

· 基础研究 ·

双氢麦角碱对血管性痴呆小鼠海马及脑皮质 NOS 阳性神经元的影响*

尹 昱¹ 吕佩源^{2,5} 杨天祝³ 何春年⁴ 翟金萍⁴

摘要 目的: 观察双氢麦角碱对血管性痴呆(VD)小鼠海马及脑皮质一氧化氮合酶(NOS)阳性神经元的影响。**方法:** 采用双侧颈总动脉线结再灌注法制作小鼠 VD 动物模型。将小鼠分为假手术对照组、双氢麦角碱治疗组和 VD 模型组,分别于术后 7d、14d、30d 测试小鼠学习成绩,24h 后测试记忆成绩,并应用 NADPH-d 酶组织化学染色法,观察海马及脑皮质 NOS 阳性神经元的变化特征。**结果:** 术后第 7d VD 模型组海马及脑皮质 NOS 阳性神经元的数量较假手术组有所减少,双氢麦角碱组较 VD 模型组有所增多,但差异无显著性意义($P>0.05$);术后第 14d、30d 模型组海马及脑皮质 NOS 阳性神经元数量明显低于假手术组($P<0.01$),双氢麦角碱组海马及脑皮质 NOS 阳性神经元的数量显著高于 VD 模型组 ($P<0.01$)。**结论:** VD 小鼠海马及脑皮质 NOS 阳性神经元的数量在较长时期内持续减少可能与 VD 发病相关,而双氢麦角碱可以提高海马及脑皮质 NOS 阳性神经元的数量,并改善 VD 的临床症状。

关键词 血管性痴呆;一氧化氮合酶;海马;脑皮质;小鼠;双氢麦角碱

中图分类号: R749.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2008)-03-0208-03

Effects of dihydroergotoxine on the change of NOS positive neurons in hippocampus and cerebral cortex of mice with vascular dementia/YIN Yu, LU Peiyuan, YANG Tianzhu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(3):208—210

Abstract Objective: To investigate the change of nitric oxide synthase (NOS) positive neurons in hippocampus and cerebral cortex of mice with vascular dementia (VD) and the effects of dihydroergotoxine on VD. **Method:** The mice were subjected for ischemia-reperfusion repeatedly by blocking the bilateral common carotid arteries to establish the VD models. Animals with the shamed-operation were taken as control group. The treating group was administrated with dihydroergotoxine after the establishment of VD model. The behavior changes were observed through the step-down avoidance test and water maze test on the 7th, 14th and 30th days after operation, respectively. A NADPH-diaphorase histochemistry method was used to measure the NOS positive neurons in hippocampus and cerebral cortex of mice. **Result:** The NOS positive neurons in hippocampus and cerebral cortex of VD group decreased more than those of control group on the 7th day after operation, and those of treating group increased more than VD group, while no significant difference was found ($P>0.05$). With the prolongation of observing time, the NOS positive neurons of VD groups reduced significantly than those of control groups on the 14th and 30th day after operation ($P<0.01$), but with using dihydroergotoxine, the NOS positive neurons of treating groups was apparently higher than those of VD groups ($P<0.01$). **Conclusion:** Fewer NOS positive neurons in hippocampus and cerebral cortex during a relatively long time might participate in the pathogenesis of VD. Dihydroergotoxine might increase the NOS positive neurons in hippocampus and cerebral cortex and improve the clinical symptoms of VD.

Author's address Dept. of Rehabilitation, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, 050051

Key words vascular dementia; nitric oxide synthase; hippocampus; cerebral cortex; mouse; dihydroergotoxine

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是由各种脑血管病引起的以记忆、认知功能缺损为主的获得性智能损害综合征。随着社会人口的日益老龄化,VD的发病呈明显增长趋势,而VD的发病机制目前仍不十分清楚。一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种新型信使分子,在体内由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸等物质生成。一些资料表明,衰老以及阿尔茨海默病 (Alzheimer's

disease, AD) 所导致的学习记忆能力减退与 NO 密

* 基金项目:河北省自然科学基金资助项目(NO.301415)

1 河北省人民医院康复科,石家庄,050051

2 河北省人民医院神经内科

3 河北医科大学神经生物教研室

4 河北省人民医院病理科

5 通讯作者:吕佩源(河北省人民医院神经内科,peiyuanlu@163.com)

作者简介:尹昱,女,住院医师,在读博士

收稿日期:2007-08-23

切相关, NO 在学习记忆过程中可能起逆行信使作用^[1-2]。NO 是否也参与了 VD 学习和记忆等智能障碍的形成, 目前相关报道较少。本研究应用 NADPH-d 酶组织化学染色法, 观察了 VD 小鼠海马及皮质 NOS 阳性神经元在较长时期内的变化特征, 并应用双氢麦角碱进行治疗, 旨在探讨 VD 分子生物学发病机制, 为进一步指导临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型制备

实验动物选用 3 月龄雄性昆明小鼠 (购自河南华兴实验动物养殖中心, 合格证号: 医动字第 19-052 号), 体重(32±2)g, 共 108 只。将小鼠随机分为假手术组、模型组和双氢麦角碱组, 各组再根据测试时间分为 7d 组、14d 组和 30d 组, 每组小鼠各 12 只。采用双侧颈总动脉线结再灌注的方法制备 VD 模型^[3]; 假手术组作为对照, 仅暴露双侧颈总动脉而不结扎, 尾部不放血; 双氢麦角碱组为制备模型术后第 2 天, 经胃管给予双氢麦角碱(舒脑宁, 意大利), 剂量 0.83mg/(kg·d), 每天 1 次。同时模型组、假手术组给予药物溶剂生理盐水, 剂量 0.01μl/(kg·d)。

1.2 学习、记忆成绩测试

各组分别于术后第 7d, 第 14d 及第 30d 进行跳台试验、水迷宫试验, 测试学习成绩, 24h 后测试记忆成绩。

1.2.1 跳台试验: 测试装置为被动回避反应箱, 记录小鼠首次受电击后跳上安全台所需时间(反应时间)、5min 内跳下安全台次数(错误次数), 作为学习成绩。24h 后重复上述实验, 记录小鼠首次从安全台跳至铜栅所需时间(潜伏时间)、5min 内跳下安全台次数(错误次数), 作为记忆成绩。

1.2.2 水迷宫试验: 采用小鼠水迷宫试验装置(中国医学科学院药物研究所, LW-II 型), 盲端有自动感应装置, 自动控制记录仪记录数据。记录其游完全程时间、进入盲端次数(错误次数)作为学习成绩。24h 后重复测试上述指标作为记忆成绩。

1.3 标本取材

各组小鼠分别于术后测试记忆成绩后取材, 用 10%水合氯醛麻醉小鼠, 4%多聚甲醛(4℃)心脏灌注固定, 开颅取脑, 后固定 4h, 移入 20%蔗糖磷酸缓冲液(4℃, 0.1mol·L⁻¹ PB 配制, pH7.4)中浸泡至标本沉底。取视交叉至乳头体脑组织, 恒冷连续冠状切片, 片厚 20μm。

1.4 NADPH-d 酶组织化学染色

将各组脑组织切片进行下列 NADPH-d 酶组织

化学染色: 0.1mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH7.4)漂洗切片 3 次, 每次 10min; 1% TritonX-100 液室温下浸泡切片 60min, 对切片进行预处理; 将切片浸入含 0.3% TritonX-100、0.6mg·ml⁻¹ 氯化硝基唑蓝、0.5mg·ml⁻¹ NADPH 溶液中, 37℃孵育 60min; 显色满意后, 0.1mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH7.4)漂洗切片 3 次, 每次 10min, 终止反应; 对贴片进行干燥、脱水、透明, 中性树胶封片。

1.5 NOS 阳性神经元计数及观察

每组选取对应断面的脑切片 12 张, 在光镜下仔细观察海马及皮质区域 NOS 阳性细胞的形态和分布, 分别统计 NOS 阳性神经元数目。

1.6 统计学分析

实验数据用均数±标准差表示, 应用 SAS 软件对数据进行处理, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 跳台试验和水迷宫试验

术后第 7d、14d、30d VD 模型组的学习成绩和记忆成绩均明显低于假手术组($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$), 且随着术后时间的延长, 小鼠的学习和记忆成绩逐渐下降; 术后第 7d 双氢麦角碱组与 VD 模型组比较差异无显著意义 ($P > 0.05$), 但随着用药时间的延长, 小鼠学习和记忆成绩逐渐提高, 术后第 14d、30d 双氢麦角碱组显著高于 VD 模型组 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$), 见表 1—2。

2.2 小鼠海马及脑皮质 NOS 阳性神经元数目及形态学观察

不同时期各组小鼠海马及脑皮质 NOS 阳性神经元数目见表 3—4。光镜下观察, 术后第 7d、14d、30d, 假手术组小鼠脑皮质和海马分布着一定数量的 NOS 阳性神经元, 大多染色呈蓝色, 少数深染, 呈蓝黑色, 胞体中等大小, 多为锥形或梭形, 突起清晰可见, 少数为椭圆形或圆形。VD 模型组术后第 7d, 在上述区域可见散在分布的 NOS 阳性神经元, 染色偏浅, 与假手术组相比, 数量有所减少, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 术后第 14d、30d, NOS 阳性神经元部分树突缩短, 消失, 可见胞体浓缩、崩解, 数量显著低于假手术组 ($P < 0.01$)。双氢麦角碱组术后第 7d, 在上述区域也可见散在分布的 NOS 阳性神经元, 与 VD 模型组相比, 数量有所增加, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 术后第 14d、30d, NOS 阳性神经元数量显著多于 VD 模型组 ($P < 0.01$), 细胞形态接近假手术组。

表1 术后不同时期各组小鼠跳台试验的学习和记忆成绩比较

组别	鼠数	学习成绩		记忆成绩	
		反应时间(s)	错误次数	潜伏时间(s)	错误次数
VD 模型组					
术后第 7d	12	99.8±40.9 ^②	2.3±0.6 ^②	95.0±68.5 ^②	1.7±0.5 ^①
术后第 14d	12	109.6±35.7 ^②	2.6±0.5 ^②	89.3±75.0 ^②	2.0±0.6 ^①
术后第 30d	12	130.0±47.3 ^②	3.1±0.6 ^②	78.4±60.0 ^②	2.3±0.6 ^①
双氢麦角碱组					
术后第 7d	12	83.4±44.1	1.8±0.6	106.6±73.5	1.1±0.8
术后第 14d	12	65.3±42.5 ^③	0.8±0.47 ^③	152.6±79.6 ^③	0.8±0.5 ^③
术后第 30d	12	55.6±36.4 ^④	0.3±0.5 ^④	180.4±95.2 ^④	0.3±0.5 ^③
假手术组					
术后第 7d	12	51.3±33.9	0.5±0.5	179.5±68.6	0.4±0.5
术后第 14d	12	52.7±35.3	0.3±0.5	178.6±76.7	0.3±0.5
术后第 30d	12	51.7±35.5	0.3±0.5	189.7±76.5	0.3±0.4

与假手术组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与 VD 模型组比较: ③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$

表2 术后不同时期各组小鼠水迷宫试验的学习和记忆成绩比较

组别	鼠数	学习成绩		记忆成绩	
		反应时间 (s)	错误次数	潜伏时间(s)	错误次数
VD 模型组					
术后第 7d	12	132.9±47.4 ^②	20.0±6.4 ^②	135.7±48.3 ^②	19.3±5.9 ^①
术后第 14d	12	143.6±39.2 ^②	22.7±3.8 ^②	143.8±38.8 ^②	22.3±5.4 ^②
术后第 30d	12	151.0±53.5 ^②	24.6±6.4 ^②	152.0±49.1 ^②	25.1±4.8 ^②
双氢麦角碱组					
术后第 7d	12	123.8±46.1	17.3±4.6	121.8±45.6	17.1±5.0
术后第 14d	12	106.8±44.1 ^③	15.8±4.9 ^③	91.8±41.6 ^③	15.1±5.8 ^③
术后第 30d	12	79.5±35.5 ^④	13.8±6.2 ^④	78.9±43.1 ^④	12.4±6.0 ^④
假手术组					
术后第 7d	12	75.8±43.1	13.3±5.1	78.8±42.2	13.2±6.2
术后第 14d	12	79.7±43.2	13.5±4.7	73.7±41.2	12.7±4.8
术后第 30d	12	76.9±38.5	13.7±6.3	80.3±35.2	13.8±5.9

与假手术组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与 VD 模型组比较: ③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$

表3 术后不同时期各组小鼠海马 NOS 阳性神经元数目

组别	鼠数	术后第 7d	术后第 14d	术后第 30d
VD 模型组	12	52.0±14.3	40.8±16.2 ^①	32.7±15.0 ^①
双氢麦角碱组	12	53.1±15.2	47.6±13.7 ^②	50.4±16.3 ^②
假手术组	12	56.5±16.7	54.3±13.8	58.4±17.1

①与假手术组比较 $P<0.01$; ②与 VD 模型组比较 $P<0.01$

表4 术后不同时期各组小鼠脑皮质 NOS 阳性神经元数目

组别	鼠数	术后第 7d	术后第 14d	术后第 30d
VD 模型组	12	82.3±18.1	64.1±14.3 ^①	58.1±16.1 ^①
双氢麦角碱组	12	85.6±15.9	72.4±17.4 ^②	76.3±19.2 ^②
假手术组	12	88.5±16.4	80.6±18.2	83.6±18.8

①与假手术组比较 $P<0.01$; ②与 VD 模型组比较 $P<0.01$

3 讨论

VD 是我国老年期痴呆中最常见疾病之一, 学习和记忆障碍是其核心症状。目前认为, 反复性脑缺血所导致的脑组织结构和功能的改变, 是造成 VD 的主要原因之一。本实验采用双侧颈总动脉线结法造成小鼠脑组织反复缺血-再灌注损伤, 并且经过行为学测试存在学习和记忆功能障碍, 是较理想的 VD 动物模型^[4]。

近年来 NO 在脑缺血中的作用受到人们广泛关注, 研究发现, 脑缺血缺氧损伤可引起脑组织 NO 水

平升高, 不同来源的 NO 可表现神经损伤和神经保护双重作用^[5]。但目前的研究主要为脑缺血损伤早期, 尤其是 48h 之内的观察。在本实验中, 我们发现 VD 小鼠在缺血再灌注损伤 7d 后较长时期内海马及脑皮质的 NOS 阳性神经元逐渐减少, 且出现树突缩短、消失, 胞体浓缩、崩解等形态学变化。分析其原因可能为: ①VD 小鼠在较长时期内海马及脑皮质神经细胞发生凋亡或坏死^[6]。②VD 时神经细胞内 Ca^{2+} 系统平衡紊乱, Ca^{2+} 持续较高水平, 钙调素生成减少^[7], 不能有效激活 NOS, 可能是导致 NOS 活性降低的重要因素。③脑组织能量障碍、神经元损伤以及基因转录活性的失常, 使细胞合成功能低下。

目前研究表明, NO 与学习和记忆功能密切相关。突触后 N-甲基-D-天门冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体及非 NMDA 受体通路产生的 NO, 在正常生理条件下可作为一种逆行信使, 扩散并刺激突触前谷氨酸合成及释放, 从而诱导和维持长时程增强(long-term potentiation, LTP)的生成, 在学习和记忆过程中发挥重要作用^[8]。有实验证实, NOS 底物 L-精氨酸或 NO 释放剂均能促进 LTP 的形成, 而向神经元注射 NOS 抑制剂或用能与 NO 牢固结合的血红蛋白可阻断 LTP 的产生^[9]。有文献报道, 海马、额叶等与学习记忆有关脑区的 NOS 神经元选择性受损可以解释衰老以及 AD 时出现的智能障碍等临床特征, 一定水平的 NOS 活性或 NO 含量对维持学习和记忆功能具有重要意义^[10]。本实验发现 VD 小鼠海马及脑皮质 NOS 阳性神经元数目在较长时期内逐渐减少, 这可能是导致 VD 学习记忆障碍形成的原因之一, 提示 VD 的发病与 NO 生成减少有关。

双氢麦角碱是一种 α 肾上腺素能受体拮抗剂, 具有扩张脑血管、改善脑组织微循环的作用。本实验发现, 随着用药时间的延长, 双氢麦角碱可阻止 VD 小鼠海马和皮质 NOS 阳性神经元的减少, 同时也有效地改善了 VD 小鼠临床症状。

4 结论

VD 小鼠海马及皮质 NOS 阳性神经元的数量在较长时期内持续减少可能与 VD 发病相关, 而双氢麦角碱可以提高海马及脑皮质 NOS 阳性神经元的数量, 并改善 VD 的临床症状, 但确切的生理机制有待进一步阐明。

参考文献

[1] Meyer RC, Spangler EL, Kametani H, et al. Age-associated

(下转 215 页)