

去卵巢及雌激素替代治疗后家兔海马 nNOS 阳性神经元的形态结构及分布变化

谢有莲, 尹逊河*, 邱建华, 赵军, 王宪龙

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 用 SABC 免疫组织化学技术, 观察家兔海马各区 nNOS 阳性神经元在去卵巢及雌激素替代治疗后的形态结构及分布变化, 为雌激素类药物防治绝经后老年性痴呆症提供理论依据。结果表明, 家兔海马各区都有 nNOS 阳性神经元分布; 去卵巢后海马 nNOS 阳性神经元的形态结构及分布变化有区域差异性: 与假手术对照组相比, 在海马 CA1 区、CA3 区、齿状回(DG)阳性神经元数量明显减少($P < 0.05$), 而在 CA2 区数量明显增多($P < 0.05$)。CA1、CA3 区和 DG 的阳性神经元胞体截面积明显变小, 最长突起长度明显变短, 第一级突起数变少, 与假手术组有显著差异($P < 0.05$)。CA2 区阳性神经元胞体截面积明显变小($P < 0.05$), 最长突起长度、第一级突起数增多, 但差异不显著($P > 0.05$); nNOS 阳性神经元的 4 种指标在雌激素替代治疗组与假手术组之间无显著差异($P > 0.05$)。结果提示: 雌激素可能通过影响海马 nNOS 的表达来影响脑的学习和记忆功能。

关键词: 家兔; 海马; 神经型一氧化氮合酶; 去卵巢; 雌激素替代治疗

中图分类号: S852.16

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0329-06

The Changes of Distribution and Structure of nNOS Positive Neurons in Rabbit Hippocampus after Ovariectomy and Estrogen Replacement Therapy

XIE You-lian, YIN Xun-he*, QIU Jian-hua, ZHAO Jun, WANG Xian-long

(College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: To study the related changes of nitric oxide synthase (nNOS) positive neurons in the sections of the hippocampus of female rabbit (Sprague-Dawley strain) after ovariectomy and estrogen replacement therapy, the distribution and structure of nNOS positive neurons was observed in rabbit hippocampus using SABC immunohistochemical technique, which provides basic theories for preventing and treating Alzheimer's disease with estrogen replacement therapy. The results showed: There are comprehensive nNOS-positive staining cells in all regions of hippocampus. After ovariectomy, the changes of nNOS positive neurons in subregion of hippocampus were not equal: the number of positive neurons in subiculum CA1, CA3 and dentate gyrus(DG) were decreased compared with control group ($P < 0.05$), while the number of positive neurons in subiculum CA2 was increased ($P < 0.05$). The average section area of positive neuron was smaller and the length of the longest process become shorter and the number of tuber turns were less in subiculum CA1, CA3 and DG than that in control group ($P < 0.05$). The average section area of positive neuron was smaller while the length of the longest process and the number of first tuber have no remarkable change in CA2 than that in control group ($P > 0.05$). Four kinds index of positive cells in the subregion of hippocampus showed no significant difference between estradiol-replacement therapy and the control group ($P > 0.05$). The results indicated that estrogen maybe

收稿日期: 2009-11-08

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2003D04)

作者简介: 谢有莲(1975-), 女, 山东临沂人, 硕士生, 主要从事神经生物学研究, E-mail: youlianxie2007406@163.com

* 通讯作者: 尹逊河, E-mail: xhyin@sdau.edu.cn

affect the learning and memory by influencing the expression of nNOS in hippocampus.

Key words: rabbit; hippocampus; neuronal nitric oxide synthase; ovariectomy; estrogen replacement therapy

一氧化氮(NO)是由一氧化氮合酶(NOS)催化L-精氨酸而成的一种气体分子,参与机体血液循环、免疫杀伤、神经传递、学习记忆等多种生理病理过程。用L-精氨酸的类似物竞争性抑制一氧化氮合酶(NOS),可阻断长时程增强(LTP)的形成,损害大鼠的学习记忆能力,NO/NOS对维持正常的学习记忆功能是必需的^[1]。雌激素是维持妇女正常生理与心理所必需的内源性活性物质,在中枢神经系统中,作用于与认知功能相关的神经回路(海马回路),影响学习和记忆。流行病学研究表明,更年期后的女性患老年痴呆症(AD)的概率明显高于同龄男性,这可能与更年期后女性的血中雌激素水平降低有关。雌激素替代疗法(estrogen replacement therapy, ERT)不仅可以改善AD患者的学习和记忆功能,而且可以降低更年期女性发生AD的危险^[2]。动物试验表明,雌激素水平的变化可能直接影响神经元的活性及修复,特别是海马、基底神经节,雌激素的缺乏可加速神经元的缺失,影响轴突和树突的形成^[3]。去卵巢后大鼠海马内nNOS神经元的变化,国内已有报道^[4],但家兔去卵巢后特别是雌激素替代治疗后海马nNOS阳性神经元形态结构及分布的变化还未见报道。本研究采用SABC免疫组织化学方法观察家兔在去卵巢和雌激素治疗后海马nNOS阳性神经元形态结构及分布的变化,为雌激素类药物防治绝经后老年性痴呆症提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验用家兔

5月龄性成熟、未经产雌性哈白兔30只,体重(2500±200)g,购自山东泰安北集坡养兔场,家兔适应1周后开始试验,切除双侧卵巢制备去卵巢模型。假手术组只找到卵巢,但不切除。动物分为3组:切除卵巢3月组(OVX),切除卵巢+苯甲酸雌二醇治疗组(OVX+E₂)和假手术对照组(sham),每组10只,开始用药是在术后恢复1周后。切除卵巢+苯甲酸雌二醇治疗组的用药方法:苯甲酸雌二醇注射液按0.3 mg·只⁻¹的剂量从后肢肌肉注射,隔天1次,共3个月;其他组同时间注射等量灭菌花生油。

1.2 主要试剂

苯甲酸雌二醇(上海第九药厂);nNOS一抗、SABC试剂盒、DAB显色试剂盒,购自武汉博士德生物工程公司。

1.3 取材及处理

家兔麻醉后,经左心室主动脉插管,灌注生理盐水300 mL,然后灌注质量浓度为40 g·L⁻¹的多聚甲醛(4℃),持续0.5~2 h。灌注完毕立即取出脑组织,截取海马部分的脑组织,再入固定液内固定4 h后备用。海马组织行石蜡包埋后制成连续冠状切片,片厚5 μm,隔10片取5片,贴片分2套,一套行nNOS免疫组织化学染色,另一套用于阴性对照。

1.4 SABC免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡至水,0.1 mol·L⁻¹ PBS洗5 min×3次;0.3% H₂O₂室温孵育10 min,蒸馏水洗5 min×3次;微波热抗原修复;正常羊血清室温封闭30 min;加入兔抗兔nNOS(1:100)抗体,4℃孵育24 h,0.1 mol·L⁻¹ PBS洗2 min×3次;滴加生物素化羊抗兔IgG(二抗),室温30 min,0.1 mol·L⁻¹ PBS洗2 min×3次;加SABC工作液孵育,室温30 min,0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH7.4)洗5 min×4次。DAB显色,上行梯度脱水;透明;中性树脂封片;阴性对照的海马切片,以PBS代替兔抗兔nNOS多克隆抗体,其余方法、步骤同上。

1.5 观察、测量和照相

每个样本取6张切片,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、胞体截面积、第一级突起数及最长突起长度,并进行显微照相。

1.6 数据统计与分析

用Excel、SPSS11.0软件进行数据统计和方差分析。

2 结果

2.1 对照组家兔海马nNOS阳性神经元的分布

家兔海马内各区均有nNOS阳性神经元和阳性纤维分布。阳性细胞轮廓清晰,胞体大且染色深,突起多而长。胞体形态主要有锥体形和圆形2种。免疫反应产物呈棕褐色,染色均匀,主要位于神经元的胞质内,细胞核不着色,说明nNOS是一种胞质

酶。nNOS 阳性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。

海马与齿状回(DG)均属古皮质 3 层结构,从外到内依次为分子层、锥体细胞层(海马)或颗粒层(齿状回)和多形层。海马各区域皮质的层次又根据各种纤维通路的不同而有变异,在 CA 各区又分为分子层、腔隙层、放射层、锥体细胞层、始层、室床。在光学显微镜下,可见海马 CA1、CA2、CA3 区和 DG 均有 nNOS 阳性神经元分布。细胞轮廓清晰,胞体形态主要有锥体形和圆形 2 种。锥体细胞较大,胞体为三角形或圆形,主要散布于海马锥体层,突起由细胞的顶部和底部发出,穿行于海马不同的层次间;圆形细胞较小,散布于齿状回的各层以及海马本部。该细胞的突起比较短小,且数目较少。海马 nNOS 阳性神经元的分布有明显的部位和层次差异。其分布特点如下:在 CA1 区(图 1A)细胞胞体排成 2~3 层,有长的突起伸向腔隙层;在 CA2 区(图 1B)锥体细胞排列最紧密,主要分布于锥体层周围;CA3 区的锥体细胞排列疏松,散在分布于放射层、锥体层和分子层,且突起稍短。而在 DG 主要见到的是圆形的颗粒细胞,细胞排列紧密,密布于 DG 的颗粒层和分子层。

2.2 试验组海马 nNOS 阳性神经元数量、形态、分布的变化

在 OVX 组,nNOS 阳性神经元在海马各区的分布没有明显差异,只是在细胞数量和细胞形态上

有所变化,CA1、CA3、DG 区阳性神经元数量均减少。而 CA2 区 nNOS 阳性细胞数量比对照组显著增多。CA1(图 1C)、CA3、DG 区阳性细胞也以锥体形细胞和圆形细胞为主,但细胞轮廓变模糊,胞体变小,第一级突起数减少,最长突起长度变短,细胞排列紊乱。CA2(图 1D)区的 nNOS 阳性细胞元第一级突起数和最长突起长度变化不明显,但胞体变小。

在 OVX+E 组,nNOS 阳性神经元的形态仍以锥体形和圆形为主。nNOS 阳性神经元在 CA1(图 1E)、CA3、和 DG 区的数目与 OVX 组相比明显增多,而在 CA2 区(图 1F)数目与 OVX 组相比明显减少。CA1、CA3 和 DG 区的细胞形态与 OVX 组相比,胞体变大,突起变长,第一级突起数变多,排列变整齐,与对照组相似。CA2 区,nNOS 阳性细胞数目减少,细胞形态与对照组比较变化不明显。

2.3 3 组家兔海马各区 nNOS 阳性神经元的测量指标

去卵巢组与对照组相比,海马各区单位面积内(CA2 除外)nNOS 阳性神经元数量减少($P < 0.05$) CA2 区 nNOS 阳性神经元数量增多($P < 0.05$,表 1),CA1、CA3、DG 阳性神经元胞体截面积显著变小、最长突起长度显著变短、第一级突起数明显减少($P < 0.05$),CA2 区胞体截面积显著变小($P < 0.05$),最长突起长度稍变长,第一级突起数稍增多,但差异不显著($P > 0.05$,表 2 和 3);而对照组和 OVX+E 组海马各区的阳性神经元数量、胞体截面积、第一级突起数和最长突起长度均无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 3 组家兔海马各区 nNOS 阳性神经元的密度

组别 Group	CA1	CA2	CA3	DG
对照组 Control group	140.76±14.56 ^a	163.44±14.56 ^b	204.49±2.14 ^a	233.43±14.48 ^A
OVX 组 Ovariectomy group	105.01±8.82 ^b	205.70±15.25 ^a	154.46±2.27 ^b	167.73±12.82 ^B
OVX+E 组 Ovariectomy plus estrogen replacement therapy group	133.91±10.06 ^a	158.00±12.66 ^b	196.41±5.18 ^a	209.73±17.95 ^A

同一列数据标不同大写字母者为差异极显著($P < 0.01$);不同小写字母者为差异显著($P < 0.05$)。下表同

In the same column, different small letters mean notable difference ($P < 0.05$), different capital letter means extremely notable difference ($P < 0.01$). The same as below

表 2 3 组家兔海马各区 nNOS 阳性神经元胞体平均截面积

组别 Group	CA1	CA2	CA3	DG
对照组 Control group	1 541.60±100.21 ^a	1 518.86±84.35 ^a	1 528.08±61.74 ^a	1 434.55±44.03 ^A
OVX 组 Ovariectomy group	1 161.12±111.47 ^b	1 157.64±91.01 ^b	1 154.06±99.91 ^b	1 077.77±73.42 ^B
OVX+E 组 Ovariectomy plus estrogen replacement therapy group	1 469.17±104.40 ^a	1 432.18±124.26 ^a	1 409.87±99.15 ^a	1 363.28±45.68 ^A

表 3 3 组家兔海马各区 nNOS 阳性神经元最长突起度长度

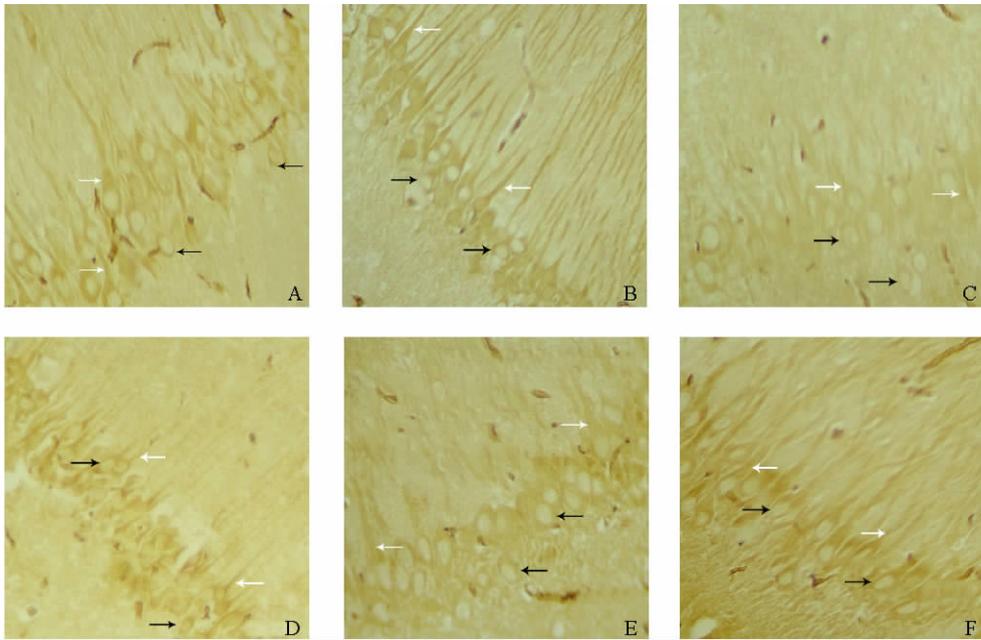
Table 3 The first born tuber length of nNOS positive neurons in four different regions of hippocampus at the three groups μm

组别 Group	CA1	CA2	CA3	DG
对照组 Control group	247.64±30.84 ^a	299.29±22.03 ^a	240.41±15.74 ^a	203.18±21.96 ^a
OVX 组 Ovariectomy group	159.75±21.48 ^b	309.36±13.86 ^a	172.68±13.09 ^b	133.39±12.23 ^b
OVX+E 组 Ovariectomy plus estrogen replacement therapy group	225.41±18.64 ^a	286.40±22.52 ^a	244.02±24.78 ^a	182.50±14.32 ^a

表 4 3 组家兔海马各区 nNOS 阳性神经元第一级突起数

Table 4 The number of first tuber of nNOS positive neurons in four different regions of hippocampus at the three groups

组别 Group	CA1	CA2	CA3	DG
对照组 Control group	4.05±1.50 ^a	3.37±0.24 ^a	3.92±0.18 ^a	3.78±0.14 ^a
OVX 组 Ovariectomy group	3.18±0.19 ^b	3.98±0.35 ^a	2.89±0.24 ^b	2.78±0.24 ^b
OVX+E 组 Ovariectomy plus estrogen replacement therapy group	4.10±0.10 ^a	3.85±0.11 ^a	3.57±0.31 ^a	3.65±0.31 ^a



黑色箭头所指是 nNOS 阳性神经元,白色箭头表示阳性神经元第一级突起; A. 对照组海马 CA1 区; B. 对照组海马 CA2 区; C. OVX 组海马 CA1 区; D. OVX 组海马 CA2 区; E. OVX+E 组海马 CA1 区; F. OVX+E 组海马 CA2 区

Black arrowhead show the positive neurons, white arrowhead show the first tuber of nNOS positive neurons; A. CA1 regions of hippocampus in control group; B. CA2 regions of hippocampus in control group; C. CA1 regions of hippocampus in Ovariectomy group; D. CA2 regions of hippocampus in Ovariectomy group; E. CA1 regions of hippocampus in Ovariectomy plus estrogen replacement therapy group; F. CA2 regions of hippocampus in Ovariectomy plus estrogen replacement therapy group

图 1 各组海马 CA1、CA2 区 nNOS 阳性神经元及其突起分布 400×

Fig. 1 Pictures of nNOS positive neurons in CA1 and CA2 regions of hippocampus at three groups 400×

3 讨论

3.1 nNOS 阳性神经元在海马内的分布

海马在学习与记忆中起重要作用,而海马长时程增强效应(LTP)被认为是学习记忆的主要机制。

现已明确 NO 作为逆行递质参与 LTP^[5],而脑内 NO 主要来源于 nNOS。作者采用 SABC 免疫组织化学方法研究了 nNOS 阳性神经元在假手术对照组家兔海马内的数量、分布和形态结构。结果显示在海马的锥体细胞层多数神经元都呈阳性标记,其

形态主要为锥体形和圆形。这一结果与涂丽莉等^[6]在胎儿海马的研究结果一致。但陈一勇等^[7]研究发现,大鼠海马内 nNOS 阳性神经元均呈散在分布,仅占海马内神经元的很小比例。这可能是 nNOS 神经元在不同物种分布有所不同所致。nNOS 在海马区分布不完全一致,在 CA 各区主要分布于放射层、锥体层,少数分布在分子层;而在 DG 主要分布于颗粒层、分子层,这同 Valtschanoff 等^[8]和 Cork 等^[9]的试验结果相似。本试验结果进一步说明:NO 作为一种特殊的神经递质,可能参与了海马各区突触可塑性的形成,继而参与了学习记忆的调节。

3.2 去卵巢后海马 nNOS 阳性神经元的分布、数量、形态结构的变化

与对照组比较,OVX 组 nNOS 阳性神经元在海马各区的分布没有明显差异,只有细胞数量和细胞形态有所变化,在 CA 各区(CA2 除外)和 DG 阳性神经元数量明显减少,细胞胞体变小且排列紊乱,突起变短,第一级突起数减少,与对照组相比有显著性差异,此与刘凤华^[4]等去卵巢 3 月后的试验结果相似。CA2 区在海马 nNOS 阳性神经元的变化中是个相对特殊的区域,本试验观察到 OVX 组与对照组相比 nNOS 阳性神经元数目在 CA2 区明显增多,形态变化不明显,这与陈一勇等^[7]研究发现大鼠海马内 nNOS 阳性神经元的数目和形态均不随体内雌激素水平改变而改变的试验结果不相符。去卵巢后 nNOS 阳性神经元在 CA2 区和其它各区变化不一致的原因,可能是海马各部分的功能不同造成的^[10]。1977 年 Andersen 等^[11]发现,在 DG、CA1、CA3 区存在与 LTP 相关的突触连接系统,这表明上述 3 个部位与学习记忆有着密切的关系;而 CA2 区与学习记忆关系如何,目前尚无报道。现在,关于大脑学习记忆神经机理中最富有吸引力的模式就是 LTP 效应,LTP 形成过程中可以见到突触形态的可塑性改变,这种变化既是 LTP 的结果,又对 LTP 的维持发挥了作用,LTP 的过程中可看到树突棘体积增大,数量增多,NO 在 LTP 中发挥了重要的逆行性信使作用^[5],且 DG、CA1、CA3 区是与学习记忆密切相关的区域,所以可以认为,去卵巢后在海马 DG、CA1、CA3 区 nNOS 阳性神经元的数量减少,胞体变小,突起变短,第一级突起变少,可能是去卵巢后学习、记忆功能减退的结果,而在与学习、记忆关系不清楚的 CA2 区可能代偿性地增多,

以维持体内 NO 含量的平衡。

3.3 雌激素替代治疗后期海马 nNOS 阳性神经元数量、形态结构变化的意义

去卵巢给予雌激素 3 月后海马内细胞的形态和分布与对照组相似,与 OVX 组有显著差异。这与 López 等^[12]报道的结果相似。试验结果提示雌激素可以改变海马内 nNOS 的数量,从而影响 NO 的合成。许多研究表明,雌激素有保护学习记忆的功能。Simpkins 等^[13]报道,将 SD 大鼠的卵巢切除后,其主动回避行为下降,给予雌激素后恢复正常;应用 Morris 水迷宫试验,大鼠缺乏空间记忆能力,雌激素替代治疗后明显改善。国外已经有一些研究表明,绝经后妇女 AD 发病率明显增高,而用雌激素后可以降低 AD 的发病率,延缓及改善记忆减退的症状。目前雌激素替代疗法(ERT)对 AD 的防治作用已引起广泛关注^[14]。本试验的结果也提示:家兔去卵巢后,内源性雌激素减少,海马中与学习记忆相关的区域 nNOS 阳性神经元数目减少,形态、结构也相应地发生了改变。细胞的结构是功能的基础,nNOS 阳性神经元的这些变化可能影响了 NO 的合成,从而影响 NO 的表达,继而影响了家兔的学习记忆功能。当补充雌激素 3 月后海马内阳性神经元的数量、形态和分布与对照组相似。这些为雌激素替代疗法(ERT)防治绝经后老年性痴呆症提供了一定的形态学依据。

参考文献:

- [1] BOHME G A, BON C, LEMAIRE M, et al. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide inhibitor treated rats[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(19): 9191-9194.
- [2] BRINTON R D, CHEN S, MONTOYAM et al. The estrogen replacement therapy of the women's health initiative promotes the cellular mechanisms of memory and neuronal survival in neurons vulnerable to Alzheimer's disease[J]. *Maturitas*, 2000, 34(Suppl 2): S35-S52.
- [3] WOOLLEY C S, MEEWEN B S. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat[J]. *J Comp Neurol*, 1993, 336(2): 293-306.
- [4] 刘凤华,谭会兵,左萍萍. 雌激素及其类似物对去卵巢大鼠脑一氧化氮合酶阳性神经元的影响[J]. *解剖科学进展*, 1999, 5(4): 379.

- [5] HOLSCHER C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity[J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(7): 298-303.
- [6] 涂丽莉, 冯定庆. 人胎海马内 nNOS 神经元的形态学观察[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2005, 4(14): 209-212.
- [7] 陈一勇. 雌激素对去势雌性大鼠海马结构内 NOS 阳性神经元的影响[D]. 太原: 山西医科大学, 2004.
- [8] VALTSCHANOFF J G, WEINBERG R J, KHARAZIA VN, et al. Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide [J]. *J Comp Neurol*, 1993, 331(1): 111-121.
- [9] CORK R J, PERRONE M L, BRIDGES D, et al. A web-accessible digital atlas of the distribution of nitric oxide synthase in mouse brain[J]. *Prog Brain Res*, 1998, 118: 37-50.
- [10] 颜 艳, 肖 明, 丁 炯. 去势后大鼠海马结构一氧化氮合酶阳性神经元的变化[J]. 南京医科大学学报, 2002, 22(1): 10-12.
- [11] ANDERSEN P, SUNDBERG S H, SVEEN O. Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices[J]. *Nature*, 1977, 266(5604): 736-737.
- [12] LÓPEZ-JARAMILLO P, TERÁN E. Improvement in functions of the central nervous system by estrogen replacement therapy might be related with an increased nitric oxide production [J]. *Endothelium*, 1999, 6(4): 263-266.
- [13] SIMPKINS J W, GREEN P S, GRIDLEY K E, et al. Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease [J]. *Am J Med*, 1997, 103(3A): 19S-25S.
- [14] DUFORUNY L, WAREMBOURG M. Estrogen modulation of neuropeptides: somatostatin, neurotensin and substance P, in the ventrolateral and arcuate nuclei of the female guinea pig [J]. *Neuroscience Research*, 1999, 33(3): 223-228.