

# 一氧化氮对一叶萩碱诱导的突触传递长时程增强的作用

许琳, 张均田\*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 目的 研究一叶萩碱对麻醉大鼠突触可塑性形成中一氧化氮(nitric oxide, NO)的作用。方法 以在体记录突触传递长时程增强(long-term potentiation, LTP)的电生理学方法,记录大鼠海马齿状回颗粒细胞层群峰电位(population spike, PS);以硝酸还原酶法测定 NO 含量。结果 在侧脑室给予 0.2 nmol·L<sup>-1</sup>一叶萩碱(securinine, 5 μL)前给予 1 μmol·L<sup>-1</sup> 7-硝基吲唑可抑制 LTP 的诱导。给药前 ip L-精氨酸 250 mg·kg<sup>-1</sup>可逆转这种抑制作用。取脑进行 NO 含量测定,与一叶萩碱对照组相比,7-硝基吲唑+一叶萩碱给药组的 NO 含量明显下降。结论 选择性一氧化氮合酶(nNOS)抑制剂 7-硝基吲唑抑制一叶萩碱对 LTP 的诱导;由 nNOS 催化产生的 NO 参与了一叶萩碱诱导 LTP 的过程。

**关键词:** 突触传递长时程增强; 一叶萩碱; 一氧化氮; 逆行性信使

中图分类号: R282.71; R965; Q424 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2002)12-0918-04

LTP 自 1973 年被首次发现以来,人们对其确切的细胞和分子机制尚未搞清。LTP 的诱导需要突触后 N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体的激活,它的维持又与突触前神经递质释放增加有关,其中一些信使分子可能从突触后向突触前转移。这些联系突触前后的逆行性信使(retrograde messenger)成了倍受人们关注的焦点,其中 NO 尤其受到重视。NO 在生物体内有广泛的生物活性,作为一种逆行信使,它也参与突触可塑性(synaptic plasticity)的形成<sup>[1]</sup>。1991~1992 年间,以 Bohme, Schuman, Madison 和 Haley 为首的 4 个研究小组首次对 NO 在 LTP 中可能的作用进行了研究。他们发现一氧化氮合酶抑制剂能阻断海马脑片 LTP 的形成,而这种抑制作用可被左旋精氨酸(L-Arg)所逆转<sup>[2,3]</sup>。

一叶萩碱是从大戟科植物一叶萩叶中提取的生物碱。药理学研究已经证明一叶萩碱对中枢神经系统,特别是对脊髓有明显的兴奋作用。研究发现,一叶萩碱增强麻醉大鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)的基础突触传递效能和低频刺激诱导的 LTP,其效果呈剂量依赖性,但其具体的作用机制尚不清楚。为了研究 NO 是否在一叶萩碱对麻醉大鼠突触可塑性中发挥作用,我们设计了以下实验。

## 材料与方 法

**动物** SD 大鼠, (200 ± 20) g, ♂, 由中国医学科

学院实验动物中心提供,实验前在动物房预饲养 3 d。

**药品与试剂** 一叶萩碱由本所植化室提供。先以磷酸盐缓冲液(pH 5)配成 8 × 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的母液,以 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调至 pH 6 常温保存。临用前以 0.9% 生理盐水稀释至所需浓度。7-硝基吲唑(7-nitroindazole, 7-NI, Sigma, USA), L-精氨酸(L-arginine, Sigma, USA), NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

**仪器** VC-11 记忆示波器, SEN7203 三道电子刺激器, SS-202J 刺激隔离器为日本 Kohden 公司产品; SR-6N 立体定位仪为日本 Narishige 公司产品; 751-紫外可见分光光度计, 国产。

**电极的埋植** 动物以 20% 乌拉坦(1.0 g·kg<sup>-1</sup>, ip)麻醉,并固定于立体定位仪上,参照 Pellegrino 大鼠脑立体定位图谱在 AP<sub>0.5-0.8</sub>, L<sub>1.6-1.8</sub> 的位置用钻头在颅骨上钻一直径 1.5 mm 的小孔并将一外径 0.8 mm 的小钢管插入侧脑室。以同样的方法埋植刺激和记录电极,刺激电极(两枚间距 0.5 mm,外覆聚四氟乙烯绝缘层,尖端裸露 0.2 mm,直径 0.15 mm 的不锈钢针构成)埋植于内嗅区穿通路(perforant path, PP)纤维间,其坐标为: AP<sub>7.5-7.8</sub>, L<sub>4.4-4.6</sub>, H<sub>3.5-4.0</sub>。记录电极(外覆绝缘层,尖端裸露 0.2 mm,直径 0.2 mm 的不锈钢针)则埋藏在海马齿状回颗粒细胞层,其定位坐标为: AP<sub>3.7-4.0</sub>, L<sub>2.4-2.7</sub>, H<sub>3.0-3.5</sub>。在立体定位仪上按定位坐标分别调整刺激电极和记录电极的位置,当以固定强度的刺激记录到最大群峰电位(population spike, PS)时将电极固定。

**PS 的记录及其幅值的计算方法** PS 幅值被作为齿状回颗粒细胞群兴奋性的指标。PS 的记录是

收稿日期: 2001-12-14。

\* 通讯作者 Tel: (010) 631 651 79, Fax: (010) 6301 7757,

E-mail: Zjtian@public.bta.ney.cn

采用细胞外记录法。测试刺激(波宽为 0.15 ms 的方波刺激)由电子刺激器产生后,经刺激隔离器和刺激电极输向 PP,测试刺激频率为 30 s/次,刺激强度则采用引起最大 PS 所需刺激强度的 1/2。

**给药方法** 以 DMSO( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )溶解 7-硝基吲唑,再用 0.9%生理盐水将其稀释到所需浓度。*L*-精氨酸应用生理盐水配制。通过侧脑室套管给药方式为:将连接微量注射器的细塑料管导入套管后,稳定 5 min,记录基础突触传递 25 min,然后将药物或溶剂  $5 \mu\text{L}$  缓慢推注入侧脑室。末次注射后,细塑料管留在套管内直至实验结束。

药物浓度换算是将大鼠脑容积计量为 2 mL,根据给药体积以及原药液浓度,计算出药物浓度。本实验给予一叶菝碱  $0.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,7-硝基吲唑  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,7-硝基吲唑在一叶菝碱给药前 10 min 侧脑室通过套管给予。*L*-精氨酸  $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  在 7-硝基吲唑给药前 10 min ip。

**数据的分析与统计** 每个测试刺激都诱发 1 个 PS,连续 5 个 PS 幅度叠加后的平均值作为该时间点的 PS 幅值,以给药前 30 min 记录的 6 个时间点 PS 值的平均值为基础传递水平,再以该平均值分别除以所有时间点的 PS 幅值得出各相应时间点的相对幅值(%),最后以时间为横坐标,PS 相对幅值(%)为纵坐标绘出 PS 幅值的动态变化图。统计用 *t* 检验,以 Excel 7.0 软件分析。

**NO 含量的测定** 原理: NO 化学性质活泼,体内代谢转化为硝酸根( $\text{NO}_3^-$ )和亚硝酸根( $\text{NO}_2^-$ ),而  $\text{NO}_2^-$  又进一步转化为  $\text{NO}_3^-$ 。本法利用硝酸还原酶特异性将  $\text{NO}_3^-$  还原为  $\text{NO}_2^-$ ,通过显色深浅测定其浓度的高低。方法:自立体定位仪上取下动物,断头取脑,以液氮快速冷却后,取出称重。以预冷的匀浆介质(pH 7.4,  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖,  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $0.0001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTANa<sub>2</sub>)制成 20%匀浆,以 Lowry 法进行蛋白含量测定,以硝酸还原酶法检测 NO 水平。

## 结 果

### 1 7-硝基吲唑对基础突触传递的影响

如图 1 所示,麻醉大鼠侧脑室给予 7-硝基吲唑( $2 \text{ nmol}$ , icv) 60 min 后,海马 DG 的 PS 幅度与溶剂对照组比较无明显差异。PS 幅度在第 5, 15, 30 及 60 min 时分别为( $99 \pm 4$ )%, ( $103 \pm 5$ )%, ( $106 \pm 7$ )%及( $110 \pm 8$ )%。结果显示,在整个记录过程中 7-硝基

吲唑对麻醉大鼠海马 DG 突触传递水平无影响。

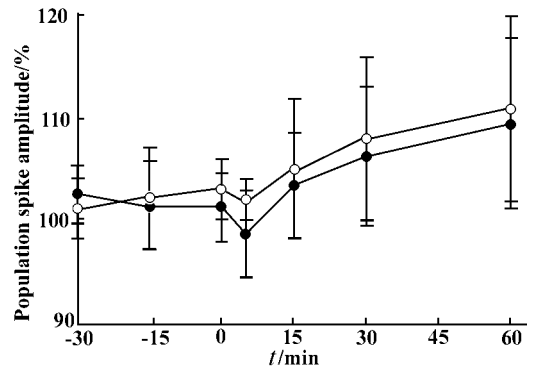


Figure 1 Effect of selective nNOS inhibitor 7-nitroindazole (7-NI) on long-term potentiation (LTP) induction in the dentate gyrus of the hippocampus of anesthetized rats. 7-NI ( $2 \text{ nmol}$ ) was injected icv 10 min before vehicle. The average amplitude of the population spikes recorded 30 min before 7-NI injection was defined as 100%. All data were presented as  $\bar{x} \pm s$  of 6 observations. ( $P > 0.1$  vs control). ○—○ Vehicle; ●—● 7-NI

### 2 7-硝基吲唑对一叶菝碱诱导麻醉大鼠 DG 的 LTP 的影响

麻醉大鼠侧脑室给予一叶菝碱( $0.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , icv)可以诱导出 PP-DG LTP,给药后 15, 30 及 60 min 的 PS 幅度分别为( $137 \pm 11$ )%, ( $156 \pm 12$ )%和( $175 \pm 6$ )%, ( $n = 6$ ,  $P < 0.01$  vs vehicle group)。如在给一叶菝碱前 10 min 给予  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  7-硝基吲唑,在 15, 30 及 60 min 时的 PS 幅度值分别为( $100 \pm 23$ )%, ( $106 \pm 16$ )%和( $124 \pm 20$ )%。与一叶菝碱对照组相比,7-硝基吲唑抑制了一叶菝碱对麻醉大鼠 DG LTP 的诱导作用( $n = 6$ ,  $P < 0.01$ , 图 2)。

### 3 *L*-精氨酸对 7-硝基吲唑抑制作用的影响

如图 3 所示 *L*-精氨酸  $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  在 7-硝基吲唑给药前 10 min ip, *L*-精氨酸能够部分逆转 7-硝基吲唑对一叶菝碱( $0.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , icv)诱导的麻醉大鼠突触传递的抑制作用,其幅度值在给予一叶菝碱后 15, 30 及 60 min 分别为( $123 \pm 15$ )%, ( $129 \pm 11$ )%和( $149 \pm 12$ )%。虽然其幅度值与一叶菝碱对照组相比无明显差别,但其对 7-硝基吲唑抑制作用的逆转有显著性意义( $P < 0.05$  vs 7-NI + securinine group)。

### 4 NO 含量的测定

单纯一叶菝碱( $0.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , icv)给药,在 30 及 60 min 分别测定脑内 NO 含量,均有明显增加(表 1)。而在给一叶菝碱前 10 min 给予  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  7-硝基吲唑,NO 含量有所下降( $P < 0.05$ ),但仍明显高

于空白对照组 ( $P < 0.01$ )。

### 讨 论

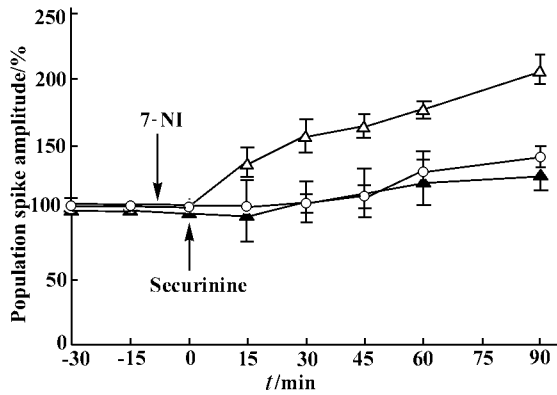


Figure 2 Effect of selective nNOS inhibitor 7-nitroindazole (7-NI) on long-term potentiation (LTP) induction in dentate gyrus of the hippocampus of anesthetized rats. 7-NI (2 nmol) was injected icv 10 min before securinine, and the average amplitude of the population spikes recorded 30 min before 7-NI injection was defined as 100%. All data were presented as  $\bar{x} \pm s$  of 6 observations.  $\triangle - \triangle$  Securinine;  $\blacktriangle - \blacktriangle$  7-NI + securinine;  $\circ - \circ$  Vehicle

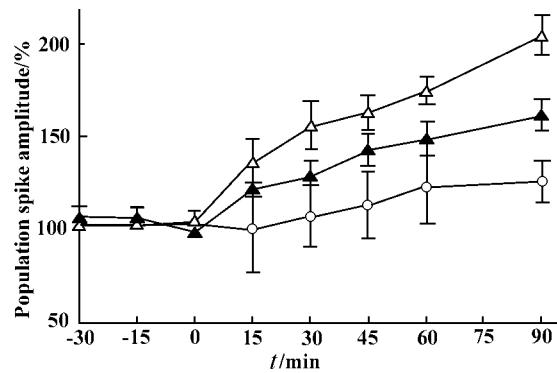


Figure 3 Effect of L-Arg on the inhibition of 7-nitroindazole (7-NI). 7-NI was injected icv 10 min before securinine, and L-arginine (ip) was injected 10 min before 7-NI. The average amplitude of the population spikes recorded 30 min before L-arginine injection was defined as 100%. All data were presented as  $\bar{x} \pm s$  of 6 observations.  $\triangle - \triangle$  Securinine;  $\blacktriangle - \blacktriangle$  L-Arg + 7-NI + securinine;  $\circ - \circ$  7-NI + securinine

**Table 1 Effect of securinine (0.2 nmol·L<sup>-1</sup>, icv) and 7-nitroindazole (7-NI) (1 μmol·L<sup>-1</sup>, icv) on NO release in rat brain**

Group	NO/μmol·g <sup>-1</sup>	Rat number
Blank control	0.32 ± 0.09	4
Securinine (30 min)	0.51 ± 0.04**	4
Securinine (60 min)	0.82 ± 0.08**	6
7-NI + securinine (60 min)	0.65 ± 0.14** #	4

Each figure represents  $\bar{x} \pm s$  of 4 ~ 6 observations. \*\*  $P < 0.01$  vs control, #  $P < 0.05$  vs securinine 60 min

近年来的研究表明, NO可发挥多种生理功能,除扩张血管外,尚可促进免疫、抗血栓,特别是在中枢神经系统(CNS)中起着信息传递的重要作用,引起了神经科学界的瞩目。NO是一种非经典的信使分子,它与经典递质不同,不储存于囊泡,不以胞裂外排方式释放,而以扩散方式达到邻近的靶细胞。NO在CNS的突触可塑性中起重要作用。海马长时程增强被认为是突触可塑性的一种模式,是学习和记忆的细胞基础。近年来的研究结果表明,NO是参与LTP形成的逆行信使<sup>[4]</sup>。

因为NO很不稳定,生成后几秒中内便被氧化成硝酸盐和亚硝酸盐,因而NO合酶的研究更为可行,尤其NOS拮抗剂的发现,大大促进了一些NO功能的研究<sup>[5]</sup>。NOS有iNOS, nNOS和eNOS 3种形式,其中海马中主要为nNOS和eNOS,我们实验发现选择性nNOS抑制剂7-硝基吲唑可抑制一叶萩碱对LTP的诱导,而这种抑制作用被L-精氨酸逆转, nNOS产生的NO参与了一叶萩碱作用的麻醉大鼠DG LTP的形成。

在海马LTP的研究中, LTP可分为早期(early-phase)和晚期(late-phase)LTP。在早期递质释放增加,无蛋白合成,可持续1h左右。有研究报道<sup>[6]</sup>, NO参与LTP的早期阶段。突触后NO可能激活GC,产生cGMP,然后激活PKG,PKG也是与海马LTP产生有关系的重要分子,PKG抑制剂可抑制LTP的产生。这样,通过NO-cGMP-PKG信号通路提高突触传递,产生活性依赖性长时程递质释放增加,诱导LTP产生。在本研究中发现给予一叶萩碱后,NO的含量与空白对照组有明显区别,且随着时间的推移(30~60min),NO含量明显增加。说明NO确实参与了一叶萩碱对LTP的诱导作用,这与文献报道一致。但利用硝酸还原酶法进行NO含量测定,方法的稳定性和灵敏度还有待提高和改进。

此外,目前关于NO的作用机制还存在很大争议。NO在LTP中作为逆行信使的研究报道很多,但也有报道NO在Ca<sup>2+</sup>/CaM诱导的突触传递加强中作为一个突触后信使作用,而不是逆行性信使作用<sup>[7]</sup>。而且,CNS中NOS的分布与兴奋性氨基酸NMDA受体的分布是一致的,提示两个系统存在密切关系。另外,NO的作用靶点还包括ADP-核糖基转移酶(ADPRT),NO可直接激活ADP-核糖环化酶,产生环ADP-核糖,进而提高Ca<sup>2+</sup>从胞内钙库释放,

有报道<sup>[8]</sup>这种释放在 HFS 诱导的 LTP 中所起的作用已在海马脑片实验中得到证实。另外, ADPRT 阻断剂抑制 HFS 诱导的 LTP, NO 对 LTP 的作用可能存在独立于 GC-cGMP 之外的信号通路, 即通过突触前蛋白 ADP-核糖基化的途径。另一个 NO 的细胞内靶点是 P21(ras)<sup>[9]</sup>。NO 可激活 ras, ras 激活导致丝裂原激活的蛋白激酶(MAPKs)的磷酸化, MAPKs 调节基因转录和 LTP。总之, 研究认为 NO 对这些通路的调节利于 Ca<sup>2+</sup>/CaM 诱导突触传递的加强, NO 为突触后作用。

在本实验中发现 NO 参与了一叶菝碱对麻醉大鼠海马 DG LTP 的诱导, 但其确切的作用机制尚待深入研究, 如产生的 NO 是属于逆行信使还是主要作用于突触后作用, 是作用于 ADPRT 还是 NO-cGMP-PKG 信号通路或 ras 通路, 尚待深入研究。

#### REFERENCES:

- [1] Murphey RK, Davis GW. Retrograde signaling at the synapse [J]. *J Neurobiol*, 1994, **25**(6):595 - 598.
- [2] Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, et al. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation [J]. *Eur J Pharmacol*, 1991, **199**(3):379 - 381.
- [3] Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation [J]. *Science*, 1991, **254**(5037):1503 - 1506.
- [4] Hawkins RD, Son H, Arancio O, et al. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus [J]. *Prog Brain Res*, 1998, **118**(3):155 - 172.
- [5] Son H, Hawkins RD, Martin K, et al. Long-term potentiation is required in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase [J]. *Cell*, 1996, **87**(6):1015 - 1023.
- [6] Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus [J]. *J Neurosci*, 1999, **19**(23):10250 - 10261.
- [7] Gladys YK, Paul TK. Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in Calcium/Calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons [J]. *J Neurosci*, 1999, **19**(16):6784 - 6794.
- [8] Wang JH, Kelly PT. Developmental changes of postsynaptic calcineurin and IP3 receptors regulating synaptic transmission [J]. *Soc Neurosci Abstr*, 1997, **23**(11):1128.
- [9] Yun HY, Gonzalez ZM, Dawson VL, et al. Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate receptor induced activation of P21 ras [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(10):5773 - 5778.

## EFFECT OF NO ON SECURININE-INDUCED LONG-TERM POTENTIATION IN DENTATE GYRUS OF THE HIPPOCAMPUS OF ANESTHETIZED RATS

XU Lin, ZHANG Jun-tian

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To study the effect of NO on securinine-induced long-term potentiation in the dentate gyrus of anesthetized rats. **METHODS** The population spike (PS) was recorded by electrophysiological techniques. Then the rat brain was homogenized, of which the NO level was detected by spectrometry at 550 nm after the catalysis of nitric acid reductase. **RESULTS** Pretreatment with 7-nitroindazole (1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 5  $\mu\text{L}$  icv) was shown to inhibit LTP induced by securinine (0.2  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 5  $\mu\text{L}$  icv) in anesthetic rats. The percentage of PS amplitude was (100  $\pm$  23) %, (106  $\pm$  16) % and (124  $\pm$  20) % at 15, 30 and 60 min, respectively ( $n = 6$ ,  $P < 0.01$ ). Meanwhile, the NO level was obviously higher in securinine group compared with that in 7-nitroindazole group ( $P < 0.01$ ). Nevertheless, L-arginine (250  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , ip) was found to reverse this inhibitory effect induced by 7-nitroindazole ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION** Selective nNOS inhibitor 7-nitroindazole inhibited the securinine-induced LTP in anesthetic rats, which demonstrated that NO was involved in securinine-induced LTP.

**KEY WORDS:** long-term potentiation; securinine; nitric oxide; retrograde messenger