

· 实验研究 ·

NMDA 微量注射对脑皮质细胞磷酸化 NMDA 受体-1 亚基表达的影响

黑明燕, 肖蜜黎, 旷寿金

(中南大学湘雅三医院新生儿科, 湖南 长沙 410013)

[摘要] 目的 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体激活在多种脑神经细胞损伤的病理生理过程中起重要的作用。该研究的目的是了解 NMDA 直接诱导的细胞毒性反应对脑皮质神经细胞 S897 位点磷酸化的 NMDA 受体-1 亚基(phospho-NR1 S897)表达的影响。方法 7 日龄 SD 大鼠 40 只,随机分为正常对照组和 NMDA 微量注射组(10 mmol NMDA 脑皮质内注射,于注射后 1 h 断头取材),应用 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)染色和荧光免疫组化染色并比较各组荧光强度 OD 值。结果 各组脑组织切片 TTC 染色均大致正常;免疫荧光染色显示正常对照组脑皮质 phospho-NR1 S897 高表达,NMDA 注射侧脑皮质 phospho-NR1 S897 表达明显下调,各组荧光强度 OD 值分别为:正常对照组 1.364 ± 0.268 ,NMDA 注射对侧 1.285 ± 0.336 ,NMDA 注射侧 0.366 ± 0.087 ,与前 2 组比较差异有显著性($P < 0.01$)。结论 NMDA 直接诱导的细胞毒性反应使脑皮质细胞 S897 位点的磷酸化 NR1 亚基的表达显著降低,与 HI 导致的损伤相类似,进一步证实了缺氧缺血性脑损伤中“HI-NMDA-phospho-NR1 S897 去磷酸化-细胞损伤”损伤途径的重要性。

[中国当代儿科杂志,2007,9(1):51-53]

[关键词] NMDA;微量注射;脑皮质;Phospho-NR1 S897;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)01-0051-03

Expression of phosphorylated NMDA receptor 1 in the cerebral cortex after NMDA microinjection *in vivo*

HEI Ming-Yan, XIAO Mi-Li, KUANG Shou-Jin. Division of Neonatology, Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013 (Email: heiming_yan@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective The activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors plays critical roles in the pathogenesis of diseases of the brain. This study aimed to examine the expression of phospho-NR1 S897 in the cerebral cortex after NMDA microinjection *in vivo*. **Methods** Forty seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly assigned into normal control and NMDA injection groups. The rats from the NMDA injection group were injected with 10 mmol of NMDA and were sacrificed 1 hr after injection. 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) and fluorescent immunohistochemical stainings were conducted and the fluorescence intensity OD value between the two groups was compared. **Results** TTC staining from the two groups was normal. Expression of phospho-NR1 S897 in the cerebral cortex of the ipsilateral hemisphere to injection in the NMDA injection group decreased significantly compared with the normal control group, with OD values of 0.366 ± 0.087 vs 1.364 ± 0.268 ($P < 0.01$). **Conclusions** NMDA microinjection, as a hypoxia-ischemia (HI) insult, significantly decreased the expression of phospho-NR1 S897. This indicates the importance of the "HI-NMDA-phospho-NR1 S897 dephosphorylation-cell damage" pathway in HI brain damage.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(1):51-53]

Key words: NMDA; Microinjection; Cerebral cortex; Phospho-NR1 S897; Rats

体内体外实验已证实了 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)型受体的激活在新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)^[1]的发病机制中起着重要的作用。NMDA 受体-1(NMDA receptor-1, NR1)是组成 NMDA 受体的主要组成亚基^[2],在 NMDA 受体的激活中是必需成分。由于受体的激活

以磷酸化或去磷酸化为主要形式,而丝氨酸 897 位点(S897)是 NR1 亚单位发生磷酸化的主要位点之一^[3,4],我们猜测 NMDA 直接诱导的细胞毒性反应将导致神经细胞 S897 位点磷酸化的 NMDA 受体-1 亚基表达发生一系列变化。本研究利用向新生大鼠脑内微量注射 NMDA 及荧光免疫组化技术,了解

[收稿日期]2006-03-30;[修回日期]2006-05-09

[作者简介]黑明燕,女,博士研究生,副主任医师。主攻方向:新生儿脑损伤。

NMDA 直接诱导的细胞毒性反应对脑皮质神经细胞磷酸化 NMDA 受体-1 亚基表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组

7 日龄 SD 大鼠 40 只,雌雄不限,平均体重 13.46 ± 1.32 g,随机分为正常对照组(再随机分为 TTC 对照组和免疫组化对照组,各亚组 $n = 10$)和 NMDA 微量注射组(以下简称 NMDA 注射组,再随机分为 TTC 组和免疫组化组,各亚组 $n = 10$)。

1.2 NMDA 微量注射

对实验动物进行低温麻醉,应用 Cunningham 小鼠及新生大鼠立体定位仪(Stoelting Co.)固定头部、应用 $10 \mu\text{L}$ Hamilton 微量注射器进行注射,部位为距囟门顶角前 3 mm、颅中缝右侧旁开 3 mm,注射深度为距颅骨下 1 mm 脑皮质区,注射量为 10 mmol NMDA/ 0.5 mL (pH 7.4),注射速度为 $0.1 \mu\text{L}/20 \text{ s}$ 。于注射后 1 h 处死动物。

1.3 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 染色

断头取脑组织、制备 2 mm 厚冠状切片浸泡于已预热至 37°C 的 2% TTC/PBS (pH 7.4) 中 20 min,以 4% 多聚甲醛浸泡固定,观察颜色变化,基本正常的脑组织为砖红色,有明显损伤的部位则呈现白色或浅粉红色。

1.4 荧光免疫组化染色

实验动物经心脏灌注固定、取脑组织以 4% 多聚甲醛浸泡固定、30% 蔗糖脱水处理后,制备 $12 \mu\text{m}$ 脑组织切片。常温下以封闭液(3% BSA + 0.1% triton-x 100 + 15% NGS)阻断非特异性反应,一抗(小鼠 NR1 抗体,1:1 000,Chemicon) 4°C 下孵育过夜(阴性对照标本不加一抗),PBS 三洗后二抗(羊抗小鼠 IgG TRITC,1:200,Pharmingen)常温避光孵育 1 h, PBS 三洗后以 0.5 mg/mL DAPI 封片,以

Leica DMRB 荧光显微镜阅片,选择邻近脑室边缘的下丘脑区、记录 400 倍高倍视野下荧光强度 OD 值(每张切片选择 3 个视野、取平均值)。为避免实验误差,所有染色均一次同批完成。

1.5 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,实验数据采用 SPSS11.5 软件独立样本 t 检验进行统计学分析,当 $P < 0.05$ 时为有统计意义。

2 结果

2.1 TTC 染色

NMDA 微量注射后 1h,各组脑组织切片 TTC 染色均大致正常(图 1)。

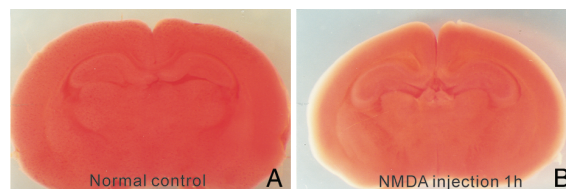


图 1 脑组织 TTC 染色 A:正常 7 日龄 SD 大鼠 B:NMDA 脑皮质内注射后 1 h 脑组织冠状切片,TTC 染色均未见异常。

2.2 荧光免疫组化染色

正常对照组脑皮质 phospho-NR1 S897 高表达,染色阳性细胞均匀密布在皮质区,细胞大小形态正常;NMDA 注射组:注射对侧 phospho-NR1 S897 表达与正常对照组相似,注射侧脑皮质 phospho-NR1 S897 表达明显下调,几乎未见阳性染色细胞(图 2)。各组荧光强度 OD 值分别为:正常对照组为 1.364 ± 0.268 ,NMDA 注射对侧 1.285 ± 0.336 ,NMDA 注射侧 0.366 ± 0.087 ,其中 NMDA 注射侧 phospho-NR1 S897 免疫荧光强度 OD 值明显降低,与 NMDA 注射对侧及正常对照组相比较,差异具有显著性($P < 0.01$)。

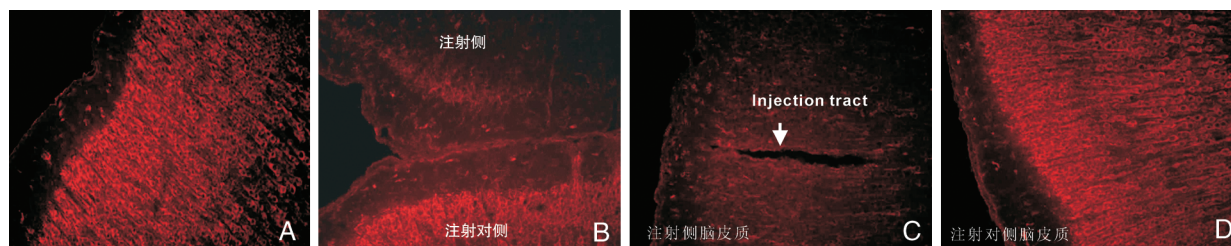


图 2 脑皮质 phospho-NR1 S897 TRITC 免疫组化染色 ($\times 200$)。A:正常 7 日龄大鼠脑皮质 phospho-NR1 S897 呈高表达,阳性染色细胞均匀分布在大脑皮质,细胞大小形态正常。B,C: NMDA 微量注射后 1h,注射侧脑皮质 phospho-NR1S897 表达明显下调,几乎无染色阳性细胞;B,D: 注射对侧脑皮质 phospho-NR1S897 呈现高表达,染色阳性细胞均匀密布,阳性染色细胞大小形态正常。

3 讨论

由于大脑皮质区部位较表浅、微量注射造成相对较小的机械损伤,我们选择了大脑皮质作为研究部位,而 NMDA 大脑皮质内注射的方法也曾被应用于研究脑组织内兴奋性氨基酸与 caspase 激活在内的课题^[5]。本课题应用 NMDA 微量注射的方法,选用对 NMDA 受体激活起关键作用的 NR1 亚基为观察指标,目的是直接观察 NMDA 诱导的兴奋性氨基酸毒性作用对磷酸化的 NR1 受体亚基表达的影响。

本课题应用 TTC 方法、在 10 mmol NMDA 微量注射后肉眼观察未发现异常。TTC 能与正常线粒体氧化酶系统发生反应而降解呈现红色,受损组织则呈现白色,使得受损组织与正常组织极易区分开来,但这只是一个对大体标本进行初筛的方法,我们的另外两项研究结果表明:①即使是在 50 nmol NMDA 脑皮质内注射后 2 h 观察、TTC 染色仍未发现异常^[6];②在缺氧缺血损害后 12 h, TTC 染色显示仅 $(5.8 \pm 1.6)\%$ 的损伤侧脑组织出现异常^[7]。提示在没有明确脑组织梗死的情况下, TTC 染色不是观察脑损伤的敏感指标,我们猜测如果应用线粒体膜电势(DYm)等反映线粒体功能的指标可能会得到更精确反映 NMDA 损伤的结果。

与 TTC 染色的阴性结果相反,免疫荧光染色结果显示 phospho-NR1 S897 在正常 7 日龄 SD 大鼠脑皮质呈高表达,提示 NR1 S897 位点的磷酸化使 7 日龄新生大鼠脑皮质神经细胞具有正常生理功能;而 10 mmol NMDA 微量注射后,注射侧脑皮质 phospho-NR1 S897 表达显著降低,进一步证实了 NMDA 受体激活与 NMDA 诱导的兴奋性氨基酸毒性具有直接因果关系,且该过程是在损伤早期、通过影响 NR1 S897 位点的磷酸化过程来完成的。这一改变与我们的另一项应用 NMDA 微量注射技术对缺氧缺血(Hypoxia Ischemia, HI)性脑损伤的研究结果(即:HI 损伤后 3~24 h 期间、损伤部位 phospho-NR1 S897 表达呈进行性下调)有相似之处^[6]。我们认为 NR1 S897 位点的磷酸化使 7 日龄新生大鼠脑皮质神经细胞具有正常生理功能, HI 损伤使该磷酸化过程的调节因子发生浓度或性质的改变,从而使 NR1 S897 位点发生去磷酸化、不能发挥正常功能,随着 HI 损伤后时间的推移,这一过程有可能呈现级联式反应,从而使发生 NR1 S897 去磷酸化的神经

细胞进行性增多、功能进行性降低,最终导致损伤部位神经细胞死亡;尽管目前尚无法对“外源性 10 mmol NMDA 对脑皮质的损伤相当于缺氧缺血后多长时间脑组织的 NMDA 性损伤相当”做出回答,但至少这样的结果更进一步证实了缺氧缺血性脑损伤中“HI-NMDA-phospho-NR1 S897 去磷酸化-细胞损伤”的损伤途径。

由于 NMDA 受体是钙通道受体, NMDA 受体的激活可导致钙离子内流、细胞内游离钙聚集,结合以上实验结果我们推测, NMDA 微量注射亦将影响脑皮质细胞内游离钙的浓度,目前需要开展进一步的实验进行验证。

综上所述, 10 mmol NMDA 微量注射使脑皮质细胞 S897 位点的磷酸化 NR1 亚基的表达显著降低,该改变与 HI 导致的损伤相类似,进一步证实了缺氧缺血性脑损伤中“HI-NMDA-phospho-NR1 S897 去磷酸化-细胞损伤”损伤途径的重要性,提示进一步研究影响 phospho-NR1 S897 磷酸化过程的调控因子可能会减轻包括 HI 在内的、与 NMDA 相关的脑损伤。

[参 考 文 献]

- [1] Johnston MV. Excitotoxicity in neonatal hypoxia[J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2001, 7(4): 229-234.
- [2] Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors[J]. Neuron, 1994, 12(3): 529-540.
- [3] Zou X, Lin Q, Willis WD. Effect of protein kinase C blockade on phosphorylation of NR1 in dorsal horn and spinothalamic tract cells caused by intradermal capsaicin injection in rats[J]. Brain Res, 2004, 1020(1-2): 95-105.
- [4] Zou X, Lin Q, Willis WD. Role of protein kinase A in phosphorylation of NMDA receptor 1 subunits in dorsal horn and spinothalamic tract neurons after intradermal injection of capsaicin in rats[J]. Neuroscience, 2002, 115(3): 775-786.
- [5] Nath R, Scott M, Nadimpalli R, Gupta R, Wang KK. Activation of apoptosis-linked caspase(s) in NMDA-injured brains in neonatal rats [J]. Neurochem Int, 2000, 36(2): 119-126.
- [6] 黑明燕,李颖,张璧涛. NMDA 诱导新生大鼠脑组织 NMDA 受体-1 的表达[J]. 中南大学学报(医学版), 2005, 31(1): 52-55.
- [7] 黑明燕,旷寿金,殷萍. 以 TTC 方法浅析 SD 大鼠及 C57 小鼠 HIE 模型脑损伤的异同[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(5): 22-25.

(本文编辑:吉耕中)