

限制活动慢性应激大鼠脑组织 NO、NOS 含量变化的研究

杨来启, 吴兴曲, 王晓锋, 杨喜民, 刘光雄, 马文涛, 张宏宾, 李栓德

(解放军第三医院, 陕西 宝鸡 721004)

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2002)03-0220-02

The Study of Change of Nitric and Nitric Oxide Synthase in Limbic System of the Slow Stress Rat

YANG Lai-qi, WU Xing-qu, WANG Xiao-feng, et al

The Third Hospital of PLA, Baoji 721004, China

【Abstract】 Objective: To observe the change in nitric and nitric oxide synthase in limbic system in the rat brain under slow stress. **Methods:** The slow stress condition was induced by restricted movement of rats, during which the level of NO and activity of NOS were measured in hippocampus, prefrontal and hypothalamus. **Results:** The level of NO and activity of NOS of hippocampus, hypothalamus and prefrontal in stress group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The level of NO increased in brain tissues might play a role in stress related disorder.

【Key words】 Environmental stress; Limbic system; Nitric oxide; Nitric oxide synthase

慢性应激对脑海马损害已得到证实^[1,2]。急性应激障碍和创伤后应激障碍(PTSD)表现出记忆、学习等认知障碍及行为障碍,可能与脑边缘系统功能受损有关。病理生理机理尚不清楚,氧自由基对脑细胞毒性作用可能参与发病^[3]。近些年来研究说明 NO 是体内重要的自由基,在中枢神经系统具有重要的生理和病理作用,在生理情况下参与信息传递,在病理情况下对神经细胞具有毒性作用。本研究通过建立应激大鼠模型,检测大脑额叶、海马、下丘脑组织 NO 含量和 NOS 活力的变化,探讨其在应激过程中及应激障碍发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

健康成年雄性大鼠,体重 180~250g,由第四军医大学动物实验中心提供,大鼠随机分为应激实验组和对照组两组,每组 8 只。适应性饲养 1 周。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的制备 采用大平台水环境法^[4],应激箱为 30cm×30cm×30cm 大小的玻璃水箱,正中一直径 18cm 高 6cm 圆形平台,箱底注满水,水深 3cm。水温保持在 20℃左右,每天更换箱中的水。自然昼夜光照,大鼠在平台上可自由进食进水,也可以睡眠,但环境限制活动,造成慢性应激。对照组独笼饲养,排除实验组大鼠独笼饲养的影响,自然昼夜光照,室内温度控制在 18.0~22.0℃。两组大鼠均观察 30 天。断颈处死,打开颅腔,分别取出大脑额

叶、海马、下丘脑组织,生理盐水冲洗,除去血液,滤纸拭干,分析天平称重量,将组织与 1ml 蒸馏水放入玻璃匀浆器中,制成匀浆,用 1 万转/分钟低温离心机离心 5 分钟,取上清液,置于一 40℃冰箱保存待测。

1.2.2 NO 含量和 NOS 活力测定 按照试剂盒说明书方法步骤测定,试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。NO 含量测定采用 Griess 比色法,NO 化学性质活泼,体内代谢转变为 NO_3^- 和 NO_2^- ,采用硝酸还原酶,特异性将 NO_3^- 还原为 NO_2^- , NO_2^- 与 Griess 试剂反应成紫色化合物,颜色深浅与标本中的 NO 含量成正比。NOS 测定采用酶法,NOS 的测定是依据 NOS 催化 L-精氨酸(L-Arg)生成 NO 的原理,由专业人员检测。

2 结 果

2.1 行为变化

对照组白天安静、活动少、睡眠多,夜间活动、进食饮水,手抓时不咬手、不相互攻击。应激组大鼠生活习性、规律改变,白天活动、进食、饮水增多,双后肢站立,企图逃出笼,相互撕咬攻击,手抓时咬手等行为改变。

2.2 二组大鼠脑组织 NO 含量和 NOS 活力比较

应激组海马、下丘脑 NOS 活力均高于对照组,有显著差异($P < 0.05$)。应激组海马、下丘脑 NO 含量均较对照组升高($P < 0.05$)。见附表。

附表 应激组与对照组脑组织 NO 含量及 NOS 活力比较($\bar{x} \pm s$)

	NO 含量(mg/mg prot)			NOS 活力(NU/mg prot)		
	额叶	海马	下丘脑	额叶	海马	下丘脑
对照组	1.18±0.59	1.03±0.74	1.99±1.33	3.52±0.78	2.21±1.61	5.56±3.08
应激组	1.74±0.41	2.76±0.65*	5.28±0.96*	4.4±2.36	4.93±2.08*	10.83±2.09*

注: * 对照组与应激组比较 $P < 0.05$

3 讨 论

本研究采用约束限制活动这样一种稳定、可靠的慢性应激方式,建立大鼠慢性应激模型。既往研究表明,应激对学习和记忆等认知功能的影响,与慢性应激对脑边缘系统海马神经细胞损害有关,病理生理机制尚不清楚。传统的应激学说认为是应激状态下高水平的糖皮质激素对海马神经细胞的直接损伤,近若干年来研究认为,体内自由基过多是对脑神经细胞损害的重要原因^[3,4]。

已有研究表明 NO 在体内具有双重性作用,既是一种新型细胞内和细胞间的传递信使,也是一种活性很强的气体分子自由基。在生理状态下传递信息,在病理状态下对神经细胞具有毒性作用。体内 NO 的生成与 NOS 的活性有关,应用传统的黄递酶组化技术和 NOS 免疫组化技术发现,在嗅球、小脑、海马、上丘、下丘、纹状体、大脑皮质、网状上行激活系统等均有 NOS 的广泛存在^[5]。研究表明不同脑区神经核团的神经元一氧化氮合成酶(NOS)活性差别很大,大脑皮层灰质 NOS 活性较强,纹状体内,下丘脑的视上核、视旁核,中脑的视上丘、下丘,脑垂体等部位 NOS 活性很高。本研究结果说明参与应激反应的脑边缘系统部位 NO 含量和 NOS 活性增高,海马、下丘脑组织尤为明显,与既往研究结果相一致。海马和下丘脑 NOS 活性均显著增高,也提示两者对应激的反应比较敏感。当 NO 得到一个电子时形成还原型 NO⁻,它能与超氧阴离子 O₂⁻ 作用形成过氧化亚硝酸根阴离子(ONOO⁻),后者及分解产物羟自由基等能引起脂质过氧化和细胞毒性。实际上 NO、ON⁺也可分别与 O₂⁻、H₂O₂ 等反应生成过硝酸根(OONO⁻),其在酶的条件下可分解成 OH 和 NO₂⁻ 两

种自由基,也都有较强的细胞毒性。NO 的神经细胞毒性作用导致细胞膜功能失调致细胞死亡。脑神经细胞的损伤则可出现脑功能障碍表现相应的临床症状,应激状态时 HPA 轴的异常可能与这些损害有关。正常情况下,机体吸收的氧 95%通过接受 4 个电子氧化产生能量供机体需要,但有 5%的还原形成具有神经毒性的自由基,在某些病理因素触发下,可使体内 O₂⁻ 和 OH 生成过多,应激则起到这种触发作用。本研究结果脑组织 NO 含量和 NOS 活性均增高,提示在应激状态下,神经递质 NO 可能主要以神经毒性作用为主。

本研究结果还说明,长时间暴露过于狭窄不舒适的环境中,限制活动空间,可以引起慢性应激反应,可能损害身心健康,尤其脑功能损害,表现出认知、情绪及行为障碍。

参 考 文 献

1 郑 晖,杨 权.慢性应激对海马结构和功能的影响.国外医学精神病学分册,2001,28:162-165
2 夏国玲.应激损害大脑.国外医学精神病学分册,2000,27:43-46
3 王焕林,余海鹰,崔 庶,等.精神分裂病人红细胞 SOD、GPX 及 CAT 活性的对照研究.中华精神科杂志,1996,27:83
4 Cadel JL. Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview. Int Neurosci, 1988, 40: 13
5 Vincent SR, Hope BT. Neurons that say NO. TITN, 1999, 15(3): 108
6 Bradley DY, Zhou J, Smagin GN, et al. Sleep deprivation by the "Flower Pot" technique and spatial reference memory. Physiol Behav, 1997, 61: 249-256

(收稿日期: 2002-02-11)