

# 海人酸活化的小胶质细胞 $H_2O_2$ 、NO 的分泌对海马神经元谷氨酸含量的影响

唐振刚<sup>1</sup> 刘俊<sup>1</sup> 郑红花<sup>3</sup> 朱威<sup>2</sup> 尧青<sup>2</sup> 李正莉<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 郧阳医学院附属人民医院 湖北 十堰 442000

<sup>2</sup> 华中科技大学同济医学院基础学院 湖北 武汉 430030

<sup>3</sup> 厦门大学医学院基础学院 福建 厦门 361005

**摘要** 目的:初步探讨海人酸(KA)活化培养的新生 SD 大鼠小胶质细胞(MG)及其分泌的一氧化氮/过氧化氢(NO/ $H_2O_2$ )、海马神经元、谷氨酸(Glu)之间的相互关系。方法:以 KA 作为 MG 的激活剂,以一氧化氮合成酶(NOS)的抑制剂氨基胍(AG)或过氧化氢的水解酶(CAT)作为工具药,先检测原代分离纯化培养的 MG 在 KA 激活后及工具药作用后各组条件培养液中 NO 和  $H_2O_2$  含量的变化,再用各组小胶质细胞条件培养液孵育离体海马神经元,观察其对神经元内 Glu 表达的影响。结果:KA 作用后各组条件培养液中 NO 和  $H_2O_2$  含量明显升高,经 AG 或 CAT 处理后各组条件培养液中 NO 和  $H_2O_2$  含量显著降低;海马神经元的 Glu 免疫反应性 KA 组较对照组明显增强,在 AG+KA 组和 CAT+KA 组较 KA 组明显减弱。结论:活化的 MG 可能通过氧化损伤机制作为参与癫痫发作一个重要环节,提示采取抑制小胶质细胞活化、减少氧化损伤也可能是癫痫防治研究的一个重要方向。

**关键词** 癫痫;小胶质细胞;神经元;过氧化氢;一氧化氮;谷氨酸

中图分类号 R724.1 文献标识码 A 文章编号 1671-8852(2010)05-0584-04

## Effects of Increased Secretion of $H_2O_2$ and NO in Kainic Acid Activated Microglia on the Content of Glutamate in Rat Hippocampal Neurons

TANG Zhengang<sup>1</sup>, LIU Jun<sup>1</sup>, ZHENG Honghua<sup>3</sup>, ZHU Wei<sup>2</sup>, YAO Qing<sup>2</sup>, LI Zhengli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Neurosurgery, Renmin Hospital of Yunyang Medical College, Shiyang 442000, China

<sup>2</sup> Dept. of Anatomy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

<sup>3</sup> Dept. of Basic Medical Sciences, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

### Abstract

**Objective:** To explore the relationship among activated microglia, NO/ $H_2O_2$ , hippocampal neurons and glutamate(Glu) and to provide new research data for the mechanism of epilepsy and its controlling strategies. **Methods:** Microglia and hippocampal neurons were cultured and kainic acid (KA) was chosen to activate microglia. Aminoguanidine (AG), a NOS inhibitor, and hydrogen peroxide hydrolase (CAT) were selected as medical intervention tools. Firstly, the content of NO and  $H_2O_2$  in the conditioned medium of primary cultured microglia induced by KA were detected, and then primary cultured hippocampal neurons were incubated with different microglial conditioned medium to observe the expression of Glu by immunocytochemical staining. **Results:** Con-

centrations of NO and  $H_2O_2$  in microglial conditioned medium of each group were higher than those of the medium before the stimulating factors were removed. After treated with CAT or AG, NO and  $H_2O_2$  level in the KA conditioned medium were significant decreased and the immunostaining of Glu in hippocampal neurons of KA group was stronger than that of the control group, and it was significantly weakened in the AG + KA group and the CAT + KA group when compared to that of KA group. **Conclusion:** Activated microglia may be involved in epilepsy by oxidative damage mechanisms. Therefore, it is an important strategy against epilepsy by inhibiting microglia activation and reducing oxidative damage.

**Key Words** Epilepsy; Microglia; Neurons; Hydrogen Peroxide; Nitric Oxide; Glutamate

癫痫是一种慢性、反复发作性神经系统疾病,其电生理基础是神经元的异常同步过度放电<sup>[1]</sup>,神经化学机制与脑内兴奋性神经递质和抑制性递质的平衡失调有密切的关系。小胶质细胞(microglia, MG)占胶质细胞的20%左右,是中枢神经系统的免疫监视细胞,对脑内各种病理刺激能迅速做出反应,表现为从静息状态(具有较小的胞体、较多分枝杆状突起)转化为激活状态(胞体较大、变圆并具有变形和吞噬功能)。在实验性脑梗死研究中可以观察到小胶质细胞、 $H_2O_2$ 、NO 三者的动态变化具有相关性,提示在病理情况下,脑内  $H_2O_2$ 、NO 含量增高可能主要源于 MG。本实验选择以海人酸(kainic acid, KA)作为 MG 的激活剂,以 NOS 的抑制剂氨基胍(aminoguanidine, AG)或过氧化氢的水解酶(CAT)作为工具药,先检测原代分离纯化培养的 MG 在 KA 激活后各组条件培养液中 NO 和  $H_2O_2$  含量的变化,再用各组小胶质细胞条件培养液孵育离体海马神经元,观察其对神经元内谷氨酸(glutamate, Glu)表达的影响,初步探讨 KA 活化的 MG、NO/ $H_2O_2$ 、海马神经元、Glu 之间的相互关系,为癫痫发病机制研究和癫痫的防治策略提供新的研究资料。

## 1 材料与方法

**1.1 MG 纯化培养及条件培养液的获取** 参照文献方法纯化培养 MG<sup>[2]</sup>。新生 SD 大鼠(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)无菌环境下开颅取脑,冷 D-Hanks 液清洗并仔细剔除脑膜及血管,取大脑皮质,充分剪碎,0.125%胰蛋白酶( $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min),终止消化后吸管适量吹打,过滤,离心(1 000 r/min, 10 min),弃上清,加入含 10%胎牛血清、10%小牛血清的 DMEM/F12 完全培养基(Gibco 公司)制成细胞悬液,接种于预先涂布多聚赖氨酸(Sigma 公司)的培养瓶( $75\text{ cm}^2$ , 250 ml)进行( $37$

$^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ )培养。混合胶质细胞培养至第 7-9 天,细胞充分分层生长后,置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  恒温摇床中,150 r/min 振荡 2 h 后,镜下观察,待大量细胞悬浮后,收集细胞悬液,离心(1 000 r/min, 10 min)收集细胞,纯化培养的小胶质细胞以  $4\times 10^5/\text{cm}^2$  的密度种植于预先涂布多聚赖氨酸的 24 孔培养板中(孔内预铺盖玻片),30 min 后完全换液一次,去除未贴壁细胞。加入含 10%胎牛血清、10%小牛血清的 DMEM/F12 培养液继续培养。根据代谢情况,每 2-3 d 换液一次,每次 1/2 体积,换液中逐渐过渡至无血清培养。纯化培养的小胶质细胞培养 5-7 d,至胞体回缩、突起伸出。采用 OX-42 抗血清鉴定 MG 纯度。纯化率达 90%以上(见插页 1 图 1)。

**实验分组及处理:**①KA 组,加入  $1\times 10^{-4}\text{ mol/L}$  的 KA 作用 2 h,收集培养液(称换液前培养液),加入无血清培养基继续培养 4 h,再次收集培养液(称换液后培养液)。②CAT 预处理(CAT+KA)组,即预先加入 CAT(2 g/L)作用 4 h,再加入上述浓度的 KA 作用 2 h,③AG 预处理(AG+KA)组,预先加入 AG(4 mmol/L)作用 24 h,再加入上述浓度的 KA 作用 2 h。④对照组,不加特殊处理。各组均收集换液前、后培养液。做好标记,  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱冻存。

**1.2 NO、 $H_2O_2$  含量检测** 对收集的换液前、后的各组 MG 条件培养液采用分光光度法分别进行 NO、 $H_2O_2$  含量检测(U-2000 可见-紫外分光光度计, HITACHI, 日本),具体操作按试剂盒说明。试剂盒购自南京建成生物公司。

**1.3 神经元培养** 原代海马神经元的培养参照文献[3]进行,即取新生大鼠大脑海马,0.125%胰蛋白酶消化( $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min),加入完全培养基终止消化,经吹打、过滤、离心(1 000 r/min, 5 min)后,加入完全培养基制成细胞悬液行差速黏附处理,以  $2\times 10^5/\text{cm}^2$  的密度种植于已包被多聚赖氨酸的玻片上。二氧化碳培养箱(5% $\text{CO}_2$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ )培养 24 h 后,全量

换 2% B27 的 DMEM/F12 无血清培养基。3 d 后半量换液,并加入阿糖胞苷(Sigma 公司,5  $\mu\text{mol/L}$ )以进一步抑制非神经元的生长。2 d 后,全量换 2% B27 的 DMEM/F12 无血清培养基以消除阿糖胞苷对神经元的影响。再继续培养 2-3 d,即可获取纯化的神经元,行 NSE 免疫细胞化学方法鉴定,纯化率达 90% 以上(见插页 1 图 2)。

#### 1.4 免疫细胞化学染色

**1.4.1 小胶质细胞 iNOS 免疫细胞化学染色** 收集 MG 条件培养液后,各组小胶质细胞爬片,计 3 组:对照组,KA 组,AG+KA 组。用预冷的 PBS 漂洗 1 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 漂洗 5 min  $\times 3$ ,0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -甲醇孵育 30 min,PBS 漂洗 5 min  $\times 3$ ,3% BSA 孵育 30 min,各组细胞片分别滴加兔抗 iNOS 抗体(1:200,Santa Cruz 公司),4  $^\circ\text{C}$  冰箱孵育 48 h,生物素化羊抗兔(1:200)孵育 1 h,SABC(1:200)孵育 1 h,DAB 显色,各步骤之间 PBS 漂洗,脱水、透明、中性树脂封片。显微镜下观

察,摄片。对照试验以 PBS 替代一抗。

**1.4.2 海马神经元 Glu 免疫细胞化学染色** 实验分为 4 组:对照组,KA 组,AG+KA 组,CAT+KA 组。取换液后的 MG 条件培养液分别孵育上述 4 组海马神经元 4 h,再进行兔抗 Glu 抗体(1:2 000,Sigma 公司)免疫细胞染色,实验步骤同上。对照试验以 PBS 替代一抗。

**1.5 图像分析及统计学处理** 用 HMIAS-2000 型高清晰度彩色病理图文分析系统分别对 NOS、Glu 免疫染色切片进行扫描,每组选 10 个样本,每个样本选择 5 个视野,分别测定每张切片免疫染色的平均光密度值(OD 值)。

实验所有数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对所得数据输入统计学软件 SPSS 15.0,采用  $t$  检验。以  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $\text{NO}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量检测 见表 1。

表 1 MG 条件培养液中  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{NO}$  含量测定( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Levels of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NO}$  in microglial conditioned medium

组别	$\text{H}_2\text{O}_2$ (mmol/L)		$\text{NO}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	
	换液前	换液后	换液前	换液后
对照组	11.31 $\pm$ 0.84	13.26 $\pm$ 0.81	257.80 $\pm$ 6.42	37.92 $\pm$ 5.97
KA 组	39.97 $\pm$ 2.73*	74.55 $\pm$ 1.40*	370.14 $\pm$ 33.97*	259.37 $\pm$ 35.74*
CAT+KA 组	9.90 $\pm$ 1.54#	18.51 $\pm$ 0.77*#	97.58 $\pm$ 10.09*#	39.12 $\pm$ 1.88#

与对照组相比, \*  $P < 0.01$ ; 与 KA 组相比, #  $P < 0.01$

**2.2 MG 的 iNOS 免疫细胞化学染色** 从 MG 的 NOS 免疫细胞化学染色的照片可见,对照组有 iNOS 免疫染色阳性细胞(见插页 1 图 3),KA 组 iNOS 免疫染色明显增强,免疫染色阳性细胞数明显增多(见插页 1 图 4)。AG+KA 组 iNOS 免疫染色和阳性细胞数较 KA 组降低(见插页 1 图 5)。其平均光密度(OD)值的差异具有统计学意义。PBS 替代一抗的对照试验为阴性。

**2.3 海马神经元 Glu 免疫细胞化学染色** 海马神经元的 Glu 免疫细胞化学染色可见,对照组有 Glu 免疫染色阳性细胞(见插页 1 图 6),KA 组 Glu 免疫

表 2 各组小胶质细胞内 NOS 免疫反应平均光密度值( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 The mean optical density values of NOS immune response in microglia of each group

分组	对照组	KA 组	AG+KA 组
平均光密度	0.194 $\pm$ 0.025#	0.281 $\pm$ 0.019*	0.237 $\pm$ 0.020*#

与对照组相比, \*  $P < 0.01$ ; 与 KA 组相比, #  $P < 0.01$

染色明显增强,免疫染色阳性细胞数明显增多(见插页 1 图 7)。AG+KA 组(见插页 1 图 8)和 CAT+KA 组(见插页 1 图 9)Glu 免疫染色 KA 组减弱。其平均光密度值的差异具有统计学意义(表 3)。PBS 替代一抗的对照试验为阴性。

表 3 各组神经元内 Glu 免疫反应平均光密度(OD)值( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 The mean optical density (OD) values of Glu immune response in hippocampal neurons of each group

分组	对照组	KA 组	AG+KA 组	CAT+KA 组
平均光密度	0.263 $\pm$ 0.029#	0.481 $\pm$ 0.034*	0.338 $\pm$ 0.025*#	0.307 $\pm$ 0.027*#

与对照组相比, \*  $P < 0.01$ ; 与 KA 组相比, #  $P < 0.01$

## 3 讨论

癫痫是由多种病因引起的慢性中枢神经系统疾

病,各种癫痫发作的原因都是由于中枢神经系统某些部位神经元群发生突然、过度和同步性异常放电所引起的。但引发这些神经元群异常放电的确切机

制至今尚未完全明了。目前癫痫研究的致病机制主要包括有:谷氨酸和  $\gamma$ -氨基丁酸含量或功能平衡失调;  $Ca^{2+}$  内流引发的兴奋毒性; 苔藓纤维芽生假说; 免疫-神经-内分泌调节网络失衡<sup>[4]</sup>; 氧化损伤<sup>[5]</sup> 等。氧化损伤是指活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 造成的细胞氧化损伤; ROS 包括超氧阴离子 ( $O_2^-$ )、过氧化氢 ( $H_2O_2$ )、羟基自由基 ( $\cdot OH$ )、和单线态氧 ( $O_2$ ) 以及一氧化氮 (NO) 等, 来源于线粒体和内质网。

KA 是天然提取的谷氨酸类似物, 不管是脑内局部还是系统给予惊厥剂量的 KA 均可引起大鼠癫痫发作。Rizzi<sup>[6]</sup> 等和 Tooyama 等<sup>[7]</sup> 在 KA 诱导的癫痫持续状态大鼠海马部位观察到胶质细胞和小胶质细胞的活化和细胞因子的释放, 以及神经元的坏死; Aronica<sup>[8]</sup> 等还对伴随慢性顽固性癫痫病人的神经胶质瘤中小胶质细胞的分布、特征和临床意义进行了研究; 发现活化小胶质细胞位于血管周围并成簇聚集于肿瘤神经细胞周围, 并认为活化小胶质细胞的密度与癫痫持续时间、发作频率有关。上述研究提示在癫痫的早期就有 MG 的活化, 后者可能在癫痫的反复发作病程中发挥作用。推测 MG 的活化既是癫痫发作的结果, 也可能是癫痫反复发作的促病因素。

本实验室的前期研究和预实验发现: 离体纯化培养的 MG 可被 KA 激活, 活化的小胶质细胞除可分泌 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  等细胞因子, 本实验检测出活化的 MG 条件培养液中, KA 组的  $H_2O_2$  和 NO 含量较对照组显著增高, 经过 iNOS 抑制剂 AG 预处理的 AG+KA 组的 NO 含量较 KA 组显著下降, 经过 CAT 预处理的 CAT+KA 组的  $H_2O_2$  含量较 KA 组亦有显著性下降。并通过免疫细胞化学方法证实 MG 内 NOS 免疫反应在 KA 组明显强于对照组, 而在 AG+KA 组明显弱于 KA 组, 从而间接证实了 MG 条件培养液内 NO 的含量变化。这些研究结果提示: KA 活化的 MG 能增加  $H_2O_2$  和 NO 的分泌。我们推测: 在活体 KA 致癫痫发作过程中, 小胶质细胞也可能被 KA 直接激活, 并释放大量的  $H_2O_2$  和 NO 参与癫痫病理过程。

癫痫发作的最终原因是脑内神经元的兴奋性异常增高。Glu 是体内主要的兴奋性氨基酸, 谷氨酸及其受体的含量或功能异常与癫痫的病理过程有密切关系。通过本实验证明小胶质细胞可被 KA 直接激活, 并释放大量的  $H_2O_2$  和 NO。将活化的 MG 条件

培养液孵育离体海马神经元, 结果表明: 海马神经元 Glu 免疫反应在 KA 组明显强于对照组, 在 CAT+KA 组和 AG+KA 组明显弱于 KA 组。说明  $H_2O_2$  和 NO 在 KA 激活的 MG 促进海马神经元兴奋性方面充当了重要的媒介物质。

在各种慢性神经系统疾病发病机制研究中, 关于 NO 与 Glu 的关系已有相关报道。吴原等<sup>[9]</sup> 在 KA 致病大鼠的海马神经元中可以发现了 NO 介导的 Glu 神经毒性, 并有学者探讨机制如下<sup>[10]</sup>: 在神经细胞膜上有 4 种类型的兴奋性氨基酸受体, 其中 N-甲基-D 天门冬氨酸受体 (NMDA) 调控细胞膜上钙离子通道, NO 可促进激活 NMDA 受体, 使  $Ca^{2+}$  通道活化, 细胞外  $Ca^{2+}$  涌入细胞内, 同时兴奋性氨基酸通过其受体产生胞内信使, 使胞内钙库释放  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  又激活磷脂酶、蛋白酶、蛋白激酶、磷酸酶和 NOS, 使海马、皮质等部位产生过量的 NO 及氧自由基, 大量的 NO 又激活 NMDA 受体, 由此循环, 进一步加重神经元损害。同时, 大量的 NO 具有神经毒性作用, 一旦 pH 低于生理值时, 立即产生氧化性和细胞毒性非常强的类羟基和  $NO_2^-$  自由基, 能损伤正常细胞。关于  $H_2O_2$  与 Glu 之间的联系, 我们分析, 由于  $H_2O_2$  具有脂溶性, 易于透过细胞膜, 因此用 KA 激活的 MG 条件培养液孵育海马神经元时, 大量的  $H_2O_2$  可进入神经元内, 通过产生氧自由基, 损伤线粒体, 使胞内钙释放, 钙离子作为重要的信使分子可以调节 Glu 的生成。也有文献报道, 在脑缺血实验研究中,  $H_2O_2$  的升高可促进神经元内 Glu 含量的增高<sup>[11]</sup>。这些表明氧自由基、一氧化氮等都可能参与了 Glu 异常增高导致的兴奋性毒性脑损伤。

综上所述, 我们推测当 MG 接触到 KA 后, 通过激活 MG 的 NMDA 和 KA 受体, 使细胞内  $Ca^{2+}$  超载, 使得 MG 内 NOS, 尤其是 iNOS 持续激活, 合成大量 NO, 同时产生大量  $H_2O_2$ , 作用于神经元, 从而促进一系列氧化反应, 导致细胞的氧化损伤, 产生神经兴奋性毒性, 诱导或促使了癫痫的发生。因此, 小胶质细胞的活化可能以氧化损伤机制作为参与癫痫发作的一个重要环节, 提示采取抑制小胶质细胞活化、减少氧化损伤也可能是癫痫防治研究的一个重要方向。

#### 参考文献

- [1] Litt B, Echaz J. Prediction of epileptic seizures[J]. Lancet Neurology, 2002, 1:22-30.

(下转第 591 页)

- [5] Brown KR, England KM, Goss KL, et al. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung *in vitro*[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001,281(4):L1 001-1 010.
- [6] Raoul W, Chailley-Heu B, Barlier-Mur AM, Effects of vascular endothelial growth factor on isolated fetal alveolar type II cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004,286(6):1 293-1 301.
- [7] Chen CM, Wang LF. High-dose vascular endothelial growth factor increases surfactant protein gene expressions in preterm rat lung[J]. *Early Hum Dev*, 2007,83(9):581-584.
- [8] 祝华平,常立文,李文斌,等. 苦杏仁甙对高氧暴露早产鼠肺泡 II 型细胞表面活性物质蛋白 A、B、C mRNA 表达的影响[J]. *中华围产医学杂志*, 2004, 7(4),832 40-46.

(2009-05-08 收稿)

编辑 沈建国

## (上接第 587 页)

- [2] Nakajima K, Takemoto, Kohsak S. Retinoic acid enhances the secretion of plasminogen from cultured rat microglia[J]. *FEBS Lett*,1992,314:167-170.
- [3] Wang XJ, Zheng HH, Liu CJ, et al. Ciliary neurotrophic factor-treated astrocyte conditioned medium regulates the L-type calcium channel activity in rat cortical neurons[J]. *Neurochem Res*,2008,33:826-832.
- [4] 朱长庚. 神经-免疫-内分泌网络与癫痫发病机制的关系[J]. *解剖学报*,2002,33:321.
- [5] 刘朝巍,张涛,杨卓. 氧化应激损伤线粒体参与癫痫病理过程[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(1): 198-200.
- [6] Rizzi M, Perego C, Aliprandi M, et al. Glia activation and cytokine increase in rathippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development [J]. *Neurobiol Dis*, 2003,14(3):494-503.
- [7] Tooyama I, Bellier JP, Park M, et al. Morphologic study of neuronal death, glial activation, and progenitor cell division in the hippocampus of rat models of epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2002, 43(Suppl 9):39-43.
- [8] Aronica E, Gorter JA, Redeker S, et al. Distribution, characterization and clinical significance of microglia in glioneuronal tumours from patients with chronic intractable epilepsy[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005, 31(3):280-291.
- [9] 吴原,庞家容,郑金瓯,等. KA 致病大鼠海马神经元凋亡和一氧化氮合成酶关系的研究[J]. *广西医科大学学报*, 2008,25(1):17-20.
- [10] Avshalumov MV, Rice ME. NMDA receptor activation mediates hydrogen peroxide induced pathophysiology in rat hippocampal slices[J]. *J Neurophysiol*, 2002, 87: 2 896-2 903.
- [11] Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia[J]. *Life Sci*,2001,69:369-381.

(2010-04-01 收稿)

编辑 沈建国

海人酸活化的小胶质细胞增加 $H_2O_2$ 、NO的分泌对海马神经元  
谷氨酸含量的影响(正文第584页)

Effects of Increased Secretion of  $H_2O_2$  and NO in Kainic Acid Activated Microglia on the  
Content of Glutamate in Rat Hippocampal Neurons(Page 584)

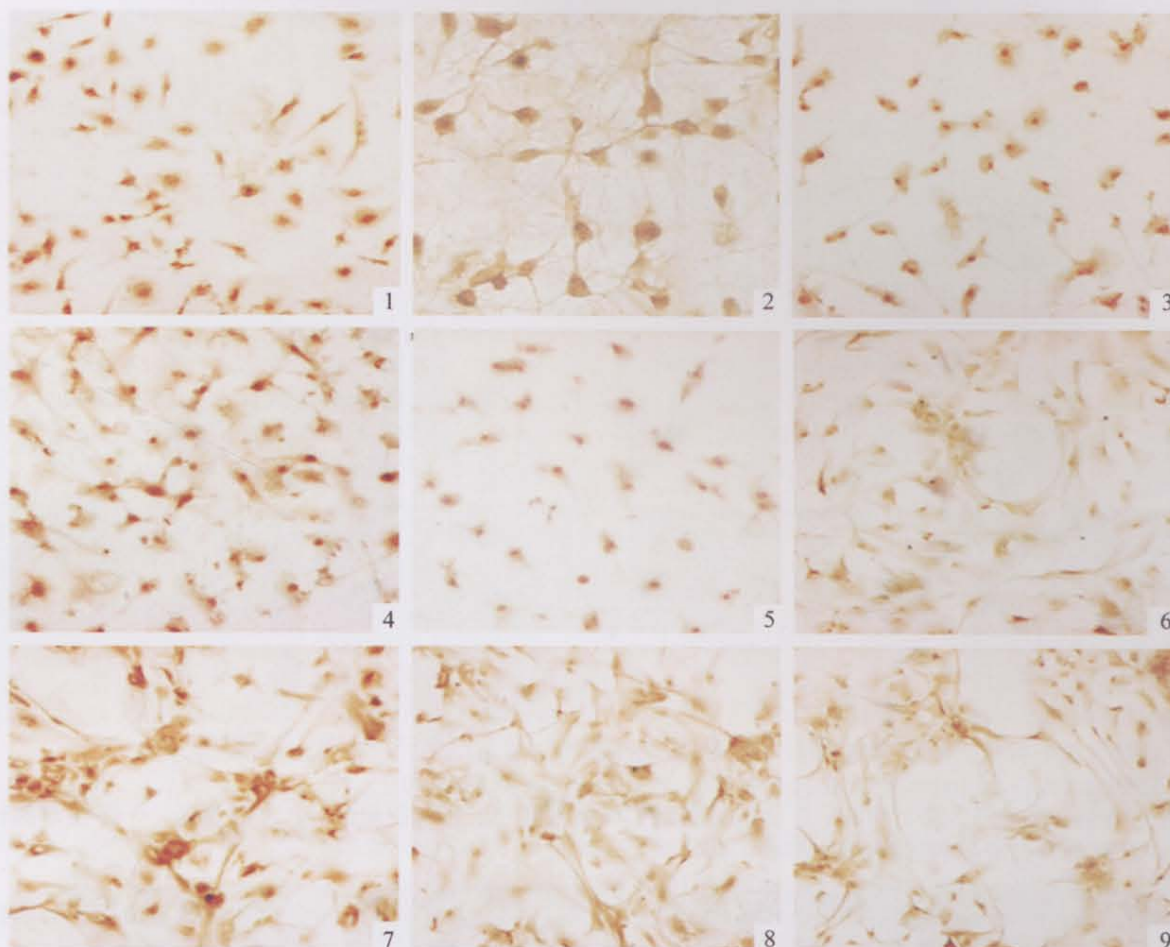


图1 小胶质细胞OX42免疫组化染色( $\times 200$ )

图2 神经元NSE免疫组化染色( $\times 200$ )

图3 小胶质细胞NOS免疫组化染色( $\times 200$ ), 生理盐水组

图4 小胶质细胞NOS免疫组化染色( $\times 200$ ), KA组

图5 小胶质细胞NOS免疫组化染色( $\times 200$ ), AG+KA组

图6 神经元Glu免疫组化染色( $\times 200$ ),生理盐水组

图7 神经元Glu免疫组化染色( $\times 200$ ),KA组

图8 神经元Glu免疫组化染色( $\times 200$ ),AG+KA组

图9 神经元Glu免疫组化染色( $\times 200$ ),CAT+KA组

Fig.1 Identification of microglia by OX-42 immunostaining( $\times 200$ )

Fig.2 Identification of neuron by NSE immunostaining( $\times 200$ )

Fig.3 iNOS immunostaining of microglia in control group ( $\times 200$ )

Fig.4 iNOS immunostaining of microglia in KA group ( $\times 200$ )

Fig.5 iNOS immunostaining of microglia in AG + KA group ( $\times 200$ )

Fig.6 Glu immunostaining of neuron in control group ( $\times 200$ )

Fig.7 Glu immunostaining of neuron in KA group ( $\times 200$ )

Fig.8 Glu immunostaining of neuron in AG + KA group ( $\times 200$ )

Fig.9 Glu immunostaining of neuron in CAT + KA group ( $\times 200$ )