

β -淀粉样肽对海马 CA1 区神经元的 短暂性外向 K^+ 电流的影响^①

许长庆¹ 钱采韵¹ 张宗明² 吴才宏³ 周培爱³ 梁秀龄¹

(1 中山医科大学附属第一医院神经科; 广州, 510080 2 北京医科大学附属第三医院外科
3 北京大学生物膜与膜生物工程国家开放实验室)

摘要 目的: 为了在离子通道水平探讨 β -淀粉样肽(β -AP)在 Alzheimer 病中的作用。方法: 用 7~21 d 大鼠, 以链霉蛋白酶 E 酶解加吸管吹打法制备海马 CA1 区神经元; 利用全细胞膜片钳技术, 观察了 β -AP_{25~35}对急性分离海马 CA1 区锥体细胞的短暂性 K^+ 电流的影响。结果: β -AP_{25~35}对短暂性 K^+ 电流有明显抑制作用, 且呈明显浓度依赖性、时间依赖性和部分电压依赖性。结论: β -AP 对 K^+ 通道的影响在 Alzheimer 病的发生机制中具有重要作用。

关键词 淀粉样 β 蛋白; 海马; 神经元; 电生理学

中图分类号 R 338.8

EFFECTS OF β -AMYLOID PEPTIDE ON TRANSIENT OUTWARD POTASSIUM CURRENT OF HIPPOCAMPAL NEURONS IN CA1 SECTOR IN RATS

Xu Changqing¹ Qian Caiyun¹ Zhang Zongming²
Wu Caihong³ Zhou Pei'ai³ Liang Xiuling¹

(1 Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080 2 Department of Surgery, Third Affiliated Hospital of Beijing Medical University
3 National Laboratory of Biomembrane and Membrane Bioengineering, Peking University)

Abstract Objective: To explore the mechanism of β -amyloid peptide (β -AP) in Alzheimer's Disease (AD) at ionic channel level. **Methods:** Hippocampal CA1 neurons of 7~21 days rats were acutely dissociated and the effects of β -AP on transient outward potassium current were observed by a whole-cell recording patch clamp technique. **Results:** β -AP can significantly block transient potassium current in dose-dependent, time-dependent and partly voltage-dependent manners. **Conclusion:** β -AP might decrease the membrane conductance of K^+ channels in hippocampal neurons, which might play an important role in the pathophysiological mechanism of Alzheimer's disease.

Subject headings amyloid beta-protein; hippocampus; neurons; electrophysiology

β -淀粉样肽(β -amyloid peptide, β -AP)是 Alzheimer 病人(Alzheimer's disease, AD)脑中老年斑和血管淀粉样变的主要成分, 1984 年^[1]首次从 Alzheimer 脑中分离出来, 后在 AD 病人血和脑脊液中亦分离纯化出此物质, 并且认为 β -AP 在

Alzheimer 病的发生和发展中起着重要作用。 β -AP 是由 39~43 个氨基酸残基组成的多肽, 有明显的神经毒性作用, 其主要神经毒性作用位于 β -AP 的氨基酸序列 25~35^[2]。Landifield 等^[3]首先报道了 K^+ 通道参与了年龄有关的认知功能损伤, 并且认

为 K^+ 通道在学习和记忆过程中起重要作用, 而 Alzheimer 病的主要临床表现是记忆力和认知功能下降。海马与学习记忆有关。 β -AP 在中枢神经系统中的作用近年受到广泛重视, 其离子作用机制, 尚不清楚。目前急性分离大鼠海马 CA1 区神经元的技术已经成熟, 且分离出的海马 CA1 区神经元具有正常的电生理学特性^[4]。本实验利用膜片钳全细胞记录技术, 观察了 β -AP_{25~35} 对急性分离的海马 CA1 神经元短暂性外向 K^+ 电流的影响, 探讨 β -AP 在离子通道水平对中枢神经元 K^+ 通道的影响, 以期了解 β -AP 在 AD 发生和发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠, 鼠龄 7~21 d, 体重 15~23 g, 雌雄不拘, 由中科院动物研究所动物室提供。链霉菌蛋白酶 E (pronase E)、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES)、氯化四乙胺 (TEA-Cl), 4-氨基吡啶 (4-AP), 乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸 (EGTA), Mg-ATP, 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), β -AP_{25~35}, 均为 Sigma 公司产品。河豚毒素 (TTX, 北京防化研究院四二室)。其余为国产分析试剂。孵育液 (mmol/L): NaCl 124, KCl 5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2.4, NaHCO₃ 26, glucose 10, 用 5%CO₂+95%O₂ 调 pH 至 7.4。无 Ca²⁺EGTA 孵育液: 将孵育液中的 CaCl₂ 换成 EGTA 2 mmol/L, 余成分相同。标准细胞外液 (mmol/L): NaCl 150, KCl 5, MgCl₂ 1.1, CaCl₂ 2.6, HEPES 10, glucose 10, 用 Tris-HCl 调 pH 至 7.4。电极内液 (mmol/L), KCl 65, KOH 5, KF 8.0, HEPE 10, EGTA 10, Mg-ATP 2, 用 Tris-HCl 调 pH 至 7.2。

1.2 海马 CA1 区神经元的急性分离

大鼠断头取脑, 置孵育液 (0~4 °C) 中 10~20 s, 分出海马, 手工切成约 500 μ m 厚的脑片, 置于 32 °C 孵育液内, 连续通以 5%CO₂+95%O₂ 混合气。2 h 后换为含 1.5 mmol/L 链蛋白酶 E 的孵育液 (32 °C), 40 min 后用无钙孵育液和含钙孵育液各洗 3 次。然后分出 CA1 区, 移入盛有氧饱和标准细胞外液的离心管内, 先后用 400 μ m 和 150 μ m 左右的 Pasteur 吸管轻轻吹打, 静止约 2 min, 取口部细胞悬液, 加入含标准细胞外液的培养皿内, 约 15 min 后细胞贴壁, 即刻行全细胞膜片钳记

录。

1.3 全细胞膜片钳记录

玻璃微电极拉制后尖端直径为 1~2 μ m, 充满电极内液后阻抗为 2~5 M Ω , 记录在 20~24 °C 的室温下进行, 记录前向细胞外液内加入 1 μ mol/L TTX 0.2 mmol/L CdCl₂, 实验用 EPC-7 (List, Germany) 膜片钳放大器, 当电极尖端与细胞膜之间形成高阻封接 (> 5 G Ω) 后, 负压破膜, 使电极内液与细胞内液相通, 调节放大器的电容—慢控制 (C-Slow) 和电导—串联控制 (G-series) 来抵消瞬态电流。电流或电压信号经放大器放大后通过接口 Labmaster TL-1 (Axon Instruments, USA) 与 1 台 386 微机相连, 经 3 kHz 滤波。采样频率为 10~50 kHz。保持电位 (holding potential, HP) 及钳制测试脉冲顺序的设定、信号采集与储存、结果分析均借助微机用 pCLAMP 5.5.1 软件完成。

1.4 加药方式

先用二甲亚砜 (DMSO) 将 β -AP_{25~35} 配成 1 mmol/L 储存液, 放在 -20 °C 冰箱备用, 用前再用标准细胞外液配成不同浓度。在全细胞记录条件下, 用快速加药装置加于神经元周围, 加药管内径为 220 μ m, 管口距细胞约 100 μ m。

2 结果

2.1 海马 CA1 区神经元的短暂性 K^+ 电流的分离

短暂性外向 (快速失活) K^+ 电流 (A 电流, I_A) 的分离, 利用 pCLAMP 5.5.1 软件, 通过程序相减获得, 如图 1。图 1A 表示在保持电压 -100 mV 下给予去极化刺激从 -80 mV 到 +40 mV 记录到的电流变化, 刺激阶梯为 10 mV。在超极化保持电压下 (-100 mV), 每个去极化刺激间隔 3 s 足以使钾通道的短暂性成分完全激活。此程序下可记录到钾电流的两种成分: 1 个是快速激活和失活的 A 电流; 另 1 个是具有慢激活, 且几乎不失活的持续的外向 K^+ 电流成分。图 1B 表示在保持电压在 -60 mV 下给予从 -80 mV 到 +40 mV 去极化刺激记录到的电流变化, 刺激阶梯为 10 mV, 可记录出 1 种缓慢激活且几乎不失活的持续外向 K^+ 电流。图 1C 表示图 1A 减去图 1B 剩下只有短暂性外向 K^+ 电流成分。图 1D 示短暂性 K^+ 电流的电流-电压 ($I-V$) 曲线。A 电流去极化达 -50 mV 以被激活的 $I-V$ 曲线。图 1E 示 A 电流的失活曲

线。图1F示A电流的失活I-V曲线。2 mmol/L 4-AP(4-氨基吡啶)或20 mmol/L TEA对A电流的影响见图2A、B。可见AB电流去极化-50 mV以上被激活, I-V曲线呈线性关系, 去极化到+

90 mV 电流值未达饱和(实验结果未列出), 能被2 mmol/L 4-AP 大部分阻断, 对TEA(20 mmol/L)不敏感。

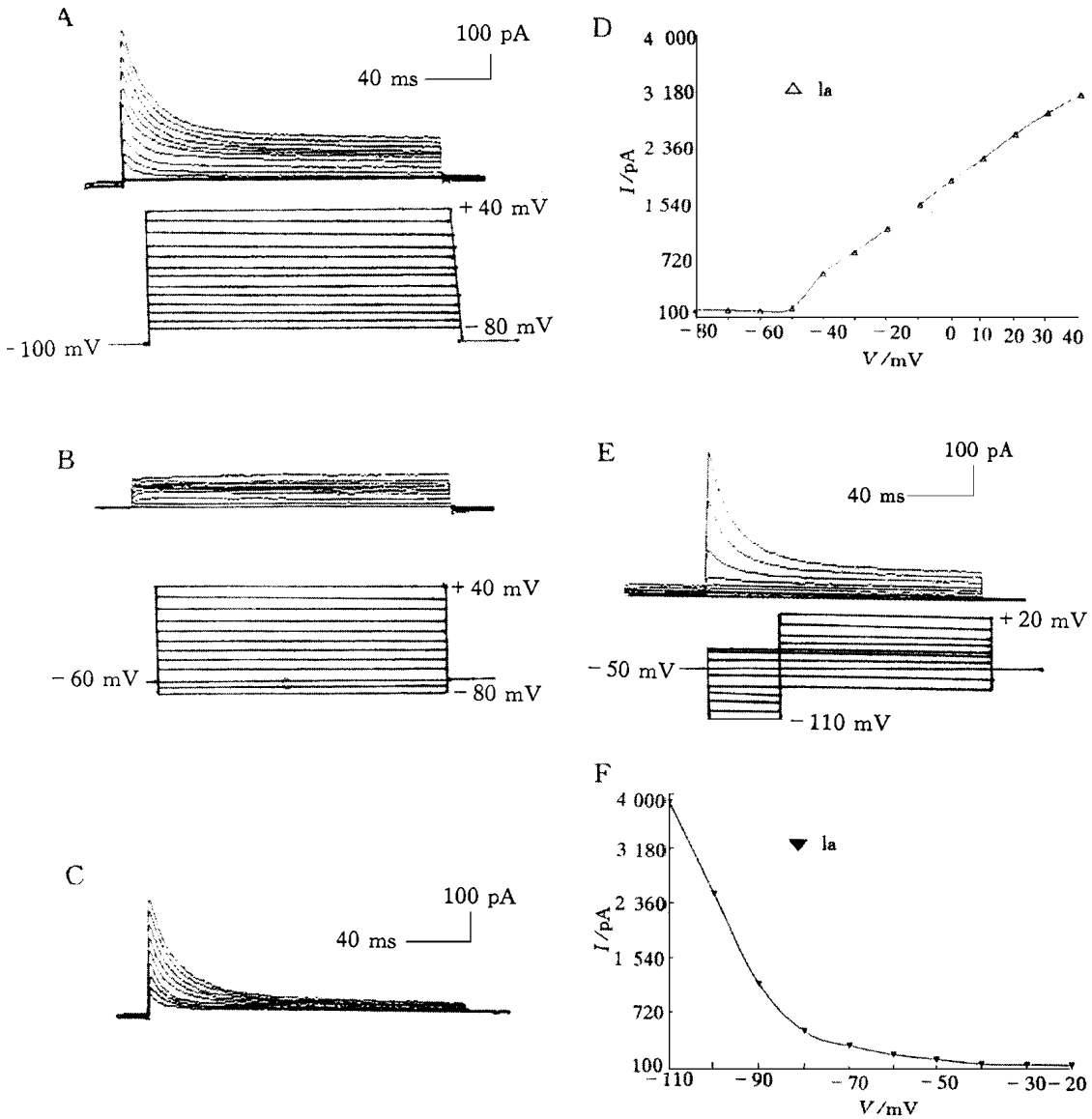


图1 短暂性K⁺电流 I_A 的分离及其特性。A: 短暂性K⁺电流和持续性K⁺电流的电流曲线。B: 持续性K⁺电流的电流曲线。C: 短暂性K⁺电流的分离, 通过A减去B的点点相减。D: I_A的I-V曲线。E: I_A的失活曲线。F: I_A失活的I-V曲线。

Fig. 1 The A-current (I_A) may be isolated by digital subtraction and the characteristic of I_A . A: The transient and sustained components of the outward K^+ current elicited at various depolarizing steps from holding potential of -100 mV. B: Sustained outward currents elicited from the holding potential of -60 mV. C: The A-current (I_A) was isolated by digital subtraction of currents in B from A. D: I-V curves were measured at the peak of the I_A . E: Depolarization inactivates the A-current. F: The I-V curves of A-current inactivation

2.2 β -AP₂₅₋₃₅对A电流(I_A)的影响

本研究用4种不同浓度(10 nmol/L; 100 nmol/L; 3.3 μ mol/L和10 μ mol/L)的 β -AP对

细胞进行灌流, 分别在灌流后2 min, 5 min和10 min时间点采样; 对照用不含 β -AP的等浓度DMSO的标准细胞外液对细胞灌流, 在与药液作用

相同的时间间隔采样。4 种不同浓度的 β -AP 在不同灌流时间内对 I_A 电流的 $I-V$ 曲线影响(如图 3,

以 $3.3 \mu\text{mol/L}$ β -AP 的影响为例)。由图可见, β -AP 对 I_A 的抑制作用具有时间依赖性。

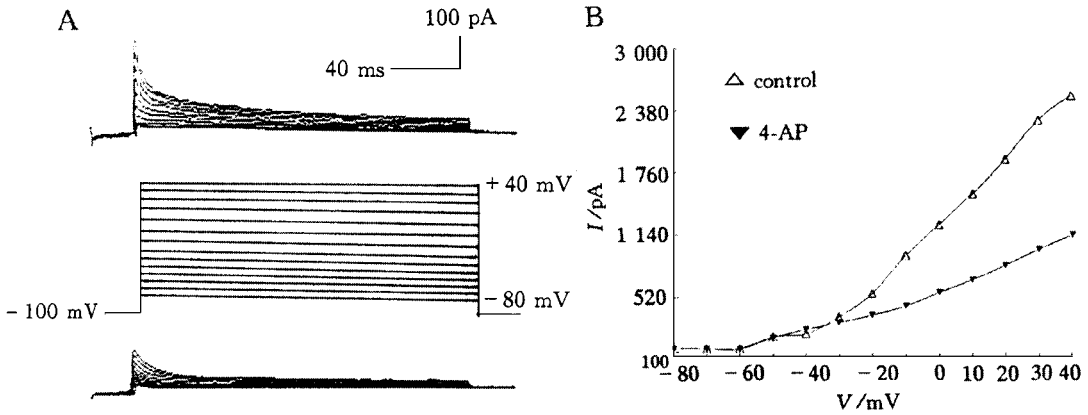


图 2 4-氨基吡啶对短暂性 K^+ 电流的影响。A: I_A 的电流曲线(上: 未用 2 mmol 4-氨基吡啶; 下: 用 2 mmol 4-氨基吡啶)。B: I_A 的 $I-V$ 曲线

Fig. 2 Effects of 4-AP on A current A: The current traces of the isolated I_A elicited by depolarizing pulses over the potential range of -80 mV to $+40 \text{ mV}$ from a holding potential -100 mV in the absence and presence of 4-AP. B: $I-V$ curves of I_A in absences and presences of 4-AP

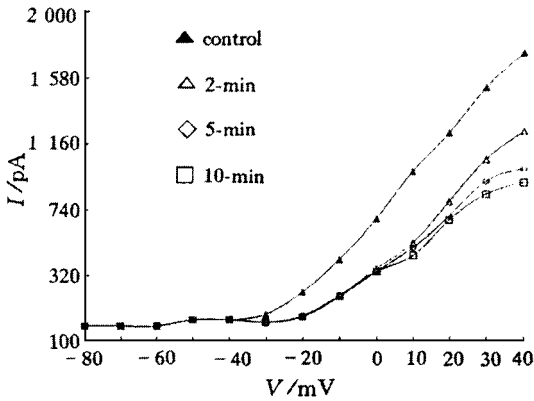


图 3 $3.3 \mu\text{mol/L}$ 的 $\beta\text{-AP}_{25\sim 35}$ 在不同时间条件下对短暂性 K^+ 电流的 $I-V$ 曲线的影响

Fig. 3 Effects of $3.3 \mu\text{mol/L}$ $\beta\text{-AP}_{25\sim 35}$ on $I-V$ curves of I_A at different times

不同浓度的 β -AP 对去极化到 $+20 \text{ mV}$ 和 $+40 \text{ mV}$ 的抑制作用见图 4。

由图 4 可见 β -AP 对 I_A 的抑制作用具有浓度依赖性, 但电压依赖性不显著。当去极化到 $+20 \text{ mV}$ 时, β -AP 灌流 5 min 时 50% 抑制浓度 $c(\text{IC}_{50}) =$

$4.71 \mu\text{mol/L}$; 去极化到 $+40 \text{ mV}$ 时, 50% 抑制浓度 $c(\text{IC}_{50}) = 3.47 \mu\text{mol/L}$ 。不同浓度的 β -AP 灌流 5 min 后 I_A 变化抑制见表 1。

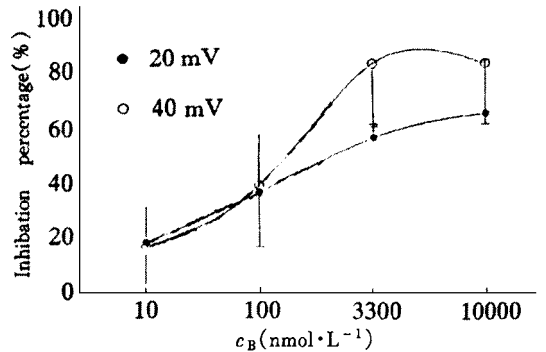


图 4 不同浓度的 $\beta\text{-AP}_{25\sim 35}$ 在给药后 5 min 时去极化到 $+20 \text{ mV}$ 和 $+40 \text{ mV}$ 对 I_A 抑制率的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of $\beta\text{-AP}_{25\sim 35}$ on inhibition percentage of I_A in depolarizing to $+20 \text{ mV}$ and $+40 \text{ mV}$ at 5 min

β -AP 对 A 电流的失活特性的影响, 可见 A-电流的失活不受 β -AP 影响, 仍在 -40 mV 下失活。

表 1 不同浓度的 β -AP 灌流 5 min 后 A 电流抑制率($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab 1 The inhibition rate of different concentration of β -AP on A-current at 5 min after the perfusion ($\bar{x} \pm s, \%$)

Concentrations	n	Depolarizing to +20 mV	Depolarizing to +40 mV
Contral group	6	2.93 \pm 2.14	4.67 \pm 3.55
10 nmol/L	5	18.04 \pm 12.25	16.45 \pm 12.93
100 nmol/L	6	35.48 \pm 20.37 ¹⁾	38.02 \pm 21.55 ¹⁾
3.3 μ mol/L	8	54.87 \pm 4.79 ²⁾	61.04 \pm 22.31 ^{2) 3)}
10 μ mol/L	7	63.80 \pm 18.85 ²⁾	81.43 \pm 21.54 ^{2) 3)}

1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ Compared with contral group (t Test);

3) $P < 0.05$ Compared with depolarizing to +20 mV (paired t Test)

3 讨 论

瞬时外向型钾电流(I_A)^[5]从超极化膜电位除极时激活,并以快速激活且快速失活为特点区别于其它类型钾电位,其另 1 特点是对 4-AP(4-氨基吡啶)极为敏感,2 mmol 4-AP 可绝大部分阻断之。本研究将膜电位钳制在 -100 mV 从而诱发出 1 种快速激活且快速失活的外向电流(如图 1),其激活电位、电压值,达到峰值时间(2~4 ms),完全失活电位的 -40 mV($n=20$)的特性,激活时间失活时间特性,符合 I_A 特点,应用 4-AP 可部分阻断之,对 TEA 不敏感。考虑分离出的该电流为 I_A 。 I_A 是动作电位复极化早期外向电流的主要成分,主要调节静息膜兴奋性,减慢去极化速度,延缓动作电位产生,并可使重复放电神经细胞呈现缓慢放电节律,有报道 I_A 受神经递质的调节^[6]。

本研究发现 β -AP 对 I_A 抑制作用具有浓度依赖性、时间依赖性。在 3.3 μ mol/L 和 10 μ mol/L 浓度时,去极化到 +40 mV 时 I_A 抑制百分率明显大于去极化到 +20 mV 抑制百分率。持续给予 β -AP 可引起海马 CA1 区神经元膜电导呈电压依赖性降低,表明 β -AP 能影响电压门控的离子通道的功能,且此影响是可逆的,停止加药后,短暂性 K^+ 电流的 $I-V$ 曲线可恢复到用药前水平。Halliwell 等^[7]报道 Dentrotoxin(从非洲毒蛇中提取 1 种肽)对海马 CA1 区锥体细胞的 I_A 有明显抑制作用,是由于这种肽的神经毒作用,所以我们推测 β -AP 对 I_A 的抑制作用与 β -AP 的神经毒性有关。 β -AP 能诱导培养神经元死亡,还有报道^[8] β -AP 能使培养的海马神经元和皮层神经元发生凋亡。因此 β -AP

的神经毒性作用,是否是首先作用 K^+ 通道,进一步引起细胞死亡(甚至凋亡)值得研究。

Rene^[9]报道 Alzheimer 病病人的成纤维母细胞上缺乏 113-PS(皮氏西姆) K^+ 通道,10 mmol/L β -AP 可诱导非 AD 成纤维母细胞上 113-PS K^+ 通道消失,由此推测 β -AP 改变了 K^+ 通道从而损伤了神经功能引起了 Alzheimer 病的学习记忆缺失。本研究发现 β -AP 不仅有浓度依赖性而且有时间依赖性抑制作用,表明 β -AP 对神经元 K^+ 通道的影响随时间延长逐渐加重,进一步解释 Alzheimer 病人临床表现认知能力丧失逐渐加重。Brorson 等^[10]报道 β -AP_{25~35} 能增强谷氨酸能神经元连接处的兴奋性活动,引起兴奋性电位,促进 Ca^{2+} 内流,引起细胞 Ca^{2+} 超载。由于 K^+ 通道的抑制而延长细胞去极化,可引起细胞内 Ca^{2+} 增加,导致 Ca^{2+} 超载,因此,本研究结果支持这个观点。

β -AP_{25~35} 降低短暂 K^+ 电流的可能机制: 1. β -AP 可逆性地结合关闭的通道,阻止它们开放; 2. β -AP 可逆性地结合开放的通道,增加它们的衰减率; 3. β -AP 不可逆地阻断开放的通道。本研究发现 β -AP 对 I_A 的激活时间特性和失活时间特性无明显影响,尽管 I_A 的峰高度随 β -AP 的增加而降低,但是峰位置未受影响。实验曲线的形态、峰位置、峰高度的浓度依赖性非常支持第 1 种机制的作用。

总之,本研究结果表明短暂性外向 K^+ 电流被成功地分离, β -AP_{25~35} 对 I_A 有抑制作用,且呈剂量依赖性、时间依赖性和部分电压依赖性;进一步表明 β -AP 在 AD 的发生和发展中起重要作用。

参 考 文 献

- 1 Glenner G G, Wong C W. Alzheimer's diseases: initial report of purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Comm*, 1984, 120: 885
- 2 Forloni G. β -amyloid neurotoxicity. *Funct Neurol*, 1993, 8: 211
- 3 Landfield P W, Piltner T A. Prolonged Ca^{2+} -dependent after hyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats. *Science*, 1984 226: 1089
- 4 张宗明, 吴才宏, 阳冬梅, 等. 海马 CA1 区神经元的急性分离及其电生理特性. *北京医科大学学报* 1997, 29(1): 5
- 5 Gerald O, Carrier. Whole-cell and perforated patch recordings of four distinct K^+ currents in acutely dispersed coeliac-superior mesenteric ganglia neurons of adult rats. *Brain Res* 1995, 701: 1

(下转第 26 页)

- morphism and its association with lung cancer and smoking. *Pharmacogenetics*, 1995, 5(4): 199
- 10 Rosvold E A, McGlynn K A, Lustbader E D. Redetection of a point mutation in NQO1 (DT-diaphorase) in a patient with colon cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87: 1802
(1997-07-19 收稿 1997-10-07 修回)

(上接第 17 页)

参 考 文 献

- 1 梁秀龄, 刘焯霖, 陈 嵘, 等. 肝豆状核变性的系列研究. *中山医科大学学报*, 1996, 17(3): 161
- 2 Bull P C, Thomas G R, Rommens J M, *et al.* The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet*, 1993, 5: 327
- 3 Tanzi R E, Petrukhin K, Chernov I, *et al.* The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genet*, 1993, 5: 344
- 4 Petrukhin K, Fischer S G, Pirastu M, *et al.* Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nature Genet*, 1993, 5: 338
- 5 Thomas G R, Forbes J R, Roberts E A, *et al.* The Wilson disease gene: Spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genet*, 1995a, 9: 210
- 6 Chuang L M, Wu H P, Jang M H, *et al.* High frequency of two mutations in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Taiwanese families with Wilson disease. *J Med Genet*, 1996, 33: 521
- 7 Knudson A G. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Nat Acad Sci*, 1971, 68: 820
- 8 Thomas G R, Roberts E A, Walshe J M, *et al.* Haplotypes and mutations in Wilson disease. *Am J Hum Genet*, 1995, 56: 1315
- 9 Guptan P K, Shao C, Zhu Y, *et al.* Loss of heterozygosity analysis in a human fibrosarcoma cell line. *Cytogenet Cell Genet*, 1997, 76: 214
- 10 Scheffer H, Kema I P, Kondo I, *et al.* Localization at a subband level of polymorphic 13q14 DNA probes for diagnosis of hereditary retinoblastoma and Wilson disease. *Hum Genet*, 1987, 77: 335
(1997-10-31 收稿 1997-12-01 修回)
- 6 Aghajanian G K. Modulation of a transient outward current in serotonergic neurons by alpha-adrenoceptors. *Nature (London)*, 1985, 315: 501
- 7 Halliwell J V, Othman I B, Pelchem-Matteus A, *et al.* Central actions of dendrotoxin: selective reduction of a transient K conductance in hippocampus and binding to localized receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 493
- 8 Loo D T, Copani A, Pike C J, *et al.* Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7951
- 9 Rene E, Etsuro I, Christopher S K, *et al.* Soluble beta-amyloid induction of Alzheimer's phenotype for human fibroblast K⁺ channels. *Science*, 1994, 264: 276
- 10 Brorson J R, Bindokas V P, Iwama T, *et al.* The Ca²⁺ influx induced by beta-amyloid peptide 25 ~ 35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. *J Neurobiol*, 1995, 26(3): 325
(1997-04-24 收稿 1997-11-06 修回)

(上接第 22 页)