

傅里叶变换红外光谱分析 NMDA 受体 单克隆抗体抗兴奋毒损伤机理*

康晓楠¹⁾ 孙长凯^{1)**} 范明^{2)**} 宋占军³⁾ 赵杰¹⁾ 王吉庆⁴⁾ 施广霞⁵⁾

(¹⁾大连医科大学脑疾病研究所, 大连 116027; (²⁾军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850;

(³⁾军事医学科学院国家生物医学分析中心, 北京 100850; (⁴⁾解放军第 210 医院, 大连 116021;

(⁵⁾大连医科大学病理生理学教研室, 大连 116027)

摘要 人 N-甲基-D-门冬氨酸受体 (NMDAR, NR) 单克隆抗体 MABN1 具有明确的抗兴奋毒保护作用, 但其机制不明. 以 MABN1 和 MK-801 分别预处理海马细胞, 拮抗谷氨酸兴奋毒损伤作用, 采用傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 技术, 对不同处理后的海马细胞红外光谱特性进行比较. 将去卷积的酰胺 I 带进行曲线拟合后发现, MABN1 组与 MK-801 组的蛋白质二级结构有明显不同, 提示二者在抗兴奋毒机制方面存在差别.

关键词 红外光谱, 兴奋毒性, 海马神经元

学科分类号 Q517

谷氨酸受体离子通道是中枢神经系统兴奋性突触信号的传递者, 是介导由谷氨酸 (Glu) 及其他相关内源性氨基酸兴奋作用的跨膜蛋白, 其中 N-甲基-D-门冬氨酸受体 (NMDAR, NR) 属于重要的兴奋性神经递质受体之一. NMDA 受体主亚基 NR1 是维持受体功能的必需亚基. 除了参与突触可塑性、学习和记忆过程等正常生理过程, NMDA 受体还介导脑缺血、缺氧所致神经元死亡的兴奋毒作用^[1,2]. 鉴于 NMDA 受体在生理和病理 (兴奋毒性脑损伤) 过程中的双重角色, 人们致力于发展高效、高选择性的 NMDA 受体拮抗剂用于治疗中风等脑缺血损害^[3]. 人 NMDA 受体单克隆抗体 MABN1 识别表位位于主亚基 NR1 重要功能区 S2 附近, 具有特异性体外抗兴奋毒作用 (另文发表), 深入研究其机制对开发新型抗兴奋毒药物无疑具有重要意义.

物质的红外图谱包含丰富的结构信息, 集中表现了各种化学基团的振动形式, 因此红外光谱法一直是经典的结构分析方法. 人体组织细胞中最基本的聚合物是核酸、蛋白质、糖、脂类等, 细胞的红外光谱就是由此聚合物分子的振动光谱组成. 本文试图通过观察培养海马神经元红外光谱, 分析比较 MABN1 和 MK-801 作用后细胞内分子结构组成的差异, 为抗体抗兴奋毒保护机制研究提供一些线索.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

新生 Wistar 大鼠由军事医学科学院动物中心

提供; 人转铁蛋白、谷氨酸单钠、MK-801、神经元特异烯醇化酶抗血清 (neuron specific enolase, NSE) 购自 Sigma 公司; 马血清、胎牛血清、MEM 培养粉购自 Hyclone 公司; 单克隆抗体 MABN1 为自制; Bio-Rad FTS-65A 型傅里叶变换红外光谱仪为 Bio-Rad 公司产品.

1.2 海马神经元培养

新生 Wistar 大鼠 (0~1 天), 75% 酒精灭菌, 断头置冰上, 解剖显微镜下快速剥离双侧完整海马, 剪碎后置 0.125% 胰酶消化液中, 于 37℃ 消化 30 min, 并制成 1×10^6 /ml 密度的细胞悬液, 接种于涂有多聚赖氨酸的 35 mm 塑料培养皿中, 每皿 2 ml, 置于 36℃、含 10% CO₂ 的培养箱内进行培养. 培养液由 94% Eagle's MEM、5% 马血清、1% N3 组合液和谷氨酰胺 100 mg/L 组成. 于培养第 3 天, 在培养液中加入细胞分裂抑制剂阿糖胞苷 3 mg/L, 以抑制非神经细胞的过度增殖. 作用 48 h 后更换新鲜培养液, 以后每周换液 2 次, 每次更换 50% 新鲜培养液.

1.3 Glu 对海马神经元的损伤

实验在细胞培养第 12 天进行, 方法见参考文献 [4]. 主要步骤如下, 神经元暴露于含 500 μmol/L 谷氨酸和 10 μmol/L 甘氨酸的培养液

* 国家自然科学基金资助项目 (30070267), 中国博士后科学基金 (2001) 和辽宁省重点科技攻关课题项目 (2001226005).

** 通讯联系人.

Tel: 0411-4721396, E-mail: cksun110@mail.dlptt.ln.cn

收稿日期: 2002-11-05, 接受日期: 2002-11-28

中, 15 min 后吸去含谷氨酸和甘氨酸的培养液, 添加新鲜培养液于培养皿中, 细胞置于 37℃ 孵箱继续培养 18 h, 此为谷氨酸组 (Glu). 同时设正常对照组 (Con)、MK-801 保护组 (MK+ Glu) 和 MABN1 保护组 (MAB+ Glu).

1.3.1 对照组: 以 PBS 代替谷氨酸和甘氨酸, 其余步骤同谷氨酸组.

1.3.2 MK-801 保护组: MK-801 (终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$) 于谷氨酸暴露前 2 min 加入培养液中, 谷氨酸暴露期间及终止培养前 18 h 持续存在.

1.3.3 MABN1 保护组: MABN1 (终浓度 0.3 $\mu\text{mol/L}$) 在谷氨酸暴露前 2 h 与细胞孵育, 然后含抗体的培养液被吸出并保存, 谷氨酸暴露 15 min 后, 把保存的培养液加回皿中继续培养 18 h.

1.4 细胞样品准备

谷氨酸作用后 18 h 终止细胞培养, 刮下培养的贴壁细胞, 用 0.9% NaCl 溶液收集刮下的细胞, 滴在特制的镀金片上, 放置在干燥器中真空干燥, 供光谱测试用.

1.5 检测

红外光谱在 Bio-Rad FTS-65A 傅里叶变换红外光谱仪/UMA500 红外显微镜上测定, 分辨率为 4 cm^{-1} , 分别对 4 组样品, 每组样品取 5 皿进行扫描, 每个样品扫描 128 次. 使用液氮冷却的 MCT 检测器, 红外检测光栏为 50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$.

1.6 红外光谱的处理

所得光谱是以原始光谱差减掉同样条件下测得的空白吸收, 差减以保证在 2 000~1 700 cm^{-1} 之

间无吸收峰特征. 傅里叶去卷积采用 Bessel 切趾函数, 洛仑兹半高宽 16 cm^{-1} , 分辨率增强因子 (k) 为 2.3. 对去卷积谱的谱带拟合采用 BANDFIT 程序, 以高斯谱带拟合, 曲线拟合的 RMS 误差均小于 0.005. 各组分的相对含量由最终拟合的酰胺 I 谱带面积计算得到.

2 结 果

2.1 样品红外谱带的归属

4 种样品在波数 950~3 050 cm^{-1} FTIR 谱图如图 1 所示, 纵坐标以透过率表示.

根据从细胞和组织中分离出来的核酸、蛋白质、糖、酯及其他生物大分子的红外光谱研究^[5,6], 对主要的吸收谱带归属如下: 970 cm^{-1} 弱吸收峰归属为磷酸化蛋白和核酸中磷酸单酯二价阴离子 PO_4^{2-} 基团的对称伸缩振动 ($\nu_s \text{PO}_4^{2-}$); 1 060 cm^{-1} 附近的强吸收峰主要由糖类 C—O 基团伸缩振动引起; 1 160 cm^{-1} 归属于核酸分子内磷酸二酯基团的对称伸缩振动峰 ($\nu_s \text{PO}_2^-$); 1 233 cm^{-1} 归属于核酸分子内磷酸二酯基团的不对称伸缩振动 ($\nu_{as} \text{PO}_2^-$); 1 397 cm^{-1} 和 1 450 cm^{-1} 分别归属为蛋白质分子中甲基的对称和非对称弯曲振动峰 ($\delta_s \text{CH}_3$ 和 $\delta_{as} \text{CH}_3$); 1 520 cm^{-1} 和 1 646 cm^{-1} 主要来自酰胺 II 带和酰胺 I 带; 2 840 cm^{-1} 和 2 922 cm^{-1} 分别由 $\nu_s \text{CH}_2$ 和 $\nu_{as} \text{CH}_2$ 引起; 2 960 cm^{-1} 归属于蛋白质、脂类和 DNA 的 $\nu_{as} \text{CH}_3$.

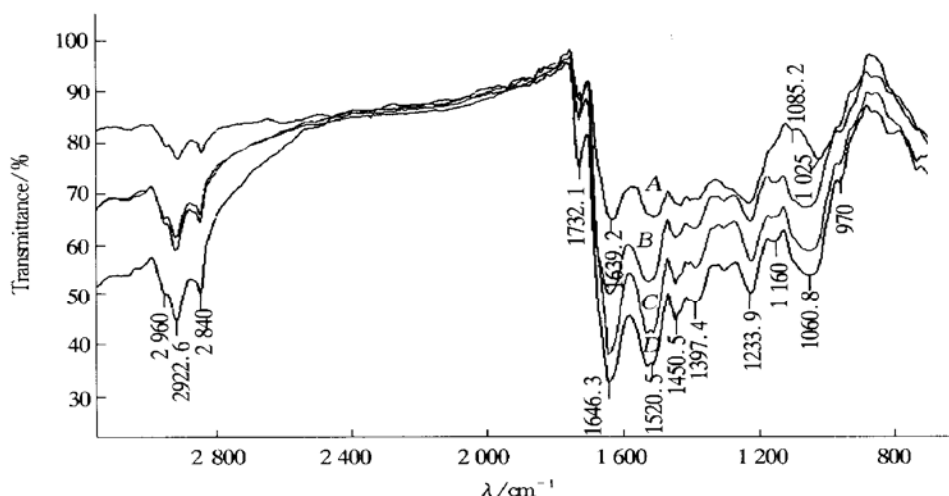


Fig. 1 Fourier transform infrared spectra of the hippocampus neuron

A: control; B: glutamate; C: MK-801; D: MABN1.

2.2 样品红外谱带的变化

与正常对照组相比, 其他3组(均有谷氨酸作用)图谱发生明显变化, 特别是在 $1\ 060\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 160\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 646\text{ cm}^{-1}$ (酰胺 I 带) 附近, 说明谷氨酸对细胞生物分子结构产生了规律性影响, 分别与核酸以及某些蛋白质二级结构改变有关. 以往的研究确已发现谷氨酸可以通过激活 NMDA 受体, 使离子通道开放, Ca^{2+} 内流, 细胞发生凋亡, 核酸降解, 从而形成相应的红外光谱变化.

经过对谷氨酸组、MK-801 保护组和 MABN1 保护组之间红外图谱的对比分析, 发现图谱之间整体差异不大. 进一步对各样品的酰胺 I 带进行细致的分析, 发现该谱带子峰的强度存在明显不同.

2.3 酰胺 I 谱带的变化

红外光谱中的酰胺 I 谱带 ($1\ 700\sim 1\ 620\text{ cm}^{-1}$) 是由骨架肽链羰基伸缩振动的吸收引起的, 蛋白质的不同二级结构形式在这一区域内具有不同的特征吸收带^[7]. 在这个区域, 各组分的谱带通常是相互叠加在一起的宽峰, 观测到的酰胺 I 谱带只是一个

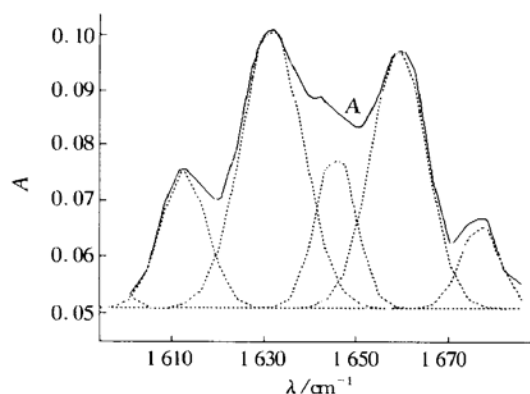


Fig. 2 The deconvoluted amide I spectrum (curve A) and the fitted individual component bands of the control

大峰, 因此, 要解析酰胺 I 带的各子峰, 必须利用去卷积、微分等数学方法提高谱峰的分辨率. 这些方法并非提高仪器的分辨率, 而是数学上使其分开可见, 再结合谱带拟合技术, 最终分析得到蛋白质二级结构的详细信息. 图 2 显示对照组的酰胺 I 带去卷积谱和拟合分析, 其他各组未显示. 曲线 A 代表酰胺 I 带的去卷积谱; 拟合分析可以得到 5 个子峰, 位于 $1\ 611\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 658\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 631\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 676\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 644\text{ cm}^{-1}$, 分别对应于典型蛋白质二级结构形式的吸收, 可作出明确的指认^[8], 即分子间反平行 β 折叠、 α 螺旋、分子内 β 折叠、转角以及无规卷曲. 由各子峰的面积可以得到 4 种样品的二级结构相对含量, 我们对各组样品都取 5 皿细胞进行检测, 最后得到各组蛋白质二级结构的平均相对含量.

表 1 显示的是各组蛋白质二级结构的指认和平均相对百分含量值. 可以看出, 4 组海马神经元酰胺 I 带红外光谱特性有明显不同. 与正常对照组相比, 细胞经谷氨酸作用后, α 螺旋、 β 折叠或转角减少, 无规卷曲增多, 蛋白质的无序程度越高反映出细胞的损伤程度越重. 这与我们兴奋毒性试验观察的结果是一致的, 即细胞损伤程度由轻到重顺序为: 对照组、MK-801 保护组、MABN1 保护组、谷氨酸组. 与谷氨酸组相比, MABN1 组和 MK-801 组的蛋白质二级结构组成的变化趋势明显不同: MK-801 保护后的海马细胞与谷氨酸组相比, α 螺旋明显增加、 β 折叠显著减少 ($P < 0.05$), 转角变化不明显; MABN1 保护组转角的含量明显高于谷氨酸组 ($P < 0.05$), 与对照组相似, 而 α 螺旋和 β 折叠与谷氨酸组无显著性差异. MABN1 组和 MK-801 组之间相比, 蛋白质二级结构的百分含量也存在明显差异.

Table 1 Fractional areas (%) and assignment of the amide I spectrum of hippocampus neuron

Groups	$1\ 658\text{ cm}^{-1}$ (α -Helix)	$1\ 611$ 和 $1\ 631\text{ cm}^{-1}$ (β -Sheet)	$1\ 676\text{ cm}^{-1}$ (Turn)	$1\ 644\text{ cm}^{-1}$ (Random coil)
Control	36.8 ± 2.34	42.7 ± 5.21	9.2 ± 2.83	10.9 ± 4.61
Glu	20.2 ± 2.85	34.5 ± 2.56	8.5 ± 1.55	36.8 ± 5.62
MAB+ Glu	21.3 ± 6.32	33.1 ± 1.33	$9.2 \pm 1.21^{1)}$	$33.1 \pm 3.39^{1)}$
MK+ Glu	$31.1 \pm 5.11^{1,2)}$	$29.6 \pm 6.44^{1,2)}$	$8.6 \pm 2.42^{2)}$	$30.1 \pm 1.31^{1,2)}$

¹⁾ $P < 0.05$, vs Glu; ²⁾ $P < 0.05$, vs MABN1. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$.

3 讨 论

傅里叶变换红外光谱及其相关技术的迅速发展, 不仅越来越广泛应用于蛋白质、核酸等生物大分子的结构研究上, 而且已开始更深入地用来研究细胞和组织等更加复杂的体系, 但已有报道多集中于肿瘤或癌前病变方面, 在神经细胞兴奋毒性损伤领域的报道还不多见。

本文试图比较 NMDA 受体单克隆抗体与 MK-801 抗兴奋毒损伤之后细胞红外光谱的变化, 寻找药物可能的作用机制。MK-801 属于经典的 NMDAR 非竞争性拮抗剂, 能够与处于离子通道深部位的 PCP 受点结合, 阻断钙通道, 减少钙离子内流, 从而减弱或对抗谷氨酸引起的兴奋毒作用^[2]。实验结果显示, MABN1 保护组和 MK-801 保护组海马细胞红外光谱的差异主要表现在蛋白质二级结构上, 说明两种拮抗剂对细胞蛋白质结构产生了不同的影响, 二者之间在抗兴奋毒机制方面有差异。所产生的红外光谱变化特点或许由靶蛋白 NMDA 受体二级结构变化造成, 也可能是兴奋毒性作用所有下游蛋白质分子变化的综合体现。如果是由 NMDA 受体二级结构的变化引起, 我们有如下分析: 定点突变实验证实谷氨酸受体激动剂 (如谷氨酸或甘氨酸) 位点远离通道形成区^[8], 说明激动剂通过结合位点将构象变化沿蛋白链传递到离子通道区域, 这种通道状态与激动剂结合位点的构象密切相关 (binding-gating problem)^[9,10], MABN1 识别表位既不在受体激动剂位点, 也不位于离子通道区域, 推测抗体与表位的结合引起受体二级结构变化, 影响了通道开放所必需的构象改变。而且 MABN1 的表位已确定位于 NMDA 受体主亚基 NR1 膜外区的一个转角处, 这是否与 MABN1 组转角的相对含量与正常组相同有关系, 还有待于进

一步的研究。

本研究利用傅立叶变换红外光谱法研究比较了 NMDA 受体单克隆抗体 MABN1 和经典 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 抗谷氨酸兴奋毒后的红外光谱变化, 由于细胞红外光谱反映的是细胞总体水平分子结构的信息, 因此尚不能确定药物作用的确切靶点, 但是研究发现两种拮抗剂保护作用的主要差异是在细胞蛋白质二级结构组成方面, 提示今后可以在这一方面展开深入分析。

参 考 文 献

- 1 Dingledine R, Borges K, Bowie D, *et al.* The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 1999, **51** (1): 7~ 61
- 2 David R L, Rodney P G. Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, **300** (3): 717~ 723
- 3 Yamada K A, Rothman S M. Diazoxide blocks glutamate desensitization and prolongs excitatory postsynaptic currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol*, 1992, **458**: 409~ 423
- 4 Prehn J H, Lippert K, Kriegstein J. Are NMDA or AMPA/kainite receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury? *Eur J Pharmacol*, 1995, **292** (2): 179~ 189
- 5 Erukhimovitch V, Talyshinsky M, Souprun Y, *et al.* Spectroscopic characterization of human and mouse primary cells, cell lines and malignant cells. *Photochem Photobiol*, 2002, **76** (4): 446~ 451
- 6 Argov S, Ramesh J, Salman A, *et al.* Diagnostic potential of Fourier transform infrared microspectroscopy and advanced computational methods in colon cancer patients. *J Biomed*, 2002, **7** (2): 248~ 254
- 7 Bandekar J. Amide modes and protein conformation. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1120** (2): 123~ 143
- 8 Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, *et al.* Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*, 1994, **13** (6): 1345~ 1357
- 9 Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 1994, **17**: 31~ 108
- 10 Colquhoun D, Sakmann B. From muscle endplate to brain synapses: a short history of synapses and agonist-activated ion channels. *Neuron*, 1998, **20** (3): 381~ 387

Fourier Transform Infrared Spectroscopic Investigation of Excitotoxicity-protective Mechanism of Monoclonal Antibody Against NMDAR*

KANG Xiao-Nan¹⁾, SUN Chang-Kai^{1)**}, FAN Ming^{2)**}, SONG Zhan-Jun³⁾,
ZHAO Jie⁴⁾, WANG Ji-Qing¹⁾, SHI Guang-Xia⁵⁾

¹⁾ *Institute for Brain Disorders, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;*

²⁾ *Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;*

³⁾ *National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China;* ⁴⁾ *210 Hospital of PLA, Dalian 116021, China;*

⁵⁾ *Department of Pathophysiology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)*

Abstract The monoclonal antibody MABN1 against NMDAR could protect the neurons from excitotoxicity, but the mechanism is unknown. Cultured hippocampus neurons treated with glutamate or/and NMDAR antagonist (MABN1 and MK-801) were studied by FTIR spectroscopy. Spectroscopic differences were observed between MABN1-treated and MK-801-treated samples. Curve-fitting of the deconvoluted amide I band revealed the difference of protein second structure between MABN1-protected neurons and glutamate-treated neurons, by which it was presumed that MABN1 protects neurons against excitotoxicity by the mechanism different from the one of MK-801.

Key words FTIR, excitotoxicity, hippocampus neuron

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30070267), Science Foundation for Postdoctors of China (2001), Science and Technology Foundation of Liaoning Province (2001226005).

** Corresponding author. Tel: 86-411-4721396, E-mail: cksun110@mail.dlptt.ln.cn

Received: November 5, 2002 Accepted: November 28, 2002