

东莨菪碱致记忆障碍大鼠中枢电压依赖性钾通道亚型的表达

徐向华, 潘雅萍, 王晓良*

(中国协和医科大学, 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研究东莨菪碱致记忆障碍大鼠模型中枢电压依赖性钾通道亚型 mRNA 表达的差异。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 5 种电压依赖性钾通道 Kv1.4, Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2 及 Kv4.3 mRNA 的表达。结果 注射东莨菪碱大鼠的学习记忆能力明显下降, 大脑皮层中 Kv4.2 的表达比对照组降低 28.8%; 海马中 Kv1.4 的表达升高 111.7%, Kv2.1 的表达升高 64.3%, 而 Kv4.2 的表达降低 33.9%。其它电压依赖性钾通道表达的变化不大。结论 东莨菪碱致大鼠学习记忆障碍的同时可诱发中枢电压依赖性钾通道亚型的表达改变。

关键词: 东莨菪碱; 电压依赖性钾通道; 逆转录聚合酶链式反应; 记忆障碍

中图分类号: R282.71; R329.251

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2002)04-0241-04

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经系统退行性疾病, 临床主要表现为进行性记忆力减退和智力下降, 在老年人中发病率很高。脑内胆碱能神经元大量丢失及中枢胆碱功能严重低下是 AD 病人的显著病理特征之一。钾通道是目前已知亚型最多的一类细胞膜离子通道, 不同的通道亚型在调节和对细胞功能的影响不同^[1]。中枢神经系统钾离子通道与学习记忆关系密切, 其功能失调可能导致记忆障碍。文献^[2]报道 AD 病人成纤维细胞以及嗅成纤维细胞 113 pS 四己胺敏感的钾通道缺失。本文用大鼠 ip 东莨菪碱(scopolamine)制备记忆障碍模型, 用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法研究胆碱能损伤对几种中枢电压依赖性钾通道亚型 mRNA 表达的影响。

材料与方 法

动物 Wistar 大鼠, δ , 230 ~ 260 g, 购自中国医学科学院实验动物中心。

药品 氢溴酸东莨菪碱购自中国生物制品检定所; Taq DNA 聚合酶, 100 bp DNA marker 购自 MBI;

DEPC 为 Sigma 产品; Trizol 为博大公司产品; dNTPs、琼脂糖(agarose)、RNasin 和 AMV 逆转录酶、寡聚六核苷酸随机引物购自 Promega 公司; PCR 引物均由上海 SANGON 公司合成。

仪器 Morris 水迷宫: 中国医学科学院药物研究所; Gene Amp 2400 型 PCR 仪: 美国 PERKIN-ELMER 公司; 电泳凝胶定量分析系统 EDAS120: 美国柯达公司。

动物模型的制备 将动物随机分为两组, 模型组动物 ip 氢溴酸东莨菪碱 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 对照组动物 ip 空白溶剂生理盐水, bid, 持续 6 d。

Morris 水迷宫实验^[3] 迷宫主要由一个不锈钢制成的直径 120 cm 圆柱形水池和一个可移动玻璃平台组成。水池中水面高出平台 1 cm, 水温控制在 $(23 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, 在水池边缘上等距离设东西南北 4 个标记点, 将水池均等地分为 4 个象限, 站台置于第 1 象限。每天给药后 20 min 进行实验, 每只动物每天训练 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 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 A_{260}/A_{280} 的比值大于 1.8 且 EB 染色后 28 s 和 18 s 两条带清晰可见呈 2:1

收稿日期: 2001-07-10。

基金项目: 国家重点基础研究“973”子课题(GI998051106)。

作者简介: 徐向华(1975-), 男, 博士研究生;

王晓良(1955-), 男, 研究员, 博士生导师。

* 通讯作者 Tel: (010) 63165193, Fax: (010) 63017757,

E-mail: wangxl@imm.ac.cn

并无基因组污染时可用。

逆转录反应 取总 RNA 2 μg, 分别加入下列成分: dNTPs 混合物(每种 dNTP 各 2.5 mmol·L⁻¹) 2.5 μL; 随机引物 0.5 μg; RNasin 20 U; 加无 RNase 水至 19 μL, 混匀后 70 °C 变性 5 min, 迅速冰浴。最后加入 AMV 酶 1 μL; 5X 缓冲液 5 μL 使总反应体系为 25 μL。上述混合物在 42 °C 反应 1 h, 接着 90 °C 变性 5 min 后冰浴, 进行扩增反应, 或在 -70 °C 保存待用。

扩增反应 取以上逆转录产物 2 μL, 分别加入以下成分: dNTP(每种各 2.5 mmol·L⁻¹) 2.0 μL; 特异引物 10 pmol; 10X 缓冲液 2.5 μL; Taq 酶 2 U; 加去离子 DEPC 水使整个反应体系为 25 μL。用以下条件进行 PCR 反应: 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 Kv1.4, Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, Kv4.3 或 18 S ribosomal RNA(内对照) 等量的 PCR 扩增产物(10~20 μL) 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

Name		Primer sequences (5' to 3')	Length/bp
Kv1.4	Sense	CGCAGTCAGTTGCCATACC	501
	Antisense	CTCTCCTCGGACCACCTTT	
Kv1.5	Sense	TCCGAGAGGAGACAATCAC	457
	Antisense	TCCAGACAGAGGCATACAGG	
Kv2.1	Sense	GCTCTGGTTTCTTCGTGGAG	364
	Antisense	CACGCTGTAGAGCAGCTGAC	
Kv4.2	Sense	AAACCAACGAGCGGACAA	301
	Antisense	GTGACTTGAAGGGCGAATTAAC	
Kv4.3	Sense	CCAAGCTGGTGCCTAGTGTCT	589
	Antisense	GGTGTGTGGTCTCGAAGG	

数据统计 通过光密度扫描仪(Kodak Digital Science 1D v3.0.0) 检测并计算出各组中的钾通道电泳条带与内对照 18 S rRNA 条带(灰度为 100%) 的表达量像素灰度的比值, 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 东莨菪碱对大鼠空间学习记忆的影响

大鼠 ip 东莨菪碱 1 mg·kg⁻¹ 可以诱导学习记忆功能障碍模型。在 Morris 水迷宫的实验中, 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, 但是东莨菪碱给药组与空白对照组相比其各天的潜伏期均显著延长 (*P* < 0.05), 图 1。注射东莨菪碱后, 训练 4 d 的搜寻潜伏期总时间由对照

组的(227.7 ± 21.0) s 延长至(422.7 ± 43.7) s, 统计学具有非常显著性差异 (*P* < 0.01)。在训练开始时, 两组动物主要以边缘式和随机式策略寻找站台, 随着训练次数的增加, 这两种搜寻策略的出现逐渐下降, 而对照组的下降速度较模型组为快, 且趋向式和直线式的出现率较模型组增加的速度和程度快。Morris 水迷宫实验证实东莨菪碱可以引起大鼠空间学习记忆障碍。

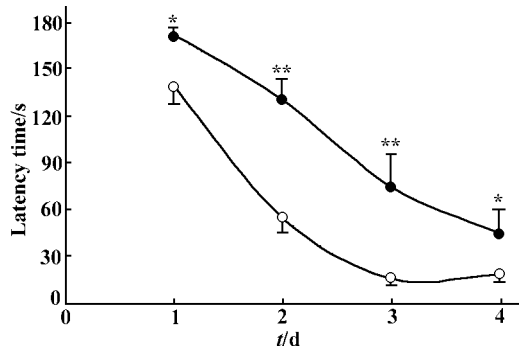


Figure 1 The effect of scopolamine on Morris water maze in rats. Mean latencies to escape from water onto the hidden platform are shown. Each rat was subjected to two trials per day for 4 consecutive days. *n* = 10 for each group. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs saline controls. ○—○ Control; ●—● Scopolamine

2 电压依赖性钾通道亚型在大鼠皮层中的表达

大鼠连续 ip 东莨菪碱 6 d 后取大脑皮层组织, 提取总 RNA, 采用 RT-PCR 检测中枢电压依赖性钾通道亚型的表达改变。发现注射东莨菪碱组 Kv4.2 的表达比对照组平均降低 28.8% (*P* > 0.05), 而对其他亚型的影响较小(图 2, 3)。

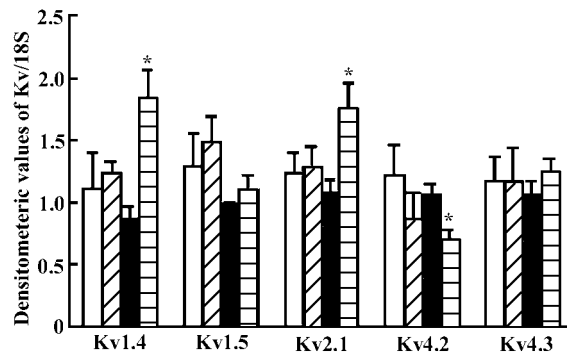


Figure 2 Comparative mRNA expression levels of voltage-dependent potassium channels in rat cerebral cortex and hippocampus. Values are $\bar{x} \pm s$ (*n* = 4). □ CC: Cortex from control group; CS: Cortex from scopolamine group; ■ HC: Hippocampus from control group; HS: Hippocampus from scopolamine group. * *P* < 0.05 vs control group

3 电压依赖性钾通道亚型在大鼠海马中的表达

大鼠连续 ip 东莨菪碱 6 d 后取大鼠海马组织, 提取总 RNA, 检测中枢电压依赖性钾通道亚型的表达改变。发现与对照组相比, 东莨菪碱损伤组

Kv1.4 的表达升高 111.7%, Kv2.1 的表达升高 64.3%, 而 Kv4.2 的表达降低 33.9%, 统计学均具有显著意义 ($P < 0.05$), 对 Kv1.5 和 Kv4.3 的影响则较小(图 2, 3)。

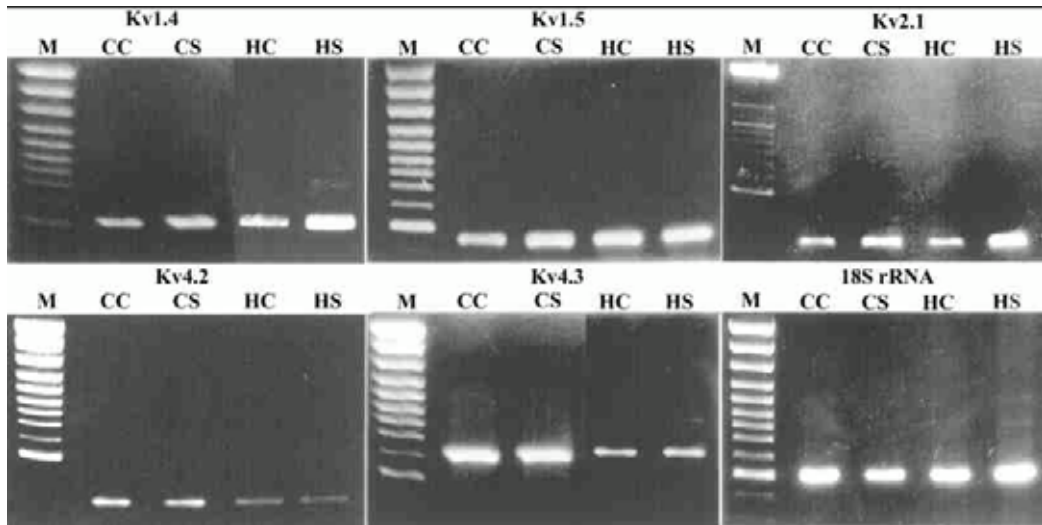


Figure 3 RT-PCR amplification of five voltage-dependent potassium channels, Kv1.4 (501 bp), Kv1.5 (457 bp), Kv2.1 (364 bp), Kv4.2 (301 bp), Kv4.3 (589 bp) and 18S rRNA (500 bp) from rat cortex and hippocampus. M: 100 bp DNA ladder; CC: Cortex from control group; CS: Cortex from scopolamine group; HC: Hippocampus from control group; HS: Hippocampus from scopolamine group. 18S rRNA served as internal control.

讨 论

中枢胆碱能系统与学习记忆关系密切, 许多研究表明中枢胆碱能系统损伤和脑内 β 淀粉样肽的沉积增加之间密切相关, 采用大鼠脑室内注射 β 淀粉样肽或前体蛋白和 APP_{sw} 转基因小鼠研究均发现脑内胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 水平的明显降低^[4,5], 说明中枢胆碱能系统的功能严重受损。有学者用东莨菪碱和阿托品进行了一系列动物和人体实验研究, 结果发现东莨菪碱 $0.4 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能明显抑制动物的主动和被动回避反应、放射状迷宫和水迷宫等多种行为模式的记忆获得过程^[6]。在本实验中, 我们发现应用胆碱能拮抗剂东莨菪碱 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 持续给药可以有效削弱中枢胆碱能神经功能, 造成模型大鼠长期空间学习记忆障碍。

钾通道是决定神经元兴奋性的重要离子通道, 它在学习记忆过程中起着重要作用。在本实验中, 我们选择了几种具有代表性的电压依赖性钾通道亚型, 其中 Kv1.4, Kv4.2, Kv4.3 编码的是快速失活的瞬间外向钾电流, 而 Kv1.5 编码的是快速激活的延迟整流钾电流, Kv2.1 编码的是缓慢激活的延迟整流钾电流。Kv1.4 主要分布于神经细胞的轴突和末

梢, 与动作电位的产生和传播有关; Kv4.2 则主要分布于神经细胞的树突, 与神经细胞的兴奋性和突触的可塑性有关^[7]。Murakoshi 等认为大鼠海马中延迟整流钾电流主要由 Kv2.1 组成^[8], 在海马锥体神经元和抑制性中间神经元直接与星形胶质细胞接触的位置有 Kv2.1 特异性表达, 在调节神经元胞体-树突兴奋性过程中具有重要作用^[9]。

已有文献报道, β 淀粉样肽及胆碱能系统损伤可引起中枢神经系统钾通道活性改变, 但改变的通道亚型则仍不清楚。Good 等^[10]报道 β 淀粉样肽可以抑制海马神经元快速失活的瞬间外向钾电流。而 Song 和 Tkatch 等^[11,12]发现大鼠基底前脑和新纹状体胆碱能神经元中这种快速失活的钾电流主要是由 Kv4.2 编码的钾通道组成。本实验用 RT-PCR 方法研究了钾通道亚型 mRNA 水平的表达, 并发现胆碱能系统阻断后海马区两种瞬间外向钾通道亚型 Kv1.4 和 Kv4.2 分别显著增加和降低。海马中 Kv1.4 和 Kv4.2 在瞬间外向钾电流中所占比例及其表达改变的意义还有待进一步研究。在 β 淀粉样肽引起的海马神经元损伤中伴有延迟整流钾电流的增加^[13], 推测与 Kv2.1 亚型的改变有关, 在我们的研究中持续用东莨菪碱阻断胆碱能受体也发现

Kv2.1 mRNA 表达明显增加,说明 Kv2.1 亚型与早老性痴呆的发病过程可能关系密切,因为在以 β 淀粉样肽为主要病因的早老性痴呆中胆碱能系统功能明显下降。现已证实,神经元钾通道的过度开放可导致兴奋性下降,而持续过度的开放则可引起细胞的损伤和死亡。我们的研究结果为了解早老性痴呆的神经电生理机制,寻找新的治疗靶点提供了依据。

REFERENCES:

- [1] Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, *et al.* Molecular diversity of K⁺ channels [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, **868**:233 - 285.
- [2] Etcheberrigaray R, Ito E, Oka K, *et al.* Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(17):8209 - 8213.
- [3] Morris RGM. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat [J]. *J Neurosci Methods*, 1984, **11**(1):47 - 60.
- [4] Nabeshima T, Nitta A. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by beta-amyloid protein in rats [J]. *Tohoku J Exp Med*, 1994, **174**(3):241 - 249.
- [5] Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, *et al.* Impaired neurotransmitter systems by Abeta amyloidosis in APPsw transgenic mice overexpressing amyloid beta protein precursor [J]. *Neurosci Lett*, 2000, **292**(3):155 - 158.
- [6] Stevens R. Scopolamine impairs spatial maze performance in rats [J]. *Physiol Behav*, 1981, **27**(2):385 - 386.
- [7] Sheng M, Tsaur ML, Jan YN, *et al.* Subcellular segregation of two A-type K⁺ channel proteins in rat central neurons [J]. *Neuron*, 1992, **9**(2):271 - 284.
- [8] Murakoshi H, Trimmer JS. Identification of the Kv2.1 K⁺ channel as a major component of the delayed rectifier K⁺ current in rat hippocampal neurons [J]. *J Neurosci*, 1999, **19**(5):1728 - 1735.
- [9] Du J, Tao Cheng JH, Zerfas P, *et al.* The K⁺ channel, Kv2.1, is opposed to astrocytic processes and is associated with inhibitory postsynaptic membranes in hippocampal and cortical principal neurons and inhibitory interneurons [J]. *Neuroscience*, 1998, **84**(1):37 - 48.
- [10] Good TA, Smith DO, Murphy RM. Beta-amyloid peptide blocks the fast-inactivating K⁺ current in rat hippocampal neurons [J]. *Biophys J*, 1996, **70**(1):296 - 304.
- [11] Song WJ, Tkatch T, Baranauskas G, *et al.* Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits [J]. *J Neurosci*, 1998, **18**(9):3124 - 3137.
- [12] Tkatch T, Baranauskas G, Surmeier DJ. Kv4.2 mRNA abundance and A-type K⁺ current amplitude are linearly related in basal ganglia and basal forebrain neurons [J]. *J Neurosci*, 2000, **20**(2):579 - 588.
- [13] Yu SP, Farhangrazi ZS, Ying HS, *et al.* Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death [J]. *Neurobiol Dis*, 1998, **5**(2):81 - 88.

mRNA EXPRESSIONS OF VOLTAGE DEPENDENT POTASSIUM CHANNELS IN THE BRAIN OF SCOPOLAMINE INDUCED MEMORY IMPAIRED RATS

XU Xiang-hua, PAN Ya-ping, 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 difference of voltage-dependent potassium channels in the brain of scopolamine-induced memory impaired rats. **METHODS** Memory impairments induced in rats by scopolamine (1 mg·kg⁻¹) were assessed in the Morris water maze test. After rats were injected intraperitoneally with scopolamine for 6 days, the mRNA expression level of five voltage-dependent potassium channels, Kv1.4, Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2 and Kv4.3 were detected in the rat cortex and hippocampus by RF-PCR. **RESULTS** Scopolamine (1 mg·kg⁻¹) was shown to significantly induce memory impairment in rats. The mRNA levels of Kv4.2 were decreased by 28.8% and 33.9% in the cortex and hippocampus, respectively. The mRNA levels of Kv1.4 and Kv2.1 were increased in the hippocampus by 111.7% and 64.3%, respectively. There were no differences in the brain mRNA levels of other voltage-dependent potassium channels in scopolamine-induced memory impaired rat. **CONCLUSION** The mRNA expression levels of voltage-dependent potassium channels changed significantly in the brain of scopolamine-induced memory impaired rats.

KEY WORDS: scopolamine; RF-PCR; voltage-dependent potassium channels; Alzheimer's disease