DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.027
第25卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 20
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)20-1837-03

论著

大鼠离体海马脑片NO变化与LTP产生的关系

胡志安[1,2],罗 峻[1],黎海蒂[1],阮怀珍[2],李希成[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室,[2]神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察离体脑片突触传递长时程增强(LTP)中一氧化氮(NO)变化的特点。方法 采用胞外记录方法检测LTP产生和维持。原位杂交技术检测NOS mRNA表达变化。生化反应方法检测NO含量和NO合酶(NOS)活性变化。结果 条件刺激10 min后,LTP产生,NO含量和NOS活性均显著升高。NOS mRNA表达也明显增加。条件刺激60 min后,LTP稳定维持,但NO含量和NOS活性却恢复到条件刺激前水平。结论 NO的显著升高过程主要发生在LTP形成的早期阶段。

关键词:长时程增强;一氧化氮;原位杂交;海马;大鼠
中图法分类号:R338.26;R338.64 文献标识码:A

Relationship between NO changes and LTP production in rat hippocampus *in vitro*

HU Zhi-an, LUO Jun, LI Hai-di, RUAN Huai-zhen, LI Xi-cheng (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the time course of the changes in nitric oxide (NO) content and the activity of NO synthase (NOS) during hippocampal long term potentiation (LTP) *in vitro*. Methods The production and maintenance of LTP were detected by using extracelluar electrophysiological recording. NO content and NOS activity were determined by biochemical reaction. The expression of NOS mRNA was detected by *in situ* hybridization. Results Conditioning stimulation for 10 min induced LTP production and significant increases in NO content, NOS activity and expression of NOS mRNA. However, at 60 min after conditioning stimulation, LTP remained stably but NO content and NOS activity returned to the pre-conditioning stimulation level. Moreover, the NOS mRNA was overexpressed at the early stage of LTP production. Conclusion Significant NO changes may occur at the early stage of LTP formation.

Key words: long term potentiation; nitric oxide; in situ hybridization; 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,一直被公认为学习记忆的细胞模型。大量证据显示,一氧化氮(Nitric oxide, NO)作为信使分子,对LTP的产生维持中具有重要影响[1]。相关研究多采用NO合酶(NO synthase, NOS)抑制剂和基因敲除等干预手段观察NO对LTP的影响[2,3],迄今为止,人们尚不完全清楚LTP中NO产生的各个环节如基因表达、酶活性和NO产量的生理变化规律。有关离体脑片LTP产生后NO变化过程的研究目前未见文献报道。本研究在我们既往的工作基础上,采用生化直接测定和原位杂交方法,观察NO在LTP不同时程中的变化特点,以期更深入理解NO的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:Wistar大鼠44只,雄性,体质量(170±20) g,第三军医大学实验动物中心提供。主要试剂:NOS活性测试试剂盒、NO含量测试试剂盒分别购自北京军事医学科学院。内皮型NOS mRNA原位杂交购自武汉博士得公司。

1.2 方法

1.2.1 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

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600048)
Supported by a grant from 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,主要从事睡眠与神经可塑性方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68753704
收稿日期:2003-03-28;修回日期:2003-09-18

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

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 0.01 L/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。

1.2.2 电生理记录 本实验刺激电极置于来自 CA3 区锥体细胞的 Schaffer 侧枝上,记录电极置于 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)[4]。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。

1.2.3 NOS 活性测定 电生理实验完毕后,分别在条件刺激后 10、60 min 取出海马脑片(下同),每一脑片加 1.5 ml 磷酸钾缓冲液,匀浆,离心,取上清液。以后顺序加入试剂盒提供各种试剂,所有试剂加入后振荡,立即用双波长分光光度计分别在 401、421 nm 处测吸光值。

1.2.4 NO 含量测定 电生理实验完毕后,每一脑片加 0.1 ml ACSF,匀浆,以后步骤操作按试剂盒说明书进行。比色用紫外分光光度计,545 nm 比色。最后利用标准曲线计算 NO 含量。

1.2.5 NOS mRNA 原位杂交 脑片实验完毕后,迅速将海马脑片置于 Zamboni 固定液(4 ℃)中。切片操作前 1 d,再置于 30% 的蔗糖液中脱水,直至组织块沉底。原位杂交步骤如下:挑取切片(片厚约 30 μm)于双蒸水漂洗 3 次,每次 5 min。0.3% H_2O_2(双蒸水配制)室温 30 min。双蒸水漂洗,3 次,每次 5 min。滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶(1 ml 3% 柠檬酸加 2 滴浓缩型胃蛋白酶,混匀),37 ℃,5 min。4% 多聚甲醛(0.2 mol/L PB 配制)固定 5 min,0.5 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min。双蒸水洗 1 次,5 min。进含探针的杂交液(按每张切片加 20 μl 含地高辛标记探针的原位杂交液),恒温干燥箱 37 ℃,过夜。2× SSC 洗涤 3 次,37 ℃,5 min。0.2× SSC 洗涤 3 次,37 ℃,5 min。滴加封闭液,室温,20 min,不洗。滴加兔抗地高辛,37 ℃,1 h。0.5 mol/L PBS 洗 3 次,2 min。滴加生物素化羊抗小鼠 IgG,37 ℃,30 min。0.5 mol/L PBS 洗 3 次,2 min。滴加 SABC,37 ℃,30 min。0.5 mol/L PBS 洗 4 次,5 min。DAB 显色,显色时间 20～30 min。用双蒸水终止反应。乙醇脱水、二甲苯透明、封片。

1.3 统计学处理

实验数据用以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用医用统计软件 SPSS(Ver 10.0)中的 t 检验。

2 结果

2.1 LTP 诱出后 NOS 活性变化

在正常 ACSF 的灌流条件下,条件刺激后,fEPSP 的斜率显著增加,并维持较长时间(一般 1 h 以上),见图 1,说明 LTP 产生并得以维持。酶生化检测显示,NOS 活性在 LTP 产生早期(条件刺激后 10 min)显著升高,但条件刺激后 60 min 明显下降,见表 1。

2.2 LTP 诱出后 NO 含量变化

与 NOS 活性变化一样,NO 含量同样在 LTP 产生后 10 min 升高最显著,在 LTP 产生后 60 min 明显下降,见表 1。说明,随 LTP 进程的不同,NO 的合成存在先升后降的变化趋势。

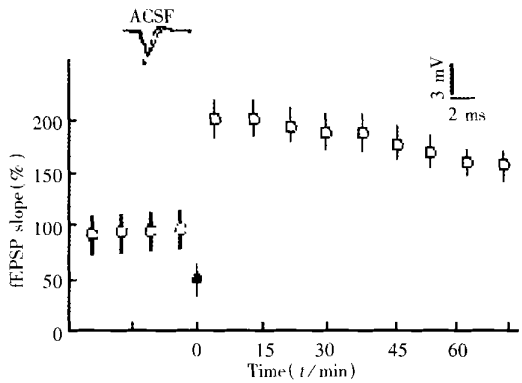


图 1 条件刺激后,海马 CA1 区 fEPSP 斜率增加,并维持 1 h 以上,LTP 产生并维持

Fig 1 LTP in hippocampal CA1 region is induced and maintained after conditioning stimulation

表 1 海马脑片 LTP 诱导与维持过程中 NO 变化($\bar{x} \pm s$)

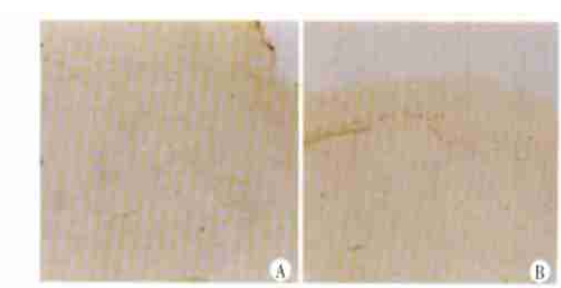
Tab 1 Changes of NOS activity in LTP of hippocampal slices($\bar{x} \pm s$)

	NOS activity [μmol·min⁻¹·mg⁻¹(slice), n]	NO level [μmol/40 mg(slice), n]	Num. of NOS mRNA positive neuron(n)
TS	16.5±2.6(18)	0.01±0.01(18)	3.80±1.2(8)
LTP 10 min	126.6±12.7*(20)	2.56±0.08*(20)	62.6±18.6*(8)
LTP 60 min	22.4±5.6(16)	0.09±0.04(18)	

*: $P < 0.01$ *vs* TS

2.3 LTP 后海马 CA1 区内皮型 NOS mRNA 表达

在 LTP 诱出后,本实验采用原位杂交技术,观察了 8 例脑片海马内皮型 NOS mRNA 的表达。结果显示,与对照组(图 2A,$n=8$)比,LTP 产生后 10 min,海马各区均有 NOS mRNA 阳性神经元数量增加,其中以齿状回和海马 CA1 区升高最为显著,由于本实验电活动记录部位为 CA1 区,故本结果仅显示和统计 CA1 区 NOS mRNA 阳性神经元变化,见图 2B,表 1。提示,伴随 LTP 产生,NOS mRNA 表达明显增强。



A: Expression of endothelial NOS mRNA before conditioning stimulation(DAB×60); B: Increased expression of endothelial NOS mRNA after LTP induction(DAB×40)

图 2 海马 CA1 区 LTP 产生后,内皮型 NOS mRNA 表达

Fig 2 Expression of endothelial NOS mRNA in CA1 region of hippocampal slices after LTP induction

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

3　讨论

内源性 NO 是一种气体分子, 可在神经元内产生, 并能快速通过胞膜。证实 NO 作为气体递质分子参与 LTP 和学习记忆已有多年[1,2]。文献[3]报道 NO 在海马 CA1 区 LTP 中发挥重要作用, 是 LTP 产生所必需的一种信使分子。尽管如此, 有关 LTP 中 NO 作用特点和作用机制的后续研究仍不断见诸文献。

我们实验证明, LTP 产生早期, 无论是 NOS 酶活性还是 NO 产生量都显著升高。这一结果与最近 Halbach 采用 1, 2-diaminoanthraquinone 法实时测量脑片 NO 产生所得结果一致[5]。NO 在学习成功后也有类似的活动加强过程。Chen 等[6]报道, 动物饮水奖赏空间变换任务学习 1 d 后, NOS 酶活性、NO 产生量都显著升高。这些证据证明, NO 在 LTP 和学习记忆早期, NOS 迅速激活, 产生适量的 NO, 进而发挥多途径信号转导功能。如 NO 产生过程受到抑制, 即造成 NO 所介导的信号级联反应障碍, LTP 或学习记忆也因此遭受损害[1]。另外, 在学习记忆早期 NO 活动的增强不仅表现在 NOS 酶活性的即时升高, 而且也表现在 NOS mRNA 表达、NOS 蛋白合成增多[7,8]。本实验显示, 条件刺激前, 内皮型 NOS mRNA 基础表达水平很低, 条件刺激 10 min 后, NOS mRNA 表达明显增加, 这一结果提示, LTP 与学习记忆过程一样, 涉及 NOS 酶蛋白活性增高和酶蛋白数量增加。

由于 NO 寿命极短, 而 LTP 本身表现为一个长时变化过程。NO 在 LTP 中究竟是不断产生, 持续性直接发挥作用, 抑或是初始产生, 时相性发挥作用, 这是一个颇为值得关注的问题[9]。我们实验发现, 条件刺激所造成的 NOS 高活性和 NO 高浓度, 并未向 fEPSP 的斜率增高那样, 同步维持较长时间, 在条件刺激后 60 min NOS 活性、NO 含量皆恢复到基础水平(由于技术的原因, 本实验未能在条件刺激后 60 min 检测 NOS mRNA 表达的变化)。NO 这一活动变化特点与其作用靶—鸟苷酸环化酶(SGC)的变化特点颇为一致。Monfort 等[10]最近发现, 条件刺激后 5 min, 伴随 LTP 形成, 组织中 SGC 明显上升, 条件刺激后 60 min, SGC 活性基本恢复到条件刺激前的水平。因此, 基于现有的实验证据, 我们可以初步推定, LTP 中 NOS- SGC 途径的生化激活可能主要发生在 LTP 形成早期, 换言之, NOS-SGC 途径的激活可能具有较明显的时相性。尽管如此, LTP 中 NOS 活性及 NO 产生的变化特征的深入阐明尚需进一步的实验研究。

如上所述, NOS- SGC 途径激活仅发生在 LTP 早期, 但并不意味着 NO 仅参与 LTP 的启动过程。NO 的产生虽然是一过性升高, 但这种升高所激发的胞内级联反应能持续相当的时间, 这正是 LTP 得以长期维持的物质基础。目前, 人们已了解到 NO 可能通过 NO-cGMP-PKG 途径, 促进突触前递质释放。尽管 NO-cGMP 活动是一过性的, 但 PKG 则维持持续的激活状态[10]。NO 也可通过突触后 PKA 途径, 影响 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)等转录因子, 促进蛋白合成, 参与 LTP 晚期过程[11,12]。除此而外, NO 还可修饰钾通道、激活 Ras/Erk 途径和促进胞内钙库钙的释放来延迟其生物效应[13]。

综上所述, 尽管 NO 对 LTP 产生和维持极为重要, 但 LTP 中 NO 的产生可能表现为一过性而非持续性的时相特征。

参考文献:

[1] 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): 82—84.

[2] Son H, Hawkins R D, Martin K, *et al*. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase[J]. Cell, 1996, 87(6): 1015—1023.

[3] 胡志安, 罗东明, 刘祚周. 一氧化氮在大鼠海马脑片长时程增强效应中的作用[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(5): 296—300.

[4] 罗　峻, 胡志安, 黎海蒂, 等. 海马脑片 LTP 中钙变化的激光共聚焦扫描技术测定方法[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(3): 263—265.

[5] von Bohlen H O, Albrecht D, Heinemann U, *et al*. Spatial nitric oxide imaging using 1, 2-diaminoanthraquinone to investigate the involvement of nitric oxide in long-term potentiation in rat brain slices[J]. Neuroimage, 2002, 15(3): 633—639.

[6] Chen J, Zhang S, Zuo P, *et al*. Memory-related changes of nitric oxide synthase activity and nitrite level in rat brain[J]. Neuroreport, 1997, 8(7): 1771—1774.

[7] Oermann E, Bidmon H J, Schleicher A, *et al*. The distribution of nitric oxide synthase-I and NADPH-diaphorase containing neurons in the cerebral cortex of different strains of mice and its association with learning and memory[J]. J Himforsch, 1998, 39(1): 65—75.

[8] Okere O, Kaba H. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory recognition memory in mice[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(12): 4552—4556.

[9] Zhuo M, Laitinen J T, Li X C, *et al*. On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long-term potentiation in the hippocampus[J]. Learn Mem, 1998, 5(6): 467—480.

[10] Monfort P, Munoz M D, Kosenko E, *et al*. Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase[J]. J Neurosci, 2002, 22(23): 10116—10122.

[11] 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.

[12] Muller U. Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees[J]. Neuron, 2000, 27(1): 159—168.

[13] Yun H Y, Dawson V L, Dawson T M. Glutamate-stimulated calcium activation of Ras/Erk pathway mediated by nitric oxide[J]. Diabetes Res Clin Pract, 1999, 45(2—3): 113—115.

(编辑　陈聪连)

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