

1. FASEB J, 1988, 2: 3087~ 3091

4 Wong G H W, Goeddel D V. Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor. Possible protective mechanism. Science, 1988, 242: 941~ 944

5 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 397

6 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162: 156~ 159

7 邓碧玉, 袁勤生, 敖杰. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2): 163

8 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193: 265~ 275

9 夏奕明, 朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定方法. 卫生研究, 1984, 16(4): 29

10 Richter C, Park J W, Ames B N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 6465~ 6467

11 Puchalski R B, Fahl W E. Expression of recombinant glutathione S-transferase π , γ , or γ b1 confer resistance to alkylating agents. Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87: 2443~ 2447

12 Hirose K, Longo D L, Oppenleim J J *et al.* Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1 tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. FASEB J, 1993, 7: 361~ 368

13 陈 媛, 周 玫主编. 自由基医学. 北京: 人民军医出版社, 1991. 55~ 57

Effect of MnSOD on Ionizing Radiation Sensitivity in CHO Cells. SUN Juan, CHEN Yuan,

ZHOU Mei (Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China); GE Zhongliang (Institute of Radiation Medicine/Beijing, Beijing 100850, China); LI Mingtao (Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510089, China).

Abstract IL-1 and TNF have been found to act as protective agents from lethal doses of ionizing radiation in recent years. It was proposed that the mechanisms of the radioprotective effect of IL-1 and TNF may be resulted from to its selective stimulation of manganese superoxide dismutase (MnSOD) expression on both RNA and protein level. Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with sense MnSOD cDNA showed decreased radiosensitivity after treatment with X-ray irradiation, whereas clones transfected with anti-sense MnSOD cDNA showed increased radiosensitivity. It was demonstrated that overexpression of MnSOD could promotes the survival of CHO cells from ionizing radiation.

Key words manganese superoxide dismutase, gene transfection, ionizing radiation

遗传性癫痫易感大鼠脑内 NMDAR1 基因表达*

单巍松 张国荣 张月华 梁英武 李春英¹⁾ 吴希如
(北京医科大学第一临床医院, 北京 100034)

摘要 N-甲基-D 天门冬氨酸 (NMDA) 受体与癫痫及癫痫易感性的形成密切相关. 以遗传性癫痫易感大鼠 P77PMC 为研究对象, 通过 RNA 印迹杂交检测, NMDA 受体一型亚单位 (NMDAR1) mRNA 在惊厥后不同脑区表达, 结果显示: P77PMC 大鼠惊厥后, 大脑皮层、海马、皮层下、下丘 NMDAR1 mRNA 表达呈时间依赖性增加; 比较惊厥即刻与惊厥后 24 h, 四个脑区 NMDAR1 mRNA 分别增加了 111%、

* 国家自然科学基金资助项目. ¹⁾ 北京医科大学第一临床医院中心实验室.
收稿日期: 1996-02-08, 修回日期: 1996-06-26

113%、165%和202%。提示NMDA受体亚单位受惊厥活动调控,并参与惊厥的发生、发展及惊厥后突触结构的重建。

关键词 N-甲基-D-天门冬氨酸受体,遗传性癫痫易感大鼠,基因,表达

遗传性癫痫易感大鼠(genetically epilepsy-prone rat GEPR)是一非人工、自然发生的癫痫动物模型,其癫痫的发作可由强烈的声音刺激诱导,该鼠系的癫痫易感性可能由多基因控制,有作者认为是常染色体显性遗传^[1]。近年,神经分子生物学研究表明遗传性癫痫易感大鼠惊厥发作及其易感性的产生可能与特定脑区内兴奋性神经递质及其受体功能增强或抑制性神经递质及其受体功能减弱,造成中枢神经系统兴奋与抑制失衡有关^[2,3]。

谷氨酸是中枢神经系统中含量最丰富的兴奋性递质,几乎存在于所有神经元内,具有使神经元去极化及诱导同步化放电的作用,其作用的发挥主要通过离子型NMDA受体所介导。NMDA受体参与发育中神经系统的生理及病理改变,与癫痫、缺血缺氧性脑损伤等疾病的发生有关^[4]。研究证实,在一些癫痫动物模型的惊厥发生过程中,脑内NMDA受体数量及功能都发生改变^[4,5]。最近,NMDA受体基因克隆发现其基因由NMDAR1和NMDAR2两个基因家族编码组成,这两个基因家族的蛋白产物分别构成NMDA受体的两类亚单位,即NR1和NR2A-D亚单位,形成完整的NMDA受体蛋白产物^[6,7]。目前,对点燃及卡因酸致惊的动物模型研究发现,惊厥过程中,脑内NMDA受体亚单位的基因表达发生改变,提示这些变化可能直接影响NMDA受体功能与惊厥发生、发展密切相关^[8,9]。然而,国内外对遗传性癫痫易感大鼠惊厥过程中NMDA受体亚单位的变化情况研究还未见报道,本研究拟以遗传性癫痫易感大鼠P77PMC为实验对象,观察惊厥中脑内NMDAR1受体基因表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源及筛选:成年遗传性癫痫易

感大鼠P77PMC由我校实验动物科学部提供,体重250~300 g。使用前两周给予120B声音刺激1 min,连续3 d,选择惊厥反应V级(潜伏期-奔跑-休止期-奔跑-强直阵挛性惊厥)的大鼠为研究对象,按惊厥时间随机分为8组,每组3个样本。

1.1.2 质粒与菌株:含NMDAR1 cDNA质粒pBluescript sk-及 β -actin PUC13质粒由美国Morgan Sheng博士和日本KoKi Moriyoshi教授赠送。

1.2 方法

1.2.1 组织总RNA提取:遗传性癫痫易感大鼠P77PMC经120 B铃声刺激1 min后,不同时间(0.30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h和24 h),急性断头处死,依照解剖部位取出不同脑区,包括:大脑皮层、海马、皮层下(包括丘脑、下丘脑等部位)、下丘。以异硫氰酸酚-氯仿一步法提取组织中RNA。

1.2.2 RNA印迹:以每样品30 μ gRNA,在1%琼脂糖的2.2 mol/L甲醛凝胶中电泳,电压为50 V,电泳6 h,电泳后将RNA转移至尼龙膜上,烤干。在42 $^{\circ}$ C,将转有RNA的尼龙膜于预杂交液中预杂交4~6 h,然后与随机引物标记³²P的NMDAR1 cDNA或 β -actin cDNA探针进行杂交18~24 h,最后于0.1 $\times$ SSC,0.1% SDS中洗膜,-70 $^{\circ}$ C脱色自显影48~72 h(以上方法参照“分子克隆”第二版)。

1.2.3 光密度测定:RNA印迹杂交结果经我校图像分析测定每个杂交点的总光密度值(IOD),实验内参照以同一样品的 β -actin mRNA杂交量显示每个样品的加样情况。NR1 mRNA增加的百分数是以每个杂交点的IOD除以相应杂交点的IOD而得,以上实验分别重复3次。

2 结果

我们选择了4个与听源性惊厥发生相关的

脑区, 分别观察 P77PMC 大鼠惊厥后不同时间 NR1 mRNA 表达情况. RNA 印迹杂交结果显示 P77PMC 大鼠大脑皮层 NR1 mRNA 在惊厥即刻到惊厥后 1 h 内表达无明显改变, 惊厥后 2 h 表达增加, 12 h 达高峰, 24 h 表达量下降, 但仍较对照高. 海马、皮层下、下丘 NR1 mRNA

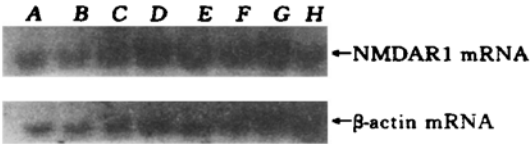


图 1 P77PMC 大鼠惊厥后大脑皮层 NMDAR1 mRNA 表达

A 为对照, B~H 分别为惊厥后 30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h.

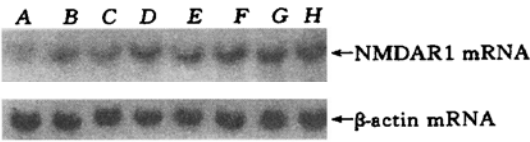


图 2 P77PMC 大鼠惊厥后海马 NMDAR1 mRNA 表达

A 为对照, B~H 分别为惊厥后 30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h.

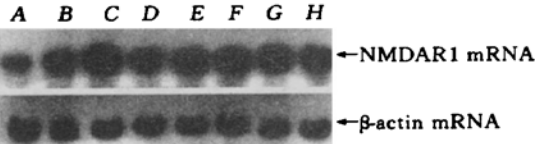


图 3 P77PMC 大鼠惊厥后皮层下 NMDAR1 mRNA 表达

A 为对照, B~H 分别为惊厥后 30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h.

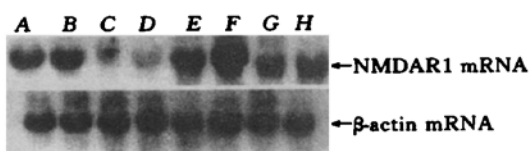


图 4 P77PMC 大鼠惊厥后不同脑区 NMDAR1 mRNA 表达

A~D 分别为惊厥即刻 P77PMC 大鼠大脑皮层、海马、皮层下、下丘. E~H 分别为惊厥后 24 h 大脑皮层、海马、皮层下、下丘.

表达与大脑皮层特点相似, 只是海马 NR1mRNA 表达可持续到 24 h 以后, 皮层下 NR1 mRNA 表达于惊厥后 30 min 开始增高, 并出现较长时程的高表达 (图 1、2、3). 图 4 所示为 P77PMC 大鼠惊厥即刻和惊厥 24 h, 四个脑区 NR1 mRNA 表达量的比较, 惊厥前大脑皮层、海马 NR1mRNA 基础表达量明显高于皮层下和下丘, 惊厥 24 h 则四个脑区 NR1 mRNA 较惊厥前有不同程度的增加, 比较惊厥即刻与惊厥后 24 h, 四个脑区 NMDAR1 mRNA 分别增加了 111%、113%、165% 和 202%.

3 讨 论

遗传性癫痫易感大鼠是一种研究全身性惊厥发病机制有价值的动物模型, 其惊厥发生是非人工的、自然的、可控的, 并存在着遗传背景, 从而克服了以往在全身性癫痫发病机制研究中, 难以在神经网络中建立与全身性癫痫发病有关的特定病灶及全身性癫痫起病的不可预测的困难^[1,2]. P77PMC 大鼠是我校药理教研室 1977 年从 Wistar 大鼠中筛选出具有与 GEPR 大鼠特性类似的听源性惊厥易感大鼠, 近亲交配, 保留繁殖, 其听源性惊厥发生率为 85%, 明显高于 Wistar 大鼠, 并对其他化学致惊剂, 如戊四氮、卡因酸及人工高热等因素所致惊厥也较敏感^[11].

近年研究证实脑内兴奋性氨基酸作用增强与 GEPR 惊厥易感性的形成机制密切相关^[9]. 谷氨酸是中枢神经系统正常存在的兴奋性神经递质, 其对神经元的兴奋作用主要通过 NMDA 受体介导. 研究发现 GEPR 下丘及海马等脑区谷氨酸递质及其合成酶含量增加; 而外源性 NMDA 微注射到下丘可诱发正常 Wistar 大鼠声音刺激后听源性惊厥产生; 而给予谷氨酸合成酶抑制剂降低谷氨酸含量则可阻止这种听源性惊厥的发生; 脑内局部或整体给予 NMDA 受体拮抗剂可抑制听源性惊厥的产生及下丘神经元放电^[1,2,8]. 在我们另一实验发现 P77PMC 大鼠大脑皮层海马 NMDA 受体对

[³H] MK-801 的结合增加 (待发表). 上述结果表明兴奋性氨基酸过度释放及其受体功能增加与听源性惊厥的发生、发展密切相关. 本实验从 NMDA 受体基因水平上探讨了 P77PMC 大鼠惊厥后 NMDAR1 受体亚单位表达情况, 结果显示听源性惊厥发生后, P77PMC 大鼠各脑区对 NR1 mRNA 表达呈上升趋势, 具有时间依赖关系, 这提示惊厥后 P77PMC 大鼠各脑区对 NMDAR1 mRNA 表达调控机制是一致的, 由于基因表达增高可能最终导致 NMDA 受体数量及功能的增加. 文献报道, 一完整 NMDA 受体由 NR1 和 NR2 亚单位构成, NR1 亚单位广泛分布于全脑内, 以大脑皮层、海马、丘脑、小脑含量丰富. 功能研究表明 NR1 亚单位具有大部分 NMDA 完整受体的功能, 其形成的跨膜结构含有多个功能性位点, 将 NR1 与亚单位单独表达或翻译成膜蛋白时, 仅有部分完整 NMDA 受体功能, 当 NR1 与 NR2 亚单位中一个组合时, 即可发挥较强的功能, 但 NR2 亚单位自身不具有 NMDA 受体任何功能特性. 这表明 NR1 亚单位是 NMDA 受体构成及发挥正常功能所必需的, 其在惊厥后各脑区转录水平的增加, 必然影响到相应脑区 NMDA 受体构成及功能的改变^[4, 6, 7]. 文献报道, 下丘是听觉传导途径的重要核团, 可能是听源性惊厥的起发点, 而皮层下、海马、大脑皮层对惊厥活动的扩散起着调控作用^[1, 2, 8]. NMDAR1 mRNA 惊厥后的变化可能也影响到神经元间回路形成及可塑性的改变, 起着对神经元功能长期的调控, 可能是 GEPR 惊厥易感性永久存在的物质基础.

NMDA 受体活性增加不只局限于 GEPR 动物模型, 在海马及杏仁核电点燃和化学药物点燃惊厥模型中, 齿状回的 CA1 和 CA3 区锥体细胞 NMDA 受体活性亦增强, 并且 NMDA 受体的激活是建立点燃模型基础; 在人类颞叶癫痫的病灶中, 发现海马区域对 NMDA 和甘氨酸结合增加了 20% ~ 110%^[10]. 最近, 海马点燃研究发现大鼠齿状回 NR1 mRNA 表达出现先下降后上升的趋势, 这些结果提示 NMDA

受体功能增加可能是癫痫及其易感性形成的共同机制. 目前, 抑制谷氨酸合成及 NMDA 受体各功能性位点拮抗剂性药物已部分用于临床治疗, 这些药物的作用途径是传统抗癫痫药物所不具备的, 随着对 NMDA 受体功能及惊厥前后表达调控的进一步阐明, 必将开拓癫痫发病机制研究与治疗的新途径.

参 考 文 献

- 1 Faingold C L, Boersma A C A. Loss of intensity-induced inhibition in inferior colliculus neurons leads to audiogenic seizure susceptibility in behaving genetically epilepsy-prone rats. *Exp Neurol*, 1991, **113** (2): 354~ 363
- 2 Faingold C L. The genetically epilepsy-prone rat. *Gen Pharm*, 1988, **19** (2): 331~ 338
- 3 Wieraszko A, Seyfried T N. Influence of audiogenic seizures on synaptic facilitation in mouse hippocampal slices is mediated by N-methyl-D-aspartate receptor. *Epilepsia*, 1993, **34** (3): 979~ 984
- 4 Monyer H, Burnashev N, Laurie D J *et al.* Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 1994, **12** (2): 529 ~ 540
- 5 Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R *et al.* Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 1992, **256** (9): 1217~ 1221
- 6 Pratt G D, Kokaia M, Bengzon J *et al.* Differential regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNAs in kindling-induced epileptogenesis. *Neurosci*, 1993, **57** (2): 307~ 318
- 7 Friedman L K, Pellegrini-Giampietro D E, Sperber E F *et al.* Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an *in situ* hybridization study. *J Neurosci*, 1994, **14** (8): 2697~ 2707
- 8 Faingold C L, Naritoku D K, Copley C A *et al.* Glutamate in the inferior colliculus plays a critical role in audiogenic seizure initiation. *Epilepsy Res*, 1992, **13** (1): 95~ 105
- 9 McDonald J M, Johnston M V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Rev*, 1990, **15**: 41~ 70
- 10 McDonald J W, Carofalo E A, Hood T *et al.* Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 1991, **29** (2): 529~ 541
- 11 Zhao D Y, Wu X R, Pei Y *et al.* Long-term effects of febrile convulsion on seizure susceptibility in P77PMC rat-resistant to acoustic stimuli but susceptible to kainate-induced seizures. *Exp Neurol*, 1985, **88** (3): 688~ 695

NMDAR1 mRNA Expression Increased After Seizure in Genetically Epilepsy-Prone Rat.

SHAN Weisong, ZHANG Guorong, ZHANG Yuehua, LIANG Yingwu, LI Chunying, WU Xiru (The First Teaching Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China).

Abstract N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) are implicated in several neuropathological conditions including epilepsy. As a model of epilepsy, genetically epilepsy-prone rat was chosen to investigate the changes in expres-

sion of NMDAR1 mRNA after seizure in different brain regions. The results showed that cerebral cortex, hippocampus, subcortex and inferior colliculus had a time-dependent modulation of the NMDAR1 mRNA expression and increased about 111%, 113%, 165%, 202% above control values, respectively in 24h after seizure. This phenomenon demonstrates that NMDAR1 mRNA was regulated by seizure and may contribute to epileptic susceptibility.

Key words N-methyl-D-aspartate receptor, genetically epilepsy-prone rat, gene, expression

亚硒酸钠对大鼠晶体蛋白基因转录的影响*

王 波¹⁾ 何海鹰 贾维红 张家萍 梁 康 张昌颖

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 对不同浓度的亚硒酸钠在体外对 αA 及 $\beta 23$ 晶体蛋白基因转录的影响作了初步的研究。结果发现, 随着亚硒酸钠浓度的升高, αA 基因的转录下降; 而当亚硒酸钠浓度升至 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, αA 基因的转录又呈反跳性回升; 提示 αA 晶体蛋白在晶体细胞内, 至少应答于高浓度的硒, 可能作为一种应激蛋白表达。而随着硒浓度的增加, $\beta 23$ 基因的转录则呈现出先升后降的双相变化; 提示一定浓度的硒可能借某种机制影响或改变晶体上皮细胞的分化状态。

关键词 亚硒酸钠, 晶体上皮细胞, 晶体蛋白基因, 转录, 分化, 应激

晶体发育过程中存在着各类晶体蛋白的分化表达。晶体蛋白基因表达时间上的调控, 导致晶体蛋白多肽链精确的空间分布, 后者规定了透明晶体折射率梯度的光学特性^[1]; 同时, 晶体的光学特性还要求其纤维内的晶体蛋白具有很高的浓度, 约占晶体蛋白质总量的 90% 以上。脊椎动物的晶体蛋白主要是 α 、 β 、 γ 晶体蛋白。近年来, 对 αB 晶体蛋白研究的一个主要突破是发现它不仅限于晶体。在非晶体组织中, αB 晶体蛋白实际上是一种小热休克蛋白 (SHSP)^[2], 具有分子伴侣功能^[3], 其表达可由热、渗透应激及亚砷酸盐应激所诱导^[4], 并赋予细胞耐热性; 最近有人报道 αA 晶体蛋白也具有分子伴侣活性, 也能赋予细胞

耐热性, 但尚未证实其热诱导性^[5]。作为晶体上皮细胞分化标志的 β 晶体蛋白, 易于氧化, 在白内障发病时较早发生改变。

我们以前的工作表明, 一定量的亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 在体内、外均能造成晶体上皮细胞 DNA 损伤^[6], 并且可能关闭 (block) 增殖区晶体上皮细胞的细胞周期, 使细胞停滞于 S 和/或 G_2 期^[7]。晶体中晶体蛋白的数量与质量及分子排列都同其透明性直接相关。因此, 我们觉得有必要对 Na_2SeO_3 处理后, 晶体上皮细胞晶体蛋白基因转录会出现怎样的反应,

* 国家自然科学基金资助项目。

¹⁾ 齐齐哈尔医学院生化教研室, 齐齐哈尔 161041。

收稿日期: 1996-03-01, 修回日期: 1996-08-02