DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.012

梭曼急性中毒诱发大鼠脑干儿茶酚胺神经元表达 c-fos

景德强* 陈尔瑜** 余争平*** 程天民*** (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室) 重庆,400038

提 要 目的: 观察梭曼急性中毒后脑干儿茶酚胺神经元的活动变化。方法: ABC免疫组化法显示 Fos 蛋白的变化。结果: 梭曼急性中毒后,脑干儿茶酚胺神经元内 fos免疫阳性神经元急剧增加; c-fos表达呈短暂一过性表达; Fos强阳性神经元在中毒 1 h开始增加,2~ 3 h时达高峰,4 h开始下降。c-fos表达与梭曼中毒剂量相关而与惊厥是否发生无关。结论: 脑干儿茶酚胺神经元在梭曼中毒后发生广泛激活,可能是脑行为变化的先期事件,是惊厥发生以及呼吸、循环中枢衰竭的关键环节。

关键词 梭曼;脑干;儿茶酚胺神经元; c-fos;大鼠
中图法分类号 R827.172

急性梭曼中毒时,呼吸驱动力丧失、呼吸及循环衰竭是造成死亡的重要原因。脑干儿茶酚胺神经元群不仅与呼吸、循环的调节密切相关[1],而且是脑内儿茶酚胺递质的主要来源[2];有研究表明儿茶酚胺神经元受乙酰胆碱神经的传入调节[3];因此了解梭曼中毒后儿茶酚胺神经元群的活动状态,有助于理解梭曼中毒中枢症状的机制。c-fos原癌基因是即刻早期基因家庭成员之一,它在正常成年大鼠中枢神经系统中表达水平很低[4],在乙酰胆碱受体刺激后可迅速表达, c-fos可以作为标识神经元活动及代谢状态的物质[5,6]。本研究用 ABC免疫组织化学方法,对梭曼中毒后大鼠脑干儿茶酚胺神经元中 c-fos表达作了图布定位研究。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

实验采用分性别笼式群养的雄性 Wistar大鼠(本校动物所提供),体重 250~ 300 g。在捕捉、实验操作过程中尽量避免钳夹、惊吓、强光等刺激。依据实验目的和 c-fos表达规律,将动物分成亚惊厥组、惊厥组和抗厥组,在 0~ 240 min之间设 7个时相存活点,见表 1。

表 1 实验动物分组

Tab 1 Groups of experimental rats

Group	Survival duration						
	5 min	15 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min
Convulsion	3	2	5	5	5	5	2
Sub-convul	–	–	1	2	2	1	1
Anti-convul	–	–	3	4	3	1	1

1.2 动物模型

梭曼原液(纯度> 97%)以丙酮配成 2%储备液。注射前以灭菌蒸馏水稀释成 100 μg/ml的水溶液,在动物清醒状态下行皮下注射。注射剂量惊厥组为 100 μg/kg;亚惊厥组为 40 μg/kg;抗惊厥组动物先以 15~ 20 mg/kg的戊巴比妥钠腹腔注射, 15 min后再注射 100 μg/kg的梭曼。

1.3 方法与步骤

实验动物存活至表 1规定的时间后,用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后常规灌注固定。固定液为 4%多聚甲醛和 0.1%苦味酸混合液 400 ml。取材后再置此固定液中后固定 6~ 8 h,然后置入 30%蔗糖缓冲液中, 4℃, 24~ 48 h,恒冷箱冰冻连续冠状切片,片厚 30 μm,每 5片取 1片,收集在 0.01 mol/L PBS中。再入含 0.2% Triton X-100及 0.1%牛血清的 PBS, 37℃下孵育 40~ 60 min; 1∶100正常兔血清, 37℃, 40 min。然后入兔抗 c-fos血清(Boehringer Mannheim Co, 1∶1 000~ 1∶1 500) 4℃, 72 h。洗后入 Biotin标记的羊抗兔血清(Sigma Co, 1∶250) 4℃, 24 h。孵育后的切片以 DAB(北京化试一厂)呈色至适度。明胶裱片,中性树胶封片,光镜下观察照相。MAS-II型图像分析系统测量、统计。

2 结果

惊厥组动物全部发生紧张-阵挛性惊厥;亚惊厥组动物中, 2例动物出现惊厥前驱症状,其余均未发生惊厥征兆;抗惊厥组动物全部未发生惊厥。各组动物均有程度不等的外周症状,表现为流涎、紫绀,呼吸、心跳频率增加,以惊厥组最严重,抗惊厥组次之,亚惊厥组最轻。梭曼注射后存活 5、15 min的 5例动物,脑干中偶见 c-fos免疫阳性神经元,染色淡,无恒定核定位特征;至 60 min时, c-fos免疫阳性神经元的数量急剧增加,着色加深,阳性神经元的核染为棕褐色或褐色,核仁不染色;至 90 min时数量进一步增加; 120、180 min时达高峰; 240 min数量

* 景德强,男, 34岁,副教授,博士
** 第二军医大学基础医学部解剖学教研室 上海, 200433 *** 第三军医大学预防医学系复合伤研究所 重庆,400038

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

开始减少。

梭曼中毒后,脑干儿茶酚胺神经元 c-fos表达呈现典型一过性表达。即中毒 1 h明显升高,至 2~ 3 h达高峰,4 h已明显下降,充分显示了 Fos信号分子的特征。c-fos的表达与梭曼中毒的剂量明显相关。中毒剂量为 40μg/kg的 5例动物各核团 c-fos表达神经元的数量显著低于剂量为 100μg/kg的各时相组动物。惊厥活动与脑干儿茶酚胺神经元中 c-fos表达无关,抗惊厥组动物在注射梭曼前进行抗惊厥处理,所有动物均未出现明显的惊厥症状,脑干各儿茶酚胺神经核中 c-fos表达的数量与出现惊厥的各组动物之间差异不显著。各核 Fos免疫阳性神经元的分布见图 1。各区神经元见表 2,形态参数见表 3。

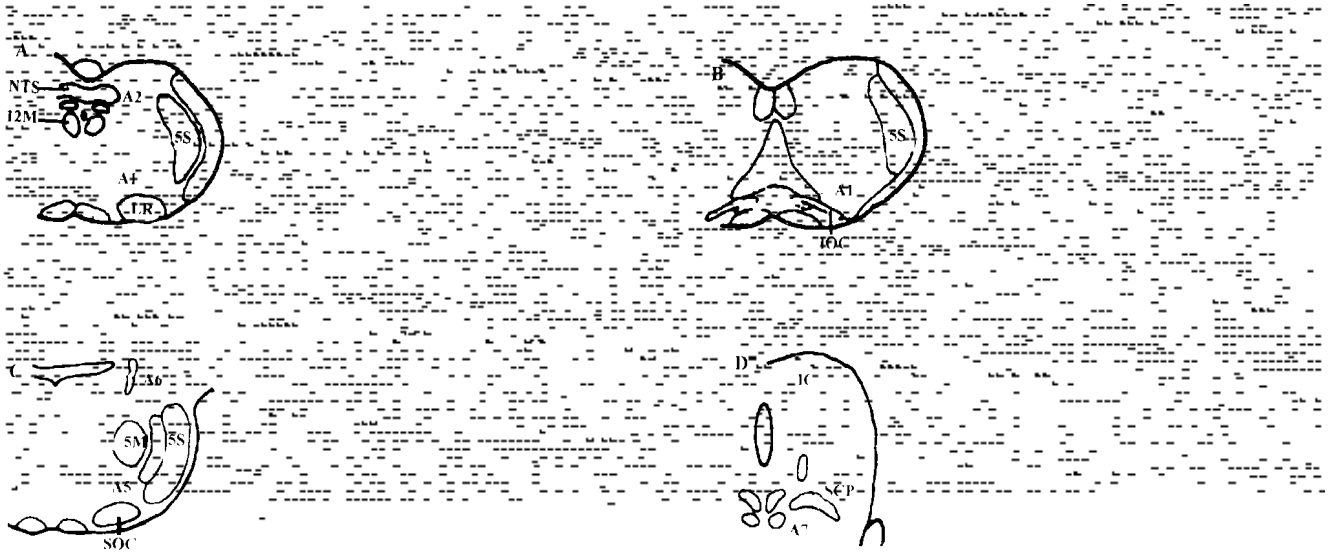


图 1　梭曼中毒后大鼠脑干儿茶酚胺神经元中 c-fos免疫阳性胞核的分布和定位。

左侧线条图:示阳性胞核在脑干冠状切面上的位置,右侧照片:示阳性胞核的形态和分布。A:延髓闩平面,示孤束核中 A1神经元群;B:延髓下橄榄核平面,示外侧网状核中的 A2神经元群;C:脑桥上橄榄核平面;D:中脑上丘平面,示 A7神经元群。标尺= 160μm

Fig 1　Distribution and location of fos-like immunohistochemically positive nuclei of neurons in catecholamine neuron groups of brain stem after acute soman intoxication in rats

Left: Drawings demonstrate the position of positive nuclei on coronal planes of brain stem. Right: Photos demonstrate the distribution and shape of positive nuclei. A: Obex plane of medular oblongata, A1 group in NTS. B: IOC plane of medular oblongata, A2 group in lateral reticular nucleus. C: SOC plane. D: Superior colliculus plane, showing A7 group. Abbreviations: NTS: nucleus tractus solitarius. 12M: motor nucleus of 12 th cranial nerve. 5S: Sensory nucleus of 5 th cranial nerve. LR: Lateral reticular formation. IOC: Inferior olive complex. SOC: Superior olive complex. A1-A7: Catecholamine neuron groups 1-7

表 2　梭曼中毒后大鼠脑干儿茶酚胺神经元中 Fos免疫阳性神经元的密度

Tab 2　The density of Fos immuno-positive neurons in catecholamine neurons of rat brian stem after soman intoxication

Nuclei	Convulsion				Sub-convul	Anti-convul
	60 min	90 min	120 min	180 min	90~ 180 min	90~ 180 min
A_1	6.12± 1.02	7.3± 0.52	8.80± 1.34	8.67± 1.72	4.38± 1.89*	7.94± 2.11
A_2	5.38± 1.12	5.49± 1.09	6.15± 1.07	6.8± 1.57	3.03± 1.79*	6.52± 1.84
A_3	3.76± 0.94	4.4± 1.25	5.1± 1.28	5.09± 1.10	2.7± 0.85*	5.03± 1.19
A_4	2.5± 0.84	4.0± 1.55	4.72± 1.19	4.55± 1.23	2.35± 0.75*	4.55± 1.27
A_5	2.99± 0.88	3.5± 0.97	4.12± 1.03	4.24± 0.91	3.0± 0.95*	4.33± 1.59
A_6	12.67± 2.14	14.3± 2.51	21.30± 2.29	20.53± 2.52	11.1± 2.13*	19.85± 3.14
A_7	1.3± 0.15	2.25± 0.14	2.92± 0.31	2.87± 0.42	1.19± 0.18*	2.47± 0.50

* : $P < 0.01$ *vs* anticonvulsion group and convulsion group

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

表 3 梭曼中毒后大鼠脑干儿茶酚胺神经元中 Fos免疫阳性神经元的形态参数 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 The shape parameters of Fos positive nuclei in catecholamine neuron groups in rat brain stem after intoxication ($\bar{x}\pm s$)

	Perimeter(μm)	Area(μm^2)	Diameter(μm)	Roundness
A_1	22.83± 2.14	519.13± 80.24	8.51± 0.87	0.84± 0.14
A_2	20.51± 5.31	497.15± 124.57	6.97± 1.34	0.78± 0.09
A_5	21.59± 3.90	507.19± 69.29	8.35± 0.67	0.82± 0.11
A_6	23.58± 1.97	547.39± 76.20	8.67± 0.42	0.85± 0.17
A_7	21.12± 1.43	511.59± 50.24	8.25± 0.31	0.86± 0.12

3 讨论

梭曼是乙酰胆碱酯酶不可逆抑制剂。中毒后迅速导致乙酰胆碱在其末梢区聚积而形成毒理反应;脑干儿茶酚胺神经核是乙酰胆碱酯酶密度较高的核区,接受乙酰胆碱能神经元的传入,且分布着高密度的乙酰胆碱受体[1],因此这些核区神经元内的信号物质变化很可能是乙酰胆碱聚积的直接后果。本结果显示:这些核内 c-fos表达与梭曼中毒剂量存在量效关系,体现了这一推论。实际上,在培养的神经元中,增加乙酰胆碱浓度或乙酰胆碱受体的占据均可导致 c-fos表达的增加[7]。有作者在大鼠梭曼中毒模型上检测了大剂量(100μg/kg)梭曼中毒后,兰斑核(A_6)儿茶酚胺神经元放电频率增加[8],本结果 A_6核团 c-fos的高表达与之十分吻合,显示梭曼中毒后,乙酰胆碱对儿茶酚胺神经元有强的兴奋作用。梭曼中毒后,特别是发生阵挛惊厥的大鼠前脑中去甲肾上腺素出现递质耗竭,显示去甲肾上腺素的递质活动在惊厥活动中起作用[1]。而前脑中去甲肾上腺素纤维主要来自脑干,特别是兰斑[9],因此本结果支持惊厥脑干起源学说[10]。

从本结果和文献[11]实验结果看,梭曼中毒后 c-fos出现高表达的脑区有三类,c-fos表达的方式有三种。第一类脑区是乙酰胆碱酯酶高密度脑区,代表之一是脑干儿茶酚胺神经元群。有趣的是,并非所有的乙酰胆碱酯酶高密度脑区在梭曼中毒后都表达 c-fos。脑干运动核的神经元分布着高密度的乙酰胆碱酯酶,但无论是高剂量或是低剂量中毒,无论是否出现惊厥均未发现其中表达 c-fos,而在脑干儿茶酚胺神经元中,c-fos表达与梭曼剂量相关,而与惊厥是否出现无关,体现了这些核区的神经元活动可能是脑内继发活动的先期事件。第二类脑区是惊厥活动涉及的脑区,包括丘脑非特异核团[11]、杏仁核、大脑皮质、海马以及嗅脑(景德强等,待发表)。c-fos在这些脑区也发生一过性表达,且 c-fos表达与惊厥相伴出现。第三类脑区是发生兴奋性脑损伤的脑区,包括大脑皮质、海马、杏仁核等脑区,在这些脑区中,c-fos表达除了一过性表达外,尚出现持续表达和延迟表达,并且三种形式的表达均与惊厥活动相关。

本研究说明在梭曼中毒后,脑干儿茶酚胺神经元发生普遍的活动增加。提示了脑干在梭曼中毒后病理过程起重要作用,脑干儿茶酚胺神经元的中枢兴奋活动可能是梭曼中毒后中枢神经行为的关键环节。

参考文献

1 Shipley M T, Nickell W T, Ennis M, *et al*. Neural mechanisms in the generation of soman-induced seizures. In proceeding of the 1991 medical defense bioscience review. US Army, South Dakota, 1991. 393~400

2 Rotter A. Cholinergic receptors. In: Bjorklund A, Horkfelt T eds. Handbook of chemical neuroanatomy. Vol 3. Classical Transmitters in CNS, Part 2. Amsterdam: Elsevier, 1984. 273~299

3 Curran T. Fos and Jun: Oncogenic transcription factors. Tohoku J Exp Med, 1992, 168(1): 169

4 Hughes D, Lawlor P, Dragunow M. Basal expression of fos, fos-related jun and krox 24 proteins in rat hippocampus. Mol Brain Res, 1992, 14(2): 271

5 Namy C A, Delamanhe I S, Bouchand C. Variation in the expression of c-fos after intoxication by soman. Comparative study using *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Brain Res, 1993, 603(1): 32

6 Morgan J I, Curran T. Immediate-early gene: ten years on. TINS, 1995, 18(1): 66

7 Grenberg M E, Ziff T S. Occupation of PC12 cells of neuronal acetylcholine receptors increase c-fos transcription. Science, 1986, 234(1): 80

8 Ennis M, Shipley M. Tonic activation of locus coeruleus neurons by systemic or intracoeruler microinjection of an irreversible acetylcholinesterase inhibitor increase discharge rate and induction of c-fos. Exptal Neurol, 1993, 128(1): 147

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

9 Albanese A, Butcher L L. Acetylcholinesterase and catecholamine distribution in the locus coeruleus of the rat. Brain Res Bull, 1980, 5(1): 127

10 Shipley M T, Nickell W T, EL-Etri M. Mechanisms of soman-induced seizures and neuropathology. In proceedings of the workshop on convulsions and related brain damage induced by organophosphorus agents. U S Army, South Dakota, 1990. 131~143

11 景德强,陈尔瑜.梭曼诱发惊厥大鼠丘脑内 c-fos的表达.神经解剖学杂志, 1996, 12(2): 141

(收稿: 1997-12-15;修回: 1998-03-18)

(编辑　汪勤俭)

Expression of protooncogene c-fos in catecholamine neurons in the brain stem after acute soman intoxication in rats

Jing Deqiang, Chen Eryu, Yu Zhengping, Cheng Tianmin (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe the changes of the activity of catecholamine neuron groups in the brain stem after acute soman intoxication. Methods: The changes of fos protein were observed with ABC immunohistochemistry. Results: The number of Fos immunoreactively positive nuclei in catecholamine neurons in the rat brain stem was dramatically increased after soman intoxication. C-fos expression was found to be classical temporary expression. The number of fos positive nuclei began to increase at the 1st h, reached its peak between the 2nd and 3rd h and began to decrease at the 4th h after intoxication. C-fos expression was related to dose of soman rather than seizure activity. Conclusion: Catecholamine neurons are generally activated by soman intoxication, which might represent the primary events of brain behavioral changes. The events seem to be the key reason for seizure activity as well as respiratory and circulatory depletion after soman intoxication.

Key words soman; brain stem; catecholamine neuron; c-fos; rat

(上接 495页)

2.3　B超检查

发现胃窦后壁有 3.2 cm× 2.6 cm的低回声块影 1例,边界清晰形态基本规则。另 1例 B超检查发现肿块内有液性暗区。

3　讨论

胃平滑肌母细胞瘤由 Martin于 1960年首先提出,国内外均有报道[1,2]。其特征性病理学改变为瘤细胞为圆形、多边形,大部分瘤细胞原浆内有肌丝,故认为本瘤来源于平滑肌,属肌原性肿瘤,故而划为胃平滑肌瘤的一种特殊类型。

该肿瘤男性多于女性[1],本组 6例中 4例为男性。年龄偏小。临床表现以腹痛为主,病程多较长。胃镜检查多能发现病灶,但因病灶位于肌层,其定性诊断准确性较低。即使是活检,4例中无 1例提及胃平滑肌母细胞瘤的诊断,这与病变位置深且其表面常为粘膜覆盖及钳取的病理组织太少,位置太浅,取材部位太局限等因素有关。

胃平滑肌母细胞瘤多位于胃窦部,胃底及胃体也有发生。病灶多起源于胃后壁肌层,单发多见,多为腔内型,少数为带蒂肿物。肿块多为球形或椭圆形,边缘光整,有深浅不一的分叶。肿物表面多有龛影,为圆形或卵圆形,典型者形成"牛眼征"。其表面的胃粘膜多存在,但分布较紊乱,而周围的胃粘膜及胃壁多有推移改变。

CT检查不仅可显示肿块的腔内部分,还可显示腔外部分,并能清晰显示肿块大小、轮廓、密度、范围及肿物对周围脏器的侵犯和转移等情况[2,3]。灰阶超声检查方便,经济实用,可显示肿瘤的结构及其与周围脏器的关系。

胃平滑肌母细胞瘤 X线诊断极易误诊[1,2]。本组病例除 1例提示胃平滑肌瘤的诊断外,其余均被误诊。且胃平滑肌母细胞瘤与胃平滑肌瘤、平滑肌肉瘤的鉴别亦较困难,主要区别是细胞病理学的细胞组成形态不同[3]。因此,消化道钡餐以及 CT、B超等影像学多为发现病变,对于定性诊断非常困难,即使胃镜或活检都存在一定难度。由于该肿瘤有恶性倾向,本组 5例病理提示有恶变,故发现病变应尽早手术。

关键词　胃肿瘤;平滑肌母细胞瘤

中图法分类号　R816.5

参考文献

1 李映南,冯振茎,赵伏兰.胃平滑肌母细胞瘤(附 4例报告).实用放射学杂志, 1988, 4(4): 195

2 何　晓.胃平滑肌母细胞瘤一例.临床放射学杂志, 1998, 17(2): 83

3 丁仕义,李贺平.胃肠道平滑肌肿瘤的影像诊断.第三军医大学学报, 1998, 20(2): 155

(收稿: 1998-05-12;修回: 1998-07-14)

(编辑　汪勤俭)

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