

新生儿脑损伤专栏·实验研究

谷氨酸受体2和钙离子在新生大鼠脑室周围 白质软化症发病机制中的作用探讨

石晶, 姚裕家, 李晋辉, 李德渊

(四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 观察 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸 (α -3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid, AMPA)受体亚单位谷氨酸受体2 (GluR2)在2日龄缺氧缺血新生鼠脑白质中的表达,并检测脑白质细胞内游离 Ca^{2+} 浓度在缺氧缺血后不同时间点的变化及其意义。方法 建立2日龄SD大鼠缺氧缺血脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)模型,分别应用荧光定量PCR和Western Blot检测脑白质缺氧缺血后12, 24, 48 h和72 h GluR2 mRNA和蛋白表达的变化;用Fura 2/AM荧光探针和双波长荧光分光光度计分别检测脑白质细胞内游离 Ca^{2+} 浓度。结果 与对照组相比,PVL组大鼠脑白质 GluR2 mRNA和蛋白含量在缺氧缺血后24 h开始降低,并持续降低至72 h ($P < 0.05$); PVL组大鼠脑白质细胞内游离 Ca^{2+} 浓度在缺氧缺血后12 h开始升高,持续增高至72 h ($P < 0.05$)。结论 GluR2表达减少可能导致脑白质细胞内钙离子超载,引起细胞损害。

[中国当代儿科杂志, 2007, 9(4): 313-316]

[关键词] AMPA受体;谷氨酸受体2;钙;脑室周围白质软化;脑缺氧缺血;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)04-0313-04

Roles of glutamate receptor 2 and cellular free calcium in the pathogenesis of periventricular leukomalacia

SHI Jing, YAO Yu-Jia, LI Jin-Hui, LI De-Yuan. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Yao Y-J, Email: yjyao2002@163.com)

Abstract: Objective To study the expression of the AMPA receptor subunit glutamate receptor 2 (GluR2) and the cellular free calcium concentration in the white matter of neonatal rats with periventricular leukomalacia (PVL) and their roles in the pathogenesis of PVL. **Methods** A PVL model was prepared by unilateral carotid artery ligation (UCL) followed by exposure to 6% oxygen for 4 hrs in 2-day-old rats. The neonatal rats performed a sham operation, without hypoxia-ischemia (HI), were used as the control group. At 12, 24, 48 and 72 hrs of HI, the expressions of GluR2 mRNA and protein in the white matter were detected using real time quantitative PCR and Western blot respectively. Spectrophotofluorimetry and Fura 2/AM were used to detect the cellular free calcium concentration. **Results** The expressions of GluR2 mRNA and protein in the white matter were significantly reduced in the PVL group at 24 hrs of HI, and remained at lower expressions until 72 hrs of HI compared with the control group ($P < 0.05$). The cellular free calcium concentrations increased significantly in the PVL group at 12 hrs of HI, and remained at higher levels until 72 hrs of HI compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The expressions of GluR2 mRNA and protein in the white matter decreased whereas the cellular free calcium concentration increased in neonatal rats with PVL. The decreased expression of GluR2 might lead to the overloading of cellular calcium in the white matter, which may cause neuronal damage and death.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(4): 313-316]

Key words: AMPA receptor; Glutamate receptor 2; Calcium; Periventricular leukomalacia; Hypoxia-ischemia; Neonatal rats

随着围产医学技术的进步和发展,早产儿和极低出生体重儿的存活率越来越高,临床上脑白质损伤的发病率也有增高的趋势。脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)是脑白质损害的

一种主要类型,与脑瘫、精神发育迟滞等严重后果密切相关^[1]。但目前对早产儿脑白质损害研究较少,因而PVL发生的相关机制尚未完全清楚,更缺乏有效的干预手段。

[收稿日期]2007-05-07;[修回日期]2007-06-14

[基金项目]教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助(20050610071)。

[作者简介]石晶,女,博士,主治医师。主攻方向:新生儿缺氧缺血性脑损伤。

[通讯作者]姚裕家,女,教授,博士生导师,四川大学华西第二医院儿科,邮编:610041。

兴奋性氨基酸和钙离子超载是缺氧缺血性神经细胞损害的两大重要因素。谷氨酸受体主要包括 AMPA 受体、海仁酸受体和 NMDA 受体等。研究显示, PVL 损害的靶细胞主要是晚期少突胶质细胞 (oligodendrocyte, OL) 前体细胞^[2], 这类细胞主要表达 AMPA 受体。在组成 AMPA 受体的亚单位中, 谷氨酸受体 2 (GluR2) 是决定 AMPA 受体 Ca^{2+} 通透性的分子开关。近年来, 关于 GluR2 在神经系统疾病中的作用越来越受到重视, 提出了 GluR2 假说^[3], 即 GluR2 决定缺氧缺血时神经细胞的存活状态。但是, 在新生动物脑白质损害的动物模型中, GluR2 的改变及其意义国内外报道较少。本研究目的是观察大鼠 PVL 模型中 GluR2 的表达和细胞内钙离子浓度的变化, 研究 PVL 发生的相关机制, 为今后的干预提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 动物 2 日龄 SD 大鼠由四川大学华西医学中心实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 6% 氧、94% 氮混合气 (成都空军供气站), GluR2 及 β -actin 引物 (上海生工生物公司), dNTP (MBI), Taq 酶 (Takara, 日本), 兔 GluR2 多克隆抗体 (CHEMICON, 加拿大), 山羊 β -actin 多克隆抗体 (Santa Cruze, 美国), HRP 标记的山羊抗兔和兔抗山羊 IgG (Santa Cruze, 美国), Fura-2/AM (日本同仁化学研究所)。

1.1.3 仪器 F-2000 型荧光分光光度计 (日本日立公司), PTC-2000PCR 合成仪 (MJ Research Inc, 美国), FTC2000 实时荧光定量基因扩增仪 (枫岭公司, 加拿大), 凝胶成像系统 (Gel Doc 1000, 美国 Bio-rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及 PVL 模型的制备 2 日龄 SD 大鼠 144 只, 清洁级, 体重 6~8 g, 动物随机分组。PVL 组 ($n=72$): 分为缺氧缺血后 12, 24, 48 h 和 72 h 组 (分别标记为 PVL 12 h, PVL 24 h, PVL 48 h, PVL 72 h), 各组均为 18 只。参照我们已经建立的方法制备 PVL 模型^[4]。PVL 组行右侧颈总动脉结扎手术, 6% 氧和 94% 氮气处理 4 h 后返回常氧中, 制备 PVL 动物模型。对照组 ($n=72$): 行假手术, 时间段与 PVL 组配对。只进行右侧颈总动脉分离术而不作结扎及缺氧处理。各组分别进行荧光定量 PCR、Western blot 和钙离子检测。

1.2.2 荧光定量 PCR 方法检测 PVL 未成熟大鼠脑白质 GluR2 的改变 根据 NCBI Genebank 中大鼠 GluR2 和 β -actin 的基因序列设计合成的引物如下:

GluR2 引物: GluR2 F (上游引物) 5'-TTCCCAA-CAGATGGCACACA-3'; GluR2 R (下游引物) 5'-TT-GATAAGCCTCTGTCCTGT-3'; β -actin 引物: β -actin F (上游引物) 5'-GCCAACACAGTGTCTGTCT-3'; β -actin R (下游引物): 5'-AGGAGCAATGATCTT-GATCTT-3'

各组动物经乙醚麻醉后迅速断头取右侧大脑白质, 提取总 RNA, RT-PCR 扩增目的基因 cDNA 片段, FTC2000 实时荧光定量基因扩增仪进行扩增绘制样品标准曲线, 扩增条件为: 94℃ 2 min, 94℃ 20 s, 53℃ 30 s, 72℃ 40 s, 45 个循环。将逆转录得到的各组 cDNA 样品各取 2.5 μL , 在同样的反应条件下行 PCR 扩增。收集数据, 绘制动力学曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ^[5] 以 β -actin 作标准校正 GluR2 mRNA 的相对含量。

1.2.3 Western Blot 检测 PVL 未成熟大鼠脑白质 GluR2 的表达 各组动物经乙醚麻醉后迅速断头取右侧大脑白质, 加入组织裂解液分离蛋白。BCA 方法测定各样本蛋白质浓度, 制备 8% SDS-PAGE 胶; 每个泳道上样 30 μg ; 150 v 恒压电泳 60 min; 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭; 兔抗 GluR2 抗体 (1:2 000), 山羊抗 β -actin 抗体 (1:2 000) 4℃ 杂交过夜, TTBS 洗膜 3 次, 分别加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 和兔抗羊 IgG 二抗 (1:10 000), 室温振荡孵育 1 h; 洗膜, 化学发光法显影。在凝胶成像分析系统中测量特异性条带平均灰度, 将同次电泳所得的 GluR2 和 β -actin 条带灰度值相比, 得到各样本组 GluR2/ β -actin 的灰度比值。

1.2.4 脑白质细胞内游离钙离子浓度的检测 参照 Dildy 等^[6] 方法制备大鼠脑白质细胞悬液, 将细胞悬液分为样品管和空白管, 样品管加入终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fura-2/AM, 对照管加等量的 DM-SO, 37℃ 恒温摇床避光振荡孵育 50 min; 调整细胞数为 2×10^6 个/mL。采用日立 F-2000 双波长荧光分光光度计检测细胞内钙离子浓度。激发波长下的最大荧光 F_{max} 由加入终浓度为 0.2% 的 TritonX-100 测得, 最小荧光 F_{min} 由加入终浓度为 8 mmol/L 的 EGTA (pH = 9) 获得。根据 Grynkiewicz 公式^[7] $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d'[(F-F_{\text{min}})/(F_{\text{max}}-F)]$ 计算细胞内游离 Ca^{2+} 浓度 (nmol/L)。

1.3 统计分析

荧光定量 PCR 各组 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 以中位数表示, 秩和

检验法比较各实验组两两间差异和各组间的差异。Western blot 和细胞内钙离子测定采用成组 t 检验和单因素方差分析 q 检验。统计分析工具为 SPSS 10.0 软件包。 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 常规 RT-PCR 结果

待测样品 GluR2 扩增产物,于 159 bp 位置可见一条清晰条带(图 1),说明引物设计合成无误, GluR2 cDNA 模板可用于定量反应。

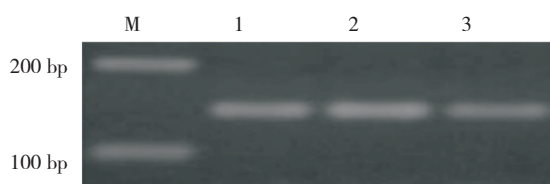


图1 GluR2 常规 PCR 产物凝胶电泳图

2.2 各组 GluR2 mRNA 的表达量

从缺氧缺血后 24 h 开始, PVL 组 GluR2 mRNA 的表达明显低于对照组,至缺氧缺血后 72 h, PVL 组 GluR2 mRNA 的表达仅为同时点对照组的 75% ($P < 0.05$)。见表 1。

表1 对照组、PVL 组 mRNA 表达量

分组	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.1571	0.3143	0.6285	0.8888
PVL 组	0.1897	0.1111	0.4444	0.6666
Z	-0.165	-2.956	-2.187	-3.000
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

以上各对照组作多组比较的非参数 Kruskal-Wallis 检验, $\chi^2 = 18.78$, $P < 0.01$ 。

2.3 两组不同时点脑组织 GluR2 及 β -actin 的 Western blot 结果

单因素方差分析 q 检验显示, 对照组之间 GluR2/ β -actin 条带灰度比值有显著差异, ($F = 165.77$, $P < 0.01$) 见图 2。

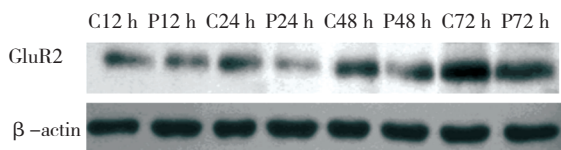


图2 对照组和 PVL 组脑组织 GluR2 及 β -actin 的 Western blot 结果(C 代表对照组, P 代表 PVL 组)

PVL 24 h、48 h 及 72 h 组 GluR2 含量较对照组明显降低, 均 $P < 0.05$, 而 PVL 12 h 组 GluR2 含量与对照组相比无统计学差异, $P > 0.05$ 。见表 2。

表2 各组大鼠不同时点脑组织 GluR2/ β -actin 条带灰度比值 ($\bar{x} \pm s$)

分组	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.4288 $\pm$ 0.0149	0.4374 $\pm$ 0.0231	0.5562 $\pm$ 0.0291	0.7529 $\pm$ 0.0412
PVL 组	0.3939 $\pm$ 0.0511	0.2392 $\pm$ 0.0211	0.3403 $\pm$ 0.0242	0.4440 $\pm$ 0.0109
t	1.605	15.523	13.96	17.77
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 对照组和 PVL 各组细胞内游离 Ca^{2+} 浓度

各时点对对照组间细胞内 Ca^{2+} 浓度差异无统计学意义 ($F = 0.413$, $P = 0.746$)。PVL 各组细胞内钙离子浓度与对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$), PVL 各组之间 Ca^{2+} 浓度差异也有显著性 ($F = 256.40$, $P < 0.01$)。见表 3。

表3 各组大鼠脑白质细胞内游离 Ca^{2+} 浓度 (nmol/L, $\bar{x} \pm s$)

分组	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	121.19 $\pm$ 0.28	129.96 $\pm$ 2.41	130.70 $\pm$ 3.22	130.16 $\pm$ 2.73
PVL	144.31 $\pm$ 2.35	149.22 $\pm$ 2.20	166.65 $\pm$ 1.94	179.39 $\pm$ 3.20
t	-9.30	-14.5	-23.43	-27.26
P	<0.01	<0.01	<0.01	0.01

3 讨论

早产儿 PVL 的发病机制至少包括 3 个主要相互作用的因素: 脑血管解剖结构的不成熟, 缺氧缺血时脑血管自我调节功能紊乱与压力被动性脑血循环的形成和少突胶质细胞成熟依赖的易感性。其中前两个因素是形成早产儿好发脑缺血的基础, 而 OL 成熟依赖的易感性是形成 PVL 主要病理改变的基础^[8]。在缺氧缺血时, 众多的机制参与了 OL 的损害, 而谷氨酸的兴奋毒性是导致 OL 损害的重要机制之一^[9]。

缺氧缺血条件下星形胶质细胞摄取谷氨酸能力下降, 谷氨酸转运体功能异常, 导致谷氨酸在脑细胞间隙的堆积^[10]。在脑白质内, 大量堆积的谷氨酸可直接损害 OL 和轴突。它所导致的 OL 死亡包括两种途径: 受体介导途径和非受体介导途径。受体介导的 OL 死亡通过 AMPA 受体实现, 这种 AMPA 受体介导的 OL 的死亡只发生于发育中的 OL, 而不是成熟的 OL, 这与早产儿 PVL 选择性脑白质损害的

特点相符,表明 AMPA 受体在介导晚期 OL 前体细胞损伤时具有重要作用。

AMPA 受体是配体门控型阳离子通道,由 GluR1- GluR4 四种亚单位围绕一个亲水性中心孔道组成一个四聚体结构。当 GluR2 与其他亚单位一起表达形成通道时对钙离子不具有通透性,而具有外向整流的作用。这种作用归结为其 M2 区域内带中性电荷的谷氨酰胺残基(Q,CGA)被带正电荷的精氨酸残基(R,CGG)所取代^[11]。早产儿脑白质胶质细胞特别是 OL 主要表达 AMPA 受体,晚期 OL 前体细胞中钙离子内流信号大多是由 AMPA 受体介导的^[12]。在脑白质中,星形胶质细胞也表达功能性 AMPA 受体,但由于有快速 AMPA 受体脱敏现象的存在,AMPA 受体的激活对星形胶质细胞本身的损害作用较小;过量的谷氨酸对轴突具有损害作用,这种损害作用很可能是继发 OL 损害而发生的^[13]。因此我们认为,脑白质中 GluR2 表达水平的降低主要影响 OL。

本研究显示,在新生 2 d 大鼠 PVL 模型中,脑白质 GluR2 mRNA 和蛋白质的表达在缺氧缺血后 24 h 开始下降,持续至缺氧缺血后 72 h 仍未恢复正常水平。GluR2 表达水平降低的后果为:直接导致 Ca^{2+} 内流增加,这是由 AMPA 受体亚单位 GluR2 特异性的结构所决定;诱导其他 Ca^{2+} 通透的 AMPA 受体表达,在晚期 OL 前体细胞中发现亚致死性氧和糖剥夺除了导致 GluR2 表达减少外,还可导致 Joro 蜘蛛毒素敏感性钙离子内流增加,提示 GluR2 受体的减少可能导致其他 Ca^{2+} 通透的 AMPA 受体亚单位表达的增加^[14]。

GluR2 受体表达减少的意义在于 Ca^{2+} 内流增加,激活一系列钙依赖性途径损伤细胞。我们的研究发现,GluR2 受体表达的减少和 Ca^{2+} 内流增加时间并不平行,GluR2 受体表达的减少从缺氧缺血后 24 h 开始,而缺氧缺血后 12 h 即有细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加。这种时间上的不平行部分原因可能与缺氧缺血早期 GluR2 受体前-mRNA 在 Q/R -607 位点的编辑减少有关。Q/R -607 位点是决定 Ca^{2+} 通透性的开关。GluR2 前 mRNA Q/R-607 位点的编辑与核蛋白酶 ADAR2 有关。在成年大鼠,前脑缺血能导致 ADAR2 表达减少,破坏易感神经细胞 RNAQ/R 位点的编辑;而给予外源性 ADARb 基因或持续激活细胞转录因子 CREB 可诱导内源性 ADAR2 表达

增加,恢复 GluR2Q/R 位点的编辑从而保护敏感的神经细胞免遭缺血性损害。很可能在缺氧缺血条件下,新生大鼠脑内 ADAR2 表达降低,破坏了神经细胞中 Q/R -607 位点的编辑,触发了早期 Ca^{2+} 向细胞内流增加,导致细胞损害。

[参 考 文 献]

- [1] Blumenthal I. Periventricular leukomalacia: a review[J]. Eur J Pediatr, 2004, 163 (8): 435-442.
- [2] Riddle A, Luo NL, Manese M, Beardsley DJ, Green L, Rorvik DA, et al. Spatial heterogeneity in oligodendrocyte lineage maturation and not cerebral blood flow predicts fetal ovine periventricular white matter injury[J]. J Neurosci, 2006, 26 (11):3045-3055.
- [3] Tanaka H, Grooms SY, Bennett MVL, Zukin RSL. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage[J]. Brain Res, 2000, 8869 (1-2):190-207.
- [4] 石晶,姚裕家,李晋辉,李德渊. 未成熟大鼠实验性脑室周围白质软化动物模型的建立及评价[J]. 实用儿科临床杂志,2006, 21(19):1330-1332.
- [5] Arocho A, Chen B, Ladanyi M, Pan Q. Validation of the 2-Delta-DeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts[J]. Diagn Mol Pathol, 2006, 15 (1):56-61.
- [6] Dildy JE, Leslie SW. Ethanol inhibits NMDA-induced increases in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cells[J]. Brain Res, 1989, 499(2):383-387.
- [7] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties[J]. J Biol Chem, 1985, 260 (6):3440-3450.
- [8] Back SA. Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms[J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2006, 12(2):129-140.
- [9] Jensen FE. Role of glutamate receptors in periventricular leukomalacia[J]. J Child Neurol, 2005, 20 (12):950-959.
- [10] Fern R, Moller T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop[J]. J Neurosci, 2000, 20(1):34-42.
- [11] Liu SJ, Zukin RS. Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death[J]. Trends Neurosci, 2007, 30(3): 126-134.
- [12] Itoh T, Reddy U R, Stern J L, Chen M, Itoh A, Pleasure D. Diminished calcium homeostasis and increased susceptibility to excitotoxicity of JS 3/16 progenitor cells after differentiation to oligodendroglia[J]. Glia, 2000, 31 (2):165-180.
- [13] Tekkok SB, Faddis BT, Goldberg MP. AMPA/kainate receptors mediate axonal morphological disruption in hypoxic white matter[J]. Neurosci Lett, 2005, 382(3):275-279.
- [14] Deng W, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. Calcium-permeable AMPA/kainate receptors mediate toxicity and preconditioning by oxygen-glucose deprivation in oligodendrocyte precursors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(11):6801-6806.

(本文编辑:吉耕中)