

新型镇静催眠化合物 YZG-331 对谷氨酸及其受体的调节及机制研究

方金玉, 刘伟, 于凤婷, 石建功, 张建军*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 新药作用机制研究和药效评价北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 本研究主要探究了新型腺苷类衍生物 YZG-331 对小鼠额叶皮层谷氨酸 (glutamate, Glu) 含量及其受体 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 (*N*-methyl-*D*-aspartate receptor, NMDAR) 的影响。动物实验均获得中国医学科学院药物研究所伦理委员会批准。采用脑微透析取样技术和高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测小鼠额叶皮层组织匀浆和细胞外液中的 Glu 含量; Western blot 和蛋白质免疫共沉淀技术检测小鼠额叶皮层中 NMDAR 在细胞膜上和内体中的表达量, 以及引起 NMDAR 内吞相关蛋白的表达量及相互作用。研究结果显示, 在灌胃给予 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹) 后小鼠额叶皮层组织匀浆中 Glu 含量与溶剂对照组相比无统计学差异, 在 0~0.5 h 和 0.5~1 h 两个时间段的小鼠额叶皮层透析液中 Glu 含量也无明显变化。给予 YZG-331 15 min 后小鼠额叶皮层细胞膜上 NMDAR 亚基 NR1 与 NR2B 的表达量均下调, 额叶皮层细胞内体的 NR1 和 NR2B 蛋白表达量显著增加, 额叶皮层组织中 NMDAR 亚基 NR2B 磷酸化水平显著上升; 同时用 NR2B 作为诱饵蛋白的免疫共沉淀结果显示小鼠额叶皮层组织的 NR2B 和突触后致密蛋白 95 (postsynaptic density-95, PSD95) 免疫沉淀复合物中 PSD95 表达量显著降低。以上研究结果表明, 化合物 YZG-331 对额叶皮层组织和细胞外液中 Glu 含量均无影响, 但通过上调额叶皮层组织 NR2B 的磷酸化水平, 减弱了 NR2B 与突触后致密蛋白 PSD95 的相互作用, 降低了 NMDAR 的膜稳定性, 促进了 NMDAR 的内吞, 导致兴奋信号传导减少。这可能是其发挥其镇静催眠作用的机制之一。

关键词: YZG-331; 谷氨酸; *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体; 前额叶皮层; 微透析; 镇静催眠

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)05-0877-07

Regulatory effect and mechanism of novel sedative hypnotic compound YZG-331 on glutamate and its receptor

FANG Jin-yu, LIU Wei, YU Feng-ting, SHI Jian-gong, ZHANG Jian-jun*

(Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: This study investigated the effect of a novel adenosine derivative YZG-331 on the glutamate (Glu) content and its receptor *N*-methyl-*D*-aspartate receptor (NMDAR) in mouse frontal cortex. All procedures in this research were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the Glu contents in the mouse frontal cortex tissue homogenate and extracellular fluid which were collected by brain microdialysis method. Western blot and co-immunoprecipitation methods were used to detect the expressions of NMDAR in cell membranes and endosomes, as well as the expression levels of endocytosis-related proteins and their interaction. The results showed that there was no significant change in Glu content in the dialysates from mouse frontal cortex within 0–0.5 h period and 0.5–1 h period after intragastric administration of YZG-331 (40 mg·kg⁻¹). Compare to the control group, the Glu content in mouse frontal cortex homogenates has no significant

收稿日期: 2020-01-14; 修回日期: 2020-02-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773715, 81630094); 国家科技重大新药创制专项 (2018ZX09711001-001-012).

*通讯作者 Tel: 86-10-63182392, E-mail: jjzhang@imm.ac.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0051

statistical differences after 15 minutes of administration of compound YZG-331. YZG-331 significantly decreased the expressions of NMDAR subunits NR1 and NR2B in the mouse frontal cortex cell membrane, meanwhile significantly increased the expressions of NR1 and NR2B proteins in the frontal cortex endosomes. It also increased the phosphorylation levels of NMDAR subunit NR2B in the frontal cortex. In addition, the result of co-immunoprecipitation which used NR2B as bait protein showed that the expression of postsynaptic density-95 (PSD95) in NR2B and PSD95 immunoprecipitation complexes in mouse frontal cortex tissues was significantly reduced. These results indicate that YZG-331 does not affect the Glu content in mouse frontal cortex, but it weakens the interaction between NR2B and PSD95 by increasing the phosphorylation level of NR2B in the mouse frontal cortex. Therefore, it reduces the membrane stability of NMDAR and promotes NMDAR's endocytosis, which leading to the decrease of excitatory transmission. It may be one of the mechanisms of YZG-331 to exert sedative and hypnotic effects.

Key words: YZG-331; glutamate; *N*-methyl-*D*-aspartate receptor; frontal cortex; microdialysis; sedation and hypnosis

传统的镇静催眠药物作用在 γ -氨基丁酸 A 型 ($GABA_A$) 受体上, 通过增加氯离子通道开放频率或延长开放时间, 进而增加氯离子内流, 导致皮层神经元超极化从而发挥镇静催眠作用, 但临床上常见停药反跳、耐受和依赖成瘾等不良反应^[1]。YZG-331 是中国医学科学院药物研究所所以临床疗效确切的安神中药天麻为起点, 通过药物化学和药理学紧密结合研究, 深入追踪发掘天麻中的微量有效成分, 经过进一步结构修饰得到的新型腺苷类衍生物, 结构见图 1。前期本实验室研究发现, 灌胃给予 YZG-331 ($1.25 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 可剂量依赖性地抑制小鼠的自主活动, 显著延长阈上剂量戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠时间、缩短入睡潜伏期及增加阈下剂量戊巴比妥诱导的小鼠入睡率, 且 $GABA_A$ 受体拮抗剂氟马西尼和荷包牡丹碱均不能拮抗 YZG-331 的镇静催眠作用^[2], 提示 YZG-331 有较强的镇静催眠作用和有别于传统镇静催眠药物的作用靶点。因此, 阐明其作用机制对研发新型镇静催眠药物具有重大意义。

基于 YZG-331 是腺苷类衍生物, 本实验室前期探究了 YZG-331 是否通过腺苷受体发挥作用。开场实验结果表明腺苷 A_{2a} 受体拮抗剂 SCH-58261 不能拮抗 YZG-331 的镇静催眠作用, 腺苷 A_1 受体拮抗剂 8-环戊基-1,3-二丙基黄嘌呤 (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, DPCPX) 可以部分拮抗 YZG-331 对小鼠自主活动的抑制作用。体外受体配体结合实验表明, YZG-331 与腺苷 A_1 受体的 K_i 值为 $2.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上结果提示, YZG-331 可能是多靶点镇静催眠类化合物, 可以通过腺苷 A_1 受体发挥一定作用, 但其作用靶点不仅仅是腺苷 A_1 受体。谷氨酸 (glutamate, Glu) 作为脑内含量最高、分布最广、作用最重要的兴奋性神经递质, 在睡眠觉醒中的核心作用是在清醒和快动眼睡眠时维持皮层的兴奋状态^[3,4]。*N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 (*N*-

methyl-*D*-aspartate receptor, NMDAR) 是一种重要的离子型 Glu 受体, 当 Glu 与膜上的 NMDAR 结合时会兴奋神经元, 已有研究表明某些 NMDAR 拮抗剂具有镇静麻醉作用, 如 Ketamine^[5]。故本研究探究了 YZG-331 对小鼠额叶皮层 Glu 含量及其受体 NMDAR 的影响。

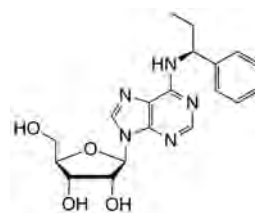


Figure 1 Chemical structure of YZG-331

材料与方法

动物 SPF 级 ICR 小鼠, 雄性, 体重 $18 \sim 22 \text{ g}$, 购于北京斯贝福实验动物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2016-0002。动物在实验环境中适应 3 天, 环境温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度 $40\% \sim 70\%$, 自由饮水和进食。动物实验均获得中国医学科学院药物研究所伦理委员会批准。

仪器 微透析套管和探针 (MD-2211, 美国 BASi 公司); 高效液相色谱泵 (LC-10A, 日本岛津公司); 电化学检测器 (LC-4C, BSA 公司); 色谱柱 (Diamonsil C18, $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, 北京迪马科技有限公司); 酶标仪 (MQX200 型, 美国 Bio-Tek 公司); DYY-7C 型电泳仪 (北京六一厂); ECL 发光仪 (Image Quant LAS 4000 型, 美国 GE 公司); 磁力架 (自制)。

药品和试剂 化合物 YZG-331 [N6-(4-hydroxybenzyl) adenosine riboside] 由中国医学科学院药物研究所植化室提供 (批号: 201110718); 邻苯二甲醛 (OPA, Sigma 公司); Minute™ 质膜蛋白和细胞组分分离

试剂盒 SM005、Minute™内体和细胞组分分离试剂盒 ED-028 和 Minute™变性蛋白溶解液 WA-009 [英文特生物技术(北京)有限公司]; Protein A Magnetic Beads (Millipore Sigma 公司); RIPA 裂解液(强)(碧云天生物技术研究所); BCA 蛋白浓度检测试剂盒(康为世纪生物技术有限公司); 5×蛋白上样缓冲液、蛋白磷酸酶抑制剂混合物、四甲基乙二胺(TEMED)(北京普利莱基因技术有限公司); 三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、过硫酸铵、蛋白酶抑制剂、十二烷基苯磺酸钠(SDS)(美国 Amresco 公司); 苯甲基磺酰氟(PMSF, 德国默克公司); 30% 丙烯酰胺(北京兰博利德商贸有限公司); 化学发光 ECL 液(上海天能科技有限公司); 抗 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)(GluN1) 抗体(D65B7)(Cell Signaling Technology 公司); 抗 NMDAR2B(phospho S1303) 抗体(ab81271)、抗 NMDAR2B 抗体(ab65783)(Abcam 公司); 抗 PSD95 抗体(48638)、抗 EEA1 抗体(21601)(Signalway Antibody 公司); 兔 IgG(A7061)(碧云天试剂公司); 抗 β -tubulin 抗体(ab1017t)[博奥瑞京(北京)科技发展有限公司]; 抗 Na/K ATPase 抗体(14418-1-AP)(Proteintech 公司)。其他试剂均为国产分析纯, 购于北京化工试剂公司。

高效液相-电化学法检测脑组织中 Glu 含量 ICR 小鼠随机分为2组, 溶剂对照组和 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹) 组, 每组8只。灌胃给予0.5% 羧甲基纤维素钠溶液或化合物 YZG-331。将其置于安静环境中, 给药 15 min 后脱颈取脑, 冰上分离前额叶皮层, 称重。组织样品称重后按 1:10 (w/v) 比例向组织中加入预冷的 0.6 mol·L⁻¹ 高氯酸溶液, 利用超声破碎, 功率 250 W, 3 s/次, 间隔 10 s, 反复 2~3 次, 在 4 °C 条件下 10 000 ×g 离心 20 min。取上清液与其 1/2 体积的缓冲溶液(柠檬酸钾 20 mmol·L⁻¹、EDTA·2Na 2 mmol·L⁻¹、磷酸氢二钾 300 mmol·L⁻¹) 混合均匀, 4 °C 条件下 10 000 ×g 离心 20 min。取上清液, 按 1:2 比例加入 OPA 衍生化试剂, 冰上反应 2 min 后进样检测。根据标准品计算组织内 Glu 含量, 得到 YZG-331 相对于溶剂对照组引起的 Glu 含量变化。检测条件: 流速 1.2 mL·min⁻¹、检测灵敏度 500 nA 和电化学检测器工作电压 0.6 V。

微透析法测皮层细胞外液 Glu 含量 腹腔注射 5% 水合氯醛 (0.07 mL·g⁻¹) 麻醉动物, 放在立体定向仪上, 准备手术。头顶局部剃毛后, 用 75% 酒精消毒颅骨上方皮肤, 切开颅骨上方皮肤, 暴露颅骨顶部。用含 3% H₂O₂ 棉花棒从颅骨上刮下结缔组织, 以前囟为零点按坐标钻一个小孔下套管: 前囟+2.4 mm, 中缝+1 mm, 颅骨平面-2 mm (图 2A)。恢复饲养 1 周后, 下探针以 1 μ L·min⁻¹ 速度进行微量透析。每 30 分钟收集 1 管透

析液, 2 h 后给予 YZG-331, 此时作为 0 点, 此前 30 min 内收集的透析液作为基准。收集灌胃给予溶剂的连续 2 管透析液作为对照, 然后给予 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹, ig), 连续收集 2 管透析液, 将透析液按照 1:1 比例加入 OPA 衍生化试剂, 冰上反应 2 min 后进样检测。根据标准品计算透析液中 Glu 含量, 得到 YZG-331 引起组织间隙 Glu 含量变化率。检测条件: 流速 1 mL·min⁻¹、检测灵敏度 10 nA 和电化学检测器工作站电压 0.6 V。

总匀浆蛋白提取 ICR 小鼠随机分为两组: 溶剂对照组和 YZG-331 组, 每组 4 只, 灌胃给予溶剂或化合物 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹) 后将其置于安静环境中, 15 min 后脱颈取脑, 冰上分离前额叶皮层, 称重。RIPA 裂解液中加入 1×蛋白酶抑制剂、1×磷酸酶抑制剂混合物和 1×PMSF 混合放入冰中备用, 样品称重后按 1:10 (w/v) 比例向组织中加入相应体积的 RIPA 裂解液, 在冰浴条件下超声破碎, 功率 250 W, 3 s/次, 间隔 10 s, 反复 2~3 次, 之后置于冰上 10 min 使蛋白充分裂解, 在 4 °C 条件下 12 000 ×g 离心 20 min, 离心后取蛋白上清液。

膜蛋白提取 将适量冷冻的组织放置于预冷的离心管柱上。加入 200 μ L 缓冲液 A (含 1×蛋白酶抑制剂、1×磷酸酶抑制剂混合物、1 mmol·L⁻¹ PMSF), 于冰上用塑料棒反复扭转研磨组织 1 min, 再加入 300 μ L 缓冲液 A, 用吸头吹打几次后, 开盖冰上孵育 5 min。盖上盖子, 16 000 ×g 离心 1 min (使用 10 s 内达到离心力的台式离心机), 弃去离心管柱, 涡旋大力震荡 10 s 重悬细胞, 700 ×g 离心 1 min (沉淀是完整的细胞核)。将上清转移到新的 1.5 mL 离心管中, 在 4 °C 下 16 000 ×g 离心 30 min, 弃去上清(胞浆组分), 保存沉淀(总膜蛋白组分包括细胞器和质膜)。加入 200 μ L 缓冲液 B, 用吸头反复吹打并涡旋震荡重悬总膜蛋白组分, 4 °C、7 800 ×g 离心 5 min, 沉淀部分为细胞器。将上清液小心转移到 2 mL 离心管中, 加入 1.6 mL 预冷的 PBS 混匀几次, 16 000 ×g 离心 30 min。弃去上清液, 保存沉淀(质膜蛋白), 沉淀加入 Minute™变性蛋白溶解液 50 μ L, 使样品充分溶解。

内体蛋白提取 将 10~30 mg 冰冻组织样品放置于离心管柱上, 加 200 μ L 缓冲液 A, 用塑料棒反复挤压扭转研磨 1 min。再加入 300 μ L 缓冲液 A 到离心柱里, 用移液器上下吹打几次, 开盖冰上孵育 5 min。盖上盖子, 16 000 ×g 离心 30 s, 弃去离心管柱, 将收集管的液体涡旋振荡混匀 10 s, 700 ×g 离心 2 min (沉淀为完整的细胞核和一些未破裂的细胞)。将上清转移至 1.5 mL 离心管中, 4 °C、16 000 ×g 离心 60 min。离心后, 再次将上清转移至离心管中(沉淀为大的细胞器和质膜)。估算管中溶液体积, 加入一半体积的缓冲液 B, 振荡混

匀, 4 °C 孵育过夜。4 °C、10 000 ×g 离心 30 min, 弃掉上清(胞浆组分), 沉淀即是内体。加入 Minute™ 变性蛋白溶解液 50 μL, 震荡, 使样品充分溶解。

蛋白质免疫印迹 使用 BCA 法测定待检测蛋白浓度, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后沸水浴 5 min, 采用等量上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜, 用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭膜 1 h 后, TBST 洗涤 2 次, 每次 5 min; 将膜放于 TBST 稀释的一抗中, 4 °C 孵育过夜; 回收一抗, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 将膜放于 TBST 稀释的二抗中(二抗按 1:5 000 稀释), 室温震荡孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 每次 5 min; 在 PVDF 膜中滴加配好的 ECL 发光液, 利用化学发光成像系统采集化学发光图像。用 Quantity One 软件处理目的蛋白条带。

蛋白质免疫共沉淀 将分离好的脑皮质组织加入适量预冷的细胞裂解缓冲液, 并加入蛋白酶抑制剂, 冰上裂解 30 min, 12 000 ×g 离心 10 min, 取上清。留取少量上清液作为 Input 对照, 再取上清液 500 μL, 加入 2 μg 一抗进行免疫沉淀, 4 °C 缓慢摇晃, 孵育过夜。取 Protein A Magnetic Beads 50 μL, 用裂解液洗 3 次, 每次摇晃混匀 5 min, 用磁力架收集磁珠, 将与抗体孵育过夜的组织上清裂解液加入, 4 °C 缓慢摇晃 5 h, 使磁珠与抗体充分结合, 进行免疫沉淀反应。反应后弃磁珠, 免疫沉淀复合物存留, 待 Western blot 检测。

数据统计和分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Graph-Pad Prism 6.01 统计分析软件进行数据统计学差异分析, 使用软件中 Student's *t*-test 方法进行统计处理, 显著性结果分别以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 表示有差异、差异显著和非常显著。

结果

1 YZG-331 对小鼠额叶皮层谷氨酸含量无影响

采用在体微透析技术结合高效液相色谱检测技术对小鼠额叶皮层组织中 Glu 含量进行检测。如图 2B、C 所示, 相比于溶剂对照组, 灌胃给予 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹) 后的 0~0.5 h 和 0.5~1 h 两个时间段的透

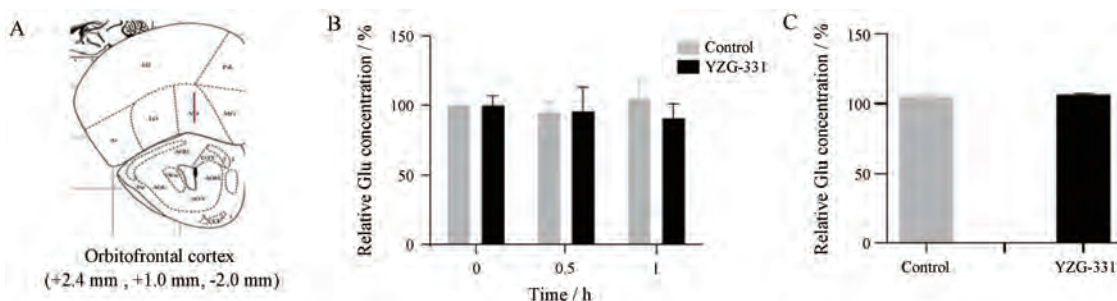


Figure 2 Effect of YZG-331 (40 mg·kg⁻¹, ig) on the content of glutamate (Glu) in mouse frontal cortex. A: The location of the probe; B: Glu content in extracellular fluid; C: Glu content in frontal cortex homogenate. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$

析液中 Glu 含量变化均无统计学差异。灌胃给予 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹) 15 min 后小鼠额叶皮层组织匀浆中 Glu 含量也无明显变化。

2 YZG-331 下调小鼠额叶皮层细胞膜上 NMDAR 表达量

采用 Western blot 法对灌胃给予 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹) 15 min 后小鼠额叶皮层细胞膜上 NR1 和 NR2B 的表达量进行检测。如图 3 所示, 与溶剂对照组相比, YZG-331 组小鼠额叶皮层细胞膜上 NR1 和 NR2B 的表达量均下调, 且 NR2B 的表达量降低具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

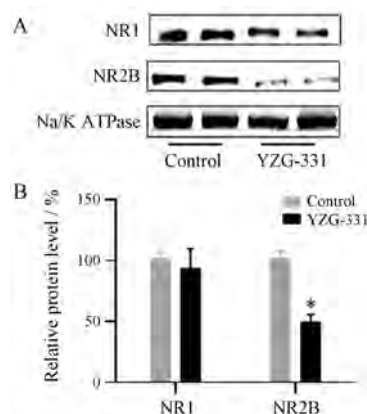


Figure 3 Effect of YZG-331 (40 mg·kg⁻¹, ig) on the expressions of the *N*-methyl-*D*-aspartate receptor (NMDAR) subunit NR1 and NR2B in mouse frontal cortex cytomembrane. A: Expressions of NR1 and NR2B in mouse frontal cortex cytomembrane were detected by Western blot; B: Quantification of the NMDAR subunits NR1 and NR2B expression levels in mouse frontal cortex cytomembrane. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control group

3 YZG-331 上调小鼠额叶皮层细胞内体中 NMDAR 表达量

采用 Western blot 法对灌胃给予 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹) 15 min 后小鼠额叶皮层内体中 NR1 和 NR2B 的表达量进行检测。如图 4 所示, YZG-331 使小鼠额叶皮层内体中 NR1 和 NR2B 蛋白表达量均显著增

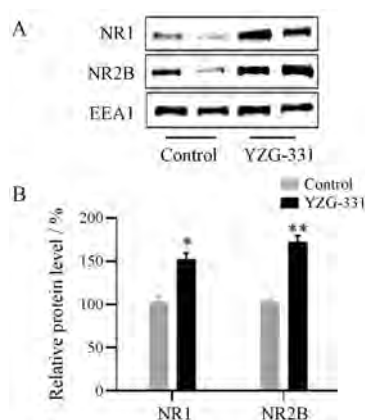


Figure 4 Effect of YZG-331 (40 mg·kg⁻¹, ig) on the expressions of NR1 and NR2B in mouse frontal cortex endosome. A: Expressions of NR1 and NR2B in mouse frontal cortex endosome were detected by Western blot; B: Quantification of the NMDAR subunits NR1 and NR2B levels in mouse frontal cortex endosome. $n = 4, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4 YZG-331 干扰小鼠额叶皮层中 PSD95 与 NR2B 复合物形成

使用 NR2B 作为诱饵蛋白, 采用蛋白质免疫共沉淀法对小鼠额叶皮层中 NR2B 和 PSD95 沉淀复合物中 PSD95 的表达量进行检测。如图 5 所示, 与溶剂对照组相比, 给予 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹) 15 min 后免疫沉淀复合物中 PSD95 蛋白含量显著降低 ($P < 0.01$)。

5 YZG-331 上调小鼠额叶皮层中 NR2B 蛋白磷酸化水平

采用 Western blot 法对灌胃给予 YZG-331 (40 mg·kg⁻¹) 15 min 后小鼠额叶皮层组织中 NR2B

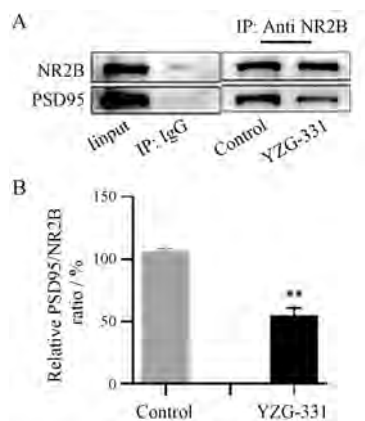


Figure 5 Effect of YZG-331 (40 mg·kg⁻¹, ig) on the expression of PSD95 in the immunoprecipitation complex. A: The interaction between PSD95 and NR2B in mouse frontal cortex was detected by co-immunoprecipitation; B: Quantification of the PSD95 level in the immunoprecipitation complex. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group

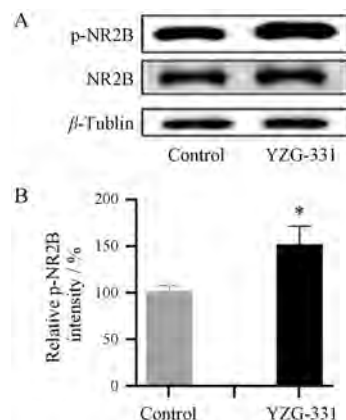


Figure 6 Effect of YZG-331 (40 mg·kg⁻¹, ig) on the phosphorylation of NR2B in mouse frontal cortex. A: Expressions of NR2B and phosphorylated NR2B (p-NR2B) at Ser-1303 site in mouse frontal cortex were detected by Western blot; B: Quantification of p-NR2B and NR2B levels in mouse frontal cortex. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control group

磷酸化水平进行检测。如图 6 所示, YZG-331 组小鼠额叶皮层 p-NR2B 的表达量显著高于溶剂对照组 ($P < 0.05$)。

讨论

失眠是人体睡眠-觉醒节律失常所致, 失眠患者常存在着不同程度的中枢神经递质传递紊乱情况。大脑皮层不但是睡眠觉醒系统的最终作用靶点, 它本身也参与睡眠觉醒的调节。目前有研究表明, 大脑皮层神经元主要接受来自基底前脑和丘脑的神经传入, 来自基底前脑的胆碱能神经元、GABA 能神经元和谷氨酸能神经元都可以投射到前额叶皮层的谷氨酸能神经元, 以一种弥散的方式影响皮层神经元兴奋性^[6,7]。在体微透析是一种在活体动物中利用透析原理对微透析探针所在部位的细胞外液中的目的物质进行动态微量取样的技术^[8]。故本研究除用高效液相色谱检测技术对小鼠额叶皮层组织匀浆中 Glu 含量进行检测外, 还结合在体微透析取样技术对小鼠额叶皮层细胞外液中的 Glu 含量进行了检测。在实验过程中, 为保证分析结果的准确性, 每 30 分钟收集 1 管样品, 利用高效液相进行检测。药代动力学研究表明小鼠灌胃给予 YZG-331 (10 mg·kg⁻¹) 的 T_{max} 为 18 min^[9], 故其余组织样品均在给予 YZG-331 15 min 后进行取材和后续检测。本实验室前期自主活动实验表明化合物 YZG-331 在 1.25~40 mg·kg⁻¹ 内剂量依赖性地抑制小鼠自主活动, 故本次药理机制研究选取了药效最为明显剂量 40 mg·kg⁻¹。检测结果发现, 给予 YZG-331 15 min 后额叶皮层匀浆中 Glu 含量未发生明显变化, 给予 YZG-331 后 0~0.5 h

和 0.5~1 h 两个时间段的透析液中的 Glu 含量与给药前相比也没有明显变化,表明 YZG-331 不是通过影响额叶皮层 Glu 含量发挥作用的。

NMDAR 是中枢神经系统最重要的兴奋性神经递质受体之一,功能性的 NMDAR 是由 NR1 和 NR2 (A~D) 组成的一种异四聚体,其中的 NR1 亚基是构成离子通道的基本亚单位, NR2 (A~D) 是调节亚单位,不同的 NR2 亚基决定 NMDAR 的突触定位和功能^[10]。含有 NR2B 的 NMDAR (NR2B-NMDAR) 主要分布在海马和皮层组织中,与其他类型的 NMDAR 相比, NR2B-NMDAR 的表达和调节更易受外界的影响,对脑功能的调节作用也更强^[11]。NMDAR 在细胞膜上的表达并不是固定不变的,而是在神经元活动时在细胞膜和胞质间快速往返,从而维持细胞膜表面受体的动态平衡,这是通过受体内吞途径实现的。当 NMDAR 内吞进细胞后降低了膜表面 NMDAR 的表达,不能发挥介导 Glu 兴奋神经元的作用^[12,13]。本实验采用 Minute™ 质膜蛋白和细胞组分分离试剂盒提取了小鼠额叶皮层细胞膜上和内体中的蛋白,探究 YZG-331 对额叶皮层细胞膜上及内体中 NMDAR 含量的影响。Western blot 实验结果表明, YZG-331 显著降低了 NMDAR 亚基 NR1 和 NR2B 在额叶皮质神经元细胞表面的表达,增加了内体中 NR1 和 NR2B 的表达量。以上结果提示, YZG-331 促进了额叶皮层细胞膜上的兴奋性神经递质 Glu 的离子型受体 NMDAR 内吞,导致细胞兴奋性信号传导活性下调,进而降低了大脑皮层神经元的兴奋性,发挥其镇静催眠作用。

蛋白质的结构域是研究蛋白质相互作用的重要位点, PSD95 是一种支架蛋白,可在突触后膜通过 PDZ 结构域与 NMDAR 的 NR2B 亚基结合形成 NMDAR/PSD95 复合物,从而起到稳定 NMDAR 在细胞膜表面表达的作用^[14,15]。在 NR2B 亚基中存在一个 Ser-1303 磷酸化位点,当它被蛋白激酶 CaMKII 磷酸化后可以减弱 PDZ 结构域中 NR2B 与 PSD95 的结合进而驱动 NMDAR 发生内吞,降低细胞膜表面 NMDAR 的表达^[16-18]。网格蛋白调控的受体内吞已经被证明是受体从细胞膜进入细胞质的主要形式,已有研究表明 NR2B-NMDAR 内吞依赖于网格蛋白的调控。在受体发生内吞时,其胞质面附着的网格蛋白提供拖拽力使受体脱离细胞膜形成内体进入细胞内,从而导致相关的细胞信号传导活性降低^[19]。为了探究 YZG-331 引起的额叶皮层 NMDAR 内吞的具体驱动机制,本实验采用 Western blot 方法检测了灌胃给予 YZG-331 15 min 后小鼠额叶皮层中 NR2B Ser-1303 磷酸化水平以及通过蛋白质免疫共沉淀法检测了 NR2B 与 PSD95 的相互作

用强度,考察化合物 YZG-331 是否通过干扰 NMDAR/PSD95 复合物的形成促进了 NMDAR 的内吞作用。实验结果显示, YZG-331 可使额叶皮层中 NR2B Ser-1303 磷酸化水平显著增加,使 NR2B 与 PSD95 的相互作用减弱。以上结果表明, YZG-331 通过阻断 NR2B 与 PSD95 复合物的形成,介导 NMDAR 的内吞增加。

综上所述,化合物 YZG-331 上调了 NMDAR 的 NR2B Ser-1303 磷酸化水平,导致 NR2B 与 PSD95 的相互作用减弱,从而降低了 NMDAR 的膜稳定性,使 NMDAR 内吞增多,减少其膜表面数量,降低 NMDAR 介导的皮层神经元兴奋性,可能是其发挥镇静催眠作用的机制之一。

References

- [1] Buysse DJ. Insomnia [J]. JAMA, 2013, 309: 706-716.
- [2] Yang WQ, Jia SB, Li XL, et al. The inhibitory effects of YZG-330/YZG-331 on central nervous system [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2018, 34: 785-789.
- [3] Jiang XJ, Xu ZG, Liu J. The GABA changes of encephalofluetograph in intrinsic in somniacs [J]. Chin J Clin Neuro Sci (中国临床神经科学), 2005, 13: 236-238.
- [4] Shi YF, Yu YQ. The roles of glutamate in sleep and wakefulness [J]. J Zhejiang Univ Med Sci (浙江大学学报 医学版), 2013, 42: 583-590.
- [5] Vadivelu N, Schermer E, Kodumudi V, et al. Role of ketamine for analgesia in adults and children [J]. Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2016, 32: 298-306.
- [6] Sun Q, Li X, Ren M, et al. A whole-brain map of long-range inputs to GABAergic interneurons in the mouse medial prefrontal cortex [J]. Nat Neurosci, 2019, 22: 1357-1370.
- [7] Groenewegen HJ, Wright CI, Uylings HBM. The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia [J]. J Psychopharmacol, 1997, 11: 99-106.
- [8] Ji LY, Yang ZH, Sun XB. Application of microdialysis in brain pharmacokinetics and cerebral ischemia studies [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2012, 18: 303-307.
- [9] Liu ZH, Sheng L, Li Y. Determination of YZG-331 in mouse plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2014, 944: 6-10.
- [10] Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease [J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14: 383.
- [11] Loftis JM, Janowsky A. The *N*-methyl-*D*-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications [J]. Pharmacol Ther, 2003, 97: 55-85.
- [12] MacDougall G, Anderton RS, Edwards AB, et al. The neuroprotective peptide poly- arginine-12 (R12) reduces cell surface levels of NMDA NR2B receptor subunit in cortical neurons; investiga-

- tion into the involvement of endocytic mechanisms [J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 61: 235-246.
- [13] Wu Y, Chen C, Yang Q, et al. Endocytosis of GluN2B-containing NMDA receptors mediates NMDA-induced excitotoxicity [J]. *Mol Pain*, 2017, 13: 1-13.
- [14] Zhang L, Zhou HM, Li XY, et al. Establishment of a screening model for compounds uncoupling the interaction of nNOS with PSD-95 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 638-644.
- [15] Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, et al. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95 [J]. *Science*, 1995, 269: 1737-1740.
- [16] Omkumar RV, Kiely MJ, Rosenstein AJ, et al. Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the *N*-methyl-*D*-aspartate receptor [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 31670-31678.
- [17] Chung HJ, Huang YH, Lau LF, et al. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand [J]. *J Neurosci*, 2004, 24: 10248-10259.
- [18] Mao LM, Jin DZ, Xue B, et al. Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by CaMKII [J]. *Acta Physiol Sin (生理学报)*, 2014, 66: 365-372.
- [19] Nong Y, Huang YQ, Salter MW. NMDA receptors are movin' in [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2004, 14: 353-361.