

网络出版时间: 2018-8-2 09:39 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180731.1310.014.html>

高氧对新生大鼠脑内谷氨酸及其转运体的影响

王丹丹, 刘光辉, 赵钰玮, 张 健

摘要 目的 研究新生大鼠在高氧中脑组织内谷氨酸(Glu)浓度的变化及机制,探讨谷氨酸及其转运体在高氧脑损伤中的作用。方法 高氧组将新生6 d大鼠置于体积分数为80%高氧下持续暴露24 h,建立新生大鼠未成熟脑高氧损伤模型,对照组将新生大鼠置于正常空气中7 d。两组新生大鼠均于第7天分别断头取脑组织,应用ELISA法检测脑组织内Glu及 γ -氨基丁酸(GABA)蛋白含量;应用Western blot法检测高亲和性谷氨酸转运体EAAT1、EAAT2、EAAT3,脑型葡萄糖转运体GLUT1、GLUT3及囊泡谷氨酸转运体VGLUT1、VGLUT2的蛋白表达情况。结果 与对照组比较,高氧组谷氨酸转运体EAAT2、EAAT3、GLUT1和VGLUT2的蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而EAAT1、GLUT3和VGLUT1的蛋白表达与对照组比较差异无统计学意义;高氧组脑组织内Glu/GABA的比值较对照组明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 高氧可导致新生大鼠脑组织内Glu/GABA的比值增高,其机制与EAAT2、EAAT3、GLUT1和VGLUT2的蛋白表达下降有关。Glu增加可能是高氧造成脑损伤的原因之一。

关键词 高氧; 谷氨酸; 谷氨酸转运体; 脑损伤

中图分类号 R 726.511.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)09-1388-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.014

新生儿缺氧性疾病是围生期最常见的疾病之一,氧疗能够纠正低氧血症和高碳酸血症,维持良好的呼吸功能,是治疗新生儿缺氧性疾病的重要措施。但目前证实高浓度氧气可能会引起视网膜病变^[1]和慢性肺部疾病^[2],越来越多的实验数据表明,高氧可能引起或加重新生儿脑损伤,增加神经系统后遗症的发生率^[3]。谷氨酸(glutamate, Glu)是中枢神经系统主要的兴奋性神经递质,过多的Glu通过激活谷氨酸受体引起兴奋性毒性作用,导致中枢神经

系统内神经元的损伤^[4]。该研究拟对新生6 d大鼠给予暴露80%高浓度氧,建立新生大鼠高氧模型,以研究高氧状态下脑组织内Glu及其转运体的变化,探讨使用高浓度氧气后神经系统中Glu的代谢机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

1.1.1 实验材料 清洁级健康新生6 d大鼠19只,雄雌不限,购自安徽医科大学实验动物中心。高氧箱(美国BioSpherix公司,型号Ltd. P. O. Box279); Glu及 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)检测试剂盒(南京翼飞雪生物科技公司); GLAST、GLT-1、EAAC1、GLUT1、GLUT3、VGLUT1和VGLUT2一抗(英国Abcam公司);山羊抗小鼠二抗、山羊抗兔二抗(北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.1.2 新生大鼠高氧模型制备及分组 将新生6 d清洁级健康新生大鼠19只随机分为高氧组和对照组,高氧组10只,对照组9只。高氧组与哺乳母鼠共置于高氧箱中24 h,持续通入100%医用氧气,并用数字测氧仪持续检测箱内氧气浓度,维持箱内氧气浓度始终 $\geq 80\%$,对照组与哺乳母鼠置于同室空气中饲养。造模结束后,分别取高氧组5只和对照组4只新生大鼠行ELISA实验检测两组大鼠脑组织Glu/GABA比值变化;两组剩余各5只新生大鼠行Western blot法检测两组大鼠脑组织中谷氨酸转运体EAAT1、EAAT2、EAAT3、GLUT1、GLUT3、VGLUT1和VGLUT2的蛋白表达变化情况。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理 将新生7 d大鼠用10%水合氯醛2.0 ml/只麻醉后,随机取高氧组5只、对照组4只剪开大鼠右心耳,然后在大鼠左心室缓慢灌注磷酸盐缓冲溶液(PBS)用于排出全身血液,然后迅速断头取脑,转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存,用于Glu及GABA蛋白含量的检测;另随机取5只迅速断头取脑,转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存,用于谷氨酸转运体EAAT1、EAAT2、EAAT3、GLUT1、

2018-03-01 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号:1508085SQH219)

作者单位: 安徽医科大学附属省儿童医院,安徽省儿童医院新生儿科,合肥 230051

作者简介: 王丹丹,女,硕士研究生;

刘光辉,男,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: lgh508@sina.com

GLUT3、VGLUT1 和 VGLUT2 的检测。

1.2.2 Glu 及 GABA 蛋白含量 取出冻存脑组织,称取 100 mg 移入玻璃匀浆器,加入预冷的 PBS,冰上充分研磨,将制备好的匀浆液以 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,采用 ELISA 法测定 Glu 及 GABA 的蛋白含量,严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 谷氨酸转运体的表达 使用含有蛋白酶抑制剂和磷酸化抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白。吸取适量蛋白上样至 12% 聚丙烯酰胺凝胶,转膜至硝酸纤维素膜。一抗孵育过夜,适当浓度的二抗孵育 1 h。添加 ECL 化学发光显影液后曝光,扫描仪采集图像,Quantity One 软件分析条带灰度值,计算目标蛋白与内参蛋白的比值。一抗为 EAAT1、EAAT2、EAAT3、GLUT1、GLUT3、VGLUT1 和 VGLUT2, β -actin 为蛋白内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,偏态分布资料用中位数和四分位数 $[M(P_{25},$

$P_{75})]$ 表示,两样本的组间比较采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠脑组织 Glu/GABA 比值变化 高氧组脑组织内 Glu/GABA 的比值 2.69(2.43,3.08) 较对照组 1.06(0.57,2.03) 明显增高,差异有统计学意义($Z = -2.205, P = 0.032$)。

2.2 两组大鼠脑组织的谷氨酸转运体蛋白含量变化 Western blot 法检测两组脑组织中谷氨酸转运体 EAAT1、EAAT2、EAAT3、GLUT1、GLUT3、VGLUT1 和 VGLUT2 的蛋白表达变化情况。与对照组比较,谷氨酸转运体 EAAT2、EAAT3、GLUT1 和 VGLUT2 的蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($t = 5.206、2.785、2.892、2.611, P = 0.0008、0.0237、0.0201、0.0311$),而 EAAT1、GLUT3 和 VGLUT1 的蛋白表达与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

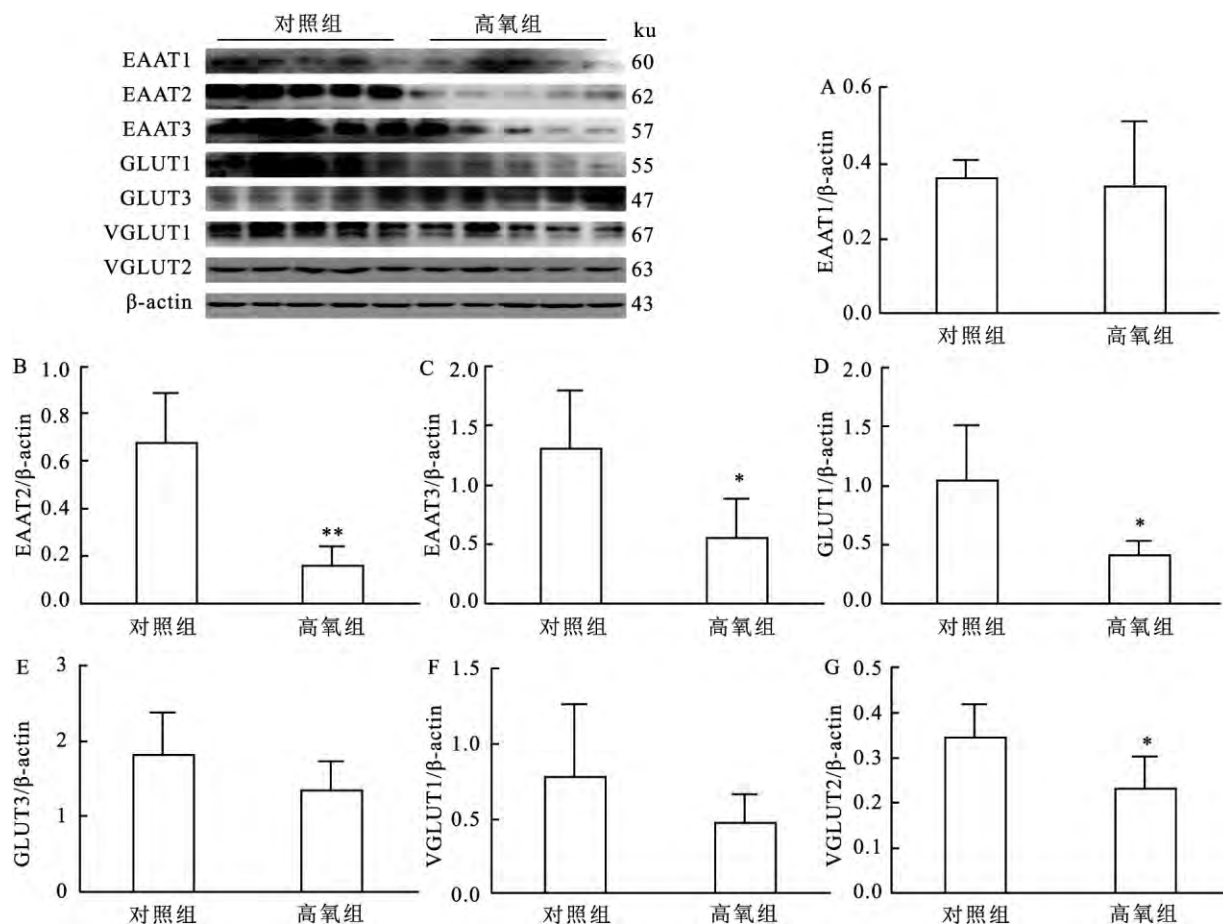


图1 Western blot 法测定脑组织中谷氨酸转运体 EAAT1、EAAT2、EAAT3、GLUT1、GLUT3、VGLUT1 和 VGLUT2 的蛋白表达

A: EAAT1/ β -actin; B: EAAT2/ β -actin; C: EAAT3/ β -actin; D: GLUT1/ β -actin; E: GLUT3/ β -actin; F: VGLUT1/ β -actin; G: VGLUT2/ β -actin; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

Glu 是中枢神经系统内重要的神经递质,参与机体正常情况下一系列的生理活动。在生理情况下,Glu 的合成、分解、摄取和重吸收处于动态平衡中^[6]。而在缺血、缺氧等病理情况下,Glu 的摄取及转运会发生障碍,引起 Glu 的堆积,而突触间隙中的 Glu 的大量堆积会导致神经元的毒性作用,最终可能导致中枢神经系统神经元的凋亡或坏死^[7],造成一定程度的脑损伤。Glu 维持在神经元细胞外的低浓度主要依赖于谷氨酸转运体,Glu 通过谷氨酸转运体进入到神经胶质细胞内转化为谷氨酰胺,从而保护神经元,避免兴奋性毒性对神经元的损伤作用^[8]。另外有研究^[9]表明,高氧会导致神经元细胞外 Glu 浓度增高,可能是高氧导致脑损伤的机制之一。

在未成熟脑内,兴奋性氨基酸的过度释放,会造成脑损伤。Glu 和 GABA 是脑内主要的兴奋性和抑制性神经递质,在生理情况下,两者保持动态平衡,Glu/GABA 体现了两者之间的动态平衡关系。Glu 作为主要的兴奋性氨基酸,在突触间隙内大量积聚,会导致 NMDA 受体过度激活,受体门控型离子通道开放, Ca^{2+} 、 Na^{+} 大量内流, K^{+} 外流,钠水潴留,导致神经元的急性肿胀、坏死。离子通道的大量开放使细胞内 Ca^{2+} 的浓度持续增高,造成细胞内钙超载; Ca^{2+} 可激活细胞内一系列酶,包括蛋白激酶 C、一氧化氮合酶、磷脂酶等,这一系列酶的激活导致了神经元内自由基增多、神经元膜磷脂降解、神经元骨架破坏,使神经元凋亡或者坏死。本研究显示,新生 6 d 的大鼠在高氧暴露 24 h 后,Glu/GABA 的比值明显升高,说明中枢神经系统中兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸之间的动态平衡关系被打破,兴奋性氨基酸在突触间隙内大量积聚,NMDA 受体过度激活,兴奋性毒性作用造成神经元的凋亡、坏死。且有研究^[9]显示,Glu/GABA 的比值越高,兴奋性毒性对神经元的损伤越重。本研究显示高氧后 Glu/GABA 的比值明显升高,可能对中枢神经系统内神经元造成了损伤作用。

谷氨酸转运体的表达降低,导致了 Glu 在突触间隙中的堆积。EAAT1、EAAT2、EAAT3 是高亲和力谷氨酸转运体,主要表达于神经元及神经胶质细胞膜上,是调节中枢神经系统内 Glu 浓度的主要转运蛋白,成人脑组织中约有 90% 的 Glu 转运都依赖于 EAAT2 来完成^[10]。GLUT1、GLUT3 是脑型葡萄

糖转运体,主要是将葡萄糖跨血脑屏障转运至神经元内^[11],且葡萄糖通过 GLUT1 和 GLUT3 跨过细胞膜是易化扩散的过程。VGLUT1、VGLUT2 是低亲和力谷氨酸转运体,主要分布于囊泡膜上,能够特异地将神经元胞质内的谷氨酸转运进入突触囊泡内^[12]。每个囊泡中转运体蛋白的数量和囊泡外谷氨酸浓度决定了 Glu 进入囊泡的流速,影响着囊泡内神经递质的最高水平^[13]。本实验检测了两组新生大鼠脑组织中谷氨酸转运体 EAAT1、EAAT2、EAAT3、GLUT1、GLUT3、VGLUT1 和 VGLUT2 的蛋白表达水平的变化。结果显示,与对照组比较,高氧组 EAAT2、EAAT3、GLUT1 和 VGLUT2 水平均明显降低,差异有统计学意义;而高氧组 EAAT1、GLUT3 和 VGLUT1 与对照组比较,差异无统计学意义。这个结果说明新生大鼠中枢神经系统内谷氨酸转运体在高氧中转运谷氨酸的能力降低,且随着氧气浓度的增加,谷氨酸转运体转运 Glu 的能力越低,脑损伤越严重^[14]。同样有研究^[8,15]表明,高氧后或者是在 Glu 堆积的情况下,谷氨酸转运体 EAAT1、EAAT2、EAAT3、GLUT1、GLUT3、VGLUT1 和 VGLUT2 的蛋白表达水平会降低。

本实验显示,高氧组新生大鼠脑组织中谷氨酸转运体 EAAT2、EAAT3、GLUT1 和 VGLUT2 的蛋白表达水平均降低,GLUT1 表达的降低,减少了葡萄糖从血液跨过血脑屏障进入脑组织的数量,使脑组织处于缺乏能量的状态;当新生大鼠在高氧中,EAAT2 和 EAAT3 的表达降低,且 EAAT2 和 EAAT3 转运谷氨酸是一个耗能的过程,使谷氨酸转运体 EAAT2 和 EAAT3 转运谷氨酸的能力愈发降低;在生理情况下,中枢神经系统内的 Glu 主要储存于突触前膜神经元的囊泡内,VGLUT2 的表达降低,不能有效地将 Glu 储存于突触囊泡内,加重了突触间隙内 Glu 的堆积,这与本研究显示的高氧组 Glu/GABA 的比值升高相一致。

综上所述,高氧可导致新生大鼠脑组织内的 Glu 增高,其机制与转运体 EAAT2、EAAT3、GLUT1、VGLUT2 的蛋白表达下降有关,Glu 增加可能是高氧造成脑损伤的原因之一。

参考文献

- [1] 彭振宇,高玲,彭湘萍. 高氧对新生小鼠视网膜谷氨酸释放的影响 [J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2014, 35(2): 90-3.
- [2] Wang Y, Yue S J, Luo Z, et al. N-methyl-D-aspartate receptor activation mediates lung fibroblast proliferation and differentiation in hyperoxia-induced chronic lung disease in newborn rats

- [1] . *Respir Res*, 2016, 17(1): 136.
- [2] Solberg R, Longini M, Proietti F, et al. Resuscitation with supplementary oxygen induces oxidative injury in the cerebral cortex. [J]. *Free Radical Biol Med*, 2012, 53(5): 1061–7.
- [3] Timofeev I, Carpenter K L, Nortje J, et al. Cerebral extracellular chemistry and outcome following traumatic brain injury: a microdialysis study of 223 patients [J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 2): 484–94.
- [4] 王平, 吕士申, 安丽, 等. 谷氨酸及其受体在低氧缺血性脑损伤中的作用 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2012, 20(1): 52–4.
- [5] Kostandy B B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire [J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(2): 223–37.
- [6] 杨晓运, 李智, 秦绿叶, 等. 星形胶质细胞和神经元之间谷氨酸-谷氨酰胺的代谢偶联 [J]. *生理科学进展*, 2003, 34(4): 350–2.
- [7] Schmitz T, Ritter J, Mueller S, et al. Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(11): 4327–44.
- [8] 魏凤环, 罗佳波. 麻黄汤不同配伍对大鼠脑内 Glu/GABA 比值的的影响 [J]. *山东中医药大学学报*, 2008, 32(3): 228–9.
- [9] Verma R, Mishra V, Sasmal D, et al. Pharmacological evaluation of glutamate transporter 1 (GLT-1) mediated neuroprotection following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 638(1–3): 65–71.
- [10] 王玉珠, 刘皋林, 李晓宇. 血脑屏障上葡萄糖转运体1研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 19(9): 1057–63.
- [11] Bellocchio E E, Reimer R J, Fremeau R T Jr, et al. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter [J]. *Science*, 2000, 289(5481): 957–60.
- [12] Wilson N R, Kang J, Hueske E V, et al. Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1 [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(26): 6221–34.
- [13] Quintard H, Patet C, Suys T, et al. Normobaric hyperoxia is associated with increased cerebral excitotoxicity after severe traumatic brain injury [J]. *Neurocrit Care*, 2015, 22(2): 243–50.
- [14] Lobo A C, Gomes J R, Catarino T, et al. Cleavage of the vesicular glutamate transporters under excitotoxic conditions [J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 44(3): 292–303.

Effect of hyperoxia on glutamate in brain of neonatal rats and its transporters

Wang Dandan, Liu Guanghui, Zhao Yuwei, et al

(The Affiliated Provincial Children's Hospital of Anhui Medical University,
Dept of Neonatology, Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei 230051)

Abstract Objective To study the changes of glutamate (Glu) concentration in the brain tissue of neonatal rats with hyperoxia, and to explore the role of glutamate and its transporters in hyperoxia induced brain injury. **Methods**

Neonatal 6 d rats were exposed to 7 d at a volume fraction of 80% and exposed to 24 h. Two groups of neonatal rats were decapitated respectively in the 7 d brain tissue, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) detection of Glu in the brain tissue and gamma aminobutyric acid (GABA protein content). Western blot was used to detect Glu transporters EAAT1, EAAT2, EAAT3, GLUT1, GLUT3, VGLUT1 and VGLUT2. **Results** Compared with control group, the expression of Glu transporters EAAT2, EAAT3, GLUT1 and VGLUT2 protein were decreased experimental group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). However, in comparison with control group the expression of EAAT1, GLUT3 and VGLUT1 was not statistically significant; the ratio of Glu/GABA in brain tissue in hyperoxia group increased obviously than the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Hyperoxia can increase the ratio of Glu/GABA in brain tissue of neonatal rats, and the mechanism is related to the decrease of protein expression of EAAT2, EAAT3, GLUT1 and VGLUT2. Increased Glu may be one of the causes of brain damage induced by hyperoxia.

Key words hyperoxia; glutamate; glutamate transporter; brain injury