

关于学位论文原创性和使用授权的声明

本人所呈交的学位论文,是在导师指导下,独立进行科学研究所取得的成果 对在论文研究期间给予指导 帮助和做出重要贡献的个人或集体,均在文中明确说明本声明的法律责任由本人承担。

本人完全了解山东农业大学有关保留和使用学位论文的规定,同意学校保留和按要求向国家有关部门或机构送交论文纸质本和电子版,允许论文被查阅和借阅本人授权山东农业大学可以将本学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

保密论文在解密后应遵守此规定。

论文作者签名: 王传宇

导 师 签 名: 尹述河

日 期: 06.6.15

兔脑 nNOS 阳性神经元的形态、结构和分布研究

中文摘要

一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 作为一种新型的神经递质和信使分子, 在中枢神经系统中广泛分布, 而且具有非常重要的作用, 故而受到越来越多的重视。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 种亚型: 即神经型 NOS (nNOS)、内皮型 NOS (eNOS) 和诱导型 NOS (iNOS), 其中神经型 NOS 主要存在于大多数神经元中。本课题采用 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、结构和分布进行系统研究, 为全面揭示兔脑 nNOS 阳性神经元的生长发育规律, 探讨 NO 在中枢神经系统中的作用和作用机制, 为神经系统疾病的研究, 尤其是神经病理生理学研究提供形态学依据。

试验一利用 SABC 免疫组织化学方法, 对家兔大脑皮质各叶中的神经型一氧化氮合酶 (nNOS) 阳性神经元的形态、结构、分布及其发育变化进行了系统研究, 结果表明: 大脑皮质有 nNOS 免疫阳性神经元和神经纤维出现。nNOS 阳性神经元呈棕黄色, 细胞核染色浅淡。神经元的形态多样化, 胞体呈梭形、三角形、圆形、椭圆形、梨形等多种形状; 突起长短、数量不等, nNOS 免疫阳性神经纤维呈棕色串珠状且交错分布。随着年龄增长, 大脑皮质 nNOS 阳性神经元的密度、突起数、最长突起长度逐渐减小, 而胞体截面积却逐渐增加, 这些指标到了老年变化极显著 ($P < 0.01$), 表明 nNOS 和 NO 与神经元的发育和衰老有关。

试验二利用免疫组织化学方法, 对家兔小脑皮质 nNOS 阳性神经元的形态分布及其发育变化进行了研究, 结果表明: 小脑皮质中也有较丰富的 nNOS 免疫阳性神经元和神经纤维出现。在浦肯野氏细胞层, 阳性神经元排列规整, 大多呈单层分布, 并有突起伸向分子层。nNOS 免疫阳性神经元呈棕黄色, 细胞核染色浅淡。阳性神经元的形态多样, 胞体呈梭形、三角形、圆形、不规则形等多种形状。

试验三对家兔下丘脑 (Hypothalamus) 各神经核团中 nNOS 阳性神经元的形态分布及发育变化进行了研究, 结果显示: 家兔下丘脑中分布有广泛的 nNOS 阳性神经元, 阳性产物呈棕黄色, 均匀分布于阳性神经元的胞质内, 细胞核基本不着色。阳性神经元有大、小两种, 突起较细, 数量少。下丘脑室旁核 (PVN)、

视上核 (SON) 内 nNOS 阳性神经元主要为大型细胞, 属于下丘脑大细胞神经分泌系统, 参与心血管活动和血压的调节, 另外有些核团如弓状核内的 nNOS 阳性神经元, 主要为小型细胞, 属于下丘脑小细胞神经分泌系统, 表明 nNOS 和 NO 在下丘脑神经内分泌调节系统中起重要作用。

试验四对 nNOS 阳性神经元在家兔脑神经核的形态和分布进行了研究, 结果表明: ①在大脑的基底核 (尾状核、豆状核和屏状核) 内有 nNOS 免疫阳性神经元分布, 这些神经元排列密集, 主要为小型细胞, 呈棕黄色, 细胞核淡染; 神经元胞体呈圆形、椭圆形、杆状、梭形、梨形等, 突起较短, 有 2~3 个。②在脑干的多个神经核团中也有较多的 nNOS 阳性神经元分布, 这些神经元呈棕黄色, 细胞核淡染; 胞体形态多种多样, 突起数目不等, 长短也有较大差异; 胞体大小在各神经核差异明显, 有的神经核神经元较大, 为大锥体细胞, 如脑桥的三叉神经中脑核、三叉神经脑桥核和三叉神经运动核, 有的神经核却为小神经元, 如脑桥的前橄榄核、面神经核和脑桥泌涎核, 有的为中等神经元, 如脑桥核和蓝斑。

关键词: 兔脑, 一氧化氮合酶, 阳性神经元, 神经核, 发育变化

ABSTRACT

Nitric oxide, a new type gas molecules, is a information transmission substance, which is a common, widely distributed in central nervous system, and plays a very important role. Therefore, it was being payed more and more attention. Nitric oxide catalyzes the production of

arginine under the action of nitric oxide synthase, and the nitric oxide synthase has three subtypes: types of neuron、types of abduction、type of endothelium, and types of neuron has been found found chiefly in the neuron. This experiment has studied, systematacially, the distribution and embryonic change of positive neuron—neuronal nitric oxide synthase in cerebral cortex of rabbits and the orientation、conformation and distribution and embryonic change of positive neuron-neuronal nitric oxide synthase in cerebral cortex of nuclei nervorum cranialium of rabbits by SABC immunohistochemical method.

This study has revealed, completely, the regular of embryonic change of positive neuron-neuronal, and probed into the function of NO and the mechanism of

NO in the central nervous system, All this research work will provide the gist of the study of nervous system disease, especially the study of the physiology of nervous pathology.

The first experiment has studied, detailedly, the morphosis、distribution and embryonic change of the positive neuron—neuronal nitric oxide synthase in cerebral cortex of rabbit , the result showed that immune-positive neuron of nNOS and neuron twig have been found in cerebral cortex of rabbits. The color of immune-positive neuron of nNOS is brown and the color of nucleolus is weak, and the conformation is variegated. The soma shows different figure such as spindle、triangle、rotundity、oval and pear shape. The length and number of apophysis is different, furthermore, neurofibril of immune-positive neuron of nNOS shows brown pinch-and-swell form and distributes interlacedly. We can draw the following conclusion: with the growth of the rabbit, the density、sectional area of soma、number of prominency、the length of longest prominency et al, show the trend of increasing by degrees, But there were some obviously change when rabbits are old. This shows that the nNOS associated with the caducity of neuron.

The second experiment has studied the conformation、distribution and embryonic change of positive neuron of nNOS in cerebellar cortex.

The result show that positive neuron of nNOS and neuron fiber widely distribute in cerebellar cortex. In Purknies layer, stands between molecular layer and granular, positive cell arranged regularly, and takes on single storey in most position, some prominency stand out surface layer. The colour of positive neuron is brown yellow, Nulceolus does not stain, or the color is weak. The conformation of positive neuron is variegated. The soma shows different figure such as spindle、triangle、rotundity, and irregular shape and size.

The third experiment has studied the conformation、distribution and embryonic change of positive neuron in each group of specialized nerve cells. The result showed that positive neuron of nNOS widely distribute in hypothalamus of rabbits; positive fruits, whose colour is brown yellow, distributes homogeneously in cytoplasm around the nucleus of a neuron

of positive neuron of nNOS. Nulceolus does not stain. Size of positive neuron is

abhorrent, prominency of positive neuron is thinner, and the number of positive neuron is a little while.

There are some difference in conformation, size, density of distribution, sectional area and prominency of positive neuron in each each group of specialized nerve cells. In some group of specialized nerve cells, nNOS coexistes with other neurotransmitter, this indicates that nNOS play a very important role in nervous system development and regulation and control of nervous system of rabbit. The positive neuron of nNOS in the PVN、SON, is mainly maxicell, those belong to the maxicell secrete system of the Hypothalamus, it participated in the regular of the cardiovascular action and blood pressure, furthermore, in some group of specialized nerve cells, such as positive neuron of nNOS, is mainly minicell, belong to minicell ecrete system of the Hypothalamus, and the conclusion is that nNOS and NO play an important role in the regular of endocrine system.

The fourth experiment has done the study on the shape and arrangement of nNOS positive neuron of rabbit's nuclei of cranial nerves . The result revealed that there are congestion nNOS positive neuron in basal nucleus(caudate nucleus, lentiform nucleus, claustrum), which are mainly small tan cell with lighe dye neuclus, ,have various shape, such as roundness/oval/ bacilliform/shuttle/patrol,and have 2or 3 piece of short tuber.

There are also many nNOS positive neuron in some Nuclei of Cranial Nerves of Brain Stem, which are tan, and have lighe dye neuclus ,various shape ,various numbers tuber,and various length. The size of nNOS positive neuron in various Nuclei of Cranial Nerves is not the same, some are big pyramidal cell ,such as Midbrain Nuclei of Trigeminal Nerve ,pontine nucleus of trigeminal and Motor nucleus of trigeminal; some are small nerve cell, such as superior olivary nucleus nucleus of facial nerve and salivatory nucleus of Pontine nucleus; some are medial nerve cell, Such as Pontine nucleus and Locus ceruleus.

Keywords: rabbit' s brain; nitric oxide synthase. positive neuron; nucleus; embryonic change

英文缩略语表

英文缩写	英文全称	中文名称
NO	nitric oxide	一氧化氮
NOS	nitric oxide synthase	一氧化氮合酶
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase	神经元型一氧化氮合酶
cNOS	constructive nitric oxide synthase	结构型一氧化氮合酶
iNOS	inducible nitric oxide synthase	诱导型一氧化氮合酶
NADPH- II	NADPH-diphosphate- II	还原型辅酶 II
L-Arg	L-arginine	左旋精氨酸
CNS	central nervous system	中枢神经系统
EDRF	endothelium-derived relaxing factor	内源性舒张因子
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	环磷酸鸟苷
PVN	paraventricular nucleus	室旁核
SON	supraoptic nucleus	视上核
Arc	arcuate nucleus	弓状核
LTP	Lang term potetiation	长时程增强
LTD	Lang term depression	长时程抑制
VOP	vasopresin	加压素
RN	red nucleus	红核
SN	substantia nigra	黑质

引 言

一氧化氮(Nitric oxide, NO)是一种无色有毒气体, 约在1620年, 比利时科学家J. B. Van海尔蒙特首次制出NO。1772年, 英国化学家J. 普利斯特利对其进行了研究, 并称之为“亚硝气”。

NO自最先制取至今已有300余年。其间, 尽管人们对其特性作过大量研究, 但真正引起各国科学家高度重视并争相研究, 却是近20余年的事。Furchon等(1980)发现血管内皮细胞可产生并释放一种舒血管活性物质——内皮细胞衍化松弛因子(EDRF), 1987年Palnlo证明EDRF就是NO, 1991年NO合酶((nitric oxide synthase . NOS)克隆成功, 1992年NO被世界最具权威性的<<科学>>杂志遴选为当年的“明星分子”(徐科, 2000), 至此, NO的研究从分子水平进入了一个全新的研究高度。

NO是一种新的细胞信使分子和效应分子, 其结构简单, 具有易扩散、反应性强、性质活泼而很不稳定, 生物半衰期很短(约 2~3s)等特性, 广泛存在于生物体内各组织器官, 由血管内皮细胞产生并释放, 参与机体内多种生理及病理过程, 它在神经系统、免疫系统、循环系统、消化系统、呼吸系统、泌尿生殖系统等有着重要的调节作用。

NO一度被认为是污染空气的一种外源性毒物。自从 Moncada 发现 NO 能在机体内合成, 是内皮细胞的松弛因子以来, 科学家们对其进行了深入而广泛的研究。1977 法里德·穆拉德(Fred Murad)开始研究硝化甘油释放氧化氮的机理; 1980 年纽约罗伯特·菲希戈特(Robert Furehgott)研究表明, 血管本身的扩张作用是因为血管内皮细胞能产生一种信使分子; 1986 年美国洛杉矶的路易斯·伊格纳罗(Louis Ignarro)在自己的独立研究以及与菲希戈特的合作研究中均证明了扩张血管的效应分子就是 NO, 首次发现气体分子可在生物体内发挥信号传递作用。两位学者的研究结果为在医学上研究 NO 开辟了一个全新的领域, 并导致一系列新药研究的成功。上述 3 位美国药理学家共同阐明了硝酸甘油和其他血管扩张药是通过在体内释放 NO 气体而发挥作用的。由于 NO 的杰出作用, 1992 年世界著名杂志“Science”将一氧化氮命名为明星分子, 而发现 NO 气体在心血管系统中重要作用的 3 位药理学家分别获得了 1998 年度诺贝尔医学奖。

NO 在体内是一种含自由基的气体, 易扩散, 不稳定, 它在多个系统的生理与病理过程中所起的重要作用不断被阐明, 使 NO 的研究渗入到众多学科, 尤其

成为全球医学界、生物学界以及化学界的一个热点课题。

NOS 是 NO 生成过程中必需的酶,催化 L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)合成内源性的 NO。NOS 是 NO 生成的最主要限速分子。因此常采用测定 NOS 的活性来反映其组织细胞 NO 的含量;且通过对 NOS 的分布的研究可反映出 NO 的合成部位(韩济生, 1999), 以便研究其在不同部位的作用, 所以关于 NOS 的研究极为重要。

1 NO 的生物合成及生物学特性

在哺乳动物体内 NO 是由 NOS 催化底物 L-精氨酸(L-Arg)经还原型尼克酰胺腺苷二核苷酸磷酸(NADPH)还原而产生的。NO 极不稳定, 在有氧和水的环境中仅能存在 6~10s。NO 与受体结合后, 作用于血管平滑肌细胞可溶性鸟苷酸环化酶, 生成第二信使分子(cGMP), 导致细胞内钙离子浓度下降, 从而使血管平滑肌松弛, 血管扩张, 血压下降(高博, 1999)。

NO 易溶于水及脂肪, 因此易在细胞内外自由弥散。NO 高度活跃, 容易失活, 而在超氧化物及酸性条件下较稳定, 与血红蛋白和可溶性鸟苷酸环化酶的亚铁血红素分子有高度的亲和力。NO 与氧生成 NO₂, 迅速转化为 NO₃ 而丧失生物活性。刺激 NO 释放的生理调节机制目前仍不清楚。

NO 与经典的神经递质不同, 它是一种气体型神经递质, 分子量较小的无机物, 它在合成、贮存、释放、作用方式及灭活等方面都与传统的神经递质有其不同的特点。

1.1 NO 的合成分布特点

NO 的生物合成是酶促反应。Knowles 等(1989)从鼠的前脑中分离出一种酶, 它能催化精氨酸(L-Arg)产生 NO; Bredt 和 Snyder 对脑片中 NOS 的活化和抑制的研究进一步证实了 Grathwaite 的发现。有机体细胞是以 L-Arg 作为合成 NO 的前体物质。当神经元兴奋时: 大量的钙离子内流, 胞内的钙离子浓度升高, 激活细胞内 NOS, 催化 L-Arg 末端的胍基中的一个 N 原子氧化形成 NO。目前已经纯化。

克隆的 NOS 有三种类型: 神经型 NOS (nNOS), 1990 年被纯化, 从大鼠到人类, nNOS 主要存在于大脑皮层、海马、纹状体、下丘脑、中脑和小脑等处; 内皮型 NOS (eNOS), 1991 年被纯化, 主要存在于脑血管内皮细胞和海马的锥体细胞; 诱

导型NOS(iNOS), 1991年被纯化, 主要分布于巨噬细胞, 小胶质细胞, 星型胶质细胞, 血管内皮细胞和血管平滑肌细胞等。由iNOS合成的NO与免疫功能有关, 已证实NO所参与的免疫活动为对侵入的微生物和肿瘤细胞起细胞病毒作用(黄迪南, 1996)。根据NOS表达形式和基本调控条件, 把在生理状态下就能表达, 而且其活性还受钙离子调控的nNOS和eNOS合称为结构型NOS或原生型NOS(cNOS)。cNOS特点: (1)对钙/钙调素有依赖性; (2)作用迅速而短暂; (3)分布有交叉; (4)参与生理功能的调节(亦称为生理性NOS)。iNOS特点: (1)对钙/钙调素无依赖性; (2)作用缓慢而持久; (3)受内毒素、缺血、缺氧和某些细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)细胞因子介导; (4)参与某些病理过程如脑缺血性损伤等(病理性NOS)。

1.2 NO的气体分子特性

NO是具有高度反应性的活泼的气体分子, 合成后并不贮存于特殊的囊泡中, 也不以胞吐的方式进行量子释放, 而是以非量子的形式在合成的部位向四周弥散, 调节附近所有细胞的功能, 涉及0.3mm直径范围内的神经细胞、胶质细胞和血管壁的细胞, 而且并不局限于突触结构(Ackerman AE, 1997)。这种气体型的神经递质在神经网络中的容积传导和空间信号传递再造了生物信号转导原理的全新概念, 使不同系统间发生联系, 解释了轴突发放传遍局部神经组织区域、控制突触效率在时间上的相关, 是对经典的点一点传导的补充; NO生物学作用的发挥, 不是通过与特殊性受体的结合, 而是通过与一些酶或蛋白质作用而产生不同的生化反应, NO作用的终止没有特殊的失活机制, 也不通过重摄取或酶解, 而是靠在生物体内其短暂的半衰期而自然失活。NO这种气体分子作为信使物质的发现及其特殊的作用方式, 扩大了人们对传统的化学递质概念的认识。

nNOS神经元能选择性地不受脑疾病的影响而保存下来的观点一直引起人们广泛的关注。如在老年痴呆病(AD)病人海马结构中的神经元数量明显减少, 但nNOS神经元数量保持不变, 它们不产生神经纤维缠结, 也不参与斑块的形成(Hyman, 1992)。在舞蹈症(HD)病人纹状体, NADPH-d神经元不受病理性伤害(Ferrante等, 1985)。脑桥被盖NADPH-d几乎共存于所有胆碱能神经元中, 精神分裂症病人此脑区内这些神经元数量增加(Karson等, 1991)。在低氧和局部缺血状态下, NADPH-d神经元具有较高的耐受性(Frriero等, 1988)。

NOS神经元还能抵御神经毒素的毒害作用(Vincent, 1994)。在纹状体内,

DADPH-d 神经元能选择地抵御 NMDA 激动剂以及某些毒素的神经毒害作用, 人们据此提出 nNOS 神经元具有自身保护机制, 并认为这种保护机制是通过抑制 Ca^{2+} 内流, 阻断了谷氨酸的神经传导, 从而产生神经保护作用 (Liptonsa 等, 1994)。但研究也表明 NO 在脑疾病和神经毒素的毒害过程中, 对脑组织会有不同程度的损害作用。

2 一氧化氮的生理作用

2.1 一氧化氮对神经系统的作用

NO 是一种特殊的扩散性神经传递介质 (Snyder S H, 1992)。它通过强化或减弱突触连接而成为与学习相关的突触调节和神经发育中的突触形成这两个过程的共同分子机制。它还对自主神经和神经内分泌过程起重要的调节作用。另外 NO 还是一种重要的抑制性神经的传递和调节介质之一 (Bolanos JP, 1999), 在很多疾病的发病过程中起重要的作用, 例如, 过量生成的 NO 可能导致癫痫的发作和对脑组织的损害。预计可调节 NO 生成的药物将会在一些临床疾病的治疗中发挥重要的作用。

2.1.1 NO 在脑内的作用

脑组织不同部位分布着 NOS, 尤其是小脑, 海马和嗅球含量很高 (Bredt DS, 1991)。在正常情况下, 中枢及周围神经系统内的 NO 是一种能调节细胞功能的信息分子, ①中枢神经介质作用: 参与记忆形成, 神经活动和脑血流协调, 血脑屏障和睡眠与觉醒的调节等; ②外周神经介质作用: 外周分布的非肾上腺素能非胆碱能神经 (NANC) 的末梢能释放 NO, 有可能是此类神经的递质, 这类神经 (亦称氮能神经) 的主要功能是调节神经性舒血管作用、胃肠、呼吸和生殖的某些功能 (主要是 nNOS 活化的结果)。在某些病理条件下, NO 是参与疾病过程的重要物质如帕金森病、缺血损伤等。

2.1.2 NO 的信使传递效应

Murad 认为 NO 在神经信号传递中发挥着重要的生理作用。NO 能起到细胞内信使、神经递质的作用。作为神经递质, NO 从前神经末梢释放后通过突出间隙弥散到突触后神经元, 影响突触后神经元的生理活动; 作为细胞内信使, 由于 NO 分子的顺磁性使它对血红蛋白中的 Fe^{2+} 有很高的亲合力, 能与含有血红蛋白的蛋白质相结合, 胞浆内可溶性鸟腺苷酸环化酶 (sGC) 是一种血红蛋白蛋白 (Bredt

DS, 1990), NO与它的活性基因 Fe^{2+} 结合, 迅速而强烈地增强sGC的催化活性, 使cGMP的生成速度加快200倍。cGMP再激活。GMP依赖性蛋白激酶, 促使蛋白磷酸化, 操纵离子通道, 促使 Ca^{2+} 跨膜流动; 活化ADP核糖环化酶, 促使钙库释放Ca, 调节磷酸二酯酶, 水解环核苷酸(cAMP), 发挥生理效应。

2.1.3 NO 具有逆向信使作用

它可以由突触后神经元弥散到突触前神经末梢, 影响突触的可塑性, 从而影响突触的发育和分化。这方面研究较多的是NO对海马的学习和记忆性过程中长时程增强(LTP)和小脑的长时程抑制(LTD)的影响(柯开富, 2000)。在海马CA1锥体细胞NMDA受体受到突触前神经末梢释放的递质谷氨酸(Glu)激活, 使 Ca^{2+} 通道开放, Ca^{2+} 内流, 激活钙调蛋白, 活化NOS, 生成的NO作为逆行信使向四周扩散, 透入到突触前末梢内, 活化sGC, 产生大量的cGMP, cGMP又刺激突触前区释放更多的谷氨酸, 形成一个正反馈性的循环。这就是学习和记忆过程中的LTP机理(Carhwaite J, 1991)。Arancio等发现突触后注入NO释放剂能促进LTP形成, 注入NO吸收剂能阻断NO的这种作用。小脑的LTD主要是有小脑颗粒细胞和蓝状细胞激活时使NOS产生NO, 弥散到蒲肯野细胞, 激活其中的sGC, 使cGMP增加, 进而活化cGMP依赖的蛋白激酶, 使MAPA受体磷酸化, 受体构型发生改变, 最终导致受体敏感性下降, 形成LTD。Shibuki等(2001)报道, 刺激小脑爬行纤维能使NO大量释放, 而能分解出NO的硝普钠, 可代替对爬行纤维的刺激而诱发LTD, 血红蛋白和NOS抑制剂(N-甲基转氨酸)能阻断LTD。

2.1.4 NO 对脑血流的调节

NO可调节脑血管张力与通透性。脑血管也像外周血管一样, 其内皮细胞含有eNOS。在生理状态下脑血管内皮细胞持续释放NO, 使脑血管平滑肌维持着一定的舒张状态。多种激动剂和血流剪切力都能刺激脑内皮细胞释放NO。NO弥散到平滑肌细胞或血小板内, 通过激活sGC, 提高脑血管平滑肌cGMP浓度, 从而松弛平滑肌, 扩张血管和抑制血小板凝聚, 阻止白细胞粘附到内皮细胞上。局部应用NOS抑制剂, 可抑制NO的生成, 导致基底动脉的收缩。这种收缩效应能被NO的前体物质逆转。因而认为平滑肌产生的NO是维持血管基本张力的重要生理调节剂, 也可能是脑血管自身调节的机制之一(Dawson TM, 1991)。脑动脉也受NANC神经的支配, NO在NANC神经传递中也起着重要作用。实验证明跨壁刺激可

引起脑动脉舒张,使脑血流增加。这一效应不能被M胆碱能受体拮抗剂或肾上腺素能受体拮抗剂阻断,但可被NOS抑制剂对抗。而L-精氨酸又能逆转NOS抑制剂的作用。因此,脑血流的调节,既可通过脑血管内皮细胞释放NO,可通过NANC神经末梢释放NO,或两者共同参与。故此NO的生理释放,对保持脑血管的通透性,协调脑血流,维持脑的生理机能具有重要的意义。

2.1.5 NO对血脑屏障的调节

在生理状态下,神经元兴奋释放的NO,具有调节血脑屏障的通透性,维持血脑屏障的代谢活动。Janigro等(1999)应用膜片钳技术表明,NO直接或间接通过sGC影响血脑屏障内皮细胞 Na^+ , K^+ 形成的高极化激活电流从而调节离子、营养物质和其他分子的跨血脑屏障转运。Utepbergenov(2001)应用血脑屏障的细胞培养模型,将 159mmol/L 的SNAP(NO的供体剂)加入其中,使血脑屏障通透性增加,当SNAP的剂量为 30mmol/L 时对血脑屏障有保护作用,可见NO对血脑屏障的影响与其浓度有关。目前研究发现,脑毛细血管对NO供体剂的反应主要是cGMP生成的增加,由此推测NO主要作用于sGC通过cGMP而发挥作用

2.1.6 NO对睡眠—觉醒的调节

脑内有很多与睡眠有关的中枢结构分布有NOS,如下丘脑、嗅结节、中脑、脑桥被盖区等。NO对机体睡眠—觉醒的具体的影响作用尚不十分肯定。Dzoljic和Devries(1998)腹腔注射NOS抑制剂L-NMMA对大鼠的觉醒有抑制作用,从而提出中枢神经系统中NO对机体的觉醒有直接兴奋作用。而Levente(2002)却认为NO可维持大鼠正确的睡眠—觉醒活动,主要表现在睡眠方面。两者结果相矛盾。张文慧用NOS抑制剂L-NAME和NO前体L-Arg对大鼠侧脑室微量注射并记录大鼠睡眠—觉醒周期,结果显示:大剂量L-NAME(L-硝基—精氨酸酯 1mg)可抑制大鼠的慢波睡眠,使觉醒增加。这一作用可被NO前体L-Arg所阻断。并认为与Dzoljic等(2000)实验结果的差异可能是注射L-Arg的浓度不同有关。提示NO参与了正常睡眠—觉醒活动的调节。有人认为NO对睡眠—觉醒的调节可能是通过脑内温度的改变而影响机体的睡眠—觉醒周期(张文慧,2000)。有文献报道NO刺激前脑基底部释放ACh,而前脑基底部、中脑以及脑桥内的胆碱能系统与慢波睡眠及异相睡眠有关。NO可影响纹状体内源性多巴胺的释放,多巴胺也是影响机体睡眠—觉醒周期的一个重要因素。

所以NO在脑的发育和功能中作为广泛的多用途的信使而发挥重要的作用。

2.2 一氧化氮对心血管系统的作用

在心血管系统中, NO 来源于血管内皮细胞和平滑肌细胞, 也来源于非肾上腺能非胆碱能 (NANC) 神经末梢。现已证明内源性 NO、NOS 及其抑制剂为一种调节血压的独立体系 (Fazeli MS, 1992)。NO 在维持血管张力素恒定, 血压的稳定及心肌收缩期的调节等方面起着重要作用。在心血管系统中 NO 是具有多种作用的重要细胞信使。NO 是一种很强的血管平滑肌松弛剂, 对冠状动脉有极其重要的血管扩张乃至收缩抑制作用。没有外部刺激, 内皮细胞不断地释放出少量的 NO, 维持平滑肌适当舒张。内皮细胞障碍时, NO 的生成和释放减少, 冠状动脉收缩增强, 甚至痉挛, NO 可能是生理的冠状动脉痉挛阻滞物质。

许多内源性血管活性物质, 如缓激肽、组胺、凝血酶、P 物质和 5-羟色胺等所致内皮依赖性血管舒张, 均系 NO 所介导。

由血管内皮细胞和中性粒细胞释放的 NO 能抑制血小板凝集, 使聚集的血小板解聚, 抑制血小板对血管内皮的粘附。因此, 由内皮细胞释放的 NO 具有抗血管内凝集作用。而且, 血小板聚集时, 自身合成的 NO 能阻止血小板的进一步聚集。外界刺激可致血小板内 Ca^{2+} 增加, 一方面导致血小板聚集, 同时 NOS 被激活, 催化 L-Arg 生成 NO, NO 使血小板胞浆中 Ca^{2+} 暂时贮存, 降低胞内游离的 Ca^{2+} , 减弱血小板的聚集, 从而达到一种动态平衡。另外, NO 和前列腺环素 (PGI₂) 均可扩张血管, 抑制血小板聚集, 二者作用机理不同, 但两者间有协同作用, 抑制血小板聚集和抗血栓形成, 保持血管系统的完整性和维持血流。

2.3 一氧化氮对免疫系统的作用

目前认为, 由精氨酸生成 NO 的过程是一种非特异性免疫机制, 可对抗侵入机体的微生物和病原体, 并对体内肿瘤细胞具有毒性作用 (赵佐庆, 2003)。在内毒素引起的休克中, 由 NOS 体系诱导产生的 NO 可能与休克时的低血压有关。在机体的防御体系中, 巨噬细胞起着非常重要的作用 (Lorsbach RB, 1993)。激活的巨噬细胞可以表现有 NO 合成酶的活性, 它可以使 L-Arg 产生 NO, NO 可以介导巨噬细胞对肿瘤及许多病原体的细胞毒性作用。巨噬细胞被内毒素或 T 细胞激活可释放出 NO, 通过抑制靶细胞线粒体中三羧循环、电子传递和粒细胞 DNA 合成途径, 发挥杀伤靶细胞效应。可以认为内源性 NO 是巨噬细胞发挥杀伤靶细胞效应信使分子。

有证据表明 NO 在急、慢性炎症反应中也起一定作用。NOS 抑制剂能减轻患急、慢性炎症大鼠的炎症程度, 而 L-Arg 则能加重。也有报导 NOS 抑制剂及 NO 供体均能保护机体免受损伤。这可能是 NO 的双重性所决定, 一方面是细胞毒, 另一方面有扩血管及潜在性保护作用, 因此, 在炎症反应中 NO 可能具有多种作用。

2.4 一氧化氮对呼吸系统的作用

NO 是肺循环中一种重要的生理及病理因子。它对降低处于静息状态下的肺部血管阻力有很大作用。研究发现, 非胆碱能、非肾上腺素能神经是通过释放 NO 来调节猪的气管和支气管平滑肌松弛的 (Furchgott RF, 1980), 这说明 NO 在调节气管、支气管的舒张和收缩功能中起重要作用。在支气管哮喘、肺动脉高压等低氧状态下, 由于细胞对氧利用的能力降低, 使得内皮细胞中 NO 的生成减少, 这对低氧性肺血管收缩及痉挛有一定的影响。另外, 作为一种有效的肺血管扩张剂, 机体吸入 NO 对于肺动脉高压及支气管哮喘等疾病均有显著疗效。

2.5 一氧化氮对消化系统的作用

实验证明 NO 是抑制性 NANC 神经传递和调节介质。外源性 NO 能引起酷似 NANC 神经刺激下胃肠道平滑肌松弛作用。Stark (2004) 等发现 NO 能引起平滑肌松弛和胃肠运动抑制。NO 拮抗剂能增加猫的食管下括约肌和胃底基础张力, 增加胃体和胃窦自发收缩的频率和振幅。已证实进食引起胃舒张是通过释放 NO 调节。NANC 神经受刺激时, 直接产生 NO-cGMP 增加, 胞浆内 Ca^{2+} 下降或收缩成分对 Ca^{2+} 敏感性下降, 平滑肌松弛。

NO 在调节胃、肠和胰腺等分泌中也起重要作用。用硝基硫醇和硝普钠等含 NO 的药物灌注大鼠胃, 能引起粘膜上皮细胞 cGMP 浓度增加, 粘液的分泌增多和粘液层增厚。此作用可被 N-硝基-L-精氨酸阻断, 用 L-Arg 使之增强。Warzecha (2003) 发现 L-NNA 抑制降钙素所致胰蛋白分泌, L-Arg 增加胰腺的基础分泌和降钙素刺激的分泌, NO 在调节胰腺泡分泌中起重要作用。

NO 可能是重要的胃粘膜血管扩张调节介质。NO 调节胃粘膜血管基础张力, 抑制 NO 合成能减少胃粘膜血流, NO 拮抗剂能减少胃泌素引起的胃粘膜血流增加。胆囊收缩素、乙酰胆碱和激肽等介质引起的胃粘膜血流增加均依赖血管内皮细胞释放 NO, 说明 NO 不仅直接扩张血管, 而且是其他扩张血管和增加粘膜

血流调节介质的协同剂或终末介质。NO 对胃粘膜的保护作用已被很多学者所证实。NO、硝酸甘油、硝普钠和 L-Arg 等明显减轻酒精性胃粘膜出血。静脉注射 L-*N*-NNA 能增加阿司匹林对大鼠胃粘膜出血。用 L-Arg 使之减轻。NO 对胃粘膜保护作用的机制除扩张血管外,还可能与抑制胃粘膜微循环的血小板凝集、改变血管通透性和增加胃粘膜上皮的保护功能及完整性有关。NO 对胃粘膜的保护作用对于进一步深入研究粘膜屏障功能以及 NO 在胃粘膜充血,糜烂和增生等疾病的病理过程、临床诊治和预防等方面均具有重要价值。

2.6 一氧化氮与寄生虫感染

James等(1989)在研究巨噬细胞抗曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)的机制时就已发现,巨噬细胞吞噬曼氏血吸虫的作用需要有由精氨酸生成的氮代谢物的参与,因此他首先提出了NO可能具有抗寄生虫的作用。Ra—maswamy(1997)则发现,接种经 γ 射线灭活的曼氏血吸虫尾蚴的小鼠,其皮肤内, NOS表达水平明显升高。Oswald(1994)在体外用IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子对内皮细胞进行处理后,发现内皮细胞产生了抗曼氏血吸虫的作用;然而在给予NO合成抑制剂后,内皮细胞则失去了抗血吸虫作用。实验结果表明,内皮细胞对抗曼氏血吸虫的免疫过程发挥重要作用,而内皮细胞的这一作用是由NO介导的。

3 NO与脑疾病的关系

3.1 NO与癫痫(ES)

NO可调节递质的释放,并受内源性谷氨酸和GABA能系统的调节,在致癫和抗癫中起重要作用。

3.1.1 NO的致癫作用

癫痫的发生主要与兴奋性神经递质的增加或抑制性神经递质减少,神经元膜兴奋增加或抑制性减弱相关。如谷氨酸释放过多, N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体持久激活,产生过量的NO,可能是致癫的一个重要机制。

在离体或在体的动物实验以及临床的研究中都发现,NO参与了癫痫的发生发展的病理过程。Tutka(2003)将NO前体(L-Arg)注入海人酸(KA)诱导癫痫动物模型的梨状皮中,可引起癫痫样发作;腹腔注射KA可使杏仁核及颞叶皮层NO形成增加;NOS抑制剂如L-NAME、7-硝基-1-吡唑(7-NI)等可对抗谷氨酸,NMDA,

KA等诱导的癫痫模型的致病作用。陆巍嘲等观察青霉素对大鼠海马脑片致病时NO释放的变化,发现NO的产生与致病因子青霉素浓度有正相关关系,痫波的发展程度与NO浓度变化也是一致的,当用NOS抑制剂使NO浓度降低时,脑片痫波亦减少。提示了NO可能参与了致病作用。

NO致病机制可能与致病剂使NMDA及非NMDA受体兴奋,引起脑内Ca²⁺浓度升高, Ca²⁺-CaM复合物形成增多,大量激活NOS,使NO产生增多。后者通过选择性sGC信号转导激活cADP核糖化酶引起细胞Ca²⁺内释放,升高的Ca²⁺即可以引起细胞的去极化产生异常放电,导致癫痫的产生及迅速传播;另一方面胞内Ca²⁺可大量增加谷氨酸的释放,从而加剧癫痫发作的恶性循环。

3.1.2 NO的抗癲作用

NO也可能参与了抗癲过程。已发现一种癲痫易感突变ddY小鼠EL小鼠,其脑中NADPH黄递酶阳性细胞明显减少;癲痫易感的蒙古沙土鼠脑NOS活性较癲痫不易感的蒙古沙土鼠明显低下(Hashikawa T,1997)。L-Arg可抑制KA诱导的发作,NOS抑制剂NNA, L-NAME, L-NOArg可加剧KA, GABA受体抑制剂,戊四唑对大鼠的致病作用,并使致病死亡率增加。硝普钠能在体内释放出NO,能抑制青素诱发的癲痫样波的发放。以上实验均说明NO在中枢神经系统内源性抗癲痫起重要作用。

由于NMDA受体的过渡激活使Na⁺, Ca²⁺等离子内流增多,引起异常放电,是导致癲痫发作的重要原因,因此有人认为NO增加,竞争性阻断NMDA受体上氧化还原位点,促进二硫键的形成,使NMDA诱导的Ca²⁺内流下降。这种负反馈作用与NO的抗癲痫作用有关。

3.2 NO与帕金森病

帕金森病(PD)是原发于黑质纹状体的变性病。代谢缺陷主要表现在黑质纹状体通路中多巴胺能神经元的退变和消失,多巴胺(DA)缺乏之。临床症状主要有随意运动减少,肢体震颤,肌僵直以及正常的姿势反射丧失。近年研究认为,NO可能参与了帕金森病的发生及黑质细胞的损伤作用(Melis MR,1994)。

在人体或MPTP(1-甲基-4-苯基-1,2,3,6四氢吡啶)--PD的动物模型的研究中发现,MPTP能选择性的损伤黑质纹状体DA通路,使纹状体DA含量降低,从而引起临床、生化和神经病理等改变。MPDP在单胺氧化酶(MAO-B)作用下转

化成活性产物MPP⁺, MPP⁺被多巴胺受体选择性摄取积聚于线粒体中,引起线粒体氧化磷酸化的崩解,导致钙离子内流,从而激活nNOS,致使NO的大量产生。过量的NO具有细胞毒性作用,导致DA能神经元的死亡,致使DA含量显著降低。

Mattews等(2001)应用nNOS和eNOS基因敲除的变异小鼠分别注入MPP⁺,发现nNOS基因敲除的变异小鼠黑质神经元变性减弱,而eNOS基因敲除的变异小鼠无变化。以上研究说明NO参与了PD的发生发展过程。

最近研究表明,NO还可能通过兴奋性神经毒性作用参与PD的发病。NO通过NMDAR介导的兴奋性神经毒性作用与DA能神经元变性有关谷氨酸浓度增加不仅可使线粒体呼吸链氧化磷酸化受阻,Na⁺-K⁺-ATP酶受损,使细胞膜发生缓慢去极化,导致神经细胞对神经毒作用敏感性增高,细胞变性死亡;同时也可以激活NMDAR,导致Ca²⁺内流,活化nNOS产生过量的NO,NO与氧结合产生毒性更强的自由基,引起强烈的神经毒性,导致神经元死亡。另外,NO可能间接或直接影响Na⁺、K⁺、Ca²⁺通道,使神经兴奋性增高,导致神经毒性。这一“缓慢性毒性作用”被认为是神经变性疾病如PD、AD等细胞死亡机制。

3.3 NO与脑缺血

目前研究已基本确定了NO在脑缺血时起了神经毒性作用。研究表明,外源性或内源性NO过量产生或释放时,具有神经毒性(王晓娟,2000)。体外培养大脑皮质、海马及纹状体细胞的实验中,NO供体药硝普钠可引起类似NMDA的神经毒性作用,且这种毒性作用可被能与NO结合的血红蛋白所阻断。NOS抑制剂或去除NO前体L-Arg,均显著减轻N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)的神经毒性作用,该保护作用可被过量的L-Arg逆转。这表明NO在脑缺血发病机理中起重要作用,如减少NO的产生,则可在一定程度上防治脑缺血或减轻脑缺血损伤的程度。

关于NO在脑缺血发病机理中的作用,一般认为是在脑缺血时,谷氨酸释放增加,使NMDA受体激活,化学递质门控性钙通道过度开放,大量Ca²⁺内流并与钙调蛋白(camodulin, CaM)结合。CaM直接调节的NOS被大量激活,导致合成过量的NO,NO通过超氧自由基起细胞毒性作用,破坏细胞蛋白质、核酸及脂质膜的损伤,并可与含铁-硫的酶如琥珀酸氧化还原酶、顺乌头酸氧化还原酶形成复合物,使酶失活,阻断细胞内能量合成及DNA的复制;NO还可使糖酵解中的甘油醛-3-磷酸脱氢酶亚硝酰化,使催化位点单ADP-核糖化,使酶失活,迅速导致能量耗竭。

3.4 NO 与蛛网膜下腔出血(SAH)

人体内血管内皮细胞产生释放的 NO 对脑血流维持有着重要作用。Afshar 等(1999)实验采用健康 Wistar 大鼠随机分为模型组和对照组进行观察血清和脑组织中 NO 含量变化,结果发现有显著性差异,模型组血清中 NO 含量明显低于对照组,脑组织中 NO 含量仍较对照组高。由此可见,SAH 后血清 NO 含量明显减少是导致脑血管痉挛和微循环异常,从而引起脑缺血发生的主要缘故。另外,其与血管内皮细胞功能异常而产生的 NO 可减少,以及氧合血红蛋白等对 NO 的猝灭有关。近年 Bredt(2000)等研究发现,SAH 后 24h 内脑组织 NO 含量显著增加,这可能与缺血时谷氨酸过度释放引起 Ca^{2+} 内流,从而使神经元或胶质细胞 eNOS 和 iNOS 激活或过量表达有关,或因能量产生不足使 NOS 去磷酸化而活性增强。脑组织高浓度的 NO 可通过介导谷氨酸毒性或抑制线粒体的呼吸,而加重缺血性神经元损伤。

3.5 NO 与老年性痴呆(AD)

记忆缺损是AD的一个主要特征,这涉及到记忆机制的研究。研究表明,脑神经元产生的NO作为中枢神经系统中的一个反馈信息分子,可从突触后迅速扩散到突触前末梢,作用于突触前膜上的鸟苷酸环化酶上,引起谷氨酸的释放,这对于中枢神经元的一种记忆模式—LTP的建立是必需的(Amir S,1995)。NO能维持正常的学习记忆功能,这与学习记忆功能相关脑区含NOS神经元丢失、减少的现象相一致。

3.6 NO 与病毒性脑炎

Koprowski 等(1997)采用逆转录—聚合酶链式反应(PT-PCR)技术,研究了大鼠、小鼠实验性过敏性脑炎和病毒感染后脑组织 NOSmRNA 的表达,发现 NOSmRNA 的表达先于症状出现,其表达量与临床症状及炎症反应程度相一致。

NO 对帕金森氏症和脑炎的损伤机理一般也归于 NO 与 O_2^- 反应生成强毒性的 ONOO⁻,其分解为 OH· 和 ·NO₂ 自由基,通过脂质过氧化而加剧神经元的损伤,在 PD 中,NO 对 DA 的释放还有调节作用,NO 可在小剂量时依剂量依赖方式促进 DA 的释放,因此大量 NO 的产生对 DA 的损伤作用具有协同、加强作用。

3.7 NO 与偏头痛

近年发现 NO 在偏头痛产生机制中是一个十分关键的分子。持续静脉注射硝

酸甘油,可引起剂量依赖性的反复发作性头痛,而机体其它任何部位并无疼痛。停止注射硝酸甘油,则头痛很快消失。正常受试者预先用组胺受体拮抗剂美吡拉敏可阻断组胺引起的头痛,但对硝酸甘油引起的头痛无影响,因此,硝酸甘油引起的头痛与组胺无关。近年有证据表明,组胺引起灵长类动物及人颅动脉扩张的作用主要通过激活内皮细胞 H1 受体,诱导 NO 生成而实现 (AnggardE,1990),说明 NO 参与了偏头痛的发作。NO 引起头痛的机制尚不清楚,可能与它引起的脑血管扩张有关,也可能由于 NO 可直接作用于血管周围感觉神经而引起头痛。

3.8 NO 与惊厥性氧中毒

王文俊等研究发现,氧惊厥时大鼠海马突触体内游离钙离子浓度和作为一氧化氮合成水平指标的cGMP浓度均升高,而应用NOS抑制剂L-NNA可使突触体内游离钙离子和cGMP浓度分别下降至氧惊厥组的70%和36%。李金声等(2001)研究了在0.25MPa的高压氧下不同暴露时间大鼠纹状体、下丘脑和黑质的NOS阳性细胞数的改变,发现暴露1h后,NOS阳性细胞数无显著性改变,而暴露4h、7h后NOS阳性细胞数明显增加($P < 0.05$),暴露7hNOS阳性细胞数比暴露4h的显著增多($P < 0.05$)。Oury等应用NOS抑制剂L-NNA对脑内过度表达人细胞外超氧化物歧化酶的转基因大鼠和非转基因的大鼠进行了研究,发现NOS有显著的防护氧惊厥作用,可延缓惊厥发生的时间,增加动物的生存率,表明NO对中枢神经系统型氧中毒的发生具有重要作用。其作用机理为:①NO作为血管扩张剂,减轻高压氧源性的血管收缩,增加脑组织的氧化作用,引起中枢神经系统氧毒性;②NO作为兴奋性氨基酸作用的递质,介导兴奋毒性;③NO抑制线粒体呼吸链中的电子传递,导致ATP的耗竭,细胞死亡;④NO与 O_2 反应生成ONOO⁻,进而损伤神经细胞。对于NO作用机制,Zhang等也作了试验,研究发现NOS抑制剂L-NAME并不降低高压氧(4ATA)暴露时的皮层脑血流量(CBF)和组织氧分压,对上述的机理提出了异议。因此,NO在氧惊厥发生中的作用机理尚需深入研究。

4 NO 的作用机理

NO 从合成的细胞部位到达靶细胞的运输方式目前尚未阐明,大多数认为仅仅是简单的气体物理扩散,但也有人提出 NO 可能是与一种未知的载体分子结合,才能到达靶细胞,此种载体分子可能是半胱氨酸或含硫蛋白质。到达靶细

胞后, NO 从载体释放并透过靶细胞膜进入细胞。NO 与鸟苷酸环化酶 (GC) 的 Fe^{+} 结合, GC 被激活, 细胞内 cGMP 增加, 继而发挥松弛平滑肌, 抑制血小板聚集及中枢神经传导等生理功能。

5 NO 的检测方法

自从发现NO的生物作用以来, 随着研究的深入, 已在各个系统许多组织中发现不同类型的NO存在, 由于受NO不稳定、易扩散、半衰期短等物理性质的局限, 许多工作只限于依靠检测NO合成副产物L-胍氨酸、NO舒张血管的生理效应、GC的刺激、血小板粘聚的抑制等来间接推测NO水平而不知局部NO的实际浓度, 给研究NO在生物体中的作用、其它因素对这种作用的影响、以及这种作用在最终的生物效应中所占比重等方面带来了困难。Kikuchi等用化学荧光方法, 虽然灵敏度很高, 但实验非常耗时, 要求实验空间较大。Mal等(1992)首先发明了利用电化学方法检测NO水平的技术。利用这种技术, 可以检测离体组织、单离细胞, 在体组织NO的释放。

NO的检测手段已从免疫组化法, 化学荧光法, 发展到电化学方法, 从间接推测到直接测定, 从离体到在体原位, 不仅实验的精确度提高, 而且可以观测在体条件下各种药物、生理刺激对NOS / NO系统的影响, 大大推动了此项研究的进程。但是使用不同NO检测器者, 由于对一些材料如碳纤维、铂丝、叶附等的认识不同, 造成目前报道的检测器种类较多。究竟孰优孰劣, 有待于进一步验证。

6 NO在兽医领域的研究进展

我国在医学领域上有关No的研究进展较快, 也较深刻, 例如我国首都医科大学李慧珠教授等(1994, 1997, 1998)对NO在疟疾发病机理中作用的研究。其研究内容包括肿瘤坏死因子(TNF)对巨噬细胞表面受体表达和吞噬功能的影响以及探讨TNF耐体内杀伤疟原虫机制等。此外, 有关NO对人心血管、肺部、神经系统等疾病治疗方面也有不少报道。在兽医领域上有关NO的研究尚很少, 美国衣阿华州立科技大学兽医药理学家弗兰克林·A·艾伦斯(Franklin A. Ahrens)正从事NO在犬IBD中作用的研究。国外只有美国农业部农业研究中心的Allen正式发表了有关NO在球虫感染中的作用的研究, 但在艾美耳球虫感染过程中NO究

竟起什么作用目前尚不清楚。

7 本课题的研究内容和意义

目前 NO 的研究方兴未艾,并形成了一门独立学科,而国内在这方面的研究与国际先进水平相比差距较大。近年来的研究表明, 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。NO 是由一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸产生的。当内源性 NO 产生或机能障碍,将直接导致某些疾病的发生,尤其是心脑血管疾病和神经系统疾病的发生。在神经系统, NOS 共有 3 种亚型: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。虽然对 NO 和 NOS 的研究已取得突破性进展,但尚有许多未知领域值得研究,尤其是 NOS 在脑部分布的研究甚少,而且以往的研究多集中在大鼠类,而在兔脑内的分布研究还未见系统的文献报道。本研究利用 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、结构和分布进行系统研究,为全面揭示兔脑 nNOS 阳性神经元的生长发育规律,探讨 NO 在中枢神经系统中的作用和作用机制,为神经系统疾病的研究,尤其是神经病理生理学研究提供形态学依据。

试验一、nNOS 阳性神经元在家兔大脑皮质的 形态分布和发育变化

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验用兔

10 日龄仔兔、30 日龄的仔兔、3 月龄的幼兔、6 月龄的青年兔、9 月龄的青年兔、12 月龄的成年兔、24 月龄及 36 月龄的老年兔，共 8 组，每组 10 只，雌雄各 5 只。所用兔均由泰安和肥城兔场提供。

1.1.2 试验场地及预备试验

本实验主要在山东农业大学动物科技学院神经解剖学和生物学教研室、生物切片室展开。正式实验前进行预备实验。

实验前先对家兔进行一段时间的饲养，以消除因场地改变带来的应激，防止由此引起 nNOS 阳性神经元及 nNOS 活性的改变，影响实验结果。

1.1.3 试剂

多聚甲醛（天津市化学试剂研究所）

NaCl（天津市百世化工有限公司）

Na₂H₂P₃O₄ · 12H₂O（天津市大茂化学试剂厂）

NaH₂P₃O₄ · 2H₂O（天津市大茂化学试剂厂）

L-多聚赖氨酸（北京鼎国生物技术发展中心，Sigma 公司分装）

nNOS 一抗（武汉博士得生物工程公司）

即用型 SABC 免疫组化试剂盒（武汉博士得生物有限公司）

DAB 显色试剂盒（武汉博士得生物有限公司）

复合消化液（武汉博士得生物有限公司）

二甲苯，酒精，苏木素，中性树胶，载玻片，盖玻片

1.1.4 主要试验仪器

电子天平 (BS110S 型, 北京赛多丽斯天平有限公司)

移液器 (德国 Brand)

电热恒温干燥箱 (WS202-, 上海吴淞五金厂)

隔水式电热恒温培养箱 (GNP-9080 型, 上海精宏实验设备有限公司)

石蜡切片机 (LEICA RM2135)

数显恒温水浴锅 (HH-4, 国华电器有限公司)

电热培养箱 (黄骅市卸甲综合电器厂)

光学显微镜 (OLYMPUS JAPAN) 及显微镜目镜直形测微尺和网格测微尺 (上海光学仪器厂)

显维照相机 (OLYMPUS JAPAN)

容声冰箱 (容声 BCD-209S/E, 科龙电器)

湿盒 (自制), 组织针 (自制), 切片架 (自制)

染色缸 (泰安化学试剂玻璃仪器化验设备批发中心)

1.2 方法

1.2.1 取材与制片

耳缘静脉注射 20% 的氨基甲酸乙酯 (5mL/kg 体重) 麻醉, 将兔仰卧位固定于手术台上, 剑突下 'V' 字形迅速剪开胸壁。打开胸腔, 充分暴露心脏。左心室插管, 灌注生理水 100~300mL, 同时剪开右心耳放血, 待流出液清亮后立即改用 4% 的多聚甲醛磷酸缓冲液固定液 (PH7.4) 灌注。先快后慢, 当家兔机体变硬, 尾巴震颤时停止灌注 (约 0.5~2h)。立即完整取脑, 并放入同种固定液固定 3~5h。固定好的脑, 沿正中矢状面纵切成 2 部分, 然后将延髓、脑桥、中脑、间脑、端脑分开并取下, 流水冲洗, 经 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 乙醇脱水后, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 制成厚度为 5um 的切片, 取两套: 一套尼氏染色, 用以核团定位; 另一套做免疫组化染色。免疫组化染色如下:

1.2.2 免疫组化染色

载玻片防脱片剂处理: 用 Poly-Lysine 处理, 捞片后置于 58-60°C 30-60min

以上使切片紧密粘附→切片常规脱蜡至水→3%水H₂O₂室温5-10min灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗3次→滴加复合消化液5-10min, 蒸馏水洗3次→滴加正常山羊血清封闭液, 室温20min, 摔去多余液体, 不洗; 滴加稀释度为1:100的一抗(兔IgG), 37℃1h左右或者20℃2h左右, 也可4℃过夜, PBS(PH7.2-7.6)洗2min×3次→滴加生物素化羊抗兔IgG, 20-37℃20min, PBS(PH7.2-7.6)洗2min×3次→滴加试剂SABC, 20-37℃20min, PBS(PH7.2-7.6)洗5min×4次→DAB显色: 使用DAB显色试剂盒室温显色5-30min, 蒸馏水洗→苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜观察。

阴性对照用0.01mol/L PBS代替一抗. 其余步骤同上。

1.3 观察和测量

每个样本取6张切片, 在低倍镜下(100×)用显微镜目镜测微网尺分别计数大脑皮质各个部位单位面积nNOS阳性神经元的数目, 计算平均值。在高倍镜下(400×), 随机选以上部位内的NOS免疫反应阳性神经元40~50个, 测量其胞体直径和突起长度, 计算平均值。

参照包新民等编写的大鼠脑立体定位图谱(包新民, 1991), 确定额、顶、枕、颞叶皮质的位置, 镜下观察并用网形测微尺计数和测量皮质各叶中NOS阳性神经元的数目。计算各皮质中单位面积内nNOS阳性神经元的数目。

1.4 数据统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果用SPASS软件进行统计学处理, 方差分析, 行组间的两两比较, 以P=0.05为显著性水准, 判断各组之间的差异是否具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 nNOS 阳性神经元的形态特征

我们在光镜下观察了家兔脑的大脑皮质的冠状切面, 结果显示大脑皮质有nNOS免疫阳性神经元和神经纤维出现。nNOS免疫阳性神经元呈棕黄色, 均匀分布于阳性神经元细胞核周围的胞质内, 细胞核处颜色浅淡。神经元的形态多样化。胞体呈梭形、三角形、圆形、椭圆形、梨形、不规则形等多种形状。突起长短不一, 多寡不同, 粗细不等, 切面上可见1~4条突起直接起于胞体, 有的

突起根部粗, 分支可达 3 级有的突起很细, 数条均起自胞体呈胡须状。nNOS 免疫阳性神经纤维呈棕色串珠状且交错分布。主要分布于大脑皮质的 II-VI 层。在大脑皮质的额叶、顶叶、枕叶、颞叶、边缘叶、梨状叶中, 通过横向比较发现, 额叶、顶叶等细胞较多, 但各叶间疏密程度镜下观察无明显差异。

2.2 各叶中 nNOS 阳性神经元的特征

2.2.1 SABC 免疫组化反应结果

2.2.1.1 额叶 nNOS 阳性细胞在额叶主要分布于 III、IV 层, 染色较淡, 突起多为 2~3 个 (见图 1、图 18)。

2.2.1.2 顶叶 nNOS 阳性神经元分布于顶叶的 II-VI 层, 胞体呈现梭形、圆形、卵圆形、三角形不等, 染色浅淡, 突起少, 长短不等 (见图 2)。

2.2.1.3 枕叶 nNOS 阳性神经元在大脑皮质枕叶 II-VI 层均有散在分布。其中以 II、III 层和 V、VI 层为多, 从形态上看, 两种细胞都属于非锥体神经元, 多呈圆形、卵圆形、梭形和三角形; 胞体较大, 突起明显, 有的突起延伸很长且反复分支, 免疫组化染色使胞质和突起呈棕色。胞核不着色, 核仁清晰可见。此外, 在枕叶皮质各层分布有棕褐色的 nNOS 阳性神经纤维, 呈小串珠状 (见图 3)。

2.2.1.4 颞叶 皮质颞叶内 nNOS 阳性神经元, 除皮质 I、IV 层以外, 其余各层均有散在分布, 以第 V 层最为明显。一般来说 II、III、V、VI 都有 nNOS 阳性神经元, 神经元胞核淡染, 胞膜轮廓清晰, 胞体亦有锥体形、圆形或椭圆形、梭形三种。第 II、III 层为小圆形或椭圆形细胞, 小锥体形细胞, V 层为大锥体形细胞, 突起长, 伸向分子层, VI 层为上述各形细胞 (见图 4)。

2.2.1.5 边缘叶 nNOS 阳性神经元也散在的分布于边缘叶, 神经元胞体形状以圆形、椭圆形居多, 三角形, 梨形也有; 突起明显, 数目多, 且相互交织, 并见明显的串珠样, 显示 Golgi 染色样外观 (见图 5)。

nNOS 阳性神经元的密度、胞体截面积、突起数、突起长度 (见表 1-1~4)。

表 1-1 各年龄段家兔大脑皮质各叶 nNOS 阳性神经元密度

Table 1-1 The density on nNOS in brain cortex of each age rabbit

年龄	额叶(个/mm ²)	顶叶(个/mm ²)	枕叶(个/mm ²)	边缘叶(个/mm ²)	颞叶(个/mm ²)
10d	5.87±0.29A	6.20±0.26A	5.73±0.28A	3.93±0.33A	4.40±0.25A
1m	5.80±0.30A	6.13±0.29A	5.67±0.30A	3.87±0.31A	4.33±0.25A
3m	5.67±0.30A	6.00±0.22A	5.60±0.27A	3.80±0.29A	4.27±0.25A
6m	5.40±0.27A	5.80±0.22A	5.53±0.22A	3.73±0.27A	4.13±0.27A
9m	5.27±0.28A	5.67±0.16A	5.47±0.24A	3.67±0.29A	4.00±0.28A
1y	5.20±0.22A	5.53±0.24A	5.40±0.21A	3.60±0.27A	3.87±0.26A
2y	3.93±0.25B	4.47±0.27B	3.53±0.32B	1.73±0.18B	2.60±0.19B
3y	3.53±0.34B	4.00±0.32B	3.27±0.37B	1.67±0.21B	2.47±0.22B

注：同一列标有不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)，不同大写字母表示差异极显著 (P<0.01)，以下同。

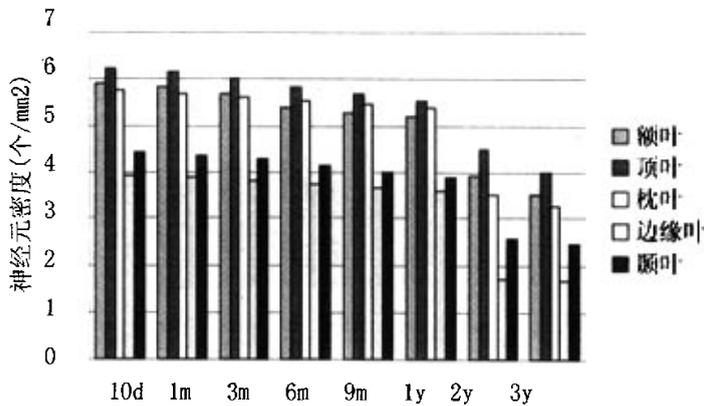


图 1-1 nNOS 阳性神经元的密度

从图中我们看出，大脑皮质各叶 nNOS 阳性神经元的密度随年龄增长逐渐降低；在大脑皮质额叶、顶叶、枕叶 nNOS 阳性神经元的密度相对较高，而边缘叶稍低。

表 1-2 各年龄段家兔大脑皮质各叶 nNOS 阳性神经元第一级突起数

Table 1-2 The first tuber number on nNOS in brain cortex of each age rabbit

年龄	额叶(个)	顶叶(个)	枕叶(个)	边缘叶(个)	颞叶(个)
10d	2.87±0.17A	2.53±0.17A	2.60±0.19A	2.67±0.19A	2.73±0.18A
1m	2.80±0.14A	2.40±0.16A	2.53±0.17A	2.60±0.19A	2.67±0.19A
3m	2.67±0.13A	2.27±0.18A	2.40±0.16A	2.47±0.17A	2.53±0.17A
6m	2.47±0.19A	2.13±0.17A	2.27±0.15A	2.40±0.13A	2.47±0.13A
9m	2.40±0.19A	2.00±0.20A	2.13±0.19A	2.27±0.18A	2.33±0.16A
1y	2.37±0.19A	1.93±0.13A	2.07±0.13A	2.23±0.13A	2.20±0.16A
2y	1.67±0.19B	1.27±0.12B	1.33±0.13B	1.33±0.13B	1.40±0.13B
3y	1.40±0.16B	1.13±0.09B	1.20±0.11B	1.20±0.11B	1.27±0.12B

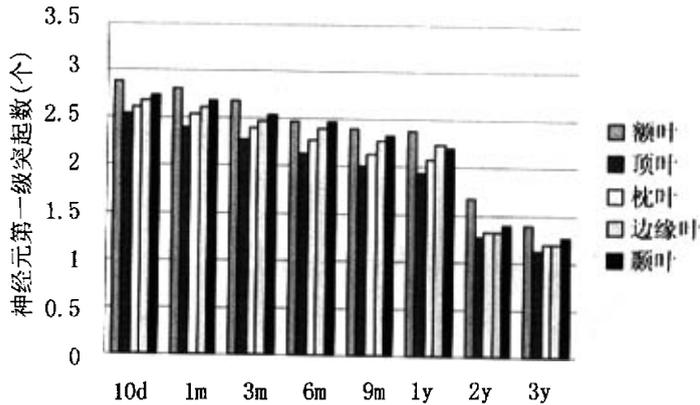


图 1-2 nNOS 阳性神经元第一级突起数

从上图可知,大脑皮质各叶 nNOS 阳性神经元的第一级突起数表现出年龄越大数量越少的特点,并且各叶突起数差别甚小。

表 1-3 各年龄段家兔大脑皮质各叶 nNOS 阳性神经元最长突起长度

Table 1-3 The tuber length on nNOS in brain cortex of each age rabbit

年龄	额叶 (μm)	顶叶 (μm)	枕叶 (μm)	边缘叶(μm)	颞叶 (μm)
10d	142.47±5.44Aa	147.80±5.37A	151.80±5.42A	151.20±5.39A	157.27±5.41A
1m	141.53±6.11A	146.73±5.98A	150.80±5.98A	150.07±5.89A	156.13±5.88A
3m	137.93±4.74A	141.07±3.92A	145.13±3.96A	144.60±3.96A	150.47±3.96A
6m	131.93±5.18A	137.00±5.14A	141.13±5.14A	140.67±5.12A	146.80±5.12A
9m	128.00±6.61A	133.67±6.41A	138.40±6.03A	137.93±6.01A	144.20±5.98A
1y	126.53±6.72Ab	132.67±6.53A	136.73±6.62A	136.30±6.34A	143.00±6.33A
2y	106.93±1.41B	112.07±1.81B	116.07±1.81B	115.47±1.95B	121.47±1.95B
3y	105.20±1.41B	110.20±1.41B	114.20±1.41B	113.53±1.67B	119.53±1.67B

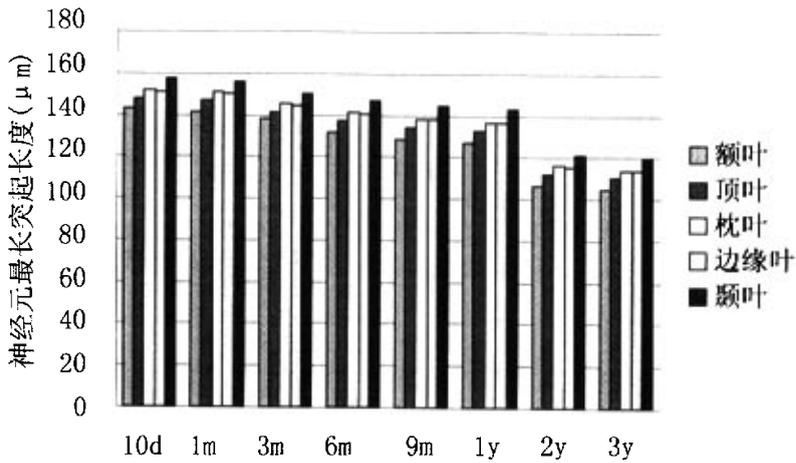


图 1-3 nNOS 阳性神经元最长突起长度

从表中可知, nNOS 阳性神经元的 longest 突起长度也是随年龄增长逐渐变短。

表 1-4 各年龄段家兔大脑皮质各叶 NOS 阳性神经元胞体截面积

Table 1-4 The section area on nNOS in brain cortex of each age rabbit

年龄	额叶(μm^2)	顶叶(μm^2)	枕叶(μm^2)	边缘叶(μm^2)	颞叶(μm^2)
10d	422.33B (14.47)	427.67B (14.49)	436.93B (14.54)	434.80B (14.57)	437.67B (14.56)
1m	429.93B (14.45)	435.20B (4.42)	444.47B (14.46)	442.27B (14.42)	445.20B (14.44)
3m	435.73B (15.51)	440.93B (14.31)	450.00B (14.36)	447.93B (14.34)	450.80B (14.37)
6m	439.87B (14.18)	445.13B (12.98)	454.20B (13.00)	452.27B (12.99)	455.20B (12.97)
9m	446.00B (12.54)	451.20B (11.55)	460.13B (11.56)	458.07B (11.55)	460.73B (11.55)
1y	444.67Bc (8.98)	455.00B (8.68)	467.93B (10.33)	463.80B (10.58)	468.67B (10.35)
2y	486.93A (2.94)	492.07A (2.93)	501.00A (2.93)	499.27A (2.87)	502.20A (2.88)
3y	491.47A (3.24)	497.21A (3.38)	505.47A (3.24)	503.33A (3.23)	506.20A (3.24)

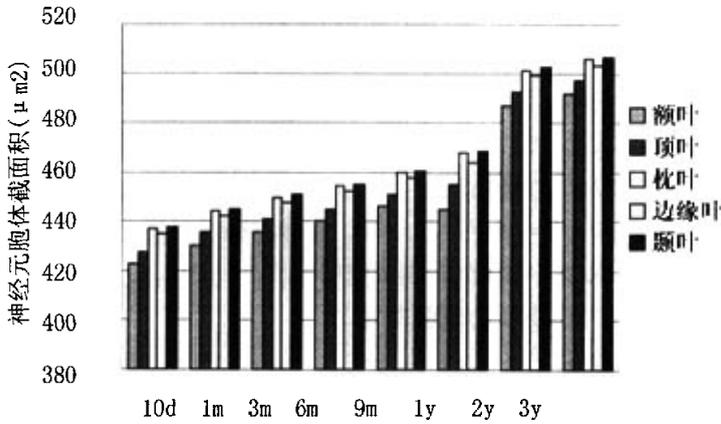


图 1-4 nNOS 阳性神经元的胞体截面积

从表 1-1 到表 1-4 中可看出随着年龄的增长家兔大脑皮质各叶中 nNOS 阳性神经元的密度逐渐降低、第一级突起数逐渐减少、最长突起长度逐渐变短，胞体截面积逐渐变大；成年前的各个年组之间，无论密度、第一级突起数、最长突起长度还是胞体截面积均表现差异不显著 ($P>0.05$)，而上述各组与老年组却表现差异极显著 ($P<0.01$) 从而表明家兔 nNOS 阳性神经元在 10 天就已经发育到成年水平，到了老年开始出现明显的衰老变化。

3 讨论

3.1 关于 nNOS 阳性神经元的密度、突起变化

nNOS 阳性神经元密度、第一级突起数和最长突起长度的急剧变化都主要表现在老年后，随着衰老的延续而急剧下降，表达强度减弱，由此催化产生的 NO 减少，这可能与老年动物脑功能衰退有密切关系。突起数减少、突起长度的改变将会影响反射活动，可以推测这也是引起神经系统功能衰退的一个方面；另一方面，NO 是一种活泼的自由基，能同氧发生反应，引发一系列的自由基反应，对细胞膜性结构产生破坏作用，也是 NO 参与大脑衰老的一个机制。由此可知：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。

3.2 关于 nNOS 阳性神经元胞体截面积的变化

大脑皮质 nNOS 阳性神经元胞体截面积在进入老年前呈平稳递增的趋势,进入老年后变的非常明显。随着衰老的延续胞体的截面积增大,截面积增大表明细胞体积增大。导致细胞体积增大的可能原因,其一由于衰老时部分细胞丢失,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;其二是细胞退行性改变过程中的一种改变形式。Uttenthal 等(2000)用硝基酪氨酸免疫反应研究了老年大鼠大脑皮质的细胞变化,发现大脑皮质的 nNOS 强免疫反应神经元胞体膨胀,有些胞体内有空泡和碎片出现,有些有斑块状沉淀物出现,细胞的轮廓不规则,有棘(突起)的缺失。本研究所观察到的老年兔 nNOS 阳性神经元胞体直径增大可能同上述物质的出现有关。

目前,有关大脑皮质 nNOS 阳性神经元的衰老变化的研究较少,许多推论还有待进一步探讨。

总之,NO 在衰老过程中的变化与衰老之间可能是一种伴随关系,也可能是存在着某种因果关系,其机制如何,仍需进一步研究。

试验二、家兔小脑皮质 nNOS 阳性神经元的 形态、分布及发育变化

1 材料与方法

1.1 材料

同试验一。

1.2 方法

同试验一。

1.3 观察和测量

同试验一。

1.4 数据统计分析

同试验一。

表 2 小脑皮质 nNOS 阳性神经元的密度、胞体截面积、第一级突起数、最长突起长度

Table The density, section area, first born tuber number, furthest protuberance length
on nNOS in cerebellum of each age rabbit

年龄	神经元密度(个/mm ²)	胞体截面积(μm ²)	第一级突起数(个)	最长突起长(μm)
10d	30.87±2.86 A	422.40±14.48B	2.87±0.19A	153.93±5.14A
1m	29.47±2.65A	430.07±14.43B	2.80±0.17A	152.87±5.33A
3m	28.47±1.81A	435.87±15.55B	2.73±0.21A	145.27±3.96A
6m	27.27±1.91A	440.00±14.23B	2.60±0.16A	141.60±5.16A
9m	26.60±1.62A	444.80±12.24B	2.53±0.13A	140.47±5.88A
1y	26.07±1.38A	446.40±11.88B	2.47±0.13A	139.40±6.60A
2y	14.07±1.58B	487.07±2.93A	1.73±0.15B	116.13±2.07B
3y	12.13±1.40B	491.60±3.22A	1.67±0.16B	114.27±1.76B

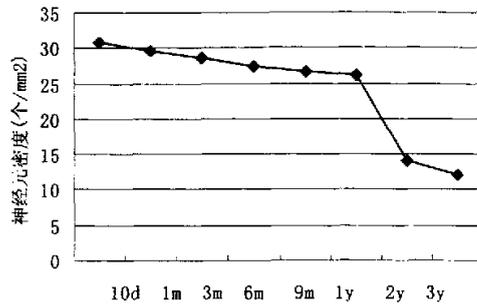


图 2-1 nNOS 阳性神经元的密度

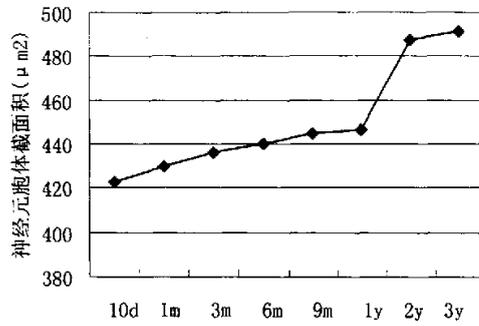


图 2-2 nNOS 阳性神经元的胞体截面积

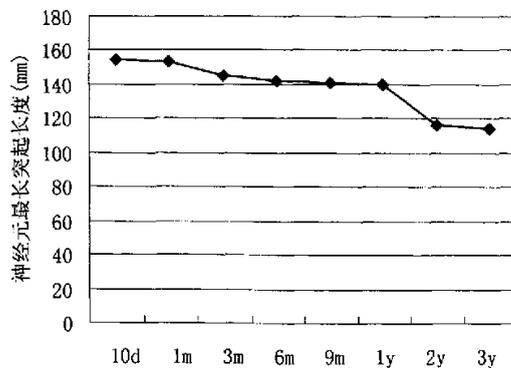


图 2-3 nNOS 阳性神经元的第一级突起数

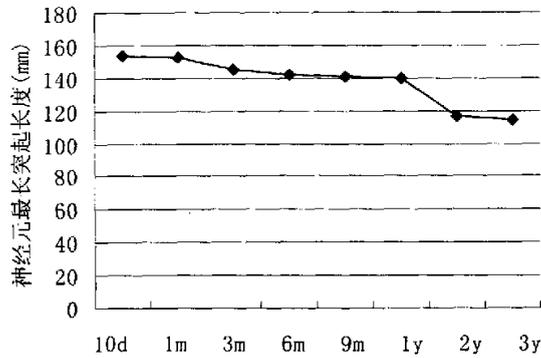


图 2-4 nNOS 阳性神经元的 longest 突起长度

2 结果与分析

我们在光镜下观察了家兔脑的小脑的冠状切面，结果显示小脑皮质有 nNOS 免疫阳性神经元和神经末梢出现。分子层与颗粒层内的浦肯野氏细胞层，阳性细胞排列规整，大多部位呈单层分布，并有突起伸向表层。nNOS 免疫阳性神经元呈棕黄色，细胞核处颜色浅淡，神经元的形态多样化，胞体呈梭形、三角形、圆形、不规则形等多种形状。突起长短不一，多寡不同，粗细不等，切面上可见 1~4 条突起直接起于胞体，有的突起根部粗，分支可达 3 级，有的突起很细，数条均起自胞体呈胡须状；nNOS 免疫阳性神经纤维呈棕色串珠状且交错分布。

3 讨论

本实验发现在家兔小脑皮质的分子层、颗粒层及浦肯野氏细胞层均有 nNOS 阳性神经元分布，而 Bredt 等和 Anggard (2001) 采用免疫组织化学染色，在大鼠脑内观察到 nNOS 阳性神经元主要分布于小脑皮质的分子层和颗粒层，而浦肯野细胞层为阴性，他们认为浦肯野细胞层内的 NO 是由颗粒层细胞弥散而来的。这一点我们所观察到的结果与文献报道的明显不同，有可能是物种间存在的差异。有关 nNOS 在小脑分布方面的研究不多，有待进一步证实。

浦肯野细胞是小脑皮质的核心细胞，它接受所有传入小脑的信息，其轴突

穿过颗粒层进入髓质，构成皮质的唯一传出纤维，因此浦肯野细胞是体现小脑功能十分重要的细胞，这在脑缺血及其治疗上有比较重要的作用。

试验三、家兔下丘脑 nNOS 阳性神经元的

形态、分布及发育变化

1 材料与方法

1.1 材料

同试验一。

1.2 方法

灌注、取材、制片均同试验一，切片后取两套：一套作尼氏染色，用以核团定位；另一套做免疫组化染色。

1.2.1 观察和测量

每个样本取 6 张切片，在低倍镜下(100×)用显微镜目镜测微网尺分别计数大脑皮质各个部位单位面积 nNOS 阳性神经元的数目，计算平均值。在高倍镜下(400×)，随机选以上部位内的 NOS 免疫反应阳性神经元 40~50 个，测量其胞体直径和突起长度，计算平均值。

参照包新民等编写的大鼠脑立体定位图谱(包新民, 1991)，确定各神经核团的位置，镜下观察并用网形测微尺计数和测量皮质各叶中 nNOS 阳性神经元的数目。计算皮质单位面积内 nNOS 阳性神经元的数目。

1.2.2 数据统计分析

实验数据以 $\bar{X} \pm S \bar{x}$ 表示，结果用 SPASS 软件进行统计学处理，方差分析，行组间的两两比较，以 $P=0.05$ 为显著性水准，判断各组之间的差异是否具有统计学意义。

2 结果与分析

统计结果显示，下丘脑的视上核、室旁核和弓状核内均见有 nNOS 阳性神经元分布，阳性产物呈棕黄色，均匀分布于阳性神经元细胞核周围的胞质内。细胞核基本不着色。阳性神经元胞体轮廓清晰，神经元大小不太一致，突起较细，数量少。各核团内阳性神经元的形态、大小、密度、胞体的截面积、突起等方面存在一定的差异，具体情况如下：

2.1 室旁核

nNOS 阳性神经元十分密集, 呈楔形分布于近第三脑室处, 室旁核的外侧部细胞密集的程度要比内侧部高。NOS 阳性神经元有两种类型: 大细胞型 (截面直径 $>100\ \mu\text{m}$), 这种神经元呈圆形或卵圆形, 染色较浅, 占多数。小细胞型 (截面直径 $<50\ \mu\text{m}$), 数量少, 亦呈圆形或卵圆形, 多散在分布于室旁核的内侧部。但在靠近第三脑室处, 有少许大型的 NOS 阳性神经元。

2.2 视上核

nNOS 阳性神经元分布亦较为密集, 呈内侧稍宽的带状分布于视交叉的外上方。NOS 阳性神经元类似于室旁核内的大细胞型, 胞体呈圆形或椭圆形, 染色浅。

2.3 弓状核

nNOS 阳性神经元分布也较密集, 但是较小, 染色浅, 位于第三脑室腹侧呈弓形分布。此外弓状核内尚具有许多伸向正中隆起的 nNOS 阳性纤维。

2.4 阳性神经元的密度

下丘脑各个核团中的 nNOS 阳性神经元的密度都是随着年龄的增长而平缓递减 (如 PVN: 仔兔、幼兔、青年兔、成年兔分别为 8.4667、8.2000、8.0667、8.000 个, 到了老年就下降为 7.0667 个), 呈现急剧下降的趋势 ($P < 0.01$) (见下表)。

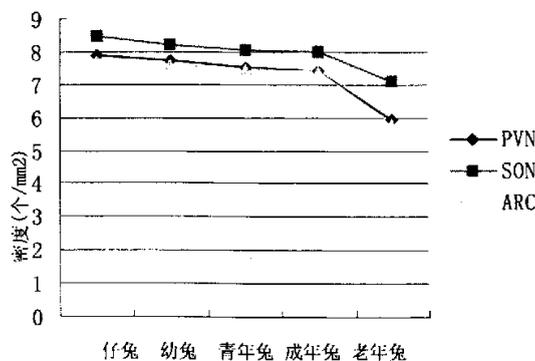


图 3—5 PVN、SON、Arc 中 nNOS 阳性神经元的密度

2.5 阳性神经元的截面积和突起

下丘脑内 nNOS 阳性神经元的截面积、第一级突起数、最长突起长度都随年龄的增长而递减，到老年后呈现明显变化 ($P < 0.01$ ，如 PVN 截面积仔兔到成年分别是：477.1、478.4、478.8、479.1，而老年兔为 482.5)。(见下表)

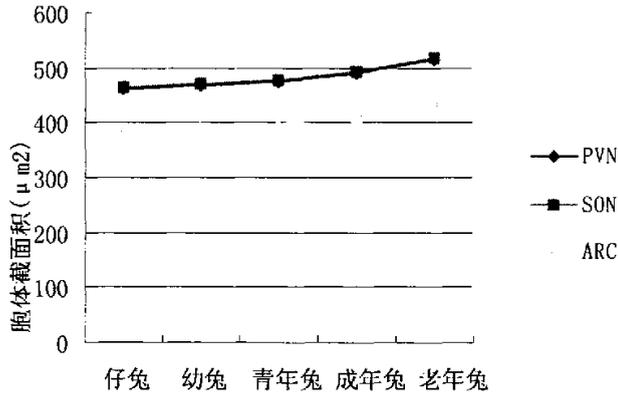


图 3—6 PVN、SON、Arc 中 nNOS 阳性神经元胞体截面积

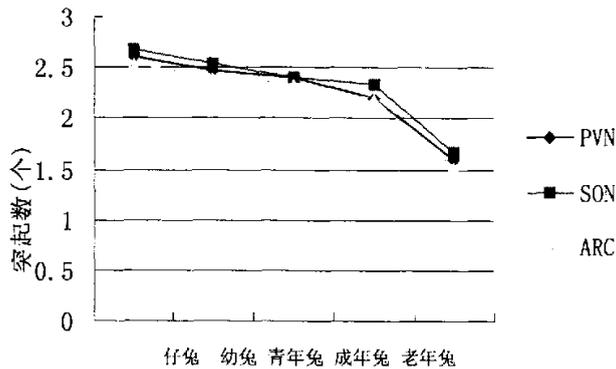


图 3—7 PVN、SON、Arc 中 nNOS 阳性神经元的突起数

从上图可看出，视上核、室旁核和弓状核中 nNOS 阳性神经元的突起数也是随着年龄的增长而逐渐减少，老年后变化显著。

表 3-5 各年龄组室旁核 nNOS 阳性神经元的密度、截面积、第一级突起数和最长突起长度 ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Table The density , section area , first born tuber number , furthest protuberance length on nNOS in PVN of each

项目	仔兔	幼兔	青年兔	成年兔	老年兔
截面积 (μm^2)	459.5 \pm 10.21B	467.20 \pm 7.96B	473.80 \pm 5.86B	489.30 \pm 7.60B	514.60 \pm 3.68A
密度 (个/ mm^2)	7.87 \pm 0.26a	7.73 \pm 0.27a	7.53 \pm 0.24a	7.40 \pm 0.31a	5.93 \pm 0.32b
第一级突起数(个)	2.60 \pm 0.24a	2.47 \pm 0.22a	2.40 \pm 0.21a	2.20 \pm 0.20a	1.60 \pm 0.13b
最长突起 长(μm)	136.70 \pm 6.87A	133.70 \pm 5.81A	129.40 \pm 5.80A	127.30 \pm 7.35A	112.30 \pm 4.42B

表 3-6 各年龄组视上核 nNOS 阳性神经元的密度、截面积、第一级突起数和最长突起长度 ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Table The density , section area , first born tuber number , furthest protuberance length on nNOS in SON of each age rabbit

项目	仔兔	幼兔	青年兔	成年兔	老年兔
截面积 (μm^2)	462.7 \pm 0.21B	470.30 \pm 7.95B	476.90 \pm 5.79B	492.30 \pm 7.54B	516.90 \pm 3.68A
密度 (个/ mm^2)	8.47 \pm 0.26a	8.20 \pm 0.24a	8.07 \pm 0.18a	8.00 \pm 0.17a	7.07 \pm 0.23b
第一级突起数(个)	2.67 \pm 0.21a	2.53 \pm 0.22a	2.40 \pm 0.21a	2.33 \pm 0.19a	1.67 \pm 0.16b
最长突起 长(μm)	136.50 \pm 6.89A	133.40 \pm 5.84A	129.20 \pm 5.87A	127.10 \pm 7.39A	112.20 \pm 4.44B

表 3-7 各年龄组弓状核 nNOS 阳性神经元的密度、截面积、
第一级突起数和最长突起长度 ($\bar{X} \pm S \bar{x}$)

Table The density , section area , first born tuber number , furthest protuberance length on
nNOS in Arc of each age rabbit

项目	仔兔	幼兔	青年兔	成年兔	老年兔
截面积 (μm^2)	382.7 \pm 10.22B	390.70 \pm 4.54B	396.70 \pm 5.77B	410.90 \pm 7.26B	434.20 \pm 3.14A
密度 (个/ mm^2)	7.73 \pm 0.23a	7.60 \pm 0.25a	7.47 \pm 0.24a	7.40 \pm 0.24a	5.80 \pm 0.30b
第一级突起数(个)	2.53 \pm 0.22a	2.40 \pm 0.21a	2.33 \pm 0.19a	2.20 \pm 0.20a	1.53 \pm 0.13b
最长突起 长(μm)	132.50 \pm 6.89A	129.50 \pm 5.82A	126.00 \pm 5.56A	123.10 \pm 7.39A	108.00 \pm 4.45B

3 讨论

3.1 nNOS 阳性神经元与其他神经递质、激素共存

下丘脑位于间脑的腹侧部, 构成第三脑室的底壁和侧壁腹侧部。它由形态大小不同的细胞组成, SON 和 PVN 是其中两个比较重要的核团。SON 位于视交叉的前方, PVN 位于第三脑室侧壁内, 两核团中大部分的神经元都是 nNOS 阳性神经元, 细胞为神经内分泌细胞。PVN、SON 是与血压、渗透压的调节密切相关的核团, 它含有多种神经活性物质, 尤其是肽类物质, 如催产素(OT)、垂体加压素(AVP)、生长抑素(SOM)、神经紧张素(NT)、神经肽 Y(NPY)等, 由此我们推测此处这些神经活性物质与 nNOS 阳性神经元共存, 这一点在 Terres (1999) 的研究中已得到部分证实。近几年来, 机能学方面的研究证实 NO 参与调节 OT 的合成与分泌, 亦有文献报道 OT 可间接调节 NO 释放, 二者具有协同累加效应。然而 NO 与 OT, AVP 等重要递质之间相互作用的形态学资料以及细胞和分子机制尚不清楚, 值得进一步深入研究。

NO 可对其邻近区域的所有神经元起重要的调节作用, 它以弥散的方式进入神经元内, 激活可溶性鸟苷酸环化酶产生前列腺素内过氧化物合酶。可以刺激泌乳素释放因子(CRH)释放。促皮质激素细胞释放促肾上腺皮质激素主要受泌乳素释放因子和加压素的控制, AVP 增加下丘脑和垂体内的泌乳素释放因子释

放。OT 可能在特定条件下增加泌乳素释放因子释放。NO 可激活泌乳素释放因子。

此外 NO 参与调节下丘脑促黄体激素释放激素 (LHRH) 神经元分泌与释放促黄体激素释放激素生理过程。其中 NO 和 NE/GA 可增强 nNOS 神经元活性, 进而促进促黄体激素释放激素的释放。

由此我们得知下丘脑各核团中含有多种神经递质, 他们之间存在共存关系, 在神经内分泌和心血管功能调节中起重要作用。

3.2 关于 nNOS 阳性神经元的胞质淡染

本试验结果显示下丘脑不同核团内 nNOS 阳性神经元细胞类型与染色程度均有所不同, 胞质浅染, 而倪衡建等在大鼠上的染色却较深, 究其原因: 一是实验方法不尽相同; 其二, 抗体来源不同也可能影响显色结果; 其三, 实验动物的不同也可能是此差异产生的一个原因。

试验四、nNOS 阳性神经元在家兔脑神经核 的形态、分布研究

1 材料与方法

1.1 材料

同试验一。

1.2 方法

灌注、取材、制片均同试验一，切片后取两套：一套尼氏染色，用以核团定位；另一套做免疫组化染色。

1.2.1 观察

参照包新民等编写的大鼠脑立体定位图谱（包新民，1991），确定各神经核团的位置，镜下观察 nNOS 阳性神经元在各神经核团中的形态分布，并对其进行分析。

2 结果与分析

2.1 大脑基底核

为大脑半球基底部的核团，主要有尾状核、豆状核和屏状核，尾状核和豆状核之间为白质构成的内囊，豆状核和屏状核之间为白质构成的外囊。以上 3 核均有 nNOS 免疫阳性神经元。

2.1.1 尾状核

斜向位于丘脑的前外侧，外形类似尾巴，故称为尾状核，冠状切面近似椭圆形；其 nNOS 阳性神经元密集主要为小型细胞(<50um)，呈棕黄色，细胞核淡染，神经元胞体呈圆形、椭圆形、梭形不等，突起数 2~3 个，突起长度较短；(见图 8, 图 9, 图 13)

2.1.2 豆状核

在尾状核的腹外侧，以内囊相隔，外形呈豆形，冠状切面为椭圆形；nNOS 阳性神经元密集主要为小型细胞，胞质棕黄色，细胞核着色淡，胞体以卵圆形居多，少数的呈三角形、梨形，突起数量、长短不等（见图 6, 图 7）。

2.1.3 屏状核

位于豆状核的外侧,与豆状核之间隔以外囊,冠状切面上弧形排列;其 nNOS 阳性神经元较密集,主要也是小型细胞,胞质棕黄色,细胞核着色淡,胞体有卵圆形、梭形、梨形等(见图 10,图 11,图 12),突起 2~3 个,多沿长轴排列,突起长度不等。

2.2 延髓神经核

在延髓呈现免疫阳性反应的神经核有后橄榄核、外侧网状核、疑核、三叉神经脊束核、薄束核及楔束核。

2.2.1 后橄榄核

位于延髓橄榄体的深面,锥体的背外侧,切面呈反向的“C”形, nNOS 阳性神经元较密集,主要是中小型细胞(<50 μ m),胞质棕黄色,细胞核着色淡,胞体有圆形、三角形、梨形等,突起 2~3 个,突起较长;

2.2.2 外侧网状核

位于后橄榄核背外侧, nNOS 阳性神经元相对较密集,主要是中型细胞,胞质棕黄色,细胞核着色淡,胞体以梨形居多等,突起 1~3 个,突起长短不等;

2.2.3 疑核

位于延髓网状结构的深部,主要由大中型多极细胞组成,胞质棕黄色,细胞核着色淡,胞体有楔形、三角形、梨形、梭形等,突起 1~3 个不等,突起长度多较短;

2.2.4 三叉神经脊束核

位于延髓的外侧部,三叉神经脊束的内侧,中型细胞为主,胞质棕黄色,细胞核着色淡,胞体形态多样,突起 1~3 个不等,突起长度多较短;

2.2.5 薄束核和楔束核

位于延髓后背侧,由中型细胞组成,阳性细胞棕黄色,胞核色淡,各种形态的都有,突起数量及长度不等,有的呈放射状;

2.3 脑桥神经核

在脑桥呈现免疫阳性反应的神经核有:位于脑桥基底部分纤维束之间的脑桥

核, 脑桥基底部外侧的斜方体核、前橄榄核, 脑桥与延髓交界处腹外侧的面神经核, 网状结构外侧的脑桥泌涎核(见图 15)、三叉神经运动核、三叉神经中脑核(见图 16, 17)、三叉神经脑桥核, 脑桥前部背侧的蓝斑。以上各个核团中的 nNOS 阳性神经元呈棕黄色, 细胞核淡染。胞体形态多种多样, 突起数目不等, 长短也有较大差异。胞体大小在各神经核差异明显, 在脑桥的三叉神经中脑核、三叉神经脑桥核, 三叉神经运动核的神经元较大, 为大锥体细胞, 而在脑桥的前橄榄核、面神经核(见图 14)和脑桥泌涎核等内的为小神经元, 在脑桥核和蓝斑内的为中型神经元。

3 讨论

3.1 本试验结果表明, 在脑干的多个神经核团中都有较多的 nNOS 阳性神经元分布, 神经元形态多样, 胞体大小在各神经核差异也较明显, 如脑桥的核团中三叉神经中脑核、三叉神经脑桥核, 三叉神经运动核较大, 为大锥体细胞; 而有的核团却为小神经细胞, 如脑桥的前橄榄核、面神经核和脑桥泌涎核等内的神经细胞。许多资料表明, 中枢神经系统的一些神经核团中特征性的分布有 nNOS, 说明这些神经元具有合成 NO 的能力。尽管目前对 NO 的作用及作用机制的认识还不够完全清楚, 但是, 大量的研究表明, NO 是一种特殊的神经活性物质, 其作用是多方面的, 它不仅参与突出传递过程, 而且还可以充当第二信使, 具有介导兴奋性氨基酸的作用, 参与长时程增效机制的形成, 与神经系统可塑性有关 (Brechtelsheuer PB, 1992)。因而, 研究这一信使系统在中枢神经系统中的分布, 对进一步了解它们的功能很有必要。

3.2 中脑和脑桥部的神经核团被认为是与睡眠有直接和间接关系的重要脑结构, 故中脑和脑桥神经核团内的 nNOS 阳性神经元可能作为多种因素之一, 参与睡眠状态下基本脑血流的维持。有试验证明, 破坏猫中缝核 80~90% 可使猫产生 3~4 天的完全失眠, 然后慢波睡眠逐渐恢复, 但不会超过每天 2 小时, 没有快波睡眠的恢复。选择性破坏中缝核头部, 慢波睡眠减少; 破坏中缝核尾部(脑桥中缝系统), 快波睡眠受到明显抑制。由此可知, 中脑和脑桥部的核团, 对睡眠的两个时相负有直接和间接的责任。Kapas 等 (2002) 证明 NO 与睡眠具有一定的关系, 但更多的研究表明, NO 参与脑血流的调节。因此, nNOS 神经元选择性地定位于既有丰富和广泛的上行投射, 又与睡眠两个时相都有关系的中缝核内, 提示该核所释放的 NO 可能作为诸多因素中的一种因素参与睡眠时脑血流的调

节。已经明确睡眠是一个主动过程，需具有一定的脑血流水平。除此之外，尚有文献指出，睡眠时平均脑血流并不下降，慢波睡眠时比安静状态下略有升高，在快波睡眠时可有明显升高。因此，要保持平均脑血流在睡眠时具有一定的水平，对于睡眠有重要关系。但这仅仅是一种有根据的推测，还需要今后的试验予以证明。还有资料报道，损毁中脑中缝核群后，大鼠脑干、前脑等处脑实质微血管管壁中的 5-HT 含量下降，说明 5-HT 与脑血管有密切的关系。近年有文献报道，电刺激中缝背核可引起脑血流改变，这种改变除了中缝核 5-HT 能神经元所释放 5-HT 的影响外，刺激所引起的脑血流增加效应则有可能是该核内 nNOS 阳性神经元释放 NO 引起脑血管扩张所致，因中缝背核也含有许多 nNOS 阳性神经元。总之，脑血流的调节是一个尚未完全弄清的问题，NO 和 5-HT 以及其它有关物质，以何种形式配合调节清醒和睡眠状态下的脑血流，则有待进一步研究。

结 论

1 各个年龄段家兔大脑皮质中均有广泛的 nNOS 阳性神经元及阳性神经纤维分布。nNOS 阳性神经元呈棕黄色，细胞核染色浅淡。神经元的形态多样化，胞体呈梭形、三角形、圆形、椭圆形、梨形等多种形状；突起长短、数量不等，nNOS 免疫阳性神经纤维呈棕色串珠状且交错分布。随着年龄增长，大脑皮质 nNOS 阳性神经元的密度、突起数、最长突起长度逐渐减小，而胞体截面积却逐渐增加，这些指标到了老年变化极显著 ($P < 0.01$)，表明 nNOS 和 NO 与神经元的发育和衰老有关。

2 家兔小脑皮质中也有较丰富的 nNOS 阳性神经元和神经纤维分布。在浦肯野氏细胞层，阳性神经元排列规整，大多呈单层分布，并有突起伸向分子层。nNOS 免疫阳性神经元呈棕黄色，细胞核染色浅淡。阳性神经元的形态多样，胞体呈梭形、三角形、圆形、不规则形等多种形状。

3 家兔下丘脑中的 nNOS 阳性神经元有大、小两种，突起较细，数量少。下丘脑室旁核 (PVN)、视上核 (SON) 内 nNOS 阳性神经元主要为大型细胞，属于下丘脑大细胞神经分泌系统，弓状核内的 nNOS 阳性神经元，主要为小型细胞，属于下丘脑小细胞神经分泌系统。nNOS 和 NO 在下丘脑神经内分泌调节系统中起重要作用。

4 大脑基底核的 nNOS 阳性神经元排列密集，主要为小型细胞。脑干的多个神经核团中的神经元，胞体大小差异明显，有的神经核神经元较大，为大锥体细胞，如脑桥的三叉神经中脑核、三叉神经脑桥核和三叉神经运动核，有的神经核却为小神经元，如脑桥的前橄榄核、面神经核和脑桥泌涎核，有的为中等神经元，如脑桥核和蓝斑。

5 兔脑 nNOS 阳性神经元的密度、第一级突起数、最长突起长度均随着年龄增长而逐渐减小，而胞体截面积却随着年龄增长逐渐增大，这种变化在成年前的各个阶段，相互之间差异不显著，但是到了老年就表现出极为显著的变化。由此得出：兔脑 nNOS 阳性神经元在 10 日龄时就已发育到成年兔水平，以后随年龄增长逐渐发育成熟至衰老，到老年时就出现显著的衰老变化，表明 nNOS 阳性神

神经元及其催化产生的 NO，在中枢神经系统的发育和神经调控中起重要作用，此规律为以后进行生长发育研究和衰老研究提供了重要的参考资料。

参考文献

- [1]包新民, 舒斯石. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社, 1991.
- [2]贾长恩, 李叔庚主编. 实用酶组织化学[M]. 湖南科学技术出版社, 1996: 61~81
- [3]曹鲁乡, 汪萌芽. L-NAME 加强麻醉大鼠低血压诱发的催产素释放作用. 中国神经科学杂志, 2000, 16(2): 156-159
- [4]陈景藻主编. 康复医学[M]. 北京: 高等教育出版社. 2001, 7: 26~32
- [5]楚宪襄, 王金兰, 方智慧等. 致痛调件下三叉神经核内 NOS 阳性神经元的分布特点[J]. 神经科学. 1995 年增刊: 88
- [6]高博, 尹桂山. 神经系统中的一氧化氮. 生物化学和生物物理进展, 1999; 26(1):31-34
- [7]高博, 尹桂山. 神经系统中的一氧化氮[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(1): 31~34
- [8]顾蕴辉. 边缘前脑内重要升、降压区调节血压的机制. 生理科学进展, 2000 , 31(4):311~316
- [9]韩济生主编. 神经科学原理(第二版)[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 1999, 9: 555~569
- [10]韩太真, 吴馥梅主编. 学习与记忆的神经生物学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998, 61; 146; 206~322
- [11]韩中胜, 鞠躬. 下丘脑下行通路及其功能[J]. 生理科学进展. 1988, 19(3):222~225
- [12]胡文辉, 刘景生, 任民峰. 一氧化氮与神经损伤[J]. 生理科学进展, 1994, 25(4): 300~304
- [13]胡志安. 一氧化氮在大鼠海马脑片长时程增强效应中的作用[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17; 296
- [14]黄迪南等. 自由基生命科学进展[M]. 1996, 4, 123~125.
- [15]黄流清, 不经典神经递质研究进展[J]. 国外医学. 生理、病理科学与临床

- 分册, 2002, 22(3)231~233.
- [16] 贾铀生, 鞠躬. 神经系统中的一氧化氮合酶[J]. 神经解剖学杂志. 1993, 9(1): 1
- [17] 解庆华, 邹全明. 一氧化氮临床研究现状及展望. 国外医学临床生物化学与检验分册. 1999, 20(2): 61~63.
- [18] 康毅, 一氧化氮与相关药物研究的进展[J]. 天津大学学报, 2000. 268~270.
- [19] 柯开富, 包仕尧, 张树生. 一氧化氮与缺血性神经元损伤[J]. 中风与神经疾病杂志, 1996, 13(4): 253~254
- [20] 柯开富, 包仕尧. 一氧化氮在缺血性脑损伤中的作用[J]. 2000, 8(2): 82~85
- [21] 李金声, 郭守一, 高健宝等. 高压氧对鼠脑一氧化氮合酶(NOS)阳性细胞分布的影响及NOS抑制剂的抗氧惊厥作用. 中华航海医学杂志. 1997, (4)231
- [22] 李霞, 郑振群. NO—一种新发现的免疫调节分子[J]. 免疫学杂志. 1996, 12(3): 201~204
- [23] 刘东, 曾帮雄, 李杰. 吸入不同浓度和时间的异氟醚对大鼠脑一氧化氮合酶活性的影响[J]. 河北医学. 2000, 6(1): 20~22
- [24] 刘敬. 一氧化氮及其在临床医学中的地位. 国外医学临床生物化学与检验分册. 1996, (3)100~102.
- [25] 刘曾旭, 熊树明, 吕诚等. 一氧化氮合酶在自发性高血压大鼠视上核及室旁核的分布[J]. 解剖学杂志, 1999, 22(6): 525~528
- [26] 马厚勋, 曾繁荣, 曾昭淳. 大鼠组织一氧化氮含量变化及其调节在衰老过程中的作用[J]. 中华老年医学杂志, 2000, 19(2): 122~125
- [27] 缪鸿石主编. 康复医学理论与实践[M]. 上海: 上海科学技术出版社. 2000, 11:21~22; 49-100
- [28] 倪朝民等, 编著. 脑血管病的临床康复[M]. 安徽合肥: 安徽大学出版社. 1998, 9: 34~35; 138~142; 145~149

- [29]倪衡建,凌树才,万人欣等.大鼠下丘脑室旁核中一氧化氮合酶阳性神经元的生后发育[J].解剖学杂志,1997,13(2):171
- [30]潘家古,伍嘉宁.NO:中枢神经系统中一个新的重要信使物质.生理科学进展,1993 24(4):293~297
- [31]潘家祜,伍嘉宁.NO:中枢神经系统中的一个新的重要的信使物质[J].生理科学进展,1993,24(4):293~297
- [32]彭化生.一氧化氮和癫痫.国外医学神经病学神经外科学分册.1997,24:7~9.
- [33]强文安,刘枝俏,刘捷,等.(Qiang w A, Liu Z Q, Liu J, et al).脑组织一氧化氮合成酶的特性及其与NADPH—diaphorase相关性研究.中国神经免疫学和神经病学杂志(Chin J Neuroimmunol and Neurol).1996,3(4):90~93.
- [34]孙成三,于恩华.一氧化氮合酶在自发性高血压大鼠脊髓中间带灰质的分布[J].解剖学报.2001,32(1):34~38
- [35]孙存普等主编.自由基生物学导论[M].合肥中国科学技术大学出版社,1999,99~105.
- [36]万选才,杨天祝,徐承等主编.现代神经生物学[M].北京北京医科大学.中国协和医科大学联合出版社.1999.170~171
- [37]王华东,李楚杰.内源性一氧化氮的研究进展[J].中国病理生理杂志.1994,10(1):100~103
- [38]王景华,杨贵贞.一氧化氮对大鼠学习记忆功能的影响[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,1997,4(1):11~15
- [39]王文俊,颜天华,严玉兰,等.氧惊厥大鼠海马突触体内一氧化氮与钙离子水平的变化.中华航海医学杂志.1996,3(4):205.
- [40]王晓娟.NO与脑缺血一再灌注损伤.国外医学.老年医学分册EM3,2000.21(3).114~117.
- [41]文树基.基础生物化学实验指导[M].西安:陕西科学技术出版社.1994:8
- [42]肖明,丁炯,左国平等.一氧化氮合酶神经元在大鼠下丘脑中的分布观察[J].

- 南京医科大学学报. 2001;21(3):220~223
- [43] 燕启江, 姚志彬, 周丽华等. 基底前脑 NOS 神经元移植至成年鼠海马内的发育[J]. 解剖学报, 1999, 3(3):215~219
- [44] 杨军, 汪吉宝. 化学修饰电极对雏鸡耳蜗神经元NO的定性检测. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1998, 33, 71~74
- [45] 杨志华. NO在长时程增强中的作用[N]. 生理科学进展, 2000, 31(2), 140~142.
- [46] 虞燕琴, 梁华为. 下丘脑室旁核的心血管调节功能研究进展. 生理科学进展, 2000 31(3):273~276
- [47] 张殿明, 徐隆绍主编. 神经内分泌的化学神经解剖学基础. 神经内分泌, 中国医药科技出版社, 18~70
- [48] 张世仪. 一氧化氮在学习记忆中的作用[J]. 复旦神经生物学讲座, 2000, 16:117~128
- [49] 张文慧等. NO对大鼠睡眠-觉醒的调节[D]. 中国应用生理杂志, 2000; 16(4), 339~341.
- [50] 张樟进, 王晓民. 下丘脑的衰老[J]. 生理科学进展. 1991, 22(3): 285
- [51] 章为, 周雪, 谄晓菊, 等. 一氧化氮合酶同功异构酶在中枢神经赵慧脚. 一氧化氮合酶的作用机制[J]. 生命的化学, 1998, 18(1): 22~24
- [52] 赵佐庆, 朱文侠, 张志培. 犬小肠缺血再灌注后 NO 和 SOD 的改变及免疫细胞凋亡基因的表达[J]. 第四军医大学学报. 2003, 24(18):1700~1703
- [53] 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学. 上海: 上海医科大学出版社. 1997: 6~12.
- [54] 钟慈声. 一氧化氮的生物医学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997:78
- [55] 朱兴族, 陈维洲. 一氧化氮与脑缺血. 基础与临床研究. 山东: 山东科学技术出版社. 1993: 84~101.
- [56] 左明雪. 细胞和分子神经生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 171~172

- [57] Ackerman AE, Lange GM, Clemens LG. Effects of paraventricular lesions on sex behavior and seminal emission in male rats. *Physiol Behav* 1997, 63:49-53
- [58] Amir S. Nitric oxide signaling in the hypothalamus; in Vincent SR (ed): *Nitric Oxide in the Nervous System*. San Diego, Academic Press, 1995, pp 151~162
- [59] Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine [J]. *Lancet*, Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent by-droxy radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1620~1624
- [60] Bolanos JP, Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1411(2-3):415~436.
- [61] Br-clt DS, Hmlg PM, Gjatt CE, et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structural resembles cytochrome P 450 reductase. *Nature* 1991, 351: 714~716
- [62] Brechtelsheuer PB, Nutta]I AL, Miller JM. Basal nitric oxide production in regulation of cochlea blood flow. *Hear Res*, 1994, 77j 38~42. Schmidt HHHW, Warner TD, Ishit K, et al. Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-Arginine-derived nitrogen oxide. *Science*. 1992, 255: 721~723
- [63] Brecht DS, Glatt CE, Hwang PM. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH-diaphorase [J]. *Neuron*. 1991, 7:615
- [64] Brecht DS, Hwang PM, Glatt GE, et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P450 reductase [J]. *Nature*. 1991, 351:714
- [65] Brecht DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide [J]. *Nature*. 1990, 347:768~770

- [66]Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide[J]. Nature, 1990, 347:768~770.
- [67]Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc Natl Acad Sci USA. 1990. 87:682~685
- [68]Bredt DS. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:682
- [69]Bredt DS. Isolation of nitric oxide synthetase[J]. Nature, 1991, 351:714
- [70]Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase
- [71]Burne AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, et al. Nitric oxide: A physiologic mediator of penile erection. Science, 1992. 257: 401~403
- [72]Carthwaite J. Glutamate nitric oxide and cell-signaling in nervous system[J]. Trend Neurosci, 1991, 14(2):60.
- [73]Comwell TL, Arnold E, Boerth J et al. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by Cgmp. Am J Physiol, 1994, 267(cell physiol36):C1405—C1413
- [74]Corg UC, Hassid A. Mechanism of nitrosothiol-induced antimitogenesis in aortic smooth muscle cells. Eur J Pharmacol, 1993:137:243—249
- [75]Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M. et al. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH dehydrogenase are identical in brain and peripheral tissues. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7797 ~ 7801
- [76]De Weid. Central actions of neurohypophysial hormones. Prog Brain Res, 1983, 60:155~162
- [77]Distribution of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the cerebral cortex and hippocampus during postnatal development. Yoon Hee Chung, Yang Soo Kim and Won Bok Lee. Journal of Molecular Histology 2004, 35:765~770.
- [78]Egashira K, Inou T, Hirooka Y. et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in

- humans[J].Circulation, 1993, 88:77~81
- [79]Fazeli MS.Synaptic plasticity:on the trail of the retrograde messenger.Trends [J].Neurosci, 1992, 15:115
- [80]Ferrini M, Wang C.Aging-related expression of inducible nitric oxide synthase and cytotoxicity markers in rat hypothalamic regions associated with male reproductive function. Neuroendocrinology
- [81]Ferrjero DM, Arcavi LT, Sagar S M, et al.Selective sparing of NADPH-diaphorase neuron in neonatal hypoxia ischemia[J].Ann Neurol.1988, 24:670
- [82]Fessenden JD, Coling DE, Schacht J. Detection and characterization of nitric oxide synthase in the rgam- malian cochlea. Brain Res. 1994. 668: 9 ~ 1510
- [83]Fin C, Cunba C, Brombery E, et al.Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes[J].Neurobiol.Learn Mem.1995, 63:113~115
- [84]Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine[J].Nature, 1980, 288 (5789) :373~376
- [85]Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R.Endotheliumderived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests roles as intercellular messenger in the brain[J]. Nature, 1988, 336(6197):385~388
- [86]Geng Y, Hansson GK, Holme E. Interferon-gamma and tumor necrosis- α synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondria[respitation in vascular smooth muscle cells. Circ Res, 1992. 71: 1268~ 1278
- [87]Gerhard M, Roddy MA, Creager SJ.et al.Aging progressively impairs endothelium - Dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans.Hypertension, 1996, 27:849~853
- [88]Harper A, Blytle WR, Zdanski cJ, et al. Nitric oxide in the rat vestibular

- system—Otol Head Neck SL. rg, 1994+ 111: 430 ~ 4389
- [89] Hashikawa T, Leggio MG, Hattori R, et al. Nitric oxide synthase Higashi Y, Oshima T, Ozono R et al. Aging and severity of hypertension attenuate endothelium-dependent renal vascular relaxation in humans [J]. Hypertension, 1997, 30:252~258
- [90] Holzer P, Wachter C, Heinemann A, et al. Sensory nerves, nitric oxide and NANC vasodilation [J]. Arch Int Pharmacodyn, 1995, 329:67
- [91] Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(7):2811~2819
- [92] Ignarro LJ. Nitric oxide: A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. Hypertension. 1990. 16, 477 ~ 483
- [93] Knowles RG, Skinner RD, Powell RM, et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system; A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1989, 86:5195.
- [94] Li GG, Rand MJ. Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1989, 933~938
- [95] Loewy AD, Mckellars S. The neuroanatomical basis of central cardiovascular control [J]. Fed Proc, 1980, 39:2495
- [96] Malinski T. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrin-based microsensor. Nature. 1992. 358: 677 ~ 678
- [97] McCann SM, Kimura M, Walczewska A, et al. Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines, and leptin. Dourest-Anim-Endocrinol. 1998, 15:333~344
- [98] Melis MR, Stancamino R, Argiolas A. Nitric oxide synthase inhibitors prevent N-methyl-D-aspartic acid-induced penile erection and yawning in male rats. Neurosci Lett, 1994, 179:9~12

- [99] Melis MR, Succu S, Iannucci U, et al. N-methyl-D-aspartic acid-induced penile erection and yawning: role of hypothalamic paraventricular nitric oxide. *Brain Res Bull*, 1997, 328:115~123
- [100] Pullen AH, Humphreys P, Baxter RG, Saito S, Kidd GJ, Trapp BD, et al. Rat spinal cord neurons: cellular sources, targets and actions of constitutive nitric oxide in the magnocellular neurosecretory system of the rat. *J Physiol*, 2004, 562.3 pp 725~744.
- [101] Schuman EM—Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, 1991. 254: 1503 ~ 1506
- [102] Suppression of stress-induced nNOS expression in the rat hypothalamus by biting. Hori et al. *J Dent Res*. 2005; 84: 624~628.
- [103] Uttenthal LO, Alonso D, Fernandez AP, Campbell RO, Moro MA, Leza JC, Lizasoain I, Esteban FJ, Barroso JB, Valderrama R, Pedrosa JA, Peinado MA, Serrano J, Richart A, Bentura ML, Santacana M, Martinez-Murillo R, Rodrigo J. Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat[J]. *Microscopy Res Tech and Technique*, 1998;43(1):75~88
- [104] Yang Y, Ozawa H, Yuri K, Kawata M. Postnatal development of NADPH-diaphorase activity in the rat: the role of nitric oxide in the ontogeny of arginine vasopressin and oxytocin. *Endocr J* 2000 Oct; 47(5): 601~613
- [105] Yong, Fu-ness JB, Shuttleworth CW, et al. Localization of nitric oxide synthase and NADPH diaphorase staining in neurons of the guinea-pig intestine. *Histochemistry*-1992, 97: 375 ~ 378

附 图

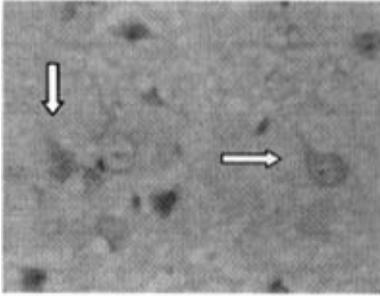


图 1 大脑皮质锥体细胞 (×1000)

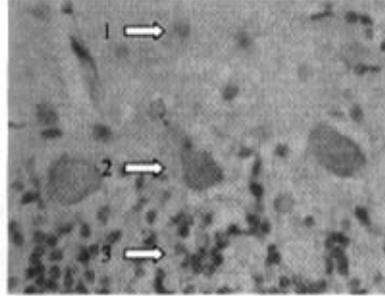


图 2 小脑皮质结构(1.分子层 2.普肯野细胞层及普肯野细胞 3.颗粒层 ×1000)

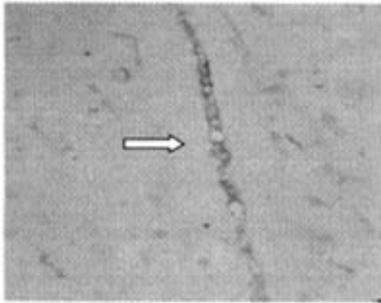


图 3 大脑皮质串珠样纤维 (×400)

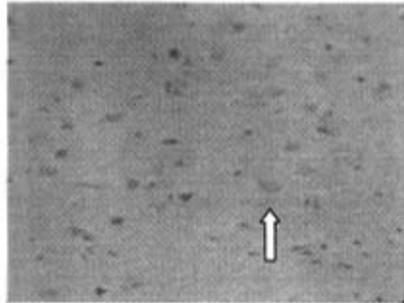


图 4 大脑皮质锥体细胞层 (×100)

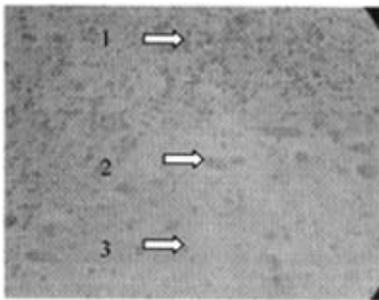


图 5 小脑皮质结构
(1.颗粒层 2.普肯野细胞层 3.分子层 ×400)

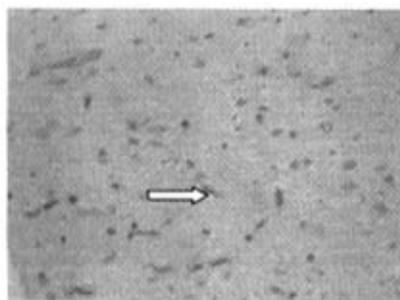


图 6 豆状核阳性神经元 (×400)

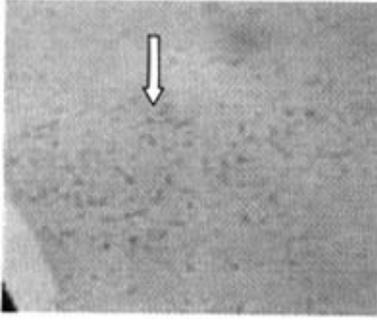


图 7 豆状核外貌 ($\times 100$)

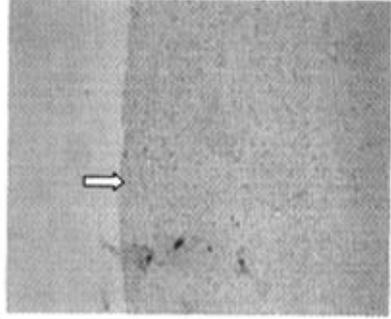


图 8 尾状核外貌 ($\times 100$)

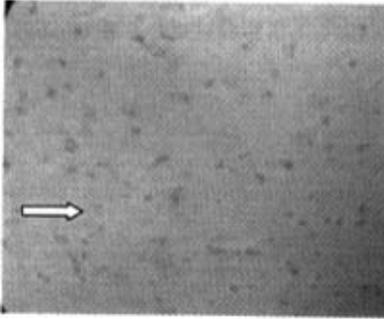


图 9 尾状核神经元 ($\times 400$)

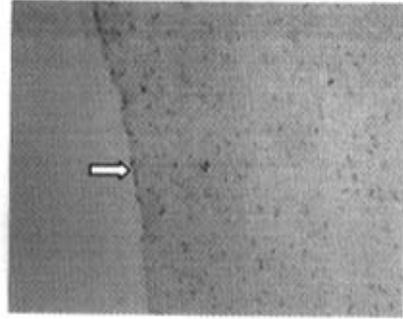


图 10 屏状核外貌 ($\times 400$)

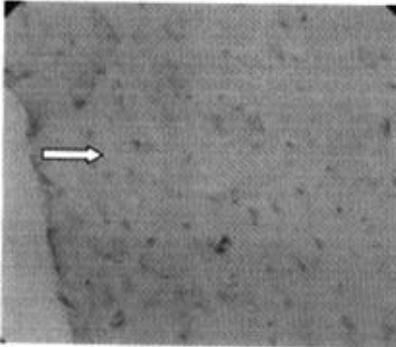


图 11 屏状核外貌 ($\times 100$)

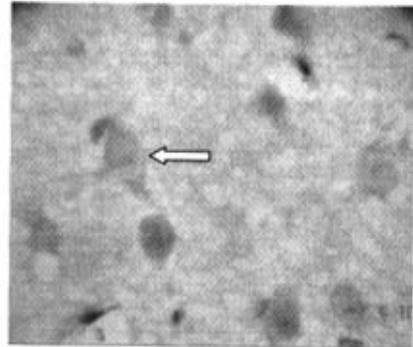


图 12 屏状核阳性神经元 ($\times 1000$)

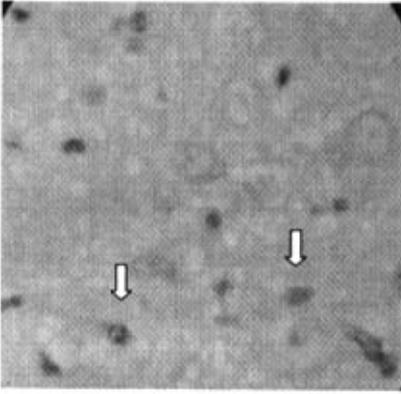


图 13 尾状核阳性神经元 (×1000)

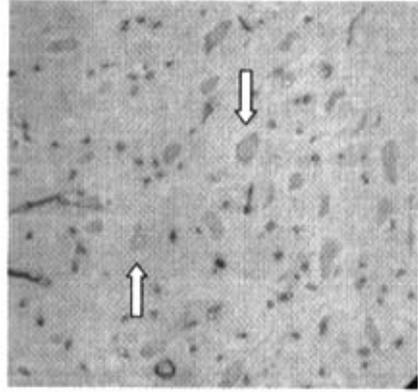


图 14 面神经核 (×400)

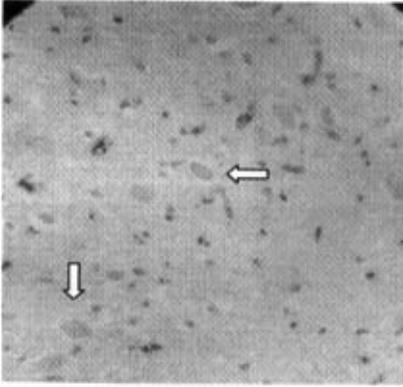


图 15 脑桥泌涎核 (×400)

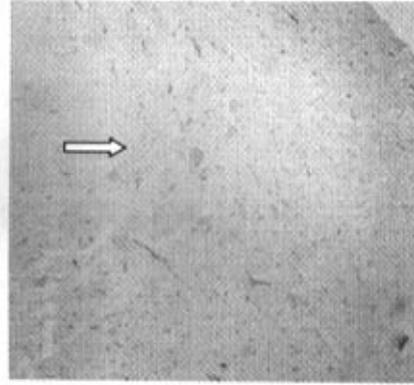


图 16 三叉神经中脑核 (×100)

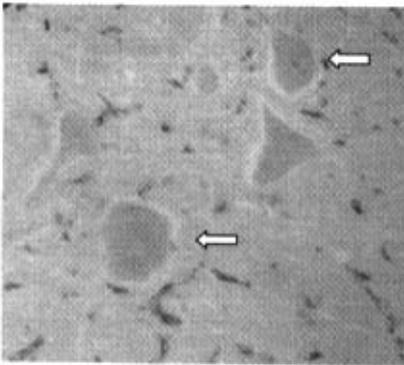


图 17 三叉神经中脑核 (×400)

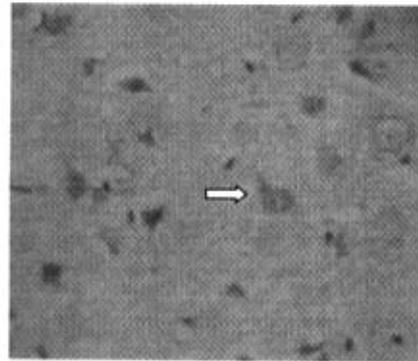


图 18 大脑皮质锥体细胞 (×400)

致 谢

本课题是在导师尹逊河教授的指导下完成的，导师渊博的知识、广阔的思路、对科学的严谨态度，一丝不苟的敬业精神使我敬佩，无论做人还是做事都使我受益匪浅，为我走上社会打下了坚实的基础。三年的研究生学习生涯虽然短暂，但尹老师对我科研、学习和生活的照顾令我终生难忘，在此，向尹老师表示我崇高的敬意和衷心的感谢！

感谢王树迎教授、谭景和教授、刘思当教授、成子强副教授、刘远飞副教授、蔡玉梅副教授、张金花老师、邱建华老师、侯衍猛老师对我的指导及对我的关心和帮助！

感谢华中农业大学的林进凯教授对我的悉心指导及对我的关心、支持和帮助！

感谢师母张静老师三年来对我的关心、支持和帮助！

感谢刘燕、孙晴、李玉香、马守俊、陈丙峰、崔景香、李伟、张鑫等师弟、师妹们对我的帮助。

感谢临床兽医系的曹爱智，预防兽医系的卢新存、张维军、林树乾、马广强、张西雷、遗传繁育系的包新见，基础兽医系的张玲娟、曹翠萍等同学对我的帮助。

同时十分感谢我的家人在我漫长的学业生涯中给我的支持和资助。

最后衷心的感谢培养我的山东农业大学动物科技学院、感谢所有关心和帮助过我的老师、同学！

2006年6月8日

发表论文情况

1. “nNOS 阳性神经元在家兔大脑皮质和小脑皮质的分布” 《家畜生态学报》
第一作者 已录用;
2. “兔脑 nNOS 阳性神经元的形态结构和分布规律” 《畜牧兽医学报》 第三
作者;
3. “兔脑 NOS 阳性神经元的形态结构和分布规律” 《中国兽医学报》 第三
作者;