

◆本文引用:李晓娟,白瑞樱,郭直岳,等. β 淀粉样蛋白对三磷腺苷所致大鼠海马神经元损伤的影响[J].新乡医学院学报,2014,31(9):691-694.

【基础研究】

β 淀粉样蛋白对三磷腺苷所致大鼠海马神经元损伤的影响

李晓娟,白瑞樱,郭直岳,李成长,王晓芳,王亚莉
(新乡医学院生理学与神经生物学教研室,河南 新乡 453003)

摘要: 目的 探讨 β 淀粉样蛋白(A β)对三磷腺苷(ATP)引起的大鼠海马神经元损伤的影响及其相互作用。方法 孕18 d大鼠取其胎鼠迅速断头取出海马神经组织进行原代培养,实验分为正常对照组、ATP组、A β 组、ATP+A β 组、Suramin组。使用台盼蓝计数检测细胞存活率,全细胞电压钳记录细胞膜电流情况,钙成像系统检测细胞内Ca²⁺水平。结果 ATP组、A β 组、ATP+A β 组细胞存活率与正常对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);ATP+A β 组和Suramin组细胞存活率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。ATP+A β 组和无Ca²⁺灌流液组全细胞电流与ATP组比较差异有统计学意义($P<0.05$);Suramin组与ATP+A β 组全细胞电流比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与加药前比较,ATP组 F_{340}/F_{380} 比值明显增加($P<0.05$);与ATP组比较,ATP+A β 组 F_{340}/F_{380} 比值增加($P<0.05$);与ATP+A β 组比较,Suramin组 F_{340}/F_{380} 比值明显下降($P<0.05$)。结论 A β 可能通过激活ATP受体通道引起显著的钙超载,从而导致更严重的细胞损伤。

关键词: 三磷腺苷; β 淀粉样蛋白;Suramin;受体;海马神经元

中图分类号:R338 文献标志码:A 文章编号:1004-7239(2014)09-0691-04

Effect of β -amyloid protein on hippocampal neuronal damage induced by adenosine triphosphate of rats

LI Xiao-juan, BAI Rui-ying, GUO Zhi-yue, LI Cheng-zhang, WANG Xiao-fang, WANG Ya-li

(Department of Physiology and Neurobiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of β -amyloid protein (A β) on hippocampal neuronal damage induced by adenosine triphosphate (ATP) of rats and their interaction. **Methods** The fetal rats were taken from rats which gestated for 18 days and then were decapitated to take the hippocampus. The hippocampus was proceeded primary culture, and then the study were divided into normal control group, ATP group, A β group, ATP + A β group and Suramin group. Trypan blue staining was used to count the cell survival rate; whole-cell voltage-clamp was used to record membrane currents and calcium imaging system was used to detect the concentration of intracellular Ca²⁺. **Results** There were statistic differences of cell survival rates between ATP, A β , ATP + A β group and control group ($P<0.05$); there were statistic differences of cell survival rates between ATP + A β group and Suramin group ($P<0.05$). There were statistic differences of whole-cell currents between ATP + A β group, without Ca²⁺ perfuse group and ATP group ($P<0.05$); there were statistic differences of whole-cell currents between Suramin group and ATP + A β group ($P<0.05$). Compared with before giving drug, the F_{340}/F_{380} ratio of ATP group increased ($P<0.05$); compared with ATP group, the F_{340}/F_{380} ratio of ATP + A β group increased ($P<0.05$); compared with ATP + A β group, the F_{340}/F_{380} ratio in Suramin group decreased ($P<0.05$). **Conclusion** A β may cause significant calcium overload by activating the ATP receptor channel and induce the more severe cell damage.

Key words: adenosine triphosphate; β -amyloid protein; Suramin; receptor; hippocampal neuron

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性痴呆为主要特征的神经元退行性疾病。主要病理学特征为:在大脑皮层和海马区出现 β 淀粉样蛋白(beta-amyloid protein, A β)聚集形成的老年

斑^[1];Tau蛋白异常聚集形成的神经纤维缠结及大量神经突触丢失和炎症反应所导致的神经元变性^[2]。AD病变导致神经细胞膜上 β 淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)水解成小分子片段,其中之一就是A β ,它在神经元外部大量沉积,造成神经元的损伤和死亡^[3]。三磷腺苷(adenosine triphosphate, ATP)不仅是组织细胞的供能物,还是一种具有兴奋性作用的神经递质,主要调节钙稳态、神经递质的释放及重要的细胞内通路^[4]。正常情况下释放到细胞外的ATP量很少,当脑受到损伤(如缺血缺氧)时,大量ATP释放到细胞外,使胞外

DOI:10.7683/xxxyxb.2014.09.005

收稿日期:2014-05-12

基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:13A310855);新乡医学院科研培育基金资助(编号:2013QN101)

作者简介:李晓娟(1973-),女,河南新乡人,硕士,副教授,研究方向:脑损伤及其干预。

通信作者:王亚莉(1980-),女,河南开封人,硕士,副教授,研究方向:神经元网络震荡。

的ATP水平迅速升高,与细胞膜上的P2嘌呤能受体结合,继而引发系列反应,导致细胞凋亡坏死,引起继发性脑损伤^[5]。研究表明,AD患者小胶质细胞中及Aβ处理体外培养的人胚胎小胶质细胞中P2X7受体表达均明显上调^[6],表明Aβ作用可影响ATP受体的表达,但是Aβ和ATP对共同处理的神经元影响及其病理生理机制尚不十分清楚。因此,本研究采用ATP、Aβ或ATP和Aβ共同处理原代培养的海马神经元,观察细胞存活情况,通过全细胞电压钳放大器记录海马神经元电流变化,通过Ca²⁺成像系统观察细胞内Ca²⁺水平变化,探讨Aβ、胞外ATP对海马神经元的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 孕鼠购自郑州大学动物中心[许可证号:SCXK(豫)2005-0001];ATP、Aβ、Suramin、谷氨酰胺、胰蛋白酶(美国Sigma公司);达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、神经基质培养基(neurobasal medium, NB)、B27培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);Axon全细胞电压钳放大器(美国Molecular Device公司);显微镜(日本Nikon公司);荧光激发单色仪(英国Cairn公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠海马神经元培养及实验分组 海马神经元的培养参照文献[7]。孕18 d大鼠取其胎鼠迅速断头取出海马组织,置于D-Hanks液中洗涤3次,用眼科剪快速剪碎至1 mm×1 mm×1 mm组织块,加入质量分数0.125%胰蛋白酶中,37℃消化20 min,用含体积分数10%胎牛血清的4℃DMEM液终止消化,静置2 min去除中止液,加入DMEM液制成密度为7×10⁵ L⁻¹的细胞悬液,接种于涂有质量分数0.05%多聚赖氨酸的培养皿中(35 mm),37℃恒温CO₂孵育箱内培养。6 h后更换NB+B27+谷氨酰胺培养基,3 d后半量换液,细胞培养至第7天进行实验。实验分为正常对照组、ATP组、Aβ组、ATP+Aβ组和Suramin组。正常对照组:NB+B27培养基常规培养;ATP组:培养液中加入ATP(100 μmol·L⁻¹),4 h后观察;Aβ组:培养液中加入Aβ(5 μmol·L⁻¹),4 h后观察;ATP+Aβ组:培养液中加入ATP+Aβ(100 μmol·L⁻¹+5 μmol·L⁻¹),4 h后观察;Suramin组:应用P2受体阻断剂Suramin(100 μmol·L⁻¹)3 min后加入ATP+Aβ(100 μmol·L⁻¹+5 μmol·L⁻¹),4 h后观察。

1.2.2 大鼠海马神经元存活率检测 用1.25 g·L⁻¹胰蛋白酶消化贴壁的神经元,并用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基中止消化、充分吹打细胞悬液,取9滴细胞悬液移入试管中,加1滴质量分数0.4%台盼蓝溶液混匀,3 min内用血细胞计数板在

倒置相差显微镜下分别计数活细胞和死细胞(蓝染细胞)。细胞存活率=未蓝染细胞/(蓝染细胞+未蓝染细胞)×100%,实验重复3次。

1.2.3 全细胞膜片钳记录大鼠海马神经元电流变化 实验分为ATP组、ATP+Aβ组、Suramin组、无Ca²⁺灌流液组。ATP组:待细胞记录稳定后喷射给予100 μmol·L⁻¹ATP;ATP+Aβ组:培养神经元加入Aβ(5 μmol·L⁻¹)预处理4 h后记录,待细胞稳定后喷射给予100 μmol·L⁻¹ATP;Suramin组:Aβ(5 μmol·L⁻¹)预处理4 h进行记录,将灌流液换成100 μmol·L⁻¹Suramin灌流2 min以上,使灌流槽内Suramin达到浓度平衡后喷射给予100 μmol·L⁻¹ATP;无Ca²⁺灌流液组:灌流液中不加Ca²⁺,待细胞记录稳定后喷射给予100 μmol·L⁻¹ATP。打开数模转换器和膜片钳放大器,通过显微镜和CCD(Charge-coupled Device)图像传感器可视下挑选突起完整、表面光滑,折光性好的神经元进行记录^[8];采用软质中性无芯玻璃管(直径1.5 mm,长10 cm)于拉制仪上拉制成尖端1~2 μm的微电极,电极电阻为3~5 MΩ,高阻抗封接,形成全细胞记录模式。应用膜片钳放大器记录电流,2 kHz滤波,采样频率为5 kHz,pcclamp 8型软件进行数据记录和分析。

1.2.4 Ca²⁺成像记录 实验分为ATP组、ATP+Aβ组和Suramin组,给药顺序同1.2.3。操作如下:培养皿中加入Fura-2/AM在37℃培养箱孵育30 min,去酯化15 min,细胞外液洗3次,去掉细胞外的Fura-2/AM。将负载好的细胞放于倒置显微镜上,实时拍摄细胞内荧光强度动态变化。由于Fura-2/AM可以进入细胞并经紫外光激发发射荧光,未结合Ca²⁺的Fura-2激发波长为380 nm,结合Ca²⁺后的激发波长为340 nm,分别检测340 nm和380 nm下的荧光强度F₃₄₀和F₃₈₀,其比值(F₃₄₀/F₃₈₀)与细胞内游离Ca²⁺水平成正比。

1.3 统计学处理 应用SPSS 13.0软件进行统计学处理。数据以均数±标准差(̄x±s)表示,采用随机区组设计的单因素方差分析(one-way ANOVA),P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATP和Aβ对细胞存活率的影响 光镜显示正常培养条件下,大鼠海马神经元折光性好,胞体饱满,有明显的立体感,边界清晰,周围有光晕,神经元突起多且伸长交织成网状(图1A)。采用ATP、Aβ及ATP+Aβ分别处理后,观察到不同程度神经元死亡,细胞体积减小,多呈圆球状,突起断裂,细胞之间的突触联系明显减少(图1B~1D);使用P2受体阻断剂Suramin后,ATP+Aβ引起的神经元死亡减少,细胞之间的突触仍可见(图1E)。

正常对照组、ATP 组、A β 组、ATP + A β 组和 Suramin 组细胞存活率分别为 $(95.31 \pm 3.25)\%$ 、 $(72.60 \pm 8.31)\%$ 、 $(58.42 \pm 5.15)\%$ 、 $(14.55 \pm 6.01)\%$ 、 $(80.26 \pm 6.23)\%$, ATP 组、A β 组、ATP + A β 组与正常对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) ; ATP + A β 组和 Suramin 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

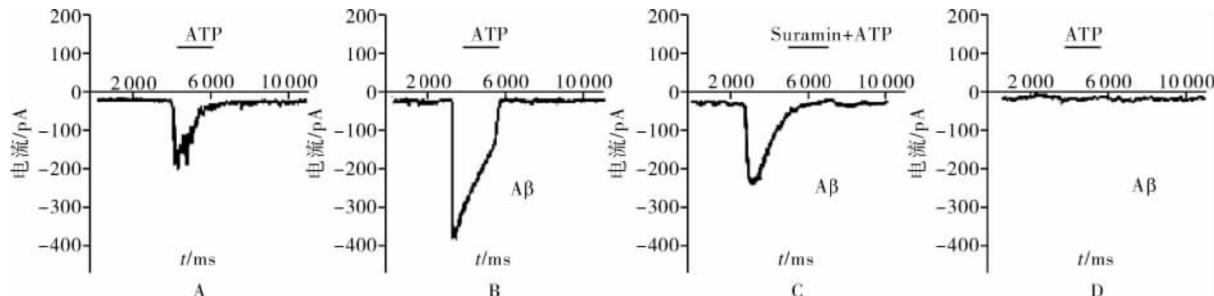
2.2 ATP 和 A β 诱导的全细胞电流 在离体培养 7 d 的大鼠海马神经元中选择典型的锥体细胞进行记录, 固定膜电位在 -70 mV, 记录全细胞电流。图 2A 显示 ATP 诱导的电流为一定强度的内向电流;



A: 正常对照组; B: ATP 组; C: A β 组; D: ATP + A β 组; E: Suramin 组。

图 1 ATP 和 A β 对大鼠海马神经元的影响 ($\times 400$)

Fig. 1 Effect of ATP and A β on hippocampal neurons of rats ($\times 400$)



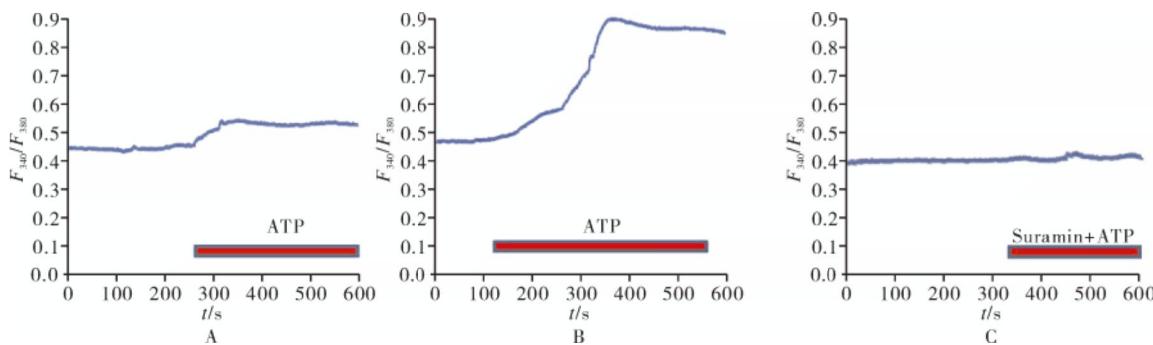
A: ATP 组; B: ATP + A β 组; C: Suramin 组; D: 无 Ca^{2+} 灌流液组。

图 2 ATP 和 A β 诱导的全细胞电流

Fig. 2 Whole-cell currents induced by ATP and A β

2.3 细胞内 Ca^{2+} 水平变化 在正常细胞外液条件下, 加入 ATP 后细胞内 Ca^{2+} 水平有一定增加, 见图 3A; A β 预处理 4 h 后灌流液中加入 ATP, 细胞内 Ca^{2+} 水平有明显增加, 见图 3B; 使用 Suramin 灌流后加入 ATP 可阻断 A β 引起的 Ca^{2+} 水平增加, 见图 3C。各组加药前、ATP 组、ATP + A β 组和 Suramin

图 2B 显示 A β 预处理 4 h 后灌流液中加入 ATP 可诱导约 400 pA 的内向电流; 图 2C 显示使用 P2 受体阻断剂 Suramin 可部分阻断 A β 预处理后 ATP 诱导的内向电流; 图 2D 显示加入无 Ca^{2+} 灌流液后给予 ATP 不能诱导出明显电流。ATP 组、ATP + A β 组、Suramin 组、无 Ca^{2+} 灌流液组全细胞电流分别为 (190.01 ± 15.03) 、 (392.22 ± 25.11) 、 (248.24 ± 18.09) 、 (5.31 ± 3.02) pA, ATP + A β 组和无 Ca^{2+} 灌流液组与 ATP 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Suramin 组与 ATP + A β 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A: ATP 组; B: ATP + A β 组; C: Suramin 组。

图 3 细胞内 Ca^{2+} 水平变化

Fig. 3 Changes of Ca^{2+} concentration in intracellular

3 讨论

在AD的研究中,至今尚未发现其他可替代A β 的病理因子,很多证据表明,A β 是诱导AD发生的主要病理环节^[9]。A β 可以促进电压门控性Ca²⁺通道开放,Tg2576小鼠体内Ca²⁺成像实验显示,在靠近老年斑的突起中,细胞溶质Ca²⁺升高或Ca²⁺超负荷,并诱导了星型胶质细胞内Ca²⁺流^[10]。ATP与离子门控型P2X受体结合可导致细胞膜通透性增加,促使大量Ca²⁺内流,最终导致靶细胞死亡^[5]。Domercq等^[11]报道脑缺血损伤是由于ATP失稳态,脑缺血时ATP释放增多,激活P2X7受体,导致显著的钙超载,是脑梗死等缺血性疾病的关键。Ca²⁺作为细胞内的第2信使,对于整个中枢神经系统至关重要,神经元通过钙信号调节一系列功能,包括神经递质释放、膜兴奋调节、基因表达、细胞生长与分化、细胞凋亡和坏死等^[12]。

本实验通过光学显微镜观察到ATP及A β 作用于大鼠海马神经元后,细胞形态变圆,突起变短。台盼蓝计数显示,ATP、A β 及ATP+A β 分别处理后大鼠海马神经元存活率依次下降,表明A β 对大鼠海马神经元的损伤与ATP受体通道激活有协同作用。ATP作用于P2受体,当使用P2受体阻断剂Suramin作用于ATP+A β 处理神经元,其存活率明显增加,表明Suramin可部分阻断ATP受体通道,降低A β 对神经元的损伤。

为进一步探讨ATP与A β 对大鼠海马神经元的损伤机制,给予ATP与A β 单独或联合诱导全细胞电流,实验结果表明,A β 预处理4 h后给予ATP可诱导较大的内向电流,与单独给予ATP比较差异有统计学意义,使用P2受体阻断剂Suramin灌流后加入ATP可部分阻断A β 诱导的内向电流。加入无Ca²⁺灌流液后给予ATP不能诱导出明显电流,表明该内向电流主要为Ca²⁺内流。

进一步使用Ca²⁺成像系统显示,ATP可增加细胞内Ca²⁺水平;A β 预处理后加入ATP,细胞内Ca²⁺水平比单独应用ATP有明显增加;使用Suramin可以使这种增加明显减弱。

Sanz等^[13]报道体外培养小胶质细胞,给予A β 可引起P2X7受体上调,提示A β 作用于胶质细胞可增加ATP受体通道开放,这与作者在海马神经元培养中观察到的A β 可激活ATP受体通道增加对海马神经元的损伤和钙内流结果是一致的。本实验结果

提示A β 可能通过激活ATP受体通道导致显著的钙超载,从而引起更严重的细胞损伤。因此,探讨A β 和ATP对神经元的作用及其相互影响,可以对AD的发病机制提供重要证据,从而为疾病的治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1] 卢艳,董海莲,张丽娜,等. 演粉样前体蛋白转基因疾呆模型小鼠视网膜神经纤维层病理改变[J]. 眼科新进展,2012,32(9):810-812,813.
- [2] 翟伟科,王小引,樊振琦,等. 饱和脂肪饮食对豚鼠学习记忆、脑β-淀粉样蛋白及氧化应激的影响[J]. 新乡医学院学报,2013,30(6):429-431.
- [3] Selkoe D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy[J]. *Physiol Rev*,2001,81(2):741-766.
- [4] Kuchibhotla K V, Goldman S T, Lattarulo C R, et al. Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis *in vivo* resulting in structural and functional disruption of neuronal networks[J]. *Neuron*,2008,59(2):214-225.
- [5] Skaper S D, Debetto P, Giusti P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders[J]. *FASEB J*,2010,24(2):337-345.
- [6] McLarnon J G, Ryu J K, Walker D G, et al. Upregulated expression of purinergic P2X7 receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*,2006,65(11):1090-1097.
- [7] Yu Z, Liu J, Guo S, et al. Neuroglobin-overexpression alters hypoxic response gene expression in primary neuron culture following oxygen glucose deprivation[J]. *Neuroscience*,2009,162(2):396-403.
- [8] Lu C B, Hamilton J B, Powell A D, et al. Effect of ageing on CA3 interneuron sAHP and gamma oscillations is activity-dependent[J]. *Neurobiol Aging*,2011,32(5):956-965.
- [9] Karra E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2011,10(9):698-712.
- [10] Bezprozvanny I. Amyloid goes global[J]. *Sci Signal*,2009,2(63):16.
- [11] Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, et al. P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes[J]. *Glia*,2010,58(6):730-740.
- [12] Bezprozvanny I, Mattson M P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Trends Neurosci*,2008,31(9):454-463.
- [13] Sanz J M, Chiozzi P, Ferrari D, et al. Activation of microglia by amyloid beta requires P2X7 receptor expression[J]. *J Immunol*,2009,182(7):4378-4385.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)