文章编号:1000-5404(2010)21-2311-03

论著

# 阻断NR2A可增强脑缺血小鼠海马神经元树突棘丢失和认知功能障碍

陈远寿[1],陈 昱[2],张 弛[2] (563003 贵州 遵义,遵义医学院生理学教研室[1];200031 上海,中国科学院神经科学研究所神经科学国家重点实验室[2])

【摘要】 目的 探讨N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR or NR)亚基NR2A在脑缺血再灌注引起的海马CA1区神经元树突棘丢失和认知功能障碍中的作用。方法 制作三动脉阻断(3-VO)GFP转基因小鼠全脑缺血模型,小鼠随机分为假手术组、脑缺血再灌注(I/R)组和NVP-AAM077(NVP)干预组;应用跳台试验测试小鼠学习记忆能力,激光共聚焦和Neurolucida软件分析检测海马CA1区神经元形态及树突棘的变化。结果 学习记忆能力测试发现,I/R组明显差于sham组($P<0.05$),NVP干预组差于sham组和I/R组($P<0.05$);I/R组CA1区神经元树突棘的数量明显少于假手术组($P<0.01$),NVP干预能进一步增加缺血/再灌注所致的CA1区神经元树突棘的丢失($P<0.05$)。结论 NMDA受体亚基NR2A在小鼠脑缺血再灌注所致树突棘丢失和脑认知功能损害中具有重要作用。

【关键词】 NVP-AAM077;NMDA受体;树突棘;学习记忆;脑缺血
【中图法分类号】 R338.26;R322.81;R743.31 【文献标志码】 A

# Blocking NR2A enhances loss of neuronal dendritic spines and cognitive dysfunction in mice after cerebral ischemia

Chen Yuanshou[1], Chen Min[2], Zhang Chi[2] ([1]Department of Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003; [2]State Key Laboratory of Neuroscience, Institute of Neuroscience, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031, China)

【Abstract】 Objective To study the role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR2A in loss of dendritic spines in CA1 region and cognitive dysfunction due to reperfusion of cerebral ischemia. Methods A global cerebral ischemia model of male C57BL/6 GFP transgenic mice was established using the three-Vessel occlusion (3-VO) method. The mice were randomly divided into sham-operation group, ischemia/reperfusion (I/R) group and NVP-AAM077 treatment group (NVP). Step-down test was used to evaluate the learning and memory ability of mice. Alterations of dendritic spines in CA1 region were detected by laser scanning confocal microscopy. Results The learning and memory ability was significantly poorer in I/R group than in sham-operation group ($P<0.05$). The function was significantly poorer in NVP treatment group than in sham-operation group and I/R group ($P<0.05$). The number of dendritic spines in CA1 region was significantly less in I/R group than in sham-operation group ($P<0.01$), indicating that NVP can increase the loss of dendritic spines in CA1 region due to I/R injury ($P<0.05$). Conclusion NMDA receptor subunit NR2A plays an important role in loss of dendritic spines and cognitive dysfunction in mice due to I/R injury.

【Key words】 NVP-AAM077; NMDA receptor; dendritic spine; learning and memory; global cerebral ischemia

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30721004); Corresponding author: Chen Yuanshou, Tel: 86-852-8609442, E-mail: jcbshengli@163.com

缺血性脑血管病是引发脑认知功能障碍的重要原因之一,脑缺血后过度激活N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR or NR)导致的迟发性神经元损伤、树突形态改变和树突棘的丢失,尤其是海马内树突棘脱落及消失可能是导致脑缺血后患者认知功能障碍的主要原因[1]。大量研究表明,NMDAR与长时程突触增强(long-term potentiation, LTP)、学习记忆、突触可塑性改变、缺血缺氧损伤,以及老年性痴呆等神经退行性疾病都有密切关系[2,3],但其对缺血后脑认知功能障碍影响的具体机制尚不清楚。本实验应用绿色荧光蛋白转基因小鼠为研究对象,采用行为学和形态学的方法,观察全脑缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)以及用特异性NR2A拮抗

【基金项目】 国家自然科学基金(30721004)
【通信作者】 陈远寿,电话:(0852)8609442,E-mail:jcbshengli@163.com

剂干预后小鼠学习记忆能力和树突棘的变化，以探讨NR2A在脑缺血再灌注引起的海马CA1区神经元树突棘丢失和脑认知功能障碍中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

成年雄性C57BL/6绿色荧光蛋白（Green fluorescence protein，GFP）转基因小鼠，体质量25～30 g，由中国科学院神经科学研究所实验动物室提供；NVP-AAM077（NR2A选择性拮抗剂）由中国科学院上海生命科学院药物研究所合成，先前的研究已证实了其特异性[4]。

### 1.2 动物分组

将GFP转基因小鼠随机分为假手术组（sham组）、脑缺血再灌注对照组（I/R组）、NVP-AAM077干预组（NVP+I/R组）。每组8只。干预组于缺血前30 min腹腔注射NVP-AAM077（5.0 mg/kg），sham组和I/R对照组在术前30 min注射等量生理盐水。

### 1.3 小鼠全脑缺血再灌注模型的制作

参照文献[4]制备三血管阻塞（3-VO）全脑缺血模型。Sham组小鼠进行同样的手术处理，但不进行三血管阻塞。

### 1.4 跳台试验（Step-Down Test）测试小鼠学习记忆能力

跳台试验的设置和实验方法参照文献[5]，分别检测小鼠第1次跳上安全台的反应时间（reaction time，RT）和5min内从台上跳下受到的电击次数（错误次数，Number of errors，NR），以此作为学习成绩。24 h后将小鼠放在平台上记录其跳下平台的潜伏期（Step-Down Latency，SDL）及5 min内受到电击的错误次数（NR），以此作为记忆成绩。

### 1.5 脑组织取材及切片制作

小鼠再灌注72 h后，用10%水合氯醛（300 mg/kg，i.p.）麻醉，经心用0.9%生理盐水和4%多聚甲醛灌注固定，迅速取脑，避光下后固定过夜，分别用15%和30%蔗糖脱水直至脑组织沉下。行冰冻冠状切片（20 μm）（德国莱卡冰冻切片机）。

### 1.6 海马CA1神经元图像采集及树突棘的形态定量分析

采用LSM510 META激光扫描共聚焦显微镜（德国蔡司）扫描拍摄海马CA1锥体细胞，扫描拍摄图像经过Neurolucida软件绘制重塑神经元的结构，并用NeuroExplorer软件分别统计出二级树突的树突棘的密度。

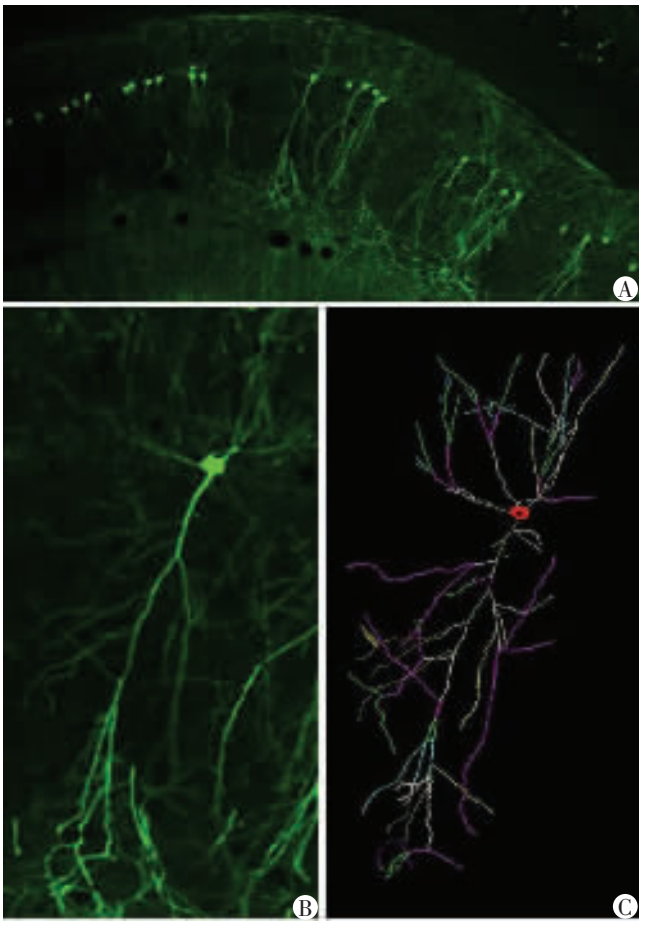
### 1.7 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 11.5统计软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 GFP在小鼠海马CA1区神经元的表达及神经元的重塑

GFP可表达于转基因小鼠海马CA1区的锥体神经元，用激光共聚焦显微镜逐层扫描（0.5 μm/层）后，通过Neurolucida软件可绘制出重塑的神经元结构。见图1。



A：海马CA1区GFP神经元 （×100）；B：放大的CA1区锥体神经元 （×200）；C：Neurolucida软件重塑的神经元

**图1 GFP在小鼠海马CA1区神经元的表达**

### 2.2 NVP-AAM077对脑缺血再灌注小鼠学习记忆能力的影响

跳台实验结果显示，第1次测试时，受电击后NVP组小鼠的反应时间较sham组和I/R组明显延长（$P<0.05$），错误次数也明显增多（$P<0.05$）。24 h后第2次测试发现，I/R组的SDL与sham组比较明显缩短，NVP组的SDL较sham组和I/R组缩短（$P<0.05$），错误次数也增多（$P<0.05$）；各组实验结果见表1。

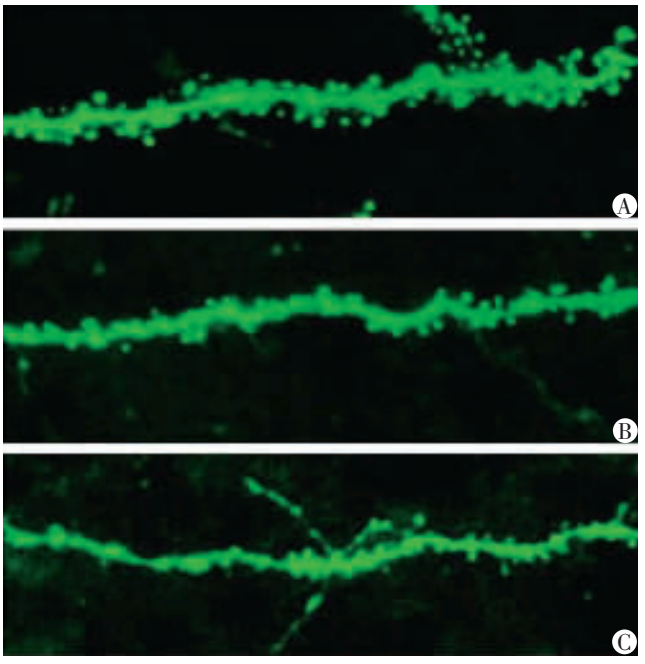
**表1 各组小鼠跳台实验结果的比较（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）**

| 组别 | 学习训练 | | 记忆测试 | |
|---|---|---|---|---|
| | 反应时间（$t$/s） | 错误次数 | 潜伏期（$t$/s） | 错误次数 |
| sham组 | 36.13±9.52 | 1.13±0.83 | 212.38±22.54 | 1.00±0.53 |
| I/R组 | 83.25±13.49[a] | 3.25±0.82[a] | 93.38±14.88[a] | 2.38±0.70[a] |
| NVP组 | 109.75±16.02[ab] | 4.13±1.80[ab] | 60.87±17.04[ab] | 3.25±1.83[ab] |

a：$P<0.05$，与sham组比较；b：$P<0.05$，与I/R组比较

### 2.3 NVP-AAM077可增加脑缺血引起的小鼠海马CA1区神经元树突棘的丢失

每微米CA1区神经元二级树突棘数量，与sham组（1.36±0.09）比较，I/R组（0.76±0.12）和NVP干预组（0.43±0.11）显著减少（$P<0.01$）；NVP干预组CA1区神经元树突棘数量低于I/R组（$P<0.05$）。见图2。




A：sham 组；B：I/R 组；C：AVP + I/R 组

**图 2　小鼠海马 CA1 区神经元树突棘的变化**　（×1 000）

## 3　讨论

学习记忆是动物和人的高级神经活动。海马（尤其是 CA1 区）是脑内参与信息贮存和记忆功能的重要部分，也是对缺血、缺氧最敏感的区域。海马神经元突触存在大量的 NMDA 受体，NMDA 受体主要由 NR1、NR2A ~ D、NR3A ~ B 亚基组成，功能性的 NMDA 受体由 NR1 和 NR2 共同组成[2,3]。不同的 NR2 亚单位可赋予通道复合物不同的电生理学和药理学特性[2]，NR2A 和 NR2B 可以通过转化比率以适应调控需要[3]。NMDA 受体是学习记忆的关键物质，在 LTP 诱导和维持过程中起重要作用[3]，但 NMDA 受体（尤其是各亚基）是如何参与和影响学习记忆的机制，目前尚不完全清楚。Bartlett 等[6] 报道，0.1 μmol/L NVP 阻断 NR2A 可降低大鼠海马脑片 LTP 63%，0.4 μmol/L NVP 就可完全阻断大鼠海马脑片 LTP 的产生。本实验研究发现，应用 NVP 阻断小鼠的 NR2A 后，可使脑缺血小鼠学习记忆能力进一步下降，提示 NMDA 受体亚基 NR2A 在学习记忆的形成过程中有重要作用，并且是诱导和维持 LTP 的关键亚基。

学习记忆的神经生物学基础是突触可塑性。研究表明，脑缺血时常伴有脑认知功能和学习记忆障碍[7,8]，其机制可能与脑缺血引起的神经元损伤和突触可塑性改变有关。树突棘是树突分枝上的棘状突起，是神经元间形成突触的主要部位。在学习记忆过程中，突触可塑性变化常与树突棘的形成、脱落、扩张和萎缩等形态变化相伴发生。脑缺血的在体和离体实验研究均表明，脑缺血可导致树突棘的丢失[1,9-11]，我们先前研究发现，应用 NVP 阻断小鼠的 NR2A 后，可加重脑缺血引起的海马 CA1 区神经元损伤[4]，这些研究均表明脑缺血可导致海马神经元突触可塑性变化。本实验研究也表明，小鼠脑缺血后海马 CA1 区锥体神经元树突棘出现丢失，并且阻断 NR2A 后，可进一步加重脑缺血所致的树突棘丢失。据此推测，阻断 NR2A 后引起脑缺血所致学习记忆障碍可能与树突棘丢失而导致的突触可塑性变化有关。

本研究结果证实，小鼠脑缺血再灌注后，海马 CA1 锥体神经元树突棘减少，学习记忆能力下降，应用选择性阻断剂 NVP 阻断 NR2A 后可进一步加重脑缺血所致树突棘丢失和学习记忆障碍，但其具体的分子生物学机制还有待进一步研究。

## 参考文献：

[1] Brown C E, Li P, Boyd J D, *et al*. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke[J]. J Neurosci, 2007, 27(15): 4101 - 4109.

[2] Gielen M, Sieqler Retchless B S, Mony L, *et al*. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits[J]. Nature, 2009, 459(7247): 703 - 707.

[3] Yashiro K, Philpot B D. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity[J]. Neuropharmacology, 2008, 55(7): 1081 - 1094.

[4] 陈远寿，罗孝美，陈旻，等. NVP-AAM077 和 Ro25-6981 对全脑缺血小鼠海马神经元损伤及 BDNF 表达的影响[J]. 中国药理学通报，2010，26(8)：1010 - 1013.

[5] 张笋，王维平，王佩，等. 不同剂量盐酸多奈哌齐对慢性癫痫大鼠空间学习记忆功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(24)：2307 - 2310.

[6] Bartlett T E, Bannister N J, Collett V J, *et al*. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus[J]. Neuropharmacology, 2007, 52(1): 60 - 70.

[7] 柳春雨，陈康宁，段炜，等. 局灶性脑缺血再灌注认知功能变化的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(19)：1976 - 1978.

[8] 李静，周华东，王延江，等. 脑缺血对阿尔茨海默病大鼠认知功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(13)：1264 - 1267.

[9] Brown C E, Wong C, Murphy T H. Rapid morphologic plasticity of peri-infarct dendritic spines after focal ischemic stroke[J]. Stroke, 2008, 39(4): 1286 - 1291.

[10] Nikonenko A G, Radenovic L, Andjus P R, *et al*. Structural features of ischemic damage in the hippocampus[J]. Anat Rec, 2009, 292(12): 1914 - 1921.

[11] González-Burgos I, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, *et al*. Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats[J]. Neurosci Lett, 2007, 423(2): 162 - 166.

（收稿 2010-06-17 修回 2010-07-07）

（编辑　汪勤俭）