

刘晓蕾,姜树原,邵国,等. NR2B 亚基磷酸化在缺血/低氧神经保护中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 125-129.

Liu XL, Jiang SY, Shao G, et al. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor NR2B phosphorylation on ischemic/hypoxic neuroprotection [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 125-129.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.016

NR2B 亚基磷酸化在缺血/低氧神经保护中的作用

刘晓蕾^{1,2,3#}, 姜树原^{1,2,3#}, 邵国^{2,3,4*}, 谢雅彬², 贾小娥², 谢伟^{2,3*}

(1.包头医学院药学院,内蒙古 包头 014040;2.内蒙古自治区低氧转化医学重点实验室,内蒙古 包头 014040;
3.泰国格乐大学国际学院公共卫生学系,泰国 曼谷 10220;4.深圳市龙岗区第三人民医院转化医学中心检验科,广东 深圳 518112)

【摘要】 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体在神经系统功能中起着关键作用。NR2B 亚基是 NMDA 受体的调节亚单位,在低氧/缺血神经保护中有重要作用。NR2B 磷酸化是调节 NMDA 受体功能的重要机制,通过磷酸化的变化在缺血/低氧神经保护中发挥重要作用。本文综述了 NMDA 受体 NR2B 亚基的结构、功能、磷酸化、信号通路与缺血/低氧神经保护的关系,为以 NR2B 亚基为靶点进行低氧/缺血脑疾病的防治工作提供思路。

【关键词】 NMDA;NR2B;缺血/低氧;磷酸化;神经保护

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0125-05

Effects of N-methyl-D-aspartate receptor NR2B phosphorylation on ischemic/hypoxic neuroprotection

LIU Xiaolei^{1,2,3#}, JIANG Shuyuan^{1,2,3#}, SHAO Guo^{2,3,4*}, XIE Yabin², JIA Xiaoe², XIE Wei^{2,3*}

(1. School of Pharmacy, Baotou Medical College, Baotou 014040, China. 2. Inner Mongolia Key Laboratory of Hypoxic Translational Medicine, Baotou 014040. 3. Department of Public Health, International College, Krirk University, Bangkok 10220, Thailand. 4. Center for Translational Medicine and Department of Laboratory Medicine, the Third People's Hospital of Longgang District Shenzhen, Shenzhen 518112)

【Abstract】 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor plays an important role in the function of the nervous system. The NR2B subunit is the regulatory subunit of NMDA receptor, which is closely related to the neuroprotection of hypoxia/ischemia. Phosphorylation of NR2B is considered to be an important mechanism to regulate the NMDA receptor function and plays an important role in ischemic/hypoxic neuroprotection through the change in phosphorylation. This review discusses the development of the NR2B subunit of NMDA receptor and the relationships between the structure, function, phosphorylation, signaling pathway and ischemic/hypoxic neuroprotection to provide a theoretical foundation to prevent and treat hypoxic/ischemic brain diseases with NR2B subunit as the target.

【Keywords】 NMDA; NR2B; ischemic/hypoxic; phosphorylation; neuroprotection

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金(82060337,82071479,31860307);内蒙古自然科学基金项目(2020MS08171,2020MS08172,2020MS08006);
深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目(LGKCYLWS2021000033);深圳市科技计划项目基础研究面上项目(JCYJ20220531092412028);包头医学院科学研究基金资助项目(BYJJ-YF201719,BYJJ-QM-2018004)。

【作者简介】 刘晓蕾(1988—),女,硕士,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail: lory1988@163.com

姜树原(1980—),女,硕士,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail: jiang_shuyuan_800@163.com *共同第一作者

【通信作者】 邵国(1972—),男,博士,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail: shao_guo_china@163.com

谢伟(1985—),男,博士,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail: xiewei19850218@sina.com *共同通信作者

N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的离子型谷氨酸受体, 介导广泛的脑过程, 例如突触可塑性和兴奋性毒性^[1-2]。NMDA 受体存在于神经元和神经胶质细胞中, 由不同亚基组成的异聚体组装而成的, 包含结构亚基 NR1, 调控亚基 NR2 (NR2A、NR2B、NR2C 和 NR2D), 以及 NR3 亚基 (NR3A 和 NR3B)^[3]。其中 NR2B 的 C 端区域, 有多个丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基, 是敏感的磷酸化位点。此外, NR2B 磷酸化的变化可能是缺血/低氧神经保护的重要表现形式, NR2B 通过磷酸化影响与其相互作用的蛋白活性, 进而调控的下游分子来实现对抗低氧/缺血脑损伤, 并可能成为治疗低氧/缺血疾病的潜在靶点。但由于 NR2B 的磷酸化位点众多, 其磷酸化与低氧/缺血神经保护间的关系复杂, 还需要更多的研究来阐明。本文综述了 NR2B 的磷酸化及信号通路在缺血/低氧神经保护中作用, 以期将 NR2B 亚基作为调控靶点进行低氧/缺血脑疾病的防治工作奠定理论基础。

1 NR2B 亚基结构、分布

NR2B 亚基是 NMDA 受体的调节亚单位, 由 1456 个氨基酸组成, 分子量约为 170~180 kDa, 包含 4 个不连续的结构: (1) 胞外 N-末端结构域 (N-terminal domain, NTD), 在谷氨酸受体寡聚化和调节中起作用; (2) 胞外配体结合结构域 (ligand-binding domain, LBD), 结合激动剂; (3) 膜区, 包括三个跨膜螺旋 (M1、M3 和 M4) 和一个环状结构 (M2), 形成离子通道; (4) 参与连接受体的胞内 C-末端结构域 (C-terminal domain, CTD), 参与细胞运输和耦合到各种细胞内信号通路^[4-7]。

NR2 亚基基因表现出不同的区域和发育表达模式。许多研究者已经在不同的大脑区域 (如皮层、海马、小脑和下丘脑) 的不同发育阶段检测了 NR2B 的表达和定位^[8]。对啮齿类动物大脑中 NR2B 亚基基因表达的进一步检测表明, 胚胎第 14 天, 在脊髓和下丘脑 NR2B mRNA 低水平表达, 到胚胎第 17 天, NR2B 转录本表达显著增加, 在大脑皮层 (特别是第 1 层)、丘脑和脊髓中表达量高, 而在海马、丘和下丘脑中表达量低。出生时, NR2B mRNA 的表达在大脑皮层、海马、隔、新纹状体和丘脑核中明显增加, 但在小脑中水平较低。出生后第 7~12 天, NR2B 在大脑皮层和海马中表达量高, 在新纹状体、隔、丘脑核和小脑中表达量中等^[3]。NR2B 亚基 mRNA 在 3~30 月龄时在大脑皮层大部

分区域和齿状回颗粒细胞中显著降低。在成人大脑中, NR2B 在皮层 (尤其是 II/III 层)、海马、杏仁核、丘脑腹侧核和嗅球中表达最高^[9]。亚细胞水平, NR2B 在突触, 突触周围和突触外位点检测到。然而, 在大多数神经元中, 突触后密度的树突棘高于树突轴和体细胞膜。在未成熟的谷氨酸突触中 NR2B 的受体占主导地位并直接介导突触传递^[10]。

2 缺氧/缺血神经保护与 NR2B 关系

缺氧是指细胞维持内在生命活动的氧气浓度的下降。由于限制组织的血液供应而导致的缺氧被称为缺血。脑缺血的主要特征之一是兴奋性毒性, 当缺氧/缺血发生时, 导致谷氨酸大量释放, 过度激活 NMDA 受体, 并导致大量钙离子流入离子受体。然后, 钙依赖的死亡信号蛋白的激活引发了大量的兴奋毒性信号级联反应, 并诱导神经元死亡^[11]。NR2B 主要分布于突触外 NMDA 受体位点, NR2B 亚基的 CTD 在促进脑缺血中的神经元死亡方面至关重要^[12]。有研究证明, 在缺氧缺血 6 h 后, 脑室下区 (subventricular zone, SVZ) NR2B 的表达量升高, 在缺氧缺血 24 h 时达到最大值^[13], 表明缺氧缺血促进了 NR2B 表达, 导致了脑损伤。Zhang 等^[14]使用四血管闭塞缺血模型评估了严重缺血后大鼠受体基因表达、蛋白水平和功能。缺血后 12 h 和 24 h, CA1 和海马其他亚区 NR2A、NR2B mRNA 表达下降, 与对照组相比, NR2A/B 蛋白 (海马总) 在缺血后 6 h 和 24 h 均显著降低。然而缺氧 1 h 后, 额叶皮质、海马、丘脑、基底节或小脑区域的 NR2B 的表达没有变化^[15]。缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 后, CA1 区 NR2B 的 mRNA 表达在 12 h 时下降到最低水平, 然后开始恢复, 到 48 h 达到峰值, 然后持续下降到第 7 天。在 CA3 区和齿状回中, mRNA 表达的变异范围逐渐显著减小。TUNEL 染色显示 IR 24 h 时, 凋亡阳性细胞主要分布在 CA1 区。随后凋亡阳性细胞数量持续增长, 在 IR 48 h 时急剧增加, 72 h 时达到峰值, 随后凋亡阳性细胞数量开始减少, 到第 7 天时凋亡阳性细胞仍然存在。表明脑缺血大鼠海马中 NR2B mRNA 的表达与凋亡之间存在特定的关系^[16]。可能由于低氧/缺血过度刺激了突触外 NMDA 受体, 导致钙超载和线粒体功能障碍, 从而触发一系列下游神经毒性级联反应, 损害神经元功能或引起谷氨酸兴奋毒性导致细胞死亡^[17]。其中, NR2B-PSD95-nNOS 通路是缺血性卒中特征明确的死亡信号通路, 在这个通路中, 脚手架蛋白突触后密度-95 (g protein postsynaptic

density-95, PSD95)将 NMDA 受体连接到下游分子,包括一氧化氮合酶(nNOS)。PSD95 包含 3 个 PDZ 结构域,PSD95 的 PDZ1 和 PDZ2 结构域直接结合在 NR2 NMDA 受体亚基的胞内 C 端苏氨酸/丝氨酸-X-缬氨酸 - COOH (threonine/serine-X-valine-COOH, T/SXV) 基序上^[18]。PSD95 的 PDZ2 结构域也与 nNOS 的 N 端结合^[19]。这种分子结构允许过度激活的 NMDA 受体的 Ca^{2+} 内流导致 nNOS 的过度激活,然后产生一氧化氮(NO),这是一种已知的兴奋毒性效应^[20]。nNOS 促进一氧化氮的产生,进而诱导 s-亚硝基化和基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotein-9, MMP-9) 的激活,最终诱导神经元凋亡。干扰 NR2B-PSD95-nNOS 复合物可抑制 NMDA 介导的 NO 生成,保护神经元免受兴奋性毒性^[21]。

相反,亚毒性 NMDA 通过激活促存活的磷酸肌醇 3-激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K) /Akt 通路对抗缺血性脑损伤从而发挥神经保护作用。NMDA 受体打开后, Ca^{2+} 和钙调素激活 PI3K,使膜磷脂 PtdIns (4, 5) P2 磷酸化至 PtdIns (3, 4, 5) P3^[22]。然后, PtdIns (3, 4, 5) P3 相互作用的磷酸肌醇依赖蛋白激酶 1 (phosphoinositide dependent protein kinase1, PDK1) 被招募到细胞膜上,通过磷酸化激活 Akt^[23]。Akt 通过磷酸化一些下游靶点来促进细胞存活。突触 NMDA 受体的激活也可诱导促生存基因的表达。突触 NMDA 受体活性以及 Ca^{2+} 内流激活细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, Ras/ERK) 信号和核 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖蛋白激酶 (Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase, CAMKs), 然后磷酸化并激活环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB)。CREB 的激活可诱导促生存基因的表达,从而保护神经元免受凋亡的损害^[24]。脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) - 酪氨酸受体激酶 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 信号和钙依赖性钙调素级联有助于 NMDA 诱导的 PI3K/Akt 通路激活^[25]。缺血预处理的实验中,通过下调 NR2B,胞浆 Ca^{2+} 降低,触发 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路,抑制 MMPs 活性,减少细胞凋亡^[26],从而在体内保护大脑免受损伤,改善新生儿缺氧缺血脑损伤的长期学习和记忆能力,同时在体外也能保护海马神经元^[27]。尽管大多数研究表明 NR2B 在缺氧缺血性脑病中具有促死亡作用,但也有证据表明 NR2B 在发育过程中可以促进神经元的发生,保护神经元免

受凋亡^[13,28]。由于含有 NR2B 的 NMDA 受体是早期发育中的主要亚型,因此 NR2B 是否在缺氧缺血性脑病中起双重作用仍有待确定。

3 低氧/缺血神经保护与 NR2B 磷酸化关系

3.1 丝氨酸/苏氨酸

蛋白质磷酸化是调节 NMDAR 功能的重要机制。NR2B 的 CTD 区域,是磷酸化的关键区域,包含很多能被磷酸化修饰的氨基酸,如丝氨酸、苏氨酸等,如: S886、S917、S1303、S1323^[29]、S1284^[30]。NR2B 的磷酸化变化在神经保护中起着重要的作用。

神经元缺血时, NR2B 亚单位 S1284 受细胞周期蛋白依赖性激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, Cdk5) 调节,培养海马神经元的氧-葡萄糖剥夺 (OGD) 和小鼠的短暂全脑缺血都会导致 S1284 处 NR2B 磷酸化水平的显著下降^[30]。再灌注后 24 h 内, NR2B 的表达随着时间的推移而降低,酪蛋白激酶 2 α (casein kinase 2 α , CK2 α) 介导的丝氨酸 S1480 磷酸化逐渐降低, S1480 的磷酸化破坏了 NR2B 与 PSD-95 之间的相互作用^[29]。Tu 等^[31]发现激活的死亡相关蛋白激酶 1 (death-associated protein kinase 1, DAPK1) 通过磷酸化 NR2B 上的 S1303 位点来提高 NR2B 受体通道的电导。在该研究中,研究者发现缺血损伤后激活 DAPK1 可使 NR2B 的 S1303 磷酸化,并且 OGD 和缺血处理的小鼠和皮质神经元细胞,都会引起 DAPK1 的活性增高并提高 NR2B 的 S1303 位点的磷酸化水平,从而导致神经元死亡。通过 S1303 位点附近基序的多肽干扰 DAPK1 和 NR2B 的相互作用,可以减少脑缺血带来的损伤。综上, NR2B 上丝氨酸位点的磷酸化参与调控了 NMDA 受体的通道特性,在低氧/缺血类脑病中,不同丝氨酸位点的磷酸化变化不尽相同,如 S1303 处 NR2B 的磷酸化水平会升高,而 S1284 处 NR2B 磷酸化水平会下降,通过改变这些位点的磷酸化水平,对低氧/缺血类脑病,特别是脑卒中有积极的治疗作用。

3.2 酪氨酸

酪氨酸磷酸化在低氧/缺血类疾病中,特别是脑卒中,发挥着重要作用。Nakazawa 等^[32]通过一系列方法鉴定出了 NR2B 上许多酪氨酸磷酸化位点,主要包括酪氨酸 Y1070、Y1472、Y1252、Y1336 等。为了探究酪氨酸磷酸化在脑卒中之中的变化,大量研究通过建立低氧/缺血模型,模拟脑卒中。有研究表明,在成年大鼠中,短暂性缺血会显著增加海

马内 NMDAR 亚基 NR2A 和 NR2B 的酪氨酸磷酸化 (NR2A 的酪氨酸磷酸化显著、快速和持续增加,而 NR2B 的酪氨酸磷酸化较小^[33])。这种上调部分是由 Src 家族酪氨酸激酶 Src 和 Fyn 介导的^[34]。Fyn 在大脑中许多底物,包括 NR2B,它是发育中大脑中的主要调节亚单位。Fyn 在其 C 末端的 7 个酪氨酸 (Y932、Y1039、Y1070、Y1109、Y1252、Y1336、Y1472) 残基上介导 NR2B 磷酸化,其中 Y1472 为主要位点^[32]。Fyn 优先磷酸化新生皮质中 Y1472 和 Y1252 处的 NR2B。此外,Y1472 处 NR2B 的磷酸化 (pY1472 NR2B) 和 Y1252 处 NR2B 的磷酸化 (pY1252 NR2B) 在 Fyn 过表达小鼠的突触膜中上调,其中 Src 家族激酶 (SFK) 活性也增加。在脑缺血的成年大鼠中,pY1472 NR2B 显著且持续上调^[35]。出生后第 7 天 (P7) 大鼠和小鼠缺氧缺血 hypoxia ischemia, HI) 后 pY1472 NR2B 增加^[36]。研究表明,再灌注后 24 h 内, NR2B 的表达随着时间的推移而降低, Fyn 介导的 Y1472 磷酸化增加,而 NR2B 上另一个 Fyn 靶点 Y1336 的磷酸化保持不变^[37]。在 WT 动物中, HI 后 6 h 内 pY1472 NR2B 和 pY1252 NR2B 增加,但 pY1336 NR2B 没有增加^[36]。Wu 等^[38]发现 Fyn 对 pY1336 在体外谷氨酸毒性模型中促进 NR2B 的钙蛋白酶裂解,然而 HI 后没有观察到 pY1336 产生的钙蛋白酶裂解片段^[36]。据报道,pY1336 还介导 NR2B 与 PI3K 的相互作用,该相互作用在成年大鼠短暂缺血后增加^[39-40]。新生儿低氧/缺血性脑病与 NR2B 酪氨酸磷酸化的增强有关。新生儿缺氧缺血后 pY1472 NR2B 上调参与了超氧化物介导的氧化应激,并促进了脑损伤。HI 后,pY1472 NR2B 的上调,可能启动了下游细胞死亡信号通路,促进了脑损伤的形成,而 pY1336 可能参与钙剪切酶对 NR2B 胞内端剪切的调控。综上,在脑卒中和新生儿低氧/缺血性脑病中, NR2B 上酪氨酸位点的磷酸化水平的变化不同,但是 NR2B 主要的酪氨酸磷酸化位点的磷酸化水平是升高的,通过改变这些位点的磷酸化水平,可以为治疗缺血缺氧性脑病奠定基础。

4 结语

总之, NR2B 的磷酸化影响了 NMDA 受体的功能,酪氨酸的磷酸化改变很可能影响 NR2B 复合体在初始状态和损伤后的蛋白质招募^[41],丝氨酸和苏氨酸的磷酸化调控 NMDA 受体通道特性和膜转运过程,这为以 NR2B 的磷酸化位点进行低氧神经保护提供了思路,若进一步研究 NR2B 的磷酸化位点

氧/缺血神经保护间的关系,能为缺血性卒中等疾病的诊断、治疗开辟更广阔的天地。

参考文献:

- [1] Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity [J]. Cell Calcium, 2010, 47(2): 122-129.
- [2] Lai TW, Shyu WC, Wang YT. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond [J]. Trends Mol Med, 2011, 17(5): 266-275.
- [3] Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications [J]. Pharmacol Ther, 2003, 97(1): 55-85.
- [4] Pan M, Neilson MP, Grunfeld AM, et al. A G-protein-coupled chemoattractant receptor recognizes lipopolysaccharide for bacterial phagocytosis [J]. PLoS Biol, 2018, 16(5): e2005754.
- [5] Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, et al. Structure, Function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels [J]. Pharmacol Rev, 2021, 73(4): 298-487.
- [6] Amin JB, Gochman A, He M, et al. NMDA receptors require multiple pre-opening gating steps for efficient synaptic activity [J]. Neuron, 2021, 109(3): 488-501.
- [7] Ni L. The structure and function of ionotropic receptors in drosophila [J]. Front Mol Neurosci, 2020, 13: 638839.
- [8] Ismail CaN, Suppian R, AbdAziz CB, et al. increased nociceptive responses in streptozotocin-induced diabetic rats and the related expression of spinal NR2B subunit of N-Methyl-D-Aspartate receptors [J]. Diabetes Metab J, 2019, 43(2): 222-235.
- [9] Wang J, Swanson RA. Superoxide and non-ionotropic signaling in neuronal excitotoxicity [J]. Front Neurosci, 2020, 4: 861.
- [10] Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, et al. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential [J]. Br J Pharmacol, 2009, 157(8): 1301-1317.
- [11] Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death [J]. Apoptosis, 2010, 15(11): 1382-1402.
- [12] Vieira MM, Schmidt J, Ferreira JS, et al. Multiple domains in the C-terminus of NMDA receptor GluN2B subunit contribute to neuronal death following *in vitro* ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2016, 89: 223-234.
- [13] Lai Q, Hu P, Li Q, et al. NMDA receptors promote neurogenesis in the neonatal rat subventricular zone following hypoxicischemic injury [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1): 206-212.
- [14] Zhang L, Hsu JC, Takagi N, et al. Transient global ischemia alters NMDA receptor expression in rat hippocampus: correlation with decreased immunoreactive protein levels of the NR2A/2B subunits, and an altered NMDA receptor functionality [J]. J Neurochem, 1997, 69(5): 1983-1994.
- [15] Kim WT, Kuo MF, Mishra OP, et al. Distribution and

- expression of the subunits of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors; NR1, NR2A and NR2B in hypoxic newborn piglet brains [J]. *Brain Res*, 1998, 799(1): 49–54.
- [16] Liu Z, Zhao W, Xu T, et al. Alterations of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B mRNA expression and their relationship to apoptosis following transient forebrain ischemia [J]. *Brain Res*, 2010, 1361: 133–139.
- [17] Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events [J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(6): 1147–1160.
- [18] Cui H, Hayashi A, Sun HS, et al. PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(37): 9901–9915.
- [19] Tochio H, Mok YK, Zhang Q, et al. Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a preformed beta-finger structure from the nNOS PDZ domain [J]. *J Mol Biol*, 2000, 303(3): 359–370.
- [20] Sattler R, Xiong Z, Lu WY, et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein [J]. *Science*, 1999, 284(5421): 1845–1848.
- [21] Wang Z, Chen Z, Yang J, et al. Treatment of secondary brain injury by perturbing postsynaptic density protein-95-NMDA receptor interaction after intracerebral hemorrhage in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(8): 1588–1601.
- [22] Joyal JL, Burks DJ, Pons S, et al. Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(45): 28183–28186.
- [23] Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α [J]. *Curr Biol*, 1997, 7(4): 261–269.
- [24] Impey S, Fong AL, Wang Y, et al. Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV [J]. *Neuron*, 2002, 34(2): 235–244.
- [25] Xu J, Zhang QG, Li C, et al. Subtoxic N-methyl-D-aspartate delayed neuronal death in ischemic brain injury through TrkB receptor- and calmodulin-mediated PI-3K/Akt pathway activation [J]. *Hippocampus*, 2007, 17(7): 525–537.
- [26] Liu Y, Wang H, Liu N, et al. Oxymatrine protects neonatal rat against hypoxic-ischemic brain damage via PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 116444.
- [27] Lai Z, Zhang L, Su J, et al. Sevoflurane postconditioning improves long-term learning and memory of neonatal hypoxia-ischemia brain damage rats via the PI3K/Akt-mPTP pathway [J]. *Brain Res*, 2016, 1630: 25–37.
- [28] Martel MA, Wyllie DJ, Hardingham GE. In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death [J]. *Neuroscience*, 2009, 158(1): 334–343.
- [29] Ghafari M, Hoger H, Keihan Falsafi S, et al. Mass spectrometrical identification of hippocampal NMDA receptor subunits NR1, NR2A-D and five novel phosphorylation sites on NR2A and NR2B [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(3): 1891–1896.
- [30] Lu W, Ai H, Peng L, et al. A novel phosphorylation site of N-methyl-D-aspartate receptor GluN2B at S1284 is regulated by Cdk5 in neuronal ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2015, 271: 251–258.
- [31] Tu W, Xu X, Peng L, et al. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke [J]. *Cell*, 2010, 140(2): 222–234.
- [32] Nakazawa T, Komai S, Tezuka T, et al. Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(1): 693–699.
- [33] Takagi N, Shinno K, Teves L, et al. Transient ischemia differentially increases tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits 2A and 2B [J]. *J Neurochem*, 1997, 69(3): 1060–1065.
- [34] Cheung HH, Takagi N, Teves L, et al. 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.
- [35] Zhang F, Guo A, Liu C, et al. Phosphorylation and assembly of glutamate receptors after brain ischemia [J]. *Stroke*, 2013, 44(1): 170–176.
- [36] Knox R, Zhao C, Miguel-Perez D, et al. Enhanced NMDA receptor tyrosine phosphorylation and increased brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in mice with neuronal Fyn overexpression [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 51: 113–119.
- [37] Shao G, Wang Y, Guan S, et al. Proteomic analysis of mouse cortex postsynaptic density following neonatal brain hypoxia-ischemia [J]. *Dev Neurosci*, 2017, 39(1–4): 66–81.
- [38] Wu HY, Hsu FC, Gleichman AJ, et al. Fyn-mediated phosphorylation of NR2B Tyr-1336 controls calpain-mediated NR2B cleavage in neurons and heterologous systems [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20075–20087.
- [39] Kim NS, Ringeling FR, Zhou Y, et al. CYFIP1 dosages exhibit divergent behavioral impact via diametric regulation of NMDA receptor complex translation in mouse models of psychiatric disorders [J]. *Biol Psychiatry*, 2022, 92(10): 815–826.
- [40] Zhang X, Peng K, Zhang X. The Function of the NMDA receptor in hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 567665.
- [41] Knox R, Brennan-Minnella AM, Lu F, et al. NR2B phosphorylation at tyrosine 1472 contributes to brain injury in a rodent model of neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Stroke*, 2014, 45(10): 3040–3047.