

- cology of metals[M]. Brussels:Academic Press,2007:446-486.
- [3] 胡斌丽,王克跃,许洁,等.不同铁含量饲料对镉致大鼠肾毒性影响[J].中国公共卫生,2010,26(10):1287-1288.
- [4] 杨敬华,徐兆发,徐斌,等.镉致大鼠肾脏毒性机制研究[J].中国公共卫生,2007,23(7):887-888.
- [5] Liu J,Ou W,Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis[J]. Toxicology and Applied Pharmacology,2009,228(3):209-214.
- [6] Bokori J,Fekete S,Glavits R,et al. Complex study of the physiological role of cadmium[J]. Acta Vet Hung,1996,44:57-74.
- [7] 朱善良,陈龙,高伟,等.镉致大鼠睾丸脂质过氧化及酶活性变化研究[J].中国公共卫生,2003,19(6):707-709.
- [8] 李君,潘家荣,魏益民.铅镉联合作用对大鼠肾脏脂质过氧化影响[J].中国公共卫生,2007,23(8):957-958.
- [9] Thijssen S,Marinwa J,Faes C,et al. Chronic exposure of mice to environmentally relevant,low doses of cadmium leads to early renal damage,not predicted by blood or urine cadmium levels [J]. Toxicology,2007,229(1-2):145-156.

收稿日期:2010-12-01

(王奕编辑 张翠校对)

· 实验研究 ·

甲基苯丙胺对瞬时外向钾电流影响*

王军¹,蒋雷²,环飞¹,程洁¹,高蓉¹,肖杭¹

摘要:目的 观察甲基苯丙胺(Meth)对瞬时外向钾电流的影响及原因。方法 将怀孕 18 d SD 大鼠胎鼠海马神经元分为对照组和 Meth 处理组,利用全细胞膜片钳方法记录外向瞬时钾电流变化;采用原位末端转移酶标记技术(TUNEL)观察 Meth 引起的细胞损伤作用;利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法观察瞬时外向电流成分中 Kv1.4、Kv4.1、Kv4.2 和 Kv4.3 表达,并通过 western-blot 方法观察 Kv4.2 蛋白表达。结果 与对照组[(87.4 ± 12.5) pA/pF]比较,Meth 能引起瞬时外向钾电流增大[(120.1 ± 19.6) pA/pF] ($P < 0.01$),与对照组(1.00 ± 0.18)比较,Meth 处理组凋亡率为对照组的(7.11 ± 0.95)倍 ($P < 0.01$),钾通道抑制剂 4-氨基吡啶(4-AP)明显抑制神经元凋亡 ($P < 0.01$);Kv4.2 可能是外向电流成分中主要贡献者,Meth 能上调 Kv4.2 通道蛋白表达;与 Kv4.2 上调密切相关的 Kchip2/3、Kchip4、CaMK2 蛋白表达增高。结论 Meth 引起的瞬时钾电流增大可能通过 Kv4.2 上调来实现,但其机制仍需进一步探讨。

关键词:甲基苯丙胺(Meth);瞬时外向钾电流;Kv4.2;细胞凋亡

中图分类号:R 181.2⁺4

文献标志码:A

文章编号:1001-0580(2013)01-0081-03

Effects of methamphetamine on transient outward K⁺ currents

WANG Jun*, JIANG Lei, HUAN Fei, et al (* Department of Toxicology, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu Province 210029, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of methamphetamine (Meth) on the transient outward K⁺ currents and its mechanisms. Methods Hippocampal neurons were harvested from 18-day-old embryonic rats and divided into control and Meth treated group. The currents were recorded with the whole cell patch clamp and the cell damage was detected by the TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. The mRNA expressions of Kv1.4, Kv4.1, Kv4.2, and Kv4.3 were evaluated by reverse transcription-PCR (RT-PCR). Furthermore, the expression of Kv4.2 was detected with western-blot after the treatment of Meth. Results Meth significantly increased the transient outward K⁺ currents (120.1 ± 19.6 pA/pF, $P < 0.01$) compared with the control group (87.4 ± 12.5 pA/pF) and caused neuronal damage (control group: 1.00 ± 0.18 vs Meth treated group: 7.11 ± 0.95, $P < 0.01$). However, 4-aminopyridine (4-AP), the antagonist of the transient currents, substantially retarded the cell damage induced by Meth (4.96 ± 1.32, $P < 0.01$). Moreover, Kv4.2 might be the main contributor in transient currents. With western-blot assay, we observed that Meth up-regulated the Kv4.2 expression and the expressions of Kchip2/3, Kchip4, and CaMK2, which were closely associated with the expression of Kv4.2, were also up-regulated. Conclusion The up-regulation of Kv4.2 might be involved in Meth induced transient outward K⁺ current increments, however, the mechanisms still need to be clarified.

Key words: methamphetamine; transient outward K⁺ current; Kv4.2; cell apoptosis

甲基苯丙胺(Meth)俗称冰毒,是目前最为常见的精神兴奋剂之一,全世界约有 1 500 ~ 1 600 万使用者,仅次于大麻,Meth 滥用已经成为国际重大公共卫生问题^[1]。Meth 滥用可引起一系列负面作

用^[2],研究表明,Meth 可引起神经退行性改变^[3]。尽管目前 Meth 毒性及其机制已经部分明确,但大多数研究仍集中于对多巴胺能和血清素能神经元探讨。而 Meth 造成皮层灰质、海马神经元损伤机制

* 基金项目:国家自然科学基金(81072329)

作者单位:1. 南京医科大学公共卫生学院 教育部重点实验室,江苏 南京 210029; 2. 江苏省人民医院急诊中心

作者简介:王军(1981-),江苏泰州人,讲师,博士,研究主向:神经药理及毒理学。

通讯作者:肖杭,E-mail:hxiao@njmu.edu.cn

仍然不明。研究发现, Meth 使用者脑形态发生明显变化, 尤其是海马发生明显收缩^[4]。而电压依赖性钾通道(Kv)对维持细胞体积, 介导细胞凋亡起重要作用^[5], 因此, 基于 Meth 可引起海马形态学变化及钾离子在细胞体积维持中作用, 本研究采用怀孕 18 d SD 大鼠胎鼠海马神经元, 观察甲基苯丙胺(Meth)对瞬时外向钾电流影响及原因, 结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 清洁级怀孕 18 d SD 大鼠(南京医科大学实验动物中心), 许可证号: SYXK(苏)2008-0007, 以胎鼠海马神经元为研究对象。兔抗微管相关蛋白 2(microtubule associated protein-2, MAP-2)(美国 Invitrogen 公司), 兔抗 Kv4.2(美国 chemicon 公司), 小鼠抗 pan-KChIP(美国 NeuroMab 公司), 兔抗 CaMK2 抗体(美国 abcam 公司), methamphetamine、小鼠抗 β -actin(美国 Sigma 公司), 原位末端转移酶标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)试剂盒(美国 Roche 公司), 无血清培养液、B27(美国 Gibco 公司)。电极制备: 记录用的微电极用硼化玻璃毛细管(内径 1.6 mm, 美国 WPI 公司)经微电极二步拉制仪(美国 Sutter 公司)两步拉制而成。充灌内液后, 电极电阻阻抗为 3~6 M Ω 。

1.2 海马神经元分离 取出海马组织, 剪碎, 用 0.25% 蛋白胰酶, 同时加入 100 μ L 的 DNase 消化, 15~20 min 后, 以胎牛血清中和, 吹打细胞, 离心; 加入汉克平衡盐缓冲液(hanks balanced salt solution, HBSS), 吹打分离, 先后经 100、40 μ m 网筛过滤。离心, 弃上清, 加入细胞培养液, 吹打使细胞悬浮。计数, 以适当密度接种于培养皿中, 每 3 d 细胞换液。细胞以抗神经元特异性抗体 MAP-2 进行鉴定。

1.3 全细胞膜片钳记录 采用全细胞电压钳记录模式, 给予细胞一组从 -80 mV 至 +80 mV、以 20 mV 递增的去极化刺激方波, 持续时间为 200 ms, 引出 4-AP 敏感型电流。利用 AXON 1440A 数模转换器对信号进行收集, 采集和滤波频率分别为 5 和 1 kHz, 所记录电流经放大器放大后, 采集储存于计算机中。系统电阻、漏电流和电容电流由手动补偿, 慢电容补偿率 75%~80%。所有记录均在室温(21 \pm 2) $^{\circ}$ C 下完成。

1.4 TUNEL 实验检测细胞凋亡 实验步骤参照试剂盒说明。凋亡细胞呈现绿染, 4',6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐(4'-6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染核呈蓝色, 荧光显微镜在 400 倍下, 各处理组随机选取 10 个视野, 平行双样, 重复 3 次, 计算各处理组凋亡率 = 绿染细胞数/DAPI 蓝染细胞总数 \times 100%, 将对对照组细胞凋亡率标化为 1, 进行各组间细胞凋

亡比较。

1.5 Kv1.4、4.1、4.2、4.3 表达 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法, 引物序列如下: Kv1.4: 上游 5'-CCATACCTACCTTCTAAT-3', 下游 5'-TCACACATCAGTCTCCAC-3'。Kv4.1: 上游 5'-TCACAGGGAAGAGATCTTGA-3', 下游 5'-ACTAGCGGGTCTTCGGAGGA-3'。Kv4.2: 上游 5'-CCGAATCCAAATGCCAATGTG-3', 下游 5'-CCTGACGATGTTTCTCCCGAATA-3'。Kv4.3: 上游 5'-GCAAGCGCAATGGACTCCTCAA-3', 下游 5'-GAAGGGCTTCTGGTGGATGGGTAG-3'。GAPDH: 上游 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3', 下游 5'-AGGTGGAAGAATGGGAGTTG-3'。反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 28 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 10 min 72 $^{\circ}$ C 末次延伸。对于 Kv1.4, 退火温度设为 52 $^{\circ}$ C, 其余相同。

1.6 Western-blot 检测 Kv4.2 表达 海马神经元经 Meth 处理后, 提取总蛋白, 蛋白上样量为 10 μ g, 电泳, 转膜, 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。二抗孵育 1 h, 化学发光液显色, 曝光。灰度以 ImageJ 软件进行分析。

1.7 统计分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由 Clamfit 10、Origin 8 和 SigmaPlot 软件分析处理, 应用单因素方差分析或 *t* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

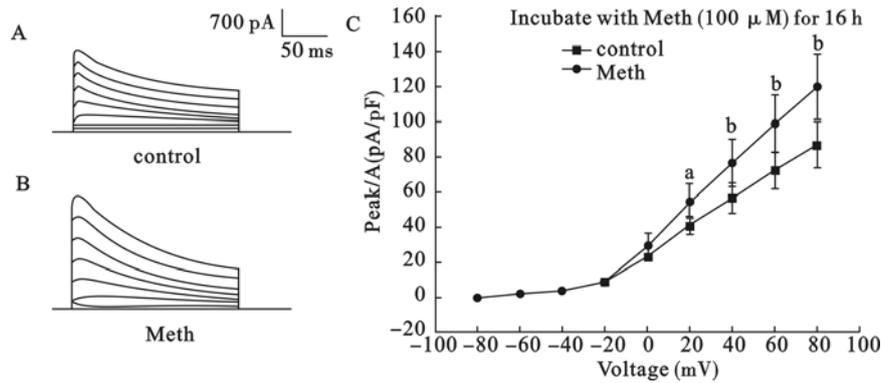
2 结果

2.1 Meth 对瞬时外向钾电流影响(图 1) 电生理结果显示, 对照组和 Meth 处理组(图 1B) 4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP)敏感型钾电流分别为(87.4 \pm 12.5) PA/PF($n=10$)和(120.1 \pm 19.6) pA/pF($n=7$), 与对照组比较(图 1A), Meth 组明显增大($t=-4.901, P<0.01$)。

2.2 Meth 对海马神经元凋亡作用 细胞与 1 000 μ mol/L Meth 共同孵育 48 h, 然后利用 TUNEL 的方法观察神经元凋亡。Meth 处理组与对照组(1.00 \pm 0.18)比较, 细胞凋亡率为对照组的(7.11 \pm 0.95)倍($P<0.01$)。与 Meth 处理组比较, 钾通道抑制剂 4-AP(1 mmol/L)干预组(4.96 \pm 1.32)细胞凋亡明显降低($F=67.495, P<0.01$)。

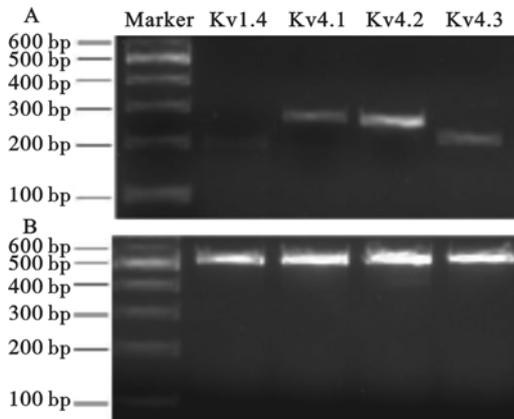
2.3 瞬时外向钾电流主要成分在海马神经元中表达(图 2) 结果显示, Kv4.2 mRNA 表达较其余 3 种亚型钾通道为高, 图 2B 为内参 GAPDH 表达条带。

2.4 Meth 对 Kv4.2 蛋白表达影响(图 3) 细胞与 100 μ mol/L Meth 分别孵育 4、16 h 后, Kv4.2 表达明显增高(图 3A)。同时明显上调 KchiP 家族中 KchiP2、KchiP3/4(图 3C)以及 CaMK2(图 3B)表达, 而 KchiP1 条带则没有明显变化。



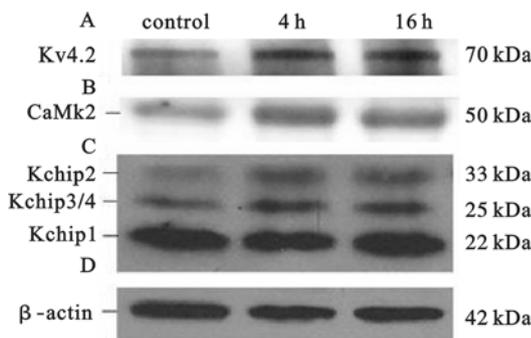
注:A、B:分别为对照组、Meth 处理组瞬时外向钾电流;C:瞬时外向钾电流密度 I-V 曲线(a $P < 0.05$, b $P < 0.01$)。

图 1 Meth 孵育 16 h 对瞬时外向钾电流影响



注:A:Kv1.4、4.1、4.2 和 4.3 mRNA 表达条带; B:GAPDH 表达条带。

图 2 海马神经元中主要瞬时外向钾通道表达



注:A:Kv4.2 蛋白表达;B:CaMK2 表达;C:Kchip1、2、3、4 蛋白表达;D: β -actin 表达。

图 3 Meth 对海马神经元中 Kv4.2 及 Kchip 蛋白表达影响

3 讨论

外向钾电流主要包含 2 种电流成分即瞬时外向和延迟整流型成分,前者可被 4-AP 拮抗,称为 4-AP 敏感型钾电流,后者可被四乙胺(tetraethylamine, TEA)阻断,称为 TEA 敏感型钾电流。在外液中加入 20 mM/L TEA,可对 4-AP 敏感型电流进行记录。本研究结果显示,Meth 明显增大瞬时外向钾电流,抑制剂 4-AP 则明显抑制由 Meth 引起的神经元损

伤,提示 4-AP 敏感型钾通道可能是 Meth 引起海马神经元损伤靶点之一。海马神经元中存在 Kv1.4、4.1、4.2、4.3 等多种瞬时外向成分。其中 Kv4.2 在调节神经元兴奋中及可塑性过程中起重要作用^[6]。本研究结果亦表明 Kv4.2 在海马神经元中表达最为丰富,提示 Kv4.2 可能在 Meth 引起的细胞损伤中起作用。此外,Meth 与细胞作用 4、16 h 后明显上调海马神经元中 Kv4.2 表达,这一现象与电生理实验中 Meth 引起瞬时外向电流增大结果一致。最近,有研究指出,在海马神经元中,Kv4.2 表达和 CaMK2 以及 Kchip 家族蛋白表达相关^[7-8]。前者上调可引起 Kv4.2 表达增高,后者 Kchip 家族蛋白中,Kchip2、Kchip3/4 与 Kv4.2 共定位于海马神经元中,在 Kv4.2 由胞浆向胞膜转移过程中起关键作用^[8]。本研究结果表明,Meth 作用神经元后,CaMK2 和 Kchip2、Kchip3/4 表达均增高,提示 Meth 可能一方面通过 CaMK2 促进 Kv4.2 高表达,另一方面通过上调 Kchip2、Kchip3/4 促进 Kv4.2 向胞膜上转移,引起电流增大。

参考文献

- [1] Krasnova IN, Cadet JL. Methamphetamine toxicity and messengers of death[J]. Brain Research Reviews, 2009, 60: 379-407.
- [2] 戴捷, 余小燕, 梅启明, 等. 甲基苯丙胺对大鼠心肌线粒体抗氧化酶的影响[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(10): 1190-1192.
- [3] Sekine Y, Ouchi Y, Sugihara G, et al. Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers[J]. J Neurosci, 2008, 28: 5756-5761.
- [4] Thompson PM, Hayashi KM, Simon SL, et al. Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine[J]. J Neurosci, 2004, 24: 6028-6036.
- [5] Yu SP. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis[J]. Progress in Neurobiology, 2003, 70: 363-386.
- [6] Lei Z, Deng P, Xu ZC. Regulation of Kv4.2 channels by glutamate in cultured hippocampal neurons[J]. Journal of Neurochemistry, 2008, 106: 182-192.
- [7] Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, et al. Calcium-calmodulin-dependent kinase II modulates Kv4.2 channel expression and up-regulates neuronal A-type potassium currents[J]. J Neurosci, 2004, 24: 3643-3654.
- [8] Rhodes KJ, Carroll KI, Sung MA, et al. KChIPs and Kv4 alpha subunits as integral components of A-type potassium channels in mammalian brain[J]. J Neurosci, 2004, 24: 7903-7915.