

戊四唑致痫小鼠海马结构内一氧化氮合酶 阳性神经元的时程变化

张德芹 熊 杰 黄宇虹 杨常泉

(天津中医学院 300193)

李积胜

(天津武警医学院 300162)

导师: 马 融

摘要 目的: 观察海马内一氧化氮合酶(NOS)在戊四唑(PTZ)致痫后的时程变化。方法: 用NADPH-黄递酶(NADPH-d)组织化学方法的方法, 分别观察正常及致痫后15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、12 h海马内NOS阳性神经元变化。结果: 致痫后15 min~1 h, NOS阳性神经元数量明显减少, 1~2 h增加至最高峰, 2~12 h逐渐降低, 12 h阳性细胞数目最少, 2 h最高。结论: 一氧化氮的含量, 随癫痫发作状态的不同而增、减。

关键词 癫痫 戊四唑 海马 一氧化氮合酶

中图分类号: R971+6 文献标识码: A 文章编号: 1005-7145(2001)03-0030-02

癫痫(Epilepticus EP)是以脑神经元反复、异常过度放电所致的短暂中枢神经系统失调为特征。其机理较复杂, 大多报道与兴奋性神经递质有密切联系。一氧化氮(Nitric oxide NO)自60年代发现, 作为新的神经递质倍受人们的关注, 同时一氧化氮与癫痫、一氧化氮与传统的神经递质关系的研究等不断受到关注, 亦有报道: 海马存在基础一氧化氮释放, 一氧化氮可能抑制海马神经元的活动^[1], 揭示一氧化氮可能具有抗癫痫的作用。

本实验以戊四唑(Pentylentetrazol PTZ)小鼠为研究对象, 采用NADPH-黄递酶(NADPH-d)染色法, 观察海马结构内一氧化氮合成的关键酶, 即一氧化氮合酶(NOS)的不同时程的变化, 进一步探讨一氧化氮在癫痫发作中的作用及机理, 为临床治疗提供客观依据。

1 动物模型与给药

选用健康昆明种小鼠, 二级(天津动物研究所提供)64只, 雌雄半, 体重18~22 g。动物分笼饲养, 喂养3天后, 随机分8组, 每组8只, 即正常对照组、致痫后15、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、12 h八组。正常对照组予腹腔注射生理盐水(0.9%生理盐水注射液)55 mm/kg, 其它组腹腔注射戊四唑(天津新亚药厂生产)55 mm/kg。依据不同时间, 开始实验。

2 方法

2.1 取材与切片

各组小鼠在相同条件下麻醉后开胸, 从左心室依

次灌注生理盐水30~50 ml, 4%多聚甲醛磷酸缓冲液150~200 ml固定, 20~30 min灌毕, 迅速断头取脑, 置于4℃上述同样固定液中后固定7~9 h后, 移入20%蔗糖浸泡12 h以上, 恒冷箱冰冻切片(50 μm)。

2.2 NADPH-d组化反应:

将切片移入NADPH-d反应液, 37℃孵育1 h, 反应液成分: NADPH-d (Sigma公司)5 mg、NBT(氯化硝基四氮唑蓝, 华美公司)2.5 mg, 体积分数为0.3%的Triton-TBS 5 ml。终止反应后裱片、脱水、透明、封片。

2.3 NOS阳性神经元计数:

每组选取对应断面的海马脑片15张, 分别计数CA₁、CA₃区和齿状回(DG)内NOS阳性神经元细胞数。

2.4 统计学分析 用SPSS 8.0统计软件包进行分析。

3 结果

结果显示: 30 min~2 h, NOS阳性神经元数逐渐增加; 2 h后逐渐降低; 2 h各区NOS数最多。且CA₃>CA₁>DG₀, 见表1。

4 讨论

4.1 一氧化氮合酶: 一氧化氮合酶是一种小而简单的生物合成酶, 由左旋精氨酸(L-Arg)通过激活的一氧化氮合成。已知中枢神经系统各脑区存在一氧化氮合酶。对于一氧化氮的检测, 已有实验证明, 中枢神经系统的NADPH-d组织化学反应强度是一氧化氮合酶

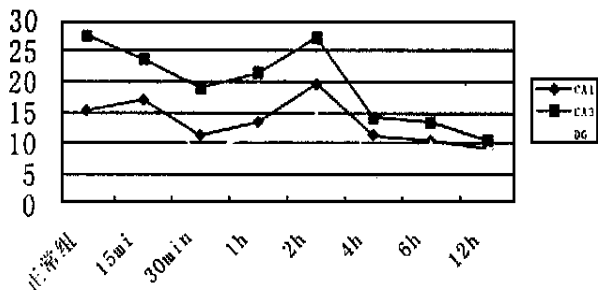
活性的标志, NADPH-d 阳性细胞即为阳性神经元细胞^[2]。

表 1 不同时段 NOS 阳性细胞数的变化($\bar{X} \pm S$)

组别	CA ₁	CA ₃	齿状回
正常组	15.33 ± 5.81	27.20 ± 4.54	13.27 ± 4.28
15 min	17.00 ± 2.56	23.53 ± 4.05	13.40 ± 4.28
30 min	11.20 ± 2.98	18.87 ± 3.07	9.07 ± 2.55
1h	13.33 ± 3.64	21.27 ± 3.37	10.80 ± 2.27
2h	19.47 ± 4.47	26.93 ± 6.50	14.33 ± 2.80
4h	11.20 ± 2.86	14.13 ± 4.36	8.87 ± 2.56
6h	10.33 ± 1.18	13.27 ± 1.58	9.67 ± 1.88
12h	9.13 ± 2.56	10.40 ± 2.41	8.80 ± 2.21
Total	13.38 ± 4.80	19.45 ± 7.13	11.02 ± 3.51

注: 与正常组相比, $P < 0.01$; $P < 0.05$ 。

不同时段 NOS 性神经元细胞的变化



4.2 模型的选择: 迄今为止, 动物致病的建模方法很多, 其给药途径常用的有腹腔注射, 静脉注射。总之, 依据实验目的和总体要求而决定的。戊四唑为呼吸中枢兴奋剂它能降低 γ -氨基丁酸样抑制作用。在动物实验中戊四唑造模已被广泛应用, 具有潜伏期较短, 死亡率低的优点^[3]; 同时戊四唑模型是一个较理想的全身强直-阵挛性动物模型, 因戊四唑本身无特殊的神经毒性作用, 且不伴有神经元损伤、坏死, 故是研究癫痫发作与神经元损伤的理想模型^[4,5]。

4.3 NOS 与癫痫: 目前认为一氧化氮在中枢神经系

统的作用途径是: 突触前释放的谷氨酸作用于突触后 NMDA 受体, 引起突触后神经元大量 Ca^{2+} 内流, Ca^{2+} 与钙调蛋白结合成复合物并激活 NOS, NOS 催化 L-精氨酸生成一氧化氮, 进入突触细胞及胶质产生作用。已知 L-精氨酸的类似物一氧化氮的合成有竞争性抑制作用^[6]。

海马是癫痫相关脑区之一。癫痫许多研究是在海马脑片上进行的, 是它的层次结构具备完整的神经回路, 且在海马, 神经元具有正常爆发放电的能力, 可能作为起步起发动痫样活动^[7]。

4.4 实验表明: 腹腔注射戊四唑后, 各组小鼠约在 40 s ~ 25 min 从癫痫始发至呈大发作状态, 持续至 2 h 左右。而实验表明: 15 min 为癫痫开始出现大发作时期, 注射戊四唑使 NOS 阳性细胞呈上升趋势, NO 含量增加; 随着癫痫的持续发作状态, NO 含量渐减少; 至 2 h 癫痫发作渐渐缓前, NOS 阳性细胞最多。说明 NOS 的含量随发作程度而增、减, 2 h NO 含量最多。至少一氧化氮在癫痫中的作用, 有待进一步探讨。

参考文献

- Xue BJ, Wang ZA, He RR. Effects of NO precursor and donor on neuronal activity of rat hippocampal slices[J]. Acta Physiol Sin 1997, 49: 375 ~ 381
- 赵秀鹤, 迟兆富, 王淑贞, 等. 临床神经病学[J], 1999; 12(4): 207 ~ 2093 郑乃智, 阮旭中, 李震中, 等. 青霉素、戊四唑、美解眠癫痫模型比较[J]. 临床胶电学杂志; 6(2): 101
- Franz DN Central nervous system stimulants. In: Good man LS, Gilman A, Eds. The pharmacological Basis of Therapeutics[J]. New York, Mac millan Co, 1980, 588
- Planas AM, Soriano MA, Ferrer I, et al. Regional expression of inducible heat shock protein-70 mRNA in the rat following administration of convulsant drugs[J]. Mol Brain Res, 1994; 27: 127
- Dubbin PN, Zambtis M, Dusting GJ. Inhibition of endothelial nitric oxide biosynthesis by N-nitro-arginine[J]. Clin Exp Pharmacol, 1990, 17: 281-286
- 沈鼎烈. 临床癫痫学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994, 6

(收稿日期: 2001-05-18)

敬告作者

为适应我国信息化建设需要, 扩大作者学术交流渠道, 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”; 作者著作权使用费与本刊稿酬一次性付给。如作者不同意将文章编入该数据库, 请在来稿时声明, 本刊将做适当处理。