

## TEA 敏感型钾电流在 gp120 引起的海马神经元损伤中的作用

余鹏飞<sup>1</sup>, 蒋雷<sup>2</sup>, 钱文溢<sup>3</sup>, 周景<sup>3</sup>, 王易欣<sup>3</sup>, 肖杭<sup>3</sup>, 王军<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学公共卫生学院预防医学专业, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院急诊中心, 江苏 南京 210029; <sup>3</sup>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)

**[摘要]** 目的:探讨 gp120 对 TEA 敏感型钾电流的作用以及该电流在 gp120 引起神经元损伤中的作用。方法:分离怀孕 18 d SD 大鼠胎鼠的海马神经元作为实验对象,分为对照组和 gp120 处理组,利用全细胞膜片钳的方法记录外向延迟钾电流的变化,通过 MTT 和 TUNEL 的方法分别观察 gp120 处理后神经元的活力和凋亡情况。Western blot 观察 Kv2.1 钾通道的蛋白表达变化以及在 TEA 敏感型钾电流中的贡献度。结果:gp120 能引起外向钾电流明显增大,具有浓度依赖性,其中 TEA 敏感型成分参与了外向钾电流的增大。此外,MTT 和 TUNEL 实验发现,gp120 能引起神经元活力的下降和凋亡,而钾通道抑制剂 TEA 能缓解由 gp120 引起的细胞损伤。进一步实验表明,gp120 可上调 TEA 敏感型成分中 Kv2.1 钾通道的表达,且其特异性抑制剂 GxTX-1E 能显著抑制神经元中 TEA 敏感型钾电流成分。结论:TEA 敏感型钾电流参与了 gp120 引起的神经元损伤过程,其重要组成成分 Kv2.1 通道蛋白上调,提示该通道蛋白可能参与了 gp120 引起的细胞损伤。

**[关键词]** gp120; TEA 敏感型钾电流; 海马神经元; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R512.91

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)01-011-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150103

## Involvements of TEA sensitive K<sup>+</sup> currents in gp120 induced hippocampal neuronal apoptosis

Yu Pengfei<sup>1</sup>, Jiang Lei<sup>2</sup>, Qian Wenyi<sup>1</sup>, Zhou Jing<sup>1</sup>, Wang Yixin<sup>1</sup>, Xiao Hang<sup>1</sup>, Wang Jun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Preventive Medicine, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Key Lab of Modern Toxicology, Ministry of Education, Department of Toxicology, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of gp120 on TEA sensitive K<sup>+</sup> currents and the role of the currents in gp120 induced neuronal apoptosis. **Methods:** Hippocampal neurons were harvest from 18-day-old embryonic rats and divided into two groups: the control and the gp120 treated group. The outward delayed K<sup>+</sup> currents were recorded by performing the whole cell patch clamp, subsequently the cell viability as well as neuron apoptosis were evaluated by MTT and TUNEL assay, respectively. Moreover, the protein expression of Kv2.1, a subtype of TEA sensitive K<sup>+</sup> channel, was detected by Western blot. **Results:** Gp120 significantly increased the outward K<sup>+</sup> currents in a dose-dependent manner, and the TEA sensitive K<sup>+</sup> currents were participated in K<sup>+</sup> currents increment mediated by gp120. The MTT and TUNEL results revealed that gp120 substantially decreased the cell viability and enhanced the cell apoptosis, while the K<sup>+</sup> antagonist TEA was effectively decreased gp120 induced cell damage. Moreover, the expression and contribution of Kv2.1 on TEA sensitive K<sup>+</sup> currents was significantly up-regulated by gp120. And the specific blocker, GxTX-1E, was used for evaluating the role of Kv2.1 in TEA sensitive K<sup>+</sup> currents. **Conclusion:** TEA sensitive K<sup>+</sup> currents were involved in gp120 induced neuronal damage, and the subtype Kv2.1, which was up-regulated by gp120, might exert effects on gp120 induced cell damage.

**[Key words]** gp120; TEA sensitive K<sup>+</sup> currents; hippocampal neuron; cell apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(01):011-016]

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81072329);国家自然科学基金青年基金(81202230);南京医科大学科技发展基金(2011NJMU275);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(CX09B-264Z);临床医学科技专项(SBL2014020070)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangjun@njmu.edu.cn

目前,全世界有超过四千万人感染人类免疫缺陷病毒(HIV)<sup>[1]</sup>。现研究表明,HIV 不仅对人体免疫系统造成破坏,还会引起一系列神经系统疾病,通常称之为 HIV 相关性认知障碍(HAND)。主要表现为:认知、运动和行为的异常<sup>[2]</sup>。根据神经、行为以及神经心理学测试,又可将其划分为无症状神经认知功能损害(ANI)、HIV 相关性轻度神经认知紊乱(MND)和 HIV 相关性痴呆(HAD),其中以 HAD 最为严重<sup>[3]</sup>。目前认为,由病毒颗粒及巨噬细胞、小胶质细胞释放出的一些可溶性的小分子如:喹啉、花生四烯酸、一氧化氮、趋化因子、炎症因子以及病毒蛋白 gp120 和 Tat 对神经元的损伤和死亡关系密切<sup>[4-5]</sup>。其中,HIV 壳蛋白 gp120 被认为是造成 HAND 患者神经元细胞功能缺失和死亡的主要病原体<sup>[6]</sup>,但其损伤机制仍不清楚。越来越多的研究表明:离子通道与细胞的凋亡存在联系,尤其是钾通道<sup>[7]</sup>。因此,本实验以钾电流作为研究对象,探讨了 gp120 是否通过钾通道这一靶点,进而造成海马神经元的损伤。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级 18 d SD 孕大鼠由南京医科大学实验动物中心提供。HBSS 缓冲液(Cellgro 公司,美国),兔抗大鼠 MAP-2 抗体(Chemicon 公司,美国),兔抗大鼠 Kv2.1(Abcam 公司,美国), $\beta$ -actin(Sigma 公司,美国),羊抗兔、羊抗小鼠过氧辣根酶二抗(Jackson 公司,美国),Alexa Fluor-594 标记的羊抗兔二抗(Invitrogen 公司,美国),TUNEL 试剂盒(In situ cell death Detection Kit,Fluorescein)(Roche 公司,美国),荧光包被液(含 DAPI)(VECTOR 公司,德国),Gp120 (Immunodiagnosics 公司,美国)。DNase (2 000 U/ml),MTT、钾离子通道抑制剂 4-AP、TEA(Sigma 公司,美国)。GxTX-1E 由美国 Dr. Herrington 馈赠。无血清培养液中 Neurobasal medium、B27、青链霉素(100 U/ml)、胎牛血清(Gibco 公司,美国),谷氨酰胺(0.5  $\mu$ mol/L)(Sigma 公司,美国)。电极内液(mmol/L):K-gluconate 120,KCl 10,NaCl 5,CaCl<sub>2</sub> 1,MgCl<sub>2</sub> 2,EGTA 11,HEPES 10,Mg-ATP 2,GTP 1。KOH 调节 pH 值至 7.3;电极外液(mmol/L):NaCl 140,KCl 5,CaCl<sub>2</sub> 2.5,HEPES 10,glucose 10,TTX 1  $\mu$ mol/L。NaOH 调节 pH 至 7.3,渗透压为 300~310 mOsm,以上内外液所有成分,以及文中涉及到的其他试剂均购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 海马神经元的分离与处理

小心取出海马组织,至于冰浴的 HBSS 液中,剪碎,用 0.25% 的蛋白胰酶,同时加入 100  $\mu$ l 的 DNase 进行消化,15~20 min 后,以胎牛血清中和,吹打细胞,使其充分分离,离心;细胞取出后加入 HBSS 液,吹打使细胞分离,先后经 100  $\mu$ m 和 40  $\mu$ 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 进行细胞的换液。9~11 d,加入不同浓度的 gp120 处理不同时间后,观察 gp120 对 TEA 敏感型钾通道电流及神经元损伤的变化。

#### 1.2.2 电极制备

记录用的微电极用硼化玻璃毛细管(内径 1.6 mm,WPI 公司,美国)经微电极二步拉制仪(Sutter,P-97,美国)两步拉制而成。充灌内液后,电极电阻的阻抗为 3~6 M $\Omega$ 。

#### 1.2.3 全细胞膜片钳记录

采用全细胞电压钳记录模式(voltage-clamp recordings),参考电极为 Ag-AgCl 电极,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 kHz 和 1 kHz,所记录的电流经放大器(Axon 公司,美国)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%。所有的记录均在室温(21  $\pm$  2) $^{\circ}$ C 下完成。

#### 1.2.4 MTT 检测细胞活性

参考孙治坤等<sup>[8]</sup>的实验步骤,各组细胞处理后,在 96 孔板中,逐孔加入 10  $\mu$ l MTT 磷酸缓冲液(2 mg/ml),2 h 后,去上清,加入 100  $\mu$ l DMSO 摇匀,570 nm 波长处测定吸光值。

#### 1.2.5 TUNEL 实验检测细胞凋亡

实验步骤参照试剂盒说明及娄华等<sup>[9]</sup>的方法。凋亡细胞呈现绿染,DAPI 染核呈蓝色,荧光显微镜在 400 倍放大倍数下,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%,将对照组细胞的凋亡率标化为 1,进行各组间细胞凋亡的比较。

#### 1.2.6 Western blot 检测 Kv2.1 的表达

海马神经元经 gp120 处理后,提取总蛋白,蛋白上样量为 10  $\mu$ g,电泳,转膜,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。然后二抗孵育 2 h,ECL 发光液显色,曝光。灰度以 Image J 软件进行分析。

### 1.3 统计学方法

所有数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,由

Clamfit 10(Axon Instrument, 美国)、Origin8 (Origin-Lab, 美国) 和 SigmaPlot (Jandel Scientific, 美国) 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,  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Gp120 对外向钾电流的作用

分离的海马神经元经 9~11 d 培养, 给予 0、10、100、1 000 pmol/L gp120 处理 2、4、16 h 后, 观察外

向钾电流的变化。给予细胞 1 组 -80~+80 mV, 持续时间为 200 ms 的去极化电压, 结果显示, gp120 处理细胞 2 h 后, 0、10、100、1 000 pmol/L gp120 处理组的电流和 4 h 后相应浓度的电流比较, 没有明显的改变 ( $P > 0.05$ )。而 gp120 作用神经元 16 h 后(图 1), 外向钾电流明显增大, 呈浓度依赖性的关系[对照组、10、100、1 000 pmol/L gp120 处理组分别为  $(70.3 \pm 12.3)$ 、 $(77.9 \pm 23.1)$ 、 $(111.7 \pm 29.6)$  和  $(117.7 \pm 29.5)$  pA/pF,  $n \geq 7$ ], 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

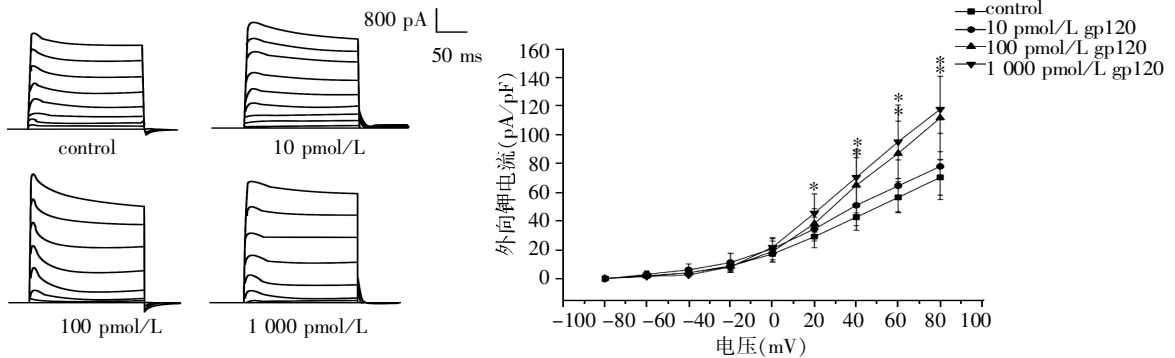


图 1 Gp120 作用细胞 16 h 后对外向钾电流的影响

Figure 1 The outward K<sup>+</sup> currents when the cells were treated with gp120 for 16 h

### 2.2 Gp120 对 TEA 敏感型钾电流的作用

研究表明, 外向钾电流主要包含两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, 称之为 4-AP 敏感型钾电流, 后者可被 TEA 阻断, 称之为 TEA 敏感型钾电流<sup>[10]</sup>。100 pmol/L gp120 处理细胞 16 h 后, 利用 4-AP 拮抗 4-AP 敏感型电流成分这一特性, 在含 5 mmol/L 4-AP 的外液中对 TEA 敏感型钾电流进行记录。结果显示, gp120 作用细胞后, 能明显增大细胞 TEA 敏感型钾电流[对照组  $(59.0 \pm 6.3$  pA/pF,  $n=9$ ); gp120 处理组  $(71.2 \pm 10.9$  pA/pF,  $n=10$ ), 图 2], 引起钾离子的外流。

### 2.3 钾离子外流对 gp120 引起神经元损伤的作用

上述结果表明, gp120 引起外向钾电流的增大, 促进钾离子的外流。接着, 将细胞与 500 pmol/L gp120 共孵 48 h, 观察钾离子外流与细胞损伤之间的关系。TUNEL 的结果表明, gp120 处理组 TUNEL 绿染的细胞  $[(218.3 \pm 67.0)\%]$  与对照组  $[(100.0 \pm 17.4)\%]$  比较, 凋亡明显增多(图 3A)。而钾通道抑制剂 TEA  $[(121.8 \pm 36.8)\%]$ , 以及培养液中加入 25 mmol/L KCl 溶液  $[(97.3 \pm 34.9)\%]$  能明显减少 gp120 引起的细胞凋亡(图 3B)。MTT 结果显示(图 3C), TEA  $[(92.1 \pm 3.1)\%]$  和 KCl  $[(93.0 \pm 1.9)\%]$

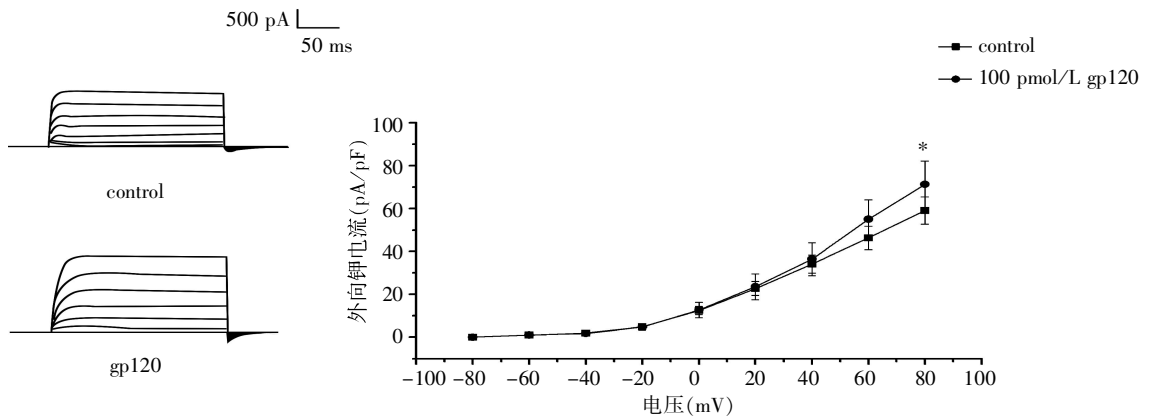


图 2 gp120 对 TEA 敏感型钾电流的影响

Figure 2 The effects of gp120 on TEA sensitive K<sup>+</sup> currents

干预组与 gp120 处理组[(78.5 ± 2.1)%]比较,神经元的活力明显增强。这一结果和 TUNEL 实验结果一致。

#### 2.4 gp120 对钾通道 Kv2.1 表达的影响

据报道,Kv2.1 与细胞的凋亡密切相关,是 TEA 敏感型钾电流重要的组成部分<sup>[11]</sup>。Western blot 结果显示,正常海马神经元激活状态下 Kv2.1 的表达极低,而 100 pmol/L gp120 处理 6 h 和 16 h 后,Kv2.1 的蛋白表达显著增高,具有统计学差异( $P < 0.01$ ,图 4)。

#### 2.5 Kv2.1 引起的电流对于 TEA 敏感型钾电流的

贡献度比较

利用 Kv2.1 特异性拮抗剂 GxTX-1E<sup>[12]</sup>,观察正常状态下 Kv2.1 在 TEA 敏感型电流中的贡献度大小。结果显示,25、50、100 nmol/L GxTX-1E 作用细胞后与 control 组比较,TEA 敏感型电流明显降低[control 组:(100.8 ± 19.8)%;25 nmol/L GxTX-1E:(68.3 ± 15.5)%;50 nmol/L GxTX-1E:(57.9 ± 9.6)%和 100 nmol/L GxTX-1E:(61.1 ± 11.6)%, $n \geq 8$ ,图 5],其中 50 nmol/L 处理组和 100 nmol/L 处理组比较,没有显著性差异( $P > 0.05$ ),提示 50 nmol/L GxTX-1E 对于 Kv2.1 的抑制可能已经达到饱和作用。

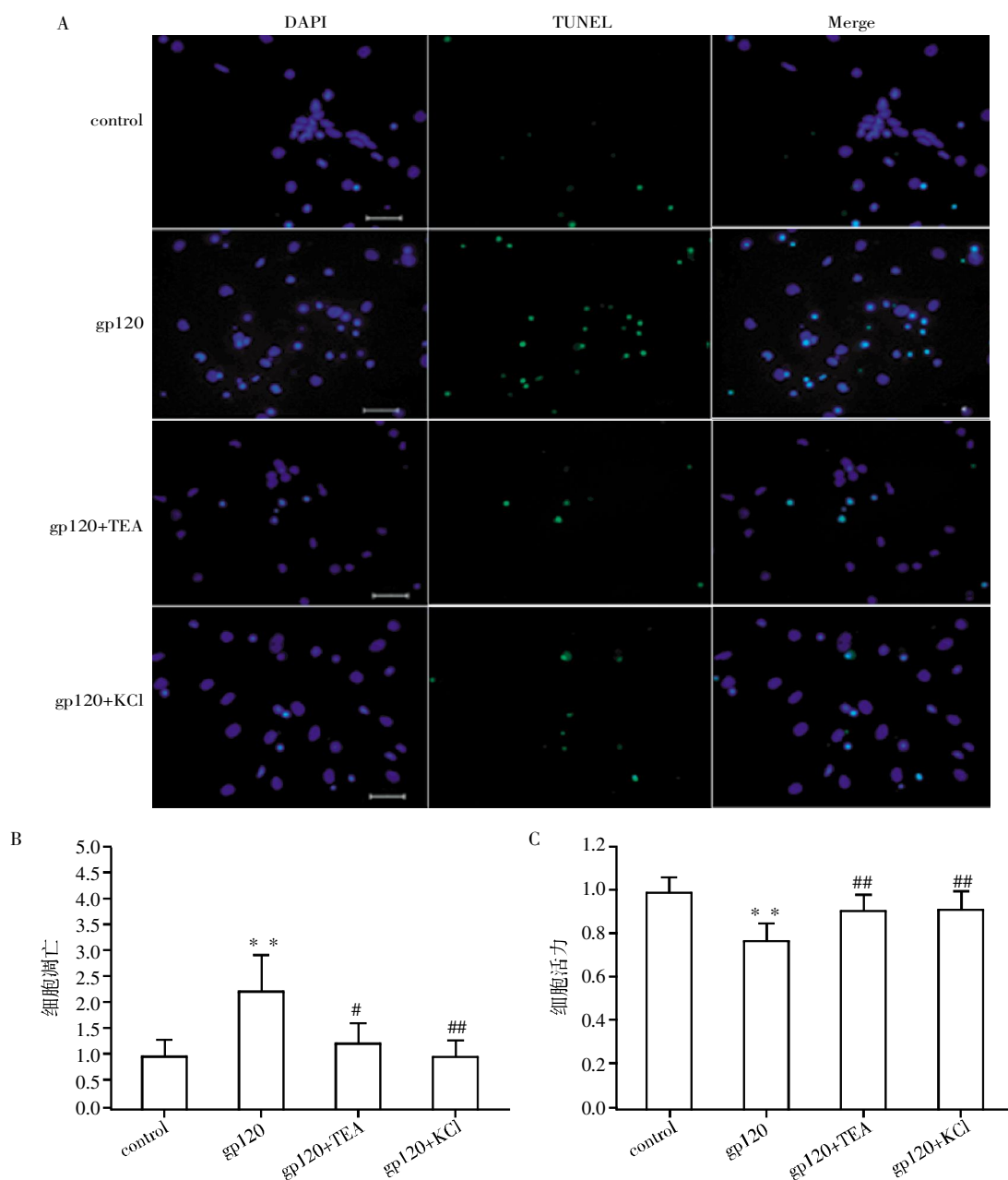
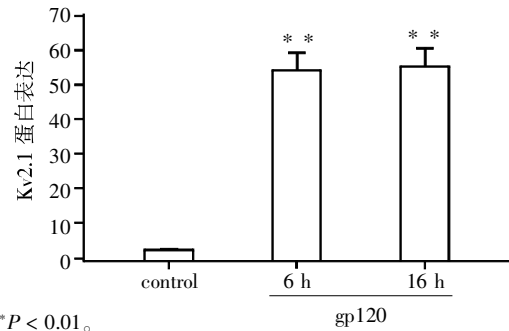
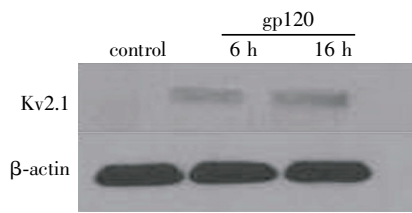


图 3 gp120 对海马神经元的损伤作用

Figure 3 The adverse effects of gp120 on hippocampal neurons



与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

图 4 gp120 对 Kv2.1 钾通道表达的影响

Figure 4 The effects of gp120 on Kv2.1 expression

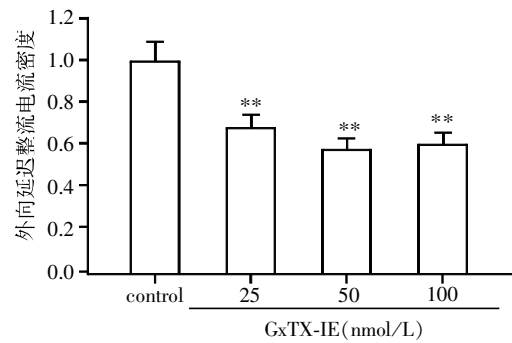
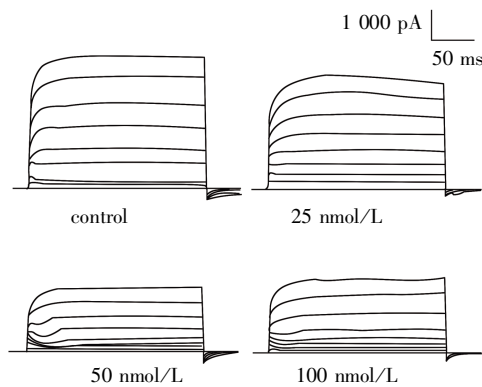


图 5 Kv2.1 在 TEA 敏感型钾电流成分中的贡献度

Figure 5 The contribution of Kv2.1 on TEA sensitive K<sup>+</sup> currents

### 3 讨论

尽管高活性抗逆转录病毒疗法(HAART)的应用相对减少了 HAND 的发病率,但目前仍有高达 40% 的艾滋病患者患有 HAND<sup>[13-14]</sup>。研究表明,神经元的损伤和死亡与 HAND 的形成有着明确的相关性,但其机制仍不清楚。电压依赖性钾通道(Kv)是广泛分布、种类繁多的一大类离子通道,免疫组化、原位杂交等显示其在海马神经元中有较高密度的分布,现研究表明,钾通道可参与调节细胞的形态和大小,与细胞的凋亡存在相关性<sup>[11]</sup>。

因此,本实验以钾通道为作用靶点,发现 gp120 能增大外向型钾电流,促进钾离子外流。为证明 gp120 作用于外向钾通道的特异性,本研究采用了多组浓度的 gp120 作用于神经元,发现 gp120 可浓度依赖性增大外向钾电流。利用 TEA 对 TEA 敏感型钾电流的阻断作用,我们对 TEA 敏感型钾电流进行了研究,结果显示 gp120 可增大 TEA 敏感型钾电流。为明确 TEA 敏感型钾通道是否参与 gp120 对神经元的损伤作用,利用 TUNEL 和 MTT 的方法,本文发现钾通道抑制剂 TEA 能明显抑制由 gp120 引起的神经元的损伤,这与电生理实验中, gp120 促进

TEA 敏感型钾电流增大,引起钾离子外流的结果完全一致。同时也支持了 Pieri 等<sup>[15]</sup>在阿尔茨海默模型中,发现在 β 淀粉样蛋白片段诱导神经元凋亡前可引发外向的延迟整流钾电流,促进钾离子外流,TEA 明显减轻由淀粉样蛋白引起的神经元凋亡这一现象。此外,为进一步阐述 gp120 引起的损伤部分通过外向钾外流实现,在细胞培养液中加入 25 mmol/L 的 KCl 溶液,这一浓度较多应用于减少细胞内外 K<sup>+</sup> 浓度梯度,减缓大量钾离子的外流<sup>[16]</sup>。MTT 和 TUNEL 的结果表明,25 mmol/L KCl 能明显减少 gp120 对海马神经元的损伤,对细胞起到一定的保护作用。越来越多的证据表明:大量钾离子外流是细胞凋亡的早期现象。而 Kv2.1 是 TEA 敏感型钾电流中的重要成分,在钾离子外流的过程中起到重要作用。本研究结果显示, gp120 能显著上调 Kv2.1 通道蛋白的表达,提示 Kv2.1 可能参与了 gp120 引起的 TEA 敏感型钾电流的增大以及神经元的损伤,但具体机制仍有待进一步研究。为阐明 Kv2.1 在海马神经元 TEA 敏感型钾电流成分中贡献度,利用其特异性拮抗剂 GxTX-1E 与细胞共孵,发现 TEA 敏感型钾电流明显减小,从而证明了 Kv2.1 在 TEA 敏感型钾通道中的作用。

总之, gp120 引起细胞损伤机制十分复杂, 其机制仍需进一步探索。本实验发现 gp120 以钾离子通道作为靶点引起神经元损伤。但由于目前市场缺乏特异性钾通道亚型的拮抗剂, 未能就 TEA 敏感型钾电流中某些具体亚型逐一进行讨论, 同时, gp120 是否会引起另一外向钾电流 4-AP 敏感型钾电流的增大仍然未知, 而对这些内容的探讨有助于加深对于钾离子通道尤其是对各亚型中单种钾通道的认识, 进而为 HAND 的防治提供新的靶点和理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Lindl KA, Marks DR, Kolson DL, et al. HIV-associated neurocognitive disorder: pathogenesis and therapeutic opportunities [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2010, 5 (3): 294-309
- [2] Kaul M, Zheng J, Okamoto S, et al. HIV-1 infection and AIDS: consequences for the central nervous system [J]. *Cell death differ*, 2005, 12 (Suppl 1): 878-892
- [3] Kaul M. HIV-1 associated dementia: update on pathological mechanisms and therapeutic approaches [J]. *Current Opin Neurol*, 2009, 22 (3): 315-320
- [4] Silverstein PS, Shah A, Weemhoff J, et al. HIV-1 gp120 and drugs of abuse: interactions in the central nervous system [J]. *Curr HIV Res*, 2012, 10 (5): 369-383
- [5] Shin AH, Thayer SA. Human immunodeficiency virus-1 protein Tat induces excitotoxic loss of presynaptic terminals in hippocampal cultures [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2012, 54C: 22-29
- [6] Kasyanov A, Tamamura H, Fujii N, et al. HIV-1 gp120 enhances giant depolarizing potentials via chemokine receptor CXCR4 in neonatal rat hippocampus [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23 (5): 1120-1128
- [7] Shepherd AJ, Loo L, Gupte RP, et al. Distinct modifications in Kv2.1 channel via chemokine receptor CXCR4 regulate neuronal survival-death dynamics [J]. *J Neurosci*, 2012, 32 (49): 17725-17739
- [8] 孙治坤, 张杰文, 杨红旗, 等. 脑源性神经生长因子通过调节 Bax/Bcl 表达抑制  $\beta$  淀粉样蛋白诱导的细胞凋亡 [J]. *中华神经医学杂志*, 2011, 10 (1): 19-23
- [9] 娄华, 王宝金, 王兴玲, 等. 子宫内膜异位症在位内膜细胞凋亡和增殖特性研究 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27 (18): 3350-3352
- [10] Jin NG, Crow T. Serotonin regulates voltage-dependent currents in type I(e(A)) and I(i) interneurons of hermissenda [J]. *J Neurophysiol*, 2011, 106 (5): 2557-2569
- [11] Yuan H, Wang WP, Feng N, et al. Donepezil attenuated oxygen-glucose deprivation insult by blocking Kv2.1 potassium channels [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 657 (1-3): 76-83
- [12] Lee S, Milesu M, Jung HH, et al. Solution structure of GxTX-1E, a high-affinity tarantula toxin interacting with voltage sensors in Kv2.1 potassium channels [J]. *Biochemistry*, 2010, 49 (25): 5134-5142
- [13] Antinori A, Trota MP, Lorenzini P, et al. Virological response to salvage therapy in HIV-infected persons carrying the reverse transcriptase K65R mutation [J]. *Antiviral Therapy*, 2007, 12 (8): 1175-1183
- [14] Cantres-Rosario Y, Plaud-Valentín M, Gerena Y, et al. Cathepsin B and cystatin B in HIV-seropositive women are associated with infection and HIV-1-associated neurocognitive disorders [J]. *AIDS*, 2013, 27 (3): 347-356
- [15] Pieri M, Amadoro G, Carunchio I, et al. SP protects cerebellar granule cells against beta-amyloid-induced apoptosis by down-regulation and reduced activity of Kv4 potassium channels [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58 (1): 268-276
- [16] Krick S, Platoshyn O, Sweeney M, et al. Activation of K<sup>+</sup> channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280 (4): C970-979

[收稿日期] 2014-06-09

欢迎投稿 欢迎订阅