DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.035
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1078 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1078-03

NOS_1 免疫阳性细胞在猕猴中枢神经系统内的分布

谢兴国[1],蔡文琴[2],张吉强[2],李成仁[2] ([1]川北医学院解剖学教研室,南充 637007;[2]第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究神经元型一氧化氮合酶(NOS_1)在灵长类动物中枢神经系统中的表达。方法 采用免疫组织化学技术,观察了一氧化氮合酶在正常猕猴脑和脊髓中的表达。结果 NOS_1阳性神经元分布于中枢神经系统的广泛区域,包括大脑皮质、海马、齿状回、尾壳核、纹状体、小脑皮质、脊髓前角、后角和中央灰质。结论 NOS_1在神经系统内有广泛的分布,其产物一氧化氮可能参与了对多种神经功能如学习记忆等的调节。

关键词:一氧化氮合酶;免疫组织化学;中枢神经系统;猕猴
中图法分类号:R322.81;R392.13 文献标识码:A

Expression of nitric oxide synthase in the central nervous system of macaque monkey

XIE Xing-guo, CAI Wen-qin, ZHANG Ji-qiang, LI Cheng-ren (Department of Anantomy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China)

Abstract: Objective To study the expression of nitric oxide synthase (NOS_1) in the central nervous system(CNS) of primates. Methods The expression of NOS_1 was observed in the normal brain and spinal cord of macaque monkey with immunohistochemical method. Results NOS_1-positive neurons were distributed in extensive regions of CNS, including cerebral cortex, pyramidal layer of hippocampus, granular layer of dentate gyrus, caudate-putamen, corpus striatum, Purkinje's cells, cerebellar cortex, anterior horn, central grey and posterior horn of spinal cord. Conclusion The extensive distribution of NOS_1 indicates that NO is involved in many functions of CNS, such as learning and memory.

Key words: nitric oxide synthase; immunohistochemistry; central nervous system; macaque

一氧化氮(Nitric oxide, NO)作为一种新的神经信使物质,它在神经系统中的作用受到高度重视[1~3],一氧化氮是一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)催化L-精氨酸生成胍氨酸过程中产生的[4]。近几年来,用还原性辅酶Ⅱ的黄递酶(NADPH-d)组织化学方法显示NOS在各种组织中的分布文献报道很多,这种方法只能间接显示NOS在组织中的分布,而不能直接显示NOS各亚型(神经元型,nNOS/NOS_1;诱生型,iNOS/NOS_2;内皮型,eNOS/NOS_3)在组织中的表达。应用NOS各亚型的抗体进行免疫组织化学染色可在组织中直接显示NOS各亚型的表达,但是是在灵长类动物方面的有关报道很少,在猕猴脑的分布研究更少。本实验用ABC免疫组织化学方法,研究了nNOS/NOS_1在猕猴脑中枢神经系统中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及来源 成年雄性猕猴3只,体重10~15 kg,由云南昆明动物研究所提供。

1.1.2 主要试剂 NOS_1抗体由Santa Cruz公司提供,免疫组化试剂盒购于博士德生物试剂公司。

作者简介:谢兴国(1963-),男,四川省南充市人,副教授,主要从事神经解剖学研究。电话:(0817)2242767

收稿日期:2001-01-12;修回日期:2001-03-27

1.2 方法

用戊巴比妥钠腹腔麻醉,经升主动脉快速灌注生理盐水,继之灌注Zamboni's固定液,取大脑、小脑、脊髓入上述固定液中后固定6 h,再入30%蔗糖-磷酸盐缓冲液至组织下沉。大脑按部位分别切片(包括冠状面和旁正中矢状面),小脑作冠状切片,脊髓作冠状切片和水平切片(纵切),上述均为恒冷箱切片,片厚25 μm。切片进行免疫组织化学ABC法反应,入含0.3% TritonX-100,10%正常羊血清,1∶500的NOS_1兔抗,37 ℃、2 h,4 ℃冰箱内60 h以上,入1∶200的羊抗兔IgG,37 ℃、1 h,0.05% DAB/H_2O_2显色同常规方法。以上各步骤间均用0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗3次,每次5 min。常规裱片,脱水,透明,封片,Olympus光镜观察,照相,记录。

2 结果

本研究主要观察了猕猴的大脑皮质、海马、尾壳核、齿状回、纹状体、小脑皮质和脊髓等处的NOS_1免疫阳性反应细胞和纤维的分布。

2.1 NOS_1免疫反应阳性神经元在大脑皮质的分布

在大脑皮质中,NOS_1的阳性反应最为广泛,除分子层以外,其余各层均有分布,相对而言,Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ层较多。第Ⅱ层为小型无突起的椭圆形的弱阳性细胞;第Ⅲ层细胞大多为小锥形和星状阳性细胞;第Ⅴ层大多为大、中型的锥形(金字塔状)强阳性细胞,突起明显并伸向分子层,还有少量小型星状细胞;第Ⅵ层大多为阳性的各形细胞,只有少数具长突起的梭形细胞呈强阳性,见图1。另外,本实验还将猕猴的前额、前运动区、躯体感觉区、顶区、颞区、听区、视区和枕区等皮质区进行了横向比

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

较, 发现以额区阳性细胞的数量相对密集, 顶区较少; 细胞大小, 相对而言, 枕叶较大, 见图 2。额叶最小。皮质运动区阳性细胞主要分布在Ⅲ层, 躯体感觉区、听区和视区细胞形态大多为较长突起的椭圆形细胞和少量的星形细胞。在额区皮质中观察到阳性神经元胞体所发出的树突很长, 末端迅速变细, 在其近端还发出许多小突起。

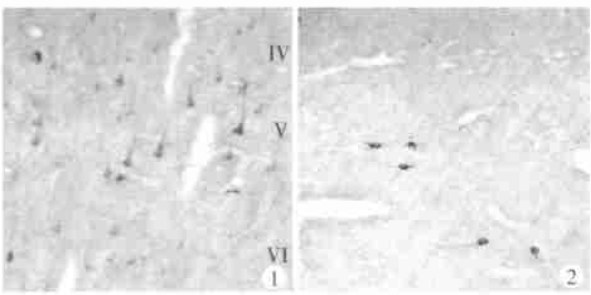


图 1　大脑皮质Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ层的 **NOS_1** 阳性细胞　(ABC× 100)

Fig 1　NOS_1 immuno-positive cells in the layer Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ of cerebral cortex　(ABC× 100)

图 2　皮质枕叶内 **NOS_1** 阳性细胞　(ABC× 100)

Fig 2　NOS_1 immuno-positive cells in occipital cortex　(ABC× 100)

2.2　NOS_1 免疫反应阳性神经元在皮质下结构的分布

皮质下结构如尾壳核, 其核内有散在的 NOS_1 强阳性细胞, 胞体大多为椭圆形、圆形, 并且具有很长的突起, 数量较多, 见图 3; 在纹状体内观察到数量较多的大型强阳性细胞和中等阳性细胞以及少量的小型弱阳性细胞, 胞体大多椭圆形、偶尔可见小梭形细胞, 但是都具有多突起, 见图 4; 在海马锥体细胞层, 可观察到大量密集排列的锥形细胞, 突起较长伸向分子层, 其它各层除分子层外, 均有少量阳性细胞, 而在齿状回颗粒细胞层内有散在的、体积较小的 NOS_1 阳性细胞, 多形层内也有少量的体积稍大的阳性星状细胞。

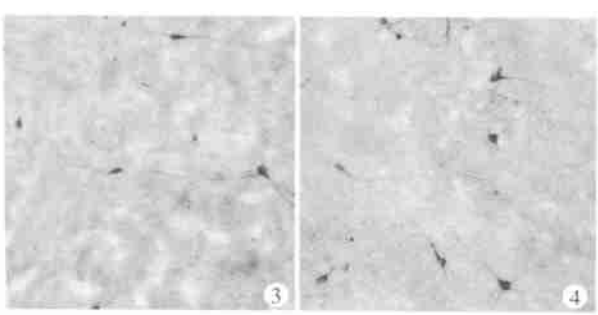


图 3　尾状核内 **NOS_1** 阳性神经元　(ABC× 100)

Fig 3　NOS_1 immuno-positive neurons in the caudate nucleus　(ABC× 100)

图 4　纹状体内 **NOS_1** 阳性神经元　(ABC× 100)

Fig 4　NOS_1 immuno-positive neurons in the striatum　(ABC× 100)

2.3　NOS_1 免疫反应 NOS 阳性神经元在小脑的分布

小脑皮质内 NOS_1 阳性反应主要表现为: 分子层内有大量与表面垂直的阳性纤维, 颗粒层内是密集的边界不清的阳性细胞, 而位于两层之间的浦肯野氏细胞层却很显著, 阳性细胞排列规整, 大多部位呈单层分布、并有突起伸向表层。小脑外侧核内的阳性细胞多, 细胞间隙清楚, 突起不着色。

2.4　NOS_1 免疫反应阳性神经元在脊髓的分布

在脊髓内 NOS_1 阳性反应相当广泛: 脊髓前角、中央灰质和后角部分均为阳性反应。在前角可观察到大量的强阳性细胞, 胞体大小不等, 多数呈多角形, 核大, 突起多而明显, 还有少数细胞呈梭形、星形。在后角有时可观察到表层会出现少量小型神经元和大量的阳性神经纤维, 脊髓其它区域只显示出少量小阳性细胞。

3　讨论

本研究采用免疫组织化学观察了 NOS_1 在猕猴中枢神经系统中的分布, 发现 NOS_1 在中枢内的分布非常广泛。

目前国内外关于猕猴全脑内 NOS 的免疫组化定位的文献很少。本实验观察到猕猴大脑皮质的阳性细胞主要分布在Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ层, 为密集的、体积较小的细胞, 多数为锥形、星状细胞、少数为椭圆形和梭形细胞, 其中, 只有梭形细胞具有突起。而文献[5, 6] 通过 NADPH-d 组织化学观察到在猴的大脑皮质有两类阳性神经元, 一类是深染的带有长胞突的星状细胞; 另一类是浅染的各型细胞, 胞突反应阴性。这些细胞的分布, 相对集中于皮质的Ⅱ、Ⅲ和Ⅵ层。本研究观察到的阳性反应在一定程度上与这一结果吻合, 但阳性细胞形态不尽相同。而章为等[7] 应用 NOS_1 在大鼠大脑皮质观察到的阳性细胞, 突起明显, 并有大量的串珠状的阳性纤维呈网状分布于皮质, 本研究结果与之有一定的差别。这提示不同亚型的 NOS 分布于不同的细胞群体, 不同种属的 NOS_1 分布于不同层次。而在额区皮质中观察到阳性神经元胞体所发出的树突很长, 末端迅速变细, 在其近端还发出许多小突起, 这一结果与 Smiley 等[8] 观察到的结果一致。

皮质下结构总的特征表现为: 阳性细胞散在, 突起多而长, 为大、中型椭圆形细胞, 在尾壳核和纹状体内大量存在, 为纹状体作为基底神经节信息处理通路中的重要环节提供了形态学基础。而 Vincent 等[9] 通过 NADPH-d 组织化学在大鼠脑内观察到阳性神经元的体积较小, 呈星状, 密集分布于海马的锥体细胞层和齿状回的颗粒细胞层。我们观察到海马和齿状回阳性神经元的分布与之一致, 而在形态上的差别进一步说明不同种属间存在差异。

通过观察脊髓前角内的神经元按其部位和功能可分为两大部分: 腹内侧核(VM)和腹外侧核(VL)。前者为强阳性大细胞, 在功能上称之为躯体运动神经元, 后者为中等阳性细胞, 这群细胞具有丰富的 NOS_1 阳性神经元, 只局限于胞浆、核大、突起多而明显。而脊髓中央管周围(即中央灰质)分布有相对较少、较小的中等阳性细胞。这与 Pullen 等[10] 学者在猫、猴和人的有关报道基本相符。至于脊髓各部阳性细胞的多少、反应

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

的强弱，目前还存在不同意见[8,11]。作者认为这可能与实验所用的物种和抗体来源有关，后角Ⅰ、Ⅱ层中的阳性细胞，由于本身很小，又有大量密集的阳性纤维，以致背景较深，但仍可见 NOS_1 阳性神经元分布其中。

Bredt 等[12]和 Anggard[13]采用免疫组织化学染色在大鼠脑内观察到 NOS_1 阳性神经元主要分布于小脑皮质的分子层和颗粒层，而浦肯野细胞阴性。他们认为浦肯野细胞内的 NO 是由颗粒层细胞弥散而来的。本实验的结果证实小脑皮质的分子层含有大量的阳性纤维，颗粒层分布有大量的边界不清的小型阳性细胞，而浦肯野细胞为阳性。这一点与文献报道明显不同，有可能是物种间存在的差异，而有关 NOS_1 在小脑分布方面的研究不多，有待进一步证实。至于人可能因标本来源关系，国内未见报道，而国外研究结果与灵长类也无明显差别。

综上所述，NOS_1 在中枢神经系统内广泛存在，阳性神经元的形态和反应强度有所不同，表明它们与多种功能有关。作为灵长类动物的猕猴，NOS_1 阳性神经元分布具有以下主要特征：①在中枢神经系中分布广泛，包括大脑皮质、海马、齿状回、尾壳核、纹状体、小脑皮质、脊髓前角、后角和中央灰质等；②阳性细胞大多为锥形、星状、椭圆形、少数为圆形和梭形细胞，大都具有多个突起，细胞的多样为各种各样的功能奠定了形态学基础；③细胞着色分 3 种类型：强阳性、阳性和弱阳性。而有关猕猴的其它部位、组织如脊髓在各节段中 NOS_1 的分布、形态与功能的关系有待进一步研究。

参考文献：

[1] Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(22): 9 030—9 033.

[2] Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-signalling in the nervous system[J]. Trends Neurosci, 1991, 14(2): 60—67.

[3] Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger[J]. Neuron, 1992, 8(1): 3—11.

[4] Knowles R G, Skinner R D, Powell R M. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanglate cyclase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(13): 5 159—5 162.

[5] Hashikawa T, Leggio M G, Hattori R, *et al*. Nitric oxide synthase immunoreactivity colocalized with NADPH-diaphorase histochemistry in monkey cerebral cortex[J]. Brain Res, 1994, 641(2): 341—349.

[6] Smiley J F, Levey A I, Mesulam M M. Infracortical interstitial cells concurrently expressing M2-muscarinc receptors, acetylcholinesterase and nicotinamine adenine dinucleatide phosphate-diaphorase in the human and monkey cerebral cortex[J]. Neuroscience, 1998, 84(3): 755—769.

[7] 章 为，周 雪，诒晓菊，等. 一氧化氮合酶同功异构酶在中枢神经系统的分布[J]. 神经解剖学杂志，1999，15(2)：171—174.

[8] Smiley J F, Levey A I, Mesulam M M. m2 Muscarinic receptor immunolocalization in cholinergic cells of the monkey basal forebrain and striatum [J]. Neuroscience, 1999, 90(3): 803—814.

[9] Vincent S R, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain[J]. Neuroscience, 1992, 46(4): 755—784.

[10] Pullen A H, Humphreys P, Baxter R G. Comparative analysis of nitric oxide synthase immunorectivity in the sacral spinal cord of the cat, macaque and human[J]. J Anat, 1997, 191(Pt 2): 161—175.

[11] Saito S, Kidd G J, Trapp B D, *et al*. Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase[J]. Neuroscience, 1994, 59(2): 447—456.

[12] Bredt D S, Hwang P M, Snyder S H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide[J]. Nature, 1990, 347(6 295): 768—770.

[13] Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine[J]. Lancet, 1994, 343((8 907)): 1 199—1 206.

（编辑 郭建秀）

（上接 1077 页）

较严重的并发症，这就要求术后 1 周，尤其第 1～3 天应严密观察病情变化，如出现胸骨后剧烈疼痛、气胸、皮下气肿、呕血、黑便或吞咽困难未能缓解等情况时，及时报告医生，对症治疗。术后远期并发症主要为食物嵌顿和发生再狭窄，需对症处理。

3.2.2 饮食护理 术后 2 h 即可进食，术后当天以流质为宜，鼓励患者多饮温热水，使支架扩张到最佳状态，术后 2～3 d 进流质或半流质，以后酌情进软食，并将食物慢嚼细咽，以免引起起阻塞，同时忌干、粗糙、硬性食物，防止食物卡在支架上，禁食冰冷食物，因镍钛合金具有记忆特性，遇冰冷环境易收缩，导致支架移位或脱落。

3.2.3 正确的体位 由于目前支架无“活瓣”作用，置放后很容易造成胃内容物的反流，引起严重的反流性食管炎继之发生食管溃疡并发出血及吸入性肺炎[1]，因此，嘱患者进食后保持 30 min 直立体位，睡眠时床头抬高 15°～30°，以防返流。

3.2.4 出院宣教 嘱患者每月门诊随访 1 次，有症状时及时治疗。

4 讨论

镍钛记忆合金网状支架具有独特的形状记忆特性，生物相容性好，可复性好及支撑力强，特别是带膜支架，既能较长时间保持狭窄部通畅，又能阻止癌组织向内生长，压迫癌组织，防止出血，同时造成局部血运不畅，癌灶生长速度缓慢，可较长时间缓解梗阻症状，延长生存期，是一种有效的姑息性治疗[2]。本疗法有以下特点：①在胃镜下置入支架，避免了 X 线损害，定位准确，方法简单，易于掌握，成功率高。②安全，并发症少。③适应症广，且治疗费用低。④疗效确切，病人耐受性好，值得临床推广。我们建议中、晚期食管癌失去手术机会的患者，为了迅速缓解吞咽困难，改善营养状况，延长生存期，本疗法不失为一种有效的治疗手段，同时，为了避免短期内再度狭窄，最好选用带膜支架。

关键词：食管；恶性肿瘤；支架；护理

中图法分类号：R571.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 黄 华，李兆福，彭荣宗，等. 记忆合金支架治疗晚期食管癌梗阻[J]. 中华消化内镜杂志，1997，14(4)：234.

[2] 方 桢. 食管癌的内镜治疗[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(9)：1 026—1 027.

（编辑 陈聪连）

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