可以有效地保护神经元细胞的存活^[11]。因此, 推测这种双孔钾通道亚型 TREK-1, TREK-2 和 TRAAK 通道表达的升高可能是 β -AP₂₅₋₃₅ 损伤神经元细胞后的一种保护性调节机制。由于在生理状态下双孔钾通道的开放程度相对较低, 而在病理条件下被大量激活, 这种背景钾电流的少量增加就可以通过调节静息膜电位而更有效地抑制其他一些离子通道的活性, 产生细胞保护作用。与其他离子通道亚型不同, TREK-1, TREK-2 和 TRAAK 在脑

内都有大量表达, 而在心脏中则没有; TREK-1 在脊髓, TRAAK 在小脑中有相对特异和高水平的表达^[4]。这些双孔钾通道亚型在中枢神经系统中的相对特异性分布使其在疾病治疗中的作用更具特异性。事实上, 临床上 β -AP 造成的病理性损伤是一个长期慢性的过程。淀粉样肽影响双孔钾通道亚型表达的确切作用机制以及对双孔钾通道亚型蛋白功能的影响还有待进一步研究。

References:

- [1] Hirakura Y, Satoh Y, Hirashima N, *et al.* Membrane perturbation by the neurotoxic Alzheimer amyloid fragment beta 25-35 requires aggregation and beta-sheet formation [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, **46**(4): 787 - 794.
- [2] Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, *et al.* Molecular diversity of K^+ channels [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, **868**: 233 - 285.
- [3] Alkon DL. Ionic conductance determinants of synaptic memory nets and their implications for Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci Res*, 1999, **58**(1): 24 - 32.
- [4] Mødhurst AD, Rennie G, Chapman CG, *et al.* Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and eriphery [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, **86**(1 - 2): 101 - 114.
- [5] Pan YP, Xu XH, Wang XL. Proceedings of the two-pore domain K^+ channel [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2002, **18**(4): 369 - 373.
- [6] Tong XY, Wang XL. The expression levels of GIRK1 and IRK1 in memory deficit rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2001, **36**(7): 488 - 492.
- [7] Yamaguchi Y, Kawashima S. Effects of amyloid- β (25-35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, **412**(3): 265 - 272.
- [8] Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, *et al.* Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors [J]. *EMBO J*, 2000, **19**(8): 1784 - 1793.
- [9] Maingret F, Fosset M, Lesage F, *et al.* TRAAK is a mammalian neuronal mechanogated K^+ channel [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(3): 1381 - 1387.
- [10] Maingret F, Patel AJ, Lesage F, *et al.* Mechanor or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(38): 26691 - 26696.
- [11] Maingret F, Patel AJ, Lesage F, *et al.* Lysophospholipids open the two pore domain mechanogated K^+ channels TREK-1 and TRAAK [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(14): 10128 - 10133.