DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.022
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)23-2139-04

论著

缺氧所致神经元AMPA受体的结构组成及功能变化

刘宝松,陈恒胜,许 忠,陈力学,曾 琳,龙在云 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第三研究室,创伤、烧伤与复合国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨缺氧损伤后神经元膜表面谷氨酸AMPA受体亚单位(GluRs)含量、受体结构组成、功能的变化及其在Ca^{2+}超载和延迟性细胞死亡中的作用。方法 建立神经元缺氧损伤模型,采用PI染色、双重免疫荧光标记和细胞比色分析技术定量观察神经元死亡和膜表面GluRs含量变化,采用Fura-2法测定胞内Ca^{2+}含量,以膜片钳技术检测微兴奋性突触后电流(mEPSCs)的变化。结果 伤后胞内Ca^{2+}含量和神经元死亡数量明显高于对照组;膜表面GluR2含量及含GluR2的突触数目显著减少($P<0.05$),而GluR3含量较对照组则显著升高($P<0.05$);缺乏GluR2的AMPA受体通道对Ca^{2+}有很高的通透性。结论 缺氧可致神经元膜表面AMPA受体的结构组成发生变化,缺乏GluR2的受体通道数目增加,介导了Ca^{2+}的快速内流,引起神经元的延迟性死亡。

关键词:GluR2;AMPA受体;mEPSCs;Ca^{2+}
中图法分类号:R338.1;R364.4;R741.02 文献标识码:A

Changes of constitution and function of AMPA receptors on neuron membrane induced by anoxia

LIU Bao-song, CHEN Heng-sheng, XU Zhong, CHEN Li-xue, ZENG Lin, LONG Zai-yun (Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the changes of the subunits content, constitution and function of glutamate receptor subunits on neuron membrane induced by anoxia, and furthermore to elucidate the contribution of these changes to the delayed neuron death. Methods The neuron death was quantitated with PI staining. The number of GluRs on the neuron membrane was quantitatively measured by colorimetric assay and double immunofluorescence labeling on neuron anoxic model. The intracellular Ca^{2+} content was determined by Fura-2 method. The miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded with the patch clamp. Results The intracellular Ca^{2+} content and the number of delayed death neuron were marked higher than those in the control group after anoxic injury ($P<0.05$). The total surface GluR2 and the number of synapse with GluR2 decreased significantly ($P<0.05$), but surface GluR3 increased significantly as compared with that in the control group. GluR2-lacking AMPA receptors appeared high permeability to Ca^{2+}. Conclusion Anoxia can induce changes in the constitution of AMPA receptors on neuron membrane. The increase of the number of surface GluR2-lacking AMPA receptors can activate Ca^{2+} influx, resulting in delayed neuron death.

Key words: GluR2; AMPA receptor; miniature excitatory postsynaptic current; Ca^{2+}

脑创伤或缺血损伤后谷氨酸(Glu)大量释放及其受体的过度激活导致了Ca^{2+}的大量内流,进而引起神经元延迟性死亡和继发性损害的发生。近年来的研究表明,α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(amino-3-hydroxy-5methylisoxazole-4-propionic acid, AMPA)受体在Ca^{2+}的快速内流时相中较可N-甲基-D-门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate acid, NMDA)受体发挥更为重要的作用,而其第二亚单位(GluR2)的特异结构是决定其对Ca^{2+}通透的关键[1]。AMPA受体为配体门控性离子通道,本研究围绕其各亚单位的组成比例变化,探讨伤后

基金项目:重庆市科技计划项目(8107)
Supported by Sci & Tech Research Project of Chongqing (No. 8107)
作者简介:刘宝松(1965-),男,天津市武青市人,博士,研究员,主要从事中枢神经系统创伤与修复方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68757703,E-mail:bsliu@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-06-28;修回日期:2004-09-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

AMPA 受体结构、功能变化及相关机制，为特异性阻断病理过程、设计低毒药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 胚胎大鼠海马神经元培养

取孕龄 18 d的胚胎大鼠，分离海马神经元（活细胞计数应＞80%），按每孔 10^6 个细胞分别植入 35 mm 培养皿（附盖玻片）和12 孔培养板中培养。接种培养基的主要成分为：胎鼠神经元培养基（Gibco 公司，下同）、2% B-27、0.5 μmol/L L-谷胺酰胺、25 μmol/L 谷氨酸、0.5%FBS（Sigma 公司）。3 d后更换为无血清维持培养基，每 4 天更换 1 次。培养 12 d 后神经元发育成熟，神经元轴突和树突交织成网状。

1.2 缺氧损伤

模拟临床缺血损伤过程，即缺糖缺氧过程，首先更换培养基为预先去氧处理的无糖细胞外液（ECS-OGD），主要成分为（mmol/L 浓度）：NaCl 116，KCl 5.4，$MgSO_4$ 0.8，$CaCl_2$ 1.8，Sucrose 33，然后置入神经元专用缺氧箱内（美国 Plas-Labs 公司）缺氧 30 min（37 ℃，气体成分：85% N_2、10% H_2、5% CO_2）后，用正常含糖细胞外液（ECS）洗涤，重新添加维持培养基，置 CO_2 培养箱内培养[2]。

1.3 细胞死亡检测

伤后 24 h，将维持培养基更换为 ECS，加入 PI（Propidium Iodide，50 μg/ml），孵育 15 min，标记坏死细胞；常规加入神经元标记抗体 anti-NeuN 和 Alexa 488 绿荧光二抗（Molecular Probes），标记神经元。在 Perkin Elmer HTS7000 自动荧光读板机上检测 PI 和 NeuN 的荧光强度[λ-(ex)＝535 nm，λ-(em)＝630 nm]，其比值与细胞死亡数量呈正相关。每培养板检测结果为 12 孔的均值，重复 6 只动物。

1.4 膜表面 GluRs（GluR1、GluR2、GluR3）含量变化

定性观察：采用双重免疫荧光标记技术进行，简述为 GluRs N 末端一抗（绿色，Chemicon）非通透情况下标记膜表面 GluRs，再用 anti-synaptophysin 标记突触（红色，Sigma），于 Zeiss LSM510 META 激光共焦显微镜下观察，绿荧光区域为膜表面 GluRs 分布区域，红色为突触，含 GluRs 的突触则呈黄色，用 Silver Spring 公司的图像分析软件进行定量分析。

定量分析：采用 colorimetric assay 法进行。分 GluR1、GluR2 和 GluR3 组，每组又分损伤组和对照组。伤后 24 h，取培养板，PBS 洗涤，加 GluRs（其中 GluR3 来自 Santa Cruz 公司）N 末端一抗，4 ℃过夜；加入 HRP 二抗（Amersham 公司），OPD（chromagenic substrate）闭光显色，在读板机上进行 492 nm 比色分析。

1.5 胞内 Ca^{2+} 浓度检测

伤后 24 h 取出培养板，ECS 洗涤，加含 10%小牛血清的 ECS 1.5 ml，预温至 37 ℃，加 7.5 μl Fura-2/AM，37 ℃孵育 30 min，ECS 洗涤 3 次。以未加 Fura-2 的孔作空白对照，在λ-(ex)＝340 nm，λ-(em)＝530 nm 条件下测定荧光强度，所得荧光强度值（减去空白对照值）即反映了胞内 Ca^{2+} 浓度的相对值。每次实验取 2 板，分别作对照组和实验组，每板又有 3 孔为空白对照；计算实验组与对照组相应各孔的荧光强度比值，平均后得到实验组胞内 Ca^{2+} 浓度变化率。

1.6 记录 AMPA 受体介导的微兴奋性突触后电流（mEPSCs）

取盖玻片上培养的神经元，ECS 洗涤，加非记录通道阻断剂（mmol/L 浓度）：TTX 0.0005、APV 0.1、Bicuculline 0.02，调整至 pH 7.2、渗透压 320 mOsm/kg H_2O，于 Axopatch 200B 型膜片钳（Axon 公司）上记录 mEPSCs，滤波设定为 2 kHz，使用 Mini 分析软件进行波幅和频率分析。波幅与 AMPA 受体通道离子通透（主要为 Ca^{2+}）的量呈正相关。1-Naphthylacetyl spermine Trihydrochloride（Naspm）可特异性阻断不含 GluR2 的 AMPA 受体介导的电流，因此，加入该阻断剂后 mEPSCs 的波幅将减小，mEPSCs 中 GluR2 缺乏型 AMPA 受体介导的电流成分越大，波幅减小的幅度就越大；亦即 mEPSCs 波幅减小的幅度反映了 GluR2 缺乏型 AMPA 受体的作用大小。

1.7 统计学处理

本文中荧光强度、图像面积及相应比值均作为计量资料处理，采用 SPSS 12.0 统计软件对两样本均数进行独立性 t 检验。

2 结果

2.1 损伤后神经元死亡数目

PI 的荧光强度反映了细胞死亡情况，OGD 组伤后 24 h PI/NeuN 荧光强度比值显著增大，与伤后即刻及对照组相比相差非常显著（$P<0.01$），见表 1；对照组在 24 h 时相，PI 荧光强度也有增大趋势，但与正常相比无统计学差异。

表 1 伤后 PI/NeuN 比值（细胞死亡）变化（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Ratio of PI/NeuN (neuronal death) after injury (%, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time (h)		
	0	6	24
Control	9.61±1.07	11.37±2.22	13.49±2.80
Injury	10.00±0.98	14.74±2.79	24.65±4.53**

**：$P<0.01$，*vs* control at 0 and 6 h

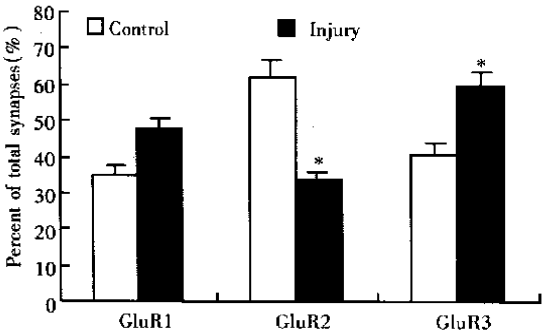
2.2 膜表面 GluRs 的变化

双重荧光染色结果显示，正常状态下突触部位 GluR2 含量丰富，约有 65%的突触含有 GluR2，而伤后 GluR2 阳性突触比例显著降低（$P<0.05$），见图 1，表明突触部位 GluR2 含量明显下降。与此相反，GluR1 和 GluR3 阳性突触数目在正常状态下约占突触总数的 34%～41%，而伤后 GluR1 和 GluR3 阳性突触比例增至 48%～53%，突触部位 GluR1、GluR3 的含量占膜表面总含量的百分比也有明显增加。

细胞比色结果以伤前或 0 时相点为 100%进行归一化处理，对照组在 24 h 膜表面 GluRs 含量略有降低（88%～92%），但无统计学差异。缺氧损伤组则不同，伤后 24 h 膜表面 GluR3 含量显著高于对照组（$P<0.05$，图 2），约为对照组的 1.35 倍；与伤前相比，增加了 1/4；伤后 GluR1 的变化有类似趋势，但幅度略小。伤后 24 h 膜表面 GluR2 含量较伤前明显降低，与对照组

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

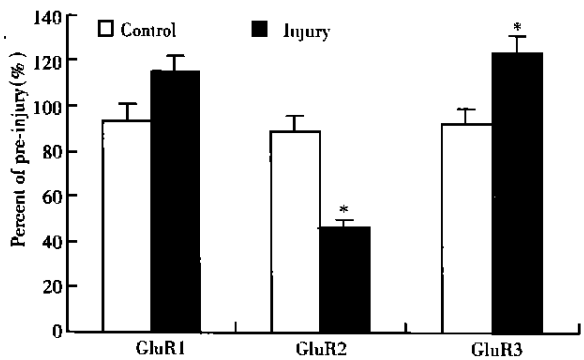
相比, 其百分含量仅占对照组的57.34%, 相差显著($P<0.05$), 提示缺氧损伤后膜表面GluR2含量明显降低。



*: $P<0.05$, *vs* control

图1　伤后24 h含GluRs突触占突触总数的百分比例变化

Fig 1　Percentage of GluRs positive synapses in total synapses at 24 h after injury



*: $P<0.05$, *vs* control

图2　伤后24 h膜表面GluRs含量变化(伤前作为100%)

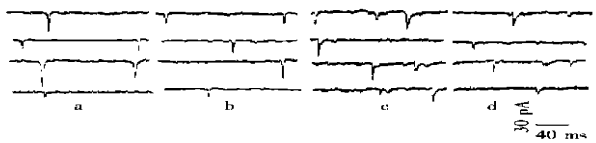
Fig 2　Changes of surface GluRs content at 24 h after injury (pre-injury value as 100%)

2.3　胞内Ca^{2+}浓度变化

本研究对测定步骤和计算方法进行简化, 所得结果仅反映胞内Ca^{2+}浓度变化趋势, 而非绝对含量。统计学分析表明, 伤后24 h实验组荧光强度显著高于对照组($P<0.05$), 约为对照组的1.36倍, 提示缺氧损伤后胞内Ca^{2+}明显增加。

2.4　mEPSCs的变化

对照组和实验组使用阻断剂Naspm前、后记录到的mEPSCs如图3所示。从图3可见, 对照组使用Naspm前后, mEPSCs的幅度无明显变化, 而缺氧损伤组使用Naspm后mEPSCs的幅度由(25.47±3.57) pA降至(17.45±3.12) pA, 相差非常显著($P<0.05$)。表明缺氧损伤后出现了一个新的突触后电流, 提示新形成的、缺乏GluR2的AMPA受体通道可能大量通透Ca^{2+}。mEPSCs频率分析结果显示, 对照组和损伤组使用Naspm前后, 频率无明显变化, 表明Naspm并不影响mEPSCs的频率变化。



a: Control group (－) Naspm; b: Control group (＋) Nospm; c: Injury group (－) Naspm; d: Injury group (＋) Naspm

a: Control group (－) Naspm; b: Control group (＋) Nospm; c: Injury group (－) Naspm; d: Injury group (＋) Naspm

图3　膜片钳全细胞记录的mEPSCs

Fig 3　mEPSCs recorded by whole-cell patch clamp

3　讨论

谷氨酸的兴奋性毒性作用是引起脑创伤、缺血损伤后继发性损害的重要因素之一, 而胞内Ca^{2+}超载是其发生的重要通路。目前针对受体或Ca^{2+}通道等的阻断剂类药物, 有一定的治疗效果, 但也常伴随着较大的副作用, 其原因可能与其阻断了正常生理性的通透过程有关。从细胞分子水平进一步阐明Ca^{2+}通透的病理机制, 对改进药物设计和指导治疗均有重要价值[3]。

AMPA受体是离子型谷氨酸受体的重要亚型, 其亚单位以同/异聚体方式围绕一个亲水性中心孔道组成五聚体结构, 构成离子通道。GluR2在mRNA转录后编辑过程中, 其功能区谷氨酸被精氨酸所取代, 形成特异性结构, 可有效阻断Ca^{2+}快速内流, 该结果使脑缺血损害治疗的研究有了新的进展[4]。正常状态下突触部位GluR2含量丰富, 本研究及其他研究结果显示[5], 缺氧损伤后神经元膜表面GluR2含量显著降低, 含GluR2的突触数目明显减少, 提示阻断Ca^{2+}快速内流的机制已经明显减弱。

膜表面GluR2减少是否伴随着通道数目的减少呢? 本研究表明, 伤后膜表面GluR1和GluR3含量明显增加, 表明AMPA受体通道GluR2的位置可能被GluR1或GluR3亚单位所取代, 形成以GluR1或GluR3为主的离子通道。膜片钳全细胞电流记录结果显示, 损伤组mEPSCs中存在一个新的电流成分, 而该电流成分能被GluR2缺乏的AMPA受体特异阻断剂所阻断, 进一步从功能上证实缺乏GluR2的AMPA受体通道对Ca^{2+}有很高的通透性[6]。

我们的结果表明, 缺氧损伤后AMPA受体结构组成变化, 引起Ca^{2+}快速内流、胞内Ca^{2+}浓度升高及一系列病理反应过程, 导致神经元延迟性死亡, 这一机制

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

可能是继发性损害发生过程中重要环节之一。

参考文献：

[1] Essin K, Nistri A, Magazanik L. Evaluation of GluR2 subunit involvement in AMPA receptor function of neonatal rat hypoglossal motoneurons[J]. Eur J Neurosci, 2002, 15(12): 1899－1906.
[2] 刘宝松, 龙在云, 曾 琳, 等. 突触后膜 GluR2 含量变化及脑继发性损害的实验研究[J]. 创伤外科杂志, 2003, 5(6): 446－448.
[3] Lutsep H, Clark W. An update of neuroprotectants in clinical development for acute stroke[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2001, 2(12): 1732－1736.
[4] Koike M, Tsukada S, Tsuzuki K. *et al*. Regulation of kinetic properties of GluR2 AMPA receptor channels by alternative splicing[J]. J Neurosci, 2000, 20(6): 2166－2174.
[5] Colbourne F, Grooms S Y, Zukin R S, *et al*. Hypothermia rescues hippocampal CA1 neurons and attenuates down-regulation of the AMPA receptor GluR2 subunit after forebrain ischemia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(5): 2906－2910.
[6] Oguro K, Oguro N, Kojima T, *et al*. Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons[J]. J Neurosci, 1999, 19(21): 9218－9227.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)23-2142-01

532 激光视网膜光凝治疗糖尿病视网膜病变的疗效评价

Analysis of 98 cases of diabetic retinopathy treated with 532 laser photocoagulation

华振宇, 赵 宏, 朱冬梅 （郑州市第五人民医院卓美眼科中心, 郑州 450003）

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖代谢异常造成的眼部严重并发症。糖尿病的病程越长 DR 病变发生率越高[1]。目前尚未发现特别有效的治疗方法, 眼底激光是目前惟一积极有效的方法。本研究通过对 98 例 DR 激光治疗效果的分析, 探讨视网膜光凝对 DR 的疗效。

1 资料和方法

1.1 研究对象

本组 98 例 DR 患者均为我院 1998－2003 年住院及门诊病人(Ⅱ型糖尿病), 双眼发病, 治疗前视力: 0.04～0.6。激光前均行荧光素眼底血管造影(FFA)检查, 其中男性 47 例, 女性 51 例, 平均年龄(53±15)岁。增生型糖尿病视网膜病变(PDR)59 眼, 非增生型糖尿病视网膜病变 137 眼。

1.2 治疗方法

使用法国光钛 532 眼底激光。本组病例中, 根据眼底情况选用全视网膜光凝(PRP) 63 眼, 局限性光凝 133 眼。

2 结果

激光治疗后视力增加 2 行以上为改善, 84 眼(42.9%); 视力减退 2 行以上为恶化, 20 眼(10.2%); 视力无提高为不变, 92 眼(46.9%)。

激光治疗后 FFA 变化: 视网膜的出血、渗出、水肿及无灌注区面积以 1 个视盘直径为一基本单位即"＋"表示。吸收及缩小面积在 4 个"＋"以上为显效, 56 眼(28.6%); 吸收及缩小面积在 2 个"＋"以上为有效, 82 眼(41.8%); 无变化者为无效, 46 眼(23.5%)面积扩大者为恶化, 12 眼(6.1%)。

3 讨论

眼底新生血管组织增殖是由于视网膜血管区局部缺氧和某些生化因子刺激所致[2]。光凝破坏了一些高度活跃的光感受细胞, 改善缺血的视网膜神经上皮层内层的氧化作用, 降低了毛细血管的通透性, 很大程度上防止或减轻黄斑水肿。此外, 在未受到激光光凝的视网膜处, 新生血管也可自行消失, 可能是光凝促进了视网膜色素上皮层产生新生血管抑制因子之故[3]。光凝可使视网膜脉络膜粘连, 以抵抗逐渐增加的玻璃体视网膜牵拉造成的严重损害。

本研究中, 用 532 眼底激光光凝治疗 DR, 治疗后随访 9 个月至 3 年的 98 例, 视力改善者为 42.9%、不变者为 46.9%、恶化者为 10.2%; FFA 结果显示, 激光后显效者 28.6%; 有效者为 41.8%; 不变者为 23.5%; 恶化者为 6.1%。总之, DR 的激光治疗对视功能的稳定, 视网膜水肿、出血、渗出的吸收和无灌注区的缩小有积极的治疗作用, 为 DR 首选的治疗方法。

关键词: 激光; 视网膜; 糖尿病
中图法分类号: R774.105 文献标识码: B

参考文献：

[1] 安美霞, 周利晓. 糖尿病性视网膜病变相关危险因素分析与探讨[J]. 中原医刊, 2004, 31(2): 23－23.
[2] 胡小军, 林 艳, 惠延年. 色素上皮源性因子和眼内新生血管性病变[J]. 国外医学眼科学分册, 2002, 26(6): 360－362.
[3] Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Early photocoagulation for diabetic retinopathy·ETDRS report number 9[J]. Ophthalmology, 1997, 98(5 Suppl): 766－785.

（编辑 龙 亮）

作者简介: 华振宇(1967－), 男, 河南省郑州市人, 主治医师, 主要从事屈光方面的研究, 发表论文 8 篇。电话: (0371)3933151

收稿日期: 2004-03-15; 修回日期: 2004-10-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net