DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.007

急性低温低氧对大鼠下丘脑 NOS及 c-fos表达的影响*

范晓棠** 阮怀珍 张金海 吴喜贵 袁碧波 (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: 探讨急性低温低氧对大鼠下丘脑 NOS及 c-fos表达的影响。方法: 用 c-fos免疫组化技术和 NADPH-d组化法研究急性低温低氧大鼠下丘脑内 c-fos原癌基因的表达、一氧化氮合酶(NOS)的分布及两者的共存。结果: 急性低温低氧组大鼠:① 下丘脑内 c-fos表达明显增加,在许多核团呈恒定的核特异定位分布,其中室旁核、弓状核、腹内侧核、背内侧核表达最为强烈,乳头体前核、下丘脑后核有中等强度的表达,视上核偶有表达。② 室旁核的大细胞部和视上核可见密集深染的 NOS阳性大细胞。③ 在室旁核的小细胞部及其附近的区域约有 10%~20%的中小型 NOS阳性细胞同时表达 c-fos蛋白,其它部位偶见双染细胞。以上结果与对照组比较差异显著,而 1 d组和 3 d组之间无明显变化。结论: 下丘脑内的特定核团可能参与低氧反应的整合。一氧化氮(NO)作为一种非经典的新型神经递质和信息分子可能与低氧反应有关。

关键词 急性低温低氧; NOS; c-fos; 下丘脑; 大鼠
中图法分类号 R345.44; R394.2

高原是一种复杂的低温低氧环境,对机体多个系统产生影响。缺氧可引起下丘脑内 TRHmRNA和 AVPmRNA升高,并引起强烈的神经内分泌反应,说明下丘脑在低氧反应中起重要的中枢整合作用。NO作为一种信息分子参与众多与谷氨酸能相关的反应,NO是否参与了下丘脑的低氧适应反应尚未见报道。本研究运用模拟海拔 6 000 m的高原缺氧模型,用 c-fos免疫组化技术和 NADPH-d组化法来观察下丘脑内一氧化氮合酶(NOS)和 c-fos的表达及两者的共存,探讨高原缺氧在下丘脑内所作用的区域及 NO是否参与下丘脑的低氧反应。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

实验用 SD大鼠 17只,体重为 150~200 g,雌雄不拘。将大鼠随机分为正常对照组(n = 5)和急性低温低氧组: 1 d组(n = 6), 3 d组(n = 6)。将急性低温低氧组大鼠置于模拟海拔 6 000 m的低压氧舱内(舱内温度为 4℃),每天 6 h。

1.2 免疫组化法

实验毕,按常规进行大鼠组织灌流,固定,取出下丘脑,行冠状连续切片(35 μm),然后进行 ABC免疫组化染色: 切片在 1∶1 000的 c-fos抗血清(购自中山公司)中孵育 48 h(4℃),再依次进入生物素化羊抗兔血清(1∶200, Vector)及 ABC(1∶200, Vector)于室温下各孵育 3 h,继之以 DAB-H_2O_2呈色液显色。非特异对照和阴性对照分别采用正常兔血清和 0.01 mol/L PBS代替一抗,随后的步骤完全相同,结果表明对照切片看不到免疫反应阳性细胞。

1.3 NADPH-d组化法

将切片放入含 1 mg/ml NADPH(Sigma,还原型), 0.1 mg/ml硝基四唑氮蓝(Sigma), 0.3% Triton X-100的 0.1 mol/L PB缓冲液中(pH= 7.4)37℃孵育 40~60 min,然后将切片移至 0.01 mol/L KPBS缓冲液中终止显色反应。

1.4 NADPH-d组化和 c-fos免疫组化的双重反应

首先将切片进行 c-fos免疫组化反应,显色后将切片充分漂洗进行 NADPH-d组化反应。

1.5 数据处理

将每一动物同一部位的下丘脑切片随机抽取四张,作阳性细胞计数,取均数作为该动物的 c-fos样免疫反应(c-fos-like immunoreactivity, FLI)数和 NOS阳性细胞数。实验数据皆用微机经双样本 t检验程序(PDA-2)进行统计学处理。结果以 $\bar{x} \pm s$表示。

2 结果

2.1 急性低温低氧大鼠下丘脑内 NOS分布和表达

光镜下可见急性低温低氧组大鼠下丘脑室旁核的大细胞部、视上核有密集深染的 NOS阳性大细胞; 室旁核的小细胞部、背内侧核、腹内侧核、弓状核、外侧区、室周区、乳头体前核可见深浅不一,疏密不等的 NOS阳性细胞, 1 d组与 3 d组比较差异不显著,正常对照组在上述部位可见少量 NOS阳性细胞,见图 1,表 1。

2.2 急性低温低氧大鼠下丘脑 c-fos的分布和表达

光镜观察到急性低温低氧大鼠 FLI在室旁核表达最为强烈,弓状核、腹内侧核、背内侧核均有强烈表达,乳头体前核、视前区、室周区有中等度的表达,视上核、下丘脑后核表达很少, 1 d组与 3 d组比较差异不显著。正常对照组在上述核团及区域仅有零星表达,见图 2,表 2。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39670283
** 范晓棠,女, 24岁,助教,硕士研究生
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

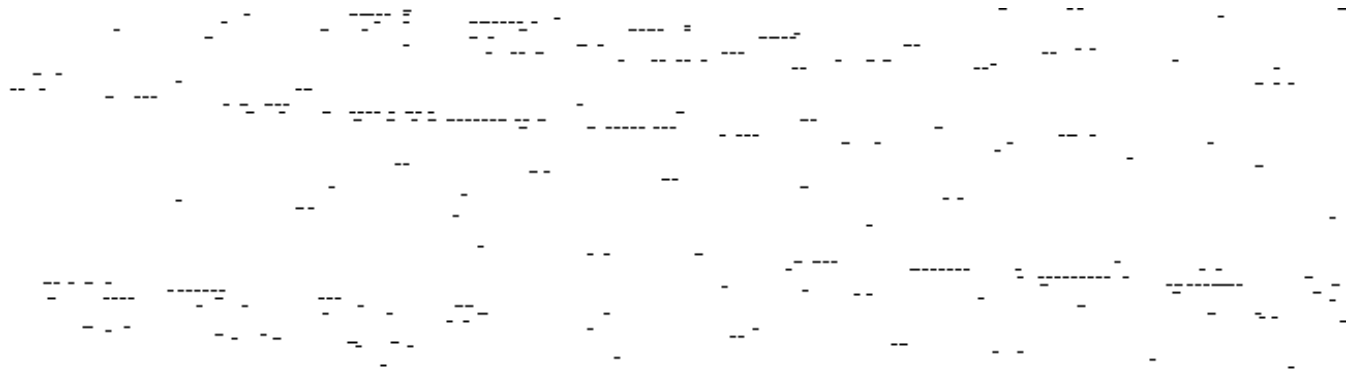


图 1 下丘脑 NOS神经元的显微照相

Fig 1 Photomicrograph of NOS neurons in the hypothalamus

A: NOS neurons in PMV were very sparse in control group (× 130)

B: One day after acute hypoxia and hypothermia, NOS neurons in PMV were densely labeled (× 130)

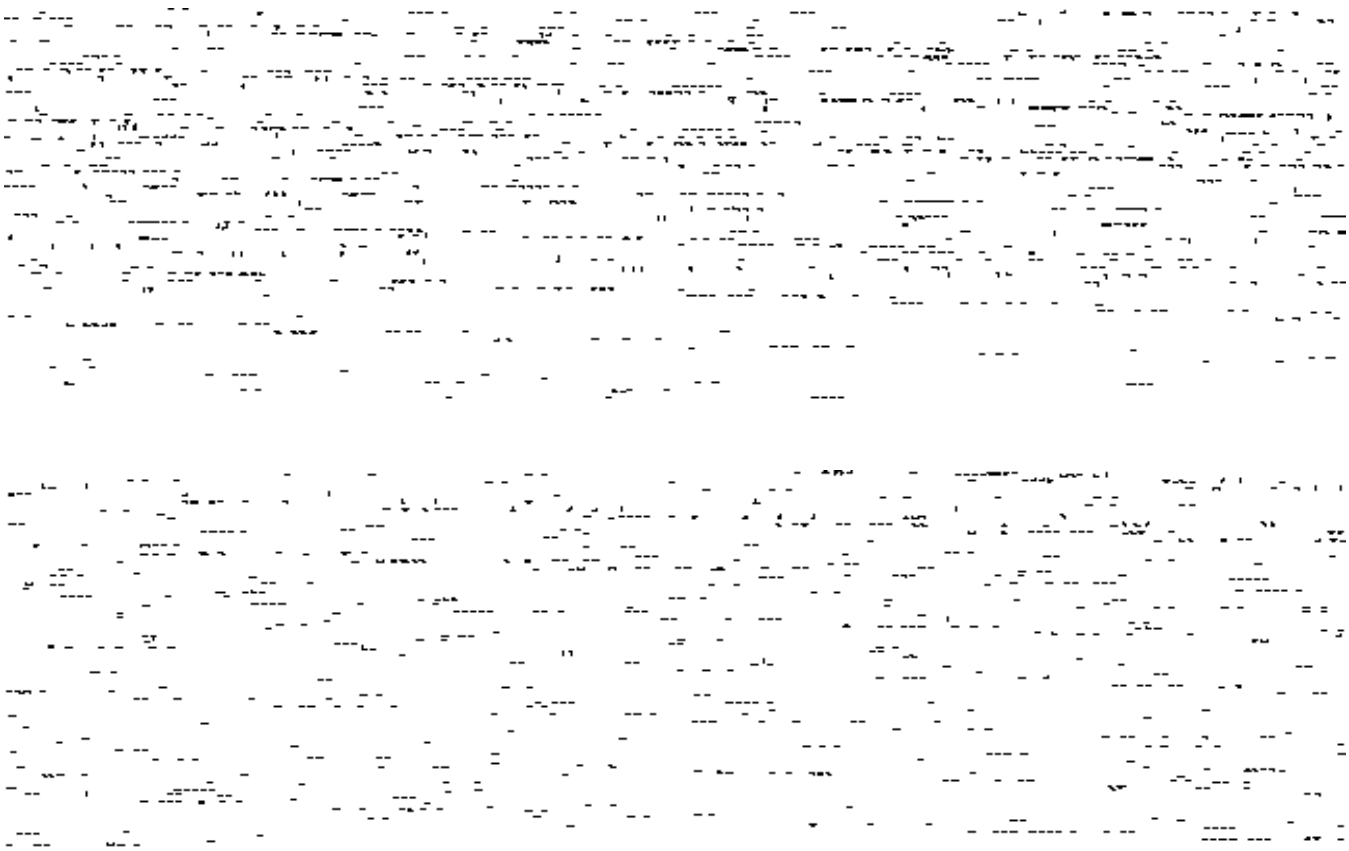


图 2 下丘脑 FIL神经元的显微照相

Fig 2 Photomicrograph of FIL neurons in the hypothalamus

A: FIL neurons of PMV were very sparse in control group(× 260)

B: One day after acute hypoxia and hypothermia, FIL neurons of PMV were densely labeled (× 260)

C: One day after acute hypoxia and hypothermia, FIL neurons of ARH were densely labeled (× 260)

D: One day after acute hypoxia and hypothermia, FIL neurons of VMH were densely labeled (× 260)

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

表 1 急性低温低氧对下丘脑室旁核、视上核 NOS表达的影响

Tab 1 Effect of acute hypoxia and hypothermia on NOS expression of PMV and SON

Groups	n	Number of NOS neurons	
		PMV	SON
Control	5	15.3± 2.7	22.5± 2.1
One day	6	135.5± 5.2**	75.0± 5.4**
Three days	6	133.2± 6.0**	76.8± 5.5**

** : $P < 0.01$ *vs* control

表 2 急性低温低氧对下丘脑 c-fos表达的影响

Tab 2 Effect of acute hypoxia and hypothermia on c-fos expression in hypothalamus

Groups	n	Number of FIL neurons			
		PMV	ARH	VMH	DMH
Control	5	32.3± 2.4	27.2± 2.7	22.6± 2.1	17.6± 1.6
One day	6	254.7± 6.8**	122.8± 5.1**	82.6± 2.7**	70± 1.3**
Three days	6	250.6± 5.1**	118± 6.5**	88.4± 4.6**	70.2± 1.6**

** : $P < 0.01$ *vs* control

2.3 FOS蛋白与 NOS在下丘脑内的共存

低温低氧 1 d组和 3 d组大鼠下丘脑室旁核的小细胞部及其附近的室周区,外侧区,背内侧区,乳头体前核的中小型 NOS阳性细胞有 10%～ 20%同时表达 FOS蛋白,其他部位偶见双染细胞。

3 讨论

NO作为一种非典型的神经递质和信息分子,介导了许多与 NMDA受体激活相关的生理、病理过程,如参与海马和皮层的长时程增强和抑制及脑缺血、脑损伤的毒性作用[1]。据报道缺氧可引起谷氨酸的大量释放[2],谷氨酸兴奋 NMDA受体激活 NOS,使 NO大量释放发挥作用。近年的研究表明,NO作为下丘脑的内源性物质对许多递质和激素的释放具有刺激或抑制性中介作用[3]。在离体状态下已经证实 NO与调节下丘脑神经元 CRF和 VP的释放[4,5]。本研究应用高原低氧模型观察到 NOS在下丘脑内的强烈表达说明 NO参与了下丘脑的低氧反应,尽管其机制还不清楚,可能与其中介作用有关。

FOS蛋白可作为神经元活动的标志物,用 FOS功能图布法可清楚显示参与某一神经活动的神经元。本研究以免疫组化法观察到高原低氧大鼠下丘脑室旁核、弓状核、腹内侧核、背内侧核 c-fos有强烈表达。以往文献报道,单纯系统中度缺氧可引起下丘脑室旁核、视上核、弓状核的 c-fos表达[6]。而在本研究模拟的高原低氧模型中 c-fos表达范围较广,累及核团较多,但视上核表达较少。不同的缺氧方式可导致 c-fos在下丘脑内表达不同,说明不同的缺氧方式可引起不同的生理功能的改变。本研究模拟的高原低温低氧模型可能比单纯系统缺氧对大鼠更为敏感,作用更为广泛。在两种不同的缺氧模型中,室旁核均为 c-fos表达最强烈的核团,说明室旁核在缺氧反应中起非常重要的作用。缺氧条件下 c-fos的强烈表达与谷氨酸大量释放作用于 NMDA受体有关。Haxlin证实中度缺氧引起的 c-fos表达可被 NMDA受体阻滞剂明显抑制。FOS蛋白作为基因转录调节因子的作用尽管未完全阐明,近来的研究已经证实 FOS蛋白对下丘脑室旁核的 AVP基因和 CRF基因的表达有重要的调节作用,并且 NO发挥的中介作用与 FOS表达密切相关。目前已经证实在大鼠的视网膜色素上皮细胞,纹状体神经元中,NO可通过对 c-fos转录活性因子 cAMP反应区结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)磷酸化引起该神经元内 FOS的表达[7,8]。在束缚应激模型中运用 NOS的抑制剂可明显抑制 c-fos的表达[9]。研究也发现在下丘脑室旁核的小细胞部及附近的室周区、外侧区、背内侧区、乳头体前核约有 10%～ 20%的中小型 NOS阳性神经元同时表达 c-fos。因此 NO的中介作用可能是通过影响 c-fos表达来影响 CRF和 AVP基因表达参与低温低氧反应。

参考文献

1 Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J, 1992, 6(12): 3051

2 Richard S K Y, Matthew J D, David F D, *et al*. Effect of anoxia on excitory amino acids in brain slices of rats and turtles *in vitro* microdialysis. Am J Physiol, 1993, 264(4): R716

3 Moretto M, Lopez F J, Vilar A N. Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. Endocrinology, 1993, 133(5): 2399

4 Costa A, Trainer P, Besser M, *et al*. Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing homone from the rat hypothalamus *in vitro*. Brain Res, 1993, 605(2): 187

5 Ota M, Crofton J, Festavan G T, *et al*. Evidence that nitric oxide can act centrally to stimulate vasopressin release. Neuroendocrinology, 1993, 57(5): 955

6 Hirooka Y, Polson J W, Potts P D, *et al*. Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. Neuronscience, 1997, 80(4): 1209

7 Morris B J. Stimulation of immediate early gene expression in striatal neurons by nitric oxide. J Biol Chem, 1995, 270(42): 24740

8 Ohki K, Yoshida K, Hagiwara M, *et al*. Nitrix oxide induces c-fos gene expression via cyclic AMP response ele-

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

ment binding protein (CREB) phosphorylation in rat retinal pigment epithelium. Brain Res, 1995, 696(1-2): 140
9 Amirs, Rackover M, Funx D. Blockers of nitric oxide synthase inhibit stress activation of c-fos expression in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. Neuroscience, 1997, 77(3): 623

(收稿: 1998-09-05;修回: 1999-02-01)
(编辑 张大春)

Effects of acute hypoxia and hypothermia on expression of c-fos and NOS in the hypothalamus in rats*

Fan Xiaotang, Ruan Huaizhen, Zhang Jinhai, Wu Xigui, Yuan Bibo (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To study the effects of acute hypoxia and hypothermia on the expression of c-fos and NOS in the hypothalamus in rats. Mehtods: The effects of acute hypoxia and hypothermia on the expression of c-fos and NOS were observed with c-fos immunohistochemical and NADPH-d histochemical staining. Results: The findings were as follows: ① c-fos expression in the hypothalamus was significantly increased with a nucleus specific distribution especially in the paraventricular nucleus, arcuate mucleus, ventromedial nucleus and dorsomedial nucleus. ② Dense and deeply stained NOS positive cells were seen in the magnocellular region of the paraventricular nucleus and supoptic nucleus. ③ In the parvocellular region of the paraventricular nucleus and in the adjacent periventricular region, about 10% ~ 20% NOS positive cells were also stained by c-fos immunohistochemistry. These findings were significantly different from those of the control but no evident difference was found between the One-day and 3-day groups. Conclusion: Specific nuclei in the hypothalamus might take part in the adjustement of and adaptation to hypoxia and nitric oxide, an atypical new neurotransmitter and message molecule, may be related to the adaptation to hypoxia.

Key words acute hypoxia; acute hypothermia; NOS; c-fos; hypothalamus; rat

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670283

颈椎管肠源性囊肿 1例

A case of cervical intraspinal enterogenous cyst

陈立朝* 邹咏文 许民辉 陈广鑫 (第三军医大学附属大坪医院神经外科) 重庆, 400042

患者, 男, 11岁。因颈项强直、疼痛 2年, 加重伴四肢感觉运动障碍, 大、小便潴留 8 d入院。查体: 双上肢近端肌力II 级, 双上肢远端及双下肢肌力 0级, 四肢腱反射消失, T_2以下痛觉减退。颈椎 MRI提示: $C_{3\sim6}$占位, T_1WI信号稍低, T_2WI信号高, 腹侧蛛网膜下腔增宽, 横断面上包块有向后压表现。手术采用 $C_{3\sim7}$后正中入路, 切除 $C_{3\sim7}$棘突及椎板, 见椎板明显变薄, 有些部位薄如纸, 硬脊膜张力高, 无搏动, 切开硬脊膜, 脊髓腹侧面有一囊肿, 表面光滑, 壁完整, 壁厚 0.5 mm, 前面与脊膜无粘连, 后面与脊髓侧面有粘连, 与神经根轻度粘连, 肿瘤大小约 3 cm× 2 cm× 1 cm。术后病理报告为肠源性囊肿。术后 13 d大、小便失禁, T_2平面以下对疼痛稍有反应, 四肢肌力无明显变化。

讨论

肠源性囊肿是由于胚胎发育第 3周神经管与原肠分离障碍, 由其残留或误位的组织演变而来。椎管肠源性囊肿 MR特点: 矢状位 T_1示囊肿信号强度稍高于 CSF, 囊肿可嵌入髓内, 故难以确定是髓内还是髓外, 一般位于胸段, 多在脊髓腹侧, 有时伴脊柱其它畸形等。本例患者病程两年, 且脊髓受压严重, 故功能恢复较困难。

关键词 颈椎管肠源性囊肿
中图法分类号 R682.1; R742.89

参考文献

1 岳盛淋, 方静宜, 罗 麟, 等. 中枢神经系统肠源性囊肿的形态及免疫组化研究. 中华神经外科杂志, 1998, 14(3): 164
2 Wilkins R H, Odom G L. Hanelbook of clinical neurdogy. In Vinken P J, Bryn G W eds. Spinal intradural cysts. New York: North Holland Rublishing Co., 1976. 55~ 102

(收稿: 1998-09-28;修回: 1999-03-22)
(编辑 冷怀明)

* 陈立朝, 男, 27岁, 住院医师, 学士

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