

应用改进的大鼠应激模型证实海马 CA3 区神经元 Nestin、NPY 表达变化

孙国刚¹, 陈波¹, 徐杰², 范光碧¹, 陈跃³, 聂业⁴

(1. 泸州医学院解剖学教研室, 四川 泸州 646000; 2. 中山大学中山医学院人体解剖学教研室, 广东 广州 510080;
3. 泸州医学院附属医院核医学科, 四川 泸州 646000; 4. 广州中医药大学 06 级研究生, 广东 广州 510006)

摘要:【目的】应用改良的连续、恒定复合型应激大鼠模型, 观察其血浆肾素活性(PRA)、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)水平和海马 CA3 区的 Nestin、NPY 表达。【方法】将雌性成鼠束缚并倒悬应激 6 h/d, 用放射免疫法测定急性应激(3 d)后血浆 PRA、AngⅡ水平, 用免疫组织化学方法观察应激 3 d、21 d 后 CA3 区锥体层细胞的 Nestin、NPY 表达变化。【结果】①急性应激组血浆 PRA 和 AngⅡ水平比正常对照组显著降低($P<0.01$), 尤以 PRA 水平的变化更明显。②急、慢性应激组海马 CA3 区的 Nestin、NPY 免疫阳性反应产物总面积(SA)和体视学光密度(IOD)值均较对照组低($P<0.01$), 急性组的组织损害比慢性组更严重。【结论】本研究成功地构建了具有科学理论依据和实用价值的复合性应激大鼠模型, 并利用此模型证实应激早期大鼠血浆 PRA 和 AngⅡ水平有降低; 观察急、慢性应激大鼠海马 CA3 区 NPY 和 Nestin 表达变化及其变化规律, 结果提示 NPY 及其水解产物在应激所致海马神经元细胞骨架损害和谷氨酸释放过程中可能产生一定的影响。

关键词: 血浆低肾素活性应激模型; 海马; 巢蛋白; 神经肽 Y; 大鼠

中图分类号: R742 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)05-0531-05

Evidence of Expression Alteration for Nestin and NPY in CA3 Region of Hippocampus Using an Improved Stressed Rat Model

SUN Guo-gang¹, CHEN Bo¹, XU Jie², FAN Guang-bi¹, CHEN Yue³, NIE Ye⁴

(1. Department of Anatomy, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. Department of Anatomy, School of Preclinical Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Nuclear Medicine, Luzhou Medical College Hospital, Luzhou 646000, China; 4. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: 【Objective】To observe the change level of PRA and AngⅡ in plasma, and the expression alteration of Nestin, NPY, and NF200 in CA3 regions of hippocampus using an improved stressed rat model. 【Methods】Experimental rats were restrained and inverted for 6 h/d and the level of PRA and AngⅡ in plasma was determined by radioimmunoassay after 3 d (acute group), and the expression profiles of Nestins and NPY were observed in the CA3 region using immunohistochemical staining of rabbit polyclonal antibodies at the 3 d and the 21 d (chronic group) in female adult Sprague Dawley rats, respectively. 【Results】(1) The levels of PRA and AngⅡ in plasma between the control and acute stressed groups decreased significantly ($P<0.01$), and the change of PRA level was more apparent. (2) The decreased alteration mainly was in the sum of area (SA) and integral optical density (IOD) of Nestin/NPY-ir positive cells in CA3 region of hippocampus between the stressed and the control group ($P<0.01$), and the pathological change of CA3 regions showed more severity in the acute group than that in chronic groups. 【Conclusion】An new stressed rat model was made scientifically, and the alteration level and pattern of PRA and AngⅡ in plasma, and the expression profiles of Nestins and NPY in CA3 regions of hippocampus were evidenced using this model. The results suggest that NPY and its hydrolyzate (the phosphorylated

收稿日期: 2008-04-25

基金项目: 泸州医学院自然科学研究基金(0602010)

作者简介: 孙国刚(1967-), 男, 四川盐亭人, 副教授, 通讯作者, E-mail: 516562@sina.com

tyrosine) could act some effect on the injury of cytoskeleton and the release of glutamate acid in pyramidal layers of CA3 region during stressing.

Key words: plasmic low-PRA stressed model; hippocampus; Nestin; NPY; rats

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(5):531-535;545]

应激能导致人和动物的生理、心理和行为异常,特别是海马内的结构及其功能损害^[1]。近年来,应激所引起的学习记忆相关脑区神经细胞的可塑性和细胞化学改变,是脑科学的重要热点领域^[2-4]。本研究通过放射免疫分析和免疫组织化学相结合的方法,观察了固定的连续应激模型大鼠血浆肾素活性(PRA)、血管紧张素 II (Ang II) 水平和海马 CA3 区内巢蛋白(Nestin)、神经肽 Y(NPY) 表达的变化。

1 材料和方法

1.1 动物分组

实验于 2006 年~2007 年在泸州医学院神经生物学研究室完成。SD 大鼠由泸州医学院实验动物中心提供,选择清洁级 3 月龄雌鼠 18 只,体质量 150~200 g,动物房温度维持在 $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $50\% \pm 20\%$ 。动物随机分组,正常对照组 4 只,急性应激组和慢性应激组各 7 只。

1.2 应激模型的构建

大鼠在实验室内饲料喂养 1 周后,将应激大鼠固定在不锈钢圆筒上,头部置筒内底部封闭的一侧,身体束缚固定于不锈钢圆筒的壁上,使大鼠处于束缚、禁饮食、避光并倒悬于 1.0 m 高的支架上 6 h/d,四肢可动但不能逃脱,分别连续应激处理 3 d 和 21 d,非应激时与对照组一起正常饲养。

1.3 采血、取脑及组织处理

用乙醚深度麻醉后开胸,对照组和急性组经右心房迅速抽取静脉血 3 mL/只。然后所有动物均经左心室插管、生理盐水灌洗(剪开右心房),在 4°C ,40 g/L 多聚甲醛经主动脉灌注固定后,剥离并完整取脑,经冠状面将前脑按约 4 mm 厚度切块,继续在 40 g/L 多聚甲醛溶液中过夜,之后石蜡包埋。

1.4 PRA 和 Ang II 的水平测定

采集静脉血液后,迅速注入(在冰水浴中冷却)含酶抑制剂(EDTA)的抗凝管、摇匀,冰水浴中冷却后,在 4°C ,3 000 r/min($r=15\text{ cm}$)离心 5 min,分离血浆,移入专用试管中, -70°C 冰箱保

存、备用。采用放射免疫方法测定,PRA、Ang II 放免分析测定盒向天津市协和医药科技有限公司购买(PRA 批号 118353C;Ang II 批号 200612)。

1.5 切片和免疫组织化学染色

取有海马中段、尾段的脑组织块分别进行连续冠状切片,片厚 5 μm ,然后免疫组织化学采取 ABC 法染色。主要步骤:二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,复合胰酶消化(37°C ,30 min),30 mL/L H_2O_2 室温氧化,100 mL/L 羊血清孵育(37°C ,30 min),加一抗后置 4°C 孵育并过夜,加二抗孵育(37°C 30 min),加三抗孵育(37°C ,30 min),DAB 避光下显色,常规脱水、透明、封片。从加酶后到脱水前的各步之间,均按常规用磷酸缓冲液(PBS 液)漂洗 5 次,每次 5 min。一抗 Nestin、NPY 为兔多克隆抗体(1:150~200,Rabbit,BA1289,Boster),NF200 为小鼠单克隆抗体(1:200,BM0100,Boster);二抗为生物素化羊抗兔和生物素化羊抗小鼠(1:200,BA1001、BA1003,Boster);ABC 按照试剂盒(Boster)说明书配制、滴加(37°C ,30 min)。在免疫组织化学的 DAB 呈色结束、漂洗后,选择部分切片用苏木精复染胞核。

1.6 图象采集

光镜下观察,每只大鼠选取有中段海马连续 5 张切片,在 400 倍下,每张切片选取背侧海马、CA3 区的同一区域拍照。采用 Image-Pro Plus 5.0 图象分析系统,对 NPY 与 Nestin 免疫阳性物进行半定量检测,分别测量 Nestin、NPY 免疫阳性细胞总面积(sum of area,SA)和体视学光密度(integral optical density, IOD)。

1.7 数据分析

所有数据用 SPSS13.0 统计学软件处理,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 t 检验, $P < 0.01$ 为差异有显著性统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆 PRA 和 Ang II 的水平测定结果

血浆肾素活性和血管紧张素 II 水平测定结果

见表1。从表1可见,本研究所使用的造模方法使急性应激组大鼠血浆肾素活性和血管紧张素Ⅱ水平与正常对照组相比均有显著性下降,其中血浆肾素活性水平的降低幅度比血管紧张素Ⅱ的下降幅度更大,从而使应激动物血浆 PRA/Ang Ⅱ 的平均比值(1.14)比对照组(1.77)大幅度下降。

表1 血浆 PRA、Ang Ⅱ 水平的放射免疫法测定

Table 1 The test of levels of PRA and Ang Ⅱ in plasma by radioimmunoassay in the control and acute stressed groups

Group	PRA($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Ang Ⅱ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Control($n=4$)	804 $\pm$ 196	453 $\pm$ 104
Stressed($n=6$)	285 $\pm$ 176 ¹⁾	249 $\pm$ 97 ¹⁾

1) compared with the control group, $P < 0.01$

2.2 应激导致大鼠海马 CA3 区 Nestin 和 NPY 的表达变化

本研究发现,Nestin、NPY 在正常雌性成年 SD 大鼠脑背侧和腹侧海马各部 CA3 区锥体层都有表达,阳性细胞的胞质及突起表现为着色深度不一的棕色颗粒、斑片状或粗细不等的丝状物质(图 1A,B,I)。从表2看出,急、慢性应激组大鼠背侧海马中段 CA3 区锥体层内的 Nestin、NPY 阳性反应均明显减弱($P < 0.01$),在受到应激处理后,同一应激组 CA3 区内的 Nestin 与 NPY 表达降低的程度是一致的;其中,急性组海马 CA3 区锥体层的组织结构和细胞形态受到明显破坏,阳性细胞数量很少,但存在少量深染的阳性细胞(图 1C,D);而慢性组阳性细胞总数和细胞密度均有增加,但缺乏深染的阳性细胞(图 1E,F)。

2.3 急、慢性应激组大鼠海马 CA3 区锥体层细胞的 NF200 免疫反应

通过观察苏木精复染的 NF200 免疫组化切片,本研究观察到急性应激组大鼠 CA3 区锥体细胞层内的还残留有少量 NF200 免疫强阳性细胞(图 1G 中实心箭头所示)即正常的成熟神经元,散在于大量弱或不表达 NF200 的受损神经元之间(图 1G 中空心箭头所示);但在慢性组大鼠 CA3 区锥体细胞层内,则几乎见不到 NF200 免疫强阳性细胞的正常成熟神经元(图 1H)。而且,这种现象与同一应激组大鼠 CA3 区的 Nestin、NPY 表达特征是基本一致的(图 1A-J)。

表2 背侧海马中段 CA3 区 Nestin、NPY 免疫阳性反应物光密度测定

Table 2 The test of Nestin/NPY-ir positive substance in CA3 region in the middle part in dorsal hippocampus($\bar{x} \pm s$)

Group	Nestin		NPY	
	SA ^{1), 2)}	IOD ^{1), 3)}	SA ^{1), 2)}	IOD ^{1), 3)}
Chronic($n=7$)	9.82 $\pm$ 1.38	3.92 $\pm$ 1.27	10.71 $\pm$ 1.47	3.43 $\pm$ 1.21
Acute($n=7$)	6.13 $\pm$ 0.82	2.41 $\pm$ 0.30	6.47 $\pm$ 0.71	2.18 $\pm$ 0.42
Control($n=4$)	16.94 $\pm$ 1.01	9.33 $\pm$ 0.87	16.01 $\pm$ 0.96	11.90 $\pm$ 0.87

1) compared between acute (or chronic) group and control group,

$P < 0.01$; 2) compared between acute group and chronic group, $P < 0.01$;

3) compared between acute group and chronic group, $0.01 < P < 0.05$

3 讨论

3.1 本研究成功建立了特定的成年雌鼠应激模型

本研究采用固定地同时束缚、倒悬和禁食的复合刺激法(6 h/d)造模,同其它单一刺激或非固定复合刺激的造模方法有所不同^[3,5]。本研究的固定、复合强刺激方法属于持续恶性心理应激,能有效建立持久、反复应激所致恐惧性、无助的心理合并智力障碍的动物模型,它对于研究地震余震区和其它持久灾难性刺激人群所发生心智损害的细胞和分子机制研究有极为重要的理论意义。本研究刺激 3 d 后的应激动物血浆 PRA、Ang Ⅱ 水平均比对照组显著降低,表明改良的复合应激方法能有效地引起模型动物处于应激状态。

本研究应激 3 d 模型大鼠血浆 PRA、Ang Ⅱ 水平均降低,并以 PRA/Ang Ⅱ 比值大幅度降低为特征,在此前的文献报道中虽然很少见,但符合 Lin^[6]关于血浆肾素水平受内皮素-1(ET-1)抑制而下降的观点;制动应激和急、慢性心理应激、脑出血等均能导致血中 ET-1 水平比正常时明显增高^[7-9],24 ~ 96 h 内达到高峰;应激条件下脑、肾等靶器官损害主要受血浆(而不是靶组织内)ET-1 水平影响^[4]。因此,本研究应激动物的血浆 PRA、Ang Ⅱ 水平和 PRA/Ang Ⅱ 比值降低,可能与心理应激后血浆 ET-1 水平增加有关,属于体内应激反应系统失代偿和应激反应过程复杂性的表现。

3.2 大鼠海马 CA3 区内的 Nestin 和 NPY 表达

众所周知,在恶性心理应激早期,除了情绪反应以外,还常常伴有大脑结构与功能损害过程,特别是对学习记忆相关脑区的损害^[1-4]。

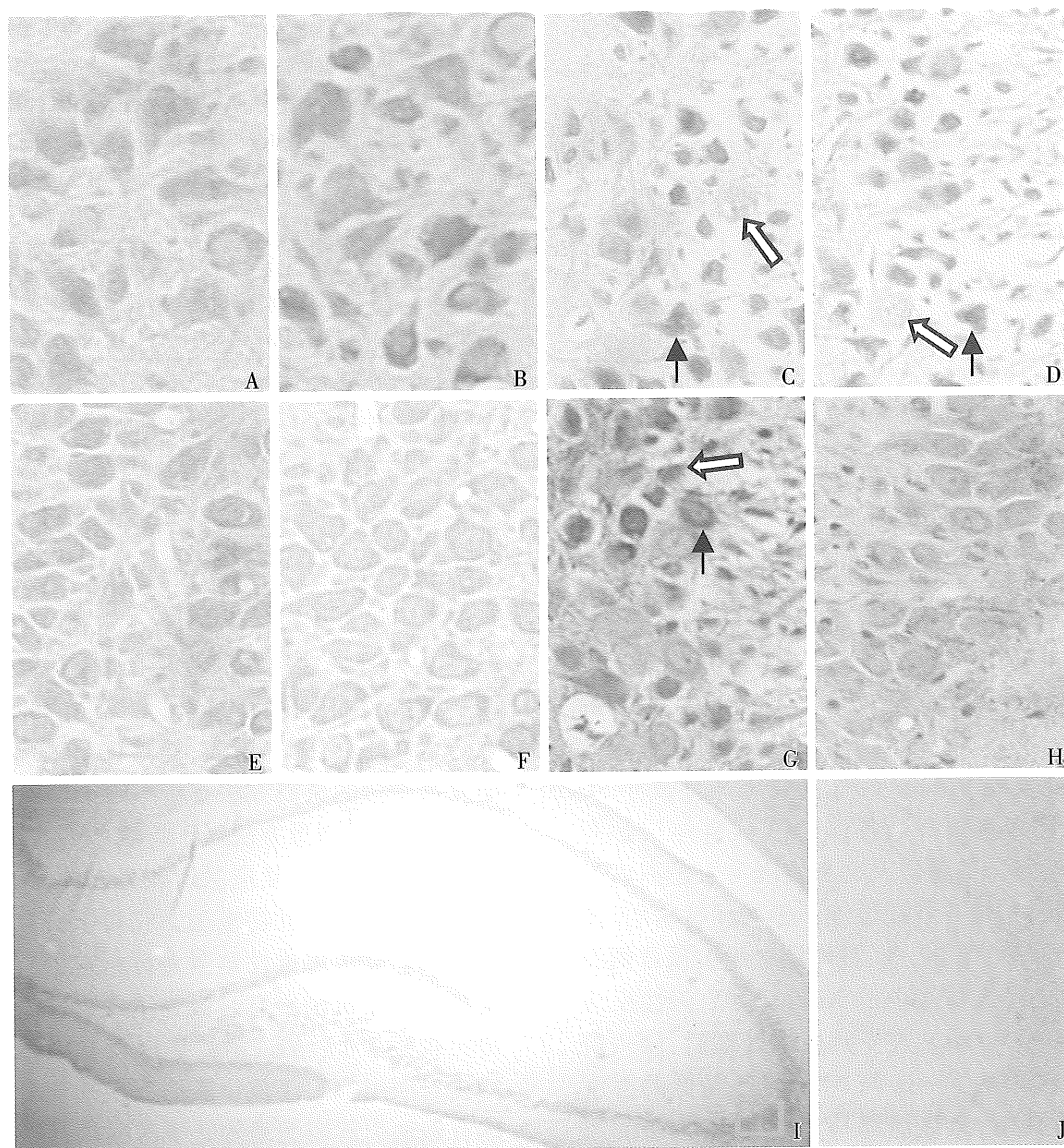


图 1 光镜下背侧海马

Fig.1 Dorsal hippocampus(DH) under microscope

Fig.A-H show the CA3 region of dorsal hippocampus (DH), IHC 400 $\times$; Fig.I shows DH in control group with Nestin positive staining, IHC 20 $\times$; Fig.J shows the CA2 & CA3 regions in DH in control group staining with no antibody, IHC 30 $\times$. Fig. A, B, I & J form control group, Fig.C, D & G for acute stressed group; Fig.E, F & H from chronic stressed, respectively. Fig. A, C & E show Nestin positive staining, Fig.B, D & F in NPY, Fig.G & H in NF200 & hematoxylin; respectively. The black & blank arrows in Fig.C, D & G show the normal neurons and the damaged neurons, respectively.

作为细胞骨架蛋白的巢蛋白(Nestin)是Ⅵ类中间丝蛋白,其分子的C末端有谷氨酸密集区,它不但广泛表达于成人、成鼠脑内的神经前体细胞,也表达于海马内的成熟神经元^[10,11]。Nestin的聚组装和解聚能引起神经元形态、位置和突触连接的可塑性变化,也可能参与学习记忆过程^[10-14]。神经肽Y(Neuropeptide Y, NPY)即神经肽酪氨酸,在人和鼠的中枢神经系统内以海马的含量最高,分布于海马各区。发生有学习记忆损害的疾病时,

中枢内 NPY 免疫反应阳性神经元数量明显下降甚至缺乏;NPY 能通过 Y2、Y1 等受体调节突触前膜的谷氨酸释放,发挥增强学习记忆能力的作用^[15,16]。本研究中,正常成年雌鼠背侧海马同一部位 CA3 区锥体层细胞能同等程度地表达 Nestin 和 NPY,提示背侧海马内的神经前体细胞和成熟神经元内的 NPY 表达程度与 Nestin 表达密切相关。但是,关于学习记忆能力的应激性损害机制研究,目前还未见到海马内 Nestin 和 NPY 表达相关性的报道。

3.3 不同应激阶段海马CA3区内Nestin、NPY表达变化的意义

本研究首次发现,持续3 d的急性应激能导致成鼠海马同一空间部位CA3区神经元表达NPY和Nestin同步减少,苏木精复染的NF200免疫组化证实,应激导致这些细胞密集区域成熟神经元的比例下降,说明应激性神经元兴奋后的细胞损害已经发生;而慢性应激大鼠的NPY和Nestin表达与细胞形态恢复过程相同步,表明该区应激性损害后已经出现了神经元再生、修复的趋势;但是成熟神经元的数量很少,这可能会制约模型鼠海马学习记忆功能的恢复。因此,本研究结果提示,应激后的智力、情绪和运动障碍,可能是神经元应激性兴奋后NPY等抑制性神经递质被耗竭以及神经元损害的结果;而且,此后海马CA3区内神经再生、修复过程中的NPY、Nestin表达程度和成熟神经元的数量,是决定学习记忆能力能否恢复的细胞和分子基础,这与同类研究的结论一致^[15-17]。

可能的机制是,受到恶性生理和心理刺激后,首先引起了模型鼠中枢神经系统内神经元的过度兴奋,导致海马等脑区肽能神经细胞膜的Ca²⁺内流过度增加和细胞内Ca²⁺超载^[17],继而导致其内递质囊泡迅速地释放大量的神经肽Y原(pre-pro-neuropeptide Y)入胞浆;后者被水解为NPY,NPY又迅速被酪氨酸磷酸化酶所分解而灭活,同时,每1分子NPY分解释放出10分子的磷酸化酪氨酸(glutamate);在持续应激条件下,神经元内的磷酸化系统活性异常,导致神经元内磷酸化酪氨酸大量堆积。随后,在磷酸化酪氨酸、谷氨酰胺酶、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶-5(CDK-5)等共同作用下^[19],神经细胞骨架蛋白受损,Nestin分子C末端的谷氨酰胺密集区被水解而释放大量的磷酸化谷氨酸(phosphorylated tyrosine);后者引起突触后神经元产生一系列继发性细胞毒性损害和神经再生障碍^[18]。可见,持续应激后神经元内NPY水解产生的高浓度磷酸化酪氨酸,可能加剧了神经元的细胞骨架损害并大量释放谷氨酸。当然,这些推论能否成立,有待深入研究。

3.4 小结

综上所述,本研究成功建立了一种固定地复合刺激的应激大鼠模型,模型大鼠的血浆和海马组织内的肽类物质可能共同参与了海马CA3区的神经元损害和再生修复过程;其中,神经细胞内

的抑制性神经递质NPY和它的水解产物(磷酸化酪氨酸)在一系列化学性细胞损害过程中可能扮演了重要角色。

参考文献:

- [1] 张银娥,杨惠芳,宋辉. 应激与海马神经元凋亡[J]. 工业卫生与职业病,2007,33(3):180-183.
- [2] Echeverry MB, Guimarães FS, Del Bel EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions [J]. Neuroscience, 2004, 125(4):981-993.
- [3] Kwon MS, Seo YJ, Choi SM, et al. The differential effects of single or repeated restraint stress on kainic acid-induced neuronal death in the hippocampal CA3 region: the role of glucocorticoid and various signal molecules [J]. J Neurochem, 2007, 103(4):1530-1541.
- [4] Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment [J]. Hippocampus, 2006, 16(3):239-249.
- [5] 刘能保,洪小平,李晓恒,等. 慢性复合应激对学习记忆的影响及cAMP/PKA-CREB信号通路的作用[J]. 解剖学报,2006,37(6):611-616.
- [6] Lin H, Sangmal M, Smith MJ, et al. Effect of endothelin-1 on glomerular hydraulic pressure and PRA release in dogs [J]. Hypertension, 1993, 21(6 Pt 1):845-851.
- [7] 孙金岭,曹云涛. 巢蛋白与脑损伤[J]. 中华神经医学杂志,2005,4(4):419-421.
- [8] 晨阳,薛康,李春跃. 原发性高血压与应激性高血压大鼠NO/NOS? ET的变化[J]. 中国医学物理学杂志,2006,23(1):35-39.
- [9] 时文珠,徐美英,孙庆文,等. 咪达唑仑对大鼠慢性心理应激反应的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2006,26(11):986-990.
- [10] 李东培,汪华桥,姚志彬. 脑nestin-ir神经元的发现—形态、化学、投射和功能[J]. 神经解剖学杂志,2004,20(6):641-643.
- [11] Gu HY, Wang SX, Messam CA, et al. Distribution of nestin immunoreactivity in the normal adult human forebrain [J]. Brain Res, 2002, 943(2):174-180.
- [12] Wang S, Yao Z, Wang J, et al. Evidence for a distinct group of nestin-immunoreactive neurons within the basal forebrain of adult rats [J]. Neuroscience, 2006, 142(4):1209-1219.
- [13] Kruglyakova EP, Khovryakov AV, Shikhanov NP, et al. Nestin-expressing cells in the human hippocampus [J]. Neurosci Behav Physiol, 2005, 35(9):891-897.

(下转第545页 to page 545)