DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.025

减弱视神经电活动大鼠脑外侧膝状体区 iNOS表达的实验研究

邓晓林* 蔡文琴 (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:观测减弱视神经电活动后外侧膝状体核团诱生型一氧化氮合酶的表达,探讨其可能的意义。方法:采用眼球摘除、眼内注射河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)减弱视神经电活动,运用还原型辅酶二-硫辛酸脱氢酶(NADPH-diaphorase, NDP)组化染色及诱生型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)原位分子杂交方法观察外侧膝状体 iNOS表达。结果:两种方式减弱视神经电活动后,外侧膝状体核均出现不同程度的 iNOS表达。结论:减弱视神经电活动后,外侧膝状体区存在过度表达的 NO(Nitric oxide)可能参与了局部的病理改变。

关键词 外侧膝状体;诱生型一氧化氮合酶;大鼠
中图法分类号 R338.8

一氧化氮合酶包括固有型和诱生型,固有型存在于正常神经系统的神经细胞中,而诱生型为各种刺激因素诱导产生。它们均能催化 L-精氨酸产生 NO。NO 作为一种气体信使分子既可以参与神经细胞间的信息传递,也可以参与多种神经系统疾病和损伤的病理过程[1]。减弱视神经电活动后外侧膝状体出现一系列的病理改变,但对其机制尚不十分清楚[2]。有报道坐骨神经切断后,脊髓内诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达和 NO的产生与局部神经元的病变等相关[3]。因此,我们检测视神经电活动减弱后外侧膝状体核 iNOS的表达,探讨 NO在局部病变中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 分组

健康 Wistar大鼠 68只,雌雄各半,体重 200 g± 20 g,均采用 0.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。术后 6 h、24 h、1周、3周取材。分组为:① 眼球摘除组(32只):用眼科剪由一侧眼球与眼眶之间深入,剪断肌肉、筋膜及神经。② 河豚毒素(TTX)注射组(12只):用 5μl微量进样器吸取 2μl TTX,(浓度为 2.5 g/L 1%消毒美蓝配制)紧靠一侧眼球睫状体环后方进针约 2 mm,注射时间约 10 min,注射后留针 10 min(美蓝利于观察注射液是否反流),温生理盐水棉球清洗注射点。注射后瞳孔放大,光反射消失,表明注射显效[4]。③ 眼内生理盐水注射组(12只):同上法用 5μl微量进样器注射消毒生理盐水 2μl。④ 正常对照组(12只):仅行麻醉处理。

1.2 方法

1.2.1 取材 常规灌注后开颅取出大脑,冠状面等分为 3块,入 4%多聚甲醛后固定 8 h~ 12 h,20%蔗糖浸泡过夜,恒冷箱冰冻切片(30μm),切片分 2套分别行二磷酸核苷(NDP)组化染色[5]及 iNOS原位分子杂交[6]。

1.2.2 NDP组化染色 冰冻切片入 0.1 mol PB(pH8.0,含 0.3% TritonX-100)漂洗数次,转入孵育液孵育 30 min~ 60 min。孵育液:以 0.1 mol PB(pH8.0) - 0.3% TritonX-100配制,含硝基四氮唑蓝 1 mmol,NADPH 1.2 mmol/L。孵育后转入 0.01 mol/L PBS(pH7.4)终止反应,脱水,透明及封片。

1.2.3 iNOS原位分子杂交 探针制备:iNOS质粒全长 6006 bp,cDNA片段长 3934 bp,在独特区有两个 EcoRⅠ酶切位点,其间长度为 307 bp,质粒扩增后回收此片段作为原位杂交探针。原位杂交方法按文献[6]。

1.2.4 统计处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 NDP组化染色

2.1.1 正常对照组 在外侧膝状体区可见到数目较少、染色较深、中小胞体的阳性细胞,细胞突起较短甚至不明显,见图 1。

2.1.2 眼球摘除组 术后 6 h变化不明显,术后 24 h外侧膝状体可见到数量增加的阳性细胞和纤维,术后 1周和 3周这种变化更明显。阳性细胞仍为中小胞体的细胞,突起细而短,见图 2。

2.1.3 TTX注射组 注射后各时相点观察,NDP组化染色阳性细胞数目和纤维变化不明显。

2.1.4 生理盐水注射组 注射后各时相点观察,与对照组差异不明显。

各实验组不同时期点 NDP组化染色后外侧膝状体区阳性细胞数目,见附表。

* 邓晓林,男,33岁,讲师,博士

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

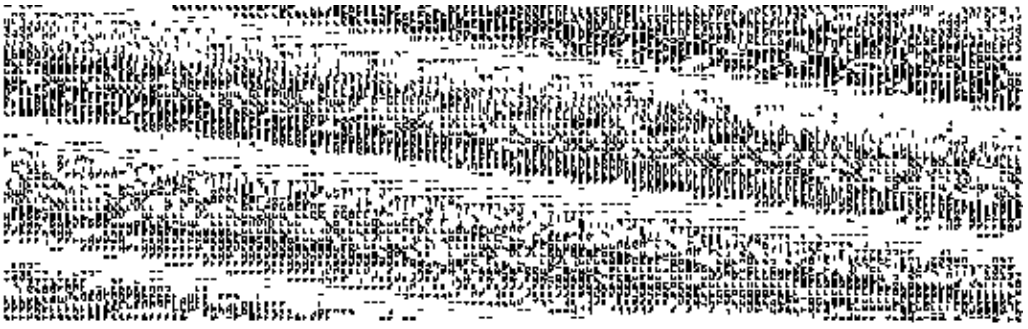


图 1　正常大鼠外侧膝状体区 NDP组化染色阳性胞体和纤维　(NDP×100)

Fig 1　Positive stained nervous bodies and fibers in lateral geneculate nucleus (LGN) of control rats　(NDP×100)

图 2　单侧眼球摘除后 24 h外侧膝状体区 NDP组化染色阳性胞体和纤维增加　(NDP×100)

Fig 2　Positive stained nervous bodies and fibers in lateral geneculate nucleus 24 h after enucleation　(NDP×100)

附表　各实验组不同时相点外侧膝状体区 NDP组化染色阳性细胞数($\bar{x}\pm s$)

Table　Numbers of positive cells of experimental groups in lateral geniculate nucleus with NDP histochemical staining at different time($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	6 h	24 h	1 week	3 week
Enucleation	32	15.7± 2.6	25.5± 5.3*	32.2± 6.8*△	33.1± 5.7*△
TTX injection	12	19.1± 7.4	15.9± 4.7#	18.3± 3.1#	16.0± 2.0#
Saline injection	12	16.6± 3.9	18.5± 3.7#	17.2± 1.1#	17.5± 3.0#
Control	12	17.4± 4.1	16.9± 1.7#	15.2± 2.3#	18.8± 3.1#

*: $P<0.01$ *vs* 6 h;△: $P<0.01$ *vs* 24 h;#: $P<0.01$ *vs* enucleation group

2.2　iNOS原位分子杂交

2.2.1　正常对照及生理盐水注射组　未显示阳性细胞.

2.2.2　TTX注射组　注射后 6 h和 24 h在外侧膝状体区见到稀疏分布中小胞体的阳性细胞,但注射后 1周和 3周染色为阴性,见图 3

2.2.3　眼球摘除组　术后 6 h起即在外侧膝状体区见到较多中小胞体的阳性神经细胞,核透亮,核周质着蓝色,突起短染色浅淡,分布较为集中,见图 4



图 3　TTX注射后 6h,iNOS原位分子杂交显示的外侧膝状体区出现的阳性细胞　(×100)

Fig 3　Section from 6th hour group after TTX injection, stained by iNOS cDNA probe hybridization *in situ*, showing positive nervous cells　(×100)

图 4　单侧眼球摘除后 24h,iNOS原位分子杂交显示的外侧膝状体区阳性细胞　(×400)

Fig 4　Section from 24th hour group after enucleation, stained by iNOS cDNA probe hybridization *in situ*, showing positive nervous cells　(×400)

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

3 讨论

3.1 正常大鼠外侧膝状体 NOS阳性神经元的形态及分布特点

已有的实验证明 NOS在脑组织就是依赖还原型辅酶II 的硫辛酸脱氢酶[1,7,8],因此用 NDP组化染色所显示的阳性细胞就是 NOS阳性神经细胞。

外侧膝状体是视神经传导的中继核团,是连接视网膜节细胞到视皮层的中转站。节细胞中大量的非肾上腺素非胆碱能纤维可以作用于外侧膝状体 NOS神经元上的 NMDA(N-methylhydroxylamine) 受体,活化 NOS产生 NO,NO 通过升高细胞内的 cGMP,从而活化细胞内依赖 cGMP的蛋白激酶而起作用[1,3,9]。

本实验观察到 NOS阳性神经元为中小体积、突起较短的神经元,集中于外侧膝状体。这种特征与在大脑皮层和海马的 NOS阳性神经元明显不同,在皮层和海马的 NOS阳性神经元呈散在分布,在一个高倍视野下很难同时见到两个 NOS阳性神经元,但这些部位的阳性神经元具有较长的细胞突起,并且其突起亦含丰富的 NOS[8]。由于 NO与其它的神经递质不同,不是通过末梢释放,而是通过胞外弥散作用于周围的神经元和胶质细胞,因此这些长突起有利于扩展细胞的作用范围。而我们在外侧膝状体区所观察到的 NOS阳性细胞突起较短集中存在,可能意味在外侧膝状体区的 NOS阳性神经元产生的 NO以局部调节为主。

3.2 减弱视神经电活动后 iNOS表达的机制及可能的意义

一氧化氮合酶包括固有型和诱生型,固有型存在于正常神经系统的神经细胞中,而诱生型为各种刺激因素诱导产生。它们均能催化 L-精氨酸产生 NO。NO 作为一种气体信使分子既可以参与神经细胞间的信息传递,也可以参与多种神经系统疾病和损伤的病理过程[1]。本实验观察到眼球摘除后外侧膝状体区 NDP组化染色阳性细胞增多,应用 iNOS cDNA探针原位杂交证明存在 iNOS mRNA表达。TTX注射后 NDP阳性细胞数目虽然并未明显增加,但原位杂交显示注射后6 h和 24 h出现 iNOS阳性细胞,1周后阳性细胞消失。这可能与原位杂交技术的敏感性高于组化染色的敏感性有关。提示当神经切断或神经细胞膜上钠通道被有效阻断动作电位消失后,能很快诱导 iNOS的表达,且具有可逆性,当诱因消失后,诱导的 iNOS也能随之消失(TTX的半衰期约为 7 h)。诱导 iNOS产生的机制目前尚不十分清楚,但有文献提示可能与局部产生的白细胞介素-1α 干扰素等活性因子有关[10]。减弱视神经电活动后外侧膝状体核团内 iNOS的表达,将导致局部 NO的增多。已有的实验证明过量的 NO通过弥散作用于邻近的神经细胞,抑制胞内的某些酶类,导致局部神经元的变性死亡[3]。Canady 也观察到眼球摘除后外侧膝状体核团内的神经元死亡[2]。虽然本实验结果尚不能提供直接的证据证明 NO与局部神经元变性有关,但提示了这种可能性的存在,尚需要更多的实验加以证实。

参考文献

1 贾铀生,鞠 躬.神经系统中的一氧化氮和一氧化氮合酶.神经解剖学杂志,1993;9(1):1

2 Canady K S, Olavarria J F, Rebul E W. Reduced retinalactivity increases GFAP immunoreactivity in rat lateralgeniculate nucleus. Brain Res, 1994;663:206

3 胡文辉,刘景生,任民峰.一氧化氮与神经损伤.生理科学进展,1994;25(4):300

4 Dubin M W, Stark L A, Archer S M. A role for action-potentialactivity in the development of neuronal connections in the kitten retinogeniculate pathway. J of Neurosci, 1986;64(4):1021

5 Wu W. Expression of nitric-oxide synthase(NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. Exp Neurol, 1993;120(1):153

6 蔡文琴,王伯 .实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1994:408~410

7 Minc Golomb D, Schwartz J P. Expression of both constitutive and inducible nitric oxide synthases in neuronal and astrocyte cultures. Ann N Y Acad Sci, 1994;17(738):462

8 Harald H, Schmidt H W, Gerard D. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-location with NADPH diaphorase but not with soluble G C, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. J Histochemistry and Cytochemistry, 1992;40(10):1439

9 Schousboe A, Westergaard N, Sonnewald U. Glutamate and glutamine metabolism and compartmentation in astrocyte. Dev Neurosci, 1993;15(3~5):359

10 Thomas W E. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. Brain Research Reviews, 1992;17(1):61

(收稿:1997-07-16;修回:1997-12-26)

(编辑 冷怀明)

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

Expression of inducible nitric oxide synthase in lateral geneculate nucleus after reduction of optic nervous electric activity in rats

Deng Xiaolin, Cai Wenqin (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in lateral geneculate nucleus (LGN) after reduction of optic nervous electric activity and its possible significance in rats. Methods: After the optic nervous electric activity was reduced with monocular enucleation and ocular injection of tetrodotoxin, the expression of iNOS in LGN was determined with NDP histochemistry and iNOS cDNA probe hybridization *in situ*. Results: Various degrees of iNOS expression was found in LGN after two optic electric activity-reducing methods. Conclusion: Nitric oxide appears in LGN might be related to the local pathological changes after the reduction of optic nervous electric activity.

Key words lateral geneculate nucleus; inducible nitric oxide synthase (iNOS); rat

慢性甲醇中毒的眼部改变

Eye damage of chronic methanol poisoning

袁容娣* 叶 剑 贺翔鸽 (第三军医大学附属大坪医院眼科) 重庆, 400042

1995年 10月, 垫江县某村村民因饮用被甲醇污染的井水造成 20名患者中毒, 其中 9例有眼部损害, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 对象

本组 9例, 男 4例, 女 5例, 年龄 11岁~ 62岁, 均为某村饮用同一井水的村民。

1.2 中毒原因

1995年 10月 3日某化工厂将生产硫酸二甲脂的废渣 10余吨倾倒在距水井 30 m的公路旁。10月 16日大雨将部分废渣冲失。10月 26日出现首例发病者。9例患者先后 1周发病。11月 13日井水水样分析示甲醇浓度为 1.45 mg/L, 即日起禁用该井水。

1.3 临床症状及治疗

9例患者中 4例出现乏力、恶心、口渴、头痛等全身症状, 其中 1例伴幻听、幻视等精神症状。9例患者均感视物模糊, 眼球疼痛, 畏光, 眼前雪花状闪光, 其中 3例患者有视物变形、变色。门诊给予皮质激素, 维生素, 能量合剂, 血管扩张剂, 高压氧等治疗。

1.4 方法

全身检查, 视力, 眼压, 裂隙灯及眼底检查, 视野及眼电生理检查, 检影验光, 荧光血管造影。

2 结果

9例患者矫正视力≤ 0.1者 4眼, 0.1~ 0.5者 11眼, 0.6~ 0.8者 3眼。9例患者视乳头不同程度发白, 视乳头凹陷不明显。Goldmann视野检查示中心暗点、旁中心暗点 8眼, 周边视野向心性缩小 8眼, 2眼同时有中心暗点和周边视野缩小。P-VEP检查示 15眼 P100波潜时延长、波幅降低, 3眼正常。9例患者眼压正常, 屈光间质无异常。荧光血管造影 10眼视乳头呈弱荧光, 网膜未见异常荧光。9例患者治疗 1月后视力无明显好转。

3 讨论

一般认为甲醇主要作用于神经系统、甲醇在体内各组织的含量与该组织的含水量成正比, 其在脑脊液、房水和玻璃体内的浓度较血液为高[1]。由于醇脱氢酶的作用, 甲醇转化为甲醛, 后者可抑制细胞的糖代谢, 使细胞发生退行性变化, 引起视网膜及视神经病变, 最后发生视神经萎缩[2]。

甲醇中毒临床上多见于误服以甲醇为饮料或甲醇生产的假酒所致, 或工作环境中甲醇蒸汽经呼吸道吸入, 皮肤接触吸收, 而由饮用被甲醇污染的井水引起的集体中毒报道较少。甲醇在体内代谢缓慢, 排泄也慢, 有明显蓄积作用[2]。因此, 饮用水中不容许有甲醇。本组患者有明确饮用被甲醇污染的井水病史, 饮用时间 20 d~ 30 d, 造成甲醇在体内蓄积而引起慢性中毒。本组患者饮用污染井水后 10 d~ 20 d发病, 以眼部病状为主。早期均表现为视力下降, 眼球疼痛、畏光, 眼前雪花状闪光, 少数病人有视物变形, 变色等症, 在当地医院误诊为视神经炎。由于未脱离污染源, 继续饮用甲醇污染的井水, 导致患者病情加重, 最终出现视神经萎缩, 使治疗无效。20例中毒患者中仅 9例有眼部损害, 可能与甲醇中毒剂量的个体差异有关。

关键词 眼损伤; 甲醇中毒
中图法分类号 R779.13

参考文献

1 青岛医这院. 急性中毒. 北京: 人民卫生出版社, 1976 237~238
2 吴执中. 职业病. 北京: 人民卫生出版社, 1984 405~407

(收稿: 1997-10-12; 修回: 1998-02-20)
(编辑 张大春)

* 袁容娣, 女, 29岁, 住院医师, 学士

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