

抑制谷氨酰胺合成酶对小鼠纹状体氨基酸类和单胺类递质含量的影响

郑 慧,宋南姗,丁建花,肖 明,胡 刚*

(南京医科大学基础医学院药理学系,江苏省神经退行性疾病重点实验室,江苏 南京 211166)

[摘要] **目的:** 探讨抑制谷氨酰胺合成酶对小鼠纹状体氨基酸类递质和单胺类递质稳态的影响。**方法:** 3月龄 C57BL/6J 小鼠,腹腔给予谷氨酰胺合成酶抑制剂 L-蛋氨酸磺酸盐 0.1 mL/10 g,隔日给药,持续 2 周。Western blot 方法检测纹状体谷氨酰胺合成酶以及谷氨酸转运体蛋白表达水平,高效液相色谱法检测纹状体谷氨酸、谷氨酰胺等氨基酸类递质和多巴胺、5-羟色胺等单胺类递质的含量。**结果:** 同生理盐水对照组相比,实验组小鼠纹状体谷氨酸转运体 1、谷氨酸天冬氨酸转运体表达上调,谷氨酰胺合成酶表达下调;谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸含量减少, γ -氨基丁酸、丝氨酸含量增加,而单胺类递质含量无明显变化。**结论:** 系统性给予谷氨酰胺合成酶抑制剂能影响脑内氨基酸类递质代谢的稳态,导致兴奋性神经递质谷氨酸水平下降,抑制性神经递质 γ -氨基丁酸水平上升,但对单胺类递质含量没有影响。

[关键词] 谷氨酰胺合成酶;谷氨酸; γ -氨基丁酸

[中图分类号] R338

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)04-389-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170401

Effects of glutamine synthetase inhibitor on the concentrations of amino acid neurotransmitters and monoamine neurotransmitters in the striatum of mice

Zheng Hui, Song Nanshan, Ding Jianhua, Xiao Ming, Hu Gang*

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Jiangsu Key Laboratory of Neurodegeneration, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of glutamine synthetase (GS) inhibitor on the homeostasis of amino acid neurotransmitters and monoamine neurotransmitters in the striatum of mice. **Methods:** Three-month-old C57BL/6J mice were intraperitoneally injected with glutamine synthetase inhibitor-methionine sulfoximine (MSO) for 2 weeks (0.1 mL/10 g, qod). The protein levels of GS and glutamate transporters were detected by Western blot. The concentrations of amino acid neurotransmitters (glutamic acid and glutamine) and monoamine neurotransmitters (dopamine and 5-hydroxytryptamine) in the striatum were measured by high performance liquid chromatography. **Results:** Compared with the saline control group, MSO effectively inhibited GS protein expression and increased the levels of glutamate transporters (glutamate transporter 1 and glutamate aspartate transporter) in the striatum. Mice with MSO injection exhibited lower levels of glutamate, glutamine and aspartic acid, and higher levels of γ -aminobutyric acid and serine, but showed no change in the concentrations of monoamine neurotransmitters. **Conclusion:** Systematical inhibition of glutamine synthetase could affect the homeostasis of metabolism of amino acid neurotransmitters in the brain of mouse, and lead to the decrease of the excitatory neurotransmitter glutamate level and the increase of inhibitory neurotransmitter γ -aminobutyric acid level.

[Key words] glutamine synthetase; glutamate; γ -aminobutyric acid

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(04): 389-393]

谷氨酸(glutamate, Glu)是中枢神经系统(central nervous system, CNS)内最主要的兴奋性神经递质,但当其含量病理性升高时,会导致神经元兴奋性毒性损伤、甚至死亡^[1]。此病理过程广泛存在于几乎所

有神经系统疾患中,包括癫痫、脑卒中、脑外伤以及帕金森、肌萎缩侧索硬化症等神经变性疾病^[2-5]。因此,维持脑内 Glu 的稳态,对于 CNS 正常生理功能的维持和相关疾病的治疗具有重要意义。

Glu 能神经元兴奋后,释放 Glu 到突触间隙,主要由星形胶质细胞通过谷氨酸转运体-1(glutamate transporter-1, GLT1)和谷氨酸天冬氨酸转运体(gluta-

[基金项目] 国家自然科学基金(81473196)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ghu@njmu.edu.cn

mate-aspartate transporter, GLAST)再摄取^[6]。被摄取的Glu经谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS), 转换成谷氨酰胺(glutamine, Gln); Gln作为Glu前体, 被星形胶质细胞传递给神经元, 再次转换成Glu, 从而构成Glu-Gln循环^[7-9]。GS特异性表达于星形胶质细胞, 对于Gln稳态的维持起着至关重要的作用^[10-11]。但是目前对于GS作用说法不一致。有研究表明, 抑制GS能降低肌萎缩侧索硬化模式小鼠的Glu水平, 起到保护作用^[12]。但也有研究表明, 下调GS, 星形胶质细胞保护功能降低, 加重兴奋性毒性^[13-14]。

纹状体作为基底核重要组成部分, 含有多种氨基酸以及单胺类递质的受体, 既能接受来自皮层的Glu, 也能释放 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)到黑质, 同时黑质释放的多巴胺(dopamine, DA)也作用于纹状体, 从而在自主运动调节方面发挥关键作用^[15]。所以我们选择纹状体作为研究部位。

L-蛋氨酸磺酸盐(methionine sulfoximine, MSO)是一种GS抑制剂, 可以透过血脑屏障。为了明确系统性抑制GS对中枢Glu及其相关代谢产物稳态的影响, 本研究给予小鼠腹腔注射MSO, 观察纹状体内GLT1、GLAST、GS表达变化, 以及Glu、GABA等氨基酸类神经递质和DA、5-羟色胺(serotonin, 5-HT)等单胺类神经递质水平。

1 材料和方法

1.1 材料

实验选用3月龄C57BL/6J遗传背景的野生型小鼠, 购自北京维通利华, 体重24~30 g。喂养标准饲料, 自由饮水, 室温保持在(24±2)°C, 控制室内湿度50%~60%, 通风良好, 每日光照与黑暗时间各12 h。所有实验经过南京医科大学动物保护与伦理委员会(IACUC)批准。

氨基酸类递质检测采用日本岛津HPLC-荧光测定系统; 单胺类递质检测采用Thermo ultimate 3000系统。单胺类以及氨基酸类标准品(Sigma公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备

小鼠适应环境3 d后, 随机分为实验组和正常对照组, 每组各10只。实验组腹腔注射MSO 0.1 mL/10 g体重(2 mg/mL, Sigma公司, 美国), 隔日给药, 持续2周^[16]。对照组给予0.1 mL/10 g体重的生理盐水。

1.2.2 组织蛋白提取

冰上快速断颈处死小鼠, 分离纹状体并称重, 加

1:10(M/V)RIPA蛋白裂解液, 超声, 冰上裂解40 min后, 4°C, 16 000 r/min, 离心15 min, 取上清, 按照1:4体积比加入5×上样缓冲液, 95°C变性5 min, -20°C保存。

1.2.3 Western blot 实验

30 μ g上样, 采用10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行恒压(80 V)电泳; 300 mA恒流湿转90 min使蛋白转至PVDF膜(Millipore公司, 美国)。5%脱脂奶粉封闭1 h。加入5%BSA-TBST配制的一抗: 鼠抗GS抗体(1:2 000, BD Biosciences公司, 美国), 兔抗GLAST(1:1 000, Millipore公司, 美国), 兔抗GLT1(1:1 000, Abcam公司, 美国), 兔抗GAPDH(1:4 000, Sigma公司, 美国), 4°C过夜, TBST洗膜3次, 加入对应二抗(1:1 000, KPL公司, 美国), 室温孵育1 h, TBST漂洗3次后加入ECL发光底物显色。使用Image Quant LAS 4000 mini显影系统显影(GE显影), Image J软件灰度分析, 以目的条带灰度值与内参GAPDH灰度值之比进行半定量。

1.2.4 高效液相检测氨基酸类递质及单胺类递质

小鼠脱颈椎处死后, 在冰上迅速分离纹状体并称重, 20 μ L/mg组织加入匀浆液(0.1 mol/L HClO₄, 0.1 mmol/L EDTA), 超声匀浆后, 4°C 20 000 r/min离心20 min。取上清置于-70°C冰箱中贮存待测。匀浆液样品中氨基酸类神经递质Glu、Gln、GABA、天冬氨酸(aspartic acid, Asp)、牛磺酸(taurine, Tau)、丝氨酸(serine, Ser)的检测采用日本岛津HPLC系统: SIL-20AC自动进样器, LC-10ADvp泵; RF-10A XL荧光检测器, 发射波长260 nm, 检测波长450 nm; 色谱柱: Agilent C18(250.0 mm×4.6 mm, 5 μ m; 预柱2 cm); 流速: 1.0 mL/min; 流动相A: 甲醇, 流动相B: 0.07 mol/L Na₂HPO₄·12H₂O、0.004 mol/L EDTA·2Na及1%(V/V)的三乙胺混合溶液, pH 6.0。衍生液为: 20 mmol/L OPA, 25 mmol/L 四硼酸钠, 2 mmol/L β -巯基乙醇, 50%甲醇(体积分数), pH 9.6。样品稀释100倍后自动进样16 μ L, 应用外标法计算上述样品中的氨基酸类神经递质的含量^[17]。

匀浆液样品中单胺类神经递质DA、双羟基乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、高香草酸(homovanillic acid, HVA)、5-HT、5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)的检测采用Thermo ultimate 3000系统, Ultimate 3000 Pump; Ultimate 3000 Autosample; Coulochem III Electrochemical Detector; C18柱(2.2 μ m, 2.1 mm×100 mm, 120 Å); Guard cell电压360 mV, ECD电压350 mV。柱温38°C, 流速: 0.2 mL/min, 进样10 μ L。流动相: NaH₂PO₄(90

mmol/L), 柠檬酸 (50 mmol/L), OSA (1.7 mmol/L), EDTA·2Na(50 μmol/L), 乙腈(体积分数 0.05), 抽滤并脱气, 流速 0.2 mL/min。变色龙软件采集分析数据, 采用外标法计算样品中的神经递质含量。

上述样品的检测均在标准品测定结果显示线性与重现性均良好的情况下再开始。检测结果显示氨基酸类递质中 Glu、Gln、GABA、Asp、Tau、Ser 以及单胺类递质中 DA、DOPAC、HVA、5-HT、5-HIAA 均分离良好, 基本达基线分离, 且峰形对称。

1.3 统计学方法

数据均用均数±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示, 用 SPSS17.0 软件进行统计分析。组间比较采用 Student-*t* 检验, 双侧检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腹腔给予 MSO 对小鼠纹状体内 GS、GLT1 和 GLAST 蛋白表达的影响

同对照组相比, MSO 组纹状体 GS 表达明显下

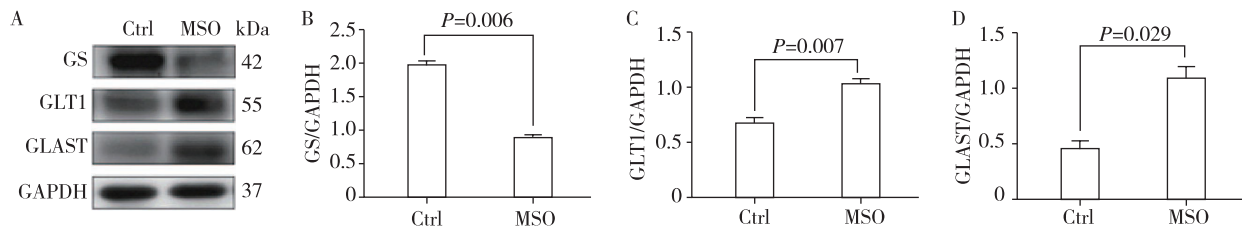
调, 提示造模成功。另外, 实验组 GLT1 和 GLAST 较对照组表达上调(图 1)。

2.2 腹腔给予 MSO 对小鼠纹状体内氨基酸类递质的影响

同对照组相比, MSO 组纹状体 Glu、Gln 水平下降, 而 GABA 水平上升(图 2A~C)。我们还检测了纹状体内其他氨基酸的水平, Asp 含量减少, Tau 无明显变化, 而 Ser 含量明显增加(图 2D~F)。兴奋性氨基酸 Glu、Asp 与抑制性氨基酸 GABA、Tau 比例下调 72.57%。

2.3 腹腔给予 MSO 对纹状体单胺类递质的影响

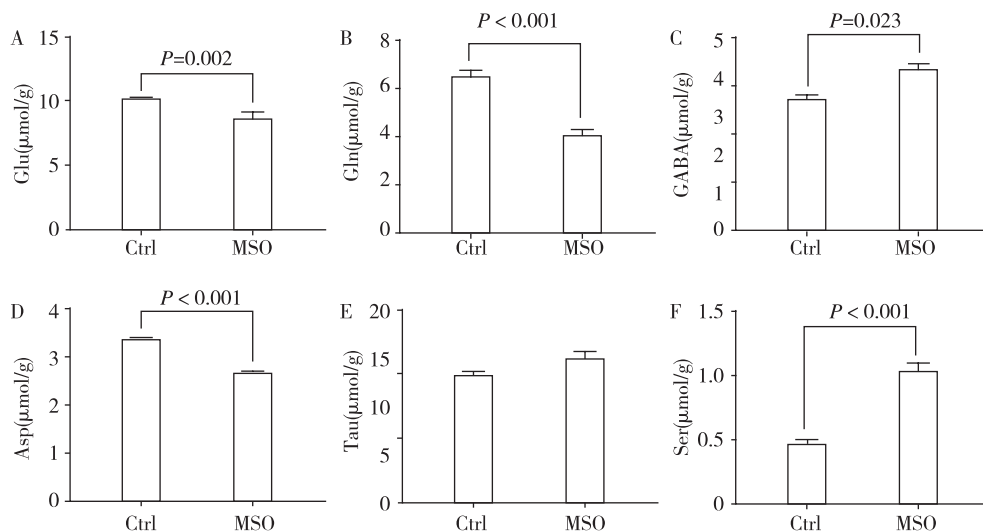
纹状体内 Glu、GABA 以及 DA 在调控运动过程中保持动态平衡^[15]。因此除了 Glu 和 GABA 还研究了腹腔给予 MSO 对纹状体内 DA 和其他单胺类递质含量的影响。同对照组相比, MSO 组纹状体 DA 及其代谢产物 DOPAC、HVA 含量无明显改变(图 3A~C)。5-HT 及其代谢产物 5-HIAA 含量也无明显变化(图 3D~E)。



A: GS、GLT1、GLAST 的典型 Western blot 蛋白条带; B-D: GS、GLT1、GLAST 蛋白的半定量分析结果 ($n=4$)。

图 1 MSO 组和对照组纹状体 GS、GLT1、GLAST 蛋白表达水平

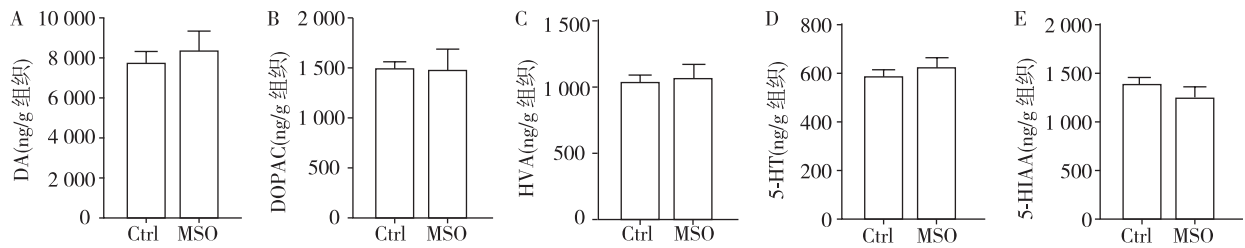
Figure 1 Levels of GS, GLT1 and GLAST protein expression in the striatum between the MSO group and the control group



高效液相色谱法检测纹状体氨基酸类递质的含量, $n=6$ 。

图 2 MSO 组和对照组纹状体氨基酸类递质的含量

Figure 2 Comparison of neurotransmitter amino acids contents in the striatum between the MSO group and the control group



高效液相色谱法检测纹状体单胺类递质的含量, $n=6$ 。

图 3 MSO 组和对照组纹状体单胺类递质的含量

Figure 3 Contents of monoamine transmitters in the striatum between the MSO group and the control group

3 讨论

生理状态下, CNS 内兴奋性的神经递质如 Glu、Asp 和抑制神经递质如 GABA、Tau 的代谢处于动态平衡, 从而使神经元保持稳定的自发放电状态, 调节机体的功能活动与执行。

有文献报道, MSO 可以用于治疗高氨血症和兴奋性毒性^[18-19]。与本研究结果相似, 肌萎缩侧索硬化小鼠长期腹腔注射 MSO, 可以使脑内 Glu、Gln 含量减少, 并延长存活时间^[16], 但本研究结果显示给予 MSO 可增加纹状体内 GABA 含量。而肌萎缩侧索硬化小鼠 GABA 含量并无明显变化, 这可能与该模式动物自身 GABA 含量减少有关。

兴奋性氨基酸转运体 (excitatory amino acid transporter, EAAT) 为维持正常兴奋性突触的转运及受体活化所必须, 目前发现 5 种亚型 EAAT1~5^[20]。EAAT1 和 EAAT2(啮齿类动物分别为 GLAST、GLT1) 是胶质细胞 Glu 转运体^[21], EAAT3 和 EAAT4 表达在神经元上^[22-23], EAAT4 主要表达在小脑浦肯野细胞^[23], EAAT5 则在视网膜感光细胞、双极细胞均有表达^[24]。脑内 Glu 转运主要由胶质细胞负责。纹状体给予 MSO 后, 小鼠 GLT1 和 GLAST 表达都上调。提示模型组星形胶质细胞上调 GLT1、GLAST 以增加对底物 Glu 的摄取, 从而部分代偿因 GS 被抑制后 Gln 的生成。

由于脑内大量的 Glu 来自于星形胶质细胞通过 GS 生成的 Gln 合成而来, 所以抑制 GS 后, Glu 水平下降。GABA 是脑内重要的抑制性氨基酸, Glu 在谷氨酸脱羧酶作用下可生成 GABA, GABA 能神经元释放的 GABA, 经 GABA 转氨酶的作用下又可产生 Glu, 形成 Gln-Glu/GABA 循环^[7], GABA 水平上调可能是一种代偿机制。腹腔给予 MSO, 抑制 GS 表达, 兴奋性氨基酸含量减少, 抑制性氨基酸含量增加, 为进一步探索减轻谷氨酸过量引起的兴奋性毒性提供新的线索。

基底核包括纹状体、苍白球、丘脑底核、黑质(网状部致密部)^[25]。基底神经节有 3 条通路调节运动功能, 分别是直接通路、间接通路以及多巴胺投射通路。直接通路和间接通路投射的递质主要是兴奋性氨基酸 Glu 和抑制性递质 GABA。多巴胺投射通路是由黑质的多巴胺能神经元发出纤维到尾壳核 (caudate putamen nucleus, CPU), 对 CPU 的神经元起两种不同作用。一种是作用于 CPU 的多巴胺 D1 受体, 对直接通路起兴奋作用; 另一种作用于 CPU 的多巴胺 D2 受体, 对间接通路发挥去抑制作用^[26]。

尽管阻断 Glu-Gln 循环可能会影响单胺类递质的水平^[27], 但本研究结果显示其并不影响纹状体的 DA、DOPAC、HVA、5-HT、5-HIAA 递质水平。但不能排除抑制 GS 后对包括中脑黑质和大脑皮层单胺类递质含量的影响。

综上所述, 腹腔给予 MSO 能影响纹状体内氨基酸类递质代谢的稳态, 抑制 Glu、GS、Gln 的水平, 而上调 GLT1、GLAST 蛋白水平, 并导致抑制性神经递质 GABA、Ser 含量增加, 而单胺类递质 DA、5-HT 表达并没有变化。本研究让我们进一步了解 GS 在 Gln-Glu/GABA 循环中作用, 但要通过调节 GS 表达治疗兴奋性毒性引起的神经系统疾患, 还有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway [J]. *Nature*, 1998, 396 (6711): 584-587
- [2] Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, et al. Neuroprotection in acute stroke targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(8): 869-881
- [3] Vishnoi S, Raisuddin S, Parvez S. Glutamate excitotoxicity and oxidative stress in epilepsy: modulatory role of melatonin [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2016, 35(4): 365-374

- [4] Litim N, Morissette M, Di Paolo T. Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets in Parkinson's disease: An update from the last 5 years of research[J]. *Neuropharmacology*, 2016(16): 30103-30108
- [5] Bonifacino T, Musazzi L, Milanese M, et al. Altered mechanisms underlying the abnormal glutamate release in amyotrophic lateral sclerosis at a pre-symptomatic stage of the disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 95: 122-133
- [6] Amara SG, Fontana AC. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate[J]. *Neurochem Int*, 2002, 41(5): 313-318
- [7] Walls AB, Waagepetersen HS, Bak LK, et al. The glutamine-glutamate/GABA cycle: function, regional differences in glutamate and GABA production and effects of interference with GABA metabolism[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(2): 402-409
- [8] Knott ME, Dorfman D, Chianelli MS, et al. Effect of angeli's salt on the glutamate/glutamine cycle activity and on glutamate excitotoxicity in the hamster retina[J]. *Neurochem Int*, 2012, 61(1): 7-15
- [9] Bernstein HG, Tausch A, Wagner R, et al. Disruption of glutamate-glutamine-GABA cycle significantly impacts on suicidal behaviour: survey of the literature and own findings on glutamine synthetase[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, 2(7): 900-913
- [10] Rose CF, Verkhratsky A, Parpura V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(6): 1518-1524
- [11] Kulijewicz-Nawrot M, Syková E, Chvátal A, et al. Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex [J]. *ASN Neuro*, 2013, 5(4): 273-282
- [12] Ghoddoussi F, Galloway MP, Jambekar A, et al. Methionine sulfoximine, an inhibitor of glutamine synthetase, lowers brain glutamine and glutamate in a mouse model of ALS [J]. *J Neurol Sci*, 2010, 290(1/2): 41-47
- [13] Zou J, Wang YX, Dou FF, et al. Glutamine synthetase-down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons[J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(4): 577-584
- [14] Shaked I, Ben-Dror I, Vardimon L. Glutamine synthetase enhances the clearance of extracellular glutamate by the neural retina[J]. *J Neurochem*, 2002, 83(3): 574-580
- [15] Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1995, 20(1): 91-127
- [16] Ghoddoussi F, Galloway MP, Jambekar A, et al. Methionine sulfoximine, an inhibitor of glutamine synthetase, lowers brain glutamine and glutamate in a mouse model of ALS [J]. *J Neurol Sci*, 2010, 290(1/2): 41-47
- [17] Guo J, Saiki T, Thanutchaporn K, et al. Elution profile of di-peptides on a sulfonated Ethylstyrene-Divinylbenzene copolymer resin column by high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Sci*, 2015, 31(1): 45-50
- [18] Warren KS, Schenker S. Effect of an inhibitor of glutamine synthesis (methionine sulfoximine) on ammonia toxicity and metabolism [J]. *J Lab Clin Med*, 1964, 64(3): 442-449
- [19] Jambekar AA, Palma E, Nicolosi L, et al. A glutamine synthetase inhibitor increases survival and decreases cytokine response in a mouse model of acute liver failure [J]. *Liver Int*, 2011, 31(8): 1209-1221
- [20] Danbolt NC. Glutamate uptake [J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 65(1): 1-105
- [21] Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, et al. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(3Pt1): 1835-1853
- [22] Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, et al. The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(17): 6000-6013
- [23] Jiang NW, Wang DJ, Xie YJ, et al. Downregulation of glutamate transporter EAAT4 by conditional knockout of *Rheb1* in cerebellar Purkinje cells [J]. *Cerebellum*, 2016, 15(3, SI): 314-321
- [24] Lee A, Anderson AR, Stevens M, et al. Excitatory amino acid transporter 5 is widely expressed in peripheral tissues [J]. *Eur J Histochem*, 2012, 57(1): 66-71
- [25] Bouabid S, Tinakoua A, Lakhdar-Ghazal NA. Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission [J]. *J Neurochem*, 2016, 136(4): 677-691
- [26] Gerfen CR, Young WS. Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study [J]. *Brain Res*, 1988, 460(1): 161-167
- [27] Gleich T, Deserno L, Lorenz RC, et al. Prefrontal and striatal glutamate differently relate to striatal dopamine: potential regulatory mechanisms of striatal presynaptic dopamine function? [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(26): 9615-9621