DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.06.012

在低氧条件下大鼠颈动脉体中多巴胺、单胺氧化酶和乙酰胆碱酶的改变

周 勉 蔡文琴 雷安富（组胚教研室）

提 要 本文对模拟高原5000m低氧条件下大鼠颈动脉体中多巴胺、单胺氧化酶和乙酰胆碱酯酶的含量和活性进行了组织化学观察和显微分光光度计定量测定。结果表明，低氧处理24h，颈动脉体中多巴胺含量增加了约70%；低氧48h，约增加50%。在低氧条件下，单胺氧化酶活性改变基本与多巴胺含量变化平行。乙酰胆碱酯酶在低氧时活性下降。

关键词 低氧症；多巴胺；单胺氧化酶类；乙酰胆碱酯酶类；颈动脉体

颈动脉体含有感受血液中氧分压，二氧化碳分压和pH改变的化学感受器。其内的多巴胺和乙酰胆碱等是与化学感受活动有关的递质，对它们在低氧时的变化已作过大量观测。但文献报道多为单纯定性或定量研究[1][2]，不能反映全貌。为此，本文采用组化手段，结合较精密的MPV-3型显微分光光度计测量，对正常和模拟高原低氧条件下大鼠颈动脉体中多巴胺的分布及含量进行观察和测定，并测量了多巴胺和乙酰胆碱生理分解相应的酶—单胺氧化酶和乙酰胆碱酯酶的活性，分析低氧时它们的改变与多巴胺和乙酰胆碱的联系。

材料与方法

健康雄性纯系Wistar大鼠，体重200g左右共36只。分正常组、低氧24h组和低氧48h组。每组12只动物。1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后取单侧颈动脉体，用于组化指标的显示及测定。

本实验采用我校高原研究室建立的动物急性低氧实验模型和该室协助制作的模拟高原简易低氧装置。装置内气压保持在相当于海拔5000m高度〔53.8kPa(405mmHg)〕[3]。减压时饲料、饮水无限制。每组动物取材时间均为上午9时至10时。

一、组化显示方法

多巴胺（DA）用乙醛酸诱发荧光法显示[4]。冰冻切片厚15μm。荧光显微镜观察的激发波长为410nm，发射波长480nm。

单胺氧化酶（MAO）采用四唑盐法显示[5]。冰冻切片厚8μm。孵育120min。

乙酰胆碱酯酶（AchE）采用硫赶酯酸法显示[6]。冰冻切片厚8μm。孵育90min。

二、显微分光光度计测量

DA的测量选用点测量法。氙灯照明，光电倍增管电压500V；滤光片波长460nm；光点直径2.4mm；荧光显微镜倍数10×25×2倍。每只动物切25张片。在每个实验组300张切片中，选用100张进行DA荧光测量。每张片测6个点，每个实验组共测量600个点。测得数据为相对荧光强度。

MAO和AchE的测量选用镜扫描法。使用的光电倍增管电压为950V；照明电流7A；测量光栅0.05mm；最大吸收波长MAO为444nm，AchE为519nm；扫描区域为边长15μm的矩形；显微镜倍数10×25倍。输出结果选用总吸光率、阳性结构面积和平均吸光率这3个指标。动物切片数同前，每个实验组这两个指标各选100张片，每片测5个区域，1个实验组测500个扫描区。

结果

一、多巴胺

荧光显微镜下，儿茶酚胺显示出绿色荧光。大鼠颈动脉体显示荧光的主要为DA[7]。荧光分布于圆形或椭圆形细胞和串球状神经终末支中。镜下比较正常组与低氧组，可见低氧组荧光明显增强，且显示荧光的神经终末成分似有增加。用显微分光光度计测量各点的相对荧光强度，结果如下：

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

表1 DA荧光强度的显微分光光度计测量

	正常组	低氧24h组	低氧48h组
荧光强度	27.88±9.6	88.75±31.4	54.30±24.2

由表1可见，正常组荧光强度最小，低氧24h组荧光强度增到最大，低氧48h组数值有所下降，但仍高于正常组。用Welch t检验对各组数据统计分析表明，正常组与低氧24h组和48h组间荧光强度呈非常显著的差异（$P<0.001$）。低氧24h组与48h组间荧光强度也具显著性差异（$P<0.05$）。

二、单胺氧化酶与乙酰胆碱酯酶

颈动脉体MAO阳性产物呈蓝紫色，弥漫分布，AchE阳性产物为棕黄色针形颗粒，分布于细胞及周围组织中。镜下比较正常组与低氧组两种酶均难以分辨出明显差异。使用显微分光光度计镜扫描方法测量上述2种酶的结果如下：

表2 MAO的显微分光光度计测量

	正常组	低氧24h组	低氧48h组
总吸光率	99.83±70.41	201.46±23.32	92.41±61.31
面积(μm^2)	343.76±200.71	705.20±27.51	417.11±197.55
平均吸光率	0.215±0.047	0.286±0.025	0.216±0.045

表3 AchE的显微分光光度计测量

	正常组	低氧24h组	低氧48h组
总吸光率	189.78±31.54	159.20±18.19	153.14±16.02
面积(μm^2)	620.54±44.56	586.40±43.09	576.16±37.74
平均吸光率	0.302±0.031	0.267±0.015	0.267±0.016

由表2可见，MAO总吸光率、阳性结构面积和平均吸光率3个指标在低氧24h时数值最大，Welch-t检验表明，正常和低氧48h 2个组均与低氧24h组间有非常显著的差异（$P<0.001$）。正常组与低氧48h组数值接近，2组无显著性差异（$P>0.05$）。

表3中，上述3个指标正常组均大于低氧组，Welch-t检验正常组与2个低氧组间均具非常显著性差异（$P<0.001$）。低氧组之间差异不显著（$P>0.05$）。

对上述2种酶的总吸光率与阳性结构面积，总吸光率与平均吸光率的关系进行曲线拟合和回归分析。结果为各组均呈幂函数关系（$Y=AX^B$）。

讨 论

一、显微分光光度计测量

用显微分光光度计测量组织切片中某种特定物质的相对含量是组织化学定量分析的重要研究手段之一。本文的观察与测量结果表明，组织切片中难以分辨的酶活性改变可由显微分光光度计测出。因此组织化学中使用显微分光光度计可提高观测结果的精确性。本文应用该仪器测定了正常组与低氧组MAO和AchE 2种酶的活性及切片中DA的相对荧光强度。测量结果表明低氧处理颈动脉体中MAO、AchE和DA都有显著改变（图1）。因此，我们支持多数学者的观点[7]，颈动脉体中DA和Ach可能参与了化学感受反应。

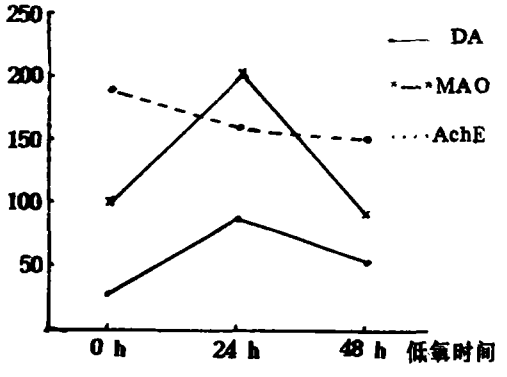


图1 大鼠颈动脉体低氧时DA、MAO和AchE含量的改变

纵座标：光密度或荧光强度

二、大鼠颈动脉体中DA和MAO的改变

DA是颈动脉体中含量最高的儿茶酚胺[7]，能抑制人和多种动物颈动脉体化学感受活动，对化学感受性起调节作用[8]。Hervonen等一些学者观察到，严重低氧时（氧含量<10%），大鼠颈动脉体球细胞荧光强度减弱，DA减少[1][2]。Hanbauer等[9][10]的慢性低氧实验却显示出不同的结

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

论。低氧处理（氧含量10%）2天后，大鼠颈动脉体中DA的的含量增加了52%，此含量可持续到低氧1周。低氧处理第2周，DA可增加180%。上述结果可用图2表示。由此可见，低氧实验中，颈动脉体DA的含量改变与低氧处理时间和缺氧的严重程度等因素有关。本文在模拟5000m高原条件下试验（氧含量约13%），选用24h和48h作时相点。显微分光光度计的测量结果表明，低氧24h后大鼠颈动脉体中DA含量约增加70%；48h后约增加50%。48hDA增加的百分值与Hanbauer的报告基本一致，但低氧24h颈动脉体中DA含量的剧增现象尚未见文献报道。Fidone[11]曾研究了低氧刺激下兔颈动脉体中DA含量的变化指出，氧含量为10%的低氧处理3h后，兔颈动脉体中DA含量增加了72%，增加百分值与本文24h时相点的结果相近。我们同时观察图示的Hanbauer的测量结果（图2），由此推测(1)模拟高原5000m低氧处理24h，大鼠颈动脉体中DA含量出现1次增值，且可能在24h之前就发生。(2)低氧实验中，颈动脉体中DA含量的改变可能不按直线持续上升，而是以阶梯式增加。

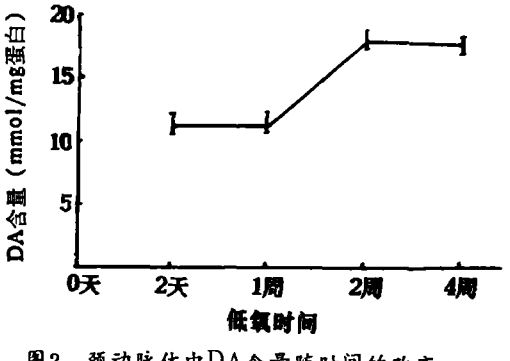


图2 颈动脉体中DA含量随时间的改变

MAO是与细胞内DA分解有关的酶，大部分定位于线粒体外膜上。显微分光光度计测量结果显示MAO活性在低氧时的改变与DA含量变化相似（图1）。因此，我们认为颈动脉体中MAO的活性与DA含量大体是平行的。

三、AchE活性的改变

AchE是Ach生理分解的主要酶。显微分光光度计测量结果表明，低氧时颈动脉体中AchE活性下降，与正常对照组具非常显著的差异。虽AchE的存在并不能绝对准确地代表胆碱能神经的分布，但目前还没有直接显示Ach的组化方法，AchE组化显示仍作为判断胆碱能神经细胞的一个重要指标[12]。在中枢神经系统Ach的分布与AchE活性是平行的[12]。低氧刺激时，颈动脉体中Ach作为兴奋性递质释放增加[8]，但本实验并未显现AchE活性平行增强。这种改变不同于中枢神经系统。颈动脉体中AchE与Ach释放之间的联系尚难推测，但根据AchE抑制实验结果，使用AchE抑制剂能增强和延长颈动脉体神经的放电[12]，提示了低氧时颈动脉体中AchE活性下降有可能与增加兴奋性有关。

参考文献

1. Hervonen A. et al. Effects of hypoxia and glucocorticoids on the histochemically demonstrable catecholamines of the newborn rat carotid body. Acta physiol Scand 1972:86:109
2. Hellstrom S. et al. Selective decrease in dopamine content in rat carotid body during exposure to hypoxic conditions. Brain Res 1976:118:352
3. 张彦搏。高原疾病。青海人民出版社 1982:55
4. 陈啸梅，等。组织化学手册。北京：人民卫生出版社，1982:281
5. 陈啸梅，等。组织化学手册。北京：人民卫生出版社 1982:193
6. 严其华，译。切片材料的染色方法。北京：人民卫生出版社 1981:247
7. Fidone SJ. et al. Putative neurotransmitters in the carotid body: the case for dopamine. Fed proc 1980:39:2638~2640

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

8. 杨恬，等。颈动脉体研究进展。国外医学资料 1986;2(3):4～5
9. Hanbauer I, et al. Effects of hypoxia lasting up to one month on the catecholamine content in rat carotid body. Neuroscience 1981:6:91
10. Dhillon DP, et al. The enlarged carotid body of the chronically hypoxic and chronically hypoxic and hypercapnic rat: a morphometric analysis. QJ Exp Physiol 1984:69:301
11. Fidone S, et al. Effects of hypoxia on catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro. J Physiol 1982:333:81
12. 艾民康，等。神经介质及有关酶类的组织化学。北京：人民卫生出版社 1987:107～108
13. 陈国治，等译。神经递质生理生化。上海：上海科学技术出版社 1984:55

(收稿：1989.2.25，修回：1989.9.11)

Dopamine Monoamine Oxidase and Acetylcholinesterase Changes in the Rat Carotid Body under Hypoxia

Zhou Mian, et al. (Departmentt of Histology and Embryology, Third Military Medical College)

By using the histochemical method and microspectrophotometer,the changes of dopamine(DA),monoamine oxidase(MAO)and acetylcholinesterase (AchE) in rat carotid body under hypoxia are studied. The results show that exposure to hypoxia (equivalent to an altitude of 5000 m)elicits an increase of DA content in the carotid body, 70% increase of DA after 24 h and 50% after 48 h. The activity of MAO basically parallels to the level of DA. Exposure to hypoxia decreases the activity of AchE.

Key words: Anoxia/PP; Dopamine/AN; Monoamine oxidase/AN; Acetylcholinesterase/AN; Carotid body/AH

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