CN 31-1285
CODEN JZAZEF

解 剖 学 杂 志

JIEPOUXUE ZAZHI

CHINESE JOURNAL OF ANATOMY

第 24 卷 第 4 期 Vol 24 No 4

2001

ISSN 1001-1633

中国解剖学会主办

解剖学杂志编委会编辑

解剖学杂志　第24卷4期　2001年8月

目　次

论　著

三种反义 c-myc RNA 对 HL-60 细胞凋亡的影响
……曾　嵘　李　进　周　生等(307)
脑源性神经生长因子对原代培养的下丘脑加压素能神经元的影响
……郭雨霁　李盛芳　郝　晶等(313)
大鼠睾丸的神经联系
……张宝林　云玉珍　汪剑威等(318)
亚低温对大鼠视网膜缺血再灌注自由基损伤的保护
……陈少强　张　更　黄　焱等(322)
人胎视网膜超氧化物歧化酶和波形蛋白免疫阳性细胞的发育
……沈伟哉　郭国庆(327)
糖尿病早期大鼠视网膜毛细血管及视细胞超微结构变化规律
……刘学政　萧　鸿　庞东渤等(331)
大鼠海马 CA3 区在学习记忆时突触可塑性的变化
……潘三强　宿宝贵　韩　辉等(336)
血管性痴呆大鼠记忆障碍与海马神经型一氧化氮合酶表达的关系
……张雪朝　肖茂磊　蔡文琴等(340)
5-羟色胺受体和 P 物质受体在培养的人胎盘滋养层细胞的定位研究
……吕葆真　黄威权　蒲若蕾等(345)
磷酸化的 P44/42 丝裂原激活的蛋白激酶分子在正常家猫脑干内的分布
……金　亮　李政丽　王百忍等(348)
雄性大鼠去势后下丘脑 NOS 神经元的分布
……肖　明　丁　炯　左国平(352)
大鼠内直肌亚核在动眼神经核的分布
……林春颖　迟焕方　王守标(357)
滋养细胞肿瘤 N-ras 基因原位分子杂交研究
……黄秀琴　阮永华　刘宝源等(360)
中药促进大鼠脊髓修复再生的超微结构的研究
……马育平　张　平　苏　静等(364)
大鼠房室交界区的组织化学研究
……吴宝金　吴洪海　朱永泽(369)
眶尖结构的临床应用解剖研究
……林　贤　蔡兆明　陈瑞华(374)
第二趾主要血管神经断面的解剖观察

血管性痴呆大鼠记忆障碍与海马神经型一氧化氮合酶表达的关系*

张雪朝[1]　肖茂磊[2]　蔡文琴[2]　蒋乃昌[1]

([1]贵阳医学院生理学教研室,贵阳 550004;[2]第三军医大学组织学与胚胎学教研室)

摘要　目的:探讨NO参与血管性痴呆大鼠学习记忆障碍的作用机制。方法:采用4-血管阻断的方法建立大鼠血管性痴呆模型,以免疫组化法检测海马神经型一氧化氮合酶蛋白表达的变化;以Nissl染色方法,结合图象分析统计海马神经元丢失比率;同时采用Y-型迷宫,进行行为学检测,定量测定其学习记忆成绩。结果:在血管性痴呆大鼠空间分辨学习记忆能力发生严重障碍时,海马CA_1区神经元丢失比率较正常对照组增高,神经型一氧化氮合酶蛋白表达增加。结论:神经型一氧化氮合酶可能引起海马CA_1区神经元凋亡或坏死增加,海马神经元受损,导致血管性痴呆大鼠学习记忆障碍。

关键词　血管性痴呆　学习记忆　神经型一氧化氮合酶　海马

*　一氧化氮(nitric oxide,NO)在中枢神经系统中既可作为一种气体信使分子又可作为神经递质而广泛参与机体多种病理和生理作用。NO不仅参与了正常生理过程中的长时程增强和长时程抑制、学习记忆[1],而且与脑缺血/缺氧等病理生理状态密切相关[2]。近来利用敲基因技术,发现敲除神经型一氧化氮合酶基因小鼠可显著抵抗局部或全脑缺血损伤,提示神经型一氧化氮合酶参与了脑缺血引起的神经损伤[3]。为观察神经型一氧化氮合酶对血管性痴呆的病理影响,本实验选用改良的Pulsinelli 4-血管阻断(4-vessel occlusion,4-VO)制备近似人类临床发病特点的、国际公认的血管性痴呆大鼠模型,以免疫组化、组织化学、Y-型迷宫等方法,观察血管性痴呆大鼠学习记忆障碍与海马神经型一氧化氮合酶蛋白的表达及神经元丢失的关系,旨在探讨NO对血管性痴呆大鼠学习记忆障碍的影响及其作用机制。

1　材料与方法

1.1　材料　雄性Wistar大鼠,体重200～250克,随机分为:血管性痴呆模型组、假手术及正常对照组,每组10只,大鼠由中国人民解放军第三军医大学动物中心提供。兔抗鼠神经型一氧化氮合酶单抗、DAB购于北京中山生物技术公司,免疫组化试剂盒(HABC)购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2　4-VO模型制备　采用改良的Pulsinelli 4-VO法,建立近似人类学习记忆障碍的血管性痴呆大鼠模型:用水合氯醛(0.5 ml/100 g体重)腹腔麻醉大鼠,背侧正中切口,用电凝针经第一颈椎横突翼小孔,闭塞双侧椎动脉。腹侧颈正中切口,分离双侧颈总动脉,24小时后,可逆性夹闭双侧颈总动脉3次,每次5分钟,间隔1小时,之后放回笼中常规饲养、观察。4-VO成功的检测指标:(1)在大鼠额、顶、枕区左右两侧对称地分别安放电极各一个,参考电极放在鼻骨正中,2～3分钟内,EEG呈等位线,示4血管完全阻断。(2)翻正反射消失。

1.3　学习记忆测试　术前及成模2周后用Stanes三等臂Y-型迷宫箱测试大鼠学习记忆:反应箱设三条通道,其顶端有一盏15W信号灯,箱底可施以电击,训练大鼠按信号灯跑向安全通道。每天上、下午各测试10次,其间休息

广西青年自然科学基金资助(桂科青9811002)

1分钟，连续测试8天。大鼠学习记忆成绩分别以其测试达到连续10次中有9次正确反应时所需的电击次数表示。

1.4 免疫组织化学及Nissl染色 大鼠经3%戊巴比妥钠(40 mg/kg体重)腹腔注射麻醉后，开胸暴露心脏，经左心室插管，快速灌注生理盐水，继4%多聚甲醛，后取脑放入30%蔗糖多聚甲醛溶液中固定，至脑组织下沉后做冠状连续冰冻切片，厚30 μm。神经型一氧化氮合酶一抗抗体稀释度为1:500，染色步骤按免疫组化试剂盒说明书进行，经DAB显色，阳性细胞呈红棕色。用PBS代替一抗作为阴性对照。同时，每个脑组织的相邻切片用10%的甲苯胺蓝进行Nissl染色。

1.5 统计学处理 数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间均数比较采用单因素以方差分析。

2 结 果

2.1 Y-迷宫检测测试结果 4-VO手术前各组大鼠的学习记忆能力基本一致。假手术组和对照组始终无明显变化，表明未出现学习记忆障碍。模型组在术后所需电击次数较对照组、假手术组和术前明显增加($P<0.01$)，表明大鼠在术后空间分辨学习记忆能力发生严重障碍(附表)。

附表 大鼠Y-型迷宫学习记忆成绩($\bar{x}\pm s$)

组 别	对照组	假手术组	模型组
术 前	5.68±1.29	5.74±1.25	6.07±1.67
术 后	5.81±1.51	5.53±1.32	18.06±2.68*

注：每组大鼠均为10只，*$P<0.01$(与对照组比较)。

2.2 免疫组织化学及Nissl染色结果 正常对照组和假手术组，大鼠海马CA_1区锥体细胞层、分子层、多形细胞层有极少量弱染及中等强度染色的神经型一氧化氮合酶阳性神经元，并可见弱染的神经元突起；模型组，在分子层、锥体细胞层神经型一氧化氮合酶阳性神经元大量增加，染色较深，突起较多且长，还可见较多散在分布的Asping神经元(有棘细胞)及纤维网，其主要由含膨体的纤维及深染的阳性细胞突起构成，见图1A、B、C、D。Nissl染色结果显示，模型组与对照组比较，海马CA_1区锥体细胞层神经元严重丢失，而且可见许多空洞。但各组之间海马CA_1区其他细胞层Nissl染色无明显变化，见图2A、B。

3 讨 论

3.1 近年的研究证实NO在神经系统中具有重要的作用，特别是NO作为逆行气体信使分子，参与学习记忆的生理和病理过程，开始引起人们的关注。但NO对血管性痴呆引起的学习记忆障碍的研究尚不清楚。血管性痴呆是以脑血管疾病引起学习记忆障碍为主要表现的一种病症，反复性脑缺血是其主要病因之一[4]。海马是研究血管性痴呆最多的结构，它是缺血损伤最敏感脑区。已有的研究证实，海马直接干预信息贮存和回忆。最近有实验证实海马内NO的表达与学习记忆密切相关[5]。推测NO可能在血管性痴呆导致学习记忆障碍过程中发挥作用，但其作用机制尚不清楚。

3.2 本实验结果显示，大鼠全脑反复缺血2周后即出现明显的空间分辨学习记忆障碍，同时海马CA_1区神经型一氧化氮合酶免疫阳性细胞明显增加，表明此时海马内NO的持续生成和释放，提示神经型一氧化氮合酶不仅参与缺血性脑损伤，而且在痴呆形成的过程中可能发挥重要作用。有临床研究观察到，血管性痴呆病人脑脊液中NO浓度明显增高，且与痴呆程度呈正相关[6]。本结果为之提供了形态学依据。本实验结果还显示，在大鼠学习记忆发生障碍时，海马CA_1区可见细胞大量丢失，两者呈正相关，提示神经型一氧化氮合酶对血管性痴呆大鼠海马神经元的破坏，可能是通过调控细胞凋亡或坏死来达到。我们过去的实验(血管性痴呆大鼠学习记忆障碍与海马bcl-2表达的关系)已证实血管性痴呆大鼠脑内除有神经元坏死外，还存在细胞凋亡。血管性痴呆大鼠海马、大脑皮质、杏仁核等易损伤敏感脑区的神经元坏死或凋亡造成细胞丢失，进而导致血管

性痴呆大鼠的学习记忆障碍。Vincent 和 Montecot 等人的实验发现，神经型一氧化氮合酶的激活可作为一个重要介导因素引起神经元的毒性作用，引起神经元的凋亡或细胞的变性坏死[7]，而抑制神经型一氧化氮合酶的产生可对海马神经元的缺血和损伤具有保护作用[8]。本实验结果与之一致。有研究证实，缺血性脑损伤后，海马内 NO 聚集，产生大量可引起神经元死亡的自由基，自由基清除剂可减轻其对神经元的损害[9]。脑反复缺血引起海马内神经型一氧化氮合酶介导的兴奋性氨基酸谷氨酸的增加，引发神经元的凋亡和坏死[10]，相反抑制神经型一氧化氮合酶的产生可减少神经元的毒性作用，对神经元具有保护作用[11]。

参考文献

1 Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide and nociceptive procession in the spinal cord. Pain, 1993, 52: 127

2 Ladecola C. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascutar regulation. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14: 175

3 Hara H, Huang PL, Panhian N, *et al*. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16: 605

4 Corey BL, Thal LJ, Glalasko D, *et al*. Diagnosis and evaluation of dementia. Neurology, 1995, 45: 211

5 Moody TD, Carlisle HJ, O Dell TJ. A nitric oxide-independent and beta-adrenergic receptor-sensitive form of metaplasticity limits theta-frequency stimulation-induced LTP in the hippocampal CA_1 region. Learn Mem, 1999, 6: 619

6 Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, *et al*. The cerebrospinal fluid oxidized NO metabolites, nitrite and nitrate, in Alzheimer's disease and vascular dementia of Binswanger type and multiple small infarct type. J Neural Transm, 1998, 105: 1283

7 Vincent AM, Maiese K. Nitric oxide induction of neuronal endonuclease activity in programmed cell death. Exp Cell Res, 1999, 246: 240

8 Montecot C, Rondi RL, Springhetti V, *et al*. Inhibition of neuronal (type 1) nitric oxide synthase prevents hyperaemia and hippocampal lesions resulting from kainate-induced seizures. Neuroscience, 1998, 84: 791

9 Uyama O, Matsuyama T, Michishita H, *et al*. Protective effects of human recombinant superoxide dismutase on transient ischemia injury of CA_1 neurons in gerbils. Stroke, 1992, 23: 75

10 Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. Stroke, 1997, 28: 1283

11 Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, *et al*. Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. J Neurosci, 1995, 15: 8419

THE RELATIONSHIP BETWEEN HYPOMNESIA AND EXPRESSION OF NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE IN HIPPOCAMPUS IN VASCULAR DEMENTIA RATS

Zhang Xuechao, Xiao Maolei, Cai Wenqin, Jiang Naicang

(*Department of Physiology, Guiyang Medical College, Guiyang* 550004
Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University)

Objective: To investigate whether NO takes part in the process of vascular dementia formation and the mechanism of neuronal nitric oxide synthase involved in vascular dementia. Methods: Modified Pulsinel-

li's 4-vessel occlusion (4-VO) method was used to establish the model of acute global ischemia and vascular dementia in Wistar rats. The rats were tested by Y-type maze. The tissue sections of hippocampus were studied by immunohistochemical method for neuronal nitric oxide synthase and neuronal loss of hippocampus was examined by Nissl's stain. Results: The experimental group showed severe impairment of spatial memory after ischemic operation, with a more marked neural loss and increased significantly of positive neuronal nitric oxide synthase immunoreaction in CA_1 region of hippocampus than control group. Conclusion: Expression of neuronal nitric oxide synthase can lead neurons of hippocampus to cell death and apoptosis in vascular dementia rats. The results suggest that the occurrence of learning and memory deficit may have close related with increased neuronal nitric oxide synthase protein expression.

Key words vascular dementia; learning and memory; neuronal nitric oxide synthase; hippocampus

图版说明

1 海马 CA_1 区神经型一氧化氮合酶阳性神经元的显微照相 A. 对照组，CA_1 区有少量的、散在的、弱阳性的表达。×100 B. 模型组，CA_1 区各层细胞神经型一氧化氮合酶阳性细胞着色增强、数量增加、突起明显。×100 C. 模型组，CA_1 区分子层、锥体细胞层神经型一氧化氮合酶阳性神经元中可见较多散在分布的 Asping 神经元(有棘细胞)及纤维网。×400 D. 示模型组海马 CA_1 区 Asping 神经元及其突起，×400

2 海马 CA_1 区 Nissl 染色的显微照相 A. 对照组，CA_1 区 Nissl 染色。×100 B. 模型组，CA_1 区锥体细胞层神经元严重丢失，形成许多空洞，×100

解剖学杂志 2001 年 24 卷 4 期

欢迎购买《中国人体质调查续集》和《中国人体质调查第三集》

由中国解剖学会体质调查委员会编辑的《中国人体质调查》和《中国人体质调查续集》已分别于 1986 年、1990 年出版发行，并在 1992 年获得了国家教委科技进步一等奖。《中国人体质调查第三集》也已于 1999 年 12 月出版发行。三书均按体质测量与运动器官、内脏学(附内分泌腺)、脉管系、神经系、感官等编写。三书内容简明扼要，数据正确可靠，被公认为是中国人解剖学数值的权威著作。该著作给人类学学者和基础医学工作者的教学和科研提供了方便，给临床医师提供了诊断治疗疾病的依据，是公安司法人员进行案件分析的必备工具书，同时也为工业、国防、体育、艺术和教育等行业提供了有价值的人体器官常数，更是编辑基础医学和临床教科书和专著的必备书。

《中国人体质调查》早已销售一空。

《中国人体质调查续集》和《中国人体质调查第三集》尚有余书。各单位和个人需购书者可汇款至：上海市(200433)，翔殷路第二军医大学《解剖学杂志》编辑部黄瀛教授收。

《中国人体质调查续集》每本定价 20.00 元，另加邮费 2.00 元，共计 22.00 元。

《中国人体质调查第三集》每本定价 50.00 元，另加邮费 2.00 元，共计 52.00 元。

《解剖学杂志》编辑部