

钾通道在培养大鼠海马神经元凋亡性 容积减少中的作用^{*}

王颖 陈明 李晓明 李建国 胡平 肖中举 高天明^{**}

(第一军医大学解剖学教研室, 生理学教研室, 广州 510515)

摘要 为探讨钾通道参与神经元凋亡的可能机制, 在星形孢菌素 (STS) 诱导的培养海马神经元凋亡模型上, 研究了凋亡时神经细胞容积的动态变化及钾通道在其中的作用. 实验结果显示, 钾通道阻断剂四乙铵或升高细胞外 K^+ 均能够明显抑制 STS 诱导的神经元凋亡, 并且大电导钙激活钾通道 (BK) 选择性阻断剂 iberiotoxin 和 paxilline 具有同样程度的抗细胞凋亡作用, 表明钾通道 (可能主要是 BK 通道) 参与了 STS 诱导的培养海马神经元凋亡. 在 STS 诱导神经元凋亡的早期就出现了细胞容积的显著减少, 而钾通道阻断剂或升高细胞外 K^+ 均可阻断该细胞容积减少. 研究结果提示细胞内钾离子的外流可能参与了凋亡性细胞容积减少, 这也可能是钾通道介导细胞凋亡的重要机制之一.

关键词 海马, 神经元, 凋亡性容积减少, 星形孢菌素, 钾通道

学科分类号 R332.8 R329.2 R392.31

细胞凋亡或程序化细胞死亡, 是多细胞有机体为调控机体发育, 维护内环境稳定, 由基因控制的细胞主动死亡过程. 凋亡是近 20 年的研究热点, 因为它包含于生物医学领域的许多方面, 从胚胎生成、蜕变到癌症以及人类的许多疾病^[1]. 因此, 对凋亡的理解将会提高我们对人类健康的认识.

细胞凋亡通常伴有特征性形态学改变, 如: 细胞体皱缩和核固缩, 染色质着边和凋亡小体形成, 其中细胞皱缩或细胞容积减少几乎是各种类型细胞凋亡的共同特征. 虽然人们对凋亡的生化机理进行了大量的研究, 包括线粒体释放细胞色素 c、bcl-2 和相关基因的调节作用, 以及 caspase 激活在执行凋亡命令中的核心作用^[1, 2]. 然而, 对在凋亡过程中出现的细胞容积减少与细胞凋亡的关系未引起人们足够的重视. 近年研究表明, 凋亡性容积减少 (apoptotic volume decrease, AVD) 的出现早于细胞色素 c 的释放^[3]或 DNA 片段化^[4]. 特别是最近, Maeno 等^[5]在 HeLa 等细胞系上用星形孢菌素 (staurosporine, STS) 诱导凋亡时发现, AVD 较凋亡特征性超微结构和生化改变 (DNA 断裂、细胞色素 c 释放、caspase-3 激活) 出现得早, 并且 caspase 抑制剂虽可抑制凋亡但对 AVD 不起作用, 提出细胞容积减少是细胞凋亡的触发因子^[6].

在神经系统的发育期间以及许多神经退化性疾病如脑中风、脑创伤、Alzheimer's 病、Parkinson's 病、Huntington's 病等的病理性神经细胞死亡中细胞凋亡同样发挥重要作用^[7]. 我们以往的工作表明,

钾通道参与了在体脑缺血以及离体缺氧/复氧诱导的海马神经元的凋亡^[8-12], 但目前对钾通道介导神经元凋亡的机制尚不清楚. 因此, 为探讨钾通道参与神经元凋亡的可能机制, 本实验在 STS 诱导的培养海马神经元凋亡模型上, 研究了凋亡时神经细胞容积的动态变化及钾通道在其中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料

新生 SD 大鼠购自第一军医大学实验动物中心. DMEM/F12 培养液购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, TUNEL 试剂盒 (S7110) 购自 Intergen 公司, 阿糖胞苷、多聚赖氨酸及四乙铵 (TEA) 购自 Sigma 公司, iberiotoxin (IBTX) 和 paxilline 购自 Alomone Labs, 星形孢菌素购自 ICN 公司.

1.2 仪器

CO₂ 细胞培养箱 (日本 TABAI ESPEC 公司), 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司).

1.3 方法

1.3.1 神经元培养: 取出生 24 h 内的 SD 大鼠,

^{*} 国家杰出青年基金 (30125013), 军队杰出青年基金 (01J009), 广东省自然科学基金团队项目 (10717) 和教育部长江学者奖励计划资助项目.

^{**} 通讯联系人.

Tel: 020-61648216 E-mail: tga@fimmu.com

收稿日期: 2003-02-08 接受日期: 2003-03-24

无菌条件下断头取脑, 分离双侧海马, 分散细胞制成单细胞悬液, 以 4×10^5 个 / ml 的密度接种于预先包备有多聚赖氨酸的培养板, 于 95% 空气、5% CO_2 、37℃、饱和湿度条件下培养. 培养液含有 90% DMEM/F12、10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青链霉素. 接种 48 h 后加入 1×10^{-5} mol/L 阿糖胞苷作用 48 h 以抑制胶质细胞增殖.

1.3.2 分组: 培养 7 天的海马神经元分为正常对照组、STS 诱导凋亡组、STS 给药同时加钾通道阻断剂或细胞外高 K^+ (25 mmol/L KCl) 组. 每次实验每组检测 2 孔, 每孔 3 个视野 (25 × 10 倍), 每个视野 30~200 个细胞, 每个实验重复 3~5 次.

1.3.3 药物处理: 培养 7 天的细胞分别给予 STS、STS+ TEA、STS+ paxilline、STS+ IBTX 和 STS+ 25 mmol/L KCl 使药物浓度达到终浓度并维持至检测终点.

1.3.4 神经元死亡计数: 加药前及加药后 12 h 于倒置显微镜下观察神经元形态, 并计数同一视野下的活细胞数目. 胞体光滑饱满、突起完整的神经元视为存活神经元, 而胞体存在空泡、突起断裂消失的神经元视为非存活神经元^[13]. 以加药后 12 h 计数的存活神经元占加药前存活神经元的百分数来表示神经元的存活情况.

1.3.5 神经元凋亡鉴定: 用 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术 (TUNEL) 鉴定培养海马神经元的凋亡, 凋亡细胞的细胞核呈现棕褐色^[14].

1.3.6 神经元细胞体积测量: 以神经元细胞体最大横截面积的变化反映细胞容积的改变, 因为这种

方法与用光学截面积技术算出的细胞容积无差异^[15]. 神经元细胞体最大横截面积的测量用 Qwin 图像分析系统 (德国 Leica 公司).

1.4 统计方法

文中数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 ANOVA 方差分析的 LSD 法进行统计学分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结 果

2.1 钾通道在海马神经元凋亡中的作用

2.1.1 STS 诱导培养海马神经元凋亡: STS 是一种非选择性蛋白激酶抑制剂, 常被用来诱导细胞凋亡^[15, 16]. 培养 7 天的海马神经元加 STS 于培养板的培养基中, 至终浓度 2 μmol/L, 持续作用 12 h 加药前后分别计数同一视野的活细胞数, 药物处理后与加药前相比存活细胞数为 39.04%, 而正常对照组 12 h 后细胞存活数为 92.82%; STS 组与正常对照组相比有显著性差异 ($n = 5$, $P < 0.001$), 表明 STS 可以诱导海马神经元死亡 (图 1 和图 2), TUNEL 染色证明死亡的细胞多为凋亡 (图 3).

2.1.2 钾通道阻断剂 TEA 的保护作用: 培养 7 天的海马神经元加 2 μmol/L STS 的同时加 1 mmol/L TEA, 持续作用 12 h 加药前和加药后分别计数同一视野的活细胞数, 结果显示 12 h 后存活细胞数为 65.96%, 与单独 STS 处理组相比具有统计学差异 ($n = 5$, $P < 0.05$) (图 1 和图 2), 表明 TEA 有明显的抗 STS 诱导细胞凋亡的作用, 提示钾通道参与了海马神经元的凋亡.

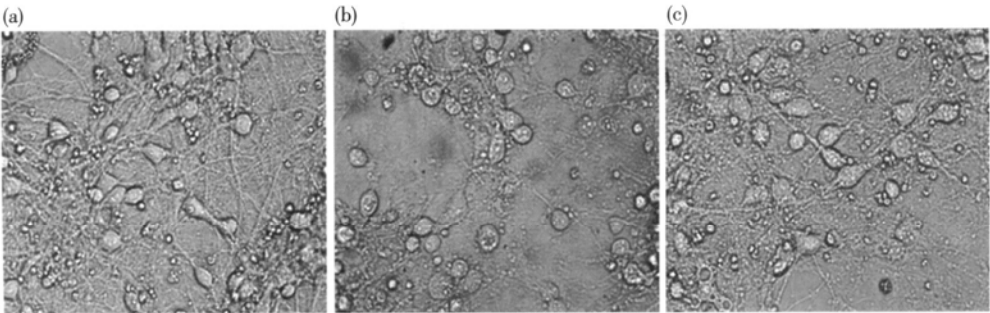


Fig. 1 Phase-contrast photos showing protection of TEA against staurosporine-induced hippocampal neuronal death in culture

(a) control (b) exposure to 2 μmol/L staurosporine for 12 h (c) exposure to 2 μmol/L staurosporine and 1 mmol/L TEA for 12 h. Staurosporine exposure caused cell body shrinkage and cell death in 12 h. 1 mmol/L TEA co-applied with staurosporine prevented the apoptotic cell body shrinkage and increased cell viability (200 ×).

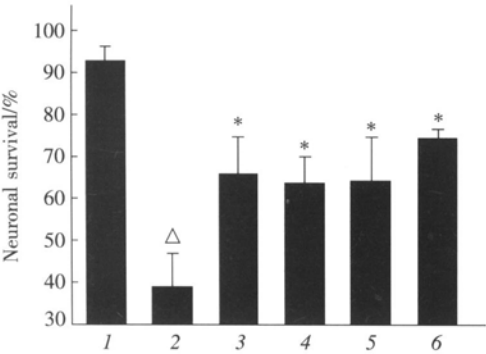


Fig.2 Potassium channel blockers and raising extracellular K⁺ concentration prevented staurosporine-induced hippocampal neuronal death in culture

Staurosporine exposure of 12 h induced significant neuronal death in hippocampal culture detected by cell counting. Cell viability is shown as the percentage of the total surviving neurons before treatment. 1 mmol/L TEA (*n* = 5) or 0.1 μmol/L iberiotoxin (*n* = 5) or 10 μmol/L paxilline (*n* = 5) or 25 mmol/L KCl (*n* = 3) all reduced staurosporine-induced cell death. Values are $\bar{x} \pm s$. △, *P* < 0.001 vs control group; *, *P* < 0.05 vs staurosporine-treated group. 1: control; 2: STS; 3: STS+ TEA; 4: STS+ IBTX; 5: STS+ paxilline; 6: STS+ 25 mmol/L KCl.

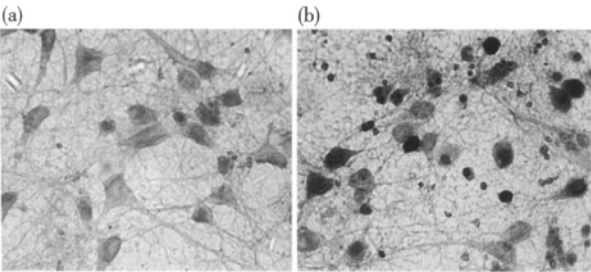


Fig.3 Micrographs of TUNEL staining after treatment of neurons with staurosporine for 12 h

Staurosporine exposure of 12 h remarkably increased the TUNEL positive stained cell in hippocampal culture. (a) control; (b) exposure to 2 μmol/L staurosporine for 12 h.

2.1.3 细胞外液高钾的保护作用: 为进一步证实钾通道在 STS 诱导凋亡中的作用, 在用 STS 处理神经细胞的同时, 培养基中加入 20 mmol/L KCl 使细胞外液钾离子终浓度达到 25 mmol/L, 并分别计数加药前和加药后 12 h 同一视野的活细胞数, 结果存活细胞数为 74.53%, 与单独 STS 处理组相比具有统计学差异 (*n* = 3, *P* < 0.05) (图 2). 可见, 增加细胞外液中钾离子浓度也可明显减轻

STS 诱导的神经元凋亡.

2.1.4 BK 通道阻断剂 IBTX 和 paxilline 的保护作用: 因为 TEA 是一个广谱的钾通道阻断剂, 而我们以往的工作表明钾通道中主要是 BK 通道参与了缺血/缺氧诱导的海马神经元的凋亡^[8-12], 因此, 用上述同样的方法加入 BK 通道阻断剂 0.1 μmol/L IBTX 和 10 μmol/L paxilline 以观察 BK 通道在 STS 诱导的海马神经元凋亡中的作用. 加药前和加药后 12 h 分别计数同一视野的活细胞数, 结果显示存活细胞数分别为 63.92% 和 64.32%, 与单独 STS 处理组相比具有统计学差异 (*n* = 5, *P* < 0.05), 而与 TEA 或高浓度钾离子处理组相比无统计学差异 (图 2), 表明 BK 通道阻断剂具有与 TEA 或高浓度钾离子同样程度的抗细胞凋亡作用, 提示钾通道中主要是 BK 通道参与了海马神经元的凋亡.

2.2 钾通道在神经元凋亡性容积减少中的作用

2.2.1 STS 诱导培养海马神经元细胞容积减少: 培养 7 天的海马神经元测量正常细胞最大横截面积, 并分别于加 2 μmol/L STS 后 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h 和 12 h 测量原细胞的最大横截面积, 以培养板底部的“十”字线做标记, 保证不同时间点描记的细胞是同一细胞, 对照组以同样的方法和时间点进行测量. 结果显示对照组细胞容积在 12 h 内未见明显变化 (*n* = 28), 而 STS 作用 1~2 h 后出现细胞容积减少, 3 h 后细胞容积减少具有显著性差异, 12 h 后细胞容积减少了 21.9% (*n* = 81, *P* < 0.05) (图 4 和图 5).

2.2.2 TEA 抑制 STS 诱导培养海马神经元细胞容积的减少: 用上述方法测量正常细胞最大横截面积, 及同时加 STS 和 TEA 后 7 个时间点的细胞最大横截面积, 结果显示 TEA 几乎完全阻断了 STS 诱导的细胞容积减少 (*n* = 24) (图 4 和图 5).

2.2.3 细胞外液高钾抑制 STS 诱导培养海马神经元细胞容积的减少: 用上述方法测量正常细胞最大横截面积, 及同时加 STS 和 25 mmol/L KCl 后 7 个时间点的细胞最大横截面积, 结果显示增加细胞外液钾离子浓度同样可以抑制 STS 诱导的神经元细胞容积减少 (*n* = 24) (图 5). 而单独给予 25 mmol/L KCl 细胞容积在加药后 7 个时间点与对照组相比均无显著性差异 (*n* = 23).

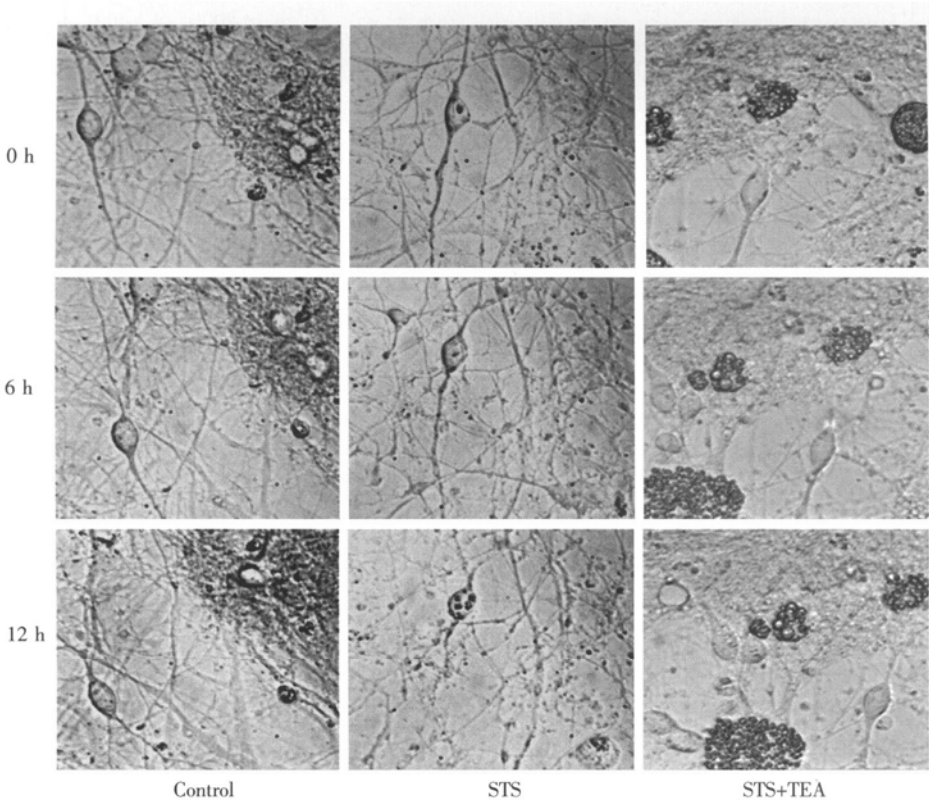


Fig. 4 Representative DIC images of control and staurosporine-treated neurons in the presence or absence of TEA

No apparent changes in the cell morphological features were observed in control culture for 12 h. Treatment of cell with 2 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine caused a significant cell body shrinkage and it was largely prevented by 30 mmol/L TEA.

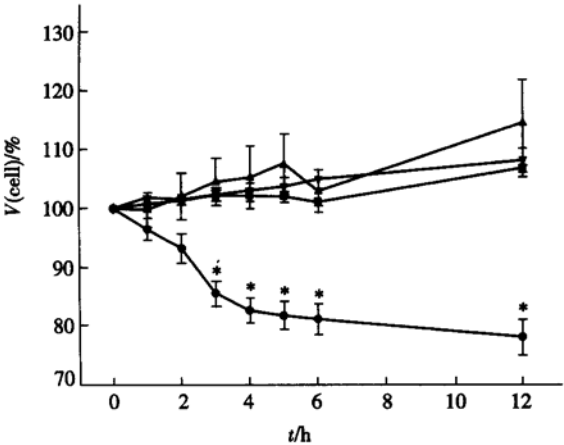


Fig. 5 Time course of changes in the relative cell volume after staurosporine exposure and the effect of TEA and raising extracellular K^+ concentration

Staurosporine treatment induced a progressive volume decrease. This volume decrease was completely prevented by potassium channel blocker 30 mmol/L TEA or 25 mmol/L K^+ . Values are ($\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$ vs time 0 controls. ■ — ■: control; ● — ●: STS; ▲ — ▲: STS + TEA; ▼ — ▼: STS + 25 mmol/L KCl

3 讨 论

本实验在 STS 诱导的培养海马神经元凋亡模型上, 观察到钾通道 (主要可能是 BK 通道) 参与了凋亡过程. 这与我们以往在在体脑缺血以及离体缺氧/复氧诱导的海马神经元凋亡模型上获得的结果一致^[8-12], 同样, Krick 等^[17]也曾报道 BK 通道还参与了血管平滑肌细胞的凋亡过程. 然而, 在培养的大脑皮层神经元凋亡模型上, 介导细胞凋亡的钾通道类型则为延迟整流型钾通道^[16]. 这种不一致的原因可能与细胞的类型及细胞的发育阶段有关. 特别是后者可能更为重要, 因为我们培养的海马神经元是来自于出生后的动物, 在这样培养的神经元上我们可记录到与成年神经元相同特性的 BK 通道, 而上述的培养大脑皮层神经元则取材于胎鼠, 在这些神经元上尚无功能性 BK 通道的表达. 同时我们也注意到钾通道阻断剂并不能够完全阻断 STS 诱导的细胞凋亡, 说明在这个模型的凋亡过程中还有其他机制的参与.

细胞容积减少是细胞凋亡的基本特征。在凋亡过程中出现的细胞容积减少可能是由于细胞内离子的外流,使得细胞外渗透压升高,导致水的外流,进而引起细胞容积的变化。最近研究表明,这种凋亡性容积减少是细胞凋亡发生的原因之一^[15-6]。本实验观察到在 STS 诱导细胞凋亡的早期,海马神经细胞容积显著减少的结果也支持这一结论。另外,我们的结果表明钾通道阻断剂及增加细胞外液钾离子浓度除可抑制海马神经细胞的凋亡外,还可完全阻断海马神经细胞容积的减少,提示细胞内钾离子的外流可能参与了凋亡性细胞容积减少,这也可能是钾通道介导神经细胞凋亡的重要机制之一。最近在 HeLa 等细胞系上的研究结果也支持我们的推测,他们观察到钾通道阻断剂在阻断凋亡性细胞容积减少的同时,可抑制细胞的凋亡^[15]。

STS 是一种非特异性蛋白激酶抑制剂,可通过抑制蛋白激酶 C、酪氨酸蛋白激酶等而诱导细胞凋亡^[18]。而蛋白激酶 C 可以调节钾通道包括 BK 通道的活动^[19-20],因此,我们推测 STS 诱导海马神经元凋亡的机理之一,可能是通过调节这些蛋白激酶的活性进而使 BK 通道开放所致。

细胞能够补偿因细胞内外环境变化而导致的细胞容积的改变,这是通过各种容积调节性反应机制激活而实现的。在凋亡过程中离子的跨膜运动可能是调控的基本机制,这些机制对细胞的存活起到了重要的作用。然而,目前对凋亡性细胞容积减少导致细胞凋亡的机制尚不清楚。因此,我们仅能对此做某些推测:细胞容积的减少可能通过影响细胞骨架改变了基因的转录、蛋白质的磷酸化/去磷酸化、蛋白质-蛋白质之间的相互作用等而诱导细胞凋亡^[21-23]。当然,这些问题尚待进一步的研究,对离子运动及细胞容积减少引起凋亡信号传导通路的深入研究将会拓展我们对凋亡的理解。

参 考 文 献

- Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, **407** (6805): 770~776
- 蔡 循, 陈国强, 陈 竺, 等. 线粒体跨膜电位与细胞凋亡. *生物化学与生物物理学进展*, 2001, **28** (1): 3~6
Cai X, Chen G Q, Chen Z, *et al*. *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (1): 3~6
- Chang S H, Phelps P C, Berzesky I K, *et al*. Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells (NRK-52E). *Am J Pathol*, 2000, **156** (2): 637~649
- Bortner C D, Hughes F M, Cidlowski J A. A primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem*, 1997, **272** (51): 32436~32442
- Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, *et al*. Nontonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (17): 9487~9492
- Bortner C D, Cidlowski J A. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, **42** (1): 259~281
- Yuan J, Yankner B A. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 2000, **407** (6805): 802~809
- Gong L W, Gao T M, Huang H, *et al*. Transient forebrain ischemia induces persistent hyperactivity of large conductance Ca^{2+} -activated potassium channels via oxidation modulation in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*, 2002, **15** (4): 779~783
- 胡 平, 李晓明, 李建国, 等. 短暂脑缺血大鼠海马 CA1 锥体细胞大电导 Ca^{2+} 依赖 K^+ 通道活动降低. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (5): 714~718
Hu P, Li X M, Li J G, *et al*. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (5): 714~718
- Gong L W, Gao T M, Li X, *et al*. Enhancement in activities of large conductance Ca^{2+} -activated potassium channels in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 2000, **884** (1): 147~154
- Huang H, Gao T M, Gong L W, *et al*. Potassium channel blocker TEA prevents CA1 hippocampal injury following transient forebrain ischemia in adult rats. *Neurosci Lett*, 2001, **305** (2): 83~86
- 陈 明, 孙宏宇, 王 颖, 等. 钾通道阻断剂对低氧/复氧诱导的培养海马神经元死亡的防护作用. *第一军医大学学报*, 2002, **22** (10): 872~874
Chen M, Sun H Y, Wang Y, *et al*. *Journal of First Military Medical University*, 2002, **22** (10): 872~874
- Glazner G W, Chan S L, Lu C B, *et al*. Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: a mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis. *J Neurosci*, 2000, **20** (5C): 3641~3649
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, **119** (3): 493~501
- Churchwell K B, Wright S H, Emma F, *et al*. NMDA receptor activation inhibits neuronal volume regulation after swelling induced by veratridine-stimulated Na^+ influx in rat cortical cultures. *J Neurosci*, 1996, **16** (23): 7447~7457
- Yu S P, Yeh C H, Sensi S L, *et al*. Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science*, 1997, **278** (5335): 114~117
- Krick S, Platoshyn Q, Sweeney M, *et al*. Activation of K^+ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, **280** (4): C970~C979
- Radloff M, Gercken G. Protein kinase C activity and phosphoprotein pattern in stimulated alveolar macrophages. *Toxicol Lett*, 1996, **88** (1~3): 139~145
- Peter H, Irwin B. Kinase and phosphatase activities intimately associated with a reconstituted calcium-dependent potassium channel. *J Neurosci*, 1995, **15** (6): 4572~4579
- Peers C, Carpenter E. Inhibition of Ca^{2+} -dependent K^+ channels in rat carotid body type I cells by protein kinase C. *J Physiol*, 1998, **512** (3): 743~750
- Akenghat F J, Ingber D E. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton matrix and integrins. *Sci STKE*, 2002, **2002** (119): E6
- Giancotti F G, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*, 1999, **285** (5430): 1028~1032
- Fernachak A P, Berl T, Capasso J, *et al*. p38 MAP kinase modulates liver cell volume through inhibition of membrane Na^+ permeability. *J Clin Invest*, 2001, **108** (10): 1495~1504

Role of Potassium Channel in The Apoptotic Volume Decrease of Cultured Hippocampal Neurons^{*}

WANG Ying CHEN Ming LI Xiao-Ming LI Jian-Guo HU Ping XIAO Zhong-Ju GAO Tian-Ming^{**}

(Department of Anatomy Department of Physiology The First Military Medical University Guangzhou 510515 China)

Abstract It has been reported that activation of potassium channel is involved in the apoptosis of hippocampal neurons induced by *in vivo* ischemia and *in vitro* hypoxia. Recently, cell shrinkage is proposed as an early prerequisite to apoptotic events leading to cell death. To understand the mechanism underlying potassium channel-mediated neuronal apoptosis, the temporal changes in neuronal cell body volume and the involvement of potassium channel in the apoptotic volume decrease were examined in a model of staurosporine (STS)-induced apoptosis of cultured hippocampal neurons. Nonselective potassium channel blocker tetraethylammonium (TEA) or raising extracellular K^+ concentration significantly prevented STS-induced neuronal cell death. A similar neuroprotection was also observed by treatment with the selective high-conductance calcium-activated potassium channel (BK) blockers iberiotoxin and paxilline. These results indicate that potassium channels, especially BK channels, contribute to STS-induced neuronal apoptosis. Moreover, STS induced an early cell body volume decrease and this cell shrinkage was completely blocked by TEA or high extracellular K^+ . It is suggested that potassium efflux may be involved in the apoptotic volume decrease, which is probably one of the mechanisms underlying mediation of neuronal apoptosis by potassium channel.

Key words hippocampus, neuron, apoptotic volume decrease (AVD), staurosporine (STS), potassium channel

^{*} This work was supported by grants from Outstanding Young Scientists Program of NSFC (30125013), Outstanding Scientists Program of PLA (01J009), Team Collaboration Project of Guangdong (10717) and Cheung King Scholars Programme to TM Gao.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-20-61648216. E-mail: tga@fimmu.com

Received February 8, 2003 Accepted March 24, 2003