论著

文章编号:1000-5404(2007)18-1742-04

缺氧对大鼠皮层、海马NMDA受体NR1亚单位磷酸化的影响

吴喜贵,赵延东,阮怀珍 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察缺氧模型大鼠皮层、海马NMDA受体NR1亚单位酪氨酸磷酸化的变化。**方法** 成年大鼠置于模拟海拔5 500 m高度的低压氧舱内,每天缺氧8 h,分别缺氧3、7、14 d和21 d。采用免疫组化、Western blot+免疫共沉淀方法检测皮层、海马NR1及其酪氨酸磷酸化的变化。**结果** 免疫组化显示缺氧皮层、海马NR1表达都明显高于对照组($P<0.01$)。Western blot检测进一步证明NR1的表达显著高于对照组($P<0.01$),且随着缺氧时间的延长而增加。缺氧各组酪氨酸磷酸化水平亦显著高于对照组($P<0.01$),缺氧14 d后酪氨酸磷酸化达到最高峰,而后开始下降,21 d时仍显著高于对照组($P<0.01$)。**结论** 高原缺氧条件下大鼠皮层、海马NMDA受体NR1亚单位表达及酪氨酸磷酸化水平显著增加,酪氨酸磷酸化的变化可能是影响NMDA受体功能的主要原因。

关键词:缺氧;皮层;海马;NMDA受体NR1亚单位;磷酸化

中图法分类号:R322.81;R329.26;R364.4 **文献标识码**:A

Effect of hypoxia on NR1 subunit of NMDA receptor in rat cortex and hippocampus

WU Xi-gui, ZHAO Yan-dong, RUAN Huai-zhen (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the expression and phosphorylation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor NR1 subunit in rat cortex and hippocampus under high altitude hypoxia. Methods The adult SD rats were exposed to hypobaric hypoxia imitating 5 500-meter high altitude for 8 h daily for 3, 7, 14, 21 d. Immunohistochemical staining, Western blotting and co-immunoprecipitation were used to detect the expression and phosphorylation of NR1 in rat cortex and hippocampus. Results Both immunohistochemistry and Western blotting showed NR1 expression in rat cortex and hippocampus was increased under hypoxia in a time-dependent manner. The tyrosine phosphorylation of hypoxia groups was increased, and reached the peak on day 14 after hypoxia, then decreased, still higher than that of control groups till day 21 ($P<0.01$). Conclusion The increase of tyrosine phosphorylation of NR1 subunit in rat cortex and hippocampus under hypoxia may be a key influencing factor for NMDA receptor function.

Key words: hypoxia; cortex; hippocampus; NR1 subunit of N-methyl-D-aspartate receptor; phosphorylation

N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR或NR)分为NR1亚单位和NR2亚单位,广泛分布于中枢神经系统,与神经系统的发育和突触形成密切相关,并参与学习记忆、突触可塑性、缺血缺氧性脑损伤等许多神经退行性变的生理病理过程[1,2]。有研究表明,缺氧可导致脑内谷氨酸和天门冬氨酸大量释放,并过度激活NMDA受体,使Ca^{2+}通道开放性增加,从而介导了兴奋性氨基酸(NMDA受体是兴奋性氨基酸的一种特异性受体)的神经毒性作用,最终导致神经元发生退行性改变和坏死[3,4],而NR的Ca^{2+}通道开放性可能与其磷酸化状态有关[5]。本实验模拟海拔5 500 m高度,建立大鼠缺氧模型,检测在缺氧性脑损伤中NMDA受体NR1亚基及其酪氨酸磷酸化水平的变化,以期进一步阐明NR在缺氧性脑损伤中的作用机制,为防治缺氧性脑损伤及因缺氧引起的神经性病变提供理论基础。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30470557);全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA196)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China(30470557) and the Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (06MA196)

作者简介:吴喜贵(1954-),男,吉林省吉林市人,高级实验师,主要从事神经生物学方面的研究。电话:(023)68752232, E-mail: wxg0328@yahoo.com.cn

通讯作者:阮怀珍,电话:(023)68752232

收稿日期:2007-05-22;**修回日期**:2007-07-12

1　材料与方法

1.1　主要试剂

抗 NR1 抗体(Sigma)，抗磷酸酪氨酸单抗(国产)，protein A sepharose CL-4B(Phamaingen)，PVDF 膜(Millipore)。

1.2　动物及缺氧模型制备

SD 大鼠 50 只(本校实验动物中心提供)，体质量(200 ± 20)g，按完全随机分组法分为对照组，缺氧 3、7、14 d和 21 d 组，每组 10 只。缺氧大鼠模型的建立参照文献[4]方法且略有改进，各缺氧组大鼠均置于低压氧舱内自由进食，模拟海拔高度为 5 500 m，每天缺氧 8 h。对照组正常饲养。

1.3　免疫组化法检测大鼠皮层、海马 NR1

缺氧结束后，大鼠按常规进行麻醉、灌注、固定，冰冻切片(徕卡 CM1800)脑片置于 0.01 mol/L PBS 中存放，ABC 法做 NR1 的免疫组织化学染色：切片在 0.01 mol/L PBS 漂洗后再于 10% 的 H_2O_2 溶液中浸泡 40 min(封闭内源性过氧化物酶)，再次 PBS 漂洗后入正常山羊血清封闭 30 min，依次室温孵育于：①羊抗 NR1 单克隆抗体(Sigma，1∶200)36 h；②生物素标记的兔抗羊 IgG(博士德生物试剂公司，1∶150)2 h；③生物素-卵白素-HRP 复合物(博士德生物试剂公司 SABC，1∶150)2 h。以上每一步骤之后均用 0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min × 3 次。DAB 显色。Olympus DP-70 显微照相系统观察、照相。从标本中随机取部分切片用 0.01 mol/L PBS 代替一抗，其余步骤相同，作为阴性对照。

1.4　皮层、海马组织总蛋白的提取

缺氧后各时相点大鼠断头处死，迅速取海马、皮层，称质量按 100 mg/500 μl 蛋白裂解液[含 MOPS 50 mmol/L (pH 7.4)，DTT 0.2 mmol/L，KCl 100 mmol/L，$MgCl_2$ 0.5 mmol/L，Na_3VO_4 10 mmol/L，EDTA 0.1 mmol/L，EGTA 1 mmol/L，蔗糖 0.32 mol/L，Leupeptin、pepstatin A、Aprotinin 各 5 mg/L，PMSF、Benzamidine 各 0.1 mmol/L]。冰浴中匀浆。离心，取上清液测蛋白后分装，置 −80 ℃冰箱待用。蛋白含量测定按改良 Lowry 法，以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.5　Western blot 检测 NR1 蛋白含量

50 μg/孔等量蛋白样品经 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后，半干法转印，15 V(恒压)40 min，将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜以含 5 % 脱脂奶粉的 TBST [50 mmol/L Tris 150 mmol/L NaCl(pH 7.5)，0.1% Tween-20] 室温封闭 2 h，NR1 抗体(工作浓度为 1∶1 000)室温反应过夜，辣根过氧化物酶标记的羊 IgG(工作浓度为 1∶1 000) 室温反应 2 h。化学发光法显色，SX-300 图像分析系统检测蛋白相对水平。

1.6　免疫沉淀 Western blot 法测定 NR1 酪氨酸磷酸化

取蛋白样品 500 μg 加入 SDS 和 DTT 至终浓度分别为 0.5% 和 1 mmol/L，再加入 400 μl 免疫沉淀缓冲液(IP buffer)[0.05 mol/L Hepes (pH 7.4)，0.15 mol/L NaCl，1% Triton X-100，0.5 % Nonidet P-40，EDTA、EGTA、PMSF、Na_3VO_4 各1 mmol/L]。加入适量抗 NR1 抗体，4 ℃，2 h。再加入 25 μl Protein A Sepharose CL-4B，4 ℃轻轻摇动过夜。1 000 × g 离心 2 min，沉淀用 IP buffer 洗 3 遍。加 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液 25 μl，沸水浴 10 min，10 000 r/min 离心 10 min，取上清 20 μl，8% SDS-PAGE 电泳分离。用抗磷酸酪氨酸单抗作免疫印迹分析。

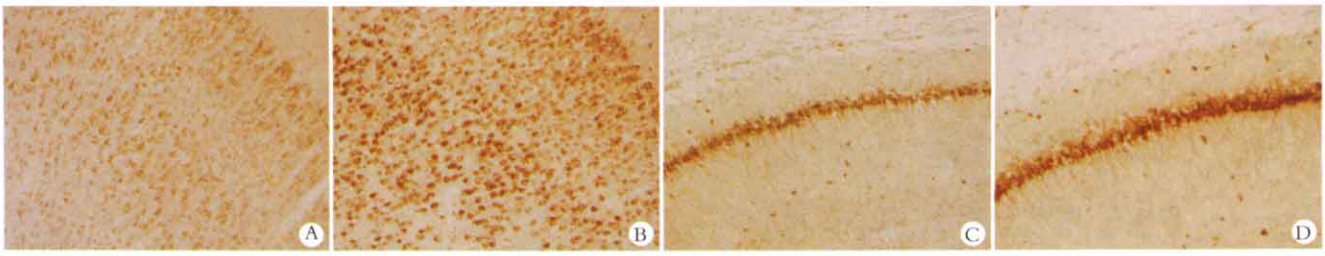
1.7　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件，组间比较行 t 检验。

2　结果

2.1　免疫组化检测缺氧不同时间皮层、海马 NR1 的变化

皮层 NR1 阳性细胞呈散在均匀分布于整个皮层组织。细胞形态有所不同。DAB 显色呈棕黄色。缺氧各组阳性细胞数量及细胞膜着色度明显高于正常组，且随着缺氧时间的增加而增加(图 1A、B)。海马 NR1 阳性细胞则主要分布于 CA 各区神经细胞内，细胞呈色与皮层相识，细胞膜及细胞质染成棕黄色。由于海马各区不同细胞层中的细胞形态不同，所呈现的 NR1 阳性细胞的形态亦不同。缺氧各组大鼠海马结构内 NR1 免疫反应产物明显高于对照组，且随着缺氧时间的增加而增加(图 1C、D)。



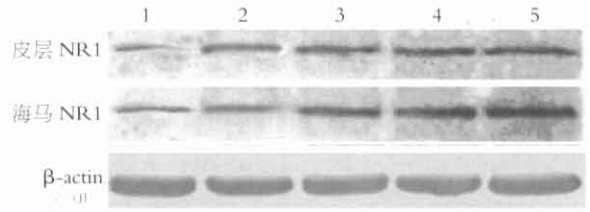
A：皮层正常对照组；B：皮层缺氧 14 d 组；C：海马正常对照组；D：海马缺氧 14 d 组

图 1　大鼠皮层 NR1 免疫组化结果　(ABC × 200)

2.2　Western blot 检测缺氧不同时间皮层和海马 NR1 蛋白含量的变化

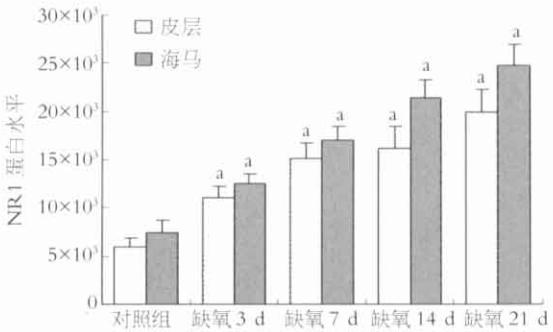
Western blot 实验进一步验证了免疫组化观察到的结果，皮层和海马缺氧各组 NR1 的表达均高于对照组(图 2)。经 SX-300 图像分析系统检测 NR1 蛋白表达的相对水平(图 3)。其结果提示：皮层缺氧各组 NR1 蛋白含量变化明显高于对照组($P < 0.01$，$n = 7$)。分别是对照组的 1.83、2.53、2.68、3.32

倍。海马缺氧各组 NR1 蛋白含量变化与皮层基本相同明显高于对照组($P<0.01$,$n=7$)。且随着时间的延长而增加,分别是对照组的1.69、2.31、2.9、2.35倍。



1:对照组;2:缺氧3 d;3:缺氧7 d;4:缺氧14 d;5:缺氧21 d

图2 Western blot 检测缺氧不同时间皮层、海马 NR1 蛋白含量的变化

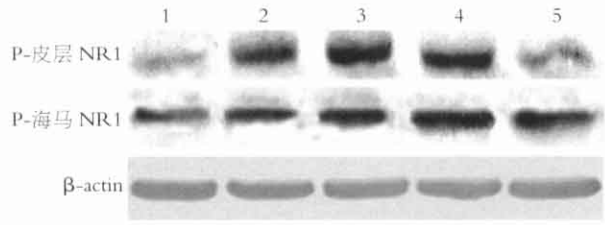


a:$P<0.01$,与对照组比较

图3 缺氧不同时间对 NR1 蛋白水平影响

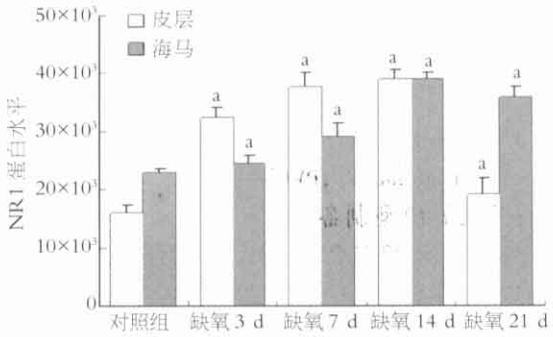
2.3 Western blot + 免疫共沉淀方法检测 NR1 酪氨酸磷酸化水平变化

利用 Western blot + 免疫共沉淀方法检测分别得到皮层及海马缺氧不同时间点 NR1 酪氨酸磷酸化蛋白条带(图4),经 SX-300 凝胶成像分析系统处理后显示,无论皮层或海马与对照组比较,缺氧各时相点 NR1 酪氨酸磷酸化水平均明显增加(图5,$P<0.01$,$n=7$),在14 d时 NR1 酪氨酸磷酸化水平达到最高,而后有所下降,21 d时仍显著高于对照组($P<0.01$,$n=7$),皮层分别是对照组的2.03、2.37、2.45、1.2倍。海马分别是对照组的1.06、1.27、1.71、1.57倍。



1:对照组;2:缺氧3 d;3:缺氧7 d;4:缺氧14 d;5:缺氧21 d

图4 Western blot + 免疫共沉淀方法检测缺氧不同时间皮层、海马 NR1 酪氨酸磷酸化水平变化



a:$P<0.01$,与对照组比较

图5 缺氧不同时间对 NR1 磷酸化蛋白水平影响

3 讨论

脊椎动物脑组织中的神经递质分为兴奋性与抑制性两大类。谷氨酸是主要的兴奋性神经递质,储存于突触前膜中的谷氨酸主要与突触后膜上的谷氨酸受体结合而发挥作用。谷氨酸受体分3类:NMDA 受体,α-甲基-5-甲基恶唑-4-丙酸受体和代谢性谷氨酸受体[6]。其中,NMDA 受体是一类配体门控型 Ca^{2+} 通道。该型受体是通过受体激活直接使离子通道开放,当谷氨酸等神经递质激活受体,其受体蛋白构象改变,离子通道开放,阳离子如 Ca^{2+}、K^+、Na^+ 等可进出细胞,使细胞膜去极化和神经元兴奋。NMDA 受体可调节神经元的存活,树突、轴突结构发育及突触可塑性,可影响神经元回路的形成及学习记忆过程。因此,NMDA 受体活性调节紊乱是许多神经性疾病发生、发展的基础[1,2,7]。

NMDA 受体由 NR1 和 NR2(2A-2D)两类亚基组成,NR1 是 NR 的功能亚单位,NR2A 及 NR2B 是 NR 的调节亚单位,NR 的 C2 末端在细胞内,C2 末端区存在多种蛋白激酶磷酸化位点,此为 NR 的磷酸化和去磷酸化调节提供了结构基础。研究证明 NR C2 末端可以被酪氨酸蛋白激酶(PTK)磷酸化,NR1 C2 末端磷酸化时,可解除 Mg^{2+} 对 NR 阻断,促进 Ca^{2+} 通过[8,9]。

我们的实验结果表明,缺氧后各时相点皮层、海马 NR1 表达均显著高于对照组,且 NR1 酪氨酸磷酸化水平亦显著增高,这一结果与文献[10]报道的基本一致。提示我们,脑发生缺氧时,可产生持续的神经元去极化,突触内谷氨酸大量释放,同时可能还伴有突触前神经元和胶质细胞的谷氨酸摄取障碍,使得突触间隙内谷氨酸大量增加,并过度激活 NR,使 NMDA 受体活性上调,配体门控 Ca^{2+} 通道过度开放,Ca^{2+} 大量内流,引起细胞内神经纤维蛋白分解,不可逆的线粒体损伤以及膜磷脂破坏和花生四烯酸盐释放等最终导致神经细胞死亡[11]。在缺氧的整个过程(21 d)中,检测各

时相点 NR1 蛋白表达水平，不管是皮层还是海马都呈随着缺氧时间延长而增加，21 d 时亦未见到下降的趋势。而 NR1 酪氨酸磷酸化水平则在第 14 天时达到最高，以后有所下降，21 d 时仍显著高于对照组（$P < 0.01$）。其结果提示我们，在缺氧性脑损伤过程中，高水平持续性的 NR1 酪氨酸磷酸化，则可能是引起 NMDA 受体活性上调，通道开放增加，改变 NMDA 受体功能的主要原因。检测 NR1 酪氨酸磷酸化的变化对于研究由 NR 介导的缺氧性脑损伤的机制可能具有重要意义。缺氧 14 d 以后 NR1 磷酸化水平有所下降，可能是由于缺氧一定时间后机体对缺氧的耐受性增强有关。其机制有待进一步研究。

NR 作为一种离子通道受体，其活性具有明显的可调控性，关于 NR 活性调控，目前大多数的研究主要集中在利用 NR 的拮抗剂来抑制突触后 NR 活性和减少突触前谷氨酸释放这两个方面，我们的实验结果提示，既然缺氧导致 NR 的磷酸化增加是 NR 激活的重要原因，那么是否可以通过调节与 NR 磷酸化有关的酶活性，从而控制 NR 磷酸化状态，达到调控 NR 活性的目的。此有待于进一步证明。

参考文献：

[1] Kumar A, Zou L, Yuan X, *et al*. N-methyl-D-aspartate receptors: transient loss of NR1/NR2A/NR2B subunits after traumatic brain injury in a rodent model [J]. J Neurosci Res, 2002, 67 (6): 781 - 786.

[2] Hrabetova S, Serrano P, Blace N, *et al*. Distinct NMDA receptor subpopulations contribute to long-term potentiation and long-term depression induction[J]. J Neurosci, 2000, 20 (12): RC81.

[3] Cazevieille C, Safa R, Osborne N N. Melatonin protects primary cultures of rat cortical neurones from NMDA excitotoxicity and hypoxia/reoxygenation[J]. Brain Res, 1997, 768 (1 - 2): 120 - 124.

[4] 阮怀珍，范晓棠，张金海，等. 高原低氧对大鼠下丘脑谷氨酸、天门冬氨酸和 NOS 的影响[J]. 中国病理生理杂志，2000，16(11)：1198 - 1201.

[5] Takagi N, Shinno K, Teves L, *et al*. Transient ischemia differentially increases tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits 2A and 2B[J]. J Neurochem, 1997, 69(3): 1060 - 1065.

[6] Brandstatter J H, Dick O, Boeckers T M. The postsynaptic scaffold proteins ProSAP1/Shank2 and Homer1 are associated with glutamate receptor complexes at rat retinal synapses [J]. J Comp Neurol, 2004, 475(4): 551 - 563.

[7] Liu Y, Zhang J. Recent development in NMDA receptors[J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(10): 948 - 956.

[8] Moon I S, Apperson M L, Kennedy M B. The major tyrosine-phosphorylated protein in postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(9): 3954 - 3958.

[9] Wang Y T, Salter M W. Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases[J]. Nature, 1994, 369(6477): 233 - 235.

[10] Guerguerian A M, Brambrink A M, Traystman R J, *et al*. Altered expression and phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors in piglet striatum after hypoxia-ischemia[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2002, 104(1): 66 - 80.

[11] Choi D W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent[J]. Neurosci Lett, 1985, 58(3): 293 - 297.

（编辑　薛国文）

（上接 1741 页）

2　讨论

下肢静脉血栓与肺栓塞形成的一大主要因素为：静脉血流淤滞，血管损伤和血液黏稠度增加。血肺栓塞大多数是由于发生在下肢周围静脉中的深静脉血栓（DVT）所致。DVT 的危险因素为：仁期卧床、手术、高脂血症、高血压、恶性肿瘤等[1]。该患者为胃癌晚期，下肢静脉血栓与肺栓塞的原因考虑与血液的高凝状态有关。因恶性肿瘤组织可释放高凝物质，使血液凝固性增加，导致血栓形成。

乳糜胸临床较罕见，系胸上淋巴管损伤和阻塞，导致淋巴管扩张与破裂，引起含脂上高的淋巴液积聚胸腔而形成的乳白色胸水。据文献[2]报道，成人乳糜胸最常见的原因是胸腔恶性肿瘤及手术创伤。该患者乳糜胸水中查见可疑癌细胞，考虑胃癌淋巴结转移或胸腔转移，引起胸腔淋巴管及其分支受压、阻塞或破裂，导致乳糜液漏于胸腔有关。

BPE 临床也较为少见，病因复杂。其病因以炎症性疾为最常见，恶性肿瘤最为常见[3]。胃癌晚期，极少数患者可出现 BPE。该患者 BPE 形成的机制考虑与淋巴管阻塞及胸外压迫引起淋巴循环受阻，低蛋白血症等因素有关。尽管多次胸水细胞学检查未发现癌细胞，但不能除外胃癌胸膜转移的可能。左右侧胸水性状不同，左侧呈血性胸水，可能与肺栓塞有关。

晚期胃癌主要表现为上腹疼痛、饱胀感、恶心、呕吐等消化道症状，癌肿扩散转移可出现腹水、肝大、黄疸、左锁骨上淋巴结肿大等。该患者无消化道症状，而以下肢静脉血栓、肺栓塞、乳糜胸及双侧不同胸水为主要表现，以上还多种消化道外表现为首发症状的胃癌尚少见报道。该患者入院后进行全科讨论，考虑上述表现不能用原发病变解释，而乳糜胸常见于恶性肿瘤，故进一步行胃镜检查，最后经病理学检查得以明确诊断。在临床工作中，对罕见多系统的复杂病例，应考虑到恶性肿瘤的可能，如进行针对性检查不能明确诊断，还应考虑进行全面血系统的检查，尽可能寻找诊断线索，以免漏诊、误诊，以争取尽早治疗，为患病的预后得出评估。

关键词：乳糜胸；下肢静脉血栓；肺栓塞；胃癌
中图法分类号：R735.2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 李相高，肺血栓栓塞[M]. 李相高，李东兰，陈和平等编. 北京：中国协和医科大学出版社，2004：1009 - 1042.

[2] 郭耀冰，李东鸣. 乳糜胸水的诊断和治疗[J]. 首都医学，2004，3(5)：371 - 373.

[3] 王伟，钱旭，钱桂生. 胸腔积液489例临床分析[J]. 中国实用内科杂志，2002，22(5)：289 - 290.

（编辑　龙　亮）