

谷氨酸转运体和 γ -氨基丁酸转运体 在脑缺血模型中的表达意义

任力¹, 邢进¹, 魏子龙¹, 王之涵¹, 赵亮¹,
邱永明², 林盈盈²

(1. 上海市浦东医院 神经外科, 上海, 201399;
2. 上海交通大学附属仁济医院 神经外科, 上海, 200127)

摘要:目的 探讨谷氨酸转运体和 γ -氨基丁酸转运体在脑缺血模型中的表达意义。方法 在体内缺血、体外缺氧2种模型中利用免疫荧光、Western-blot、RT-PCR等技术定性定量的检测主要的谷氨酸转运体-1(EAAC-1)和 γ -氨基丁酸转运体-1(GAT-1)的表达情况。结果 在局灶性脑缺血模型(大鼠脑中动脉缺血模型)和缺氧条件下培养的原代神经元中均发现, EAAC1表达下降, GAT1表达上升。结论 在脑缺血缺氧状态下 EAAC1表达下降, GAT1表达上调。

关键词: 脑缺血; 缺氧; 谷氨酸转运体1; γ -氨基丁酸转运体1

中图分类号: R 743 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2017)03-048-04 DOI: 10.7619/jcmp.201703015

Significance of expressions of glutamate transporters and γ -aminobutyric acid transporters in rat model with cerebral ischemia

REN Li¹, XING Jin¹, WEI Zilong¹, WANG Zhihan¹, ZHAO Liang¹,
QIU Yongming², LIN Yingying²

(1. Department of Neurosurgery, Shanghai Pudong Hospital, Shanghai, 201399; 2. Department of Neurosurgery, Renji Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200127)

ABSTRACT: Objective To explore the significance of expressions of glutamate transporters and γ -aminobutyric acid transporters in the rat model with cerebral ischemia. **Methods** The detections of the expressions of glutamate transporter-1 (EAAC-1) and γ -aminobutyric acid transporter -1 (GAT-1) in models with ischemia in vivo and hypoxia in vitro were performed by immunofluorescence, Western-blot and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. **Results** The expression of EAAC1 was reduced in the cerebrum of focal cerebral ischemic MACO rat model as well as in primary neurons cultured under hypoxia. The expression of GAT1 was elevated. **Conclusion** EAAC1 expression decreases while GAT1 expression increases under condition of cerebral ischemia and anoxia.

KEY WORDS: cerebral ischemia; anoxia; glutamate transporter-1; γ -aminobutyric acid transporter -1

缺血缺氧是导致癫痫、中风等神经生理疾病发生的主要原因之一,具有较高致死率、致残率^[1]。L-谷氨酸因脑缺血缺氧过度释放,导致中

枢神经系统神经元死亡^[2]。同时, γ -氨基丁酸(GABA)受体活化以抑制L-谷氨酸过度释放^[3]。GABA转运体与谷氨酸转运体协同作用,共同维

收稿日期: 2016-11-20

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会面上项目(201540412); 上海市卫生和计划生育委员会中医药科研基金课题(2014JP025A); 上海市浦东新区卫生系统重点专科建设项目(PWZz2013-18)

通信作者: 魏子龙, E-mail: weizilong2007@163.com

持细胞外 GABA 和谷氨酸的含量,参与正常神经元活动及大脑的多种病理状态^[4]。目前,关于这两种氨基酸转运体在脑缺血性疾病中的具体表达尚不明确。本研究通过建立大鼠脑中动脉缺血(MCAO)模型,探讨谷氨酸转运体-1(EAAC-1)及 γ -氨基丁酸转运体-1(GAT-1)在体内外缺血缺氧条件下的表达情况。

1 材料与方法

1.1 大鼠 MCAO 模型的建立

健康成年雄性 SD 大鼠 16 只,体质量 250 ~ 300 g,由上海交通大学医学院动物实验中心提供,食物和水随意提供,设置 12、12 h 日夜周期。本研究采用的动物实验研究通过动物实验伦理委员会的批准,并依据上海交通大学医学院的动物实验指南进行。

SD 大鼠随机分为对照组(手术但无栓塞)与观察组,每组 8 只。观察组脑缺血 24 h 后腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,按照文献^[4]对大鼠进行再灌注。具体操作如下:1 根单丝尼龙线与热处理后的圆尖通过颈外动脉引入右颈内动脉,直到到达一个轻微的阻力处,维持 90 min 后撤回,以便再灌注。再灌注开始的特定时间,采用戊巴比妥钠腹腔注射 100 mg/kg 将动物深度麻醉。大鼠心脏灌注 4 °C 生理盐水后,在冰上解剖获取相应的缺血中心区和半暗带区脑组织,用于组织 mRNA 和蛋白的分析。大鼠心脏灌注 4 °C 生理盐水后,4% 多聚甲醛(pH = 7.4)灌注固定脑组织。取脑组织,4% PFA 固定,低温保存于 20%、30% 蔗糖溶液中。在 -1.80 和 -4.80 mm 间的前凶水平连续冠状切片,共收集 24 个切片进行染色。

1.2 细胞培养

原代神经元在含有 10% FBS (PAA, Linz, Austria) DMEM 中培养,置于 5% CO₂、37°C 的细

胞培养箱中。为模拟体内缺氧环境,将细胞接种于 10 cm 培养皿中,用 CoCl₂ 处理培养的神经元 24、48 h 后,采用免疫印迹法和 RT-PCR 法观察 EAAC1 和 GAT1 的表达情况。

1.3 免疫荧光

采用 4% 多聚甲醛于 4 °C 下固定含有细胞的玻片 15 min,并使用含有 0.1% 皂素、1% 羊血清或 2% 驴血清的 PBS 溶液室温下孵育 30 min。加入相应的小鼠 EAAC1、GAT1 一抗,稀释 500 倍,4 °C 孵育过夜。吸去一抗,洗涤玻片,使用 Alexa-Fluor-488 标记的山羊抗兔荧光二抗,室温避光孵育 2 h。激光共聚焦显微镜下观察。

1.4 实时荧光定量 PCR

Trizol 法抽提 RNA,并用 DNA 酶去除样本中的 DNA。使用 RNA 反转录试剂盒合成 cDNA, GAPDH 作为引物内参。实时荧光定量 PCR 使用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒,重复 3 次,采用 7900HT 快速实时 PCR 机进行分析。

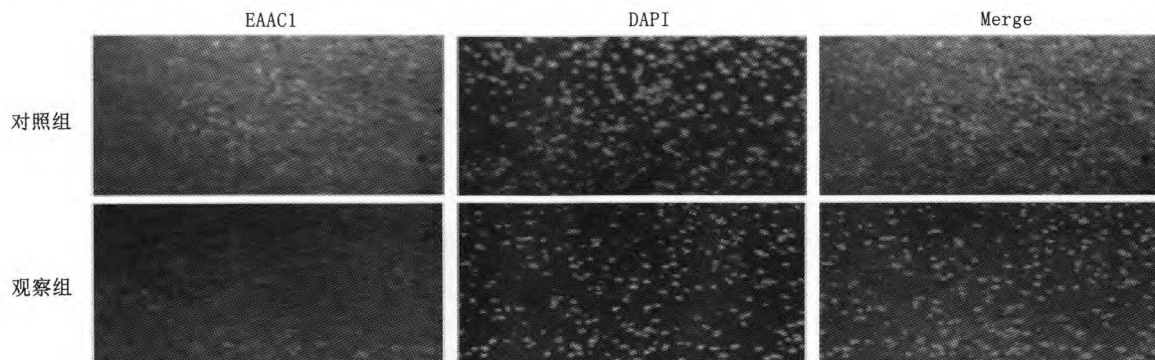
1.5 免疫印迹分析法

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 10% ~ 15% 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,使用柯达胶片曝光。一抗为 EAAC1、GAT1, Actin 为蛋白内参。

2 结果

2.1 EAAC1、GAT1 在大鼠 MCAO 再灌注模型半暗带区的表达

采用免疫荧光法观察 EAAC1、GAT1 在半暗带区的表达,结果显示,观察组再灌注 24 h 后,EAAC1 蛋白表达相比于对照组明显减少,GAT1 蛋白表达相比于对照组增加。见图 1。



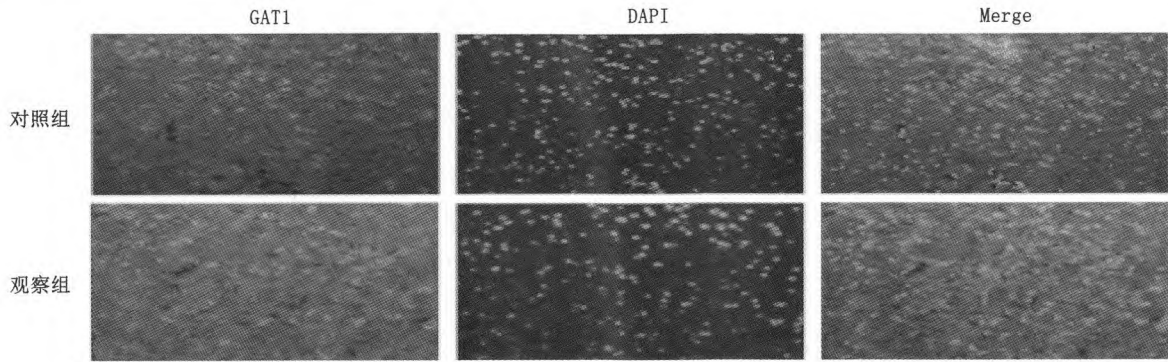


图 1 大鼠脑中动脉缺血再灌注模型中 EAAC1 和 GAT1 表达

2.2 EAAC1、GAT1 在缺氧刺激下的神经元中的表达

CoCl₂ 处理 24、48 h 后,神经元 EAAC1 蛋白表达下调,并呈时间依赖性(图 2A), GAT1 蛋白

表达上调(图 2B); RT-PCR 法检测 EAAC1 和 GAT1 的 mRNA 水平, CoCl₂ 处理 24、48 h 后, EAAC1 mRNA 水平下调(图 2C), GAT1 mRNA 水平上调(图 2D)。见图 2。

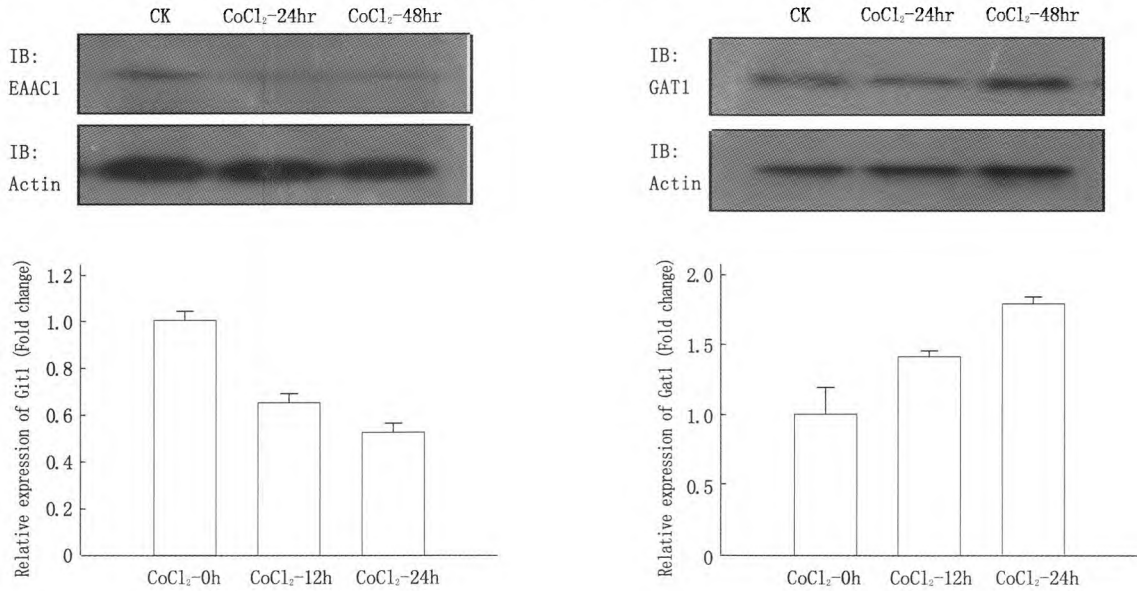


图 2 EAAC1 和 GAT1 在缺氧诱导的神经元中的表达

3 讨论

脑缺血再灌注损伤由多因素共同作用所致,其中兴奋性氨基酸毒性、梗死周围去极化、炎症和凋亡是引起神经元死亡的主要病理生理机制,构成了脑缺血再灌注损伤的级联反应^[5-6]。谷氨酸为兴奋性神经递质,具有神经毒性作用。GABA 为抑制性神经递质,具有神经保护作用。GABA 转运体和谷氨酸转运体是中枢神经系统重要的转运蛋白,参与大脑多种病理状态,尤其是脑缺血性疾病和癫痫^[7-8]。谷氨酸转运体家族含 5 个成员,分别是 GLAST/EAAT1、GLT-1/EAAT2、EAAC1/EAAT3、EAAT4 和 EAAT5^[9]。研究^[10-11]

证明,消除 GLT-1 的小鼠发生严重癫痫,可见 GLT-1 在中枢神经系统中发挥重要作用。与 GLT-1 相比,EAAC1 在神经元死亡中的作用尚未明确。除了介导细胞外谷氨酸转运,最新研究^[12]发现 EAAC1 可作为半胱氨酸转运体从而发挥作用,并维持神经元的谷胱甘肽代谢。因此,推测 EAAC1 可能在维持谷氨酸转运外,还发挥着其他重要的作用。钠-氯离子依赖性 GAT1 主要负责将 GABA 从神经传递的突触间隙去除,从而终止了 GABA 神经传递的作用^[13]。

本研究中,EAAC1 在局灶性脑缺血 MCAO 模型及缺氧条件下培养的原代神经元中的表达均降低,GAT-1 的表达轻度升高,与国内研究^[14]结

果一致。可见脑缺血再灌注后谷氨酸的神经毒性及 GABA 的神经保护作用, EAAC-1 可通过调节谷氨酸水平保护神经元损伤。本研究还发现, CoCl_2 处理后, 大量的神经元凋亡, 可见缺氧和能量不足所致的细胞凋亡是脑缺血缺氧损伤的重要发病机制。

参考文献

- [1] Roger V L, Go A S, Lloyd-Jones D M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2011 Update: A Report From the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2010, 123(4): e18 - e209.
- [2] Kostandy B B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire[J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(2): 223 - 237.
- [3] Hutchinson P J, O'Connell M T, Al-Rawi P G, et al. Increases in GABA concentrations during cerebral ischaemia: a microdialysis study of extracellular amino acids[J]. *J Neurosurg Psychiatr*, 2002, 72(1): 99 - 105.
- [4] 毛小元, 蔡际群. γ -氨基丁酸转运体与癫痫关系的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009, 36(3): 261 - 264.
- [5] 杨娟. 谷氨酸转运体与癫痫关系的研究进展[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29(4): 377 - 379.
- [6] Jiang J, Amara S G. New views of glutamate transporter structure and function: advances and challenges[J]. *Neuropharmacology*, 2011, 60(1): 172 - 181.
- [7] Watanabe T, Morimoto K, Hirao T, et al. Amygdala-kindled and pentylene-tetrazole-induced seizures in glutamate transporter GLAST-deficient mice[J]. *Brain Res*, 1999, 845(1): 92 - 96.
- [8] Li L, Zuo Z. Glutamate transporter type 3 knockout reduces brain tolerance to focal brain ischemia in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(5): 1283 - 1292.
- [9] 金亦涛, 刘国卿, 唐治华. γ -氨基丁酸转运体研究进展[J]. *国外医学: 生理、病理科学与临床分册*, 2004, 24(1): 8 - 10.
- [10] Bianchi M G, Bardelli D, Chiu M, et al. Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(11): 2001 - 2015.
- [11] 刘青青, 郭虹, 王少峡, 等. 脑缺血损伤机制的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(6): 1228 - 1230.
- [12] Lussier A L, Romay-Tallon R, Caruncho H J, et al. Altered GABAergic and glutamatergic activity within the rat hippocampus and amygdala in rats subjected to repeated corticosterone administration but not restraint stress [J]. *Neuroscience*, 2013, 231: 38 - 48.
- [13] Smith K S, Rudolph U. Anxiety and depression: mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABA (A) receptor subtypes [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(1): 54 - 62.
- [14] 陈魁, 胡风云. 电针水沟穴对全脑缺血昏迷大鼠脑组织谷氨酸转运体-1 γ -氨基丁酸转运体-1的影响[J]. *山西医药杂志: 上半月*, 2013, 42(5): 501 - 503.

(上接第 47 面)

- [2] 王佳蕾, 李进, 秦叔逵, 等. 雷替曲塞或氟尿嘧啶/亚叶酸钙联合奥沙利铂治疗局部晚期或复发转移性结直肠癌的随机对照多中心 III 期临床试验[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(1): 6 - 11.
- [3] Barni S, Ghidini A, Coinu A, et al. A systematic review of raltitrexed-based first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(10): 1122 - 1128.
- [4] Kitao H, Kiyonari S, Iimori M, et al. The molecular aspect of the antitumor effect of oxaliplatin in combination with 5-FU [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2016, 43(6): 707 - 714.
- [5] Caballero-Baños M, Benitez-Ribas D, Tabera J, et al. Phase II randomised trial of autologous tumour lysate dendritic cell plus best supportive care compared with best supportive care in pre-treated advanced colorectal cancer patients[J]. *Eur J Cancer*, 2016, 64: 167 - 174.
- [6] Pilanci K N, Saglam S, Okyar A, et al. Chronomodulated oxaliplatin plus Capecitabine (XELOX) as a first line chemotherapy in metastatic colorectal cancer: A Phase II Brunch regimen study[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 78(1): 143 - 150.
- [7] Kwakman J J, Punt C J. Oral drugs in the treatment of metastatic colorectal cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2016, 17(10): 1351 - 1361.
- [8] 谢达成, 李宁, 王静珏, 等. 雷替曲塞联合伊立替康 2 周方案对比 FOLFIRI 方案二线治疗晚期结直肠癌的疗效观察[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2013, 18(2): 140 - 143.
- [9] Avallone A, Di Gennaro E, Silvestro L, et al. Targeting tyrosinase in colorectal cancer: critical re-evaluation and emerging therapeutic role of raltitrexed[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2014, 13(1): 113 - 129.
- [10] Petrelli F, Coinu A, Ghilardi M, et al. Efficacy of oxaliplatin-based chemotherapy + bevacizumab as first-line treatment for advanced colorectal cancer: a systematic review and pooled analysis of published trials[J]. *Am J Clin Oncol*, 2015, 38(2): 227 - 333.
- [11] Santini D, Massacesi C, D'Angelillo R M, et al. Raltitrexed plus weekly oxaliplatin as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer: a multicenter non-randomized phase II study[J]. *Med Oncol*, 2004, 21(1): 59 - 66.
- [12] Feliu J, Castañón C, Salud A, et al. Phase II I randomised trial of raltitrexed-oxaliplatin vs raltitrexed-irinotecan as first-line treatment in advanced colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(11): 1230 - 1235.
- [13] Gravalos C, Salud A, García-Girón C, et al. A randomized phase II study to compare oxaliplatin plus 5-fluorouracil and leucovorin (FOLFOX4) versus oxaliplatin plus raltitrexed (TOMOX) as first-line chemotherapy for advanced colorectal cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2012, 14(8): 606 - 612.
- [14] 黄雪松, 吕茶, 张兆毅. TNF- α 对外周神经损伤继发性疼痛的影响[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2015, 5: 101 - 102.
- [15] Matikas A, Asimakopoulou N, Georgoulas V, et al. The place of targeted agents in the treatment of elderly patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 7(1): 439 - 449.