

·论著·

全脑缺血再灌注诱导大鼠海马 CA1 区 GluR6 巯基亚硝基化的机制

杨红宁, 吕兰欣, 颜晓庆, 韩 东, 胡书群, 许 铁

(江苏省卫生应急研究所/徐州医学院附属医院急诊医学实验室, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 用大鼠全脑缺血模型探讨全脑缺血再灌注诱导大鼠海马 CA1 区 GluR6 巯基亚硝基化的机制。方法 将 78 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、全脑缺血再灌注组(I/R 组)、给药组(7-NI 组、GSNO 组、SNP 组、NS102 组)及溶剂对照组[生理盐水(Saline)组、DMSO 组],每组 6 只。采用四动脉结扎去结扎法构建大鼠全脑缺血再灌注模型。运用生物素转化法检测蛋白质的巯基亚硝基化,聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫印迹方法对 GluR6 巯基亚硝基化水平进行分析研究。结果 全脑缺血再灌注后,I/R 组 GluR6 巯基亚硝基化水平高于 Sham 组,差异有统计学意义($P<0.05$),7-NI 组 GluR6 巯基亚硝基化水平相比 I/R 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),溶剂 DMSO 组与 I/R 组相比差异无统计学意义($P>0.05$);GSNO 组和 SNP 组 GluR6 巯基亚硝基化水平比 I/R 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),溶剂 Saline 组与 I/R 组相比差异无统计学意义($P>0.05$);NS102 预处理组 GluR6 巯基亚硝基化水平比 I/R 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),溶剂 DMSO 组与 I/R 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 7-NI、GSNO、SNP 和 NS102 都能抑制脑缺血再灌注诱导的 GluR6 巯基亚硝基化。nNOS 介导产生的内源性 NO 介导全脑缺血再灌注诱导的大鼠海马 CA1 区 GluR6 巯基亚硝基化,并受外源性 NO 影响;全脑缺血再灌注通过激活 KA 受体诱导大鼠海马 CA1 区 GluR6 发生巯基亚硝基化。

关键词:谷氨酸受体 6 亚基;巯基亚硝基化;全脑缺血再灌注

中图分类号:R364.1+2;Q71

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.18.017

文章编号:1006-1959(2019)18-0051-04

Mechanism of Nitrosation of GluR6 Thiol in Rat Hippocampal CA1 Region Induced by Global Cerebral Ischemia-reperfusion

YANG Hong-ning, LYU Lan-xin, YAN Xiao-qing, HAN Dong, HU Shu-qun, XU Tie

(Jiangsu Provincial Health Emergency Research Institute/Emergency Medical Laboratory,

Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of GluR6 thiol nitrosylation in rat hippocampal CA1 region induced by global cerebral ischemia-reperfusion in a rat model of global cerebral ischemia. Methods 78 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), global cerebral ischemia-reperfusion group (I/R group), and drug-administered group (7-NI group, GSNO group, SNP group, NS102 group). And the solvent control group [saline group, DMSO group], 6 in each group. A rat model of global cerebral ischemia-reperfusion was established by four-arterial ligation and ligation. The biotin-transformation method was used to detect the sulfhydryl nitrosylation of proteins, and the phosphination level of GluR6 thiol was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. Results After global cerebral ischemia-reperfusion, the level of GluR6 thiol nitrosylation in the I/R group was higher than that in the Sham group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The level of GluR6 thiol nitrosylation in 7-NI group was significantly lower than that in I/R group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Solvent DMSO group and I/R group There was no significant difference between the two groups ($P>0.05$). The nitrosation level of GluR6 in the GSNO group and the SNP group was significantly lower than that in the I/R group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference between the Saline group and the I/R group ($P>0.05$). The GluR6 sulfhydryl nitrosylation level in the NS102 pretreatment group was significantly lower than that in the I/R group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference between the solvent DMSO group and the I/R group ($P>0.05$). Conclusion 7-NI, GSNO, SNP and NS102 can inhibit GluR6 sulfhydryl nitrosylation induced by cerebral ischemia-reperfusion. nNOS-mediated endogenous NO mediates GluR6 sulfhydryl nitrosylation in rat hippocampal CA1 region induced by global cerebral ischemia-reperfusion and is affected by exogenous NO; global cerebral ischemia-reperfusion activates KA receptor Induction of thiol nitrosylation of GluR6 in the hippocampal CA1 region of rats.

Key words: Glutamate receptor 6 subunit; Sulfhydryl nitrosylation; Global cerebral ischemia reperfusion

脑缺血/复灌的早期神经元损伤研究中,神经细胞内的神经性一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,

nNOS)活性增强,产生大量内源性 NO,能够对神经细胞产生损伤作用^[1],给予外源性 NO 能发挥对损伤机体的保护作用^[2]。有文献报道在癫痫模型中,KA 注射通过激活 KA 受体诱导蛋白质的亚硝基化^[3,4]。本实验假设脑缺血再灌注诱导 GluR6 巯基亚硝基化是由 nNOS 产生的 NO 参与作用,GluR6 巯基亚硝基化与 KA 受体通道的活化密切相关。本实验采用注射 KA 受体抑制剂 NS102、nNOS 抑制剂 7-NI,外源性 NO 供体 GSNO 和 SNP 来探讨 GluR6 巯基

基金项目:1.国家自然科学基金青年项目(编号:31800810);2.江苏省自然科学基金青年项目(编号:BK20180998);3.江苏省重点研发计划(社会发展)项目资助(编号:BE2016645, BE2017641);4.江苏省自然科学基金面上项目资助(编号:BK20161153)

作者简介:杨红宁(1984.5-),女,山东威海人,硕士,实验师,主要从事生物化学与分子生物学方向的研究

通讯作者:许铁(1958.12-),男,江苏徐州人,硕士,教授,博士生导师,主要从事急诊医学方向的研究

亚硝基化受体机制以及外源性 NO 和内源性 NO 在全脑缺血再灌注诱导 GluR6 巯基亚硝基化机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂与器材 7-NI、GSNO、NS102 购自 Sigma 公司; SNP 购自徐州市中心医院; GluR6 抗体购自 Millipore 公司, 其它试剂为国产分析纯。电动匀浆器购自美国 Glas-Col 公司; 全波长酶标仪购自美国 Molecular Device 公司; 蛋白电泳及电转移装置购自美国 Bio-Rad 公司; 图象处理仪购自美国 Gene 公司; 大鼠脑立体定位仪购自美国 STOLTING 公司。

1.2 实验动物 雄性成年 SPF 级 SD 大鼠 78 只, 体重 250~300 g, 由徐州医科大学实验动物中心提供 SCXK (苏)2015-0009, 通过了徐州医科大学动物实验伦理审查, 遵照动物福利进行实验, 饲养温度 20~25℃, 湿度 40%~70%。实验中动物自由摄食、饮水, 1 周换 1~2 次垫料。SD 大鼠按照随机数字表法分为 Sham 组、I/R 组、给药组(7-NI 组, GSNO 组, SNP 组, NS102 组)和溶剂对照组(DMSO 组, Saline 组), 每组 6 只。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型及样品制备 采用四动脉结扎法制备大鼠全脑缺血再灌注模型, 使用 20%水合氯醛(300~350 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 分离双侧颈总动脉, 电凝椎动脉。手术第 2 天动物于清醒状态下结扎双侧颈总动脉, 全脑缺血 15 min。Sham 组只行颅部手术的皮肤切口, 然后缝合。NS102 组(20 mmol/10 μ l 溶于 DMSO, 于缺血前 20 min 侧脑室注射), GSNO 组(GSNO 溶于生理盐水, 0.1 mg/kg 于缺血前 20 min 侧脑室注射), SNP 组(SNP 溶解于生理盐水, 5 mg/kg 分别于缺血前 30 min、缺血后 40 min 和 130 min 腹腔注射, 即每两次给药之间相隔 90 min), 7-NI 组(7-NI 溶解于 1% DMSO, 25 mg/kg 于缺血前 20 min 腹腔注射)。溶剂对照组注射等量溶剂 Saline 或 DMSO。全脑缺血复灌注后, 断头取脑, 分离双侧海马 CA1 区, 加匀浆缓冲液后匀浆离心取上清液, 用 BCA 微量法测定蛋白浓度。

1.3.2 蛋白质巯基亚硝基化测定 生物素转化法(Biotin-Switch method)测定蛋白亚硝基化^[8]: 用 HEN 液(250 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.7, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L 新亚铜试剂)匀浆, 1000 g 4℃离心 10 min, 取上清; 测蛋白并计算浓度, 转为统一浓度 0.8 mg/ml, 每次取 0.8 mg 分装蛋白, 用 HEN 液补充至 1 ml; 向分装的蛋白中加 10% CHAPS 至终浓度为 0.4%, 再加 4 倍体积封闭液(9 体积 HEN 液和 1 体积 25% SDS 的混合液将 MMTS 稀释 10 倍), 置于 50℃ 20 min, 不断摇匀; 加 2 倍体积冰丙酮放入 -20℃, 20 min 到 30 min 后 2000 g 4℃离心 10 min, 弃上清; 加 HENS 液(HEPES: 250 mmol/L, pH 7.7, EDTA: 1 mmol/L, 0.1 mmol/L

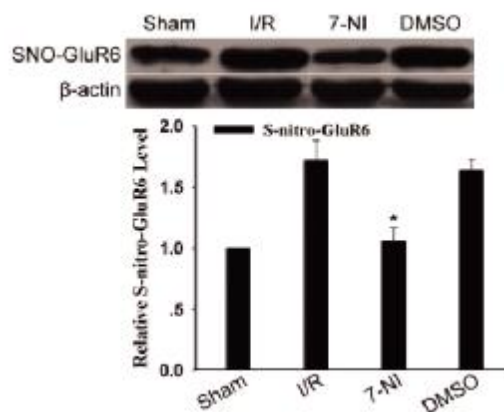
新亚铜试剂, 1% SDS) 0.1 ml/mg 重悬, 转入 EP 管中, 加生物素(Biotin-HPTP) 4 mmol/L, 即 labeling solution, 体积为重悬液的 1/3, 再加 Vc 溶液(Ascorbate solution), 体积为重悬液的 1/5, 25℃水浴 1 h; 加 2 倍体积冰丙酮放入 -20℃ 20 min, 2000 g 4℃离心 10 min, 弃上清; 加 HENS 液, 0.1 ml/mg, 重悬, 加 2 倍体积中和液(20 mM HEPES-NaOH, pH 7.7, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% TritonX-100), 再加 15 μ l/mg 亚硝基化琼脂糖凝珠(Streptavidin-Agarose), 冷库旋转混匀 1 h; 每管加 0.5~0.6 ml (600 mM NaCl) 中和液洗 5 次, 800 g \times 1 min, 4℃离心; 用洗脱液(20 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.7, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA 和 100 mmol/L 2-巯基乙醇)加 4 倍蛋白上样缓冲液(sample buffer), 混匀煮沸 5 min, 冷却待用。

1.3.3 免疫印迹 等量蛋白样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 以湿转法电转移至 NC 膜上。转移后的 NC 膜经 3% BSA 封闭后加入稀释好的一抗, 4℃过夜, 洗膜后加入相应的二抗, 37℃反应 2 h, 洗膜, 曝光法显色, 结果以图像处理仪(Gene Company)分析处理, 并以 LabWorks 软件分析处理, 各条带的吸光值(OD 值)以同一张膜上假手术组的倍数表示。

1.4 统计学方法 用于分析统计的软件有 Excel, Sigma STAT 32, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。分析采用单因素方差分析(ANOVA), 多个实验组与一个对照组比较采用最小显著差法(LSD), 实验组间比较采用 q 检验(Newman-keuls test), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

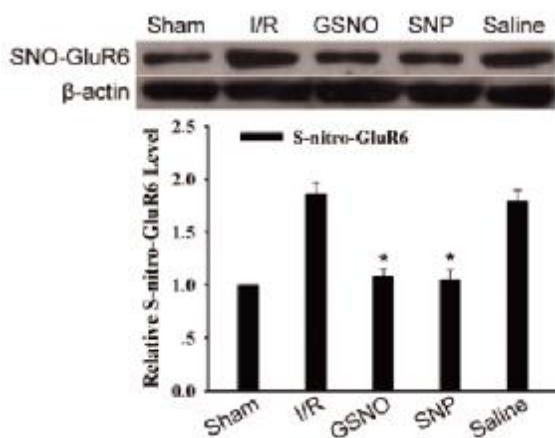
2.1 内源性 NO 介导 GluR6 巯基亚硝基化 用 nNOS 抑制剂 7-NI 在大鼠全脑缺血再灌注前预处理, 结果见图 1, 全脑缺血再灌注后, I/R 组 GluR6 巯基亚硝基化水平比 Sham 组高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 7-NI 组 GluR6 巯基亚硝基化水平相比 I/R 组明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 溶剂 DMSO 组与 I/R 组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注: *表示与 I/R 组相比, $P < 0.05$

图 1 GluR6 巯基亚硝基化水平电泳图

2.2 外源性 NO 抑制 GluR6 巯基亚硝基化 在全脑缺血再灌注之前分别给予外源性 NO 供体 GSNO 和 SNP,结果见图 2,GSNO 组和 SNP 组 GluR6 巯基亚硝基化水平比 I/R 组明显降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$);溶剂 Saline 组与 I/R 组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注:*表示与 I/R 组相比, $P<0.05$

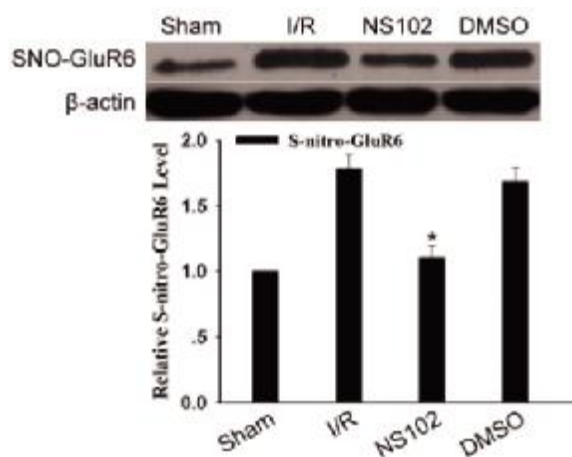
图 2 GluR6 巯基亚硝基化水平电泳图

3 讨论

一氧化氮(NO)是一种脂溶性,可扩散的小分子气体信号分子,化学结构简单,却能以相对特异的方式控制神经元的生理或其他功能,参与脑内多项生理功能。早期研究表明 NO 对细胞内生物活动的调节主要通过 NO/cGMP 途径,即 NO 诱导 cGMP 的产生,进而调节蛋白激酶 G 的活性,影响生物体的活动^[6]。近来文献表明,NO 通过蛋白质巯基亚硝基化的机制来发挥作用,即 NO 结合到蛋白质的巯基上以一种不依赖于可溶性鸟氨酸环化酶活化的方式调节蛋白质的功能。蛋白质巯基亚硝基化修饰是一种可逆的蛋白质转录后修饰,通过亚硝基与蛋白质半胱氨酸巯基共价结合,来调节许多靶蛋白酶、转录因子、离子通道^[7,8],在调节生理和病理情况下的蛋白酶活性中起着重要的作用,能够调节不同的信号转导通路进而影响许多细胞的功能。蛋白质的亚硝基化/去亚硝基化可以影响到蛋白质的活性、稳定性^[9]。酶原的降解、酶的活性位点的暴露、功能蛋白活性位点的修饰都可以与亚硝基化修饰有关。越来越多的数据表明 NO 能够调节蛋白质巯基的亚硝基化修饰,即在电子受体的存在下可以与蛋白质巯基发生反应,形成巯基-亚硝基化蛋白(SNO 蛋白)来影响蛋白质的功能与活性^[7,9]。脑缺血再灌注能够诱导蛋白质发生巯基亚硝基化,但是其机制尚不明确。

脑缺血再灌注损伤的发病机制假说包括钙超载,谷氨酸兴奋毒及氧自由基学说。谷氨酸受体分为代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate recep-

2.3 NS102 抑制 GluR6 巯基亚硝基化 在全脑缺血再灌注前侧脑室注射 KA 受体抑制剂 NS102,结果见图 3,NS102 预处理组 GluR6 巯基亚硝基化水平比 I/R 组明显降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$);溶剂 DM-SO 组与 I/R 组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注:*表示与 I/R 组相比 $P<0.05$

图 3 GluR6 巯基亚硝基化水平电泳图

tors, mGluRs)和离子型谷氨酸受体 (ionotropic glutamate receptors, iGluRs)。谷氨酸诱导的兴奋性毒性,主要和谷氨酸的过量释放以及由此引起的 Ca^{2+} 内流有关。iGluRs 根据其所首选的配体不同可分为 NMDA 受体、AMPA 受体和 KA 受体。其中 KA 受体是由 GluR5、GluR6、GluR7、KA1 和 KA2 五种亚基自由组合构成的四聚体受体分子。本研究主要采用大鼠四动脉结扎去结扎法制作全脑缺血再灌注模型,在全脑缺血前分别注射 nNOS 抑制剂 7-NI, 2 种典型的外源性 NO 供体: S-亚硝基谷胱甘肽 (GSNO) 和硝普钠 (SNP), 外源性 NO 供体 GSNO 和 SNP, KA 受体抑制剂 NS102 来观察它们对全脑缺血再灌注诱导的 GluR6 巯基亚硝基化亚硝基化的作用。

KA 受体被认为是调节神经递质释放的主要参与者,谷氨酸突触后作用的主要调节者。有研究显示^[3],在 KA 致使大鼠癫痫发作模型中,经侧脑室途径注射 $0.6 \mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 的 KA,仅单纯激活 KA 受体作用。前期研究也证明腹腔给予大鼠一定剂量海人藻酸可以使海马 CA1、CA3/DG 区 GluR6-PSD95-MLK3 信号模块组装增强,激活了 JNK3 下游信号通路,最终导致神经元死亡^[10]。因此,在全脑缺血再灌注模型中可能也是激活 KA 受体使大鼠海马 CA1 区 GluR6 发生巯基亚硝基化,本实验选择用 KA 受体抑制剂 NS102 预处理大鼠,来观察全脑缺血再灌注是否激活 KA 受体诱导大鼠海马 CA1 区 GluR6 发生巯基亚硝基化。

NO 根据来源可以分为外源性和内源性两种。

在生物体内催化 NO 合成的酶是 NOS, 体内 NO 的生物作用完全依赖于 NOS 的活性。在神经元中主要表达 nNOS, 介导神经元的早期损伤^[1]。近年来的一些研究提示内源性 NO 和外源性 NO 均能使蛋白质的半胱氨酸残基发生巯基亚硝基化反应。有文献报道^[4], 外源性 NO 能发挥对损伤机体的保护作用。

本实验尝试采用 nNOS 的特异性抑制剂 7-NI、外源性 NO 供体 GSNO 和 SNP、KA 受体抑制剂 NS102 来检测是否能够抑制 GluR6 巯基亚硝基化, 探讨 GluR6 巯基亚硝基化的诱导机制及受体机制, 结果显示, 全脑缺血再灌注后, I/R 组 GluR6 巯基亚硝基化水平比 Sham 组高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 7-NI 组 GluR6 巯基亚硝基化水平相比 I/R 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 溶剂 DMSO 组与 I/R 组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); GSNO 组和 SNP 组 GluR6 巯基亚硝基化水平比 I/R 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 溶剂 Saline 组与 I/R 组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$); NS102 预处理组 GluR6 巯基亚硝基化水平比 I/R 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 溶剂 DMSO 组与 I/R 组相比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。说明 7-NI、GSNO 和 SNP、NS102 均可以抑制 GluR6 巯基亚硝基化, 因此, 全脑缺血再灌注后, 内源性 NO 通过激活 KA 受体诱导海马 CA1 区的 GluR6 巯基亚硝基化, 外源性 NO 抑制 GluR6 巯基亚硝基化。

本实验初步揭示了 GluR6 巯基亚硝基化的诱导机制和受体机制, 为后续研究 GluR6 巯基亚硝基化对下游神经通路的影响以及神经元损伤提供了基础, 也为研究卒中疾病的作用机制提供了新的理论基础。

参考文献:

[1] Almeida J, Oliveira LA, Benini R, et al. Differential roles of hippocampal nNOS and iNOS in the control of baroreflex function

in conscious rats[J]. Brain Res, 2019(1710):109-116.

[2] Rychter M, Gaucher C, Boudier A, et al. S-nitrosothiols-NO donors regulating cardiovascular cell proliferation: Insight into intracellular pathway alterations[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016(78):156-161.

[3] Yang H, Zhao N, Lv L, et al. Functional research and molecular mechanism of Kainic acid-induced denitrosylation of thioredoxin-1 in rat hippocampus[J]. Neurochem Int, 2017(108):448-456.

[4] Zhang D, Zhao N, Ma B, et al. Procaspase-9 induces its cleavage by transnitrosylating XIAP via the Thioredoxin system during cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Sci Rep, 2016 (6):24203.

[5] Forrester MT, Foster MW, Benhar M, et al. Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(2):119-126.

[6] Cardenas AJ, Abelman R, Warren TH. Conversion of nitrite to nitric oxide at zinc via S-nitrosothiols[J]. Chem Commun(Camb), 2014, 50(2):168-170.

[7] Diers AR, Keszler A, Hogg N. Detection of S-nitrosothiols[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(2):892-900.

[8] Zhou Y, Tan J, Dai Y, et al. Synthesis and nitric oxide releasing properties of novel fluoro S-nitrosothiols[J]. Chem Commun(Camb), 2019, 55(3):401-404.

[9] Wobst J, Schunkert H, Kessler T. Genetic alterations in the NO-cGMP pathway and cardiovascular risk[J]. Nitric Oxide, 2018 (76):105-112.

[10] Wu X, Li L, Zhang L, et al. Inhibition of thioredoxin-1 with siRNA exacerbates apoptosis by activating the ASK1-JNK/p38 pathway in brain of a stroke model rats[J]. Brain Res, 2015(1599):20-31.

[11] Lewis S, Little R, Baudoin F, et al. Acute inhibition of PM-CA4, but not global ablation, reduces blood pressure and arterial contractility via a nNOS-dependent mechanism [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(2):861-872.

收稿日期: 2019-7-29; 修回日期: 2019-8-10

编辑/肖婷婷