

生后早期听觉剥夺、经验改变大鼠听皮层 NMDA受体 NR2B 蛋白表达*

吴秀梅 张 凌 许兢宏 徐 凤 杨文伟 张季平 孙心德**

(华东师范大学生命科学学院, 脑科学研究中心, 上海 200062)

摘要 应用蛋白质印迹检测技术, 研究早期听觉剥夺、经验对大鼠听皮层 NMDA 受体 NR2B 蛋白表达的影响. 结果表明, 听觉剥夺使生后 14 天龄组和 28 天龄组动物听皮层 NR2B 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 听觉剥夺 7 天后再给予纯音暴露则又使 NR2B 表达水平明显提高 ($P < 0.05$), 呈现双向调节趋势. 听觉剥夺和纯音暴露对生后 42 天龄组大鼠听皮层 NR2B 表达不再产生明显调节作用 ($P > 0.05$). 结果提示, 在大鼠生后发育关键期, 听觉剥夺、经验可改变听皮层 NMDA 受体 NR2B 蛋白表达水平. 研究结果为研究感觉功能发育可塑性的机制提供了重要实验资料.

关键词 大鼠, 听皮层, NR2B, 听觉剥夺, 听觉经验, 蛋白质印迹

学科分类号 Q6

离子型 Glu NMDA 受体在中枢神经系统发育可塑性中起重要作用, 特别是 NR2B 亚单位的作用备受关注^[1,2]. 对视皮层的研究表明, 在动物出生后发育“关键期”(critical period), NMDA 受体亚单位呈年龄依赖性表达, 并受视觉经验双向性调节, 呈现动力学变化过程^[3,4]. 推测 NMDA 受体亚单位表达变化过程可能与经验依赖性突触可塑性的机制有关. 本实验室以往对大鼠听皮层研究也表明, NMDA 受体 NR2B 亚单位 mRNA 和蛋白质均呈年龄依赖性表达模式^[5,6]. 本文应用蛋白质印迹技术, 进一步考察大鼠生后发育早期听觉剥夺和经验对听皮层 NR2B 蛋白表达的影响, 为深入研究脑功能发育可塑性的机制提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验在 60 只 SD 大鼠上进行, 购自复旦大学医学院实验动物中心, 清洁级, 由本实验室饲养繁殖, 幼鼠用于本实验. 动物分为听觉剥夺 (auditory deprivation, AD) 组、听觉剥夺+声音暴露 (auditory deprivation and tone exposure, AD+TE) 组和对照 (control, Con) 组, 每组 20 只.

1.2 听觉剥夺和声音暴露

听觉剥夺: 分别在动物生后 14 天(PND 14)、

28 天(PND 28)和 42 天(PND 42), 应用人用泡沫隔音耳塞(Max-1 型, 美国 Howard 公司)堵塞双侧外耳道, 实施听觉剥夺. 先将泡沫隔音耳塞剪成适合大鼠外耳道大小的锥状, 堵塞外耳道, 并用医用橡皮膏封固, 以防脱落. 堵塞前, 所有动物都要做耳廓反射检查. 动物外耳廓、隔音耳塞等做常规消毒, 以防感染. 处理好的动物正常饲养分别至生后 28 天(PND 28)、42 天(PND 42)和 56 天(PND 56)取样分析.

听觉剥夺+声音暴露: 先分别对 PND14、PND28 和 PND42 动物实施双耳听觉剥夺, 方法同上. 在听觉剥夺 7 天后, 取出堵塞在外耳道的隔音耳塞, 将动物置于隔音室内, 实施声音暴露. 暴露声音的频率为 3.0 kHz 纯音(pure tone), 强度为 70 dB SPL, 隔音室背景噪音为 40 dB SPL. 每天暴露 12 h (20:00~8:00), 饲养室正常饲养 12 h, 连续 7 天至取样分析.

对照组动物置于饲养室正常饲养.

*国家自然科学基金资助项目(30170313, 90208012, 30570595), 上海市启明星计划项目(05QMX1420), 上海市曙光计划项目(05SG28).

** 通讯联系人. Tel: 021-62232775, E-mail: xdsun@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2006-05-11, 接受日期: 2006-07-03

1.3 蛋白质印迹检测

腹腔注射戊巴比妥钠 (sodium pentobarbital, 50 mg/kg, BW) 将动物麻醉后, 立即断头, 剥离大脑, 根据血管分布标志并参照大鼠脑图谱^[6], 分离出听皮层, 放入玻璃匀浆器, 加入 10 倍体积的匀浆缓冲液 (137 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 1.5 mmol/L 硫酸钠, 1% NP-40, 10% 甘油, 1 mmol/L PMSF, 10 mg/L Aprotinin, 0.2 mg/L Leupeptin), 冰内匀浆 10 min, 静置 1 h, 4℃ 下以 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清分装并保存在 -80℃ 冰箱中直至使用. 用 Bradford 法测定蛋白质浓度. 上样前在样品中加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液, 100℃ 煮沸 5 min, 取出后插入冰水中. 用 5% 的浓缩胶, 7.5% 的分离胶进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (60 V 浓缩胶, 120 V 分离胶), 每孔上样量为 80 μg. 电泳结束后, 将胶放入电转缓冲液中平衡 30 min. 将电转槽放入冰水中, 并置于冰箱内, 恒流 400 mA, 4 h 将蛋白质转移至 NC 膜 (Pall 公司) 上. 丽春红染色, 大致定位蛋白质位置, 再用 TBST (TBS+0.1% Tween-20) 脱色后, 用封阻液 (5% 脱脂奶粉-TBST) 室温封阻 2 h, 将 NC 膜放入自封袋中, 加 NR2B 亚单位多克隆抗体 (兔抗大鼠, 稀释度为 1:250, Santa Cruz 公司), 密封, 垂直平面上缓慢旋转摇动, 4℃ 孵育 36 h. TBST 漂洗 (10 min × 4 次), HRP 标记的二抗 (羊抗兔, 稀释度为 1:200 000, Proteintech Group Inc.) 室温孵育 3 h, TBST 漂洗 (10 min × 4 次), 再用 TBS 洗 5 min, 用 ECL 试剂 (Pierce 公司) 反应, 根据发光强弱用 Kodak 胶片曝光约 10 ~ 300 s, 冲洗胶片. 为保证所得条带清晰准确, 在样品旁泳道中加各年龄中一个固定的正常组样品, 且边缘的条带舍弃不用.

1.4 数据处理

将显色胶片进行扫描, 用 Quantity One 软件对胶片上各条带进行灰度测量. 以每张胶片上正常对照组灰度值的平均值为对照, 计算其他各组的相应灰度值. 运用统计学方法对各值进行比较, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-way ANOVA 对不同年龄组进行比较, 并运用 Unpaired *t*-test 进行同一年龄不同组间的显著性差异比较.

2 结 果

2.1 听觉剥夺、经验对 14 天龄大鼠听皮层 NR2B 蛋白表达的影响

14 天龄动物在生后 28 天蛋白质印迹检测结果

显示在图 1 中, 图 1a 分别显示听觉剥夺组 (AD)、听觉剥夺+声音暴露组 (AD + TE) 和正常饲养对照组 (Con) 动物听皮层 NMDA 受体 NR2B 蛋白表达的印迹条带. 与标准蛋白质分子质量标准比较, AD、AD+TE 和对照组样品在 175 ku 处各出现一条带, 其分子质量与 NR2B 亚单位一致, 即各组 NR2B 蛋白的表达条带 (以下同). 比较各组 NR2B 相对表达水平可见, AD 组动物 NR2B 表达明显低于对照组动物 ($P < 0.05$), 下降了 62%. 在 AD+TE 组动物, 听觉剥夺 7 天后, 接着再给予纯音暴露 7 天, 到生后 28 天检测发现, NR2B 蛋白表达水平又明显升高, 达到对照组动物 NR2B 表达水平 (图 1b, 表 1). 这提示, 在大鼠生后发育早期, 听觉剥夺和声音暴露对听皮层 NR2B 蛋白表达起到双向调节作用.

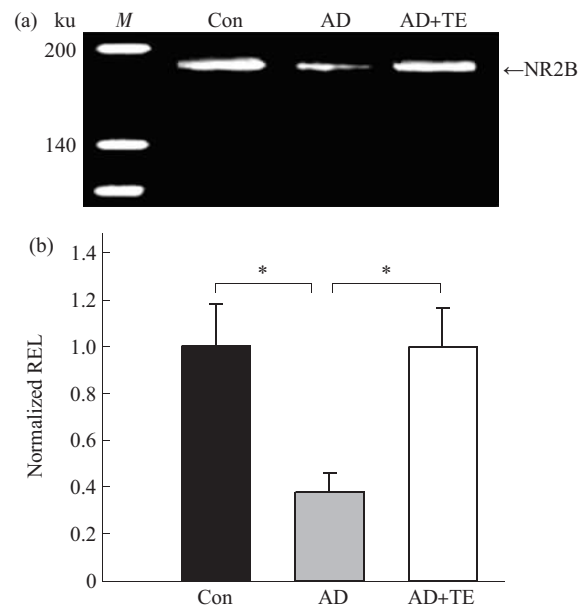


Fig. 1 Effects of auditory deprivation and tone exposure on the expression of NMDA receptor subunit NR2B protein of auditory cortex of PND 14

(a) NR2B bands showing the NR2B protein relative expression level of auditory cortex of PND28 and standard protein marker. (b) Normalized relative expression level (REL) of NR2B protein of auditory cortex of PND28. M: Standard protein marker showing two bands, 200 ku and 140 ku; Con: Control; AD: Auditory deprivation; AD+TE, auditory deprivation and tone exposure; Normalized REL: Normalized relative expression level of NR2B protein. * $P < 0.05$.

2.2 听觉剥夺、经验对 28 天龄大鼠听皮层 NR2B 蛋白表达的影响

对生后 28 天龄大鼠实施听觉剥夺, 在生后 42

天检测, 仍然可使 NR2B 蛋白表达水平明显降低 (图 2, 表 1), 与对照组相比, NR2B 相对表达水平下降了 63% ($P < 0.01$), 这和生后 14 天龄 AD 组没有差异. 但是 AD + TE 组则显示了微妙的变化, 我们发现听觉剥夺 7 天之后再给予 7 天声音暴露, 虽然仍可使 NR2B 表达较 AD 组上调了 37%, 但却不能完全达到对照组的表达水平 (图 2b, 表 1). 这说明, 生后 14 天和 28 天实施听觉剥夺, 对听皮层 NR2B 蛋白的下调性影响没有差别, 都可使 NR2B 表达水平下降 60% 以上. 然而, 在 AD + TE 组则出现了明显差别. 28 天龄动物是在 35 天 (PND35) 开

始声音暴露的, 这时已接近大鼠听觉功能发育关键期的结束^[7,8], 因此, 虽然声音暴露仍能上调 NR2B 的表达, 但却达不到发育早期上调的水平.

2.3 听觉剥夺、经验对 42 天龄大鼠听皮层 NR2B 蛋白表达的影响

图 3 是 42 天龄动物组在生后 56 天蛋白质印迹的检测结果. 可见, 这时不仅听皮层 NR2B 表达总体水平已很低, 而且, 听觉剥夺、声音暴露也不再能有效调节 NR2B 的表达水平, 显示 AD、AD+TE 和对照组 NR2B 表达水平基本一致 ($P > 0.05$) (图 3, 表 1). 此结果表明, 在本文实验条件下, 听觉剥夺和声音暴露对生后 42 天龄大鼠听皮层 NR2B 蛋白表达已不存在明显影响.

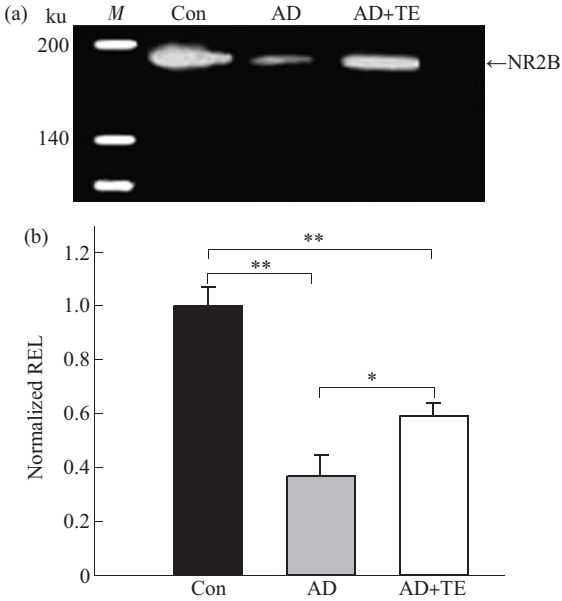


Fig. 2 Effects of auditory deprivation and tone exposure on the expression of NMDA receptor subunit NR2B protein of auditory cortex of PND 28

(a) NR2B bands showing the NR2B protein relative expression level of auditory cortex of PND 42. (b) Normalized relative expression level (REL) of NR2B of auditory cortex of PND 42. M: Standard protein marker showing two bands, 200 ku and 140 ku; Con: Control; AD: auditory deprivation; AD+TE: Auditory deprivation and tone exposure; Normalized REL: Normalized relative expression level of NR2B protein. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

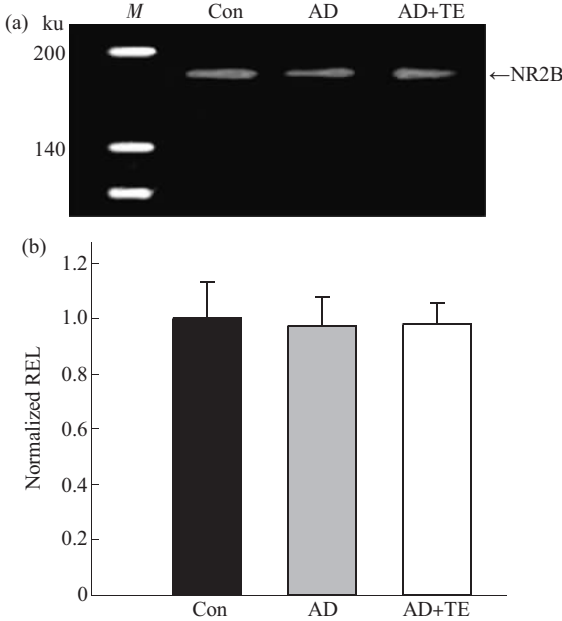


Fig. 3 Effects of auditory deprivation and tone exposure on the expression of NMDA receptor subunit NR2B protein of auditory cortex of PND 42

(a) NR2B bands showing the NR2B protein relative expression level of auditory cortex of PND 56. (b) Normalized relative expression level (REL) of NR2B of auditory cortex of PND 56.

Table 1 Comparison of NR2B protein expression level in auditory cortex among Con, AD and AD+TE group of PND 28, PND42 and PND56

Postnatal days	Relative expression level			P (Three groups)
	Con	AD	AD+TE	
28	1759.20 ± 80.04 (n=5)	663.60 ± 35.88 (n=6)*	1762.88 ± 71.58 (n=6)▲	0.026
42	1126.46 ± 76.16 (n=6)	416.85 ± 84.71 (n=6)**	666.40 ± 55.02 (n=7)▲▲	0.000
56	220.54 ± 28.13 (n=6)	215.22 ± 21.91 (n=6)	2 216.20 ± 16.27 (n=8)	0.985

* $P < 0.05$ (vs Con), ** $P < 0.01$ (vs Con); ▲ $P < 0.05$ (vs AD), ▲▲ $P < 0.01$ (vs AD).

3 讨 论

3.1 NR2B 年龄-依赖性表达

NMDA 受体 NR2B 亚单位在不同脑区的时空表达模式已有不少报道. 生后第 1 天在大鼠前脑即有高表达, 生后 10~14 天嗅球、端脑、海马、体感皮层等脑区也出现表达高峰, 随后表达递减, 到第 21 天进入低表达水平直至成年^[3, 9~11]. 本实验室应用原位杂交技术对大鼠听皮层 NR2B mRNA 表达检测表明, 生后 NR2B 阳性神经元即有高水平表达, 之后递减, 在生后 14 天出现一过性表达高峰, 14~21 天急剧降低, 21 天后呈低水平表达至成年^[5]. 免疫组化技术对大鼠听皮层 NR2B 蛋白表达的检测结果显示与 mRNA 表达完全一致的年龄-依赖性表达模式^[6]. 本文应用蛋白质印迹方法虽然只对 4 周、6 周和 8 周龄大鼠听皮层 NR2B 蛋白表达进行检测, 但仍显示出随年龄增长, NR2B 蛋白表达的下调趋势. 大鼠生后发育“关键期”一般认为从第 12 天开始, 到第 30 天结束^[7, 8], NR2B 生后的表达时程刚好与大鼠发育“关键期”相匹配, 因此, 不少学者认为, NR2B 年龄-依赖性表达变化可能与经验-依赖性可塑性有关^[2, 3].

3.2 早期经验、活动对 NMDA 受体亚单位表达的调节

生后早期经验、活动可明显影响中枢神经元 NMDA 受体亚单位的表达. 一侧耳蜗摘除使大鼠同侧耳 NR1 mRNA 显著减少^[12], 生后早期致聋大鼠 NR1、NR2A 和 NR2B 表达明显降低^[13]. Quinlan 等研究表明, 生后早期饲养在黑暗中的大鼠显著地降低视皮层 NR2A 的表达, 而光照暴露又可快速地上调 NR2A 的表达^[2]. 本文在大鼠听皮层上观察到, 听觉剥夺 7 天使生后 14 天龄和 28 天龄动物听皮层 NR2B 蛋白表达较对照动物下降了 60% 以上, 再给予纯音暴露 7 天, NR2B 蛋白表达则又分别上调了 62% 和 37%. 如同视觉经验一样, 显示了发育“关键期”内听觉剥夺和经验对 NR2B 蛋白表达的双向调节. 但听觉剥夺和声音暴露却不能改变生后 42 天龄动物听皮层 NR2B 蛋白表达, 因为这时发育“关键期”已经结束. 感觉经验双向性调节 NMDA 受体亚单位表达的动力学变化, 被认为可能是感觉经验调控突触可塑性的机制之一^[2, 3, 14].

3.3 NR2B 与关键期的发育

大鼠生后第 9 天外耳道打开, 之后外界声音信息传入听觉中枢, 激活神经元突触连接和相关神经

网络的快速发育, 经过 2~3 周的发育关键期, 一个具有音调组构的初级听皮层(AI)便可在大脑的颞侧皮层逐步建立起来. 在“关键期”, AI 区的音调组构极易为特定的声信号输入而改变^[15, 16]. 给予特定频率的声音暴露, AI 区便会出现与暴露声相对应的频率表征分离区^[8], 而给予连续的噪声暴露又可掩盖正常环境声音的输入, 取消听皮层对声音频率的系统表达, 延迟听皮层的成熟期^[7]. 感觉皮层神经元反应特性和功能组构的形成有赖于丘脑皮层输入的活动模式和功能汇聚^[17~19], 丘脑皮层突触竞争起着决定作用. 发育关键期, 听皮层频率调谐的锐化和音调组构的可塑性变化是来自不同频率通道丘脑皮层突触竞争的结果, 最终使 AI 区表达特定声特征频率增强, 未被驱动的区域被抑制, 出现频率表征分割区. 生理学研究显示, NMDA 受体介导发育关键期大鼠听皮层 II~IV 层神经元的兴奋性突触后电位 (excitatory postsynaptic potential, EPSPs)^[20], 因此, 听皮层发育早期 NMDA 受体的高表达对丘脑传入、皮层之间的突触连接和激发 NMDAR EPSPs 都极为重要^[21]. 本实验室在小鼠生后 12~14 天, 在其一侧听皮层缓慢释放 NR2B 特异性拮抗剂 ifenprodil, 成年后测定听皮层 II/III 层细胞外记录场电位长时程增强效应 (long-term potentiation, LTP), 结果发现 LTP 增长幅度显著下降. 如果在孵育脑片的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中加入激动剂 NMDA, 则又可使 LTP 的增长幅度升高^[22, 23]. 这些结果提示, NMDA 受体, 特别是 NR2B 在听皮层的功能发育、成熟以及可塑性中起关键作用. 本文在发育关键期实施双耳听觉剥夺, NR2B 蛋白表达下降, 如同噪声暴露的效应一样延迟了“关键期”, 而纯音暴露又使 NR2B 蛋白表达上调, 增进了相关网络神经元突触竞争和连接.

参 考 文 献

- 1 Feldmeyer D, Cull-Candy S. Functional consequences of changes in NMDA receptor subunit expression during development. *J Neurocytol*, 1996, **25** (12): 857~867
- 2 Tang Y P, Shimizu E, Dube G R, *et al.* Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 1999, **401** (6748): 63~69
- 3 Quinlan E M, Olstein D H, Bear M F. Bidirectional, experience-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition in the rat visual cortex during postnatal development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (22): 12876~12880
- 4 Chen L, Cooper N G, Mower G D. Developmental changes in the

- expression of NMDA receptor subunit (NR1, NR2A, NR2B) in the cat visual cortex and the effects of dark rearing. *Mol Brain Res*, 2000, **78** (1~2): 196~200
- 5 崔一蕾, 卢静萍, 孙心德, 等. 大鼠听皮层 NMDA 受体亚单位 NR2B mRNA 年龄依赖性表达. *中国神经科学杂志*, 2002, **18** (1): 405~408
Cui Y L, Lu J P, Sun X D, *et al.* *Chin J Neurosci*, 2002, **18** (1): 405~408
 - 6 张凌, 吴秀梅, 孙心德, 等. 大鼠听皮层 NMDA 受体亚单位 NR2B 蛋白质的年龄 - 依赖性表达. *解剖学报*, 2005, **28** (5): 566~570
Zhang L, Wu X M, Sun X D, *et al.* *Chin J Anatomy*, 2005, **28** (5): 566~570
 - 7 Games K D, Winer J A. Layer V in the rat auditory cortex: projections to the inferior colliculus and contralateral cortex. *Hearing Res*, 1988, **34** (1): 1~25
 - 8 Nakahara H, Zhang L L, Merzenich M M. Specialization of primary auditory cortex processing by sound exposure in the 'critical period'. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (18): 7170~7174
 - 9 Portera-Cailliau C, Price D L, Martin L J. N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J Neurochem*, 1996, **66** (2): 692~700
 - 10 Cao Z, Liu L, Lickey M, *et al.* Development of NR1, NR2A and NR2B mRNA in NR1 immunoreactive cells of rat visual cortex. *Brain Res*, 2000, **868** (2): 296~305
 - 11 Candace Y H, Chen Y L, *et al.* Postnatal development of NR2A and NR2B mRNA expression in rat auditory cortex and thalamus. *JARO*, 2002 (03): 479~487
 - 12 Soto K, Shiraishi S, Nakagawa H, *et al.* Diversity and plasticity in amino acid receptor subunit in the auditory brain stem. *Hearing Res*, 2000, **147** (1~2): 137~144
 - 13 Marianowski R, Pollard H, Moreau J, *et al.* N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1 and NR2C are overexpressed in the inferior colliculus of audiogenic mice. *Neurosci Lett*, 1995, **189** (3): 190~194
 - 14 Philpot B D, Sekhar A K, Shouval H Z, *et al.* Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron*, 2001, **29** (1): 157~169
 - 15 Zhang L I, Bao S, Merzenich M M. Persistent and specific influences of early acoustic environments on primary auditory cortex. *Nat Neurosci*, 2001, **4** (11): 1123~1130
 - 16 Zhang L I, Bao S, Merzenich M M. Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs during a critical period. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (4): 2309~2314
 - 17 Miller L M, Escabi M A, Read H L, *et al.* Functional convergence of response properties in the auditory thalamocortical system. *Neuron*, 2001, **32** (1): 151~160
 - 18 Kaas J H, Catania K C. How do features of sensory representations develop?. *Bioessays*, 2002, **24** (4): 334~343
 - 19 Zhang Y F, Dyck R H, Hamilton S E, *et al.* Disrupted tonotopy of the auditory cortex in mice lacking M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Hearing Res*, 2005, **201** (1~2): 145~155
 - 20 Metharate R, Ashe J H, Weinberger N M. Acetylcholine modifies neuronal acoustic rate-level functions in guinea pig auditory cortex by an action at muscarinic receptors. *Synapse*, 1990, **6** (2): 364~368
 - 21 Candace Y H, Yiling Chen, France M L, *et al.* Postnatal development of NR2A and NR2B mRNA expression in rat auditory cortex and thalamus. *J Associat Res Otolaryngol*, 2002, **3** (4): 479~487
 - 22 毛玉婷, 臧绍云, 孙心德. C57Bl/6 小鼠听皮层脑片的长时程增强特性. *生物物理学报*, 2004, **20** (5): 344~348
Mao Y T, Zang S Y, Sun X D. *Acta Biophysica Sinica*, 2004, **20** (5): 344~348
 - 23 Mao Y T, Zang S Y, Sun X D. Early chronic blockade of NR2B subunit and transient activation of NMDA receptor modulate LTP in mice auditory cortex. *Brain Res*, 2006, 1073~1074: 131~138

Early Auditory Deprivation and Experience Modify The Expression of NMDA Receptor Subunit NR2B Protein in Rat Auditory Cortex*

WU Xiu-Mei, ZHANG Ling, XU Jing-Hong, XU Feng,
YANG Wen-Wei, ZHANG Ji-Ping, SUN Xin-De**

(Research Center for Brain Science, College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract Using Western blotting technique, the effects of auditory deprivation and tone exposure on the relative expression level (REL) of NMDA receptor subunit NR2B protein of rat auditory cortex during early postnatal days were studied. The results showed that the NR2B protein expression of PND14 and PND28 decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) when auditory deprivation for 7 days. Tone exposure after auditory deprivation for 7 days made NR2B protein level increased significantly ($P < 0.05$). It showed bidirectional regulation of NMDA receptor subunit NB2B protein. No significant effects of auditory deprivation and tone exposure on the relative expression

level of NR2B protein of PND42 ($P > 0.05$) were found. The results indicated that, auditory deprivation and experience can modify the protein expression level of NMDA receptor subunit NR2B during the critical period of rat postnatal development. The findings provided important data to the study of the mechanisms for the developmental plasticity of sensory functions.

Key words rat, auditory cortex, NR2B, auditory deprivation, auditory experience, Western blotting

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30170313, 90208012, 30570595), Shanghai Rising-Star Program (05QMX1420), Shanghai ShuGuang Program (05SG28).

**Corresponding author . Tel: 86-21-62232775, E-mail: xdsun@bio.ecnu.edu.cn

Received: May 11, 2006 Accepted: July 3, 2006