DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.028
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

文章编号:1000-5404(2004)22-2051-03

论著

缺血损伤后突触后膜 GluR2 含量变化及机制

刘宝松,廖维宏,陈恒胜,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、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨缺血损伤后突触后膜谷氨酸受体2(glutamate receptor 2, GluR2)含量变化、机制及其在神经元延迟性死亡中的作用。方法 采用PI染色、比色分析和双重免疫荧光技术定量观察神经元死亡、膜表面及突触GluR2含量变化及途径。结果 缺血损伤神经元死亡数量明显增加;膜表面GluR2总量、含GluR2的突触数目以及突触部位GluR2含量都明显降低($P<0.05$),而胞内GluR2含量则显著增加,采用高渗糖预处理阻断内吞过程可显著抑制膜表面GluR2的降低过程。结论 缺氧损伤后膜GluR2内吞过程增强,导致了膜表面GluR2含量降低,缺乏GluR2的AMPA受体增加,进而介导了Ca^{2+}的快速内流,引起神经元延迟性死亡。

关键词:GluR2;AMPA受体;缺氧
中图法分类号:R329.26;R338.13;R364.12 文献标识码:A

Changes of GluR2 on post-synaptic membrane and its mechanisms after ischemic insult

LIU Bao-song, LIAO Wei-hong, CHEN Heng-sheng, 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 glutamate receptor (GluR2) on the post-synaptic membrane, the potential mechanisms, and the effects on the delayed neuron death after oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** The neuron death, GluR2 contents on the membrane, and the post-synaptic membrane and the paths were quantitatively observed by PI staining, colorimetric assay, and double immuno-fluorescence labeling. **Results** The number of delayed death neuron increased significantly after OGD. The total surface GluR2, the number of synapses with GluR2, and the quantity of GluR2 in synapse were marked lower than those in the control group ($P<0.05$). On the contrary, the intracellular GluR2 content increased significantly. The pretreatment of hypertonic sucrose, which would block the endocytosis, inhibited the decrease of GluR2 effectively. **Conclusion** OGD would accelerate the endocytosis of GluR2 and induce decreased GluR2 content on the postsynaptic membrane, so the number of GluR2-lacking amino-3-hydroxy-5 methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors may increase, which may mediate the influx of Ca^{2+} and result in delayed neuron death.

Key words: GluR2; AMPA receptor; ischemia

谷氨酸(glutamate, Glu)过度释放和谷氨酸受体(glutamate receptor, GluR)过度激活与缺血损伤后神经细胞延迟性死亡密切相关,并以Ca^{2+}的内流(分两个时相)为特征。除N-甲基-D-门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate acid, NMDA)外,α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(amino-3-hydroxy-5methylisoxazole-4-propionic acid, AMPA)在导致Ca^{2+}快速内流中的作用日益受到重视,其第二亚单位(GluR2)阻断Ca^{2+}通透的特异性结构的发现,使AMPA受体的结构变化成为神经元死亡和继发性脑损害研究的新热点[1]。本研究旨在探讨缺血损伤(oxygen glucose deprivation, OGD)后突触后膜GluR2的变化规律及发生机制,为特异性阻断病理过程、预防脑继发性损害以及减小药物毒副作用研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 海马神经元分离与培养

怀孕18 d胚胎大鼠7只,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。分离海马神经元(活细胞计数应>80%),分别植入35 mm培养皿和12孔培养板中培养。接种培养基的成分为:胎鼠神经元培养基(Gibco公司)、2%B-27(Gibco公

基金项目:重庆市科技计划资助项目(8107);第三军医大学回国启动基金资助项目(XG200355)
Supported by the Sci &Tech Research Project of Chongqing (8107) and the Research Projects Sponsored by Third Military Medical University (XG200355)
作者简介:刘宝松(1965-),男,天津市人,博士,研究员,主要从事中枢神经系统损伤与修复方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68757703
收稿日期:2003-12-22;修回日期:2004-03-26

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

司)、0.5% FBS(Sigma 公司)、0.5 μm L-谷胺酰胺(Gibco 公司)、25 μm 谷氨酸(Gibco 公司)。3 d 后更换为无血清维持培养基。培养 12 d 后神经元发育成熟,神经元轴突和树突间相互交织成网。

1.2 OGD 损伤

在生物安全柜内吸去培养基,添加预先去氧的无糖细胞外液(ECS-OGD),主要成分为(mmol/L 浓度):NaCl 116, KCl 5.4, $MgSO_4$ 0.8, NaH_2PO_4 1.0, $CaCl_2$ 1.8, $NaHCO_3$ 26, Sucrose 33,迅速置入神经元专用缺氧箱内(美国 Plas-Labs 公司)缺氧 20 min,缺氧箱内温度 37 ℃,气体成分含量分别为:85% N_2, 10% H_2, 5% CO_2。缺氧结束后,吸去 ECS-OGD,以正常含糖细胞外液(ECS)洗涤 1 次,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

OGD 后 24 h,更换培养基为 ECS,加 PI(Propidium Iodide, 50 μg/ml)标记坏死神经元;并常规加入神经元抗体 anti-NeuN (Chemicon 公司)和 Alexa 488 绿色荧光二抗(Molecular Probes 公司)。在 Perkin Elmer HTS7000 自动荧光读板机上检测 PI 和 NeuN 的荧光强度,激发波长 535 nm,发射波长 630 nm;实验分 OGD 损伤组和对照组,重复 6 次,每次 1 只大鼠。

1.4 GluR2 含量测定

采用细胞比色分析(colorimetric assay)法进行:①膜表面 GluR2 含量测定:常规固定,加鼠抗 GluR2(Chemicon 公司)N-末端一抗,4 ℃过夜;加 HRP 二抗(Amersham 公司),室温反应 1 h;加 OPD(chromagenic substrate)显色剂,闭光,待显淡棕色后用 3N HCl 阻断反应,492 nm 比色分析。②细胞 GluR2 总量(含膜和胞内)测定:常规固定后加 0.25% Triton X-100 进行细胞通透处理,同时使用 N-末端和 C-末端结合的一抗。

1.5 膜表面 GluR2 分布与计量

采用免疫荧光双标方法进行:①取 35 mm 培养皿(附盖玻片),常规加入 GluR2 N 末端一抗(Chemicon 公司)和 Alexa 488 荧光二抗,标记膜表面 GluR2 受体;洗涤,加入 0.25% Triton X-100,室温 10 min,进行第二次通透性染色,加突触小泡一抗(anti-synaptophysin, Sigma 公司)和 Alexa 594 荧光二抗,标记突触。于 Zeiss LSM510 META× 400 激光共焦显微镜下观察,每张玻片随机记录 10 个视野。绿荧光区域为膜表面 GluR2 分布区域,红色为突触区域,含 GluR2 的突触区域红、绿色荧光重叠而呈黄色。②定量分析:所得图像用 Silver Spring 公司的图像分析软件计量荧光强度面积值,分别以突触数目、膜表面 GluR2 总量为基准,计算伤后含 GluR2 的突触数目、突触部位(突触内、外)以及胞内 GluR2 含量变化。

1.6 GluR2 变化的通路分析

在 OGD 前,分别用高渗糖(0.45 mol/L)和布雷菲德菌素 A (brefeldin A, BFA)预处理神经细胞 30 min,以破坏网格蛋白和高尔基氏体的转运功能,借以分析 GluR2 的变化与内吞过程或分泌过程的关系。

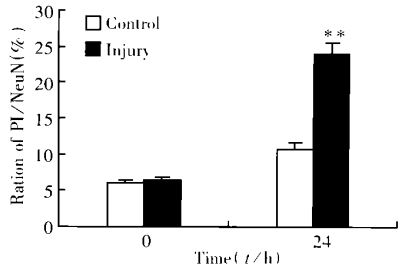
1.7 统计学处理

荧光强度、图像面积等均作为计量资料处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,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 缺氧损伤后神经元延迟性死亡数目增加

PI 的荧光强度反映了细胞死亡情况,OGD 组伤后 24 h PI/NeuN 荧光强度比值增大,与伤后即刻及对照组相比相差非常显著($P<0.01$);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($P>0.05$),见图 1。



**: $P<0.01$, *vs* control

图 1 OGD 后 PI/NeuN 比值(细胞死亡程度)变化

Fig 1 Changes of the ratio of PI/NeuN (neuronal death) after OGD injury

2.2 GluR2 总量变化

细胞比色结果以正常 GluR2 总量为 100% 进行归一化处理,胞内含量由每次实验中细胞 GluR2 总量减去膜表面含量而获得,其标准差为各次结果统计后获得。OGD 组神经元膜表面和胞内 GluR2 含量,即总的 GluR2 含量与对照组无显著差异。对照组膜表面 GluR2 含量约占总含量的 57.34%,而 OGD 组膜表面 GluR2 含量则显著降低,占总含量的 36.41%,为对照组膜表面 GluR2 含量的 63.50%,与对照组相差显著($P<0.05$);与此相反,OGD 组胞内 GluR2 含量则显著高于对照组,提示 OGD 损伤后 GluR2 由膜表面向胞内的移动过程(表 1)。

表 1 细胞 GluR2 总含量变化[$(\bar{x} \pm s)$%]

Tab 1 Changes of total GluR2 content in cells [$(\bar{x} \pm s)$%]

Group	Total GluR2	GluR2 on membrane	Intracellular GluR2
Control	100.00±0.00	57.34±10.19	45.62±9.07
OGD	92.02±14.22	36.41±8.74 *	61.83±11.36

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

2.3 膜表面 GluR2 分布与计量

采用双重免疫荧光分别标记突触和 GluR2,通过共定位原理则可确定 GluR2 分布与突触的关系。正常状态下树突和轴突表面 GluR2 含量丰富,约有 65% 的突触含有 GluR2,约 82% 的膜表面 GluR2 分布在突触部位。缺氧后 GluR2 的变化表现为:①以突触数目为基准,OGD 组含有 GluR2 的突触数目占突触总数的 47.3%,较正常对照组降低 1/4 以上,有统计学差异($P<0.05$),表明突触部位膜表面 GluR2 含量明显下降;②以神经元表面 GluR2 总含量为基准,OGD 组突触部位 GluR2 含量为膜表面 GluR2 总含量的 54.6%,显著低于对照组($P<0.05$),表明膜表面 GluR2 的降低以突触部位为主。

2.4 GluR2 变化的通路分析

对照组经高渗糖(0.45 mol/L)预处理 30 min 后,膜表面 GluR2 含量略有增高,而 OGD 组经相同预处理后膜表面 GluR2 含量降低幅度显著减小,提示高渗糖预处理阻断了 GluR2 的内吞,从而有效阻止了膜表面 GluR2 的降低过程(表 2)。BFA 可

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

以阻断内质网高尔基氏体的转运过程, 但经 BFA 预处理(5μg/ml, 10 min)后膜表面 GluR2 的变化与对照组相似, 即 BFA 预处理不能阻断膜表面 GluR2 的降低过程, 或者说膜表面 GluR2 含量降低与胞内向膜表面的分泌过程无明显关系。

表 2　高渗糖和 **BFA** 预处理对膜表面 **GluR2** 降低幅度的影响 [$(\bar{x}\pm s)$%]

Tab 2　Effects of hypertonic sugar and BFA pretreatment on the decrease of membrane GluR2 [$(\bar{x}\pm s)$%]

Pre-treatment	Control		OGD	
	Without pre-treatment	Pre-treatment	Without pre-treatment	Pre-treatment
Hypertonic sugar	100.00±0.00	106.68±18.19	72.62±13.07 *	92.06±14.43
BFA	100.00±0.00	95.82±17.24	69.78±16.19 *	70.65±10.57 *

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

3　讨论

大量实验证实脑缺血后 Glu 过度释放是神经元延迟性损伤的重要基础, 在局灶性脑缺血梗死中心区 Glu 的浓度可高于基线 100 倍。Glu 引起细胞损伤的机制涉及 AMPA 受体、NMDA 受体和海人草酸盐(Kainate, KA)受体的激活、抑制性去极化及能力代谢等多个方面, 而 Na^+、Ca^{2+} 的大量通透及细胞损伤又包含多种途径, 深入了解离子通透的分子机制, 特异性阻断病理过程, 保护有益的反应过程, 对预防继发性脑损害、减小药物的毒副作用均有重要意义。

AMPA 型 Glu 受体为配体门控性离子通道, 主要介导快速兴奋性突触传递, 对神经元的整合功能以及突触的可塑性均有重要影响[3], 其激活可调控 NMDA 受体激活过程[4]。AMPA 受体是由 GluR1～4 等 4 种亚单位以同/异聚体方式围绕一个亲水性中心孔道组成的五聚体结构。GluR2 通过 mRNA 转录后编辑过程, 使其功能区谷氨酸被精氨酸残基所取代, 可以阻断 Ca^{2+} 内流, 因而含有 GluR2 的 AMPA 受体对 Ca^{2+} 不通透[5,6]。本研究结果显示, 神经元突触部位 GluR2 含量非常丰富, 约有 65%的突触含有 GluR2。

OGD 后膜表面 GluR2 总量、含 GluR2 的突触数目以及突触部位 GluR2 含量均显著降低, 与此相对应, OGD 组细胞死亡数量显著高于对照组, 提示膜表面 GluR2 含量下降与细胞死亡有关。进一步观察发现, 伴随膜表面 GluR2 的降低, 胞内 GluR2 明显增加, 且胞膜和胞内 GluR2 的总量则无明显变化, 表明 GluR2 含量降低的机制与细胞内吞过程有关。

膜表面受体一般处于胞内合成、分泌、组装和吞噬、降解的循环过程, 其中任一环节障碍均可引起膜受体含量变化, 进而导致一系列功能变化。本研究分别阻断合成分泌和内吞过程, 观察到膜表面 GluR2 降低主要通过内吞过程增强所引起。也就是说, OGD 后膜 GluR2 内吞过程增强, 导致了膜表面 GluR2 含量降低, 缺乏 GluR2 的 AMPA 受体增加, 进而介导了 Ca^{2+} 的快速内流, 引起神经元延迟性死亡。

参考文献:

[1] Essin K, Nistri A, Magazanik L. Evaluation of GluR2 subunit involvement in AMPA receptor function neonatal rat hypoglossal motoneurons[J]. Eur J Neurosci, 2002, 15(2): 1899－1906.

[2] Ying H S, Weishaupt J H, Grabb M, *et al*. Sublethal oxygen-glucose deprivation alters hippocampal neuronal AMPA receptor expression and vulnerability to kainate-induced death[J]. J Neurosci, 1997, 17(24): 9536－9544.

[3] Koike K, 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.

[4] Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system[J]. Prog Neurobiol, 1998, 54(5): 581－618.

[5] Partin K M. Domain interactions regulating AMPA receptor desensitization [J]. J Neurosci, 2001, 21(6): 1939－1948.

[6] Steiner P, Sarria J C, Glauser L, *et al*. Modulation of receptor cycling by neuron enriched endosomal protein of 21 kD[J]. J Cell Biol, 2002, 157(7): 1197－1209.

(编辑　张　宁)

欢迎订阅《中华现代皮肤科学杂志》

《中华现代皮肤科学杂志》为中华临床医药学会主办的医学专业学术刊物, 月刊, 具有 ISSN/CN 标准刊号。现已被中华首席医学网(www.shouxi.net)全文收录。国内外读者可以在网上免费阅读杂志全文。本刊贯彻党和国家的卫生工作方针、政策, 旨在反映我国临床科研工作的重大进展, 促进国内外学术交流。刊登该学科领域的科研成果和临床诊治经验、学术研究、技术改进以及对临床有指导作用的专家评论等。

本刊主要栏目有: 论著、综述、基础研究、临床与病理、美容外科、临床医学、中西医结合、中医中药、药物与临床、检验与临床、经验交流、病例报告、误诊分析、技术改进、预防医学、临床护理、医学教育、调查报告、会议纪要等。本刊发表周期短, 免收审稿费。论文发表后颁发论文证书。对省、部级以上部门科研基金资助项目的论文优先刊登。欢迎投稿!

地　址: 北京市 100035－55 邮政信箱《中华现代皮肤科学杂志》编辑部　　邮　编: 100035

电　话: (010)62245829, 62242528　　E-mail: pifuke@sohu.com

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