DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.016
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)01-0043-04

论著

海马脑片 LTP 产生中 NO 对 NCAM 蛋白合成的影响

胡志安[1],陈伯成[2],黎海蒂[1],罗 峻[1] ([1]第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038;[2]解放军第303医院麻醉科,南宁 530002)

提 要:目的 观察NMDA受体和一氧化氮(NO)对海马脑片突触传递长时程增强(LTP)产生中神经细胞粘附分子(NCAM)合成的影响。方法 采用胞外记录方法检测LTP产生和维持。Western blot技术检测NCAM合成变化。结果 条件刺激10 min后,LTP产生,NCAM合成显著增加。条件刺激60 min后,LTP稳定维持,NCAM蛋白水平持续增高。NMDA受体阻断剂AP-5和NO合酶抑制剂N硝基精氨酸在抑制LTP产生的同时,也显著抑制NCAM合成。结论 海马脑片LTP产生中NCAM合成的变化与NMDA受体和NO有关。

关键词:长时程增强;一氧化氮;神经细胞粘附分子;海马;大鼠
中图法分类号:R338.26;R348;R392.11 文献标识码:A

Effects of nitric oxide on NCAM production during LTP induction in hippocampal slices

HU Zhi-an[1], CHEN Bai-cheng[2], LI Hai-di[1], LUO Jun[1] ([1]Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Anesthetics, No. 333 Hospital of PLA, Nanning 530002, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of NMDA receptors and nitric oxide (NO) on neural cell adhesion molecule (NCAM) synthesis during hippocampal long-term potentiation (LTP) induction *in vitro*. **Methods** LTP induction and maintenance were tested by using extracelluar electrophysiological recording. The synthesis of NCAM protein was detected by Western blotting. **Results** Application of conditioned stimulation induced LTP and a rise in NCAM at 10 min. NCAM protein level continued to rise while LTP remained stably at 60 min. The NMDA receptor inhibitor AP-5 and the NO synthase inhibitor N-nitro-arginine inhibited the LTP induction and the increase in the NCAM synthesis. **Conclusion** The changes in NCAM synthesis during hippocampal LTP induction *in vitro* may be involved in NMDA receptors and NO.

Key words: long tern potentiation; nitric oxide; neural cell adhesion molecule; hippocampus; rat

突触传递长时程增强(long-term potentiation, LTP)是中枢神经系统重要的可塑性形式。被视为学习记忆的细胞基础。神经细胞粘附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)是位于神经元膜上一种糖蛋白。实验表明,NCAM抗体、肽片段可阻断海马LTP及部分类型的学习记忆行为[1]。据报道,一些神经递质如谷氨酸和乙酰胆碱、神经生长因子等参与了对NCAM活动的调控[2]。

一氧化氮(nitric oxide, NO)已被证明是LTP中一种气体信使分子,其主要作用是促进神经递质的释放,对LTP的维持与长期记忆的形成至关重要[3,4]。但目前尚不了解NO是否参与LTP产生中NCAM合成的调控。为此,本实验采用Western blot技术,对LTP产生中NCAM蛋白变化进行了定量分析,在此基础上,观察了NMDA受体、NO等对NCAM合成的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600048)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39600048)
作者简介:胡志安(1964-),男,湖北省安陆市人,博士,副教授,主要从事可塑性与睡眠机制方面的研究。电话:(023)68753704
收稿日期:2003-03-12;修回日期:2003-10-30

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物:Wistar大鼠48只,雄性,体质量(170±20)g,由第三军医大学实验动物中心提供。主要试剂:NMDA受体阻断剂AP-5抑制剂,NO合酶抑制剂N硝基精氨酸(Nitro-Arg)购自Sigma,NCAM抗体购自Santa Cruz。

1.2 脑片准备

大鼠断头处死后,取出一侧海马,顺海马槽纤维的走向连续切片,片厚400~450 μm,迅速将其移至浴槽尼龙网上,随之保证持续的恒温人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)灌流,ACSF成分为(mmol/L:124 NaCl, 5 KCl, 2 $MgSO_4$, 1.25 NaH_2PO_4, 24 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$, 10 Glucose)。ACSF的pH值为7.4~7.6。使ACSF通过浴槽外室的恒温热水加热(34±0.5)℃,供氧量为10 ml/min(95% O_2与5% CO_2的混合气体)。脑片在孵育30 min后,开始电生理记录。

1.3 电生理记录

刺激电极置于来自CA3区锥体细胞的Schaffer侧枝上,记录

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

电极置于 CA1 区的放射层，所记录的电活动是 Schaffer 侧枝-CA1 区锥体细胞的场兴奋性突触后电位(field excited postsynaptic potential，fEPSP)。记录时，先行测试刺激(test stimulation，TS)，测试刺激每 5～10 min 一次，以观察 fEPSP 是否稳定，待其稳定 15 min 后，再行条件刺激(conditioning stimulation，CS)。条件刺激 10 min 后，检测 LTP 是否产生。fEPSP 的斜率超过 20%，并稳定维持 1 h 时，判断为 LTP 产生。LTP 的发生率是指已发生 LTP 的脑片例数占接受条件刺激的脑片总例数的百分数。

1.4 Western blot 测定 NCAM 蛋白含量

1.4.1 脑片样品的准备 电生理实验完毕，立即取出脑片，称重后置于匀浆缓冲液中，－70 ℃保存。测定时将脑片剪成碎片，于 0 ℃用 PBS(pH 7.4)充分洗涤，3 000 r/min 离心 5 min，弃上清。用 5 倍体积的匀浆缓冲液分离碎片并匀浆 2 min，100 000× g 离心 20 min，上清保存于－70 ℃。

1.4.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳及转移电泳

分离胶 15%，浓缩胶 5%，上样量每孔为 50 μg 蛋白质，常规进行 SDS-PAGE。将凝胶上的蛋白条带电泳转移至 PVDF 膜上(4 ℃，恒压 20 V，电转移过夜)，室温干燥，密封，4 ℃保存。

1.4.3 酶标抗体检测 将 PVDF 膜放入塑料袋中，加封闭液(0.1 ml/cm^2)，密封水平缓慢摇动 45 min，弃去封闭液，加入抗 NCAM 抗体的 IgG 液(300 μg/ml，0.125 ml/cm^2)，室温摇动 60 min 取出 PVDF 膜，用 TTBS 洗 4 次，每次 10 min。用封闭液稀释 AP 抗 Ig 抗体偶联物(1/200)，加入放有 PVDF 膜的塑料袋中(0.125 ml/cm^2)，密封，轻摇 60 min。用 TTBS 洗 4 次，每次 10 min。再用 PBS 洗 15 min，将膜放入 BCIP/NBT 发色底物显迹液中轻轻摇动至有条带充分显色。吸光度扫描定量，照相保存。

1.5 统计学处理

计数资料用 χ^2 检验，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS 10.0 中单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 LTP 产生中 NCAM 蛋白合成的变化

在正常 ACSF 灌流情况下，条件刺激使 fEPSP 的斜率显著增加，并维持较长时间(一般 60 min 以上)，LTP 总诱出率为 88.2%(15/17)。

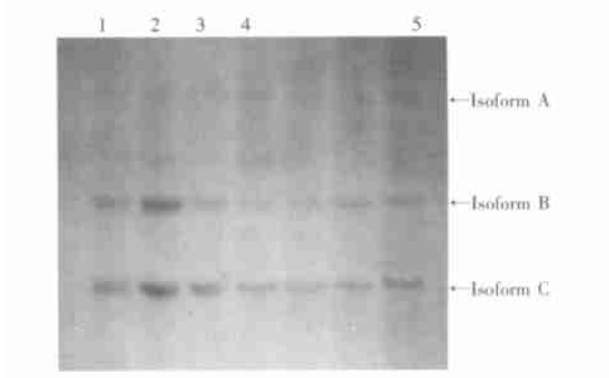
LTP 诱出后，用 western blot 方法检测 NCAM 蛋白水平，在 LTP 10 min 时间点，脑片的蛋白水平比 TS 对照组升高 43%，变化显著($P<0.05$)。而在 LTP 60 min 时间点，脑片的蛋白水平升高达 79%，与 LTP 10 min 时间点比，升高非常明显(表 1，图 1)。提示 LTP 维持期 NCAM 蛋白处在一个更高水平。

表 1 海马脑片 CA1 区 LTP 产生中 NCAM 蛋白水平的变化(arbitary unit/50 μg)($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of NCAM protein levels during LTP of hippocampal CA1 region *in vitro* (arbitrary unit/50 μg)($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	NCAM protein
TS	7	5.024±0.37
LTP 10 min	8	7.190±0.64 *
LTP 60 min	7	9.031±0.71 #

*：$P<0.05$，*vs* TS；#：$P<0.05$，*vs* LTP 10 min



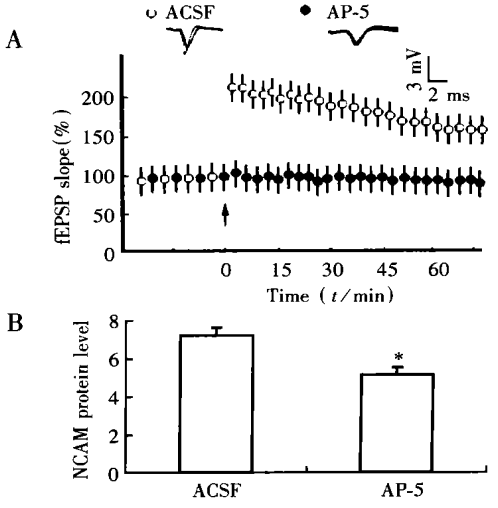
1：TS；2：LTP 1 h；3：LTP 10 min；4：Nitro-Arg；5：AP-5

图 1 Western blotting 检测海马脑片 LTP 产生中 NCAM 蛋白水平变化及 AP-5、nitro-Arg 对其影响

Fig 1 Effects of AP-5，nitro-Arg on the changes of NCAM production (by Western blotting) during LTP induction in hippocampal slices

2.2 NMDA 受体阻断剂 AP-5 对 LTP 和 NCAM 合成变化的影响

灌流 AP-5(1 mmol/L，溶于 ACSF 中)后，LTP 诱出率为 5%(1/20)，说明 LTP 产生被抑制(图 2A)。选择 6 例 LTP 被抑制的脑片进一步检测 NCAM 的蛋白合成情况，NCAM 蛋白水平也明显下降(图 1，图 2B)。结果说明，NMDA 受体通道的激活参与了对 NCAM 合成的调控。



A：Inhibition of LTP induced by AP-5；B：Decrease in NCAM protein level(arbitrary unit/50 μg protein) induced by Ap-5. *：$P<0.05$，*vs* ACSF group

图 2 NMDA 受体阻断剂 AP-5(1 mmol/L)对海马脑片 LTP 和 NCAM 蛋白酶合成的影响

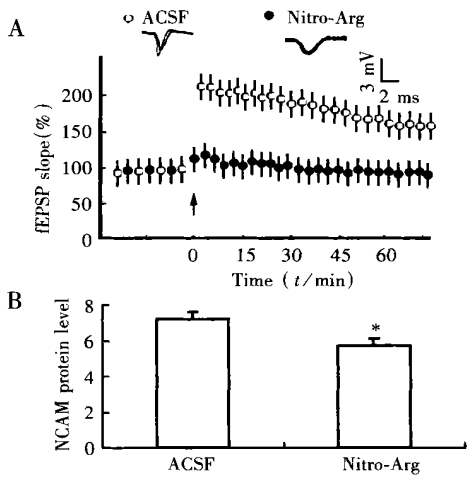
Fig 2 Effects of NMDA inhibitor AP-5(1 mmol/L) on LTP induction and NCAM protein production in hippocampal slices

2.3 NO 合酶抑制剂 Nitro-Arg 对 LTP 和 NCAM 合成的影响

在 Nitro-Arg(NO 合酶特异抑制剂，100 μmol/L)灌流脑片情况

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

下, LTP 的诱出率为 12.5%(2/16), 提示 LTP 被抑制(图 3A)。8 例 LTP 被抑制脑片的 NCAM 蛋白含量也明显下降(图 1, 图 3B)。结果说明, NO 对 NCAM 合成产生了显著抑制效应。



A: Inhibition of LTP induced by nitro-Arg; B: Decrease of NCAM protein level(arbitary unit/50 μg protein) induced by nitro-Arg (100 μmol/L) *: $P<0.05$, *vs* ACSF group

图 3　NO 合酶抑制剂 Nitro-Arg(100 μmol/L)对海马 LTP 和 NCAM 蛋白酶合成的影响

Fig 3　Effects of NO synthase inhibitor Nitro-Arg (100 μmol/L) on the hippocampal LTP induction and NCAM protein production

3　讨论

NCAM 及其多唾液酸形式 PSA-NCAM 参与了中枢神经发育和可塑性的许多过程, 如分化、迁移、突起长芽、突触联系的特殊模式建立等[1,5,6]。1994 年, 发现 NCAM 抗体可以阻止 LTP 产生。自此, NCAMs 在成年大脑可塑性中的作用开始受到应有的注意。与此同时, NCAMs 参与学习记忆的实验证据屡屡见之于文献中[2]。NCAMs 在 LTP 与学习记忆中的作用主要体现在以下方面: 一是影响其它胞内信号转导分子的活动; 二是参与 LTP 晚期阶段形态重建, 包括树突棘的数量和形态变化、树突形态计量的改变和新突触形成等[1]。

本实验结果显示, LTP 产生后 NCAM 蛋白量持续处在较高水平, 提示不断有新 NCAM 蛋白合成。作为一个结构分子, NCAM 不断增加, 无疑对树突棘数量增加和新突触形成极为重要。本实验表明, 与 LTP 形成早期的相比, LTP 维持期的 NCAM 蛋白量处在一个更高的水平。需要强调的是, NCAM 蛋白这一变化并不一定意味着 NCAM 蛋白合成呈进行性增加。LTP 早期 NCAM 蛋白水平之所以较低, 也可能与 LTP 早期一部分 NCAM 蛋白发生降解有关。据文献[7]报道, 海兔长时易化(long term facilitation, LTF)中, 原有海兔 CAM(apCAM)有一个先降解过程, 这种降解被认为是突触结构形态发生可塑性变化的先行步骤。本实验仅检测了 NCAM 蛋白总的水平, 未区分新合成 NCAM 蛋白量和原有 NCAM 降解量, 因此, NCAM 详细的变化过程需进一步实验研究。

在神经发育过程中, NCAMs 的结构和功能的改变依赖于兴奋活动、神经递质和细胞因子的作用[8]。LTP 产生后 NCAM 合成增加也是突触活动依赖性的, 谷氨酸受体通道活动在其中发挥了重要作用。相关研究表明[9], NMDA 受体抑制剂可以抑制 NCAM 合成(包括 PSA-NCAM)。

而 AMPA 受体的一种异位激动剂 ampakine, 可以刺激 NCAM 启动子的活性, 此效应可被 AMPA 受体特异抑制剂阻滞。本实验显示, AP-5 在抑制 LTP 产生的同时, 也明显抑制了 NCAM 蛋白水平增加。

NMDA 受体激活导致 NO 产生, 而 LTP 产生又与 NO 关系密切。既然 NMDA 受体参与了对 NCAM 的修饰, 理论上 NO 可能参与调控 NCAM 合成。NO 活动与 NCAM 合成调控关系研究最早采用的是成年脑干长时程抑制(LTD)可塑性模型。据文献[10]报道, NMDA-NO-cGMP 通路参与了 LTD 中 PSA-NCAM 下降过程的调控。本实验显示, Nitro-Arg 显著抑制 NCAM 蛋白水平的增加, 说明 NCAM 合成与 NO 活动有关。事实上, NO 已被发现通过多种方式参与基因表达和蛋白合成过程的调节[11,12]。首先, NO 弥散至突触前膜, 促进更多的递质释放; 其次, NO 促进胞内钙库释放更多钙; 第三, NO 激活 cAMP-PKA-CREB 途径。因此, 我们认为, 在 LTP 等可塑性模型中, NCAM 合成调控依赖于 NMDA 受体-NO 途径。

参考文献:

[1] Kiss J Z and Muller D. Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity[J]. Rev Neurosci, 2001, 12(4): 297—310.

[2] 胡志安, 黎海蒂. 神经细胞粘附分子结构与生理功能研究进展[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(1): 70—73.

[3] 胡志安, 罗东明, 刘祚周. 海马突触传递长时程增强效应中的逆行信使[J]. 生理科学进展, 1996, 27(1): 97—99.

[4] Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function [J]. Prog Neurobiol, 2001, 64(1): 51—68.

[5] Cremer H, Chazal G, Lledo P M, *et al*. PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity[J]. Int J Dev Neurosci, 2000, 18(2—3): 213—220.

[6] Muller D, Wang C, Skibo G, *et al*. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity[J]. Neuron, 1996, 17(3): 413—422.

[7] Hegde A N, Inokuchi K, Pei W, *et al*. Ubiquitin C-terminal hy-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

drolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia[J]. Cell, 1997, 89(1): 115—126.

[8] Bouzioukh F, Tell F, Rougon G, *et al*. Dual effects of NMDA receptor activation on polysialylated neural cell adhesion molecule expression during brainstem postnatal development[J]. Eur J Neurosci, 2001, 14(8): 1194—1202.

[9] Nacher J, Alonso-Llosa G, Rosell D, *et al*. PSA-NCAM expression in the piriform cortex of the adult rat. Modulation by NMDA receptor antagonist administration[J]. Brain Res, 2002, 927(2): 111—121.

[10] Bouzioukh F, Tell F, Jean A, *et al*. NMDA receptor and nitric oxide synthase activation regulate polysialylated neural cell adhesion molecule expression in adult brainstem synapses[J]. J Neurosci, 2001, 21(13): 4721—4730.

[11] Peunova N, Enikolopov G. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells[J]. Nature, 1993, 364(6436): 450—453.

[12] Lu Y F, Kandel E R, Hawkins R D. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus[J]. J Neurosci, 1999, 19(23): 10250—10261.

（编辑 栾 嘉）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)01-0046-02

26例新型弹性开放襻前房人工晶体植入的临床观察

Clinical observation of 26 cases of artificial lens implantation with new flexible open-loop anterior chamber lens technique

刘 翔，吴 楠 （第三军医大学新桥医院眼科，重庆 400037）

老式前房型人工晶体，由于其设计上的缺陷（硬质闭合襻）和制作工艺粗糙，植入人眼后常产生青光眼、前房出血、色素膜炎和角膜水肿等严重并发症。新型弹性开放襻前房人工晶体，由于其新的设计和精良的制作抛光，植入人眼后具有良好的长期耐受性。近10年来，国内外学者相继报道植入该型晶体取得良好效果，且无老式前房晶体的严重并发症。本研究报告26例26眼新型前房晶体植入，探讨其有效性、安全性和植入方法。

1 临床资料

本组26例中，男19例，女7例，年龄6～80岁，平均45岁。老年性白内障超声乳化术中后囊破裂3例，囊外摘除术中后囊破裂9例，囊内摘除术后二期植入2例，外伤性白内障摘除术后一期植入7例，二期植入5例。植入人工晶体均为美国Alcon公司的“三位一体”型PMMA前房晶体，双侧“S”型弹性襻，长13 mm。

植入手术方法：做上方角巩缘切口或巩膜隧道切口，摘除白内障，用眼内剪或玻璃体切割头清除脱入前房的玻璃体，0.5%匹罗卡品注入前房缩瞳，前房注入透明质酸钠维持前房深度，用晶体植入镊夹住晶体送入前房，用晶体定位钩交替压缩两晶体襻顺时钟旋转晶体至水平位，做12点虹膜周边切除，10-0尼龙线缝合角巩膜切口，用平衡盐液置换前房透明质酸钠。术后处理与后房人工晶体植入相同。

随访观察时间为3个月至2年，平均5个月。

2 结果

术后裸眼视力，≥1.0者占19.2%（5/26），0.5～0.9者占57.7%（15/26），0.1～0.4者占11.5%（3/26），＜0.1者占11.5%（3/26）。

术中并发症：前房出血2例。术后并发症：前房积血3例，角膜水肿发雾5例（积血和水肿均于1周内吸收、消退），较明显炎症反应3例，持续1周左右，未发现持续高眼压者。

3 讨论

国外学者经过不断的改进和多年的临床观察，确信新型弹性开放襻前房型人工晶体在眼内具有良好的耐受性[1,2]，国内学者也报道该型前房晶体植入适应症广，安全有效[3,4]。

3.1 前房晶体植入的适应症

新型前房晶体植入可以用于任何类型的白内障摘除术[5]，但目前主要用于下列情况：①白内障超声乳化或囊外摘除术中后囊破口较大。②外伤性白内障后囊破损较大，或虹膜与囊膜广泛粘连，或晶体明显脱位。③囊内摘除术后二期植入。

3.2 前房晶体植入的手术操作要点

前房晶体的植入，操作比较简单，但笔者认为应注意以下几点：①植入前彻底清除脱入前房的玻璃体。前房玻璃体的存在使晶体植入困难或产生倾斜，所以，术中必须应用眼内剪或开放式玻切予以彻底清除，尽可能使瞳孔恢复圆形。②缩瞳。缩瞳有利于阻止玻璃体突入前房及展平虹膜，利于晶体顺利植入及旋转。如果是一期植入，则在前房玻璃体清除后前房注入缩瞳剂；如果是二期植入，则术前点缩瞳眼液。③用粘弹剂维持前房足够深度，并撑开房角，确保晶体不接触损伤内皮，并使晶体能顺利旋转。④旋转晶体要小心。前房晶体襻的理想位

（下转50页）

作者简介：刘 翔（1960—），男，四川省内江市人，硕士，副主任医师，副教授，主要从事角膜移植和白内障超声乳化方面的临床研究，发表论文10余篇。电话：(023)68755633

收稿日期：2002-02-03；修回日期：2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net