

神经疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.2014.02.005

脑源性神经营养因子与不含 GLuR2 的 AMPA 受体在增强 AMPA 受体功能及活化突触囊泡中的关系

胡 巧,罗媛媛,陈恒胜,程 莉,蒋 莉

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,重庆 400014)

【摘要】目的:研究脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)与 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA)受体尤其不含 GluR2 的 AMPA 受体的相互关系,为进一步针对性调控 BDNF 及 AMPA 受体,保护海马神经元提供理论依据。**方法:**孕 17~18 d SD 大鼠 8 只,取胎鼠体外培养海马神经元细胞爬片,同批细胞爬片随机分为空白对照组(N 组)、BDNF 实验组(BDNF 组)、特异性阻断不含 GluR2 的 AMPA 受体的阻断剂 1-萘乙酰精胺三盐酸(1-naphthylacetyl spermine Trihydrochloride, NASPM)对照组(N+NASPM 组)、BDNF+NASPM 实验组(BDNF+NASPM 组)4 组,各组随机选择爬片 2 张,共 3 批细胞爬片应用于实验。各组应用 Synapto GreenTM C4(FM1-43)结合激光共聚焦标记突触囊泡,活体追踪同一视野给予相应处理前后 2 次染色突触囊泡变化;应用膜片钳记录 AMPA 受体 mEPSCs 频率及幅度变化。**结果:**BDNF 组与 N 组第 2 次染色比较,荧光强度 BDNF 组(750.23 ± 137.81)明显高于 N 组(554.41 ± 16.42)($\chi^2=7.22, P=0.030$);而 BDNF 组添加 NASPM 后,荧光强度(525.93 ± 72.64)较 BDNF 组有明显减少($\chi^2=13.18, P=0.000$),表明 BDNF 对不含 GluR2 的 AMPA 受体调控可能是 BDNF 使功能突触囊泡增多的机制之一。BDNF 组较 N 组 AMPA 受体微兴奋性突触后电流的频率从(1.730 ± 0.217)增长到(3.340 ± 0.280)($P=0.000$),幅度从(-16.30 ± 1.98)增加到(-25.00 ± 2.57)($P=0.000$)。BDNF 组使用 NASPM 后,频率(1.740 ± 0.207)($P=0.000$)及幅度(-15.50 ± 2.52)($P=0.000$)均减小,表明 BDNF 能通过对不含 GluR2 的 AMPA 受体调控来增加 AMPA 受体的功能。**结论:**BDNF 可能部分通过调节不含 GluR2 的 AMPA 受体,来参与 BDNF 增强 AMPA 受体功能及活化突触囊泡的作用。

【关键词】脑源性神经营养因子;GluR2;1-萘乙酰精胺三盐酸;FM1-43;微兴奋性突触后电流

【中图分类号】R748

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-08-16

Relationship of brain-derived neurotrophic factor and AMPA receptor without GLuR2 in enhancing the function of AMPA and activating synaptic vesicle

Hu Qiao, Luo Yuanyuan, Chen Hengsheng, Cheng Li, Jiang Li

(Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education, Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To study the relationship of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor (AMPA) receptor without GluR2, to further regulate BDNF and the receptor of AMPA and to provide theoretical basis for protecting hippocampal neuron. **Methods:** Eight pregnant SD rats of 17-18 d were selected and their fetal rats' hippocampal cells were separated and cultured. The cells were randomly divided into normal group (N group), BDNF group, N+NASPM group and BDNF+NASPM group. All groups were treated with Synapto GreenTM C4 (FM1-43) and patch clamp. Quantity of synaptic vesicles and the function of synapse were recorded. **Results:** Results showed that the second fluorescence intensity of BDNF group (750.23 ± 137.81) was obvious higher than that of N group (554.41 ± 16.42) ($\chi^2=7.22, P=0.030$); while fluorescence intensity of BDNF+NASPM group (525.93 ± 72.64) was lower than that of BDNF group ($\chi^2=13.18, P=0.000$), indicating that BDNF regulating AMPA receptor without GluR2 may be one of the mechanisms of BDNF increasing the function of synaptic vesicle. What's more, BDNF

作者介绍:胡 巧, Email: 4198664@qq.com,

研究方向:小儿神经病学。

通信作者:蒋 莉, Email: neurojiang@gmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071056)。

group had higher frequency (3.34 ± 0.280) and amplitude (-25.00 ± 2.57) of AMPA receptor micro excitatory postsynaptic currents compared with those of N group (1.730 ± 0.217) ($P=0.000$) and (-16.3 ± 1.98) ($P=0.000$). After BDNF group being

adding NASPM, frequency (1.740 ± 0.207) ($P=0.000$) and amplitude (-15.50 ± 2.52) ($P=0.000$) were reduced, indicating that BDNF can increase AMPA receptor mEPSCs by regulating the AMPA receptor without GluR2. **Conclusions:** BDNF may partially adjust the AMPA receptor without GluR2 subunit to enhance the function of AMPA and activate the synaptic vesicles.

【Key words】brain-derived neurotrophic factor; GluR2; 1-naphthylacetyl spermine Trihydrochloride; FM1-43; micro excitatory postsynaptic currents

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是重要的神经元保护因子和维持海马功能不可或缺的多肽物质,具有较强的刺激和促进神经细胞生长分化的作用^[1-2],同时也参与突触间神经递质的传递和突触重建^[3]。谷氨酸受体分为离子型和代谢型两大类。离子型谷氨酸受体(ionotropic glutamate receptor, iGluR)是非特异性阳离子通道,包括 N-甲基-D 门冬氨酸受体、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPA)受体和海仁酸受体。这些受体不仅参与快速兴奋性突触传递,还调节突触的传递效率、递质的释放,对突触的可塑性具有重要影响^[4-5]。近年来的研究尤其是 AMPA 受体“GluR2 假说”的提出,AMPA 受体生理结构改变即含 GluR2 的 AMPA 受体转换为不含 GluR2 的 AMPA 受体,可导致受体 Ca^{2+} 通透性增加,进而引起的神经损伤机制日益受到重视。本研究拟应用体外培养 10 d 的海马神经元,探讨 BDNF 与不含 GluR2 的 AMPA 受体的相互关系,为进一步针对性调控 BDNF 及 AMPA 受体,以保护海马神经元提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

取培养 10 d 的海马神经元分为 4 组进行研究:空白对照组(N 组)、BDNF 实验组(BDNF 组)、特异性阻断不含 GluR2 的 AMPA 受体的阻断剂 1-萘乙酰精胺三盐酸(1-naphthylacetyl spermine trihydrochloride, NASPM)对照组(N+NASPM 组)、BDNF+NASPM 实验组(BDNF+NASPM 组),各组随机选择爬片 2 张,共 3 批细胞爬片应用于实验。其中, N 组为培养 10 d 的海马神经元用正常培养基培养 3 h 用于实验, N+NASPM 组在相同时间点加入 NASPM ($20 \mu\text{mol/L}$)^[6]。BDNF 组加入 BDNF (100 ng/ml)^[7-9]; BDNF+NASPM 组同时加入 BDNF (100 ng/ml) 及 NASPM ($20 \mu\text{mol/L}$); 均在培养 3 h 后进行实验。

1.2 主要试剂

Neurobasal 培养基(Gibco 公司), DMEM-F12 培养基

(Gibco 公司), 优质胎牛血清(Hyclone 公司); B27 培养基添加剂(Gibco 公司), L-谷氨酰胺(Hyclone 公司), 多聚赖氨酸(进口分装), 人 BDNF(PeproTech 公司), FM1-43(Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 胚胎大鼠海马神经元培养及鉴定 操作步骤:参照本课题组沿用的海马神经元培养方法进行胎鼠海马神经元培养^[10]。主要方法为:取孕 17~18 d 的 SD 大鼠 8 只, 取出胎鼠并分离海马神经元, 按每孔 $(5\sim6) \times 10^5$ 个细胞密度种植于含盖玻片并多聚赖氨酸处理过的普通及玻底 24 孔板中, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 24 h 后全量换为无血清培养基, 每 3 d 无血清培养基半量换液, 第 5 天添加阿糖胞苷 ($0.5 \mu\text{mol/L}$, 24 h) 抑制胶质细胞生长。培养 10 d 后应用于实验。胎鼠海马神经元鉴定:取培养 10 d 的细胞爬片 2 张, 采用免疫荧光双标法标记神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)及星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP), 操作步骤:4%多聚甲醛固定, 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次 $\times 5 \text{ min}$, 10%牛血清白蛋白及 10% Triton X-100 封闭 15 min, 一抗兔抗 NSE (1:500 Abcam 公司)及小鼠抗 GFAP (1:300, Cell Signaling 公司) 4°C 孵育过夜, 爬片经复温 1 h 后, 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次 $\times 5 \text{ min}$, Alexa-Fluor 488 山羊抗兔 IgG (1:500, Invitrogen 公司)及 Alexa-Fluor 568 山羊抗小鼠 IgG (1:500, Invitrogen 公司) 室温孵育 1 h, 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次 $\times 5 \text{ min}$, DAPI 染核 (1:10, 凯基生物), 再经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次 $\times 5 \text{ min}$ 后, 抗荧光淬灭封片液封片。在激光共聚焦显微镜下扫描, 光源分别用 488 nm 和 568 nm 波长的激光器激发绿色和红色荧光后, 每张爬片随机摄片 6 张。

1.3.2 激光共聚焦下 Synapto Green™ C4(FM1-43)染色及脱色 操作步骤:FM1-43 染色:取培养 10 d 的海马神经元, 37°C Kerbs-Ringer 缓冲液 (mmol/L): NaCl 130、KCl 4、 NaH_2PO_4 0.5、 MgSO_4 0.5、HEPES 10、 NaHCO_3 2、 CaCl_2 1.5、葡萄糖 5.5, pH 7.4 洗 2 遍; 用添加了 FM1-43 的高钾 Kerbs-Ringer 缓冲液 (KCl 90 mmol/L 的 Kerbs-Ringer 缓冲液) 避光染色 3 min, 再用含 FM1-43 的正常 Kerbs-Ringer 缓冲液避光染色 20 min, 37°C Kerbs-Ringer 缓冲液洗 3 次, 洗弃未被神经元细胞吞入体内的 FM1-43 染料, 激光共聚焦下摄片。FM1-43 脱色:摄片完毕后, 在激光共聚焦下 37°C 高钾 Kerbs-Ringer 缓冲液与 Kerbs-Ringer 缓冲液反复交替刺激突触囊泡胞吐及清洗出 FM1-43 染料。再分别按照前述不同分组要求加入含 NASPM ($20 \mu\text{mol/L}$)、BDNF (100 ng/ml)、BDNF+NASPM 的培养基或正

常培养基,在激光共聚焦下培养 3 h 后,重复 FM1-43 染色及摄像过程^[11-12]。

1.3.3 膜片钳记录 AMPA 受体介导的微兴奋性突触后电流 (micro excitatory postsynaptic currents, mEPSCs) 操作步骤 取培养 10 d 各组海马神经元的细胞爬片,采用 Multiclamp-700B 膜片钳系统的电压钳模式记录 mEPSCs,细胞外液中加入非记录通道阻断剂 (mmol/L) TTX 0.0005、APV 0.1、Bicuculline 0.02,调整至 pH 7.2、渗透压 300 mOsm/kg H₂O,滤波设定为 1 kHz,用 Mini 分析软件进行 AMPA 受体 mEPSCs 波幅和频率分析,比较各组的差别。

1.4 结果判定

1.4.1 免疫荧光结果判定 神经元 NSE 染色阳性信号为胞浆及轴突上出现绿色荧光,星形胶质细胞 GFAP 阳性为胞浆出现红色荧光,所有细胞的细胞核被 DAPI 标记为蓝色荧光,每张贴片选取 6 个高倍视野,计数 NSE 阳性细胞百分比。

1.4.2 FM1-43 染色图像分析 图片结果经 NIS-element 3.2 软件进行分析及计算平均光密度值。平均光密度值采用均值 $\pm$ 标准差表示。

1.4.3 膜片钳图片分析 图片经 Mini 分析软件分析细胞 AMPA 受体 mEPSCs 的频率及幅度。频率及幅度均采用均

数 $\pm$ 标准差表示。

1.5 统计学分析

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。FM1-43 染色平均光密度值组内采用配对 *t* 检验,组间采用 Kruskal-Wallis 检验,组间多重比较采用 Nemenyi 检验;频率、幅度均采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 方法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 原代培养胎鼠大脑海马神经元的鉴定

用神经元特异性 NSE 抗体及星形胶质细胞特异性抗体 GFAP 抗体对培养第 10 天神经元进行免疫荧光双标,计算 NSE 阳性细胞百分比,最大值为 100.0%,最小值为 94.2%,说明培养的细胞绝大多数是神经元(图 1)。

2.2 激光共聚焦下 FM1-43 染色改变

各组分别按照实验分组要求加入相应处理前后,激光共聚焦在相同拍摄条件下摄片的同一视野 FM1-43 表达情况及处理拍摄过程结果如图 2 及表 1 所示。

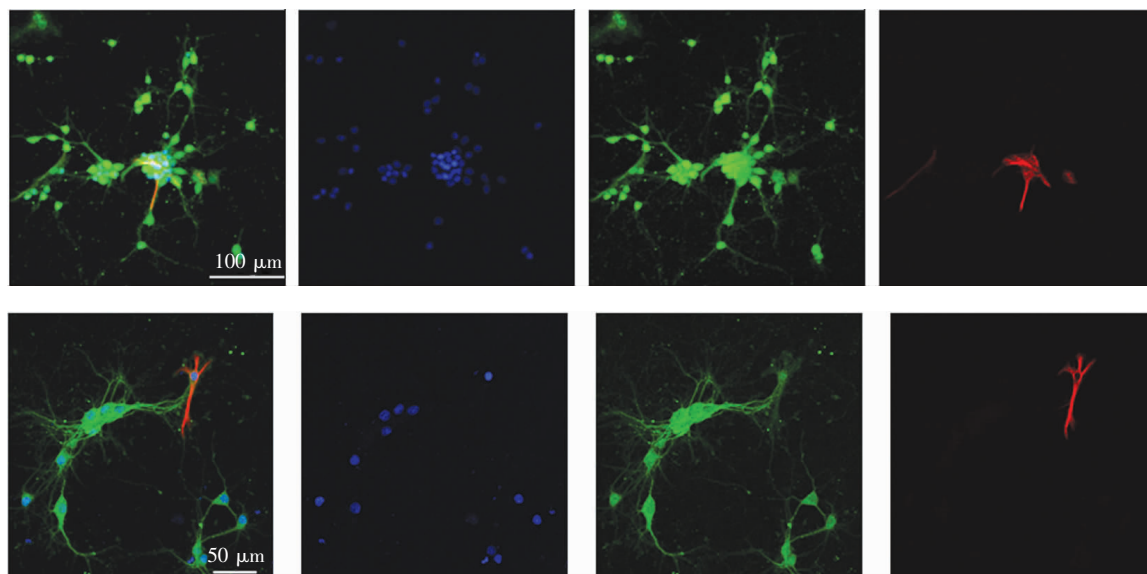


图 1 培养 10 d 的海马神经元 NSE (绿色荧光) 及 GFAP (红色荧光) 免疫荧光照片 (上图 200 $\times$, 下图 400 $\times$)

Fig.1 10-day cultured hippocampal neurons NSE (green fluorescence) and GFAP (red fluorescence) immunofluorescence photographs (200 $\times$, upper picture; 400 $\times$, lower picture)

表 1 各组 FM1-43 染色平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison on average optical density value of FM1-43 staining among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	视野数	第 1 次染色	第 2 次染色	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	第 2 次染色各组 K-W 检验 卡方值及 <i>P</i> 值
N组	7	252.19 $\pm$ 13.60	554.41 $\pm$ 16.42	-32.733	0.000	
BDNF组	9	252.53 $\pm$ 22.51	750.23 $\pm$ 137.81 ^a	-10.290	0.000	χ^2 值: 19.032
N+NASPM组	8	252.89 $\pm$ 11.32	527.83 $\pm$ 30.57	-27.473	0.000	<i>P</i> 值: 0.000
BDNF+NASPM组	9	251.66 $\pm$ 22.94	525.93 $\pm$ 72.64 ^b	-12.647	0.000	

注: a, 与 N 组第 2 次染色比较 (Nemenyi 检验 $\chi^2=7.22, P=0.030$); b, 与 BDNF 组第 2 次染色比较 (Nemenyi 检验 $\chi^2=13.18, P=0.000$)

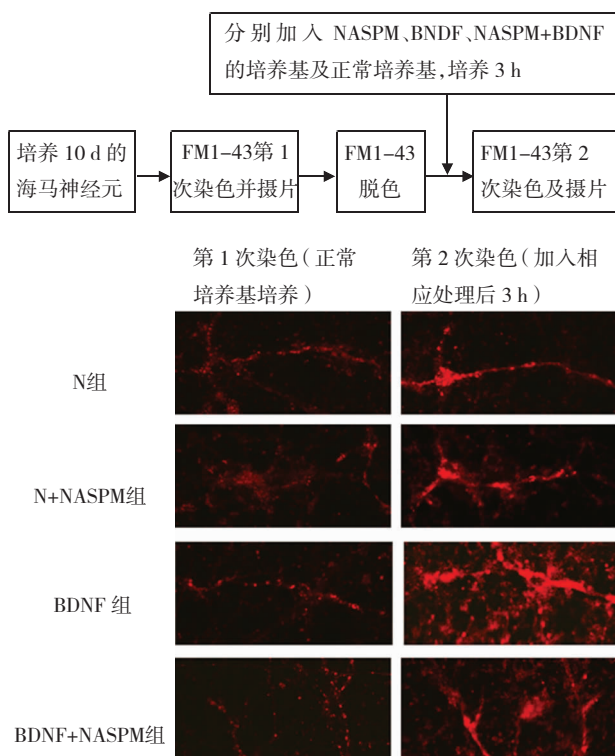


图 2 各组同一视野干预前后 FM1-43 染色图片 (200 ×)

Fig.2 FM1-43 staining image before and after the intervention in the same field of view of each group (200 ×)

各组培养神经元不同处理前后 FM1-43 染色平均光密度值统计分析显示:各组神经元培养 3 h 后,免疫荧光水平均有明显提高,表明正常 10 d 海马神经元培养 3 h,即可有显著的突触囊泡功能进展;BDNF 组处理后第 2 次染色光密度值与 N 组处理后第 2 次染色比较,FM1-43 的荧光强度 BDNF 组明显高于 N 组 ($\chi^2=7.22, P=0.03$);而 BDNF 组添加 NASPM 培养 3 h 后,FM1-43 荧光强度较 BDNF 组第 2 次染色有明显减少 ($\chi^2=13.18, P=0.00$),但与 N 组第 2 次染色比较无统计学意义,表明 BDNF 能显著增加突触囊泡的数量。本研究结果同其他类似研究结果基本一致^[12-13],而应用 NASPM 可以阻断这种变化,即不含 GLuR2 的 AMPA 受体在 BDNF 显著增加突触囊泡这一过程中发挥了重要作用。

2.3 AMPA 受体 mEPSCs 的变化

应用膜片钳技术记录海马神经元细胞 AMPA 受体 mEPSCs,每组记录 8 个海马神经元细胞,图 3 及表 2 显示每组 3 个神经元的记录片段结果及统计结果。

结果显示:BDNF 组较 N 组 AMPA 受体 mEPSCs 的幅度及频率均有所增加 ($P<0.05$);BDNF+NASPM 组较 BDNF 组 mEPSCs 的幅度由 (-25.0 ± 2.57) pA 降至 (-15.5 ± 2.52) pA,差异有统计学意义 ($P<0.05$),但与 N 组的幅度比较差异无统计学意义;mEPSCs 频率分析结果显示:BDNF+NASPM 组较 BDNF 组频率差异有统计学意义 ($P<0.05$),但与 N 组的频率比较差异无统计学意义,表明 BDNF 可通过调节不含 GLuR2 的 AMPA 受体增强 AMPA 受体 mEPSCs 的幅度及频率。

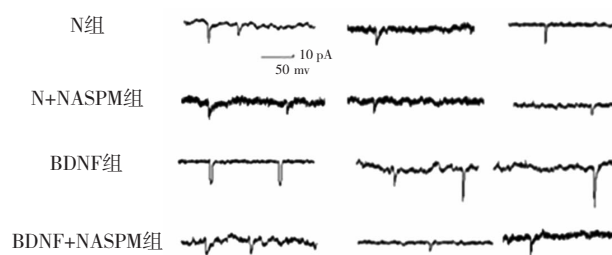


图 3 各组膜片钳记录 AMPA 受体 mEPSCs 结果

Fig.3 Results of patch-clamp recording AMPA receptor mEPSCs in each group

表 2 实验各组 AMPA 受体 mEPSC 结果

Tab.2 mEPSC results of AMPA receptor in each group

组别	细胞数 (n)	频率 (Hz)	幅度 (pA)
N组	8	1.730 ± 0.217	-16.30 ± 1.98
BDNF组	8	3.340 ± 0.280^a	-25.00 ± 2.57^b
N+NASPM组	8	1.640 ± 0.216	-15.00 ± 1.41
BDNF+NASPM组	8	1.740 ± 0.207^c	-15.50 ± 2.52^d
F 值		99.227	37.465
P 值		0.000	0.000

注:a,与 N 组频率比较 (LSD-t 方法 P 值 BDNF 组为 0.000);b,与 N 组幅度比较 (LSD-t 方法 P 值 BDNF 组为 0.000);c,与 BDNF 组频率比较 (LSD-t 方法 P 值为 0.000);d,与 BDNF 组幅度比较 (LSD-t 方法 P 值为 0.000)

3 讨论

众所周知,给予外源性刺激后,突触前神经元兴奋,动作电位传到神经末梢导致突触前膜发生去极化,前膜电压门控 Ca^{2+} 通道开放,从而促进突触囊泡与前膜融合,引起突触囊泡内递质量子式释放,释放的递质与突触后膜上受体结合,使突触后膜发生一定程度的去极化,形成兴奋性突触后电流,进而触发突触后神经元爆发动作电位,完成突触传递的过程。

FM1-43 是一种具有独特结构的荧光染料,其尾端的脂溶性基团,能很好的将亲脂性及疏水性的结构与别的结构区分开;中间部分芳香环双键数量决定其荧光光谱,且在极性溶液如水中,荧光的量子产率较非极性溶液如膜中,减少超过 2 个数量级,因此 FM1-43 在水中不显色,只有进入囊泡膜或其他疏水结构中才可显色;带正电荷的头端可以防止 FM1-43 完全进入膜内,这有利于位于细胞膜表面的染料被洗脱,而被胞吞入细胞内的突触囊泡只能通过胞吐作用吐出囊泡与细胞包膜融合后再被洗脱,所以 FM1-43 的荧光强度可以反映有功能突

触囊泡的多少。FM1-43 染色标记及洗脱技术是活体标记突触囊泡最便捷和成熟的手段^[10],结合激光共聚焦能为细胞提供必要的温度和 CO₂ 浓度,使细胞存活相当长时间,并且激光共聚焦的定位记忆功能能保证追踪同一视野下同一细胞在处理前后突触囊泡的变化。根据上述 2 项技术的优点,本研究采用培养 10 d 的原代海马神经元细胞,结合 FM1-43 染色及激光共聚焦技术,追踪同一视野神经元 BDNF 处理前后突触囊泡的变化情况,结果发现:10 d 海马神经元细胞 FM1-43 染色标记的突触囊泡,经 BDNF 处理 3 h 后,显著增加其功能突触囊泡的数量,这与许多研究海马神经元中 BDNF 对突触囊泡的影响结果一致^[13-14]。

在观察突触传递过程中突触囊泡变化的基础上,为进一步深入研究 BDNF 对突触传递中突触功能的影响,应用膜片钳技术记录研究 AMPA 受体 mEPSCs 的变化。AMPA 受体 mEPSCs 的幅度对应于 AMPA 受体的数量和电导,频率则被认为是反映突触囊泡从突触前膜释放的概率和数量^[15]。膜片钳技术可以特异性记录 AMPA 受体单通道电流大小,从而反映 AMPA 受体功能。本研究应用膜片钳电压钳模式记录培养 10 d 神经元,应用 BDNF 前后 AMPA 受体 mEPSCs 结果显示:应用 BDNF 后,BDNF 能使海马神经元突触中 AMPA 受体 mEPSCs 的频率及幅度均有所增加,即 AMPA 受体功能有所增强,本研究结果与文献中许多类似研究结果一致^[16-17]。

众所周知,AMPA 受体由 GLuR1~GLuR4 亚单位组成,每个亚基都由 1 个 N 端、3 个跨膜区域、1 个形成孔的发夹结构和 1 个位于胞质侧的 C 端构成。各个亚基的胞外结构和跨膜区非常相似,差别主要在胞质侧 C 端,各个亚基通过 C 端和不同的胞内蛋白相互作用^[4-5]。含 GLuR2 亚单位的 AMPA 受体异聚体呈现低 Ca²⁺通透性;而不含 GLuR2 亚单位构成的 AMPA 受体 Ca²⁺的通透性很高。GLuR2 亚基在 AMPA 受体中的相对含量决定了 AMPA 受体的功能特性,对 GLuR2 亚基的调节也成为研究热点。因此,本研究应用特异性阻断不含 GLuR2 的 AMPA 受体阻断剂 NASPM 来研究不含 GLuR2 亚基的 AMPA 受体与 BDNF 的关系。将 NASPM 加入 BDNF 组中,即 NASPM 与 BDNF 共同加入正常培养基中培养 3 h。首先在激光共聚焦下观察,阻断不含 GLuR2 亚基的 AMPA 受体后,BDNF 对突触传递过程中突触囊泡的影响。FM1-43 染色结果表明:添加 NASPM

于 BDNF 实验组后,FM1-43 染色荧光强度明显比不添加 NASPM 的 BDNF 组荧光强度低,即 NASPM 能显著减少 BDNF 增加突触传递中功能突触囊泡这一过程。其次,NASPM 与 BDNF 共培养的实验组 (NASPM+BDNF 组),应用膜片钳记录 AMPA 受体 mEPSCs 的频率及幅度。通过加入 NASPM,可阻断不含 GLuR2 的 AMPA 受体介导的电流,即电流幅度减少及频率减弱。膜片钳记录结果表明:应用 NASPM 和 BDNF 后,膜片钳记录的 AMPA 受体 mEPSCs 的幅度及频率较未添加 NASPM 的 BDNF 实验组有减少,但与 N 组的频率及幅度比较无明显差异。以上膜片钳实验结果表明 BDNF 能通过对不含 GLuR2 的 AMPA 受体的调控来增加突触中 AMPA 受体的功能。

综上所述,BDNF 可能部分通过调节不含 GLuR2 的 AMPA 受体,来参与 BDNF 增强突触传递过程中活化突触囊泡和增强 AMPA 受体功能的作用,但是 BDNF 的这种调控作用的具体分子机制仍有望进一步通过确定 AMPA 受体各亚基的组成变化等来证实,从而为以后针对性调控 AMPA 受体及保护海马神经元提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Chen K, Henry RA, Hughes SM, et al. Creating a neurogenic environment: the role of BDNF and FGF2[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 36(1): 108-120.
- [2] Paradiso B, Marconi P, Zucchini S, et al. Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(17): 7191-7196.
- [3] Bartkowska K, Turlejski K, Djavadian RL. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system[J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2010, 70(4): 454-467.
- [4] 陈 凯, 孙红斌. α -氨基-3-羟基-5-甲基异恶唑-4-丙酸受体与癫痫的研究进展[J]. *实用医院临床杂志*, 2012, 9(1): 151-153.
- [5] Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 179(1): 4-29.
- [6] Liu B, Liao M, Mielke JG, et al. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(20): 5309-5319.
- [7] Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(17): 12619-12628.

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.02.006

持续惊厥后幼年大鼠海马电生理学变化
及脑源性神经营养因子表达变化

熊佳佳, 蒋 莉, 陈恒胜, 胡 越

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:研究幼年期大鼠长时程惊厥(status convulsion, SC)后海马电生理学与海马脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达变化, 探索两者之间的可能关系。**方法:**选择生后 21 d Wistar 鼠 160 只, 随机分为对照组和实验组, 每组 80 只。腹腔注射氯化锂-匹罗卡品制造 SC 模型; 以腹腔注射生理盐水为对照组。造模后 1、7、14、21 d 膜片钳技术检测海马场兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potentials, fEPSP)斜率与波幅的变化, 比较长时程增强(long-term potentiation, LTP)现象。造模后 12 h、1 d、3、7、14、21 d 免疫组织化学观察海马区 BDNF 表达的定位情况, Western blot 方法鉴定其表达情况。**结果:**(1)SC 后 7 d, 实验组 fEPSP 斜率为 $(162.30 \pm 28.50)\%$ 高于对照组 $(124.01 \pm 26.46)\%$ ($P < 0.05$); SC 后 14 d 实验组和对照组 fEPSP 斜率分别为 $(83.06 \pm 8.32)\%$ 和 $(121.64 \pm 23.12)\%$, 波幅分别为 $(100.54 \pm 16.03)\%$ 和 $(135.65 \pm 35.85)\%$, 实验组较对照组斜率及波幅明显降低, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。(2)免疫组织检查发现 SC 后大鼠海马 CA1、CA3 区 BDNF 阳性着色均有不同程度的增强, 实验组在 SC 后 12 h、1 d、3、7 d 较正常组有增多趋势, 14 d 及 21 d 组无明显差别。(3)Western blot 测定 BDNF 表达情况, SC 后 12 h、1 d、3、7 d 分别为: 1.08 ± 0.10 、 1.39 ± 0.08 、 0.85 ± 0.04 、 0.53 ± 0.06 , 对照组分别为: 0.39 ± 0.16 、 0.37 ± 0.03 、 0.39 ± 0.02 、 0.37 ± 0.04 , 实验组与对照组比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。**结论:**(1)幼年大鼠 SC 后 fEPSP 斜率在 SC 后 7 d 较正常组增高; 在 SC 后 14 d fEPSP 斜率及波幅较对照组和其他实验组明显降低。提示 SC 后急性期 LTP 增高, 潜伏期 LTP 降低。(2)经免疫组化和 Western blot 方法检测, 提示 BDNF 表达受 SC 刺激影响, 在 SC 后急性期表达明显增多。(3)BDNF 在 LTP 形成过程中可能起重要作用。

【关键词】幼年大鼠; 长时程惊厥; 长时程增强; 脑源性神经营养因子

【中图分类号】R748; R741.044

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-02-05

作者简介:熊佳佳, Email: dr_xj@tom.com,

研究方向: 脑发育与脑损伤。

通信作者:蒋 莉, Email: dr_liang@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号: 81071056)。

[8] Zhang Z, Fan J, Ren Y, et al. The release of glutamate from cortical neurons regulated by BDNF via the TrkB/Src/PLC- γ 1 pathway[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(1): 144-151.

[9] Lazo OM, Gonzalez A, Ascaño M, et al. BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching[J]. J Neurosci, 2013, 33(14): 6112-6122.

[10] 文 香, 蒋 莉, 陈恒胜. 无镁诱导神经元放电后细胞共培养微环境中脑源性神经营养因子的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(5): 375-379.

[11] Gaffield MA, Betz WJ. Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes[J]. Nat Protoc, 2006, 1(6): 2916-2921.

[12] Xu SJ, Wang P, Xia D. Quantitative analysis of synaptic vesicle release and readily releasable pool size in hippocampal neurons[J]. Acta Physiol Sinica, 2009, 61(6): 505-510.

[13] Tyler WJ, Pozzo-Miller LD. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the ac-

tive zones of hippocampal excitatory synapses[J]. J Neurosci, 2001, 21(12): 4249-4258.

[14] Shen W, Wu B, Zhang Z, et al. Activity-induced rapid synaptic maturation mediated by presynaptic cdc42 signaling[J]. Neuron, 2006, 50(3): 401-414.

[15] Kerchner GA, Nicoll RA. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(11): 813-825.

[16] Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, et al. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition[J]. Trends Neurosci, 2010, 33(3): 121-129.

[17] Copi A, Jungling K, Gottmann K. Activity- and BDNF-induced plasticity of miniature synaptic currents in ES cell-derived neurons integrated in a neocortical network[J]. J Neurophysiol, 2005, 94(6): 4538-4543.

(责任编辑: 冉明会)