基础研究 文章编号：0253-3626(2010)07-0992-03

p75NTR 在谷氨酸诱导海马神经元兴奋毒性损伤中的表达

吴兰香，滕永真，李春莉，吴明军
（重庆医科大学生命科学研究院，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察谷氨酸诱导海马神经元兴奋毒性损伤中神经营养因子受体 p75（p75 neurotrophin receptor，p75NTR）表达水平的变化。方法：建立谷氨酸诱导的新生大鼠海马神经元兴奋毒性损伤模型，RT-PCR 和 Western blot 方法检测 p75NTR 在mRNA 和蛋白质水平的表达变化。结果：谷氨酸刺激后，p75NTR 在 mRNA（$P<0.01$）和蛋白质（$P<0.05$）水平的表达较对照组明显增高；N- 甲基 -D- 门冬氨酸受体（N-methyl-D-aspartate receptor，NMDAR）的特异性拮抗剂 MK-801 可明显减弱 p75NTR 在 mRNA 和蛋白质水平的表达上调（$P<0.05$）。结论：p75NTR 的活化与谷氨酸兴奋毒性神经损伤过程密切相关。

【关键词】谷氨酸；兴奋毒性；p75NTR
【中国图书分类法分类号】Q954.67 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-18

p75NTR expression in cultured hippocampal neurons during glutamate-induced excitotoxicity

WU Lan-xiang, et al
(*Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the change in expression level of p75NTR (p75 neurotrophin receptor) in cultured hippocampal neurons during glutamate-induced excitotoxicity. *Methods*: Excitotoxicity was induced by glutamate in rat cultured hippocampal neurons; RT-PCR and western blot were used to detect the change in expression level of p75NTR. *Results*: After glutamate exposure, p75NTR mRNA ($P<0.01$) and protein ($P<0.05$) levels had evaluated markedly compared with control group; MK-801, a specific antagonist of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) could decrease p75NTR mRNA and protein levels dramatically compared with glutamate group ($P<0.05$). *Conclusion*: p75NTR plays an important role in neuronal damage during glutamate-induced excitotoxicity.

【Key words】Glutamate; Excitotoxicity; p75NTR

p75NTR 属于肿瘤坏死因子受体（Tumor necrosis factor receptor，TNFR）超家族。以往研究认为，p75NTR 作为神经营养因子的普遍受体可以促进神经元的存活和分化，但近年来发现，在许多中枢神经系统（Central nervous system，CNS）疾病如阿尔茨海默病、脑缺血、癫痫等的发病过程中，p75NTR 表达水平明显增高，其作用是促进神经元凋亡，而这些疾病的病理过程均与兴奋毒性神经损伤密切相关[1,2]。本研究利用体外海马神经元培养体系，观察了谷氨酸诱导兴奋毒性神经损伤与 p75NTR 表达变化之间的相关性，对神经元兴奋毒性损伤的干预具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 新生（0～1 d）SD 大鼠 18 只，购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 试剂 多聚赖氨酸、阿糖胞苷、L- 谷氨酸、碘化丙啶（Propidium Iodide，PI）、小鼠抗大鼠 β-actin 单克隆抗体、碱性磷酸酶标记兔抗小鼠二抗及显色底物为 Sigma 公司产品；DMEM 干粉、胎牛血清、马血清、N_2、B27 为 Gibco 公司产品；小鼠抗大鼠 p75NTR 单克隆抗体为 Chemicon 公司产品；DeadEndTM. Fluorometric TUNEL System 凋亡检测试剂盒为 Promega 公司产品；TRIzol 为 Invitrogen 公司产品；一步法 RT-PCR 试剂盒为天更公司产品；引物由上海生工生物工程有限公司合成；其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 新生大鼠原代海马神经元培养[3] 新生 SD 大鼠断头后快速分离双侧海马，0.125% 胰酶于 37℃消化 30 min，置于 37℃、5% CO_2 的培养箱内培养。种植液（体积比）由 78% DMEM、10% 胎牛血清、10% 马血清、1% 青链霉素、1% 谷氨酰胺组成。第 2 d，更换为维持液。维持液（体积比）由 90%DMEM、5% 马血清、1% 青链霉素、1% 谷氨酰胺、1% N_2、2% B27 组成。以后每周换液 2 次，每次更换 50% 新鲜培养液。第 5 d，加入

作者介绍：吴兰香（1979-），女，博士，
研究方向：中枢神经系统神经保护。

基金项目：重庆医科大学校级科研课题（编号：0200101097）。

4 mg/L 阿糖胞苷,抑制非神经细胞过度增殖。

1.2.2 海马神经元谷氨酸兴奋毒性模型的建立[4] 本实验分为 3 组,分别为对照组、谷氨酸组和 MK-801 保护组。具体实验操作如下:海马神经元体外培养第 18 d,向培养液中加入 100 μmol/L 谷氨酸,在 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 10 min,更换新鲜培养液后,于培养箱中继续培养,此为谷氨酸组;加入谷氨酸前 2 min 加入 10 μmol/L 的 MK-801,即离子型谷氨酸受体——N- 甲基 -D- 门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor,NMDAR)的竞争性拮抗剂,此为 MK-801 保护组;正常对照组即以 0.9%生理盐水代替谷氨酸。

1.2.3 神经元损伤程度的评价 谷氨酸刺激后 18 h,通过检测神经元存活率及凋亡率来定量评价神经元兴奋毒性损伤程度。将培养细胞在室温下用 0.12 g/L 台盼蓝染色 10 min,4%多聚甲醛 4℃固定 30 min,倒置显微镜下计数 50 个相邻视野中不蓝染的细胞,即存活细胞。凋亡率检测按 Dead-EndTM. Fluorometric TUNEL System 试剂盒说明书进行:PI 使所有细胞红染,凋亡细胞则被标记为绿色,从而计算凋亡率。

1.2.4 海马神经元总 RNA 提取和 RT-PCR TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,取样用紫外分光光度计测 A_{260}/A_{280} 吸收值。p75NTR 引物:5'-GGAGCCAACCAGACCGTGTG-3',5'-CGCCTTGTTTATTTTGTTTGC-3',片段长度 682 bp;β-actin 引物:5'-TGATCTTCATGGTGCTAGGAGCC-3',5'-GGTATGGGTCAGAAGGACTCC-3',片段长度 843 bp。PCR 扩增反应条件:p75NTR-94℃、2 min,1 循环;94℃、30 s,58℃、30 s,72℃、4 min,30 循环;β-actin-94℃、2 min,1 循环;94℃、30 s,55℃、30 s,72℃、4 min,30 循环。产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳,紫外光下凝胶成像,图像分析软件(Quentity One,Bio-Rad 公司,2006 年)进行灰度定量分析。

1.2.5 海马神经元总蛋白的提取及 Western blot 分析 培养皿中加入 4℃预冷的细胞裂解液(50 mmol/L Tris-buffer,150 mmol/L NaCl,1% Triton X-100,1 mmol/L EDTA,0.1% SDS,1 mmol/L PMSF)于冰上静置 30 min,收集蛋白裂解液,于 4℃、12 000 g 离心 15 min,收集上清,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白质样品经 12% SDS- 聚丙烯凝胶电泳后,电转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉于室温下封闭 1 h。将膜置于 1:500 小鼠抗大鼠 p75NTR 单克隆抗体或 1:4 000 小鼠抗大鼠 β-actin 单克隆抗体稀释液中,4℃孵育过夜;加入 1:4 000 碱性磷酸酶标记兔抗小鼠二抗室温孵育 2 h,加入显色底物显色 1~2 min,图像分析软件进行灰度定量分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,实验资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

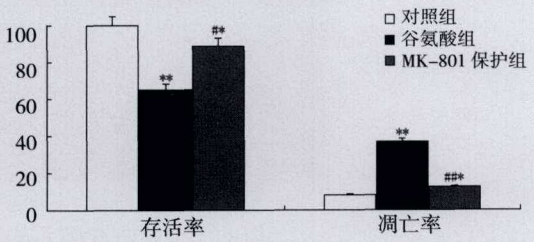
2 结 果

2.1 谷氨酸诱导的海马神经元兴奋毒性损伤及 MK-801 的保护作用

100 μmol/L 谷氨酸刺激 10 min 对原代培养的海马神经元有明显毒性:谷氨酸组的神经元存活率约为 65%,凋亡率约为 37.2%。MK-801 对谷氨酸诱导的兴奋毒性损伤有明显保护作用:MK-801 组的神经元存活率约为 88.7%,凋亡率约为 11.8%(表 1,图 1、2)。

表 1 谷氨酸和 MK801 预处理对海马神经元存活率和凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$)

	n	对照组	谷氨酸组	MK-801 保护组
存活率(%)	4	100	64.80 ± 3.10**	87.60 ± 2.60#*
凋亡率(%)	4	8.10 ± 1.02	36.80 ± 1.57**	12.30 ± 1.24#*



*$P<0.05$, **$P<0.01$ 与对照组比较;#$P<0.05$, ##$P<0.01$ 与谷氨酸组比较;A. 神经元存活率;B. 神经元凋亡率. 1. 对照组;2. 谷氨酸组;3. MK-801 保护组

图 1 谷氨酸诱导神经元损伤及 MK-801 的保护作用

2.2 谷氨酸诱导海马神经元兴奋毒性损伤中 p75NTR mRNA 的表达变化

实验结果显示,正常神经元中 p75NTR mRNA 的基础表达水平较低,而在谷氨酸刺激后 6 h,p75NTR mRNA 的表达水平较对照组明显增高($P<0.01$)。与谷氨酸组相比,MK-801 保护组的 p75NTR mRNA 的表达明显下调($P<0.05$)(表 2,图 3)。

表 2 谷氨酸诱导海马神经元兴奋毒性损伤 p75NTR mRNA 与蛋白质表达水平变化($\bar{x} \pm s$)

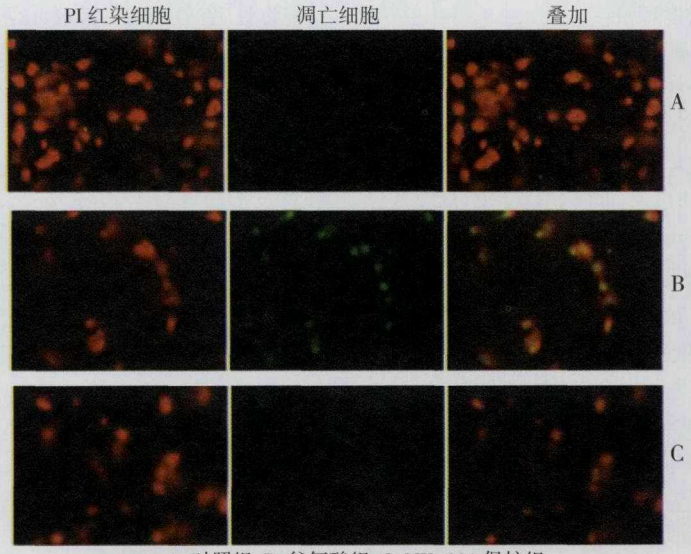
	n	对照组	谷氨酸组	MK-801 保护组
mRNA 表达相对密度值	4	0.29 ± 0.04	0.57 ± 0.03**	0.41 ± 0.06#*
蛋白质表达相对密度值	4	0.43 ± 0.01	0.96 ± 0.05*	0.62 ± 0.04#*

2.3 谷氨酸诱导海马神经元兴奋毒性损伤中 p75NTR 蛋白质的表达变化

Western blot 检测结果显示,p75NTR 蛋白在正常神经元中表达水平较低。谷氨酸刺激后 18 h,p75NTR 表达显著增高($P<0.01$)。MK-801 保护组 p75NTR 表达水平较谷氨酸组明显下调($P<0.05$)(表 2,图 4)。

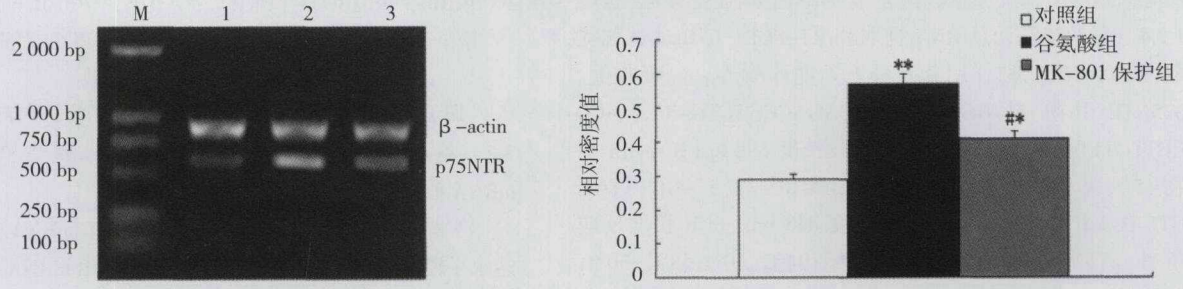
3 讨 论

谷氨酸是脊椎动物中枢神经系统内主要的兴奋性神经递质,主要存在于谷氨酸能神经末梢囊泡内。正常情况下,神经元去极化,突触前膜释放谷氨酸入突触间隙,作用于突触后膜的谷氨酸受体,对神经元发育、突触可塑性的维持、神经元回路的形成及学习过程起关键作用。然而,在脑卒中、癫痫、脑外伤等各种原因引起的脑缺氧缺血性改变时,突触前大量释放谷氨酸,过度激活突触后膜的谷氨酸受体,最终导



A. 对照组; B. 谷氨酸组; C. MK-801 保护组

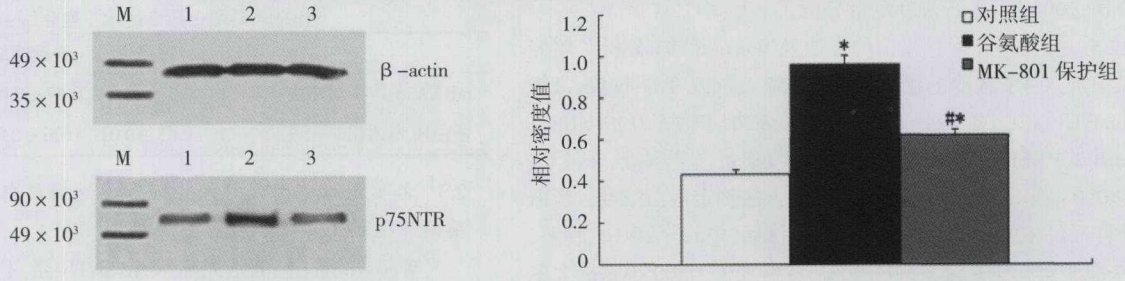
图 2　谷氨酸诱导神经元凋亡及 MK-801 的保护作用（×400）



*P<0.05, **P<0.01 与对照组比较; #P<0.05 与谷氨酸组比较

M. marker DL2000; 1. 对照组; 2. 谷氨酸组; 3. MK-801 保护组

图 3　谷氨酸诱导海马神经元兴奋毒性损伤中 p75NTR mRNA 的表达变化



*P<0.05 vs 对照组; #P<0.05 vs 谷氨酸组

M. marker; 1. 对照组; 2. 谷氨酸组; 3. MK-801 保护组

图 4　谷氨酸诱导海马神经元兴奋毒性损伤中 p75NTR 蛋白质的表达变化

致神经元凋亡或坏死。由于谷氨酸的这种神经毒性与它对中枢神经元的兴奋性有关，故称其为“兴奋毒性”，其中离子型谷氨酸受体——NMDAR 被过度激活后产生的钙内流在其中起关键作用[5]。

p75NTR 是已知最早分离出来的神经营养因子受体，在发育过程中呈现高表达，随着发育过程的结束，其表达量逐渐降低。p75NTR 在神经系统中广泛分布，以往认为，p75NTR 与神经营养因子的功能一致，二者结合后，能促进神经元的存活和分化。近年来发现，在许多 CNS 疾病如阿尔茨海默病、脑缺血、癫痫等的发病过程中，都出现 p75NTR 的表达增高，敲除或阻断 p75NTR 信号可以延缓病情发生和促进细胞存活。目前多数研究认为 p75NTR 可能通过促进神经元凋亡来参与这些疾病的病理过程，然而其活化机制以及下游信号途径尚不明确[1,6,7]。由于以上 CNS 疾病的发病机制中都存在兴奋毒性神经损伤这一共同途径，又有实验表明 p75NTR 的表达上调很可能与 NMDAR 的活化有关[8]，因此，明确兴奋毒性过程与 p75NTR 表达变化之间的关系便成为亟待解决的问题。

本研究结果显示，100 μmol/L 谷氨酸刺激 10 min 可以成功诱导体外培养海马神经元的兴奋毒性损伤。谷氨酸刺激后 6

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0995-04

STAT3 在小鼠急性病毒性心肌炎发病中的作用研究

吴巾红,钟家蓉,谢盛慧
(重庆医科大学附属儿童医院心内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:观察 STAT3 在小鼠急性病毒性心肌炎(Viral myocartditis,VMC)发病中的作用及其可能作用机制。方法:建立急性 VMC 小鼠模型,将 45 只小鼠随机分为 3 组:正常对照组 10 只、急性 VMC 组 15 只,急性 VMC+RPM 干预鼠 20 只,分别采用 DMEM 和 STAT3 特异性抑剂 RPM 0.4 mg/kg 每日腹腔注射,12 d 后观察小鼠的一般情况及存活率,心肌组织病理变化,心肌组织病毒滴度,ELISA 法检测血清 IFN-γ 和 TNF-α 含量。结果:与急性 VMC 鼠相比,急性 VMC+RPM 干预鼠一般情况明显加重,心肌组织变性坏死及炎性细胞浸润明显加重,并且血清中 IFN-γ 和 TNF-α 含量均增加,但心肌组织病毒滴度两组间无明显差异。结论:STAT3 活化在病毒性心肌炎小鼠发病中对心肌组织有一定的保护作用,抑制其活化,小鼠对 CVB3 的易感性明显增加;STAT3 活化虽不能干扰心肌组织中病毒复制,但却可通过抑制 IFN-γ、TNF-α 的过度表达而对心肌组织有一定保护作用。

【关键词】病毒性心肌炎;信号转导和转导激活子 3;雷帕霉素;柯萨奇病毒 B3
【中国图书分类法分类号】R542.211 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-21

Role of STAT3 in the pathogenesis of acute viral myocarditis in mice

WU Jin-hong, et al
(*Department of Cardiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of STAT3 in the pathogenesis of acute viral myocarditis (VCM) in mice and its possible mechanism. *Methods*: Acute VCM mice models were established forty-five mice were randomly divided into blind control group (n=10), virus-infection control group (n=15), RPM intervention group(n=20).In RPM intervention group, RPM was given to mice

作者介绍:吴巾红(1979-),女,硕士,
研究方向:儿童心血管疾病。
通讯作者:钟家蓉,女,教授,E-mail:zhongjiarongcq@163.com。
基金项目:重庆市卫生局资助(编号:渝卫科教[07-2-141])。

h,p75NTR mRNA 水平明显增高;谷氨酸刺激后 18 h,p75NTR 蛋白质水平明显上调。NMDAR 的特异性拮抗剂 MK-801 可明显阻断兴奋毒性过程中 p75NTR 的表达变化。MK-801 是一种经典的 NMDAR 拮抗剂,能不可逆地与 NMDAR 离子通道内的 PDZ 位点结合,堵塞离子通道,从而使细胞外的钙离子无法内流,具有非常好的抗兴奋毒性损伤效果,然而由于其严重的毒副作用,无法用于动物实验和临床,目前仅局限于体外实验中使用[9]。以上结果表明,p75NTR 在 CNS 疾病中的活化与兴奋毒性神经损伤过程密切相关,很可能是谷氨酸的 NMDAR 激活后进而活化的下游分子,参与了兴奋毒性损伤中的促凋亡过程。因此,对 p75NTR 进行调控可望为兴奋毒性神经损伤的干预提供新的策略和手段。

参 考 文 献

[1] Blöchl A, Blöchl R. A cell-biological model of p75NTR signaling [J]. J Neurochem, 2007, 102 (2):289-305.

[2] Greenwood S M, Connolly C N.Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity[J].Neuropharmacology, 2007, 53 (8):891-898.

[3] Yamada K A, Rothman S M.Diazoxide blocks glutamate desensitization and prolongs excitatory postsynaptic currunts in rat hippocampal neurons [J]. J Physiol, 1992, 458 (1): 409-423.

[4] Michaels R L, Rothman S M.Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations[J].J Neurosci, 1990, 10 (1):283-292.

[5] Albensi B C. The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity[J].Curr Pharm Des, 2007, 13 (31): 3185-3194.

[6] Longo F M, Massa S M.Small molecule modulation of p75 neurotrophin receptor functions[J].CNS Neurol Disord Drug Targets, 2008, 7 (1):63-70.

[7] Underwood C K, Coulson E J. The p75 neurotrophin receptor[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40 (9):1664-1668.

[8] Hota S K, Barhwal K, Singh S B, et al. Chronic hypobaric hypoxia induced apoptosis in CA1 region of hippocampus: a possible role of NMDAR mediated p75NTR upregulation [J].Exp Neurol, 2008, 212(1):5-13.

[9] Sripada S, Gaytan O, Swann A, et al. The role of MK-801 in sensitization to stimulants [J].Brain Res Brain Res Rev, 2001, 35 (2): 97-114.

(责任编辑:冉明会)