

· 实验研究 ·

# 老年性学习记忆减退大鼠基底前脑 NOS神经元的形态变化<sup>①</sup>

王怀星<sup>②</sup> 姚志彬 顾耀铭 陈以慈

(中山医科大学解剖学教研室脑研究室; 广州, 510089)

**摘要** 用 Morris 水迷宫行为检测方法, 以青年组平均逃避潜伏期加 2 倍标准差为下限, 加 1 倍标准差为上限将老年大鼠分为学习记忆减退组和学习记忆正常组。取受试大鼠的前脑冰冻切片, 行尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 组化染色。结果显示: 37.5% 的老年鼠为学习记忆减退鼠。与青年鼠相比, 老年学习记忆减退鼠基底脑一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 神经元胞体萎缩, 着色变淡, 突起减少。而老年学习记忆正常鼠基底脑内 NOS 神经元形态正常。IBAS 图象分析表明老年学习记忆减退鼠基底前脑各核团 NOS 神经元数、细胞面积和灰度值较青年鼠明显下降 ( $P < 0.01$ ), 而老年学习记忆正常鼠上述指标无明显改变。受试大鼠逃避潜伏期与基底前脑 NOS 神经元数量呈负相关。上述结果提示, 老年大鼠学习记忆能力减退存在着明显的个体差异。老年学习记忆减退大鼠基底前脑 NOS 神经元发生严重的退变, 这可能是老年性学习记忆减退的神经机制之一。

**关键词** 前脑; 细胞学; 学习障碍; 病理学; 记忆障碍; 病理学; 神经元; 细胞学; 大鼠; 衰老

中图分类号 R 749.1

学习记忆减退是脑衰老的主要表现之一, 其神经生物学机制尚不清楚。本实验室以往的研究发现衰老时海马内突触结构的退变和胆碱能纤维的减少与学习记忆减退有密切关系<sup>[1-3]</sup>。基底前脑是海马内胆碱能投射纤维的发源地, 也是一氧化氮合酶 (NOS) 阳性神经元较为集中的脑区。许多研究证实老年性痴呆患者认知能力损害与基底前脑胆碱能神经元溃变有关<sup>[4]</sup>。但是, 正常衰老过程中基底前脑胆碱能或 NOS 神经元是否发生退变, 它们与老年性学习记忆减退的关系如何尚不清楚。本研究通过行为筛选分组的方式, 分别观察老年学习记忆正常鼠和老年学习记忆减退鼠 NOS 神经元的形态变化, 为探讨老年性学习记忆减退的神经基础提供资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 行为测试

健康雄性 SD 大鼠 60 只, 青年鼠 (3 个月) 20 只, 老年鼠 (26 个月) 40 只。Morris 水迷宫测试方法按文献<sup>[2]</sup>进行。每只大鼠每天测试 8 次 (上、下午各 4

次), 连续 5 d, 第 5 天只在上午测试 4 次。逃避潜伏期取获取过程第 4 天、第 5 天的均数。将逃避潜伏期大于青年组逃避潜伏期均数加 2 倍标准差的老年鼠定为老年学习记忆减退鼠, 逃避潜伏期小于青年鼠逃避潜伏期均数加 1 倍标准差的老年鼠定为老年学习记忆正常鼠。逃避潜伏期介于两者之间的老年鼠剔除不用。

### 1.2 组织化学染色

行为测试后 1 周, 取青年鼠、老年学习记忆正常鼠、老年学习记忆减退鼠各 5 只。腹腔戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 麻醉, 左心室主动脉插管, 50 mL 生理盐水冲洗, 350 mL 含 4% 多聚甲醛、0.2% 戊二醛和 0.2% 苦味酸 PB 溶液经心灌注。取脑后在上述固定液里后固定 4 h, 再放入 30% 蔗糖中过夜。取基底前脑作冰冻切片, 厚 40  $\mu$ m, 隔 3 取 1 张进行 NADPH 组化染色。NOS 与 NADPH 脱氢酶为同一种酶已得到公认, 用 NADPH 组化染色可反映 NOS 的分布。染液为: NADPH 5 mg, 亚硝基四唑蓝 1.25 mg, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 8) 4 mL, 3% Triton 1 mL, 37°C 温箱孵育 1 h, 停止反应。裱片、脱水、透明。

① 国家教委博士点基金资助课题; ② 第一作者, 1963 年出生, 男, 博士研究生, 讲师

封固。全部 NADPH染色切片用作细胞学定性分析。

### 1.3 定量分析

取包含内侧隔核 (SM)、斜角带核垂直支 (vDB)、斜角带核水平支 (hDB) 的 3 个标准断面 (座标分别为前囟 + 2.5, + 0.5 和 - 0.2), 用 IBAS Rel 2.0 图象分析系统 (OPTON 公司) 测量 3 个核团内 NOS 神经元的数量、神经元胞体面积和 NOS 染色灰度。所得数据均用 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处理。

## 2 结果

3 组大鼠逃避潜伏期分布情况见图 1 经 Morris 水迷宫测试青年组平均逃避潜伏期为 (21.22 ± 10.95)。按上述标准筛选出老年学习记忆减退鼠 15 只, 占全部老年鼠的 37.5%。老年学习记忆正常鼠 13 只, 剔除 12 只, 3 组大鼠逃避潜伏期变化情况见图 2

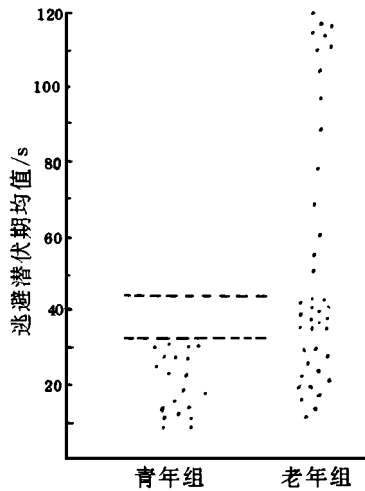


图 1 大鼠行为测试分组

每个点代表一个大鼠的平均逃避潜伏期。上虚线代表青年组平均逃避潜伏期加 2 倍标准差的数值。超过上虚线的为老年学习记忆减退鼠。下虚线代表青年组平均逃避潜伏期加 1 倍标准差的数值。低于下虚线的为老年学习记忆正常鼠。

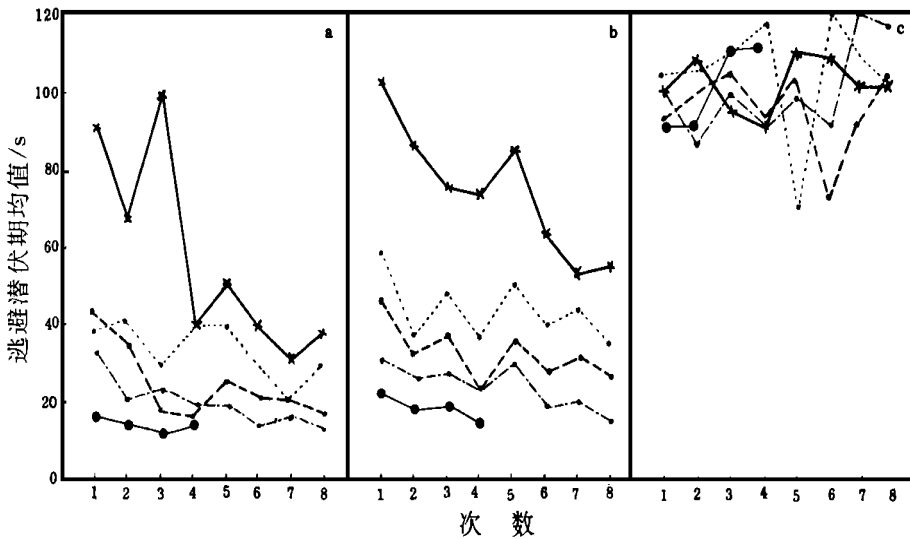


图 2 获取过程中逃避潜伏期的动态变化

a. 青年组; b. 老年学习记忆正常组; c. 老年学习记忆减退组

NADPH 组织学观察显示基底前脑 NOS 神经元自胼胝体前端水平, 向尾侧伸展到前连合交叉, 为一连续的细胞带。其外观类似 Golgi 染色神经元。依据排列位置和细胞形态, 这些神经元可分为 3 个核群: SM, vDB 和 hDB。SM 中的 NOS 细胞中等大小 (图 3), 胞体面积为  $(172 \pm 21) \mu m^2$ , vDB 和 hDB 的

胞体面积较大 (图 6, 7), 分别为  $(209 \pm 29) \mu m^2$  和  $(253 \pm 31) \mu m^2$ 。NOS 神经元树突复杂程度从前向后逐渐增加。

和青年组相比, 老年学习记忆减退组 NOS 神经元 NADPH 染色变淡, 有些胞体变形、萎缩, 表面出现棘样突起或切迹; 突起减少, 突起上的胞体数量下

降,神经毡的密度降低(图 5, 10, 11) 而老年学习记忆正常大鼠的 NOS神经元胞体深染,无明显形态学异常(图 4, 8, 9)。定量分析表明老年学习记忆减退鼠较青年鼠 SM、vDB、hDB3个核团的 NOS神经元数量明显减少,分别下降了 33.33%、33.19%、35.18%,差异有显著意义(表 1)。老年学习记忆正常鼠和青年鼠相比较 NOS神经元数量未见减少( $P > 0.05$ )。相关分析表明受试大鼠逃避潜伏期与基底前脑的 NOS、DB 神经元数量呈负相关(SM:  $r = -0.7156, P < 0.01$ ; vDB  $r = -0.7437, P < 0.01$ ; hDB  $r = -0.8013, P < 0.01$ )。

表 1 基底前脑 3个标准断面 NOS神经元数量和的比较(个)

	青年组	老年学习记忆	
		正常组	减退组
SM	185±10	171±11	114±8 <sup>1),2)</sup>
vDB	145±8	137±7	97±8 <sup>1),2)</sup>
hDB	364±15	253±17	164±11 <sup>1),2)</sup>

1)与青年组相比较,  $P < 0.01$ ; 2)与老年学习记忆正常组相比较,  $P < 0.01$

老年学习记忆减退大鼠的 NOS神经元丢失的同时还伴有细胞染色变淡。图象分析显示,老年学习记忆减退组大鼠的 NOS神经元灰度值较青年组和老年学习记忆正常组均显著减少; SM 下降 24.52% 和 23.68%, vDB 下降 25.69% 和 26.58%, hDB 下降 31.52% 和 28.57%。老年学习记忆减退组与青年、老年学习记忆正常组相比较 3个核团皆有明显差异( $P < 0.01$ );而老年学习记忆正常组与青年组相比较 3个核团 NOS神经元灰度值之间没有明显差异( $P > 0.05$ )(见表 2)。

表 2 基底前脑 NOS神经元灰度值的比较

	青年组	老年学习记忆	
		正常组	减退组
SM	117±5	116±9	88±10 <sup>1),2)</sup>
vDB	115±5	116±9	85±5 <sup>1),2)</sup>
hDB	120±4	115±7	83±7 <sup>1),2)</sup>

1)与青年组相比较,  $P < 0.01$ ; 2)与老年学习记忆正常组相比较,  $P < 0.01$

表 3显示 3组大鼠基底前脑各核团 NOS神经元的胞体面积 与青年组和老年学习记忆正常组相

比较,老年学习记忆减退大鼠基底前脑各核团 NOS神经元胞体面积下降, SM 中下降 25.00% 和 23.2%; vDB 中下降 30.14% 和 1.46%; hDB 中下降 35.18% 和 33.07%。老年学习记忆减退组与青年组、老年学习记忆正常组相比较 3个核团 NOS神经元胞体面积皆有明显差异( $P < 0.01$ );而老年学习记忆正常组与青年组相比较 3个核团之间没有明显差异( $P > 0.05$ )(见表 3)。

表 3 基底前脑 NOS神经元胞体面积的比较 ( $\mu m^2$ )

	青年组	老年学习记忆	
		正常组	减退组
SM	172±21	168±24	129±18 <sup>1),2)</sup>
vDB	209±29	213±23	146±25 <sup>1),2)</sup>
hDB	253±31	251±35	168±29 <sup>1),2)</sup>

1)与青年组相比较,  $P < 0.01$ ; 2)与老年学习记忆正常组相比较,  $P < 0.01$

### 3 讨论

#### 3.1 相同年龄老年鼠存在行为差异

通过 Morris水迷宫测试分析表明: 26个月龄老年鼠有 37.5% 的空间学习过程受到损害,而 62.5% 的 26个月龄老年鼠没有表现出获取过程异常。表明老年鼠的学习记忆能力有较大差异。这种差异反应了个体学习记忆能力对衰老的敏感性不同,即随着年龄的增加一部分大鼠学习的记忆能力的衰退发生得早且严重,另一部分大鼠的行为学衰退则相对迟缓,在受测试年龄时,尚未表现出现明显的学习记忆能力的缺陷。老年大鼠平均逃避潜伏期的分布情况亦充分说明了这一点,即部分老年大鼠的测试值与青年鼠处于同一范围(下虚线以下)。

#### 3.2 老年学习记忆减退鼠行为学与基底前脑 NOS神经元的关系

按照结构和功能统一的观点,出现这一差异必定有其形态基础。我们将表现出行为损害的和行为正常的老年大鼠分别观察其基底前脑结构上的差异,这样有利于进一步探讨基底前脑神经元的衰老性变化与老年性学习记忆减退的关系。

定量分析显示,和青年组相比,老年学习记忆减退组基底前脑 NOS阳性神经元的数量、胞体面积和染色灰度值均明显下降,且这种下降的程度和学习记忆能力的减退呈相关关系。而老年学习记忆正常

大鼠却未发现细胞丢失、萎缩等退变现象。这一结果表明衰老时基底前脑 NOS神经元的退变是老年性学习记忆能力减退的神经生物学机制之一。这与我们前期发现老年学习记忆减退大鼠海马内突触结构退变和胆碱能纤维丢失的结果相验证。因为基底前脑是海马胆碱能传入纤维的起源,而 NOS神经元是基底前脑胆碱能神经元的一个亚族。文献报道在基底前脑约 97% 的 NOS神经元是胆碱能神经元,约占胆碱能细胞的 30% [5]。

### 3.3 NO减少可能是学习记忆减退的机制

关于基底前脑神经元损害与老年性学习记忆减退的关系,以往研究者的注意力多集中于隔核、海马胆碱能系损害 [6]。从现在结果看,除胆碱能系统损害后,NO减少也可能发挥重要作用。因为基底前脑的 NOS神经元既是胆碱能又是 NO能的,它们的轴突经穹窿投射到海马。NOS神经元丢失和 NOS活性下降都可造成海马内 NO的产量和释放减少。NO在海马内长时程突触增强(LTP)现象的产生和维持中的作用已被证实 [7]。因此,老年学习记忆减退大鼠基底前脑 NOS神经元的退变和丢失表明 NO和乙酰胆碱两种递质的损害都参与了老年学习记忆减退神经基础的形成。

(本文图 3-11见封 2)

### 参 考 文 献

1 洪 岸,姚志彬,顾耀铭,等.老年性学习记忆减

退大鼠新皮质和海马结构胆碱能纤维的定量研究.神经解剖学杂志,1994,10(1):17

2 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

3 洪 岸,姚志彬,顾耀铭,等.老年学习记忆减退大鼠齿状回突触的定量研究.解剖学杂志,1996,19(3):222

4 Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, *et al.* Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 1982, 215(5):1237

5 Kitchen PD, Diamond J. Distribution and colocalization of choline acetyltransferase immunoreactivity and NADPH diaphorase reactivity in neurons within the medial septum and diagonal band of Broca in the rat basal forebrain. *J Comp Neurol*, 1993, 335(1):1

6 Fisher W, Chen KS, Gage FH, *et al.* Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. *Neurobiol Aging*, 1992, 13(1):9

7 Bohme GA, Bon C, Stutzman JM, *et al.* Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol*, 1991, 199(2):379

(1996-09-05收稿 1996-11-08修回)

## THE MORPHOLOGICAL CHANGES OF NOS NEURONS IN THE BASAL FOREBRAIN OF AGED LEARNING AND MEMORY DEFICIT RAT

Wang Huaixing Yao Zhibin Gu Yaoming Chen Yici

(Brain Research Group, Department of Anatomy, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Forty aged(26-month-old) rats were divided into learning and memory deficits group and normal group according to the mean escape latency of young(3-month-old) rats in Morris water maze task. Forebrain freezing microtome tissue sections were stained by NADPH histochemical technique. The result showed that 37.5% of old rats were learning and memory deficit rats, and theirs NOS neurons in basal forebrain

(下转第 8页)

- CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> gene, a related gene and a pseudogene. *Am J Hum Genet*, 1989, 45(6): 889
- 9 Wang SL, Huang JD, Lai MD, *et al.* Molecular basis of genetic variation in debrisoquine hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RELP and sequence of CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub>. *Clin Pharmacol Ther*, 1993, 53(4): 410
- 10 Matsunaga E, Zeugin T, Zanger UM, *et al.* Sequence requirements for cytochrome P450II D1 catalytic activity. *J Biol Chem*, 1990, 265(28): 1719
- 11 陶恩祥, 刘焯霖. 细胞色素氧化酶 P450<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 多态性及其分子生物学进展. *国外医学遗传学分册*, 1996, 19(4): 180
- (1996-09-13收稿 1996-12-10修回)

## THE POLYMORPHISM OF EXON 1 AND EXON 9 OF CYTOCHROME P450<sub>2</sub>D<sub>6</sub> GENE IN CHINESE SUBJECTS

Tao Enxiang Liu Zhuolin Chen Bao Li Jinru Pan Xibang

(Department of Neurology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

The polymorphism of cytochrome P450<sub>2</sub>D<sub>6</sub> (debrisoquine-4-hydroxylase) is a genetic variation in drug metabolism, which can be characterized by two phenotypes, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The frequencies of the phenotypes and the polymorphism of CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> gene in different nationalities are obviously different. This paper analysed DNA from 83 Chinese subjects for the polymorphism of C<sub>188</sub>→T in exon 1 and G<sub>4268</sub>→C in exon 9 of CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> gene by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The frequencies of C<sub>188</sub>→T allele and G<sub>4268</sub>→C allele were 0.59 and 0.66 respectively. Both T<sub>188</sub>/T<sub>188</sub> and C<sub>4268</sub>/C<sub>4268</sub> homozygous alleles were 0.38 and 0.34 respectively. In contrast to the other reports, the frequencies of T<sub>188</sub> and C<sub>4268</sub> alleles in the Chinese were shown significantly higher than those of the European.

**Subject headings** cytochrome C oxidase/genetics; polymorphism; restriction fragment length; exons/genetics

(上接第 4 页)

shrunk, the dendrites decreased, compared with the youngs. The old learning and memory normal rats showed no obviously changes. IBAS image system was used for quantity analysis. The cell number, the cell area and the gray level of NOS neurons in the basal forebrain of the aged-deficits obviously decreased compared with the youngs ( $P < 0.01$ ). The escape latencies of the tested rats correlated inversely with the NOS neuron numbers in the basal forebrain. The results indicated that the changes of NOS neurons in basal forebrain is one of the nerve mechanism of aged learning and memory deficits.

**Subject headings** prosencephalon/cytology; learning disorders/pathology; memory disorders/pathology; neuron/cytology; rats; aging

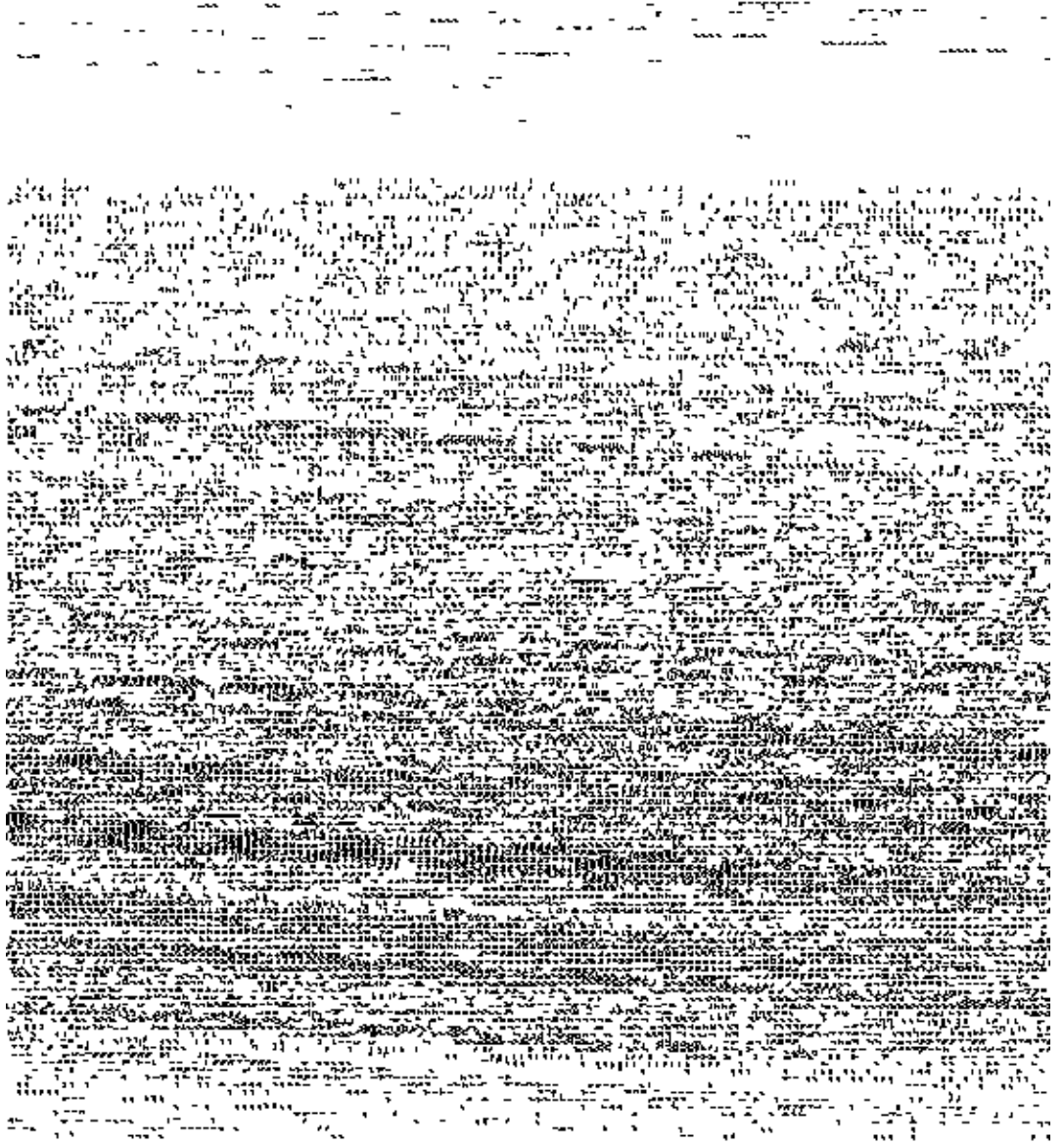


图 3 青年鼠内侧隔核 图 4 老年学习记忆正常鼠内侧隔核 图 5 老年学习记忆减退鼠内侧隔核 图 6 青年鼠斜角带核垂直支 图 7 青年鼠斜角带核水平支 图 8 老年学习记忆正常鼠斜角带核垂直支 图 9 老年学习记忆正常鼠斜角带核水平支 图 10 老年学习记忆减退鼠斜角带核垂直支 图 11 老年学习记忆减退鼠斜角带核水平支 图 3~ 11( $\times 10$ )