维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2003年第12卷第2期
J Regional Anat & Operative Surg, 2003, Vol.12, No.2

^{60}Coγ射线全身照射后大鼠脑NOS表达变化及其与神经再生的关系

喻启玲* 左艳芳**

【摘 要】 **目的** 研究大鼠经^{60}Coγ全身照射致中枢神经系统损伤后，神经再生过程中NOS表达变化规律，初步探讨NOS表达变化对神经损伤后再生的影响及意义。**方法** 旋转式^{60}Coγ射线一次性全身低剂量照射，NDP组化染色。**结果** 大鼠经8 Gy ^{60}Coγ射线全身照射1周后，大脑皮质、基底核、丘脑和下丘脑的大部分核团NOS呈中等强度阳性表达，照射后第4周，以上脑区NOS水平明显升高，照射后第7周NOS的阳性表达逐渐减弱，但仍高于正常水平。正常对照组大鼠除海马锥体细胞层有较强的阳性标记外，其它脑区仅有弥散的NOS弱阳性标记。**结论** ^{60}Coγ射线全身照射致大鼠脑损伤后NOS表达增强，提示NOS可能在对应的损伤神经元结构再生和突触重建过程中发挥重要作用。

【关键词】 ^{60}Coγ射线；NOS；大鼠；脑；神经再生

Expression of NOS and it's relationship with nerve regeneration in rat brain after ^{60}Coγ irradiation *YU Qiling, Zuo Yanfang. Out-patient Department of Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing* 400038

【**Abstract**】 **Objective** To study the expression rule of NOS after ^{60}Coγ irradiation induced central nerve damage and analyse the possible effects of NOS on nerve regeneration after the damage. **Methods** Wistar rats were subjected to whole-body irradiation with 8 Gy ^{60}Coγ rays. The expression of NOS was detected by using NDP. **Results** The expression of NOS increased in cortex, caudate putamen, globus pallidus, thalamus and hypothalamus of rats one week after 8 Gy ^{60}Coγ radiation. Four weeks after radiation the NOS expression reached its peak and began to decrease. But it still remained at a higher level than normal. Seven weeks after radiation it decreased to a low level. **Conclusion** Enhanced expression of NOS after ^{60}Coγ radiation in rats' brain may have an importment association with nerve regeneration and reconstruction of synapse.

【Key Words】 ^{60}Coγ rays; NOS; Rat; Brain; Nerve regeneration

二十世纪八十年代以前，人们一直认为成年哺乳动物中枢神经系统损伤后不能再生。近二十年来，许多研究已表明，中枢神经损伤后有轴突侧支发芽或突触增生现象，各种细胞移植和自体外周神经段或神经再生桥的实验也证实轴突能够再生，但对该过程的分子机制仍未能给以揭示。一氧化氮(nitric oxide, NO)可作为一种"气体性"信使分子在神经系统中发挥作用，它既可能参与神经细胞间的信息传递，又可能参与神经系统疾病的病理过程，但其在中枢神经系统损伤后表达的变化和意义目前尚不清楚[1]。本研究以大鼠^{60}Coγ射线一次性全身照射为损伤模型，用NDP组化染色法检测放射损伤后大鼠脑内一氧化氮合成酶(NOS)表达的动态变化，了解损伤后神经再生过程中NOS表达变化规律，初步探讨NOS表达变化对神经损伤后再生的重要意义，为神经损伤与再生的研究提供理论基础与实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康Wistar大鼠20只(第三军医大学动物所提供)，雄性、3月龄，体重(200 ± 30)g，随机分为4组，每组5只，其中1组为对照组，3组为照射组。照射组动物照射前24 h内禁食，不禁水。

1.2 照射方式和条件

将照射组大鼠置入有孔塑料盒内，辐射源至塑料盒中心线距离为140 cm。旋转式^{60}Coγ射线一次性全身照射，照射剂量率为2.597 Gy/min，照射剂量8 Gy，接受照射3组动物分别于照射后1，4，7周取材检测。

1.3 取材

大鼠在戊巴比妥钠腹腔注射麻醉下开胸，经左心

* 作者单位：400038 重庆市第三军医大学西南医院门诊部
** 第三军医大学外科应用解剖与手术学教研室

维普资讯 http://www.cqvip.co

室插管，先用生理盐水 100 ml 冲洗血液，再用4%多聚甲醛灌注固定。立即取脑、脊髓于4%多聚甲醛中后固定5 h，再浸入含30%蔗糖和4%多聚甲醛(0.1 MPB稀释)固定液中过夜(4 ℃)。连续冰冻切片，片厚20 μm，漂于4%多聚甲醛中备用。

1.4 NDP组化染色

参照伦敦大学 BurnstocK 实验室方法配制作用液：0.2 mg/ml NBT，2.7 mg/ml L-苹果酸，1.0 mg/ml β-MADPH (购于 Sigma 公司)，0.1% Trton X-100，0.1M Tris-HCl(pH 7.6)。标本用含 0.1% Triton X-100 的 TBS 充分漂洗后入作用液中，37℃孵育 15～30 min 后用 TBS 终止反应，染色后的标本切片经乙酸逐级脱水、二甲苯透明、DPX 封片后观察。

1.5 图像分析及数据处理

应用 Tiger920 图像分析系统测定各组 NOS 的相对含量。光镜下放大 100 倍，在相应脑区或核团对 NOS 阳性表达区域进行分析定量，每例切片随机测 10 个单位面积，每组动物分别测得 50 个单位面积。获得每个单位面积 NOS 相对含量的平均值及标准差，应用 SPSS 统计软件进行 t 检验统计学处理。

2 结果

2.1 NOS 在正常成年大鼠脑的表达

在正常对照组大鼠，下丘脑、中脑、纹状体、海马和大脑皮质等部位都出现弥散的 NOS 弱阳性标记信号，小脑和嗅球有较强的阳性标记反应。

2.2 成年大鼠脑放射损伤后 NOS 表达的变化

大鼠经 8 Gy ^{60}Coγ 射线全身照射 1 周后，大脑皮质、基底核、丘脑和下丘脑的大部分核团 NOS 呈中等强度阳性表达，照射后第 4 周，以上脑区 NOS 水平明显升高，照射后第 7 周 NOS 的阳性表达逐渐减弱，但仍高于正常水平。主要表现为照射组大鼠脑 NOS 的表达增强，阳性神经元明显增加，皮层阳性细胞数亦有增加，在杏仁核簇，脑桥巨细胞网状核观察到阳性细胞。另外，面神经核等亦有分布。而且小脑有许多小型细胞而非蒲肯野细胞具明显的标记，同时海马的锥体层以外的小型细胞有较强的标记。小脑和海马内的这些小型细胞可能为胶质细胞，推测可能是照射引起诱生性 NOS 基因的表达而致。

2.3 图象分析

经图像分析测定，在放射损伤后 1、4、7 周，大脑皮质、基底核、丘脑和下丘脑 NOS 阳性反应物光密度值都显著高于对照值，其最高值比正常对照值升高 3～5 倍(附表)。

附表 ^{60}Coγ 放射损伤后大鼠脑 NOS 阳性表达面积密度变化($\bar{x} \pm s$)

时相点	大脑皮层	尾壳核	丘脑	下丘脑
对照	1.248±0.103	0.463±0.087	0.647±0.093	0.736±0.082
1周	2.672±0.175	2.206±0.218	1.854±0.109	1.635±0.096
4周	3.439±0.217	3.636±0.329	2.741±0.230	2.924±0.215
7周	2.498±0.236	2.572±0.197	2.075±0.212	2.312±0.183

注：照射组与对照组比较，NOS 阳性表达相差显著，$P<0.05$

3 讨论

近年来，越来越多的证据表明，NO 可能在人体机能的许多方面发挥作用。在生理条件下，NO 作为新型的不典型递质或理想的时空信使，可调节脑血流量、促进递质释放和参与突触可塑性，尤其在长时程增强和长时程抑制、学习与记忆、痛觉调节及阿片成瘾等过程中发挥重要作用[2]。而另一方面 NO 也具有一定的细胞毒性作用，主要是由于大量诱生的 NO 与体内同时大量产生的 O_2^- 等活性氧类反应，生成 $ONOO^-$ 或 N_2O_3 等一系列物质，由二者分别介导氧化损伤[3]。新近超微结构的研究证实，兴奋毒性损伤大鼠尾壳核内，既有明显的神经元缺失和突触密度减少[4]，又在损伤后数周至数月内出现突触增生和神经元回路重建等再生变化[5]。亦即在各种原因导致的神经损伤后，都可以发现神经元结构再生和突触重建现象的存在，而在此过程中又存在多种复杂的因素对这种再生进行调控，人们推测 NOS 可能在这一再生过程中发挥重要作用。因此，本文试图从神经损伤后再生过程中 NOS 表达变化的角度进行研究，了解神经损伤后再生过程中 NOS 表达变化规律，初步探讨 NOS 表达变化对神经损伤后再生的影响和意义。实验结果发现，在神经损伤之后，NOS 表达较正常对照组明显增高，而在神经损伤急性期之后，NOS 的表达仍然维持比平时高的水平，这一 NOS 表达的高水平很可能与放射损伤后神经再生有关。值得注意的是，有研究报道兴奋毒性损伤尾壳核使神经元内 NOS 水平明显升高并持续至第 6 周，NOS 伴随着突触连接的重建过程，一旦重建完成，NOS 含量

维普资讯 http://www.cqvip.com

便骤然下降，甚至消失。因此，我们考虑放射损伤后NOS的表达与神经再生呈伴随关系。据此推测，放射损伤后NOS的较高水平的表达可能与中枢神经的再生有关，其具体作用机理尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

1. 胡敏，姚伟星. 一氧化氮的病理及生理作用. 国外医学·分子生物学分册，1995，17(2)：58－62.
2. Kim CK, Rivier CL. Nitric oxide and carbon monoxide have a stimulatory role in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to physico-emotional stressors in rats. Endocrinology, 2000, 141(7): 2244－2253.
3. Takahashi M, Ikeda U, Masuyama J, et al. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. Cytokine, 1996, 8(11): 817－821.
4. 雷万龙，刘勇，凌东风. 大鼠脑缺血再灌注血管壁NOS和ICAM-1的表达. 中国组织化学与细胞化学杂志，2000，9(1)：83－85.
5. McCann SM, Kimura M, Karanth S, et al. Role of nitric oxide in the neuroendocrine response to cytokines. Ann NY Acad Sci, 1998, 840: 174－184.

（收稿日期：2003－02－06）

·个案与短篇·

冰冻连续断层标本的定标方法

宋 林* 谭立文*

随着断层切割技术的发展，人体断层标本的切割厚度已由最初的厘米级进入了毫米级，已可利用冰冻薄层连续锯切的断层标本进行计算机三维重建和对标本内解剖结构进行空间参数的测量。但各断层的外形是不规则的，按常规冰冻锯切方法不易设置定标点，难以将连续的断层标本重新对位和配准，从而影响重建和测量的精度。

1 材料与方法

选取固定过的手和头标本各1例，根据标本的大小，用厚度为5 mm以上的聚氯乙烯塑料板（PVC板）制成冰冻盒。在冰冻盒的两端各打2个对应的小孔，孔内穿塑料管，并拉直。将冰冻盒置于－25℃的冰柜中，用15%的明胶液包埋标本，制成方形的冰体。利用HN047型工业锯床进行连续锯切，将断层标本放置在玻璃板上，用4℃的冰水刷洗冰面，除去锯末，标本旁加标尺，并用尼康880数码相机获取断层数据。

2 结果与讨论

当层厚大于2 mm时，断层标本及其四周的明胶冰体形成一个完整的断层薄片，且可获得无缺损的连续断层标本。标本经刷洗后，标本与明胶冰体仍然完整，未出现变形或移位现象。每一层数字图像上可见2个由塑料管断面形成的圆点，经测量，两圆点的间距一致。

传统的冰冻锯切方法是将标本直接冰冻，或置于清水中冰冻成冰砖，或用聚氨酯泡沫塑料包埋冰冻标本。采用直接冰冻的标本无法设置定标线，数据获取后难以将各断层重新对位，不适合三维重建，多用于断层结构的观察与描述；利用清水冰冻而成的标本冰体内可以埋设定标线，但在锯切过程中由于冰的脆性，标本周边的冰体易脱落，无法保证定标点的一致性，该方法制作的标本也多用于断层结构的观察和描述，但将冰体用切片技术获取该方法获取的断层图像可用于三维重建；而用聚氨酯泡沫塑料包埋的冰冻标本在锯切时，聚氨酯泡沫塑料易成粉状，难以形成连续而完整的断层标本，也不适用于三维重建。

本实验利用明胶液作标本的包埋体，明胶液冰冻后降低了冰的脆性，在锯切过程中不致碎裂和脱落，可将定标点和标本断层保持在原位，所获取断层图像上的定标点和标本在相对位置上具有一致性，经定标点调整和配准后的连续图像即可用于计算机三维重建，也可利用三维坐标系的原理来测量标本上各结构的立体参数。

由于冰冻明胶体在常温状态下易形成糊状，特别是在刷洗过程中易造成定标点和标本移位，以及模糊断面上组织结构，所以锯切下来的断层标本宜快速在冰水中刷洗，以除去冰末，使标本断面的结构清晰，如来不及处理，可置入冰箱中保存，待以后处理。

（收稿日期：2003－04－15）

* 作者单位：400038 重庆市第三军医大学解剖学教研室