DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.001
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)10-0841-03

论著

惊厥阈下电刺激致大鼠海马NO含量及nNOS表达变化

王庆松[1],王正国[1],朱佩芳[2] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所:[1]脑二科,[2]第四室研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨海马一氧化氮(NO)及NO合酶(NOS)在惊厥阈下电刺激所致创伤后应激障碍(PTSD)样行为异常中的可能意义。方法 在大鼠海马惊厥阈下电刺激PTSD动物模型基础上,动态检测了大鼠海马、额叶皮层组织匀浆NO、NOS含量及神经元型NOS(nNOS)表达。结果 惊厥阈下电刺激所致PTSD样行为异常大鼠海马NO于电刺激停止后12 h明显升高[(4.65±1.22)μmol/g protein,$P<0.01$],24 h达高峰[(6.44±1.53)μmol/g protein,$P<0.01$],72 h时仍明显增多[(3.17±0.91)μmol/g protein,$P<0.05$],海马nNOS表达亦同步增高,而海马NOS仅轻度短期增高,额叶皮层nNOS则无明显改变。结论 海马结构nNOS持续性高表达与NO含量明显增多,在惊厥阈下电刺激所致实验大鼠PTSD样行为异常中可能有重要意义。

关键词:电刺激;海马;一氧化氮;一氧化氮合酶;应激障碍,创伤后
中图法分类号:R-332;R338.26;R363.124 文献标识码:A

Subconvulsive electrical stimuli facilitate increased NO level and neuronal NOS expression in hippocampi of rats

WANG Qing-song, WANG Zheng-guo, ZHU Pei-fang (Department 4, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To observe the alterations of nitric oxide (NO) level and the neuronal NOS (nNOS) expression in rats with posttraumatic stress disorder (PTSD)-like behavior following subconvulsive electrical stimuli. **Methods** After the establishment of the PTSD animal model following subconvulsive stimuli to hippocampus, the nitric oxide (NO) and NO synthase (NOS) levels and the neuronal NOS (nNOS) expression in hippocampus and frontal cortex of experimental rats were investigated by neurochemistry and Western blotting, respectively. **Results** The NO level in hippocampus of experimental rats with PTSD-like behavior following subconvulsive stimulation increased significantly at 12 h after the last stimulation (4.65±1.22 μmol/g protein, $P<0.01$), and highest at 24 h (6.44±1.53 μmol/g protein, $P<0.01$), and still elevated at 72 h (3.17±0.91 μmol/g protein, $P<0.05$). The Western blot analysis demonstrated the nNOS expression was markedly enhanced synchronously in hippocampus. Only mild short term change of NOS was found in hippocampi of stimulated rats, but no obvious alteration of nNOS was found in frontal cortex. **Conclusion** The lasting increased nNOS expression and NO level in hippocampus may play an important role in PTSD-like behavior following subconvulsive electrical stimulation to hippocampus in rats.

Key words: electrical stimulation; hippocampus; nitric oxide; neuronal NO synthase; traumatic stress disorder; posttraumatic

创伤后应激障碍(Posttraumatic stress disorder, PTSD)是对创伤等严重应激因素的一种异常精神反应。我们的前期工作显示,惊厥阈下电刺激所致PTSD样行为异常大鼠存在选择性中枢神经系统(Central nervous system, CNS)海马结构糖皮质激素受体持续性高表达[1];本研究则进一步观测了在海马突触可塑性及中枢神经元损害中有重要作用的一氧化氮(Nitric oxide, NO)、一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)与神经元型NOS(Neuronal NOS, nNOS)的动态变化规律,以进一步探讨其在惊厥阈下电刺激所致PTSD样行为异常中的可能意义。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870284);全军"十五"医药卫生指令性课题(01L028)
作者简介:王庆松(1966-),男,湖北省钟祥县人,博士,主治医师,主要从事神经精神疾病临床及PTSD、认知功能受损、血管性痴呆等方面的研究,发表论文27篇。电话:(023)68757181
收稿日期:2002-06-15;修回日期:2002-12-25

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

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

6~7周龄雄性Wistar大鼠(第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供)192只,体质量(184±17) g,随机分为3组,海马阈下电刺激组(Group of subconvulsive electrical stimulation to hippocampus, SE, $n=64$)、海马电极埋植对照组(Control of electrode implanted in hippocampus, CE, $n=64$)和正常对照组(Normal control, NC, $n=64$)。

1.2 模型制备

参照文献[1]的方法,按Pllegrino大鼠脑图谱于海马CA1区埋植电极,采用波宽1 ms、频率25 Hz、串长10 s、强度100 μA、串隔7 min的恒流单向方波,每天刺激8次,连续刺激5 d。CE组除不通电刺激外其余处理与SE组相同。

1.3 脑组织匀浆NOS、NO测定

分别于电刺激停止后12、24、72 h及1周时取SE、CE及NC组动物各8只,分离双侧海马、额叶皮层各120 mg,制备10%的组织匀浆,Sonics VC50超声细胞破碎仪破碎,上清蛋白定量后,按NO、NOS检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)操作说明检测NO、NOS含量。

1.4 脑组织nNOS表达

各组动物分别于电刺激停止后12、24、72 h和1周时随机各取8只活杀,分离双侧海马、额叶皮层各100~150 mg,按文献[1]方法进行Western blotting检测:常规提取并制备胞浆蛋白,蛋白定量后SDS-PAGE电泳、硝酸纤维素膜电转印,兔抗大鼠nNOS一抗(Santa Cruz Biotechnology) 1∶1 000、辣根过氧化物酶标记羊抗兔1∶1 500各反应1 h,化学发光试剂(Boehringer Mannheim)中反应1~5 min,X线胶片曝光、显影、定影。将X线胶片置于凝胶扫描成像分析系统(Bio-Rad)测定目标带单位密度,以正常对照组动物的单位密度值为标准校正后统计分析。

1.5 统计学处理

所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 9.0软件进行单因素或双因素方差分析,以及各组间均数的最小显著差值法检验。

2 结果

2.1 脑组织NO、NOS含量变化

阈下电刺激大鼠海马NO含量于电刺激停止后12 h明显升高,24 h达高峰;额叶皮层则于电刺激停止后轻度增高,24 h时渐恢复正常;NOS呈相似的变化趋势,但电刺激停止后72 h已恢复正常,见表1。

表1 各组动物脑组织NO(μmol/g protein)及NOS(U/mg protein)含量变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

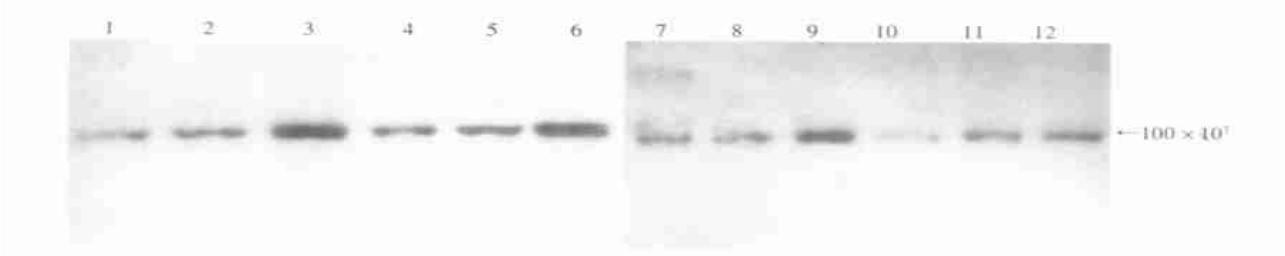
Tab 1 NO levels(μmol/g protein) and NOS contents(U/mg protein) in brain tissue of experimental rats($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Hippocampus				Frontal cortex			
	12 h	24 h	72 h	1 week	12 h	24 h	72 h	1 week
NO								
SE	4.65±1.22 **	6.44±1.53 **#	3.17±0.91 *	1.85±0.53	1.83±0.51 *	1.87±0.48 *	1.48±0.39	0.92±0.28
CE	1.51±0.49	1.59±0.51	1.52±0.47	1.55±0.51	0.85±0.25	0.81±0.23	0.82±0.22	0.78±0.24
NC	1.54±0.48	1.47±0.38	1.51±0.40	1.58±0.42	0.80±0.26	0.78±0.21	0.85±0.22	0.81±0.22
NOS								
SE	0.62±0.18 *	0.83±0.25 **	0.42±0.14	0.38±0.12	0.52±0.15 *	0.59±0.16 *	0.39±0.11	0.35±0.09
CE	0.34±0.09	0.35±0.11	0.31±0.09	0.31±0.10	0.28±0.09	0.34±0.10	0.34±0.10	0.32±0.08
NC	0.32±0.09	0.29±0.07	0.34±0.09	0.31±0.08	0.28±0.06	0.31±0.08	0.29±0.08	0.34±0.09

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* group NC or CE; #: $P<0.05$ *vs* other intervals in the same group; SE: Group of subconvulsive stimulation to hippocampus; CE: Control group of electrode implanted in hippocampus; NC: Normal control

2.2 脑组织nNOS表达

海马结构Western blot结果见图1,经图像扫描分析并以NC组单位密度为标准(以NC组单位密度值为1)校正后显示,电刺激停止后72 h内,SE组大鼠海马nNOS表达明显增高,见表2;额叶皮层无显著性改变($P>0.05$)。



Group NC: 1, 4, 7 and 10; Group CE: 2, 5, 8 and 11; Group SE: 3, 6, 9 and 12. 12 h post-stimulation: 1, 2 and 3; 24 h: 4, 5 and 6; 72 h: 7, 8 and 9; 1 week: 10, 11 and 12

图1 电刺激停止后12、24、72 h及1周时海马nNOS免疫印迹检测结果

Fig 1 nNOS expression in hippocampus at 12, 24, 72 h and 1 week post-stimulation by Western blot analysis

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

表 2　海马 **nNOS** 免疫印迹检测结果（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　The expression of nNOS in hippocampus of experimental rats（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Intervals after the last stimulation (ODu/mm^3)			
		12 h	24 h	72 h	1 week
SE	8	3.45±1.13 **	3.16±0.98 **	2.77±0.86 **	1.26±0.44
CE	8	1.07±0.32	1.24±0.39	0.82±0.25	1.11±0.37
NC	8	1.00±0.27	1.00±0.31	1.00±0.24	1.00±0.33

**: $P<0.01$ *vs* group NC or CE. SE: Group of subconvulsive stimulation to hippocampus; CE: Control group of electrode implanted in hippocampus; NC: Normal control

3　讨论

我们的前期实验通过海马 CA1 区反复惊厥阈下电刺激, 成功诱发了实验大鼠 1 个月内旷场活动性明显减少、拒俘反应性则显著增强, 以及短暂高频金属音刺激后全身性惊吓反射明显, 并伴有打洞、埋头、趋暗性等多种躲藏、逃避性焦虑样行为, 且对刺激的适应时间明显延长, 反复刺激 8 次后仍有较明显惊吓反应, 可基本模拟 PTSD 患者的主要临床表现[1]。

NO 是一种细胞内和细胞间的信使性气体物质, 也是一种活性很强的气体分子自由基。正常生理状况下, NO 在痛觉、突触可塑性、神经内分泌、神经传导等多种 CNS 生理功能中有重要作用[2]; 但当 NO 异常表达时却有明显的神经毒性作用[3]。鉴于 NO 在 CNS 中的这种特殊双重作用, 我们对惊厥阈下电刺激所致 PTSD 样行为异常大鼠脑组织 NO 的变化规律进行了动态检测。

实验结果显示, SE 组大鼠电刺激后额叶皮层 NO 含量仅短暂轻度增多, 而海马则较长时间明显增高, 并于电刺激停止后 24 h 增至顶峰。有研究表明, 增多的 NO 主要通过其还原型亚硝酸离子与超氧阴离子反应形成过氧化亚硝酸阴离子($ONOO^-$), 从而抑制腺苷酸环化酶、蛋白激酶 C 及核糖核苷酸还原酶活性, 并可破坏 DNA 结构, 损伤脂质膜, 干扰 CNS 正常的物质和能量代谢、信息传递及细胞内稳态的维持, 导致神经毒性作用[4,5]。同时增高的 NO 还可通过突触长时程增强(Long-term potentiation, LTP)诱导障碍、神经递质释放与再摄取异常、NO-Ras 信号转导途径失调等, 导致由 NO 参与的神经元活动依赖性核基因调控与海马长时程突触可塑性异常, 进而影响动物的行为、学习和记忆等认知功能[6]。结合本实验中 NO 变化与阈下电刺激后 1 d 大鼠行为异常最明显, 且持续较长时间基本同步[1], 因此, 海马 NO 释放持续增多, 可能参与了惊厥阈下电刺激所致实验大鼠 PTSD 样行为异常。

NO 由 NOS 作用于 L-精氨酸的胍基氮产生, CNS 中至少存在 3 种 NOS 亚型, 即 nNOS、诱导型 NOS(Inducible NOS, iNOS)及内皮型 NOS(Endothelial NOS, eNOS); 其中 nNOS 主要分布于神经元, 在突触可塑性与神经再生、神经传导与神经元发育、神经内分泌调节与行为调控中有非常重要的作用[7]。为此, 我们实验中一方面对脑组织总 NOS 活性进行了动态检测, 另一方面也重点观察了 nNOS 的表达变化规律。结果显示, 脑组织 NOS 活性在电刺激停止后 24 h 内明显增高, 72 h 时则已恢复至正常水平; nNOS 表达却呈现了与 NO 相同的变化趋势: 海马结构增高可持续至电刺激停止后 72 h, 而额叶皮层则无明显改变, 提示实验大鼠海马 nNOS 异常表达, 可能是 NO 长时间释放增多的主要原因; 而持续增高的 nNOS 本身亦可能直接影响实验大鼠情感行为及认知功能。因此, 本实验结果提示, 海马结构 nNOS 持续性高表达与 NO 释放明显增多, 在惊厥阈下电刺激所致大鼠 PTSD 样行为异常中可能有重要意义, 值得进一步探讨。

参考文献:

[1] 王庆松, 王正国, 朱佩芳. 大鼠创伤后应激障碍模型的建立及其海马糖皮质激素受体的变化[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 152－154.

[2] De Vente J, Van Ittersum M M, Van Abeelen J, *et al*. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain: effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthasis [J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(2): 507－519.

[3] Mishra O P, Delivoria-Papadopoulos M. Nitric oxide-mediated Ca^{2+}-influx in neuronal nuclei and cortical synaptosomes of normoxic and hypoxic newborn piglets[J]. Neurosci Lett, 2002, 318(2): 93－97.

[4] Canossa M, Giordano E, Cappello S, *et al*. Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 3282－3287.

[5] Xie Z, Wei M, Morgan T E, Fabrizio P, *et al*. Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia[J]. J Neurosci, 2002, 22(9): 3484－3492.

[6] Grammatikopoulos G, Pignatelli M, D'Amico F, *et al*. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthesis reduces hyperactivity and increases non-selective attention in the Naples high-excitability rat[J]. Behav Brain Res, 2002, 130(1－2): 127－132.

[7] Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 959(1): 66－81.

（编辑　薛国文）

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