

γ -羟丁酸钠对缺氧缺血后新生大鼠海马 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2B 亚基 mRNA 表达的影响

张 研, 马正良*, 曾因明, 于常州, 范建伟

(徐州医学院附属医院麻醉科 江苏省麻醉医学研究所, 江苏 徐州 221002)

摘要: 目的 探讨 γ -羟丁酸钠(GHB-Na)对缺氧缺血后脑损伤新生大鼠有无保护作用及 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2B 亚基(NR2B)与脑损伤的关系。方法 180 只 7 日龄 SD 乳大鼠, 随机分为 5 组(每组 36 只), 分别为假手术(Sham)对照组、生理盐水(NS)对照组、GHB-Na 50, 100 和 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。按 Rice 法制备缺氧缺血模型。Sham 组仅分离颈总动脉, 不结扎, 不缺氧。GHB-Na 组动物于缺氧缺血后立即腹腔注射 GHB-Na。Sham 组和 NS 组动物注射相同体积的生理盐水。以后每 8 h 一次。在术后 2, 6, 12, 24 h, 3 和 7 d 每组处死 6 只乳大鼠。应用逆转录-聚合酶链反应技术测定左侧海马组织中 NR2B mRNA 的表达, 并进行半定量分析。结果 与 Sham 组相比, NS 组术后 2 h, NR2B mRNA 的表达明显减少(约 20%); 在术后 6, 12, 24 h 和 3 d, NR2B mRNA 的表达没有明显变化; 术后 7 d, NR2B mRNA 的表达显著升高(约 94%)。与 NS 组相比, GHB-Na 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组在术后 6, 12, 24 h, 3 和 7 d, NR2B mRNA 的表达明显减少(分别减少约 27%, 45%, 19%, 31% 和 37%); 而 GHB-Na 50, 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的 NR2B mRNA 在这些时间点虽然也较 NS 组有不同程度的减少, 但差异多无显著意义。结论 GHB-Na 能有效抑制新生大鼠缺氧缺血后海马 NR2B mRNA 的表达, 特别是 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的抑制作用好于 50 和 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。

关键词: 海马; 缺氧; 缺血; 受体, *N*-甲基-*D*-天冬氨酸; γ -羟丁酸钠; 基因表达

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)03-0175-06

围生期窒息导致的新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是引起新生儿死亡和脑性瘫痪的主要原因。该病的发病机制涉及很多方面, 其中 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体(*N*-methyl-*D*-aspartate receptor, NMDAR)的毒性作用一直是人们关注的焦点。研究显示, HIBD 时脑组织中兴奋性氨基酸浓度增高, 激活 NMDAR 造成脑组织的严重损伤。NMDAR2B 亚基(NR2B)与发育和神经毒性的关系尤为密切^[1]。但 NMDAR 拮抗剂的临床疗效却不理想。近来有学者研究提出的兴奋-抑制假说认为^[2], 脑缺血后脑内 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的含量进行性下降, 内源性抑制性降低, 兴奋性毒性增加, 造成脑内兴奋-抑制失衡, 是脑缺血损伤的重要因素。而且, 有文献报道, GABA 可以治疗脑缺血后因兴奋性氨基酸大量释放引起的神经元损伤。 γ -羟丁酸钠(sodium γ -hydroxybutyrate, GHB-Na)是一毒性很低的催眠性静脉麻醉药, 主要作为麻醉诱导和维持时的辅助用药。作为 GABA 的中间代谢产物和抑制性递质, 其中枢抑制作用明显强于 GABA, 此外, GHB-Na 还有降低脑代谢率的作用, 因此推测其对脑缺血造成的神经损伤可能具有保护作用。已有研究初步发现, GHB-Na 对沙土鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[3], 但其对新生儿 HIBD 的影响如何, 至今尚未见报道。本实验观察 GHB-Na 对缺氧缺血后新生大鼠海马 NR2B mRNA 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验对象及分组

7 日龄 SD 乳大鼠 180 只, 雌雄不拘, 体重 10 ~

收稿日期: 2004-07-09 接受日期: 2005-03-02

基金项目: 江苏省卫生厅科研课题项目(Z200306)

作者简介: 张 研(1972-), 女, 山西省阳泉人, 主治医师, 硕士, 现在深圳市中医院麻醉科。E-mail: zhangy1009@163.com

*联系作者 现在南京大学医学院附属鼓楼医院麻醉科(210008) E-mail: mazhengliang1964@sina.com Tel: (025) 583304616

14 g, 由徐州医学院实验动物中心提供。分为 5 组, 每组 36 只, 分别为假手术(Sham)对照组、生理盐水(NS)对照组、GHB-Na 50, 100 及 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。

1.2 按 Rice 等法^[4]制备缺氧缺血模型

乙醚麻醉后颈正中切口, 结扎左侧颈总动脉, 缝合皮肤, 送回母鼠身边休息 2~3 h 后进行低氧处理: 将动物置于底部铺有 CO_2 吸收剂-钠石灰的 37℃ 恒温容器中, 给以 8% O_2 + 92% N_2 的混合气体, 2 h 后取出。Sham 组仅分离左侧颈总动脉, 不结扎不缺氧。

1.3 给药方法

GHB-Na 治疗组于缺氧后立即腹腔注射不同剂量的 GHB-Na, 每 8 h 一次(GHB-Na 用生理盐水稀释成所需浓度, 注射体积为 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$); Sham 和 NS 组于相同的时间腹腔注射等体积的生理盐水。

1.4 制备标本

将各组动物在术后 2, 6, 12, 24 h, 3 及 7 d 各时间点每组均断头处死 6 只乳大鼠, 取左侧海马组织约 25 mg, 冻存于 -80℃ 冰箱备用。

1.5 主要试剂及仪器

GHB-Na 购自上海旭东海普制药有限公司, 批号 020401; Access RT-PCR System 试剂盒、Total RNA Isolation System 试剂盒、琼脂糖、溴乙锭均为美国 Promega 公司产品; 焦碳酸二乙酯、Puc Mix Marker 为上海生工生物技术有限公司产品。Electrophoresis power Supply-EPS 3501 及 Image Master VDS 均为美国 Pharmacie Biotech 产品。Genecycler 为日本 Bio-Rad 产品。

1.6 引物设计

从 GenBank 中查出 SD 大鼠 NR2B 基因 cDNA 序列, 用 Primer Designer 软件设计引物。NR2B 引物序列为: 5'-GAG AAG AGG ACC CTG GAT ATT C-3' 和 5'-GGG AAC TAC TGA GAG ATG ATG G-3'。扩增产物片段为 295 bp。内参照为 G3PDH, 引物序列参考文献^[5]设计: 5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC-3' 和 5'-GCT GAC AAT CTT GAG GGA GT-3', 扩增片段为 437 bp。NR2B 引物由上海生工生物技术有限公司合成, G3PDH 由香港 Invitrogen 生命技术公司合成。

1.7 RT-PCR

1.7.1 RAN 的提取

取各组乳大鼠左侧海马组织约 25 mg, 置于 2 mL 玻璃匀浆器中, 立即加入 0.3 mL 预冷的变性液

匀浆, 匀浆后将匀浆液转移至 1.5 mL 的 EP 管中, 之后的步骤参照 Total RNA Isolation System 试剂盒说明进行。最后将提取的总 RNA 用 30 μL RNase-free H_2O 溶解, 立即进行反转录。并将所余 RNA 置于 -80℃ 冰箱冻存。提取的 RNA 波长在 1.7~1.9。

1.7.2 PCR

采用 Promega 公司的 Access RT-PCR system 试剂盒来进行。总反应体系为 50 μL , 包括: RNase-free H_2O 24 μL , AMV/Tfl 5 \times 反应缓冲液 10 μL , dNTPs 1 μL , 12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NR2B 上游和下游引物各 2 μL , 12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 G3PDH 上游和下游引物各 2 μL , 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgSO_4 2 μL , AMV 反转录酶 1 μL , Tfl DNA 聚合酶 1 μL , RNA 样品 3 μL 。阳性对照使用 Access RT-PCR system 试剂盒提供的对照上下游引物 2 μL 及阳性对照 RNA 3 μL , 阴性对照用无酶水代替 RNA 样品。混匀管内混合物后, 滴入 40 μL 矿物油覆盖表面。置 Genecycler 上进行反转录及 PCR 扩增, 经 48℃ 45 min 反转录, 94℃ 2 min 变性后, 跟随 35 次循环, 分别是 94℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 1 min, 68℃ 延伸 2 min。之后再经 68℃ 延伸 7 min。

1.7.3 PCR 产物电泳和相对表达量测定

取 PCR 产物 7 μL 与 2 μL 上样缓冲液通过 1% 琼脂糖凝胶(含 16.67% 溴乙锭), 在 80 mA 恒流下电泳约 30 min 后, 将凝胶置于 Image Master VDS(Pharmacie Biotech, USA), 用 Imager Master 1D Version 2.0 图像分析软件分析。PCR 产物量用光密度表示。以 NR2B 和内参照 G3PDH cDNA 条带的吸光度的比值作为 NR2B mRNA 的相对表达量。

1.8 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.0 统计软件包进行单因素方差分析。P < 0.05 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠出生后及缺氧缺血后 NR2B 的变化

7 d 的新生大鼠 NR2B mRNA 表达水平较高, 随着时间的推移, NR2B 逐渐减少。本实验中, Sham 组 6, 12, 24 h, 3 及 7 d 的 NR2B 较前一时间点的都有减少, 但只有 3 和 7 d 较前一时间点的 NR2B 明显减少, 其他则无统计学差异(图 1A, 表 1)。经缺血缺氧处理后(NS 组), NR2B mRNA 表达较自然生长状态下(Sham 组)的表达出现了降低(2 h)、恢复(6, 12, 24 h 及 3 d)到升高(7 d)的变化(图 1B, 表 1)。

2.2 γ -羟丁酸钠对缺氧缺血后新生大鼠 NR2B 表达的影响

GHB-Na $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 NR2B mRNA 在各时间点与 NS 组相比差异均无显著性; GHB-Na $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组除术后 2 h 外, 各时间点 NR2B mRNA 均较 NS 组明显减少(分别减少约 27%, 45%, 19%, 31% 和 37%); GHB-Na $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组除术后 6 和 12 h 外, NR2B mRNA 与 NS 组相比差异均无显著性(术后 6 和 12 h 较 NS 组明显减少, 分别减少约 18% 和 39%)。术后 6 和 12 h, GHB-Na $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组又较 GHB-Na $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组减少的多, 但两者间的差异无显著性(图 1C, 1D, 1E 及表 1)。

3 讨论

天然的 NMDAR 是由 NR1, NR2, NR3 三种亚基组成的异聚体^[6], 其中 NR2 影响受体对谷氨酸和甘氨酸的亲和力, 调节受体通道的活性。在 NR2 的 4 个亚基中, NR2B 是其中的优势亚基^[7]。Tovar 等^[8]证实, 海马或皮质的神经元在发育的早期表达 NR2B, 此时 NMDAR 主要是突触外的, 突触外受体

大部分是 NR1/NR2B 二聚体, NR2B 主要位于突触外位点。而且 Hardingham 等^[9]研究发现, 选择性刺激突触外的 NMDAR, 抑制了突触的功能, 促进了细胞的死亡。这些都说明 NR2B 与发育、神经毒性有着密切的关系。

本实验结果显示, NR2B 在出生后随着发育逐渐减少。此结果与文献报道相似^[10]。有研究发现, NR2B 的 mRNA 和多肽在生后 1 d 已经高表达, 几乎遍布整个脑组织。随着发育(3 周后), NR2B 逐渐降至成年水平并局限于前脑结构。在端脑, 海马是其最集中的免疫标记区域。但也有报道, 此段时间内 NR2B 是轻度增加的^[11]。本实验发现, 腹腔注射生理盐水的乳大鼠在缺氧缺血后 2 h, 海马 NR2B mRNA 的表达下降, 而 24 h 时 NR2B 的表达却没有变化, 与文献报道类似。Gurd 等^[11]在与本实验相同的模型上, 检测了缺氧缺血后 1 和 24 h 缺氧缺血侧海马 NR2B 的表达, 发现缺氧缺血后 1 h, 海马 NR2B mRNA 的表达下降, 24 h NR2B 的表达没有变化。但是缺氧缺血后 6 和 12 h 有关 NR2B mRNA 的变化却未见过报道。本实验还发现, 腹腔注射生理盐水

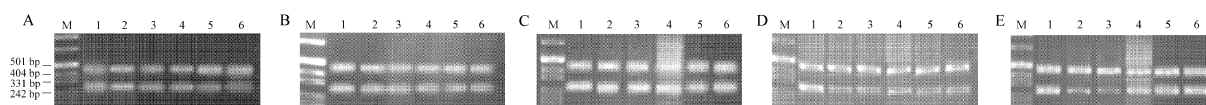


Fig 1. Expression of NR2B mRNA at different time. NR2B: *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2B subunit. A(Sham group): the left carotid artery was separated but not obturated, the same volume normal saline was administered ip in the same way as sodium gamma-hydroxybutyrate(GHB-Na) groups. B(Normal saline group): the same volume normal saline was administered ip after hypoxia in the same way as GHB-Na groups. C, D and E(GHB-Na 50, 100, 200): GHB-Na 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ was administered ip immediately after hypoxia every 8 h, respectively. NR2B: 295 bp, G3PDH: 437 bp. Lanes 1-6: the cells were treated for 2, 6, 12, 24 h and 3, 7 d, respectively.

Tab 1. Semi-quantitative analysis of RT-PCR results of NR2B mRNA in the neonatal rat left hippocampus

Group	$A_{\text{NR2B}} : A_{\text{G3PDH}}$					
	2 h	6 h	12 h	24 h	3 d	7 d
Sham	1.11 ± 0.18	1.07 ± 0.12	1.06 ± 0.09	1.06 ± 0.25	$0.77 \pm 0.23^{##}$	$0.53 \pm 0.06^{**}$
NS	$0.89 \pm 0.09^{\Delta\Delta}$	0.95 ± 0.14	1.06 ± 0.20	0.99 ± 0.06	0.83 ± 0.13	$1.02 \pm 0.19^{\Delta\Delta}$
GHB-Na 50	0.99 ± 0.11	1.00 ± 0.16	0.95 ± 0.17	0.96 ± 0.12	0.71 ± 0.21	$0.90 \pm 0.12^{\Delta\Delta}$
100	$0.93 \pm 0.02^{\Delta}$	$0.69 \pm 0.06^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.58 \pm 0.16^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.80 \pm 0.14^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.57 \pm 0.18^{\Delta}$	$0.64 \pm 0.25^{\Delta\Delta\Delta}$
200	1.03 ± 0.20	$0.78 \pm 0.14^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.65 \pm 0.16^{\Delta\Delta\Delta}$	0.91 ± 0.17	0.84 ± 0.12	$1.18 \pm 0.30^{\Delta\Delta}$

See Fig 1 for the treatment of every group. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. $^{##} P < 0.01$, compared with 24 h of sham group; $^{**} P < 0.01$, compared with 3 d; $^{\Delta} P < 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$, compared with corresponding time points of sham group; $^{\Delta} P < 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$, compared with corresponding time points of NS group.

的乳大鼠在缺氧缺血 7 d 时, NR2B mRNA 显著高于假手术组。这个结果与某些对成年大鼠脑缺血的结果大相径庭^[12]。有学者用原位杂交的方法, 在成年雌性 Wistar 大鼠大脑四血管阻断模型的实验中发现, 海马 CA1 区 NR2B mRNA 在术后 6 h 无变化, 而在术后 24 h, 3 及 7 d 却显著减少^[12]。之所以存在这样的差异, 作者认为这可能是与 NR2B 的发育阶段不同及实验检测的手段和方法存在差异有关。因此推测乳大鼠在缺氧缺血的后期(7 d), 脑组织中兴奋性氨基酸浓度增高, 激活了 NR2B, 使 NR2B 转录水平表达增加, 导致了 NR2B 的蛋白表达量上升, 从而激活了突触外的 NMDAR, 触发了“细胞死亡”通路。

但是, 作者还不知道乳大鼠在缺氧缺血急性期内(2 h) NR2B mRNA 表达下降的原因。而且缺氧缺血后一段时间内(6, 12, 24 h, 3 d) NR2B mRNA 没有明显变化, 并不表示缺氧缺血对 NR2B 没有影响, 有可能与另一些成年大鼠脑缺血模型中 NR2B 的变化相类似, 即缺血改变了 NR2B 的酪氨酸磷酸化水平而可能未影响受体亚基的数目^[13]。但是还有一个可能的原因是: NR2B 的变化是一个连续的过程, 是在前一基础上变化而来的, 而且是体内发育和缺氧缺血两种因素相互作用的结果。术后 6 和 12 h 时, 缺氧缺血造成的影响——兴奋性氨基酸浓度增高, 使 NR2B 转录水平表达增加的因素占优势, 发育因素造成的影响——使 NR2B 转录水平表达减少的因素占弱势, 两相消长, 使 NR2B 的表达在较低的基础上(2 h)升高, 而 Sham 组由于发育的影响 NR2B 逐渐减少, 所以 NS 与 Sham 组在数值的比较没有差异; 随着时间的推移(24 h, 3 d), 缺氧缺血造成的影响逐渐减弱, 发育的影响相对较强, NR2B 的表达在前一基础上逐渐减少, 但在数值上与 Sham 组的比较还是没有差异; 7 d 时, 缺氧缺血造成的影响出现了又一次高峰, 使 NR2B 的表达明显升高, 明显高于 Sham 组的水平。

本实验发现, GHB-Na 能抑制 HIBD 后 NR2B 的变化。腹腔注射 2 h 后, 3 个剂量组动物海马 NR2B mRNA 的表达与 NS 组相比没有统计学差异, 可能由于用药时间较短, 药物的作用还未充分体现出来, 所以在数值上没有统计学差异。在其余 5 个时间点(6 h 以后), GHB-Na 50 mg·kg⁻¹ 组与 NS 组相比也无统计学差异, 这可能是由于 50 mg·kg⁻¹ GHB-Na 药效较低, 对组织不足以产生影响; 100 mg·kg⁻¹ 组的

NR2B mRNA 明显低于 NS 组的; 200 mg·kg⁻¹ 组在 6 和 12 h 明显低于 NS 组。GHB-Na 抑制缺氧缺血对 NR2B 影响的作用在这 3 个剂量之间不呈剂量依赖性。综合这 6 个时间点的全部结果来看, 100 mg·kg⁻¹ 组的效果最好, 能明显抑制缺氧缺血对 NR2B 的影响(此结果与作者实验室同期进行的 GHB-Na 对缺氧缺血后新生大鼠海马 CA1 区神经元凋亡影响的研究结果相类似。研究发现, GHB-Na 100 mg·kg⁻¹ 能有效抑制新生大鼠海马 CA1 区神经元的凋亡); 50 mg·kg⁻¹ 组作用不大; 200 mg·kg⁻¹ 组短时间内(6 和 12 h)有抑制作用, 长时间应用(7 d)似乎还有加重缺氧缺血对 NR2B 影响的作用。推测存在这种结果的原因为: ①HIBD 时, 脑内的兴奋-抑制平衡被破坏, 外源性应用 GHB-Na 后, 增加了脑内抑制性递质的含量, 使缺氧缺血后被打破的兴奋-抑制平衡趋于恢复, 拮抗了谷氨酸的兴奋毒性, 减少了 NMDAR 的过度激活, 所以 GHB-Na 抑制了缺氧缺血后 NR2B mRNA 的变化; ②有研究显示, 脑缺血时多巴胺引起的损伤可能与激活 NMDAR 有关。而低浓度的 GHB-Na 可以作用于 GABA_B 受体使多巴胺的释放减少^[14]。这样一来, GHB-Na 就可以通过抑制多巴胺的释放而抑制 NMDAR 的激活, 所以 NMDAR 中的优势亚基-NR2B 的表达相应地减少了。GHB-Na 可能通过①和②提到的途径抑制了缺氧缺血后乳鼠海马 NR2B mRNA 的变化, 从而抑制了突触外 NMDAR 的激活, 在一定程度上抑制了“细胞死亡”通路。本实验中, GHB-Na 对 NR2B mRNA 表达的影响与剂量不成正相关: GHB-Na 100 mg·kg⁻¹ 组的作用最好。研究显示, GHB-Na 在抑制多巴胺释放的同时可以激活酪氨酸羟化酶使多巴胺的合成增加, 从而使多巴胺在神经末梢聚集^[15]。这可能是 200 mg·kg⁻¹ GHB-Na 对 NR2B mRNA 表达的影响反而不如 100 mg·kg⁻¹ 的原因之一。短时间应用高浓度的 GHB-Na, 多巴胺在神经末梢的聚集较少, 主要体现的是 GHB-Na 对 NR2B mRNA 的抑制作用, 所以 6 和 12 h 时 GHB-Na 200 mg·kg⁻¹ 组 NR2B mRNA 的表达与 NS 组相比也是减少的。随着时间的推移, 多巴胺在神经末梢聚集增多, 释放到突触间隙的多巴胺相应增加, 在一定程度上又激活了 NMDAR, 所以 24 h, 3 和 7 d 时 GHB-Na 200 mg·kg⁻¹ 组的 NR2B mRNA 的表达与 NS 组之间又没有明显差异了, 而且还有逐渐升高的趋势。本实验没有设计 GHB-Na 150 mg·kg⁻¹ 组, 所以推定 GHB-Na 对 NR2B mRNA 的影响与剂量

的关系还需要进一步的研究。并且 GHB-Na 对 HIBD 其他方面的影响及临床工作中的具体应用也都有待于进一步研究。

4 参考文献:

- [1] Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection[J]. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2001, **7**(1):56–64.
- [2] Madden KP. Effect of gamma-aminobutyric acid modulation on neuronal ischemia in rabbits[J]. *Stroke*, 1994, **25**(11):2271–2275.
- [3] Enz R, Cutting GR. Molecular composition of GABAC receptors[J]. *Vision Res*, 1998, **38**(10):1431–1441.
- [4] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, **9**(2):131–141.
- [5] Lai SK, Wong CK, Yang MS, Yung KK. Changes in expression of *N*-methyl-*D*-aspartate receptor subunits in the rat neostriatum after a single dose of antisense oligonucleotide specific for *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 1 subunit[J]. *Neuroscience*, 2000, **98**(3):493–500.
- [6] Dingledine R, Conn PJ. Peripheral glutamate receptors: molecular biology and role in taste sensation[J]. *J Nutr*, 2000, **130**(4S Suppl):1039S–1042S.
- [7] Gotz T, Kraushaar U, Geiger J, Lubke J, Berger T, Jonas P. Functional properties of AMPA and NMDA receptors expressed in identified types of basal ganglia neurons[J]. *J Neurosci*, 1997, **17**(1):204–215.
- [8] Tovar KR, Westbrook GL. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses *in vitro*[J]. *J Neurosci*, 1999, **19**(10):4180–4188.
- [9] Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways[J]. *Nat Neurosci*, 2002, **5**(5):405–414.
- [10] Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J 2nd, Hell JW, Wenthold RJ. A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses[J]. *J Neurosci*, 2000, **20**(3):1260–1271.
- [11] Gurd JW, Bissoon N, Beesley PW, Nakazawa T, Yamamoto T, Vannucci SJ. Differential effects of hypoxia-ischemia on subunit expression and tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor in 7- and 21-day-old rats[J]. *J Neurochem*, 2002, **82**(4):848–856.
- [12] Hsu JC, Zhang Y, Takagi N, Gurd JW, Wallace MC, Zhang L, *et al.* Decreased expression and functionality of NMDA receptor complexes persist in the CA1, but not in the dentate gyrus after transient cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, **18**(7):768–775.
- [13] Cheung HH, Takagi N, Teves L, Logan R, Wallace MC, Gurd JW. Altered association of protein tyrosine kinases with postsynaptic densities after transient cerebral ischemia in the rat brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, **20**(3):505–512.
- [14] Nissbrandt H, Elverfors A, Engberg G. Pharmacologically induced cessation of burst activity in nigral dopamine neurons: significance for the terminal dopamine efflux[J]. *Synapse*, 1994, **17**(4):217–224.
- [15] Maitre M. The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications[J]. *Prog Neurobiol*, 1997, **51**(3):337–361.

Effect of sodium gamma-hydroxybutyrate on expression of hippocampal *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2B subunit mRNA of hypoxic-ischemic neonatal rat

ZHANG Yan, MA Zheng-Liang*, ZENG Yin-Ming, YU Chang-Zhou, FAN Jian-Wei
(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Jiangsu Province
Institute of Anesthesiology, Xuzhou 221002, China)

Abstract: **AIM** To investigate if sodium gamma-hydroxybutyrate (GHB-Na) could protect neonatal rats from hypoxia-ischemia and the rela-

tionship between *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2B subunit (NR2B) expression and brain injury. **METHODS** One hundred and eighty Sprague

Dawley rat pups of either sex weighing 10 – 14 g eighty seven-day old were randomly assigned to 5 groups (36 pups in every group): sham operation (Sham) group, normal saline (NS) group, GHB-Na 50 mg · kg⁻¹, GHB-Na 100 mg · kg⁻¹ and GHB-Na 200 mg · kg⁻¹ groups. The procedure for the induction of hypoxia-ischemia was carried out as described by Rice, *et al.* The pups of Sham were only underwent left carotid artery separation. The pups of GHB-Na and NS were administered ip GHB-Na and saline respectively, immediately after hypoxia and then repeated every 8 h. Reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to analyze the expression of NR2B mRNA semi-quantificationally in the left hippocampus at 2, 6, 12, 24 h, and on 3 and 7 d after insulting. **RESULTS** Compared to Sham, expression of NR2B mRNA in NS was decreased by 20% at 2 h and increased significantly (about

94%) at 7 d. Compared to NS, the expression of NR2B mRNA in GHB-Na 100 mg · kg⁻¹ group was decreased by 27%, 45%, 19%, 31% and 37% at 6, 12, 24 h, and on 3 and 7 d after insulting, respectively. GHB-Na 50 and 200 mg · kg⁻¹ had no effects on the expression. **CONCLUSION** Systemically administration of GHB-Na 100 mg · kg⁻¹ after hypoxia-ischemia can effectively suppress change of NR2B in neonatal rat hippocampus.

Key words: hippocampus; hypoxia; ischemia; receptors, *N*-methyl-*D*-aspartate; sodium gamma-hydroxybutyrate; gene expression

Foundation item: The project supported by grant of Public Health Bureau of Jiangsu Province(Z200306)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)

(上接 174 页)

8. 会议前重要日程安排

会议注册日期: 即日起 ~ 10 月 12 日

会议论文摘要截止日期: 2005 年 8 月 1 日

会议提交论文最终日期: 2005 年 10 月 9 日

9. 会议注册费用 只限中国代表(RMB)

	2005.6.1 前	2005.9.1 前	2005.9.1 后
代表(全部)	800 RMB	1000 RMB	1200 RMB
代表(一天)	200 RMB	250 RMB	300 RMB
学生	500 RMB	600 RMB	700 RMB
伴随人员	300 RMB	350 RMB	400 RMB

10. 会议摘要、墙报和论文有关通知, 详见网站

会议选择其中优秀论文摘要制成正式学术论文, 分别在“Experimental Biology and Medicine”(IF 2.460)和“中国生物化学与生物物理学报”(IF 0.524)以专刊形式(英文版)发表。

11. 旅游 大会组织长城和故宫, 其他旅游详见网站。

12. 展览 会议同时将举办有关仪器、设备、试剂、药品和营养品的展示会, 详见网站。

13. 住宿 北京友谊宾馆, 详见网站。

因为这是首次在中国召开的有关 MT 会议, 又是一次国际盛会, 将有国际上许多著名专家、学者前来参加, 并作相关领域的热点专题报告, 欢迎国内外学者和有关公司、企业积极参加, 可详见网站, 可用以下方式索取第二轮通知。

MT-2005 会议筹备组: 北京大学生命中心楼 305 室, 100871

电话: 010-62756969/62751842

Fax: 010-62751842

E-mail: rulab@pku.edu.cn

网站: <http://www.MT-2005.org>

联系人: 韩铁钢, 茹炳根