

# 梭曼中毒后不同时间大鼠海马 N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位 NR2A/NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体表达的变化

宋尚华<sup>1</sup>, 骆媛<sup>2</sup>, 李万华<sup>2</sup>, 隋昕<sup>2</sup>, 王永安<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军总医院, 北京 100853; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所  
军事毒理与生化药理研究室, 北京 100850)

**摘要:**目的 观察梭曼染毒大鼠海马组织 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体亚单位 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体在中毒后不同时间 mRNA 与蛋白表达的变化。方法 大鼠先 ip 给予 HI-6 125 mg·kg<sup>-1</sup> 一次性 sc 给予梭曼 160  $\mu$ g·kg<sup>-1</sup>, 采用 HE 染色及 TUNEL 染色观察中毒后不同时间大脑海马组织病理损伤及神经元细胞凋亡; 实时荧光定量 PCR 及 Western 印迹法测定海马组织中 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体在梭曼染毒后 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h 及 7 d 的表达变化。结果 组织病理学检查结果显示, 在梭曼染毒后 1 h 出现明显的细胞损伤, 在染毒后 24 h 细胞损伤最为严重; TUNEL 染色显示, 在染毒后 6 h 出现明显细胞凋亡, 在染毒后 24 h 凋亡最为严重。染毒后 2 h, 与正常对照组比较, NR2A 及 NR2B 蛋白表达均显著上调, 但 GABA $\alpha$ 1 受体到染毒后 24 h 才出现表达明显增加。梭曼染毒后 2~6 h, 与正常对照组比较, 海马 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体 mRNA 表达显著上调, 染毒后 24~48 h, NR2A 及 NR2B 受体 mRNA 出现不同程度降低, 至染毒后 7 d 恢复正常水平。结论 梭曼染毒后期, 出现 NMDA 受体亚单位 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体 mRNA 及蛋白表达异常; 该表达异常可能与海马神经细胞损伤及凋亡存在一定关系。

**关键词:** 梭曼; 惊厥; 受体, N-甲基-D-天冬氨酸; 受体, GABA; 脑损伤

中图分类号: R994.7 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)03-0328-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.03.004

神经性毒剂梭曼中毒后, 可导致惊厥发生。惊厥发生后, 如不及时控制, 持续发作的惊厥可迅速发展成难治性癫痫, 进而引发中枢神经系统明显病理学改变<sup>[1-2]</sup>。关于梭曼所致惊厥后期及其引发迟发性中枢神经系统损伤发生机制, 目前尚未阐明。但药理学研究结果已经证实, 一些特异性作用于中枢 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体药物如地佐环平 (dizocilpine, MK-801) 和加环立定 (gacyclidine, GK-11) 等, 以及中枢  $\gamma$ -氨基丁酸  $\alpha$ 1 ( $\gamma$ -aminobutyric acid  $\alpha$ 1, GABA $\alpha$ 1) 受体功能调节剂地西洋, 在惊厥发作后期 (惊厥发作后 40 min), 均可发挥一定抗惊厥及神经

保护作用<sup>[3-5]</sup>, 因而提示, NMDA 及 GABA 受体与惊厥发生及由此引发的脑损伤存在密切关系。但上述两类受体及其主要亚型在惊厥后期表达变化, 国内外至今尚无明确研究结果。基于此, 本研究选择了 NMDA 两种主要受体亚型 NR2A 及 NR2B, 以及 GABA 主要受体亚型 GABA $\alpha$ 1 作为研究对象, 在梭曼所致惊厥大鼠上, 观察了惊厥动物海马内 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体 mRNA 及蛋白在惊厥发作后不同时间表达变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

Trizol, 购自美国 Invitrogen 公司; 梭曼, 北京防化学院, 纯度 > 95%; 乙酰胆碱酯酶重活化剂 HI-6, 本所合成; Prime Script<sup>®</sup> RT reagent Kit, gDNA Eraser 及 SYBRPremix Ex Taq<sup>™</sup> 均由美国 TaKaRa 公司提供; 抗 NR2A 单克隆抗体由美国 Abcam 公司提供; 抗 NR2B 单克隆抗体及抗 GABA $\alpha$ 1R 单克隆抗体均由美国 Millipore 公司提供;  $\beta$  肌动蛋白单克隆抗体由美国 Santa Cruz 公司提供; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠

**基金项目:** 国家科技重大专项 (2011ZXJ09102-05C); 军队医学科技“十二·五”重大专项 (AWS11C004); 军队医学科技“十二·五”重点项目 (BWS12J042)

**作者简介:** 宋尚华 (1987 -), 女, 硕士研究生, 主要从事药理毒理学研究, E-mail: songshanghua1987@126.com; 王永安 (1973 -), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事药理毒理学研究。

**通讯作者:** 王永安, E-mail: yonganw@sina.com, Tel: (010)66874607

二抗均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

实时荧光定量 PCR 仪、PCR 扩增仪、垂直板电泳槽、Model 4001P 稳压稳流电泳仪及半干电转仪均由美国的 Bio-Rad 提供。

## 1.2 动物及染毒

SPF 级,健康 Sprague-Dawley 大鼠,雄性,体质量 240~270 g,由北京维通利华动物实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2006-0009。将大鼠随机分组为正常对照组( $n=8$ )和 ip 给予 HI-6 125 mg·kg<sup>-1</sup> 30 min 后大鼠后肢 sc 给予梭曼 160 μg·kg<sup>-1</sup>组( $n=8$ ),分别于染毒后 30 min,1,2,6,24,48 h 及 7 d 每组取 8 只大鼠进行指标检测。

## 1.3 行为学观察及脑电波的记录

大鼠称质量后 ip 给予 20%乌拉坦 800 mg·kg<sup>-1</sup>麻醉,将其固定于大鼠脑立体定位仪上,去头部皮肤,手术刀剥离颅骨外骨膜,范围自大鼠两眼眶之间至人字缝后 2 mm。在两侧皮质及海马处钻孔,将自制的外层绝缘电极(康铜丝)置于皮质(AP 2.2 mm, L 4.1 mm, V 8.2 mm)及海马(AP 3.8 mm, L 3.5 mm, V 3.7 mm)内,无关电极置于两眼间,以牙托粉固定。埋藏好电极的动物置于不同笼内,饲养 7~9 d 后用于实验。

将埋藏好电极的动物称质量,按照 1.2 进行分组处理,以行为学及电生理学为评价指标,观察 SD 大鼠在染毒后 6 h 内行为学及脑电图的改变。Racine 分级 V 级,脑电图上出现高幅高频惊厥波即为惊厥发作。

## 1.4 苏木素-伊红(HE)染色观察海马 CA1 区在梭曼染毒后不同时间的病理改变

每组各取 3 只完整大脑于 4% 甲醛中,至少固定 24 h。视交叉处冠状面切片,二甲苯洗 2 次,每次 5~10 min,95%乙醇洗 2 次,每次 3 min,80%乙醇 1 min,蒸馏水 1 min,苏木素液染色 12 min,随后用流水稍洗去苏木素液 1~3 s,1%盐酸乙醇 1~3 s,稍水洗 20 s,促蓝液返蓝 15 s,流水冲洗 15 min,蒸馏水冲洗 2 s,0.5%苏红染色 2 min,蒸馏水稍洗 2 s,80%乙醇稍洗 1~2 s,95%乙醇洗 2 次,每次 3 min,无水乙醇 10 min,二甲苯 3 次,每次 3 min,用滴加中性树脂的盖玻片封片,通风橱内吹干,光学显微镜下观察组织病理学变化并照相。

## 1.5 dUTP 缺口末端标记染色观察海马 CA1 区在梭曼染毒后不同时间的凋亡变化

采用 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)染色检测梭曼致惊后海马神经元细胞的凋亡。具体操作步骤如下:①先用多聚赖氨酸或 APES 处理玻片;②石蜡包埋的切片常规脱蜡至水;③蛋白酶 K 消化膜

蛋白及核蛋白,室温孵育 20 min,PBS 洗 3 次;④加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,37℃孵育 10 min,消除内源性过氧化物酶活性;⑤加入 TUNEL。反应液,湿盒中 37℃孵育 60 min,PBS 洗 3 次;⑥加入辣根过氧化物酶抗体,孵育 30 min,PBS 洗 3 次;⑦加入 DAB 溶液显色 10 min;⑧苏木精复染,常规脱水、透明、中性树脂封片。最终采用 Image Pro-plus5.1 及 Infinity capture 6.0 对细胞凋亡个数进行统计。

## 1.6 Western 印迹法测定海马组织内 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体蛋白表达

各组取大鼠海马组织约 100 mg,加入蛋白裂解液 1 ml,冰上超声破碎,4℃,12 000 ×g 离心 15 min,制备组织蛋白匀浆液,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白 BCA 定量后,通过 5% 浓缩胶及 12% 分离胶进行浓缩与分离。分离后转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上(60 min,恒流 0.06 A),此后 5% 脱脂牛奶室温震荡 2~3 h。取出 PVDF 膜,加入一抗(GABA $\alpha$ 1R 1:3000; NR2A 1:1000; NR2B 1:500),4℃过夜孵育。TBST 常温震荡清洗 6 min,加二抗(辣根酶标记山羊抗小鼠、兔 IgG 1:2000)室温震荡 1 h,用 TBST 常温震荡清洗 6 min。化学发光、显影、定影、曝光、洗片。胶片扫描后,用 Quantity One 图像分析软件对结果进行积分吸光度分析,以 $\beta$ 肌动蛋白为内标,计算目的蛋白的相对表达量。

## 1.7 实时荧光定量 PCR 法测定海马组织 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体 mRNA 表达

梭曼染毒后不同时间点处死动物,分离出海马,并于 -80℃ 保存。用 Trizol 提取法对组织总 RNA 进行提取,并将提取得到的 RNA 进行逆转录,最终得到 cDNA,置于 -20℃ 保存。扩增引物设计如表 1 所示。基因表达检测采用 SYBR green 荧光标记法,扩增过程采取两步法:NR2A, NR2B, GABA $\alpha$ 1 R:95℃30s→(95℃10s→60℃30s) ×

Tab. 1 Primer sequences of genes sequences in real time-PCR

Gene	Primer	Length/bp
NR2A	F: 5'-ACTCGGGAGGAGGTCTAC-3'	94
	R: 5'-CATAGGAGTGCTGTCGGT-3'	
NR2B	F: 5'-TGTACCAACAGGTCTCACCTCAA-3'	61
	R: 5'-CGCCTACCACTCCGTGCTT-3'	
GABA $\alpha$ 1R	F: 5'-GCGACCATAGAACCAGAAAG-3'	129
	R: 5'-AGACAGAGGCAGTAAAGCAGAC-3'	
$\beta$ -Actin	F: 5'-GGGAAATCGTGCCTGACATT-3'	76
	R: 5'-GCGGCAGTGGCCATCTC-3'	

NR: N-methyl-D-aspartate receptor subunit.

40→65℃ 5 s→95℃ 5 s。以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示目的基因的表达水平。

### 1.8 统计学分析

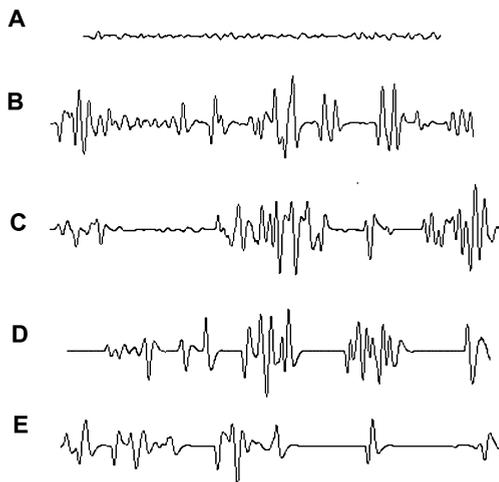
实验结果数据结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 GraphPad Prism 5 进行数据分析,两组间资料比较采用完全随机设计资料单因素 *t* 检验;计量资料经过正态性检验和方差齐性检验, $P < 0.05$  为有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 梭曼染毒大鼠行为及脑电图变化

梭曼染毒后 2~5 min,大鼠首先出现 3~5 s 的无意识咀嚼,咀嚼声音清晰可见,并逐渐由间断性发展为持续性,在无意识咀嚼后不久便出现点头运动及全身性轻微抽搐,后经过 10~15 min 的惊厥潜伏期后,大鼠全身呈僵直状,管状尾,站立不稳,达到 Racine 分级 IV~V 级,并且持续长达 1~3 h,后惊厥症状减轻,但仍达到 III~IV 级的惊厥水平,直到染毒后 6 h 仍明显存在。

与行为表现相吻合的是,中毒大鼠脑电图在梭曼染毒后 30 min~1 h 开始出现明显的紧张性放电,其特点为高幅高频的棘状脑电波;至染毒后 6 h,脑电波幅度频度明显减弱,表现为间断性放电;至染毒后 24 h,仍存在间断性的紧张性放电(图 1)。



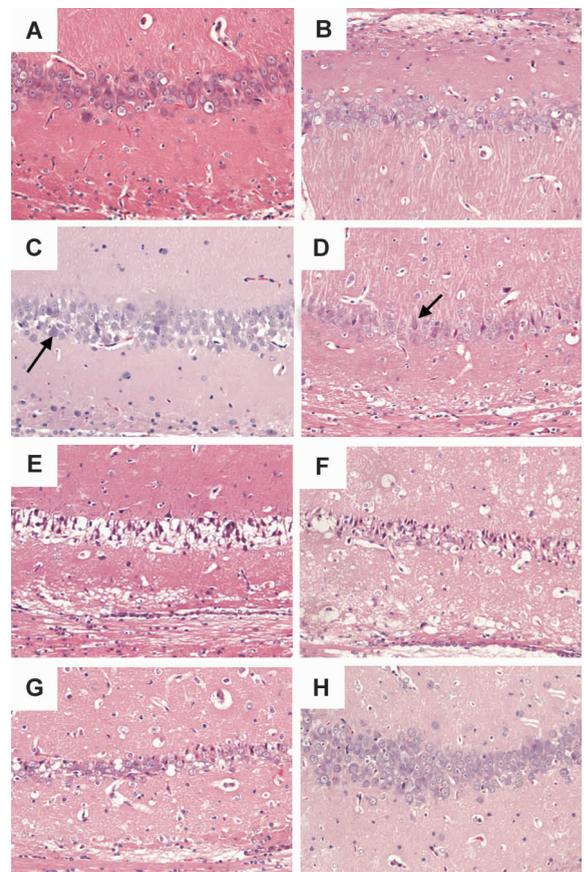
**Fig. 1** Change of EEG at different time points following exposure to soman. Rats were sc given soman  $160 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  30 min later after HI-6  $125 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ip given. EEG was recorded on 0 (A), 30 min (B), 1 h (C), 6 h (D) and 24 h (E) after soman exposure.

### 2.2 梭曼染毒大鼠海马 CA1 区组织病理变化

#### 2.2.1 HE 染色

如图 2 所示,正常海马 CA1 区可见大量致密的

锥体细胞及颗粒细胞,细胞排列整齐、均匀分布,形态完整,核质清晰(图 2A)。梭曼中毒后 1 h,细胞出现明显损伤,表现为细胞体积明显减小,核分叶固缩,细胞排列紊乱,轮廓模糊界限不清,胞质与胞核凝结在一起,出现暗细胞(dark neurons)(图 2C);此后,随着中毒时间的延长,细胞损伤进一步加重,至中毒后 6 h,组织损伤最为严重,表现为神经元细胞大量坏死,出现大量空泡,细胞层数减少,几乎看不到正常的细胞,同时纤维结构角质化(图 2F);中毒后 48 h 损伤有所缓解,可见胶质细胞的增生和神经元再生(图 2G);至中毒后 7 d,仍存在明显细胞损伤(图 2H)。

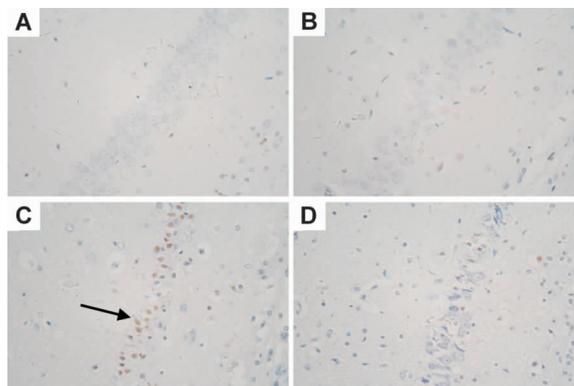


**Fig. 2** Pathological changes of rat CA1 of hippocampus at different time points after soman exposure (HE  $\times 200$ ). See Fig. 1 for rat treatment. A, normal control group; B-H: 0.5, 1, 2, 6, 24, 48 and 7 d after soman exposure. Arrows show dark neurons.

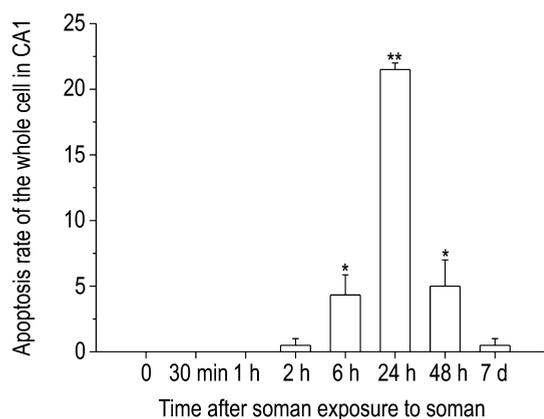
#### 2.2.2 TUNEL 染色

对染毒后不同时间点海马 CA1 区总细胞进行 TUNEL 染色(图 3)后,镜下观察发现 CA1 区神经元在梭曼染毒后 6 h 就出现明显凋亡,表现为细胞结构模糊,黄褐色凋亡小体出现(图 3B),染毒后 24 h 时凋亡最严重(图 3C),染毒后 48 h 时凋亡仍明显存在(图 3D)。定量数据显示(图 4),与正常对

照组比较,染毒后 6 h 时海马 CA1 区出现明显细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ),染毒后 24 h 达到高峰 ( $P < 0.01$ ),随后细胞凋亡有所改善,但染毒后 48h 时凋亡仍明显存在 ( $P < 0.05$ )。



**Fig. 3 Apoptosis in CA1 of hippocampus at different time points after soman exposure (TUNEL  $\times 400$ ).** See Fig. 1 for the treatment. A. normal control group; B-H: 6, 24, 48 h following exposure to soman. The arrow directs to apoptotic body.



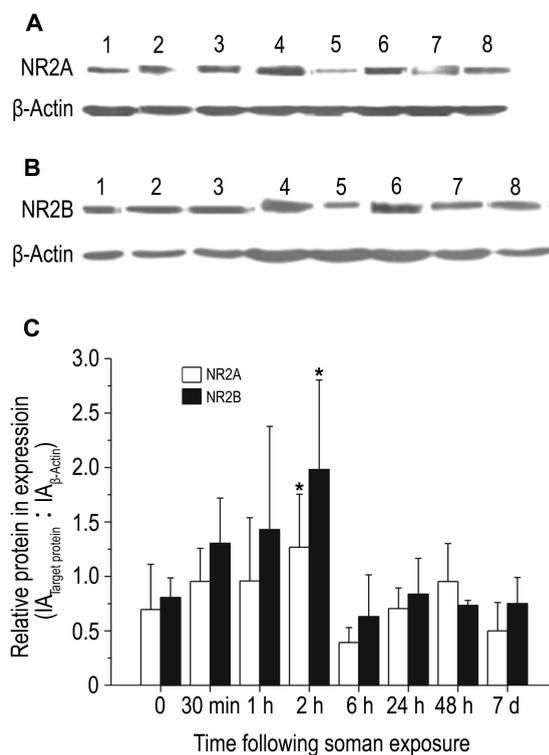
**Fig. 4 Apoptosis rate of whole cells in rat CA1 of hippocampus at different time points after soman exposure.** See Fig. 1 for rats treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group.

### 2.3 梭曼染毒后不同时间大鼠海马 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体蛋白在表达变化

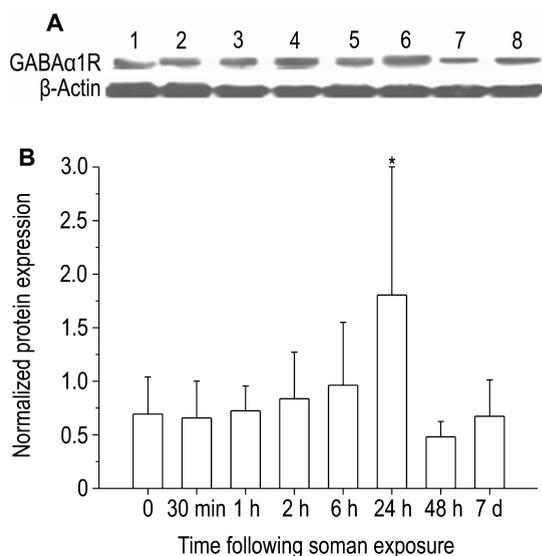
如图 5 和图 6 所示,与正常对照组相比, NR2A 及 NR2B 蛋白在染毒后 2 h 即表达明显增加 ( $P < 0.05$ ),但 GABA $\alpha$ 1 受体蛋白至染毒后 24h 才出现明显表达上调 ( $P < 0.05$ )。在出现明显表达上调后的时间段内, NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体蛋白总体表达呈降低趋势,但与正常对照组比较并无统计学差异。

### 2.4 梭曼染毒后不同时间大鼠海马 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体 mRNA 表达变化

如表 2 所示,与正常对照组相比,海马



**Fig. 5 Protein expression of NR2A/2B in hippocampus at different time points after soman exposure by Western blotting.** See Fig. 1 for the treatment. C was the semiquantitative result of A and B. Lane 1. normal control group; lane 2-8: 0.5, 1, 2, 6, 24, 48 and 7 d following exposure to soman.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6-8$ . \*  $P < 0.05$ , compared with normal control group.



**Fig. 6 Protein expression of GABA $\alpha$ 1 receptor in the hippocampus at different time points after soman exposure by Western blotting.** See Fig. 1 for rats treatment. B was the semiquantitative result of A. Lane 1. normal control group; lane 2-8: 0.5, 1, 2, 6, 24, 48 and 7 d following exposure to soman.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6-8$ . \*  $P < 0.05$ , compared with normal control group.

**Tab.2 mRNA expression of NR2A/2B and GABA $\alpha$ 1 receptor in hippocampus at different time points after soman exposure**

Time after exposure	mRNA expression( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )		
	NR2A	NR2B	GABA $\alpha$ 1R
0 min	1.44 $\pm$ 0.32	1.02 $\pm$ 0.30	0.68 $\pm$ 0.11
0.5 h	1.54 $\pm$ 0.47	1.31 $\pm$ 0.56	0.84 $\pm$ 0.14
1 h	1.54 $\pm$ 0.64	1.40 $\pm$ 0.49	0.89 $\pm$ 0.25
2 h	1.89 $\pm$ 0.66 **	1.40 $\pm$ 0.71	0.88 $\pm$ 0.17 *
6 h	1.57 $\pm$ 0.19	1.42 $\pm$ 0.44 *	0.71 $\pm$ 0.16
24 h	0.61 $\pm$ 0.27 **	0.64 $\pm$ 0.28 *	0.51 $\pm$ 0.24
48 h	0.38 $\pm$ 0.17 **	0.38 $\pm$ 0.24 *	0.24 $\pm$ 0.06 **
7 d	1.01 $\pm$ 0.52	1.13 $\pm$ 0.60	0.47 $\pm$ 0.11 **

See Fig. 1 for rat treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6-8$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group.

GABA $\alpha$ 1 受体及 NR2A 受体 mRNA 变化出现最早,在染毒后 2 h 表达即显著增加( $P < 0.05$ ),但 NR2B 受体 mRNA 在染毒后 6 h 才出现显著改变( $P < 0.05$ );随着染毒时间的延长,NR2A,NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体 mRNA 均出现不同程度降低,在染毒后 24~48 h 降至最低( $P < 0.05$ );至染毒后 7 d,除 GABA $\alpha$ 1 受体外,上述各受体 mRNA 基本恢复至正常水平,与染毒前相比无明显差异。

### 3 讨论

关于梭曼中毒所致惊厥及由此引发中枢神经系统损伤的发生机制,目前尚未完全阐明。但既往研究结果已初步证实,NMDA 及 GABA 等兴奋性及抑制性氨基酸受体功能失衡是导致临床常见惊厥维持、延续及相关脑区病理学损伤的主要原因<sup>[6-7]</sup>。作为 NMDA 及 GABA 受体主要功能亚基,NR2A,NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体对维持脑内兴奋性<sup>[8-9]</sup>及抑制性<sup>[10-11]</sup>平衡发挥重要调节作用。为深入阐明梭曼所致惊厥及由此引发的迟发性神经损伤发生机制,本研究选择了梭曼中毒后,病理学改变发生最早、且与认知及学习记忆功能关系最为密切脑区海马<sup>[12]</sup>作为研究对象,从 mRNA 及蛋白等不同水平,观察了海马 NR2A, NR2B 及 GABA $\alpha$ 1 受体在梭曼中毒后不同时间表达变化。

本实验结果发现,梭曼染毒后,NR2A 及 NR2B 表达出现得更快、更为迅速,其 mRNA 及蛋白在染毒后 2~6 h 均出现显著上调,且 NR2A 变化尤为敏感,在染毒后 2 h 时,mRNA 及蛋白均出现显著上

调;除此之外,在梭曼中毒早期(染毒后 2 h),同样观察到 GABA $\alpha$ 1 受体 mRNA 表达上调,尽管其蛋白直至染毒后 24 h 才出现显著改变。此后,各受体亚型 mRNA 在染毒后 24~48 h(NR2A, NR2B)及染毒后 7 d(GABA $\alpha$ 1 受体)均出现表达下调;其蛋白表达水平总体亦呈降低趋势。相对于 NMDA 及 GABA 主要受体亚型表达变化,在梭曼中毒后 1 h,即可观察到明显病理学损伤;在中毒后 6 h,首次观察到凋亡细胞出现。上述研究结果初步证实 NMDA 及 GABA 主要受体亚型表达在梭曼中毒后出现显著改变。值得说明的是,本研究中 mRNA 与蛋白表达结果并不是一致的,其原因可能与 mRNA 在翻译时存在的表达调控有关。翻译水平上的表达调控使得相关酶活性受到抑制或激活,导致蛋白延迟或提前表达;同时大鼠个体差异也会对蛋白表达结果产生一定的影响<sup>[13]</sup>。

目前尚未完全明确 NMDA 受体及其主要亚型在梭曼中毒不同阶段数量及功能变化与惊厥维持、延续及由此引发脑损伤的规律性关系。但现有研究结果已经发现<sup>[14-15]</sup>,在梭曼中毒所致惊厥发作后 40 min,一些单纯作用于胆碱能系统药物如阿托品、东莨菪碱,完全失去抗惊疗效;而特异性 NMDA 受体拮抗剂如 MK-801 等,在此阶段仍可发挥明显抗惊作用,且其对惊厥控制时间快于惊厥发作后 5 min 给药,提示 NMDA 受体在惊厥发作后 40 min 对惊厥维持延续起着更为重要作用。结合本研究结果,NMDA 受体主要亚型表达上调最早出现在梭曼中毒后 2 h,因而推测在惊厥发作后 40 min,NMDA 受体拮抗剂 MK-801 发挥的良好抗惊作用,很可能源于其对持续活化 NMDA 受体功能的抑制作用。关于 NMDA 受体主要亚型 NR2A 及 NR2B 受体表达与惊厥发生及脑损伤的关系,目前的观点一般认为,NR2A 在各种原因引发脑损伤中的表达上调能够降低损伤程度,是机体针对兴奋性神经毒性的一种自我保护;而 NR2B 主要介导 NMDA 受体的兴奋性神经毒性,其表达上调对神经元损伤发生起“易化”作用<sup>[4]</sup>。除此之外,作为 GABA 主要受体亚型 GABA $\alpha$ 1 在惊厥后期出现的表达上调,亦可能是机体针对中枢神经系统持续兴奋性的一种负反馈调节;支持上述观点的研究结果在于,作为 GABA 受体选择性调节剂,地西洋在梭曼所致惊厥后期仍可发挥良好抗惊作用<sup>[17-18]</sup>。至于在染毒后 24 h~7 d,NMDA 及 GABA 主要受体亚型出现的显著表达下调,目前尚无确定结论。较为公认的观点是,在中毒后期,神经元细胞出现明显损伤,该损

伤可诱发 GABA $\alpha$ 1 等主要受体亚型出现显著“内吞作用”,进而导致受体表达数量降低。另外一个值得注意的现象是,在本研究中,先观察到海马神经细胞的病理学损伤,而后出现 NR2A 及 NR2B 表达变化;在此变化出现后,进而观察到凋亡。上述结果,提示 NR2A 及 NR2B 表达异常可能不是病理学损伤的始动因素,但与病理学损伤发展,以及凋亡的出现存在更为密切关系。

前已述及,作为一种非特异性的 NMDA 受体拮抗剂,尽管 MK-801 在梭曼所致惊厥及由此引发脑损伤中表现出一定的治疗效果,但因其作用的非特异性,导致 MK-801 抗惊及神经保护作用仍存在明显缺陷<sup>[5,18]</sup>。在本研究中,发现 NMDA 主要受体亚型 NR2A 及 NR2B 在惊厥后均出现显著改变,且上述受体表达上调在时间上存在一定差异。因此,针对不同受体亚型表达的差异性,结合不同受体亚型功能,选择特异性受体亚型拮抗剂或激动剂进行针对性治疗,可能成为梭曼中毒所致惊厥治疗今后的研究重点。

#### 参考文献:

- [1] Shih TM, Duniho SM, McDonough JH. Control of nerve agent-induced seizures is critical for neuroprotection and survival [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, **188** (2):69-80.
- [2] de Araujo Furtado M, Rossetti F, Chanda S, Yourick D. Exposure to nerve agents: from status epilepticus to neuroinflammation, brain damage, neurogenesis and epilepsy [J]. *Neurotoxicology*, 2012, **33**(6):1476-1490.
- [3] Lallement G, Baubichon D, Clarençon D, Galonnier M, Peoc'h M, Carpentier P. Review of the value of gacyclidine (GK-11) as adjuvant medication to conventional treatments of organophosphate poisoning: primate experiments mimicking various scenarios of military or terrorist attack by soman [J]. *Neurotoxicology*, 1999, **20**(4):675-684.
- [4] Rossetti F, de Araujo Furtado M, Pak T, Bailey K, Shields M, Chanda S, et al. Combined diazepam and HDAC inhibitor treatment protects against seizures and neuronal damage caused by soman exposure [J]. *Neurotoxicology*, 2012, **33**(3):500-511.
- [5] Myhrer T, Enger S, Aas P. Anticonvulsant efficacy of drugs with cholinergic and/or glutamatergic antagonism microinjected into area tempestas of rats exposed to soman [J]. *Neurochem Res*, 2008, **33**(2):348-354.
- [6] Avanzini G, Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis [J]. *Lancet Neurol*, 2003, **2**(1):33-42.
- [7] Steinhäuser C, Seifert G. Glial membrane channels and receptors in epilepsy: impact for generation and spread of seizure activity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, **447**(2-3):227-237.
- [8] Ghasemi M, Schachter SC. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review [J]. *Epilepsy Behav*, 2011, **22**(4):617-640.
- [9] Frasca A, Aalbers M, Frigerio F, Fiordaliso F, Salio M, Gobbi M, et al. Misplaced NMDA receptors in epileptogenesis contribute to excitotoxicity [J]. *Neurobiol Dis*, 2011, **43**(2):507-515.
- [10] Li CX, WANG Y, Zhou C, Shen XY. Transportation and role of GABAA receptor in neurological diseases [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2011, **27**(7):889-892.
- [11] Avoli M, de Curtis M. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity [J]. *Prog Neurobiol*, 2011, **95**(2):104-132.
- [12] de Moura JC, Tirapelli DP, Neder L, Saggiore FP, Sakamoto AC, Velasco TR, et al. Amygdala gene expression of NMDA and GABA(A) receptors in patients with mesial temporal lobe epilepsy [J]. *Hippocampus*, 2012, **22**(1):92-97.
- [13] Svensson I, Waara L, Johansson L, Bucht A, Cassel G. Soman-induced interleukin-1 $\beta$  mRNA and protein in rat brain [J]. *Neurotoxicology*, 2001, **22**(3):355-362.
- [14] Wang YA, Zhou WX, Li JX, Liu YQ, Yue YJ, Zheng JQ, et al. Anticonvulsant effects of phencyclonate hydrochloride and other anticholinergic drugs in soman poisoning: neurochemical mechanisms [J]. *Life Sci*, 2005, **78**(2):210-223.
- [15] Myhrer T, Nguyen NH, Andersen JM, Aas P. Protection against soman-induced seizures in rats: relationship among doses of prophylactics, soman, and adjuncts [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, **196**(3):327-336.
- [16] Taghibiglou C, Martin HG, Lai TW, Cho T, Prasad S, Kojic L, et al. Role of NMDA receptor-dependent activation of SREBP1 in excitotoxic and ischemic neuronal injuries [J]. *Nat Med*, 2009, **15**(12):1399-1406.
- [17] McDonough JH, McMonagle JD, Shih TM. Time-dependent reduction in the anticonvulsant effectiveness of diazepam against soman-induced seizures in guinea pigs [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2010, **33**(3):279-283.
- [18] Shih TM, Koviak TA, Capacio BR. Anticonvulsants for poisoning by the organophosphorus compound soman: pharmacological mechanisms [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1991, **15**(3):349-362.

## Changes of N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A/2B and GABA $\alpha$ 1 receptor expression in hippocampus of rats after soman exposure

SONG Shang-hua<sup>1</sup>, LUO Yuan<sup>2</sup>, LI Wan-hua<sup>2</sup>, SUI Xin<sup>2</sup>, WANG Yong-an<sup>2</sup>

(1. Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Department of Military Toxicology and Biochemical Pharmacology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To observe the changes of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits (NR) 2A and NR2B as well as GABA $\alpha$ 1 receptor expression in mRNA and protein levels in hippocampus at different time point since soman poisoning in rats. **METHODS** On the establishment of the soman-induced seizure model in rats which were injected intraperitoneally with soman 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , the histopathological changes and neurons apoptosis in CA1 of hippocampus at different time points since exposure to soman were observed by HE staining and TUNEL staining, respectively. Meanwhile, the levels of mRNA and protein of NR2A, NR2B and GABA $\alpha$ 1 receptor were tested at 30 min, 1, 2, 6, 24, 48 h and 7 d following exposure to soman by real-time quantitative PCR and Western blotting. **RESULTS** The neuropathological damage was shown at 1 h and became the worst at 24 h in CA1 of hippocampus following exposure to soman. Compared with normal control group, the neurons in CA1 of hippocampus shown an apparent apoptosis at 6 h, and the cell apoptosis became the worst at 24 h, too. Compared with normal control group, the protein level of NR2A and NR2B increased significantly at 2 h while GABA $\alpha$ 1 receptor kept unchanged until 24 h since soman poisoning. The mRNA level of NR2A, NR2B and GABA $\alpha$ 1 receptors increased significantly at 2 – 6 h after soman exposure in CA1 of hippocampus. Both NR2A and NR2B decreased significantly at 24 – 48 h, then returned to normal level at 7 d. **CONCLUSION** The levels of mRNA and protein of NR2A, NR2B and GABA $\alpha$ 1 receptors express abnormally at the late stage of soman induced-seizure, which might be related to the neuro-pathological damage and apoptosis.

**Key words:** soman; receptors, N-methyl-D-aspartate; receptors, GABA; brain damage

**Foundation item:** The project supported by National Major Special Project Science Technology of China (2011ZXJ09102-05C); the Twelfth Five-Year Major Special Project of Medicine Research of PLA (AWS11C004); and The Twelfth Five-Year Mega-project of PLA (BWS12J042)

**Corresponding author:** WANG Yong-an, E-mail: yonganw@sina.com, Tel: (010)66874607

(收稿日期: 2013-05-08 接受日期: 2013-05-30)

(本文编辑: 乔虹)