

# 缺氧对大鼠纹状体边缘区 AChE 和 NADPH-d 含量的影响及其与学习记忆的关系

王 钧,舒斯云,包新民,李胜修,杨文科,高 凯 (第一军医大学珠江医院神经生物研究所,广东 广州 510282)

**摘要:**目的 观察大鼠缺氧后纹状体边缘区(MrD)的病理改变及乙酰胆碱酯酶(AChE)和还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(NADPH-d)的含量改变,探讨缺氧对纹状体边缘区的损害及与学习记忆的关系。方法 建立40只大鼠缺氧模型(予氧含量为8%、氮气含量为92%的混合气,5h/d,连续5d)并对其进行Y迷宫实验,缺氧5d后处死动物观察其脑组织切片HE染色和AChE和NADPH-d组织化学染色情况并与对照组比较。结果 (1)大鼠缺氧前后Y迷宫实验成绩差异显著。(2)AChE组化结果显示,正常大鼠纹状体可见大量AChE阳性反应纤维和少量阳性细胞,MrD内AChE染色略淡;缺氧后纹状体其他部分AChE染色无明显变化,而MrD则明显加深。(3)NADPH-d组化反应显示,MrD内NADPH-d阳性细胞多呈梭形,纹状体内阳性细胞数较其他区域多;缺氧后阳性细胞形态变化不明显,但数目明显少于正常对照。结论 缺氧可导致大鼠学习记忆功能下降以及MrD内AChE、NADPH-d染色的明显改变。这些改变较纹状体其他区域更为明显,表明MrD对于缺氧较敏感,缺氧后AChE和NADPH-d的减少可能与学习记忆功能的下降有关。

**关键词:**缺氧;乙酰胆碱酯酶;还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶;纹状体;边缘区

中图分类号:R741.02 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)03-0193-04

Effects of hypoxia on AChE and NADPH-d levels in the marginal division and learning and memory functions of rats

WANG Jun, SHU Si-yun, BAO Xin-min, LI Sheng-xiu, YANG Wen-ke, GAO Kai

Institute of Neuroscience, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

**Abstract** Objective To observe the pathological changes and changes in acetylcholinesterase (AChE) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) levels in the marginal division (MrD) following hypoxia, and explore the relation of hypoxia to damages of learning and memory functions. Methods Hypoxia models were established in 40 SD rats by treatment with the mixture of 8% oxygen and 92% nitrogen 5 times daily for 5 consecutive days, and the sham-hypoxia group was constituted by 10 rats receiving normal oxygen supply in the same manner as above. Another 10 untreated rats were used as normal control. The rats completing the hypoxia induction procedures were subjected to Y-maze test before their brain sections, along with those of the rats in the other 2 groups, were prepared for HE staining and immunohistochemical staining. Results AChE immunohistochemical results of the normal control group revealed numerous AChE-positive fibers and some positive cells in the striatum where the MrD was more lightly stained than the other regions. In the rats with hypoxia, however, the MrD was more intensely stained in comparison with the control, but the stain in other regions of the striatum did not manifest any significant differences between the groups. The MrD of normal rats possessed more NADPH-d-positive cells, all spindle-shaped, than the other regions of the striatum, and hypoxia did not result in morphological changes of the cells but significant reduction of their quantity occurred. Conclusions Hypoxia may cause reduction of the learning and memory functions of rats and give rise to alterations of AChE and NADPH-d staining patterns in the MrD. The MrD is more vulnerable to hypoxia as evidenced by more obvious changes in AChE and NADPH-d staining in the MrD than in the other regions of the striatum, which may be associated with the impairment of the learning and memory functions by hypoxia.

**Key words** hypoxia; acetylcholinesterase; reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase; corpus striatum; marginal division

缺氧是由多种原因造成的循环血中氧分压或氧含量下降而导致组织细胞供氧不足的病理状态。缺氧发生后,受损最严重的部位当属中枢神经系统,尤其是与学习记忆密切相关的脑区(如海马等部位),纹状

体的某些细胞亦会严重受损。既往研究表明纹状体边缘区(MrD)与学习记忆有关<sup>[1]</sup>,该区域的损伤可导致学习记忆能力的下降<sup>[2]</sup>。本研究通过制作缺氧大鼠模型并结合行为学实验,观察缺氧后大鼠MrD内乙酰胆碱酯酶(AChE)和原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(NADPH-d)的改变,探讨MrD与学习记忆的关系。

收稿日期:2000-12-07

基金项目:国家自然科学基金(39770250);广东省自然科学基金(99050)

作者简介:王 钧(19582),男,山东淄博人,2000年毕业于第一军医大学,副教授,副主任医师,电话 020-85143176

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物模型及分组

雄性成年 SD 大鼠 70 只, 体质量 180~220g, 随机选取 10 只作为正常对照 (C 组), 其余大鼠参照 Stanes<sup>[3]</sup>报道的方法经两次 Y-型迷宫筛选出合格动物 50 只, 将其分为伪缺氧组 (SH 组, n=10) 和缺氧组 (H 组, n=40)。

### 1.2 缺氧模型的制作及行为学实验

(1)H 组: 于第二次迷宫训练的次日进行缺氧实验。将动物置于特制容器中, 输入湿化的氧含量为 8%、氮气含量为 92% 的混合气, 流量为 2L/min, 5h/d, 连续 5 d。(2)SH 组: 将动物置于特制容器中, 除输入湿化的氧气含量为 21%、氮气含量为 79% 的混合气外, 其余处理均同 H 组。(3)C 组: 置于动物房正常饲养。

H 组缺氧 5 d 后, 分别于第 1、3、5 天重复 Y 迷宫实验后处死动物。对 3 组动物进行组织化学检测。

### 1.3 脑组织固定切片

10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠, 切开右心房, 将穿刺针通过左心室进入升主动脉, 生理盐水 100ml 冲洗后, 多聚甲醛 500ml 缓慢灌注固定, 持续 2 h, 剥离颅骨后, 完整取出整个脑组织置于 30% 蔗糖中, 置于 4℃ 冰箱至脑组织沉底, 二氧化碳干冰冰冻后, -20℃ 下进行冠状切片, 片厚为 50 μm。AChE 检测应用 Karnovsky 改良法<sup>[4]</sup>, NADPH-d 的检测参照熊抗辉<sup>[5]</sup>的方法进行。显色后明胶贴片, 干燥, 乙醇梯度脱水、二甲苯透明, DPX 封片观察。

### 1.4 统计处理

数据以均数 ± 标准差表示, 统计分析采用 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 缺氧后大鼠的一般表现及病理学改变

缺氧状态下, H 组大鼠表现为口周及耳廓紫绀明显, 呼吸频率加快, 开始躁动不安, 继之进入镇静状态, 毛发耸立不整, 在解除缺氧 30~60min 内基本恢复常态。缺氧后大鼠脑组织切片 HE 染色显示: C 组和 SH 组大鼠纹状体及边缘区细胞轮廓清晰、排列紧密、形态完整, 神经元突起明显; H 组大鼠纹状体细胞轮廓欠清晰、边缘区细胞轮廓模糊, HE 染色出现簇状暗染、细胞数目和密度降低、神经元突起消失等病理学改变。

### 2.2 H 组大鼠 Y 迷宫实验结果

H 组大鼠经 Y 迷宫训练的结果为: 第一次正确次数平均为 21.4±2.3, 第二次为 27.1±2.6, 前后差异显著。缺氧结束后第 1 天, 迷宫训练准确率显著降低, 第 3 天有所恢复, 第 5 天与缺氧前迷宫准确率仍有显著差异 (表 1)。

### 2.3 缺氧后 MrD 内 AchE 和 NADPH-d 的改变

表 1 大鼠缺氧前后 Y 迷宫实验测定成绩 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Y-maze scores of the rats before and after hypoxia (Mean±SD)

Mean right times	
Pre-hypoxia	27.1±2.6
Post-hypoxia(d)	
1	15.0±3.8*
3	17.0±3.2*
5	20.0±2.9*

\*P<0.05 vs Pre-hypoxia

2.3.1 AChE 组化反应结果 AChE 组化阳性反应产物在 C 组脑区中纹状体最为明显, 可见大量阳性反应纤维和少量阳性反应细胞。MrD 内 AChE 染色较纹状体其他区域稍浅, 但深于苍白球等其他基底节结构, 该区域内偶可见到阳性反应神经元 (图 1)。脑内其他区域除海马外 AChE 染色均较浅。SH 组 AChE 染色与 C 组无明显差异。H 组 AChE 染色发现纹状体在缺氧后较正常对照组无明显变化, 而 MrD 内 AChE 染色则明显深于尾壳核其他区域 (图 2)。

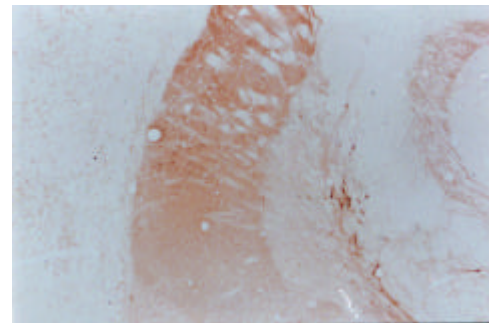


图 1 正常大鼠纹状体及纹状体边缘区 AchE 的表达 (免疫组化染色, ×80)

Fig.1 Expression of AchE in the striatum and its marginal division in normal rats (Immunohistochemical staining, ×80)

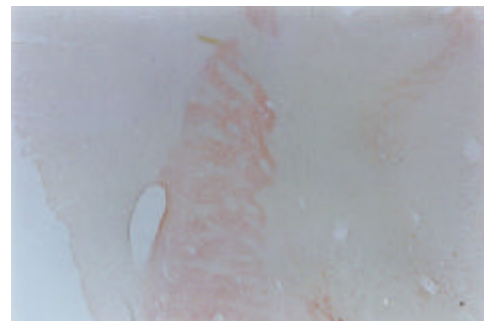


图 2 大鼠缺氧 5 d 后纹状体边缘区 AchE 的表达 (免疫组化染色, ×80)

Fig.2 Expression of AchE in the striatum and its marginal division of the rats after 5 d of hypoxia (Immunohistochemical staining, ×80)

2.3.2 NADPH-d 组化反应结果 正常大鼠, 脑内各区均有 NADPH-d 阳性神经元分布, 纹状体 NADPH-d

阳性细胞含量多、分布广、中等大小、形态各异,胞质染色较深。MrD 内 NADPH-d 阳性细胞多呈梭形,中等大小,数量较纹状体其它区域略多,着色也较深,细胞两极发出较长的纤维沿尾壳核朝背腹方向行走(图 3)。SH 组 NADPH-d 在 MrD 的分布、形态、着色及数目与 C 组无明显差异。H 组 NADPH-d 染色发现纹状体阳性细胞较正常对照组明显减少,而 MrD 内阳性细胞数目减少更为明显,形态变化不明显,着色较对照组阳性细胞浅(图 4)。

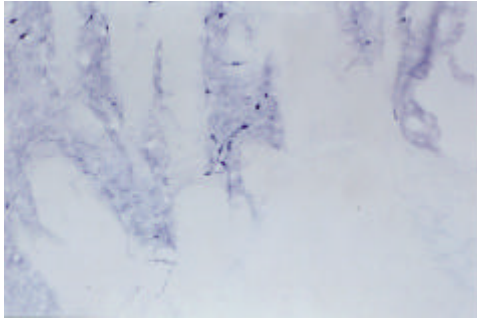


图 3 正常大鼠纹状体及纹状体边缘区 NADPH 的表达  
(免疫组化染色, ×200)

Fig.3 Expression of NADPH in the striatum and its marginal division in normal rats  
(Immunohistochemicalstaining, ×200)

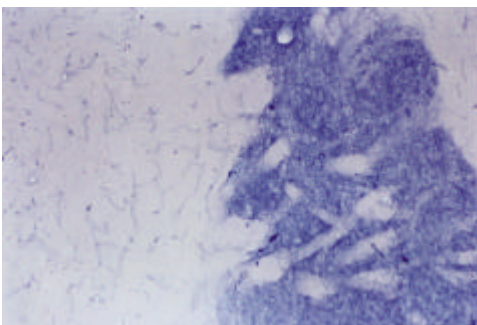


图 4 大鼠缺氧 5 天后纹状体边缘区 NADPH 的表达  
(免疫组化染色, ×200)

Fig.4 Expression of NADPH in the striatum and its marginal division of the rats after 5 d of hypoxia  
(Immunohistochemicalstaining, ×200)

The number of positive cell in marginal division decreased

### 3 讨论

在机体所有器官中,中枢神经系统对缺氧最为敏感,缺氧可引起记忆、行为、情绪等高级功能障碍。另外,缺氧可导致可逆性的纹状体神经元膜去极化和短暂钙离子内流的增加,缺氧 30min 则可引起不可逆性膜去极化和钙离子水平的显著增加,而纹状体较皮层神经元的变化更为显著,说明纹状体神经元对缺氧更为敏感<sup>[6]</sup>。从本实验结果来看,动物缺氧后,纹状体边缘区出现的神经递质变化较尾壳核和苍白球更明显,表明纹状体边缘区是纹状体缺氧最为敏感的部位。缺氧状态下,细胞之无氧代谢增加,造成细胞外酸

中毒,使 NMDA 受体功能受到抑制,因而对长时程增强(LTP)利用的生理过程产生负面影响<sup>[7]</sup>,导致学习记忆功能下降。

研究表明,大鼠纹状体内的 AChE 阳性细胞是胆碱能神经元<sup>[8]</sup>,而 MrD 内存在可为乙酰胆碱激活的离子通道<sup>[9]</sup>。本实验结果显示,大鼠在缺氧 5 d 后 MrD 内 AChE 染色明显深于纹状体其他部位,这可能是由于 AChE 在该区域的合成、释放增加而致活性上升的结果。而另一方面,AChE 活性的增加可能与易感神经元的死亡有关<sup>[10]</sup>。

一氧化氮(NO)是一种在生物体内广泛存在的小分子化合物,在脑内除具有扩张脑血管作用外,也可诱导兴奋性氨基酸,参与 LTP 的形成,被认为是一种 LTP 形成的逆行细胞间信使。位于神经元内的结构型 NOS 即是用组化方法显示的 NADPH-d。本实验发现 MrD 区内 NADPH-d 阳性细胞多呈梭形,中等大小,数量较纹状体其它区域略多,着色也较深,进一步说明 MrD 存在着与学习记忆有关的物质基础。本实验发现,大鼠在缺氧 5 d 后纹状体内 NADPH-d 阳性细胞较正常对照组明显减少,而 MrD 内阳性细胞数目减少更为明显,着色较对照组阳性细胞浅,说明缺氧导致 MrD 内 NO 含量下降,这可能是缺氧所致学习记忆下降的机制之一。然而,MrD 可能只是涉及学习记忆功能的一部分,该区域的递质变化可能对学习记忆有一定影响,但海马等与学习记忆有关的经典的区域可能会发挥更大的作用。因此,MrD 内神经递质的变化代表了该区域神经纤维和终末的一种对缺氧的敏感反应,这种反应可能与缺氧导致的学习记忆功能下降有关。

### 参考文献:

- [1] ShuSY, BaoXM, LiS, et al. A new subdivision of mammalian neostriatum with functional implications to learning and memory [J]. *J Neurosci Res*, 1999, 58(2): 242-3.
- [2] 李胜修, 舒斯云, 包新民, 等. 海人藻酸损毁纹状体边缘区后对大鼠学习和记忆功能影响的研究 [J]. *神经解剖学杂志*, 1996, 12(1): 37-41.
- [3] LiSX, ShuSY, BaoXM, et al. Influence on learning and memory function of the rat following kainic acid lesioning in the marginal division of the striatum [J]. *Chin J Neuroanat*, 1996, 12(1): 37-41.
- [4] Stanes MD, Brown CP, Singer G. Effects of physostigmine on Y-maze discrimination retention in the rat [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1976, 46(3): 269-75.
- [5] Karnovsky MJ, Roots L. A "direct-coloring" thiocholin method for cholinesterases [J]. *J Histochem Cytochem*, 1964, 12: 219.
- [6] 熊抗辉, 赵经纬, 王百忍. 还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(NADPH-d)组化方法操作步骤中各种参数的选择 [J]. *神经解剖学杂志*, 1996, 12(1): 79-82.
- [7] Xiong KH, Zhao JW, Wang BR. Determination of optimal conditions for various parameters in the protocol of histochemical

- technique on reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase [J]. Chin J Neuroanat, 1996, 12(1): 79-82.
- [6] Pisani A, Calabresi P, Bernardi G, et al. Hypoxia in striatal and cortical neurones: membrane potential and  $Ca^{2+}$  measurements [J]. Neuroreport, 1997, 8(5): 1143-7.
- [7] Velisek L. Extracellular acidosis and high levels of carbon dioxide suppress synaptic transmission and prevent the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices [J]. Hippocampus, 1998, 8(1): 24-32.
- [8] Lehmann J, Fibiger HC. Acetylcholinesterase and the cholinergic neuron [J]. Life Sci, 1979, 25(23): 1939-47.
- [9] 曾建新, 舒斯云, 包新民, 等. 大鼠纹状体边缘区神经元乙酰胆碱激活的离子通道特性 [J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 208-301.
- Zeng JX, Shu SY, Bao XM, et al. Acetylcholine-activated ion channels in neurons of the marginal division acutely dissociated from rat striatum [J]. JFirstMilMedUniv, 1999, 19(4): 208-301.
- [10] Tanaka K, Mizukawa K, Ogawa N, et al. Post-ischemic administration of the acetylcholinesterase inhibitor ENA-713 prevents delayed neuronal death in the gerbil hippocampus [J]. Neurochem Res, 1995, 20(6): 663-7.

## 2002年广东省中西医结合肿瘤学术年会 暨全国肿瘤诊疗新技术研讨会 (第一轮征文通知)

2002年广东省中西医结合肿瘤学术年会暨全国肿瘤诊疗新技术研讨会已列入国家和广东省学术活动 I 类会议 (将授予国家和广东省继续教育 I 类学分)。这次会议由广东省中西医结合学会肿瘤专业委员会、广州抗癌协会生物治疗专业委员会和广州第一军医大学南方医院肿瘤中心联合举办。这是一次高水平、大规模肿瘤学术盛会, 届时将邀请国内 20 多名著名专家报告肿瘤诊疗最新进展, 交流各地在肿瘤防治研究中的新成果、新经验, 提高我省和全国肿瘤防治水平, 造福人类。现将有关事项通知如下:

### 1 会议时间地点:

2002年8月16-19日 广州市

### 2 专题报告主要内容:

(1) 肿瘤综合治疗进展; (2) 造血干细胞“鸡尾酒疗法”与肿瘤大剂量放疗; (3) 肿瘤体细胞治疗与基因治疗; (4) 肿瘤中西医结合研究进展; (5) 肿瘤介入治疗进展; (6) 肿瘤 RFA 治疗进展; (7) 肿瘤化疗进展; (8) 循证医学与数字医学在肿瘤临床的应用; (9) 人源化抗体与肿瘤靶向治疗; (10) 肿瘤热疗进展; (11) 肿瘤标志物与分子流行病学进展; (12) 超声聚焦刀治疗进展; (13) 肿瘤 PDT 进展; (14) 二十一世纪肿瘤中西医结合发展方向展望; (15) 中医药在肿瘤综合治疗中的地位和作用; (16) 肿瘤立体适形放疗技术进展; (17) 常见肿瘤诊治进展; (18) 氩氦刀靶向治疗进展; (19) 小移植在血液肿瘤中的应用; (20) 医学生物技术与肿瘤防治等。

### 3 征文内容:

涉及肿瘤基础、临床、预防研究, 包括病因病理、分子机制、诊疗新技术新模式、中西医结合、生物治疗、生物化疗、化学治疗、放射治疗、手术治疗、微创外科治疗和综合治疗等诸多方面。

### 4 征文要求:

(1) 专题报告采用约稿方式征集, 请以全文投稿, 其他论文只要求寄 800 字中文摘要, 内容包括题目、目的、方法、结果和结论。投稿时应同时提供电脑磁盘 (Word 格式), 也可通过 E-mail 投稿 (center@nfhoc.com)。

(2) 截稿日期: 2002年6月30日

### 5 论文公布方式:

- (1) 论文经审稿录用者, 皆可参会, 并授予国家继续教育学分;
- (2) 录用的论文, 可列入大会或分会场论文报告、发言、讨论和壁报交流;
- (3) 论文全文或摘要登载在会议论文集上;
- (4) 录用论文作者, 将发给会议第二轮通知。

地址: 广州南方医院肿瘤中心 邮编: 510515 联系人: 徐萌 张军一  
电话: (020)87640966, 85141655-806 传真: (020)87726110