

老年记忆减退大鼠 NO_2^- 含量和 NOS 活性的变化^①高国全¹ 姚志彬² 朱振宇¹ 张清秀¹ 马涧泉¹

(中山医科大学 1 生化教研室, 2 脑研究室; 广州, 510089)

摘要 目的: 同时测定老年性记忆减退大鼠一氧化氮合酶(NOS)活性和一氧化氮(NO)的终末代谢产物亚硝酸盐含量(NO_2^-), 研究 NO 与老年记忆减退发生的关系, 为探讨老年性记忆减退发生的机制及寻找新的治疗方法提供理论依据。方法: 用 Morris 水迷宫将老年大鼠(24 月龄)筛选为记忆正常和记忆减退两组, 以老年记忆减退大鼠作为老年记忆减退模型; 用双波长分光光度法测定一氧化氮合酶(NOS)比活性; 用改良硝酸还原酶法测定亚硝酸盐含量。结果: ①海马组织中老年记忆正常组和老年记忆减退组较青年组 NOS 比活性和亚硝酸盐含量均下降, 记忆减退组下降更为显著。②小脑组织中 NOS 比活性和亚硝酸盐含量, 老年记忆正常组和老年记忆减退组较青年组下降, 但老年记忆正常组和老年记忆减退组间无差异。③额叶组织的结果与小脑相同。结论: 海马、小脑和额叶等脑区衰老时 NO 生成下降, 海马脑区老年记忆减退大鼠较老年记忆正常鼠下降更为显著; 提示 NO 生成减少可能与老年记忆减退的发生有关。

关键词 记忆; 衰老; 一氧化氮; 大鼠

中图分类号 Q 522.2

Changes of Nitric Oxide Synthase Activity and Nitrite in the Brain of Senile Memory Deficit Rats

Gao Guoquan¹ Yao Zhibin² Zu Zhenyu¹ Zhang Qingxiu¹ Ma Jianquan¹

(1 Department of Biochemistry 2 Department of Brain Research, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: Study the relationship between nitric oxide (NO) and senile memory deficits, in order to explore the mechanism of senile memory deficits and find out a new method for the treatment. **Methods:** Aged rats (24 month old) were divided into aged memory impaired group and aged memory non-impaired group using Morris water maze. NOS specific activity were measured by a method in which the oxidation of oxyhaemoglobin to methaemoglobin by NO is monitored spectrophotometrically. Using modified nitrate reductase method to measure the concentration of nitrite. **Results:** In hippocampus, NOS specific activity and nitrite in aged rats were decreased in comparison to young rats; aged memory impaired rats reduced more significantly than aged memory non-impaired rats. In cerebellum, NOS activity and nitrite also were lower in aged rats; but no difference between memory non-impaired rats and impaired rats. In frontal cortex, the result is similar to that in cerebellum. **Conclusions:** Generation of NO is decreased in hippocampus, cerebellum and frontal cortex of aged rats, aged memory impaired rats reduced more significantly in hippocampus. It suggested that decreased NO generation may have close relationship with occurrence of senile memory deficits.

Subject headings memory; aging; nitric oxide; rats

一氧化氮(NO)是一种新的细胞间信息交换的载体, 在生物体内 NO 兼有第二信使物质和神经递质的功能, 广泛参与机体多种生理功能的调节。在

记忆的形成中 NO 起逆向信使作用, 主要是以调节长时程效应而实现的^[1]。衰老时有关脑区一氧化氮合酶(NOS)神经元形态和 NO 含量表现衰退趋

势,本研究的侧重点在于观察老年记忆正常和老年记忆减退大鼠记忆相关脑区 NO 变化的差异,为理解 NO 系统的衰老性变化在老年记忆减退中的作用提供资料;同时测定反映 NO 生成的两个指标: NOS 比活性和 NO 的终末代谢产物亚硝酸盐含量,以期使结果具有可比性、增加可信度。

1 材料与方 法

1.1 动 物

SD 雄性大鼠,由本校动物中心提供。老年鼠(24 月龄)20 只,日夜交替分笼饲养 8 个月,青年鼠(3 月龄)10 只,在同样环境下饲养 1 个月。

1.2 试 剂

还原性辅酶 II (NADPH)、苯甲基磺酰氟、大豆胰蛋白酶抑制剂、萘乙基二胺盐酸盐、对氨基苯磺酰胺、硝酸还原酶(NR)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(GD)、葡萄糖-6-磷酸(G6P)等为 Sigma 公司产品,磺基水杨酸、亚硝酸钠等为国产分析纯试剂。

1.3 Morris 水迷宫及其行为检测

Morris 水迷宫:由圆形水池和自动录像系统两部分组成^[4]。日立 U-2000 分光光度计(带有循环水浴恒温装置),三洋-70 °C 冰箱,冷库。Morris 水迷宫行为检测参照文献[2]进行。

1.4 NOS 活性测定^[3]

1.4.1 NOS 酶抽提液的制备 实验予断头处死大鼠,取海马、小脑和额叶等组织,电子天平(敏感性 1/10 000)称量,取约 100 mg 组织加入 10 倍体积的缓冲液(10 mmol/L HEPES, pH 7.4, 0.1 mmol/L EDTA, 1.0 mmol/L DTT, 质量分数为 1% 的苯甲基磺酰氟,质量分数为 1% 的大豆胰蛋白酶抑制剂)制备匀浆,匀浆液 15 000×g 离心 30 min,上清液即为 NOS 抽提液,可保存 4 h。以上操作均在 4 °C 冷库中进行。

1.4.2 抽提液蛋白质浓度测定 用 Lowry 法测定 NOS 酶抽提液总蛋白质浓度。

1.4.3 NOS 活性测定 将酶抽提液和基质液(40 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4, 1.0 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L CaCl₂, 1.6 μmol/L HbO₂, 100 μmol/L L-精氨酸, 50 mmol/L L-缬氨酸, 100 μmol/L 还原性辅酶 II)放 37 °C,预温 5 min,取基质液 0.5 mL、NOS 酶抽提液 0.5 mL 混合,立即计时、振荡,用带有温控装置(37 °C)的双波长分光光度计同时测定 A₄₀₁ 和

A₄₂₁ 值,每间隔 30 s 记录 1 次,记录时间要一致,记录到 5 min。

1.4.4 NOS 比活性计算 参考文献^[3]。

1.5 亚硝酸盐含量测定

采用硝酸还原酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶^[4]。体内产生的 NO 氧化生成亚硝酸盐,一部分亚硝酸盐进一步氧化生成硝酸盐。因而只测定亚硝酸盐含量不能准确反映体内产生 NO 的含量。本实验采用硝酸还原酶将氧化生成的硝酸盐先还原成亚硝酸盐,再同 Griess 试剂反应测定亚硝酸盐含量。但在此过程中辅酶 NADPH 氧化生成 NADP⁺, NADP⁺ 严重干扰 Griess 反应;因此需要用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(GD)将 NADP⁺ 重新还原为 NADPH。操作如下。

1.5.1 组织样品中亚硝酸盐上清液的制备 同上述 NOS 酶抽提液的制备。

1.5.2 水杨酸沉淀法制备无蛋白滤液 取上清液 500 μL 加入 1/2 体积的质量分数为 35% 的磺基水杨酸,室温反应 30 min,每隔 5 min 振荡 1 次,10 000×g 离心 15 min,将上清转移至另一管中保存于 4 °C 冰箱,此即含亚硝酸盐的无蛋白滤液。

1.5.3 亚硝酸钠标准曲线制备 按表 1 配制亚硝酸钠系列标准溶液

表 1 亚硝酸钠标准曲线制备

Table 1 Preparation of standard curve of sodium nitrite

No. of tube	1	2	3	4	5	6
NaNO ₂ (μmol/L)	0	2	4	6	8	10
1 mmol/L NaNO ₂ (μL)	0	2	4	6	8	10
H ₂ O (μL)	1000	998	996	994	992	990
A ₅₄₆	0	0.017	0.024	0.031	0.040	0.048

上述 6 管分别加入 Griess 试剂: A 液(质量分数为 0.1% 的萘乙基二胺盐酸盐溶液)200 μL 和 B 液(质量分数为 1% 的对氨基苯磺酰胺,体积分数为 5% 的磷酸溶液)200 μL,混匀,置 20 °C 反应 10 min,用分光光度计测定 A₅₄₆ 值。以亚硝酸钠浓度为横坐标, A₅₄₆ 吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.5.4 样品亚硝酸盐含量的测定 取 200 μL 无蛋白滤液,加入 160 μL 新鲜配置的溶液 C(NR 80U/L, GD 160 U/L, G6P 500 μmol/L, 磷酸缓冲液 pH(7.4), 再加入 40 μL NADPH (100 μmol/L), 置 20 °C 反应 45 min; 然后加入 A 液 400 μL 和 B 液 400 μL, 混匀,

置在 20 ℃反应 10 min。测定每个样品的 A_{546} 值,在标准曲线上查得其浓度。

1.6 数据处理

所得数据用 ANOVA 统计分析软件进行单因素方差分析,根据方差齐性与否采用相应的方法进行统计。

2 结果

2.1 水迷宫行为测试

2.1.1 行为分组结果 测得青年组平均逃避潜伏期为 (13.8 ± 10.6) s,以青年组平均逃避潜伏期的 95%和 99%正常值的上限值为界^[2],潜伏期大于 99%上限值(38.5 s)的老年大鼠为老年学习记忆减退大鼠(7只),小于 95%上限值(31.2 s)的为老年学习记忆正常大鼠(10只),潜伏期在两上限值之间的鼠为可疑,剔除不用(3只)。

2.1.2 3组大鼠空间探索试验 青年组和老年正常组大鼠的游泳轨迹主要集中在平台象限,老年记

忆减退组的游泳轨迹呈随机分布。利用数字计算机系统计算大鼠在平台所在象限的游泳距离占总距离的百分比,青年组和老年记忆正常组分别为 67.7%和 50.2%, t 检验明显高于非平台象限($P < 0.01$);老年记忆减退组为 28.7%,与非平台象限差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 老年记忆减退大鼠 NOS 比活性变化

结果见表 2。海马组织老年记忆正常组和记忆减退组同青年组相比,NOS 比活性均显著下降,老年记忆减退组比老年记忆正常组降低更为显著,NOS 活性采用每毫克组织为测定基准单位与采用每毫克蛋白为测定基准单位结果一致。小脑组织采用每毫克蛋白为测定基准单位时,老年记忆正常组和减退组与青年组相比 NOS 比活性无显著差异;采用每毫克组织为测定基准单位时,老年记忆正常组和老年记忆减退组较青年组下降,但老年记忆正常组和老年记忆减退组间无差异。额叶组织的结果同小脑组织。

表 2 老年记忆减退大鼠脑 NOS 比活性变化值

Table 2 Change of NOS specific activity in brain of aged memory-impaired rats

$\frac{z/m(\text{NOS, 2regions})^2}{\text{nmol}(\text{s} \cdot \text{mg})^{-1}}$	Group I ¹⁾	Group II ¹⁾	Group III ¹⁾
$z/m(\text{NOS, h, p})^2$	4.48 ± 1.07	2.85 ± 0.4^3	$2.02 \pm 0.28^{3,4)}$
$z/m(\text{NOS, h, t})^2$	134.50 ± 32.00	52.15 ± 7.32^3	$37.10 \pm 5.22^{3,4)}$
$z/m(\text{NOS, c, p})^2$	5.35 ± 1.33	5.12 ± 1.20	4.42 ± 1.17
$z/m(\text{NOS, c, t})^2$	171.73 ± 42.80	90.72 ± 21.28^3	75.30 ± 20.60^3
$z/m(\text{NOS, f, p})^2$	2.37 ± 0.67	2.42 ± 0.60	2.38 ± 0.52
$z/m(\text{NOS, f, t})^2$	71.43 ± 20.12	42.95 ± 10.67^3	41.97 ± 9.10^3

1) Group I (Young rats, $n=10$); Group II (Aged memory non-impaired rats, $n=10$); Group III (Aged memory-impaired rats, $n=7$). 2) To represent the regions and substances with abbreviations: c, cerebellum; f, frontal cortex; h, hippocampus; p, proteins; t, tissues. 3) Compared with Group I, $P < 0.05$. 4) Compared with Group II, $P < 0.05$

2.3 老年记忆减退大鼠亚硝酸盐含量的变化

结果见表 3。海马组织老年记忆正常组和记忆减退组同青年组相比,亚硝酸盐含量均显著下降,老年记忆减退组比老年记忆正常组降低更为显著,亚硝酸盐含量采用每毫克组织为测定基准单位与采用每毫克蛋白为测定基准单位结果一致。小脑组织采用每毫克蛋白为测定基准单位时,老年记忆正常组和减退组与青年组相比亚硝酸盐含量无显著差异;采用每毫克组织为测定基准单位时,老

年记忆正常组和老年记忆减退组较青年组下降,但老年记忆正常组和老年记忆减退组间无差异。额叶组织的结果同小脑组织。

3 讨论

由于 NO 在中枢神经系统中具有重要的作用,脑衰老时 NO 相关的形态学、神经化学变化开始引起人们重视。老龄大鼠大脑皮质和纹状体 NOS 神

神经元数目明显减少^[3]。Alzheimer's 病人颞叶皮层和杏仁核 NOS 神经元及突起显著皱缩, 海马分子层内侧 1/3 缺少 NOS 神经元, 整个海马分子层 NOS 神经元减少 18% 到 30%^[9]。衰老时与 NO 生成相关的氨基酸也发生了改变, 脑中天冬氨酸、瓜氨酸和精氨酸浓度与青年鼠比较下降^[7]。Mollace 等发现衰老时海马 NOS 活性只有青年鼠的 33%, 而小脑和大脑皮质 NOS 比活性未见显著下降^[8]。以上研究说明衰老时一些脑区 NO 相关神经元形态和代谢呈现退行性改变。但有关老年记忆减退时 NOS 相关变化的研究较少, 把具有不同学习记忆衰老程度的同年龄老年个体作为同一整体来研究老年记忆减退问题显然是不合适的, 本研究利用 Morris 水迷宫根据老年大鼠空间记忆能力的差异区分

老年记忆减退鼠和老年记忆正常鼠, 突出了记忆因素的作用。研究结果表明, 反映 NO 生成的两个指标: NOS 比活性和 NO 的终末代谢产物亚硝酸盐含量的变化完全一致, 即老年组海马 NOS 比活性和亚硝酸盐含量均显著下降, 老年记忆减退组比老年记忆正常组降低更为显著; 小脑和额叶老年组也下降, 但老年记忆正常组和老年记忆减退组间无显著差异。由于衰老时单位脑组织蛋白质含量显著低于青年鼠, 当采用每毫克组织为单位时, 老年鼠小脑和额叶 NOS 比活性和亚硝酸盐含量显著下降, 而采用每毫克蛋白为单位时, 老年鼠小脑和额叶 NOS 比活性和亚硝酸盐含量下降不显著。因此采用每 mg 组织单位可能比每 mg 蛋白单位更能反映代谢变化。

表 3 老年记忆减退大鼠脑亚硝酸盐含量变化

Table 3 Change of NO_2^- content in brain of aged memory-impaired rats

$\frac{m(\text{NO}_2^-, \text{regions})^{2)} }{(\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1})}$	Group I ⁻¹⁾	Group II ⁻¹⁾	Group III ⁻¹⁾
$m(\text{NO}_2^-, \text{h p})^{2)}$	11 615±122	11 498±68 ³⁾	11 407±65 ^{3), 4)}
$m(\text{NO}_2^-, \text{h t})^{2)}$	18 186±3 608	9 113±1 244 ³⁾	7 489±1 196 ^{3), 4)}
$m(\text{NO}_2^-, \text{c p})^{2)}$	1 069±232	11 995±157	11 853±172
$m(\text{NO}_2^-, \text{c t})^{2)}$	34 315±7447	17 641±2 784 ³⁾	15 056±3 036 ³⁾
$m(\text{NO}_2^-, \text{f p})^{2)}$	11 497±89	11 479±84	11 486±89
$m(\text{NO}_2^-, \text{f t})^{2)}$	14 999±2 686	8 512±1 439 ³⁾	8 559±1 567 ³⁾

1) Group I (Young rats, $n=10$); Group II (Aged memory non-impaired rats, $n=10$); Group III (Aged memory-impaired rats, $n=7$).

2) To represent the regions and substances with abbreviations; c, cerebellum; f, frontal cortex; h, hippocampus; p, proteins; t, tissues. 3) Compared with Group I, $P<0.05$. 4) Compared with Group II, $P<0.05$

NO 对学习记忆的作用主要是以调节长时程效应而实现的。长时程增强(LTP)是研究学习记忆机制的一种模式, 被认为是记忆形成的神经基础。NO 从突触后释放通过扩散作用于突触前膜, 起逆向信使的作用, 增加突触前谷氨酸的释放, 使突触前突触后共同参与形成 LTP^[1]。用一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 *N*-硝基精氨酸能阻断大鼠海马 LTP 的形成, 同时在行为实验中损害了空间记忆、工作记忆和嗅觉记忆^[9]。另一种长时程效应是长时程抑制(LTD), 它是小脑突触可塑性的一种模式, 小脑 NO 释放可以诱发 LTD, 血红蛋白和 *N*-硝基精氨酸则可阻断 LTD 的产生^[10]。Ingram 等用 14 unit T-1 迷宫(stone 迷宫)观察大鼠空间记忆的差异, 发现使用 NOS 抑制剂后大鼠 Stone 迷宫中空间学习记忆能力

下降, 因而提出诱导 NO 生成以加强认知能力^[11]。本研究发现老年记忆减退大鼠海马区 NO 生成进一步减少, 更加明确提示老年记忆减退的发生可能与 NO 生成减少有关, 为诱导 NO 的生成治疗老年记忆减退提供了可靠的理论依据。

参 考 文 献

- O' Dell T J, Hawkins R D, Kandel E R, *et al*. Test of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 11285
- 洪 岸, 姚志彬, 顾耀铭, 等. 老年大鼠学习记忆减退与海马结构的突触素改变. *解剖学报*, 1996, 27(2): 164

(下转第 110 页)

作用。研究证明,除心血管内皮细胞生成NO以外,心肌细胞本身也含有NOS,它可在血流应力、缓激肽和乙酰胆碱等的作用下激活,催化L-精氨酸生成NO^[8]。NO通过激活鸟苷酸环化酶使cGMP生成增加,我们检测到2K1C肾性高血压大鼠心脏的cGMP水平明显低于假手术组,而长期口服L-精氨酸后,cGMP水平显著升高,cGMP有明显抑制心肌肥厚作用。这些结果从另一个角度说明L-精氨酸可能增加2K1C肾性高血压大鼠心脏NO的生成。我们推测,2K1C肾性高血压大鼠的心脏,L-精氨酸-NO途径可能受损,NO生成减少,导致cGMP含量减少和心肌肥厚。长期补充L-精氨酸,增加NOS的底物,从而增加NO和cGMP的生成。此外,我们还观察到,口服ACEI卡托普利的2K1C肾性高血压大鼠,心脏的cGMP含量明显升高,提示ACEI防止2K1C肾性高血压大鼠的心肌肥厚可能与缓激肽分解减少、从而刺激内皮细胞增加NO生成有关。至于长期口服L-精氨酸不影响2K1C大鼠的高血压水平,其机制未明。我们观察到,长期服用L-精氨酸的2K1C肾性高血压的大鼠动脉壁的cGMP含量虽比2K1C肾性高血压大鼠高,但未恢复到假手术组大鼠的水平(待发表)。这说明有其他代偿机制维持高血压水平。

参 考 文 献

- 1 Dominiczak A F, Borhr D F. Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension*, 1995, 25: 1202
- 2 Matsuoka H, Nakata M, Kohno K. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1996, 27: 14
- 3 Lever A F, Lyall F, Morton J J. Angiotensin II, vascular structure and blood pressure. *Kidney Int*, 1992, 41: S51
- 4 郑辉,潘敬运,李洪义,等.大鼠肾性高血压发生过程中 α 和 β 肌球蛋白的重链基因表达的变化. *生理学报*, 1997, 49: 344
- 5 Amal J F, Amrani A I, Chatellier G, *et al*. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension*, 1993, 22: 380
- 6 Harding P, Carretero O A, Pointe M C. Effects of interleukin-1 β and nitric oxide on cardiac myocytes. *Hypertension*, 1995, 25: 421
- 7 王庭槐,吴滨,潘敬运.左旋精氨酸抑制血管紧张素II诱导培养心肌细胞的肥大反应. *生理学通报(广东)*, 1996, 13: 9
- 8 Kitakaze M, Node K, Komamura K, *et al*. Evidence for nitric oxide generation in the cardiomyocytes; its augmentation by hypoxia. *J Mol Cell Cardio*, 1995, 27: 2149

(1998-10-26收稿 1999-01-17修回)

(上接第106页)

- 3 Knowles R G, Salte M, Brooks S L, *et al*. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 172(3): 1042
- 4 Verdon C P, Buntun B A, Prior R L. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP⁺ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem*, 1995, 224: 502
- 5 Noda Y, Yamada K, Nabeshima T. Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behav Brain Res*, 1997, 83(1-2): 153
- 6 Unger J W, Lange W. NADPH-diaphorase-positive cell population in the human amygdala and temporal cortex; neuroanatomy, peptidergic characteristics and aspects of aging and Alzheimer's disease. *Acta Neurophathol Berl*, 1992, 83(67): 636
- 7 Strolin B M, Dostert P, mariani P, *et al*. Effect of aging on

- 1 tissue levels of amino acids involved in the nitric oxide pathway in rat brain. *J Neural Transm Gen Sect*, 1993, 94(1): 21
- 8 Mollace V, Rodino P, Massoud R, *et al*. Aged-dependent changes of NO synthase activity in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 215(3): 822
- 9 Bohme G A, Bon C, Lemaire M, *et al*. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 9191
- 10 Shibiki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*, 1991, 349: 326
- 11 Ingram D K, Spangler E L, Jilka S, *et al*. Rodent model of memory dysfunction in Alzheimer's disease and normal aging: moving beyond the cholinergic hypothesis. *Life Sci*, 1994, 55: 2037

(1998-07-05收稿 1999-01-13修回)