

N-甲基-D-门冬氨酸2B受体mRNA在纹状体边缘区的表达

N-甲基-D-门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体作为谷氨酸离子型受体的一种亚型,在适应、学习与记忆、兴奋性神经毒等方面的作用已引起了人们的注意[1][2],尤其在脑内长时程可塑性方面(Long-term potentiation, LTP)被认为代表着细胞水平的学习过程,而这一过程需要NMDA受体偶联的Ca²⁺通道的开放作为条件。目前已克隆到鼠的2个家族5种NMDA受体亚单位,即NMDA1、NMDA2(A、B、C、D)[3]。中枢神经系统中NMDA1及NMDA2A亚单位分布广泛;NMDA2B多见于丘脑、海马及纹状体;NMDA2C限定在小脑;NMDA2D在黑质致密部[2]。随着研究逐步深入,NMDA受体亚单位的作用正渐渐成为人们关注的焦点[4][5],其中NMDA2B受体作为学习记忆过程中一个分子开关,为治疗学习与记忆障碍指出一新方向[6]。纹状体边缘区是舒斯云于1987年首先发现,它位于腹侧纹状体与苍白球交界处,主要由一层中等大的梭形细胞组成,呈背腹走向[7]。迷宫试验显示边缘区与学习记忆有关[8][9],1994年舒斯云观察到纹状体边缘区中有NMDA1受体mRNA的表达[10],但是否有NMDA2B受体表达尚未见报道。研究边缘区的NMDA2B受体的表达,可在基因水平上阐明边缘区学习记忆功能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠10只(购于第一军医大学实验动物中心),体质量200~250 g。10%水合氯醛(0.35 ml/100 g·b.w.)腹腔内注射麻醉,开胸、剪开右心耳,从左心室插管至升主动脉,先用100 ml生理盐水快速灌注,随后用4%多聚甲醛磷酸缓冲液250 ml快速灌注,再用250 ml慢速滴注,持续2 h后取脑。置于30%蔗糖溶液中40℃过夜。恒冷箱切片机制片,厚度20 μm,贴于事先经多聚赖氨酸处理过的载玻片上。切片分两套,一套做NMDA2B受体的原位杂交,而另一套做对照。

1.2 原位杂交

1.2.1 探针的选择 杂交的探针采用武汉博士德生物公司提供的地高辛标记的多相寡核苷酸探针。探针的合成、标记及检测试剂均购自武汉博士德生物公司。选取NMDA2B受体cDNA位置及合成探针序列如下:(1)561~590:5'-GCT CTT TGG GTC AGT TTC GTT CAT GGC TAC-3';(2)2521~2550:5'-CTG CAT CAT AGA TGA ATG CAT CAA GCT TCC-3';(3)4621~4290:5'-CCT CCT TCT GCA GGT CCA CGA AGG TGT CGT-3'。

1.2.2 杂交方法及显色 具体杂交过程参见试剂盒中说明书。用GDN法[11](葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍铵)显色。干燥、梯度酒精脱水,二甲苯透明,DPX封片,在Olympus AH-3显微镜下观察、照相。

1.3 对照组的统计

RNA酶消化对照:先用RNA酶处理切片,再杂交。空白对照:杂交过程省去标记探针。检测系统空白对照:原位杂交后进行免疫组化显色时省去地高辛抗体。

2 结果

地高辛标记的NMDA2B受体cDNA寡核苷酸探针进行原位杂交后,反应产物检测呈紫蓝色颗粒状,主要分布于神经元核周围胞浆内,呈弥散或块状分布。在纹状体内可见较多表达NMDA2B受体mRNA阳性的细胞,胞体呈多极性,突起的方向不规则。在尾壳核和苍白球之间边缘区的部位,可见中等大小、表达NMDA 2B受体mRNA阳性的梭形细胞,呈密集的带状分布,细胞长轴呈背腹方向,而苍白球内有少量细胞被标记(图1)。此外大脑皮层、海马、杏仁核、丘脑也出现较强的标记细胞。对照组试验均为阴性,未见NMDA 2B受体阳性神经元胞体。

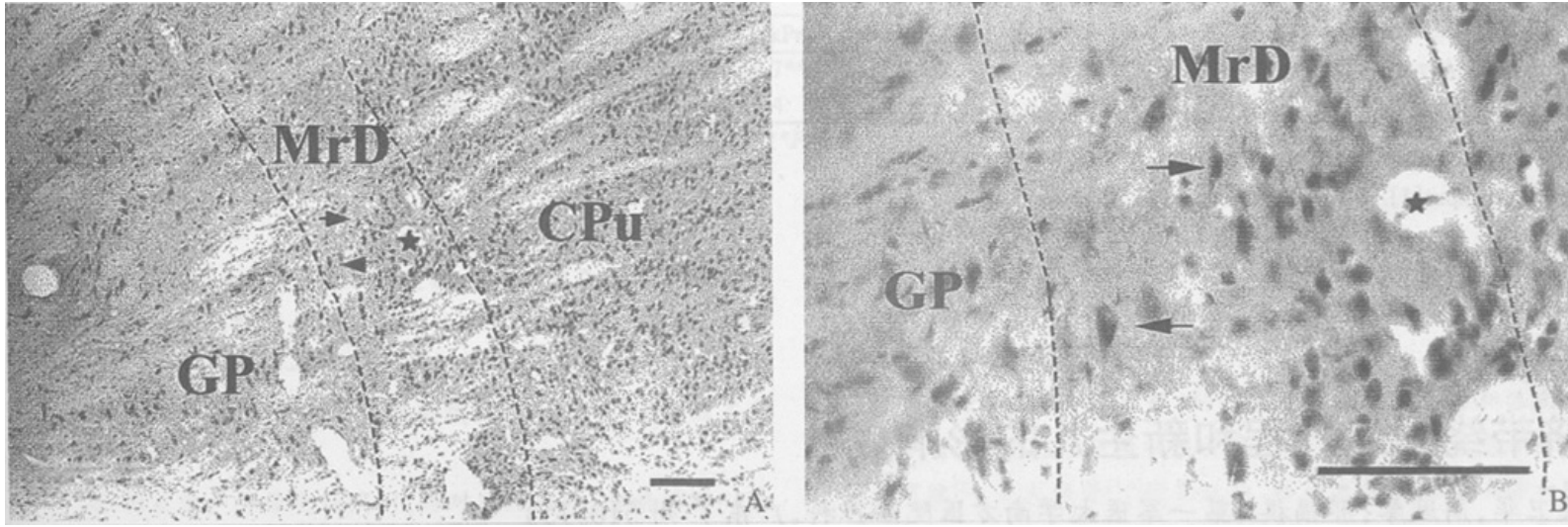


图1 大鼠脑矢状面切面光学显微镜图片

Fig.1 The microphotographs of the rat striatum sagittal section

Bar=50 μ m. Cpu: Caudoputamen; GP: Globus pallidus; MrD: Marginal division. Asterisk indicates the location of MrD (the area defined by the 2 lines is the MrD)

A: Large quantity of positive expression of NMDA2B receptor mRNA is observed in the MrD, located between the caudate putamen and globus pallidus. Arrows show the neurons of MrD

B: Magnification of Fig. A. Arrows indicate the fusiform neurons, with fibers extending dorsoventrally

3 讨论

NMDA受体是异聚型受体，即由NMDA1和NMDA2亚单位组成，其中NMDA1受体对通道的功能是必需的，而NMDA2受体调节通道的开放，起修饰作用[5]。NMDA1受体亚单位与不同的NMDA2受体亚单位(NMDA 2A、NMDA 2B、NMDA 2C、NMDA 2D)所构成的异聚体，表现不同的生化和药理学上的特性。如NMDA1-NMDA 2A对甘氨酸亲和力和比NMDA1-NMDA 2B要低，另外在离子流动持续时间、对Mg离子阻断敏感性方面都有着差异[1]。最近Tong[5]通过转基因技术对过度表达NMDA 2B受体鼠的研究发现，易化突触电位、对学习能力和信息保留方面明显改善，鼠变得更聪明。Bliss[6]也把NMDA 2B受体视为学习记忆过程中一个开关分子。

关于NMDA2B的分布，Standaert等[2]用³⁵S标记寡核苷酸3'-末端的探针检测NMDA 2B受体mRNA，主要在皮层、纹状体、伏隔核，同时在丘脑、海马等处也有较强的标记，而苍白球等处有少量的标记信号。本实验结果除与上述结果吻合外，还在纹状体边缘区发现有较多NMDA 2B阳性胞体存在，且密集分布成带状。Landwehrmeyer等[11][12]采用³⁵S和地高辛标记的双标技术发现，纹状体中脑啡肽阳性的投射神经元比胆碱能、生长抑素能中间神经元有较高NMDA1和NMDA 2B受体mRNA表达。而舒斯云等[7]用免疫组织化学方法观察到在边缘区有密集的乙酰胆碱、脑啡肽等阳性纤维分布，但只有少量的阳性细胞分布，表明虽然纹状体与边缘区都有NMDA 2B受体mRNA的表达，但有可能在对NMDA 2B受体调节方面存在差异。Standert等[2]也认为纹状体NMDA受体主要以NMDA1和NMDA2亚单位为主。已有文献报道[10][12]边缘区有NMDA1受体的mRNA表达，可以推测边缘区中NMDA受体是由NMDA1及NMDA2B所构成。是否还有其它亚单位如NMDA2A、NMDA2C、NMDA2D的存在及作用有待进一步研究。

参考文献：

- [1] Monyer H, Sprengel R, Schoepfer A, et al. Heteromeric NMDA receptor: molecular and function distinction of subtypes[J]. Science, 1992, 256(5060):1217-21.
- [2] Standert DG, Testa CM, Young AB, et al. Organization of N-methyl- D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat[J]. J Comp Neurol, 1994, 343(1):1-16.
- [3] Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y. Molecular mechanism associated with long-term consolidation of the NMDA signals[J]. Life Sci, 2000, 1667(4):355-64.
- [4] Cammarota M, Stein MLD, Paratcha G, et al. Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus[J]. Neurochem Res, 2000, 25(5):567-72.
- [5] Tang YP, Shimizu E, Dube GR, et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice[J]. Nature, 1999, 401(6748):63-9.
- [6] Bliss TV. Young receptors make smart mice[J]. Nature, 1999, 401(6748):25-7.
- [7] Shu SY, Penny GU, Peterson GM. The marginal division: a new subdivision in the neostriatum of rat[J]. J Chem Neuroanat, 1988;1(3):147-63.
- [8] 李胜修, 舒斯云, 包新民, 等. 海人藻酸破坏纹状体边缘区后对大鼠学习记忆功能影响的研究[J]. 神经解剖学杂志, 1996, 12(1):37-41.
- [9] Shu SY, Bao XM, Li SX, et al. New subdivision of mammalian neo- striatum with function implications to learning and memory[J]. J Neurosci Res, 1999, 58(1):242-53.
- [10] Shu SY, Pritchett DB. Gene and protein expression of NMDAR1 receptors in the cerebellum, hippocampus and striatum of the rat brain[J]. Abstr Neurosci Soc, 1994, 20(13):214.

- [11] Shu SY, Ju G, Fang LZ. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system[J]. *Neurosci Lett*, 1988,85(2):169-71.
- [12] Landwehrmeyer GB, Standaert DG, Testa CM, et al. NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum[J]. *J Neurosci*, 1995,15(7):5297-307.

参考文献:

- [1] Monyer H, Sprengel R, Schoepfer A, et al. Heteromeric NMDA receptor: molecular and function distinction of subtypes[J]. *Science*, 1992,256(5060):1217-21.
- [2] Standert DG, Testa CM, Young AB, et al. Organization of N-methyl- D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat[J]. *J Comp Neurol*, 1994,343(1):1-16.
- [3] Platenik J, KuramotoN, Yoneda Y. Molecular mechanism associated with long-term consolidation of the NMDA signals[J]. *Life Sci*, 2000,1667(4):355-64.
- [4] Cammarota M, Stein MLD, Paratcha G, et al. Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus[J]. *Neurochem Res*, 2000,25(5):567-72.
- [5] Tang YP, Shimizu E, Dube GR, et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice[J]. *Nature*, 1999,401(6748):63-9.
- [6] Bliss TV. Young receptors make smart mice[J]. *Nature*, 1999,401(6748):25-7.
- [7] Shu SY, Penny GU, Peterson GM. The marginal division: a new subdivision in the neostriatum of rat[J]. *J Chem Neuroanat*, 1988;1(3):147-63.
- [8] 李胜修, 舒斯云, 包新民, 等. 海人藻酸破坏纹状体边缘区后对大鼠学习记忆功能影响的研究[J]. *神经解剖学杂志*, 1996,12(1):37-41.
- [9] Shu SY, Bao XM, Li SX, et al. New subdivision of mammalian neo- striatum with function implications to learning and memory[J]. *J Neurosci Res*, 1999,58(1):242-53.
- [10] Shu SY, Pritchett DB. Gene and protein expression of NMDAR1 receptors in the cerebellum, hippocampus and striatum of the rat brain[J]. *Abstr Neurosci Soc*, 1994,20(13):214.
- [11] Shu SY, Ju G, Fang LZ. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system[J]. *Neurosci Lett*, 1988,85(2):169-71.
- [12] Landwehrmeyer GB, Standaert DG, Testa CM, et al. NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum[J]. *J Neurosci*, 1995,15(7):5297-307.

[回结果列表](#)