

兔脑 nNOS 阳性神经元的形态、结构和分布规律

尹逊河, 王树迎, 蔡玉梅, 邱建华, 王传宝, 刘 燕

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘 要: 利用 SABC 免疫组织化学方法, 对兔脑神经型一氧化氮合酶(nNOS)阳性神经元的形态、结构及分布规律进行了系统研究, 结果表明: ① nNOS 阳性神经元呈深棕色, 着色主要在胞质内, 细胞核处较为浅淡; 神经元胞体形态多种多样, 有三角形、圆形、椭圆形、梭形等, 神经元突起有一个或者数个; nNOS 阳性神经纤维大多呈棕色串珠样, 有些区域的阳性纤维交错分布, 相互交织成网状。② 家兔的各个脑区均有 nNOS 阳性神经元和神经纤维出现, 其中在大脑皮质、小脑、丘脑下部、中脑和脑桥广泛分布, 延髓分布极少。③ nNOS 阳性神经元, 在仔兔时就已基本发育到成年兔水平, 以后随着年龄增长逐渐发育成熟至衰老, 到 2 岁龄(老年兔)时就出现了显著的衰老变化, 即密度减小, 表达强度减弱, 第一级突起数减少, 最长突起长度变短等。结果提示: nNOS 阳性神经元及其催化产生的 NO 在家兔中枢神经系统的发育和神经调控中起重要作用。

关键词: 兔脑; 神经型一氧化氮合酶; 阳性神经元; 结构; 分布规律

中图分类号: S852.16

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)09-0914-06

Modality, Structure and Distribution of nNOS Positive Neurons in Rabbit Brain

YIN Xun-he, WANG Shu-ying, CAI Yu-mei, QIU Jian-hua, WANG Chuan-bao, LIU Yan

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: The study, using SABC immune histochemistry technique, was designed for observing the modality, structure and distributed law of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) positive neurons in rabbit brain. The results showed: ① The nNOS positive neurons appeared deep brown which had most in the cytoplasm and the cell nucleus were more lighter; the neuron cell bodies had all kinds of types, such as triangle, round, ellipse, shuttle and so on; and had one or more neuron protruding; the most positive nerve fibres were brown bunch of pearls kind, and some nNOS positive fibres were netted. ② The nNOS positive neurons and nerve fibres were distributed in every area of rabbit brain. And they were widely distributed in cerebral cortex, cerebellum, hypothalamus, mesencephalon and pons. But there were even fewer in medulla. ③ Basically, the nNOS positive neurons of the young rabbit had developed to the adult rabbit's level. It developed from maturation to doat gradually with age. To two-year old rabbit, who was the aged, the nNOS positive neurons appeared senescence obviously, including the reducing of density, weakening of expression intensity, decreasing of the first born tuber number and shortening of the longest born tuber length etc. The results indicated that nNOS positive neurons and the NO which nNOS positive neurons catalyzed did most use in the upgrowth of central nervous system and the nerve adjusting and controlling.

Key words: rabbit brain; neuronal nitric oxide synthase (nNOS); positive neurons; structure; distribution

收稿日期: 2005-10-13

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2003D04)

作者简介: 尹逊河(1955-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事神经解剖学与神经生物学研究。E-mail: xhyin@sdau.edu.cn

近年来的研究表明,一氧化氮(Nitric oxide, NO)是神经系统中一种新型的神经递质和信使分子,参与信息传递、神经发育、介导兴奋性毒性、调节神经再生和脑血流量等许多重要过程^[1~3]。NO是由一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)催化L-精氨酸产生的,在神经系统,NOS共有3种类型:第一种为神经型NOS(nNOS),主要存在于大多数神经元中;第二种为内皮型NOS(eNOS),主要存在于脑血管内皮细胞和海马神经元中;第三种为诱导型NOS(iNOS),一般在病理状态下才诱导产生。有关各种NOS在大鼠脑内分布的研究报道较多,而在兔脑内的分布仅见NOS报道^[4]。本文利用SABC免疫组织化学方法,首次对各年龄段(从出生到老年)家兔整个脑内nNOS阳性神经元的形态、结构和分布规律进行系统研究,以全面揭示兔脑nNOS阳性神经元的生长发育规律,探讨NO在家兔中枢神经系统中的作用和作用机制,为神经生物学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

哈白兔50只,均购自山东泰安北集坡养兔场。根据年龄把实验兔分为5组:即30d以内的仔兔、3月龄的幼兔、6月龄的青年兔、12月龄的成年兔、24月龄的老年兔,每组10只,雌雄各半。

1.2 试验方法

1.2.1 试验兔处理 参照贲长恩^[5]方法进行脑组织的取材与固定。将试验兔耳缘静脉注射20%的氨基甲酸乙酯(5 mL/kg 体重)麻醉,打开胸腔经主动脉灌注9 g/L的生理盐水100~300 mL以冲洗血液,然后灌注40 g/L的多聚甲醛(4℃),持续0.5~2 h。灌注完毕立即取出脑组织,浸在相同的固定液中固定3~5 h后置于20%蔗糖(用pH7.4的磷酸缓冲液配制)中至组织沉底。

用上述方法处理的脑组织,沿正中矢状面纵切成2部分,一部分用经生理盐水浸泡过的医用纱布包裹,放进液氮罐中速冻,以备切片用,另一部分放在-70℃低温冰箱内,作当时切片用。

1.2.2 冰冻切片 将脑组织样块从低温冰箱或液氮罐中取出,做连续冰冻切片。仔兔、幼兔、青年兔的脑组织,先沿正中矢状面做纵的连续切片(可观察到延髓、脑桥、小脑、中脑、间脑、大脑等的全貌),再按各个脑区做冠状连续切片。成年兔、老年兔的脑

组织,按不同脑区做纵、冠状2种连续切片。切片厚度为20~25 μm,切片时温度控制在-15~-10℃。间隔3片取1片,裱片后收集于4℃冰箱中晾干。

1.2.3 染色程序 利用SABC(链霉亲和素-生物素-酶复合物)免疫组织化学方法进行染色。染色程序:0.3% H₂O₂ 甲醇溶液,室温浸泡30 min,以灭活内源性过氧化物酶;蒸馏水洗3次,正常羊血清室温封闭20 min;适当稀释的兔源nNOS抗体(一抗)37℃孵育1 h;生物素化羊抗兔IgG(二抗)20~37℃孵育30 min;以上两步之后均用0.1 mol/L PBS洗2 min×3次;SABC工作液20~37℃孵育30 min;0.1 mol/L PBS(pH7.4)洗5 min×4次;DAB(二氨基联苯胺)室温下显色(镜下控制反应时间,一般在5~30 min。呈色反应为棕色的示为阳性);苏木素轻度复染,上行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

阴性对照的脑切片,以PBS代替兔源nNOS抗体,其他步骤同上。

1.2.4 观察、测量和摄影 在Olympus显微镜下观察nNOS阳性神经元的形态、结构,用网形和尺形测微尺计数和测量阳性神经元的密度、胞体直径、第一级突起数及最长突起长度,并进行显微摄影。

1.2.5 数据处理 所得数据均用微机进行统计分析。

2 结果

2.1 兔脑 nNOS 阳性神经元的整体分布及形态、结构特征

家兔的各个脑区均有nNOS阳性神经元和神经纤维出现,其中在大脑皮质、小脑、丘脑下部、中脑和脑桥广泛分布,延髓分布极少。nNOS阳性神经元呈深棕色,着色主要在胞质内,说明nNOS是一种胞质酶,细胞核处较为浅淡;神经元胞体形态多种多样,有三角形、圆形、椭圆形、梭形等,神经元突起有一个或者数个;nNOS阳性神经纤维大多呈棕色串珠样,有些区域的阳性纤维交错分布,相互交织成网状。

2.2 各脑区 nNOS 阳性神经元的分布、形态及结构

2.2.1 大脑皮质 大脑皮质有较丰富的nNOS阳性神经元分布,主要在皮质的II-IV层(图1)。阳性神经元胞体呈梭形、三角形、圆形等多种形状,多为中型或大型神经元;突起较多,有3~4个,突起

长,显示 Golgi 样染色外观。nNOS 免疫阳性物质为深棕色,位于胞浆内,胞核部分着色浅(图 2)。串珠状的 nNOS 阳性神经纤维呈网状分布在大脑皮质浅层(图 3)。

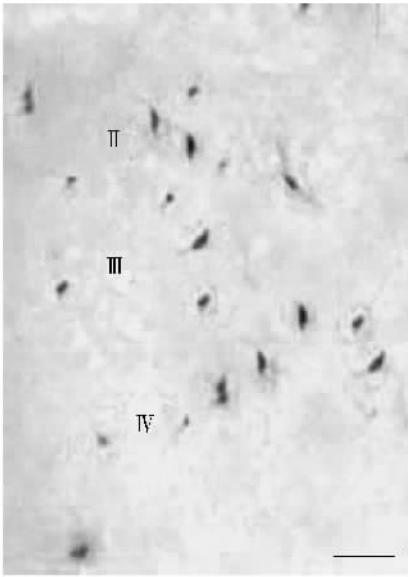


图 1 青年兔大脑皮质 II、III、IV 层 (示 nNOS 阳性神经元,比例尺:100 μm)

Fig. 1 Layers II-IV of youthful rabbits' cerebral cortex (The nNOS positive neurons, Bar=100 μm)

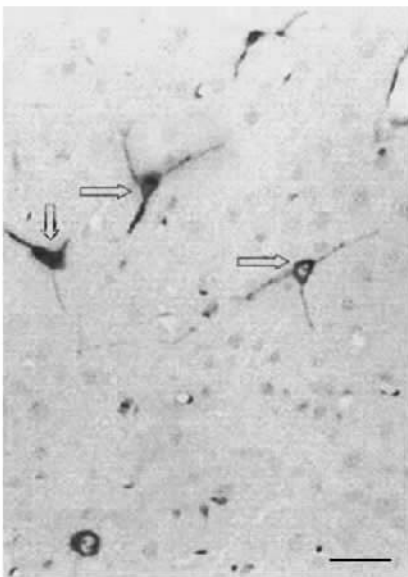


图 2 成年兔大脑皮质枕叶 (箭头示 nNOS 阳性神经元,比例尺:50 μm)

Fig. 2 Cerebral occipital cortex of grown rabbits (Arrowhead showed the nNOS positive neurons, Bar=50 μm)

2.2.2 脑干 脑干 nNOS 阳性神经元的分布情

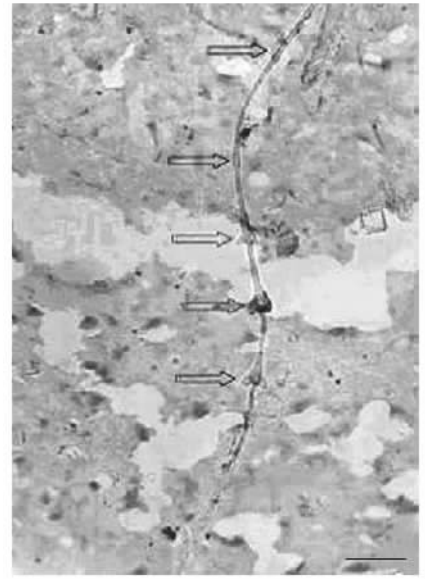


图 3 青年兔大脑皮质颞叶 (箭头示呈串珠样的 nNOS 阳性纤维,比例尺:50 μm)

Fig. 3 Cerebral temporal cortex of youthful rabbits (Arrowhead showed bunch of pearls shaped nNOS positive fibres, Bar=50 μm)

况:①延髓,nNOS 阳性神经元分布极少,基本呈阴性。②脑桥,nNOS 阳性神经元主要分布在第四脑室底、中线的两侧。这些神经元分布密集、着色深,主要为大型多极细胞;胞体呈圆形、卵圆形,三角形;胞质染色深,胞核基本不着色,突起明显(图 4)。③中脑,nNOS 阳性神经元主要分布在四叠体(顶盖)内。在四叠体外灰质层可见梭形的 nNOS 阳性神经元,其突起伸向四叠体表面,与四叠体表面相垂直;在四叠体深面的灰质层是深染的多级神经元。

2.2.3 小脑 nNOS 阳性神经元主要分布在小脑皮质的颗粒层。在颗粒层可见密集的边界不清的阳性细胞,胞体呈梨状。分子层内只有大量与皮质表面相垂直的阳性纤维。蒲肯野细胞层为 nNOS 免疫反应阴性,既没有阳性细胞,也没有阳性纤维(图 5)。

2.2.4 间脑 nNOS 阳性神经元主要分布在丘脑下部。在丘脑下部阳性神经元为深棕色,胞体大,呈卵圆形或梭形(图 6);胞质染色深,胞核不着色;突起较短,伸向第三脑室。

2.3 各年龄组兔脑 nNOS 阳性神经元的测量指标

兔脑 nNOS 阳性神经元的密度、第一级突起数和最长突起长度随年龄增长而逐渐减少,而胞体直径却随年龄增长而逐渐增大。阳性神经元的胞体直

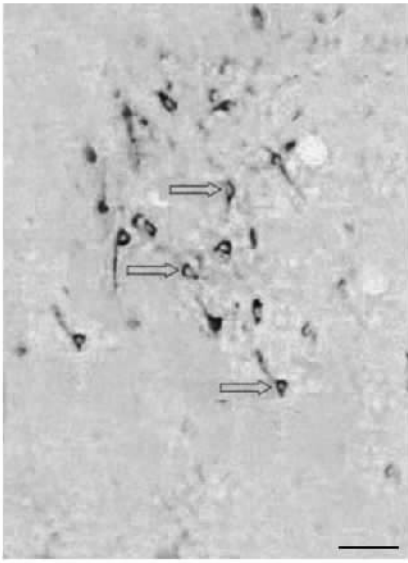


图 4 成年兔脑桥(箭头示 nNOS 阳性神经元,比例尺:100 μm)

Fig. 4 Pons of grown rabbits (Arrowhead showed the nNOS positive neurons, Bar=100 μm)

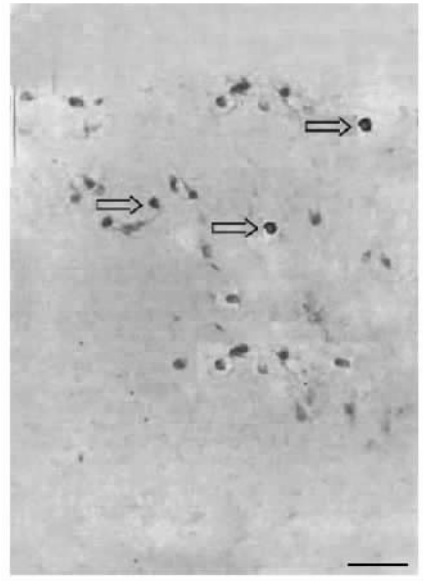


图 6 仔兔丘脑下部(箭头示 nNOS 阳性神经元,比例尺:100 μm)

Fig. 6 Hypothalamus of young rabbits (Arrowhead showed the nNOS positive neurons, Bar = 100 μm)

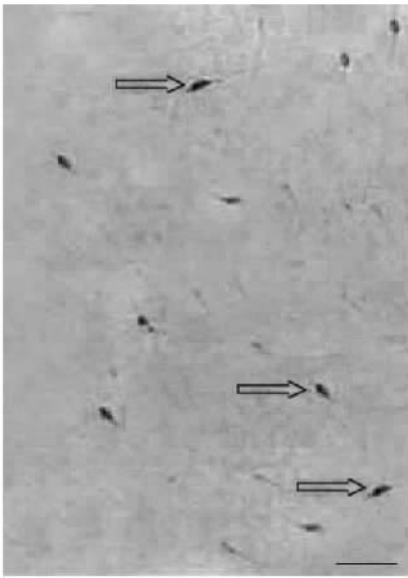


图 5 成年兔小脑皮质(箭头示颗粒细胞层 nNOS 阳性神经元,比例尺:50 μm)

Fig. 5 Cerebellar cortex of grown rabbits (Arrowhead showed the nNOS positive neurons of granular cell layers, Bar=50 μm)

0.01),而仔兔、幼兔、青年兔、成年兔 4 个年龄组之间,多数差异不显著($P>0.05$,见表 1)。

3 讨论

3.1 本研究发现,家兔的各个脑区均有 nNOS 阳性神经元和神经纤维出现,其中在大脑皮质、小脑、丘脑下部、中脑和脑桥广泛分布,延髓分布极少;阳性神经元胞体大多呈多角形、梭形,还有一些呈圆形和卵圆形等。这一结果与在大鼠脑的观察结果类似^[6]。

3.2 在大脑皮质,nNOS 阳性神经元主要分布于 II、III、IV 层,阳性神经元胞体呈梭形、三角形、圆形等多种形状,多为中型或大型神经元,突起较多,有 3~4 个。而谢兴国^[7]等在猕猴的研究则发现大脑皮质的 nNOS 阳性神经元主要分布在 II、III、V、VI 层,为密集的、体积较小的细胞,多数为锥形、星形细胞,少数为椭圆形和梭形细胞,其中,只有梭形细胞具有突起。本研究所观察到的 nNOS 阳性神经元的分布和形态与之有一定的差别。这提示不同亚型的 NOS 分布于不同的细胞群体,而不同种属的 nNOS 分布于大脑皮质的不同层次。

径在 5 个年龄组之间差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。阳性神经元的密度、第一级突起数和最长突起长度,老年兔与仔兔、幼兔、青年兔、成年兔相比,多数差异显著($P<0.05$)或极显著($P<$

表 1 各年龄组兔脑 nNOS 阳性神经元的密度和性状 ($\bar{x} \pm S$)

Table 1 The density and character of nNOS positive neurons in brain at different ages rabbits

项 目 Item	仔兔 Young rabbit	幼兔 Juvenile rabbit	青年兔 Youthful rabbit	成年兔 Adult rabbit	老年兔 Aged rabbit
密度/(个/mm ²) Density	4.24±0.08 ^{aA}	4.17±0.08 ^{aA}	4.09±0.07 ^{aA}	4.01±0.08 ^{aA}	2.12±0.09 ^{bb}
胞体直径/ μm Soma diameter	10.51±0.31 ^{ed}	11.51±0.28 ^{dcd}	12.63±0.14 ^c	13.99±0.27 ^{bb}	16.04±0.35 ^{aA}
第一级突起数/个 First born tuber number	3.52±0.27 ^{aA}	3.29±0.32 ^{abA}	2.59±0.24 ^{bcAB}	2.41±0.20 ^{cAB}	1.62±0.18 ^{db}
最长突起长度/ μm First born tuber length	163.77±9.83 ^{aA}	152.43±9.27 ^{abA}	144.36±9.41 ^{abAB}	135.51±6.61 ^{bAB}	109.51±4.35 ^{cb}

同一行标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 标有不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

In the same row, different small letters means notable difference ($P < 0.05$), different capital letters means extremely notable difference ($P < 0.01$).

3.3 谢兴国^[7]等采用 ABC 免疫组织化学技术, 在猕猴小脑观察到颗粒层分布有大量的边界不清的小型阳性细胞, 浦肯野细胞层也为 nNOS 反应阳性, 分子层含有大量的阳性纤维。本研究也发现 nNOS 阳性神经元主要分布于小脑皮质的颗粒层, 分子层内只有大量与皮质相垂直的阳性纤维, 但浦肯野细胞层呈阴性。而 Breadt^[8] 和 Anggard^[9] 采用免疫组织化学方法在大鼠小脑则观察到, nNOS 阳性神经元主要分布于小脑皮质的分子层和颗粒层, 浦肯野细胞层呈阴性。以上结果明显不同, 有可能是物种之间存在着差异。有关 nNOS 在小脑分布方面的研究不多, 有待进一步证实。

3.4 本研究发现, 兔脑 nNOS 阳性神经元的密度、第一级突起数和最长突起长度, 随年龄增长而逐渐减少, 而胞体直径却随年龄增长而逐渐增大。这种变化在仔兔、幼兔、青年兔、成年兔之间多数差异不显著, 而到了老年兔就变化极显著。由此得出: 兔脑 nNOS 阳性神经元, 在仔兔时就已基本发育到成年兔水平, 以后随着年龄增长逐渐发育成熟至衰老, 到 2 岁龄 (老年兔) 时就出现了显著的衰老变化。

本研究所观察到的老年兔脑 nNOS 阳性神经元的衰老变化与李秋明^[10] 在老年大鼠大脑皮质和孙贤奎^[11] 在老年大鼠脑中 nNOS 阳性神经元的衰老变化相似, 唯有 nNOS 阳性神经元的胞体直径不同, 本研究观察到的是胞体直径在老年兔最大, 而李秋明和孙贤奎发现阳性细胞的平均截面积在老年大鼠明显减小, 是动物种属之间的差异还是其它原因需要深入探讨。分析老年兔 nNOS 阳性神经元胞体直径增大的原因可能有二: 其一由于部分细胞衰老、死亡或发生了神经细胞凋亡而丢失, 存留细胞代偿性体积增大, 功能活跃以补偿失去细胞的功能;

其二可能是细胞退行性改变过程中的一种改变形式。Salas^[12] 用高尔基银染法研究了老年小鼠丘脑下部的细胞变化, 发现细胞突起扭曲、变短, 树突棘数目减少, 有的细胞皱缩, 表面不光滑, 有的体积膨胀, 胞体内有斑块状沉淀物。用 Nissl 染色和 PAS 染色发现, 视上核胞浆内嗜碱性物质增加; 视上核、视前区、丘脑下部前核有脂褐素沉积。本试验发现老年兔 nNOS 阳性神经元胞体直径增大可能同上述物质的增加有关。

3.5 随着神经生物学研究的不断深入, NO 作为一种新型的非经典的神经递质和信息分子, 它在各系统中所发挥的生理和病理作用逐渐被人们所认知。尤其是在中枢神经系统, NO 除了与兴奋型氨基酸受体以及神经毒性有关外, 还影响着海马和小脑的突触传递效应, 即记忆的长期增强能力 (LTP) 和长时期消退 (LTD), 因此 NO 可能与学习和记忆有关^[3]。NO 还可分别与 SOM、NPY、GABA、Ach、5-HT、多巴胺等神经递质共存^[3], 表明 NO 可能对神经递质的合成、储存、释放有一定作用。在衰老时, 兔脑 nNOS 阳性神经元密度急剧下降, 表达强度减弱, 由此催化产生的 NO 减少, 这可能是导致老年动物脑功能衰退的直接原因。结果提示, nNOS 阳性神经元及其催化产生的 NO 在家兔中枢神经系统的神经调控中起重要作用。

参考文献:

- [1] Breadt D S, Synder H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(22): 9 030~9 033.
- [2] Damson V L, Damson T M, London E D. Nitric oxide

- mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical culture[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(14): 6 368~6 371.
- [3] 蔡文琴,李海标.发育神经生物学[M].北京:科学出版社,1999.314~323.
- [4] 邱建华,尹逊河,王树迎.兔脑 NOS 阳性神经元的总体分布和形态、结果的研究[J].畜牧兽医学报,2005,36(11):1 159~1 162.
- [5] 贲长恩,李叔庚.实用酶组织化学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1996.61~81.
- [6] Schere-Singler, Vincent S R, Kimrua H. Demonstration for a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry[J]. J Neurosci Meth, 1983, 9(3): 229~234.
- [7] 谢兴国,蔡文琴,张吉强,等. NOS1 免疫阳性细胞在猕猴中枢神经系统内的分布[J].第三军医大学学报, 2001,23(9):1 078~1 080.
- [8] Bredt D S, Hwang P M, Snyder S H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide[J]. Nature, 1990, 347(25): 768~770.
- [9] Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine [J]. Lancet, 1994, 343(8907): 1 199 ~ 1 206.
- [10] 李秋明,王荣华,田秀珍.神经肽 Y 和一氧化氮合酶阳性神经元在大鼠大脑皮质枕叶的分布及其衰老变化[J].哈尔滨医科大学学报,2001,35(2):100~102.
- [11] 孙贤奎,梅俊.一氧化氮合酶阳性神经元在大鼠脑干的分布及其衰老变化[J].解剖学杂志,1998,21(4): 308~311.
- [12] Salas J M, Scheidel M M. Morphologic changes in the hypothalamus of the old mouse[J]. Experimental Neurology, 1977, 57(1): 102~111.

《中国农业科学》中、英版征订启事

《中国农业科学》由农业部主管、中国农业科学院主办。主要刊登农牧业基础科学和应用科学研究论文。读者对象是国内外农业科学研究院(所)、农业大专院校、综合性大学的农业科研、教学与管理人

员。《中国农业科学》多年来一直被国内外著名数据库收录。影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊前列。从 2000 年起连续 3 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助。中国期刊方阵双高期刊;2000 年获“首届国家期刊”2003、2005 年获“第二、三届国家期刊奖提名奖”;2002~2004 年连续荣获第三届、四届全国农业优秀科技期刊评比一等奖、特等奖。从 2002 年起多次被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。中国科学院评选中国自然科学期刊显示度排名列农林科技学术类期刊第一名;北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览(2004 年版)》位居“农学、综合类核心期刊表”首位。

《中国农业科学》英文版(*Agricultural Sciences in China*)2002 年创刊,自 2006 年 1 月起,正式与国际著名的 Elsevier 出版集团合作,海外发行将由 Elsevier 全面代理,其电子版全文数据将登上 Elsevier 的 ScienceDirect 平台面向世界发行。

《中国农业科学》大 16 开,每月 10 日出版,国内外公开发售。每期 216 页,定价 39.50 元,全年定价 474.00 元,国内统一刊号:CN11-1328/S,国际标准刊号:ISSN0578-1752,邮发代号:2-138,国外代号:BM43。

《中国农业科学》英文版大 16 开,每月 20 日出版,每期 128 页,国内订价 20.00,全年 240.00,国内统一刊号:CN11-4720/S,ISSN1671-2927,邮发代号:2-851,国外代号:1591M。

邮编:100081;地址:北京 中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部

电话:010-62191637,68919808,62191638;传真:010-68976244。

网址:www.ChinaAgriSci.com;E-mail:zgnykx@mail.caas.net.cn