

### 【基础研究】

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<sup>[5]</sup>。研究表明,AD患者小胶质细胞中及A $\beta$ 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<sup>[6]</sup>,表明A $\beta$ 作用可影响ATP受体的表达,但是A $\beta$ 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、A $\beta$ 或ATP和A $\beta$ 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Ca<sup>2+</sup>成像系统观察细胞内Ca<sup>2+</sup>水平变化,探讨A $\beta$ 、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、A $\beta$ 、Suramin、谷氨酰胺、胰蛋白酶(美国Sigma公司);达尔伯克改良伊格格培养基(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<sup>[7]</sup>。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 $7 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 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CO<sub>2</sub>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、A $\beta$ 组、ATP+A $\beta$ 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( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),4 h后观察;A $\beta$ 组:培养液中加入A $\beta$ ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),4 h后观察;ATP+A $\beta$ 组:培养液中加入ATP+A $\beta$ ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),4 h后观察;Suramin组:应用P2受体阻断剂Suramin( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )3 min后加入ATP+A $\beta$ ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),4 h后观察。

**1.2.2 大鼠海马神经元存活率检测** 用 $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 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+A $\beta$ 组、Suramin组、无Ca<sup>2+</sup>灌流液组。ATP组:待细胞记录稳定后喷射给予 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP;ATP+A $\beta$ 组:培养神经元加入A $\beta$ ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )预处理4 h后记录,待细胞稳定后喷射给予 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP;Suramin组:A $\beta$ ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )预处理4 h进行记录,将灌流液换成 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Suramin灌流2 min以上,使灌流槽内Suramin达到浓度平衡后喷射给予 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP;无Ca<sup>2+</sup>灌流液组:灌流液中不加Ca<sup>2+</sup>,待细胞记录稳定后喷射给予 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP。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<sup>[8]</sup>;采用软质中性无芯玻璃管(直径1.5 mm,长10 cm)于控制仪上拉制成尖端1~2  $\mu\text{m}$ 的微电极,电极电阻为3~5 M $\Omega$ ,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,pclamp 8型软件进行数据记录和分析。

**1.2.4 Ca<sup>2+</sup>成像记录** 实验分为ATP组、ATP+A $\beta$ 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Ca<sup>2+</sup>的Fura-2激发波长为380 nm,结合Ca<sup>2+</sup>后的激发波长为340 nm,分别检测340 nm和380 nm下的荧光强度 $F_{340}$ 和 $F_{380}$ ,其比值( $F_{340}/F_{380}$ )与细胞内游离Ca<sup>2+</sup>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( $\bar{x} \pm s$ )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。

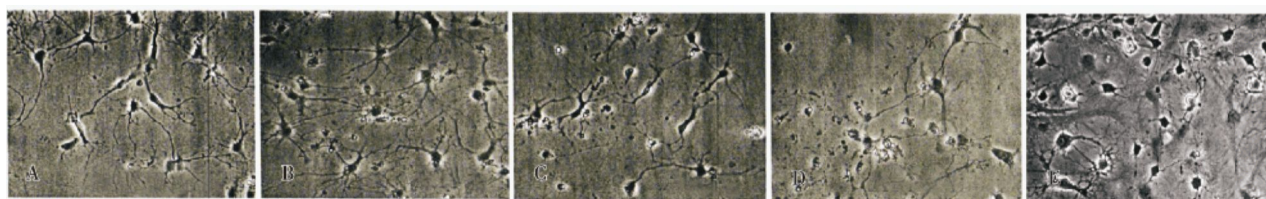
## 2 结果

**2.1 ATP和A $\beta$ 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、A $\beta$ 及ATP+A $\beta$ 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+A $\beta$ 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、 $A\beta$ 组、ATP +  $A\beta$ 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、 $A\beta$ 组、ATP +  $A\beta$ 组与正常对照组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); ATP +  $A\beta$ 组和 Suramin 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 ATP 和  $A\beta$  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;

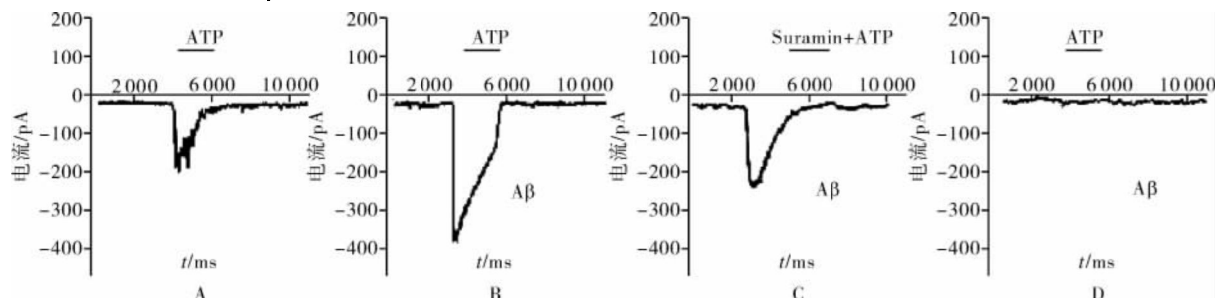
图 2B 显示  $A\beta$  预处理 4 h 后灌流液中加入 ATP 可诱导约 400 pA 的内向电流;图 2C 显示使用 P2 受体阻断剂 Suramin 可部分阻断  $A\beta$  预处理后 ATP 诱导的内向电流;图 2D 显示加入无  $Ca^{2+}$  灌流液后给予 ATP 不能诱导出明显电流。ATP 组、ATP +  $A\beta$  组、Suramin 组、无  $Ca^{2+}$  灌流液组全细胞电流分别为  $(190.01 \pm 15.03)$ 、 $(392.22 \pm 25.11)$ 、 $(248.24 \pm 18.09)$ 、 $(5.31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



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

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

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



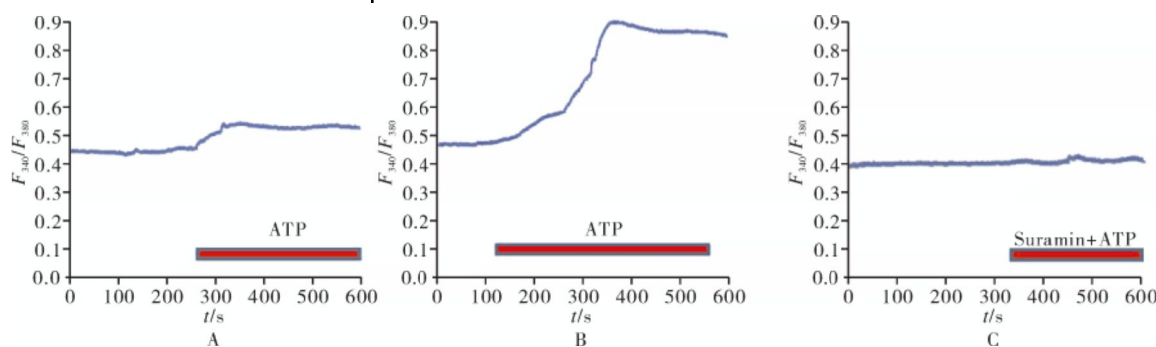
A: ATP 组; B: ATP +  $A\beta$  组; C: Suramin 组; D: 无  $Ca^{2+}$  灌流液组。

图 2 ATP 和  $A\beta$  诱导的全细胞电流

Fig. 2 Whole-cell currents induced by ATP and  $A\beta$

**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;  $A\beta$  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  $A\beta$  引起的  $Ca^{2+}$  水平增加,见图 3C。各组加药前、ATP 组、ATP +  $A\beta$  组和 Suramin

组  $F_{340}/F_{380}$  比值分别为  $1.00 \pm 1.00$ 、 $1.42 \pm 0.18$ 、 $1.73 \pm 0.21$ 、 $1.08 \pm 0.17$ ,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 +  $A\beta$  组  $F_{340}/F_{380}$  比值增加 ( $P < 0.05$ );与 ATP +  $A\beta$  组比较, Suramin 组  $F_{340}/F_{380}$  比值明显下降 ( $P < 0.05$ )。



A: ATP 组; B: ATP +  $A\beta$  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 $\beta$ 的病理因子,很多证据表明,A $\beta$ 是诱导AD发生的主要病理环节<sup>[9]</sup>。A $\beta$ 可以促进电压门控性Ca<sup>2+</sup>通道开放,Tg2576小鼠体内Ca<sup>2+</sup>成像实验显示,在靠近老年斑的突起中,细胞溶质Ca<sup>2+</sup>升高或Ca<sup>2+</sup>超负荷,并诱导了星型胶质细胞内Ca<sup>2+</sup>流<sup>[10]</sup>。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Ca<sup>2+</sup>内流,最终导致靶细胞死亡<sup>[5]</sup>。Domercq等<sup>[11]</sup>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。Ca<sup>2+</sup>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<sup>[12]</sup>。

本实验通过光学显微镜观察到ATP及A $\beta$ 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 $\beta$ 及ATP+A $\beta$ 分别处理后大鼠海马神经元存活率依次下降,表明A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 对神经元的损伤。

为进一步探讨ATP与A $\beta$ 对大鼠海马神经元的损伤机制,给予ATP与A $\beta$ 单独或联合诱导全细胞电流,实验结果表明,A $\beta$ 预处理4h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 $\beta$ 诱导的内向电流。加入无Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>内流。

进一步使用Ca<sup>2+</sup>成像系统显示,ATP可增加细胞内Ca<sup>2+</sup>水平;A $\beta$ 预处理后加入ATP,细胞内Ca<sup>2+</sup>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<sup>[13]</sup>报道体外培养小胶质细胞,给予A $\beta$ 可引起P2X7受体上调,提示A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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. 淀粉样前体蛋白转基因痴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 $\beta$ -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] Karran 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)