DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.009

一氧化氮在大鼠海马脑片长时程增强效应中的作用*

胡志安 罗东明 刘祚周 (第三军医大学基础部生理学教研室) 重庆,630038

提 要 在大鼠海马脑片上,观察了一氧化氮(NO)对不同的条件刺激(CS)诱出的海马 Schaffer 侧支-CA1 区锥体细胞通路上的长时程突触传递长时程增强(LTP)效应的影响。两种条件刺激方式(A 方式:二轮 100 Hz、100 个脉冲、最大刺激强度、两轮间隔 60 s;B 方式:一轮 100 Hz、100 个脉冲,60%的最大刺激强度)诱出的 LTP 无显著差别;一氧化氮合成酶抑制剂 NG-硝基-精氨酸(L-No-Arg 100 μmol/L)显著地抑制两种方式的条件刺激诱出 LTP,该抑制作用能被 NO 的前体 L-精氨酸翻转;通过耗竭胞外的 NO,血红蛋白使 LTP 发生受到阻滞;NO 产生剂硝普钠灌流后,在测试刺激条件下,突触传递出现压抑。上述结果表明:内源性 NO 为海马 LTP 所必需。

关键词 一氧化氮;血红蛋白;长时程增强;记忆;海马

中图法分类号 R338.64

目前,关于大脑学习记忆神经机理的最富有吸引力的模式是突触传递长时程增强效应(Long-term potentiation LTP)[1]。大量的证据表明,突触后的 NMDA 受体及 Ca^{2+} 内流对于 LTP 的产生具有关键作用[2,3],而 LTP 的维持却是突触前递质释放增加的直接结果[4],LTP 产生后,突触后神经元是否逆行性地影响突触前的递质释放? Bliss 等(1986 年)提出海马 LTP 中存在的逆行信使(retrograde messanger)可能起到这种逆向调控作用。在中枢神经系统中,内源性的一氧化氮(nitric oxide NO)是由一氧化氮合成酶(NO synthase NOS)催化底物 L-精氨酸(L-Arginine L-Arg)生成瓜氨酸后释放的。NO 也可直接来自 NO 的产生剂(NO donor),硝普钠(SNP)即是其中之一。1991 年,两家实验室首次观察到 NO 参与海马 CA1 区 LTP 的过程,但随后的文献报告了不同的结果[5,6],对此,有作者提出,存在 NOS 抑制剂敏感型 LTP 和 NOS 抑制剂不敏感型 LTP[7]。本实验拟使用 NOS 的抑制剂,NO 的耗竭剂等进一步观察 NO 在 LTP 中的作用,以探讨 NO 在 LTP 中的信使功能。

1 材料与方法

1.1 脑片准备、刺激和记录

实验共用 Wistar 大鼠 72 只,体重 130~170 g,雌雄不拘。大鼠断头后,取出一侧海马,左右不限,顺海马槽纤维的走向连续切片,片厚 400~450 μm,迅速将其移至准备好的浴槽尼龙网上,随之保证持续的恒温(到达脑片的人工脑脊液的温度为 32±0.5℃)人工脑脊液(ACSF)灌流,ACSF 成分为(mmol/L):NaCl 124、KCl 5、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.25、$NaHCO_3$ 24、$CaCl_2$ 2、GS·H_2O 10。ACSF 的 pH 值用 NaH_2PO_4 调定为 7.4~7.6。95%O_2 与 5%CO_2 的混合气体通过外室热水加热、湿化再弥散于脑片的表面,供氧量为 0.1 L/min。

脑片在孵育 60~90 min 后,开始进行刺激和记录。刺激电极为直径 0.05 mm 的双根铂丝电极,记录电极采用玻璃微电极,尖端直径 1 μm,内冲灌 3 mol/L 的 KCl 溶液,阻抗为 3~8 MΩ。在解剖显微镜直视下,将刺激电极置于来自 CA3 区锥体细胞的 Schaffer 侧枝上,记录电极置于 CA1 区的放射层(胞外记录),故本实验所记录的电活动是 Schaffer 侧枝-CA1 区锥体细胞的场兴奋性突触后电位(fFPSP)。记录时,先行测试刺激(test stimulation),刺激参数为:单个脉冲、波宽 0.2 ms,强度为引出最大 fEPSP 斜率的 60%左右时的刺激强度(出现最大 fEPSP 斜率时的刺激强度简称为最大刺激强度),待 fEPSP 稳定 15 min 后,再行条件刺激(conditioning stimulation CS)。CS 采用 A 方式(pattern A)和 B 方式(pattern B),A 方式为:两轮 100 Hz、100 个脉冲,强度为最大刺激强度,两轮间隔 60 s;B 方式:一轮 100 Hz、100 个脉冲,60%最大刺激强度,两种 CS 使用的波宽同测试刺激。条件刺激后每 10 min 观察一次,至少观测 1 h。条件刺激后 fEPSP 的斜率增加 20%,持续 1 h 以上,判定为突触传递长时程增强效应(LTP)发生[8]。

* 全军"八五"攻关项目

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

1.2　数据采集与统计处理

fEPSP 波形信号经微电极放大器、示波器，再同步输入到计算机，并进行 fEPSP 斜率的测量（有多个波时，以第一个波为准）。全部过程采用本校野战外科研究所提供的 SEP 软件控制。条件刺激前的斜率一律记为 100，条件刺激后的斜率用相对斜率表示。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，fEPSP 的斜率变化用 t 检验；LTP 的发生率的差别用 χ^2 检验。

1.3　主要试剂

一氧化氮合成酶的抑制剂 NG－硝基精氨酸（L－No－Arg 100 μmol/L）和一氧化氮的产生剂硝普钠（SNP 1 mmol/L）购自美国 Sigma 公司；一氧化氮的前体 L－精氨酸（L－Arg）（日本味之素公司生产）；一氧化氮的耗竭剂血红蛋白（hemoglobin Hb）购自北京华美生物工程公司，以上试剂都用 ACSF 配制。

2　结果

2.1　L－No－Arg 及 L－Arg 对海马 LTP 的影响

2.1.1　L－No－Arg 及 L－Arg 对 A 方式条件刺激诱出的 LTP 的影响　　正常 ACSF 灌流的情况下，14 例脑片接受 A 方式 CS，14 例脑片中有 11 例 fEPSP 的斜率的增加超过 20%（最高达到 199%），持续 1 h 以上且 60 min 内各时间点（每 10min）fEPSP 的斜率无显著的差别（$P > 0.05$），LTP 的发生率为 78.6%（11/14）。未产生的 3 例中有 1 例在 CS 后 10 min 斜率增加超过 20%，但随后明显衰减。

用含 L－No－Arg（100 μmol/L）的 ACSF 灌流脑片，1 h 后开始记录，测试刺激情况能正常引出 fEPSP，随后施以 A 方式 CS，16 例脑片中，只有 4 例 fEPSP 的斜率增加超过 20%，维持时间超过 1 h 以上，LTP 的发生率为 25%（4/16）如前述，正常 ACSF 灌流的情况下，LTP 的发生率为 78.6%（11/14），二者有显著性差别（$P < 0.05$），由此说明：L－No－Arg 明显地抑制 A 方式 CS 在 CA1 区所诱发的 LTP。

在另外一组脑片上，实验进一步地用过量 L－Arg（1 mmol/L）加入到含 L－No－Arg（100 μmol/L）的 ACSF 中，在施以 A 方式 CS 后，9 例脑片中 7 例有 LTP 产生，LTP 的发生率为 77.8%（7/9），与正常 ACSF 灌流 A 方式 CS 后 LTP 的发生率 78.6%相比，无显著性的差别（$P > 0.05$），可见，L－Arg 翻转了 L－No－Arg 对 LTP 的抑制作用（见图 1）。

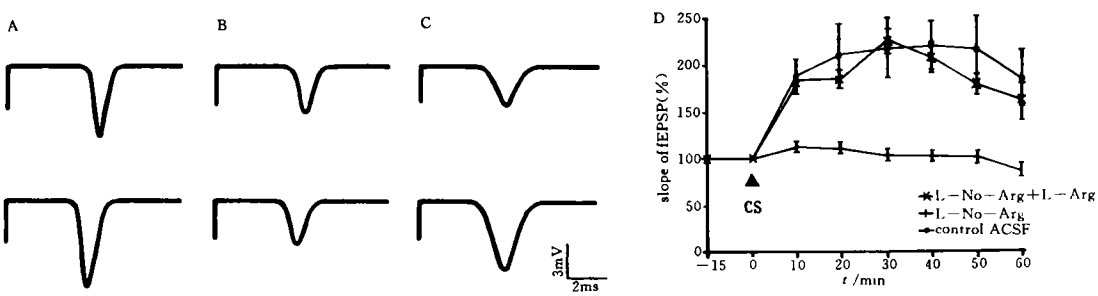


图 1　L－No－Arg 及 L－Arg 对 A 方式 CS 后海马 CA1 区 fEPSP 的影响

Fig 1　Influences of L－No－Arg and L－ Arg on the slope of fEPSP in hippocampal area CA1 when CS(pattern A) was used

A: Control ACSF; B: L－No－Arg; C: L－No－Arg+L－Arg; D: Effects of L－No－Arg and L－Arg on the slope of fEPSP

2.1.2　L－No－Arg 及 L－Arg 对 B 方式条件刺激诱出的 LTP 的影响　　在正常 ACSF 灌流时使用 B 方式 CS 后，12 例脑片中有 10 例 fEPSP 的斜率增加超过 20%，时间持续 1 h 以上，60 min 内斜率无显著的差异，2 例脑片斜率无增加，B 方式 CS 的 LTP 发生率为 83.3%（10/12），经 χ^2 检验，A、B 两种 CS 方式的 LTP 发生率无显著的差异（$P > 0.05$），不仅如此，两种 CS 方式都能产生稳定的 LTP。

同样地，脑片用含 L－No－Arg（100 μmol/L）的 ACSF 灌流，1 h 后开始记录。结果发现：接受 B 方式 CS 的 11 例脑片中，仅 3 例产生了 LTP，8 例 fEPSP 的斜率的增加未超过 20%。该条件下 LTP 的发生率为 27.8%（3/11），显著地低于正常 ACSF 灌流的情况下 LTP 的发生率（$P < 0.05$）。说明，L－No－Arg 对 LTP 的抑制作用在 A 方式，B 方式两种条件刺激的情况下都能出现。

在 7 例用 L－No－Arg（100 μmol/L）和 L－Arg（1 mmol/L）的 ACSF 灌流的脑片中，B 方式条件刺激后，有 6 例 fEPSP 的斜率的增加超过 20%，持续 1 h 以上，另 1 例 fEPSP 斜率增加只维持了 20 min，便迅速衰减。该条件下 LTP 的发生率为 85.7%（6/7），与正常 ACSF 灌流的情况下的 LTP 的发生率无显著的差别（$P > 0.05$）。说明，L－Arg 亦能翻转 B 方式条件刺激后 L－No－Arg 对 LTP 的抑制作用（见图 2）。

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

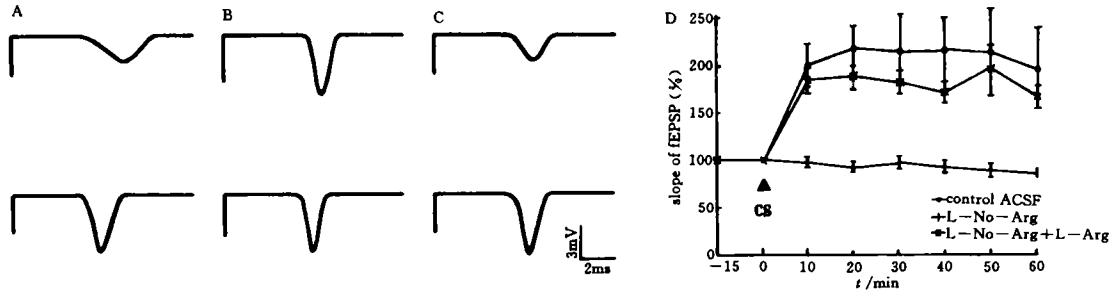


图 2 L－No－Arg 及 L－Arg 对 B 方式 CS 后海马 CA1 区 fEPSP 的影响

Fig 2 Influences of L－No－Arg and L－Arg on the slope of fEPSP in hippocampal area CA1 when CS (pattern B) was used

A: Control ACSF; B: L－No－Arg; C: L－No－Arg+L－Arg; D: Effects of L－No－Arg and L－Arg on the slope of fEPSP

2.2 Hb 对 LTP 的影响

血红蛋白用 ACSF 配制，浓度为 100 μmol/L。在脑片移入浴槽之初即用含 Hb(100 μmol/L)的 ACSF 进行灌流，并一直灌流至记录完毕。在测试刺激的情况下，都能顺利地记录出 fEPSP，表明 Hb 的存在，并不影响基本的突触传递(5～6 h)。接受 A 方式条件刺激后，10 例脑片中 fEPSP 的斜率增加均未超过 20%，其中，有 8 例脑片其 fEPSP 无衰减，维持 1 h 以上，2 例在条件刺激后 40 min，衰减至很小。本实验的条件刺激后的 LTP 的发生率为 0。说明 Hb 具有非常明显的抑制 LTP 的作用($P<0.01$)(见图 3)。

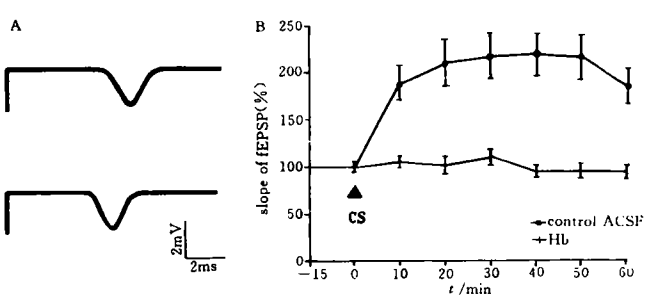


图 3 Hb 对 CS(A 方式)后海马 CA1 区 fEPSP 的影响

Fig 3 Influences of Hb on the slope of fEPSP in hippocampal area CA1 when CS(pattern A) was used

A: Control ACSF; B: Hb

2.3 硝普钠(SNP)对测试刺激下突触传递的影响

SNP 用 ACSF 配制成浓度 1 mmo/L。本实验情况下，脑片先用正常 ACSF 灌流 1 h 以上，然后记录 fEPSP，待其稳定后，改灌含 SNP(1 mmo/L)的 ACSF 15 min(避光操作)，然后恢复灌流正常 ACSF。实验发现：停止灌含 SNP(1 mmol/L)的 ACSF 后 5 min，在测试刺激的情况下，6 例脑片的 fEPSP 中有 4 例完全消失，2 例先见明显减小，5 min 后消失(图 4 为 SNP 影响 fEPSP 之一例)。另外，在对 1 例脑片用 SNP 后提前的观察发现：SNP 开始接触脑片 3 min 后，fEPSP 的斜率即出现明显的下降，最后 fEPSP 完全消失。这些结果表明：SNP 能显著地抑制测试刺激情况下的突触传递，至少持续 1 h。实验中未见 fEPSP 的斜率增加。

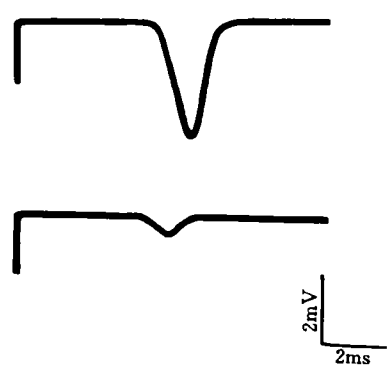


图 4 SNP 对海马 CA1 区 fEPSP 的影响

Fig 4 Influences of SNP on fEPSP in hippocampal area CA1

3 讨论

现在，已明确 LTP 产生与维持，既涉及突触后机理，又涉及突触前机理，因此，发现一种(或几种)起到使二者联系的信使物质成为最终明确解释 LTP 神经机理的关键。

作者观察到，用 NOS 抑制剂 L－No－Arg 灌流脑片时，A 方式、B 方式两种条件刺激在 CA1 区诱出 LTP 皆明显受阻，NO 的前体 L－Arg 能逆转这种阻滞作用。Bohme 报道[9]NO 参与了最大强度的条件刺

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

激所诱出的LTP的过程。Mizutani则报道[8]在体实验中，NOS的抑制剂阻滞了较低频率(30 Hz)、较低强度的条件刺激在齿状回所诱出的LTP。说明NO参与了LTP的过程，并且其作用不受条件刺激参数差异的影响。因而可认为，NO随条件刺激的施加而产生，在LTP中发挥不可缺少的作用。

文献[5]指出，NO的产生是在突触后膜。那么NO的作用靶又是什么呢？Hb与NO亲合性很高，因此Hb是NO的重要耗竭剂。本实验结果显示Hb非常显著地抑制了海马LTP，这与早期报道结果一致[6]。由于Hb是大分子，只能在胞外发生作用，这提示产生于突触后神经元的NO可能先弥散到胞外，随后作用于突触前膜。

实验中发现，SNP作用组织3 min即明显减小fFPSP，且持续时间较长。如果在此期间，使用较高的刺激强度与频率，可增大fEPSP。另外，若在灌流SNP的过程中，某一具体的通路上不施加测试刺激，那么，其在恢复正常ACSF灌流后70～80 min以上时，仍能正常引出fEPSP(另文报道)。这表明外源性使用SNP对突触传递产生了可逆性的抑制，其抑制机理不明。Izumi报道[10]如果NMDA受体激活先于施加条件刺激，LTP的诱出则被阻滞，原因是伴随NMDA受体的激活而产生的NO反馈抑制了NMDA受体的功能。在视网膜上已发现SNP通过释放NO，抑制NMDA受体功能、阻滞Ca^{2+}内流[11]。因此，可推测本实验中SNP的抑制作用可能为NO产生的反馈作用所致，但明确的结论尚需进一步的实验。

本实验结果支持内源性NO在海马CA1区的LTP中扮演了必不可少的逆行性信使角色。但是，NO在突触传递中的作用可能是双重的，内源性NO起到加强突触传递的作用；一定的条件下(如测试刺激下外源性使用)，NO可能又起到反馈抑制作用。

参考文献

1 Xie CW, Lewis DV. Endogenous opioids regulate long-term potentiation of synaptic inhibition in the dentate gyrus of rat hippocampus. The Journal of Neuro-science, 1995; 15:3788

2 Collingridge GL, Singer W. Excitatory amino acid receptor and synaptic plasticity. Trends Pharmacol Sci, 1990; 11:290

3 Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ et al. The impact of postsynatpic calcium on synaptic transmission. Trends Neurosci, 1989; 12:444

4 Malinow R, Tsion RW. Presynaptic enhancement shown by whole－cell recordings of long－term potentiation in hippocampal slices. Nature, 1990; 346:11

5 Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long－term potentiation. Science, 1991; 254:1503

6 Errington ML, Li YG, Matthies H et al. The nitric oxide synthase inhibitor N$^{\omega}$－nitro－L－arginine reduces the magnitude of long－term potentiation in the dentate gyrus but not in area CA1 of the hippocampus in vitro. Soc Neurosci Abstr, 1991; 17:251

7 Gribkoff VK, Lum－Ragan JT. Evidence for nitric oxide synthase inhibitor－sensitive and insenstive hippocampal synaptic potentiation. J of Neurophysiology, 1992; 68:639

8 Mizutani A, Satio H, Abe K. Involvement of nitric oxide in long－term potentiation in the dentate gyrus in vivo. Brain Res, 1993; 605:309

9 Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM et al. Possible involvement of nitric oxide in long－term potentiation. European Journal of Pharmacology, 1991; 199:379

10 Izumi Y, Clifford DB, Zorumski CF. Inhibition of long－term potentiation by NMDA－mediated nitric oxide release. Science, 1992; 257:1273

11 Ujihara H, Akaike A, Tamura Y et al. Blockade of retinal NMDA recepteors by sidium nitroprusside is probably due to nitric oxide formation. J Pharmacol, 1993; 61:375

(收稿：1994-09-06；修回：1995-06-08)

Study of NO effects on long-term potentiation in hippocampal slices in rats

Hu Zhi'an, Luo Dongming, Liu Zuozhou (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chonqing, 630038)

Abstract The effects of nitric oxide (NO) on the long-term potentiation (LTP) of CA1 area evoked with 2 differently conditioning stimulations (CS) were investigated on the hippocampal slices of rats. Pattern A CS was composed of 2 times of 100 Hz 100 pulses were given with a minute interval at maximal intensity

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

and pattern B CS was composed of one time of 100 Hz 100 pulses at 60% of maximal intensity. LTP evoked with 2 patterns of CS showed no significant difference. Administration of L－No－Arg (100 nmol/L), a NO synthase inhibitor, blocked the production of LTP when pattern A or pattern B CS was used. This blockage was abolished by L－arginine (1 mmol/L), a NO precursor, or hemoglobin (100 nmol/L), a NO scanvenger. Meanwhile, the LTP evoked was remarkably attenuated. After exposure of the hippocamplal slices to nitroprusside (1 mmol/L), field EPSP was suppressed. These findings suggest that NO is responsible for the production of LTP and acts as an important messenger. However, exogenous NO can suppress the efficiency of snaptic transmission in certain conditions.

Key words nitric oxide; hemoglobin; long-term potentiation; hippocampus

****

一氧化氮及其合成酶与急性肺损伤关系的基础研究

Study on the effect of nitric oxide and nitric oxide synthases in acute lung injury

孙广运 毛宝龄 王舟琪 （第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所）重庆，630037

一氧化氮（NO）及其合成酶（NOS）可能与急性肺损伤（ALI）有密切关系。实验结果显示：①大鼠油酸和内毒素（LPS）型ALI时，肺组织内皮型NOS（ecNOS）mRNA表达水平降低。LPS 5 h比对照组减少18.21%，油酸5 h比对照组增加4.15%，油酸12 h，1 d，3 d和5 d组，分别比对照组降低3.37%，4.45%，34.43%和42.79%。结果提示，ecNOS有下调趋势，其后果是血管张力增加，对白细胞粘附的抑制作用减弱，从而加重ALI。②油酸和LPS使肺组织诱导型NOS（iNOS）mRNA升高。LPS 5 h比对照组增加59.46%，油酸5 h，12 h，1 d，3 d和5 d时分别比对照组增加28.09%，52.79%，42.83%，60.96%和51.90%。结果提示，ALI导致iNOS活性增强，其后果是大量NO生成，组织细胞起损伤作用。③用原位杂交技术，显示肺组织iNOS mRNA阳性细胞位于肺泡壁，肺泡腔，细支气管壁，小血管壁及软骨组织。根据其分布部位和形态特点，推测这些细胞为肺泡上皮细胞，肺间质内吞噬或巨噬细胞，血管平滑肌细胞，纤维母细胞等，并明确显示细支气管上皮和软骨细胞为阳性。这与体外培养细胞所得结论一致，但未观察到正常或ALI时内皮细胞着色。ALI时阳性细胞多于正常肺组织，而血管内皮阴性，均提示有加重肺损伤作用。④还原型辅酶Ⅰ黄递酶（NADPHd）作为NOS的组化标志，规则地显色于细支气管上皮，ALI时着色加深，LPS较油酸相同时间组着色更深，提示ALI对上皮NADPHd有诱导作用，可能加重上皮损伤。比较NADPHd组化与iNOS原位杂交的分布特点，表明NADPHd不能反映iNOS。⑤左旋硝基精氨酸（NA）是NOS阻滞剂，能显著降低正常和ALI大鼠血浆NO浓度。双香豆素通过抑制四氢生物蝶呤（BH4）合成而选择性抑制iNOS活性，曾在培养内皮细胞证实。本实验表明，双香豆素对整体水平NO生成有抑制作用且弱于NA，提示双香豆素对整体动物iNOS有选择性抑制，应能改善ALI。但NA可降低ALI时血浆丙二醛（MDA）浓度，而双香豆素使MDA进一步升高，与iNOS选择性抑制的改善ALI效应相矛盾。根据文献资料和本实验结果分析，提示活体内iNOS本身可能有氧自由基生成作用，双香豆素通过减少BH4合成而使iNOS由NO生成转向氧自由基生成，从而加重肺损伤。⑥NA使正常大鼠肺组织髓过氧化物酶（MPO）活性增加，而对ALI时MPO无影响，提示NOS阻滞剂对不同病理生理状态有不同影响。双香豆素使ALI时MPO活性进一步升高，而其本身不抑制ecNOS，提示双香豆素导致的氧自由基生成增加，是中性粒细胞粘附扣押的原因。⑦正常和ALI大鼠持续吸入NO $90\cdot\varphi\times10^{-6}$ 5 h，血浆MDA，肺组织MPO和肺水含量与相应对照组均无显著差别，提示吸入治疗浓度的NO不引起氧自由基增加，也不加重ALI。⑧吸入NO对正常和ALI大鼠平均肺动脉压无显著影响，吸入NO $36\cdot\varphi\times10^{-6}$可抑制缺氧性肺血管收缩效应的87%。

关键词 一氧化氮；肺损伤；呼吸窘迫综合征，成人；氧自由基；中性粒细胞

中图法分类号 R563.8

（收稿：1995-07-17；修回：1995-07-22）

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