

発表番号 64 (0338)

食塩感受性高血圧ラットにおける脳内 nNOS ニューロン核の破壊 および回路遮断剤による交感神経抑制経路の解析

助成研究者: 西田育弘(防衛医科大学校生理学第二講座)

共同研究者: 晝間 恵、煙山健仁、平川晴久(防衛医科大学校生理学第二講座)

堀内城司 (シドニー大学生理学講座)

前3回の助成にて次のことが明らかにされた。a) 食塩感受性高血圧ラットへの nNOS 阻害剤である 7-nitroindazole の全身投与実験、および同 S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC) の脳室内投与実験より、食塩感受性高血圧に見られる交感神経活動亢進が脳内 nNOS 性 NO により緊張性に抑制されていること、b) 脳幹部の nNOS 活性および nNOS 酵素蛋白量が食塩感受性高血圧ラットで高値であること、c) 中脳から橋にかけて存在する4つの神経核(中脳中心灰白質背外側核、脚橋被蓋核、背外側被蓋核、外側結合腕周囲核)の nNOS ニューロン数は高血圧群の方が正常血圧群より多いこと。これらの結果から、食塩感受性高血圧では、脳内 nNOS ニューロンにより中枢性に交感神経活動が抑制されていることがわかり、その責任神経核の一部が判明した。

本研究の目的は、(i) 中脳から橋における nNOS ニューロン以外の、交感神経活動調節機能を有する神経核を検討し、食塩感受性高血圧時交感神経活動抑制機能を有する nNOS ニューロンの全貌を明確にすること、および、(ii) これら神経核の nNOS ニューロンが交感神経活動抑制にどのような機能回路網を形成しているのかを判明すること、である。

【方法】食塩感受性ラットに、正常食塩食または高食塩食を4週間負荷し、2実験動物群を作成した。負荷後、両群のラット脳を還流固定し、延髄および視床下部を抗 nNOS 抗体を用いた免疫組織染色し、nNOS ニューロンの分布を検討した。また、染色されたニューロンの数を両群間で比較した。次に、別の実験動物2群を用い、ウレタン麻酔下で抑制に関与する神経核を電気凝固、またはギヌレン酸(グルタミン受容体阻害剤)或いはビキユキュリン(GABA 受容体阻害剤)などの微量注入を行い、SMTC 誘発性交感神経活動増強効果を検討した。

【結果】延髄では、吻側腹外側延髄と孤側核に、また、視床下部では視索上核に、nNOS ニューロンを認め、これらニューロン数は高血圧群の方に多かった。また、視床下部室傍核や延髄大縫線核にも nNOS ニューロンが認められたが、高血圧群と正常群との間に分布や細胞数に有意差を認めなかった。一方、高血圧群の nNOS 陽性ニューロンの数が増加していた神経核に破壊または阻害剤微量注入を行ったが、報告書作成現在では結果が得られるに至らなかった。

【結論】食塩感受性高血圧ラットでは交感神経活動亢進を抑制する代償機構が見られる。この代償機構には中枢性 nNOS ニューロンが強く関与しており、その nNOS ニューロンの存在部位は、中脳から橋にかけての4神経核以外に、視床下部では視索上核、延髄では吻側腹外側延髄と孤束核である。これら nNOS ニューロンによる交感神経抑制の情報伝達回路とその神経伝達物質は同定されるに至らず、今後の研究に委ねられた。

12

助成番号 0338

食塩感受性高血圧ラットにおける脳内 nNOS ニューロン核の破壊
および回路遮断剤による交感神経抑制経路の解析

助成研究者：西田育弘 (防衛医科大学校生理学第二講座)

共同研究者：晝間 恵、煙山健仁、平川晴久 (防衛医科大学校生理学第二講座)

堀内城司 (シドニー大学生理学講座)

1. 研究目的

過去3年間貴財団研究助成(9923, 0043, 0142)に支えられ次のような結果を得ていた。

i) 食塩感受性高血圧ラットに 7-nitroindazole を全身投与し神経性一酸化窒素合成酵素 (nNOS) を阻害すると、交感神経活動が増加する。特に、圧受容器反射性に抑制される前段階の交感神経活動をおよそ3倍にも増大する(1)。ii) 脳室内に、全身投与量の1000分の1量の S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC) を投与しても i) と同様の結果を得た(4)。これらのことから、食塩感受性高血圧では、その交感神経活動亢進状態が脳内 nNOS により産生される一酸化窒素 (NO) により緊張性に抑制され、高血圧への代償反応が起こっていると推測された。また、iii) 脳幹部の nNOS 活性および nNOS 酵素蛋白量は食塩感受性高血圧ラットに高値である(4)。iv) 中脳から橋にかけて4つの神経核(中脳中心灰白質背外側核、脚橋被蓋核、背外側被蓋核、外側結合腕周囲核)に nNOS 陽性ニューロンが認められ、その細胞数は高血圧群に多かった(2, 3, 4)。これらの結果から、食塩感受性高血圧時交感神経活動亢進の代償性抑制は、何らかの原因で増幅された脳内 nNOS 活性の増強によりなされ、その増幅された nNOS は脳幹部ニューロン内に存在する。したがって、中脳から橋にかけて存在する4神経核にある nNOS ニューロンが交感神経抑制機能を担っていると推定された。

しかし、脳組織のホモジネートによる nNOS 酵素活性の測定や nNOS 酵素タンパク量の定量ではその組織切片の平均的酵素量を比較出来るが、切片内局所の酵素活性状態は判定できない。脳幹部だけでなく、交感神経活動制御に関わる他の中枢神経系の nNOS ニューロンを再度検討し直し、その食塩感受性高血圧で増幅される nNOS ニューロン分布の全貌を明らかにせねば、nNOS ニューロン性交感神経抑制機構の解明に繋がらない。全貌を明らかにしたうえで、交感神経活動抑制に関わっていると推定される神経核を破壊もしくは化学的神経伝達阻害を行い、主力になっているニューロン群やその神経伝達物質の検索を行えば、食塩感受性高血圧時に誘導・増幅される nNOS ニューロン性交感神経抑制機構があきらかと成り得る。

本研究の目的は、1)食塩感受性高血圧で誘導・増幅される nNOS ニューロン分布の全貌を明らかにすること、2)交感神経活動抑制に関わると推定されるニューロン群の破壊、または化学的神経伝達阻害により交感神経抑制経路を明瞭にすること、である。

2. 研究方法

2.1 実験動物

Dahl 食塩感受性 (S) ラットに高食塩食 (8% NaCl 含有、S 8%群) または正常食塩食 (0.4% NaCl 含有、S 0.4%群) を、8週齢から12週齢に渡って4週間投与し、2群の実験群を作成した。

2.2 抗 nNOS 抗体を用いた、延髄および視床下部の免疫組織染色法

ABC法(4,5)を一部改変した方法を用いた。ラットをネンブタール麻酔(40 mg/kg, i.p.)し、開胸下に右心房を切開した後、上行大動脈へカテーテルを挿入し、胸部大動脈を結紮した。約 200 ml の生理食塩水でラット頭部を還流し、続いて約 400 ml の固定液(4% paraformaldehyde 含有 0.1M Phosphate buffer, pH7.2)にて脳を還流固定した。固定された脳を摘出し、30% sucrose 含有 0.1M Phosphate buffer, pH7.2 内にてオーバーナイト浸漬固定した。固定された脳を凍結し、クライオスタットにて約 40 μ m 厚の切片に切った。脳幹切片は PBS(-)にて洗浄後、3% non-specific goat serum / 0.3 % triton - PBS(-)に浸漬し、その後、抗 nNOS ラビット抗体(一次抗体)にて反応させた(4、3日間)。PBS(-)で洗浄後、Biotinylated anti-rabbit IgG(二次抗体)にて反応させた(25、1時間)。PBS(-)で洗浄後、Avidin-Biotin-HRP complex にて反応させ(25、1時間)、PBS(-)で洗浄後、DAB 反応(1mg/ml diaminobenzidine tetrahydrochloride / 0.01% H₂O₂ 含有 0.05M Tris-HCl buffer, pH7.2)にて発色させた。

S8%群ラット1匹の脳切片と S0.4%群ラット1匹の脳切片を一組にして、2群切片を全く同じ条件で上述の免疫組織染色した。この条件で染色された nNOS 陽性ニューロンを顕微鏡で同定し、その nNOS 陽性ニューロンの分布を調べ nNOS 陽性細胞の全細胞数をカウントした。正常血圧群と食塩感受性高血圧群間でそれら分布と細胞数を比較した。

2.3 神経核の破壊および化学的神経伝達阻害実験

ラットにウレタン麻酔(1.3~1.4 g/kg i.p.)下で、気道確保のための気管内挿管、薬物投与のための静脈内カテーテル挿入、静脈還流量を低下させ低血圧を起こさせるための血管内バルーンカテーテル(フォガティーカーテーテル 2Fr)を下大静脈へ挿入、血圧・心拍数測定のための動脈内カテーテル挿入、腎交感神経活動測定のための神経活動記録電極設置を行った。腎交感神経活動記録用電極の設置には、左側腹切開から後腹膜腔に達し、腎交感神経を剥離し、双極ステンレススチール電極を留置し、電極と神経をシリコンゲルで

固定・隔離した。電極からの電気シグナルは、バンドパス・フィルター (50-1000 Hz) を通して後増幅・整流・平均化 (2 sec-time constant) し記録した。動脈圧 (AP)、平均動脈圧 (MAP)、瞬時心拍数 (HR)、腎交感神経活動 (RSNA) および平均腎交感神経活動 (mRSNA) はアナログレコーダーに記録すると共に、デジタル変換 (サンプリング速度 1000 Hz) しコンピュータでチャート状に記録した。

ラット頭部は脳定位固定装置にて固定し、頭頂部皮膚および皮下組織を切開し、視床下部視索上核 (SON)、中脳から橋にかけての4神経核 (中脳中心灰白質背外側核 DLPAG、脚橋被蓋核 PPT、背外側被蓋核 LDT、外側結合腕周囲核 LPB) および延髄の2神経核 (吻側腹外側延髄 RVLM、孤束核 NTS) など、刺入目標の神経核によって骨に空ける小径穴の位置を変えた。破壊電極や薬物微量注入用ガラス・マイクロピペットの刺入には、マイクロマニピュレータを用い、ラット用脳マップ (8) に基づいて角度・距離・深さなどを決め刺入した。破壊点やマイクロピペット先端の到達位置は、実験後マイクロピペットから1% ポンタミン・スカイ・ブルーを50nl注入し、その後脳を固定・摘出し、0.5%クリスタルバイオレットにて染色し形態学的に確認した。

神経核の電氣的破壊には、直流電流 1 mA を 10 秒間通電し破壊した。化学的神経伝達阻害には各阻害剤を 100 nl または 50 nl の人工脳脊髄液 (4, 6) に溶解後微量注入し阻害または刺激した。阻害・刺激剤には、グルタミン酸受容体阻害剤としてキヌレン酸を 3~4.5 nmol、グルタミン酸受容体刺激剤としてグルタミン酸を 100 pmol、GABA 受容体阻害剤としてムシモールを 2 nmol、GABA 受容体刺激剤としてピキュキュリンを 200 pmol、それぞれ用いた。

上述の神経核破壊・阻害・刺激処置前後に、nNOS の選択的阻害剤 S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC) 10 mg/kg を静脈内投与し腎交感神経活動への影響と圧受容器徐負荷腎交感神経活動への影響のそれぞれを比較した。圧受容器徐負荷交感神経活動は、下大静脈に留置した血管内バルーンを拡張させ動脈圧を充分低下させて得られた最大神経活動として求めた (1, 4, 7)。

各測定値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計には、1変数を多群間で比較する時には one-way ANOVA および Fisher's PLSD を、1変数を2群間で比較する時には unpaired t-test を、それぞれ用いた。

3. 研究結果

実験は、(1) 延髄および視床下部の nNOS 陽性ニューロンの分布について、食塩感受性高血圧群と正常血圧群との比較、(2) nNOS 陽性ニューロンの細胞数を高血圧群と正常血圧群との比較、そして、(3) 各神経核の破壊または化学的神経伝達阻害が nNOS ブロックによる腎交感神経活動増強作用へ及ぼす影響を検討、の3部から構成される。

3.1 延髄および視床下部の nNOS 陽性ニューロンの分布

食塩感受性高血圧ラット (Fig. 1 の a, c, e) と正常血圧ラット (Fig. 1 の b, d, f) の延髄における nNOS 陽性ニューロンの分布を示す。いずれのラットでも、吻側腹外側延髄 (RVLM)、孤束核 (NTS) および大縫線核 (RM) に nNOS 陽性ニューロンが分布しており、その分布は両群間に差がなかった。

Fig. 3 は視床下部における nNOS 陽性ニューロンの分布を示す。Fig. 3 a, c, は高血圧ラットの視床下部を、Fig. 3 b, d は正常血圧ラットの視床下部を、それぞれ示す。両群とも視床下部では室傍核 (PVN) と視索上核 (SON) に nNOS 陽性ニューロンの分布が認められた。特に、室傍核では magnocellular 領域だけでなく、parvocellular 領域に及んで nNOS 陽性ニューロンが認められた。しかし、これら両群間には分布の差が認められなかった。

3.2 nNOS 陽性ニューロンの細胞数

延髄の吻側腹外側延髄と孤束核に見られた nNOS ニューロンの細胞数は高血圧群で有意に多かった (Fig. 2) が、大縫線核では両群間に差は認められなかった (Tab. 1)。一方、視床下部では nNOS 陽性ニューロンが認められた視索上核の nNOS 陽性細胞数が高血圧群で多く、正常血圧群で少なかった (Fig. 4)。しかし、室傍核の nNOS 陽性細胞数には両群間に差を認めなかった (Fig. 4)。

以上の結果とこれまでの結果を総合すると、食塩感受性高血圧群に有意に多く nNOS 陽性細胞数を有する神経核は、視索上核、中脳周囲灰白質背外側核、脚橋被蓋核、背外側被蓋核、外側腕結合周囲核、吻側腹外側延髄および孤束核、以上 7 神経核であった (Tab. 1)。

3.3 各神経核の破壊または化学的神経伝達障害の交感神経活動へ及ぼす影響

本実験をこれまで何度か試みたが、十分な結果は未だ得られていない。最大の原因は担当者の人事異動があったからであるが、その他に、1) 電気凝固による神経核破壊や化学的神経伝達障害剤注入にむらがあり一定した破壊・障害モデル作成に至っていないこと、また、2) これまでの動物実験は無麻酔の意識下実験で得られた結果であったが、本実験は定位脳固定が必要なため麻酔下実験をせねばならないこと、などである。麻酔剤により交感神経活動の制御が左右され、その応答に定量性を欠くからである。

現在、これらの困難点を凌駕すべく創意工夫を加え、定量性・客観性のある結果をだすべく努力を続けている。2ヶ月後の助成研究発表会で結果を提示できることを期待したい。

4. 考察

本研究では、食塩感受性高血圧に見られる交感神経活動亢進を代償すると思われる交感神経抑制性 nNOS ニューロンの主座は、視床下部の視索上核 (SON)、中脳から橋に存在

する中脳中心灰白質背外側核 (DLPAG)・脚橋被蓋核 (PPT)・背外側被蓋核 (LDT)・外側結合腕周囲核 (LPB) および延髄の吻側腹外側延髄 (RVLM)・孤束核 (NTS) であることがわかり、この交感神経抑制機構に関わる nNOS ニューロンの全貌が明らかとなった。

これら神経核がどのようなシグナル伝達ないしは神経回路網を形成して交感神経活動を抑制しているのかは、残念ながら解明に至らなかった。しかし、これら神経核はいずれも交感神経活動制御ニューロンを有することが知られている。RVLM は交感神経活動を規定する前運動ニューロンとして大変重要であることは広く知られている。同様に、NTS は圧受容器やその他の自律神経性球心路の中枢への入り口として広く知られており、NTS ニューロンへの NOS 遺伝子操作が交感神経活動へ影響することが報告されている。一方、DLPAG は脳虚血反応を起こさせる中枢として知られ、脳虚血時緊急応答性の交感神経制御中枢であり、RVLM を制御していることが知られている。LPB の生理学的機能はさほど知られていないが、やはり RVLM へニューロンを送り制御していることが知られている。PPT や LDT による交感神経活動制御はあまり調べられていないが、体性運動系による交感神経制御との関係が取りざたされている。視床下部では、PVN の parvocellular nucleus のニューロン群が脊髄にある交感神経節前ニューロンを直接制御することで有名であるが、SON による交感神経制御はあまり知られていない。ただ、SON から PVN への interneuron が知られているため、これらを介する交感神経活動制御は可能であろう。これらの神経回路網に今回解明された nNOS ニューロンを重ねた図を Fig. 5 に示した。これによると、nNOS ニューロンは交感神経制御系と概ね重なっており、これら両者の関係の強いことが示唆される。

5. 今後の課題

本報告書作成現在で得られなかった、神経核の破壊または化学的神経伝達阻害実験の結果が、向後得られるよう努力し、今回判明した責任神経核のうちどの神経核にある nNOS ニューロンが交感神経抑制に主力であるのか、また、nNOS ニューロンによる交感神経抑制回路網の全貌、を解明しなければならない。

また、貴財団に支えられた助成研究 (0142) では、食塩感受性があるラットと感受性の無いラットとは、その成長過程において食塩負荷を与えなければ脳内組織 nNOS 活性に差が生じないことが示された。今後、食塩負荷をかけた2群のラットの組織 nNOS 活性を測定し、成長過程、特に高血圧への‘critical period’と nNOS 活性発現との関係を調べたいと考えている。

さらに、angiotensin II ニューロンは交感神経活動亢進性作用をもつことが知られている(9)ことから、nNOS ニューロンと angiotensin II ニューロンは交感神経活動制御中枢のなかで、直列的にリレーしているのか、或いは、並列的にリレーしているのか、を解明したいと考えている。これにより、交感神経活動制御がこれら2種類のニューロンにより修

飾されるメカニズムが解明される。

6 . 文献

1. Nishida Y, Chen QH, Tandai-Hiruma M, Terada S, Horiuchi J. Neuronal nitric oxide strongly suppresses sympathetic outflow in high-salt Dahl rats. *J. Hypertension* **19(3)**: 627-634, 2001.
2. 晝間 恵、煙山健仁、西田育弘 Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける脳内 nNOS 分布。日本病態生理学会雑誌 Vol. **12 (2)**: 57, 2003.
3. 晝間 恵、平川晴久、煙山健仁、西田育弘 Dahl ラット脳における神経性 NOS の分布。 *Jpn. J. Physiol.* (in press).
4. Hiruma M, Horiuchi J, Sakamoto H, Kemuriyama T, Hirakawa H, Nishida Y. Brain nNOS neuron-mediated sympathoinhibition is enhanced in Hypertensive Dahl rats. *J Hypertens.* (投稿中)
5. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29**:577-580, 1981.
6. Horiuchi, J., Saigusa, T., Sugiyama, N., Kanba, S., Nishida, Y., Sato, Y., Hinuma, S., Arita, J. Effects of prolactin-releasing peptide microinjection into the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity in rats. *Brain Research* **958**: 201-209, 2002.
7. Nishida, Y., Ryan, K. L., and Bishop, V. S.. Angiotensin II modulates arterial baroreflex function via a central α_1 -adrenoceptor mechanism in rabbits. *Am. J. Physiol.* **269** (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 38): R1009-R1016, 1995.
8. Paxinos G, Watson C. Plate 55. (In) *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 4th Edition. Academic Press, San Diego, 1998.
9. Liu JL, Murakami H, Zucker IH. Angiotensin II–nitric oxide interaction on sympathetic outflow in conscious rabbits. *Circ. Res.* **82 (4)**:496-502, 1998.

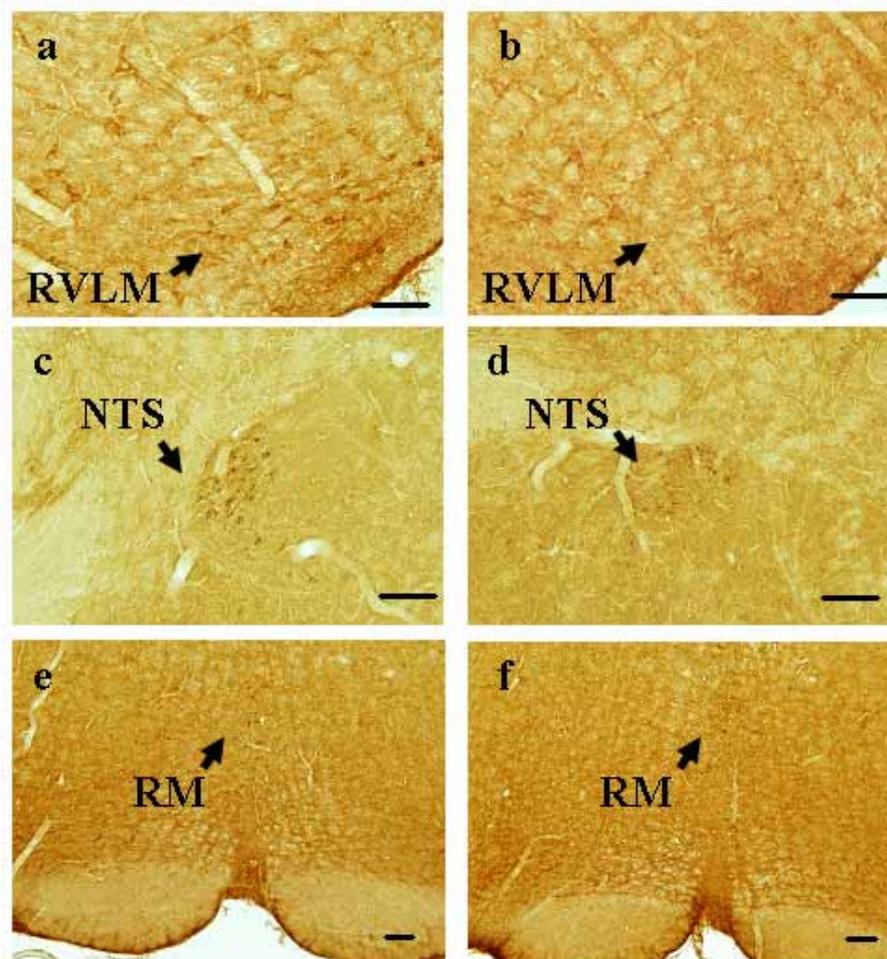


Fig. 1 Coronal slices of the medulla oblongata showing the rostrocaudal extent of an intensely labeled cell group extending from the rostral ventrolateral medulla (RVLM, a and b) to the nucleus tractus solitarius (NTS, c and d) and raphe magnus (RM, e and f). The slices were taken from DS8% rats (a c, e) and DS0.4% rats (b, d, f).
Bar = 100 μ m.

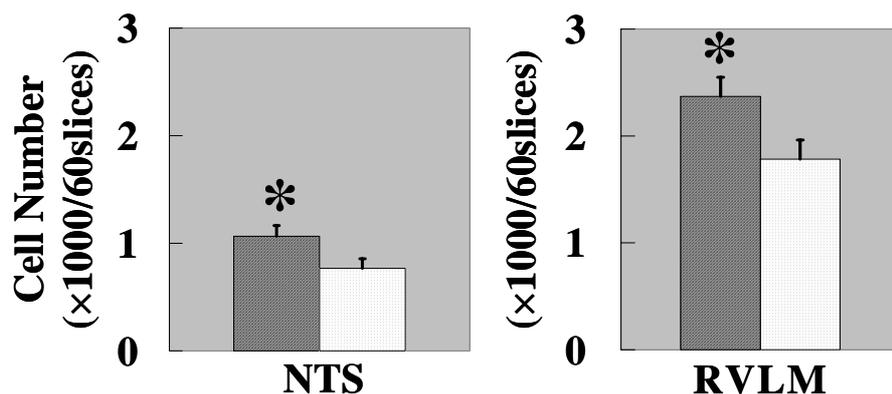


Fig. 2 Cell numbers of nNOS positive neurons in the nucleus tractus solitarius (NTS) and rostral ventrolateral medulla (RVLM) of salt-sensitive hypertensive rats (dashed column) and of normotensive rats (scattered column).

Data are mean \pm SE. n=5. *P<0.05 vs. the normotensive rats group.

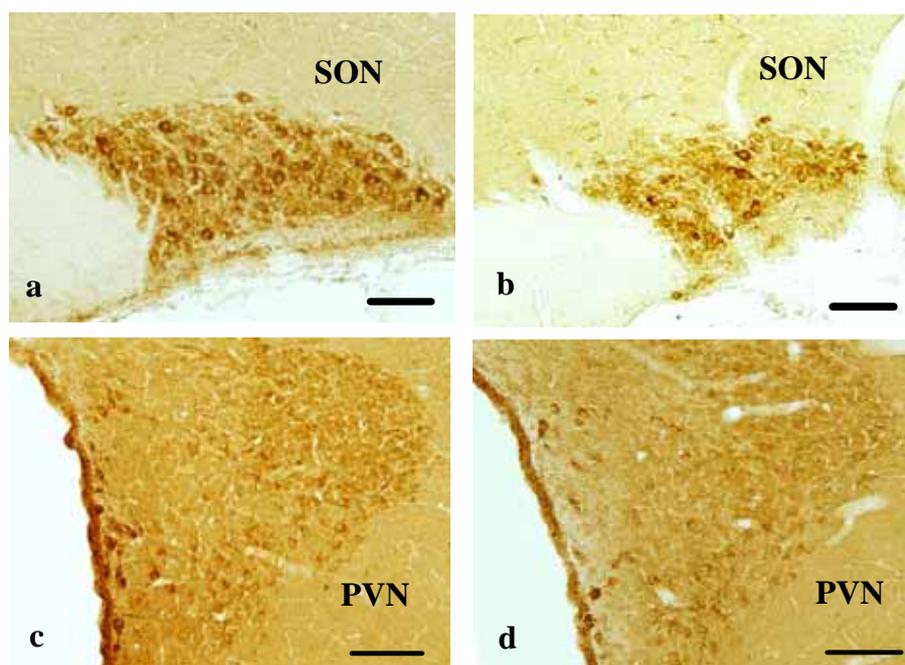


Fig. 3 Coronal slices of the hypothalamus showing the paraventricular nucleus (PVN, c, d) and the supraoptic nucleus (SON, a, b). The slices were taken from DS8% rats (a, c) and DS0.4% rats (b, d).

Bar = 100 μ m.

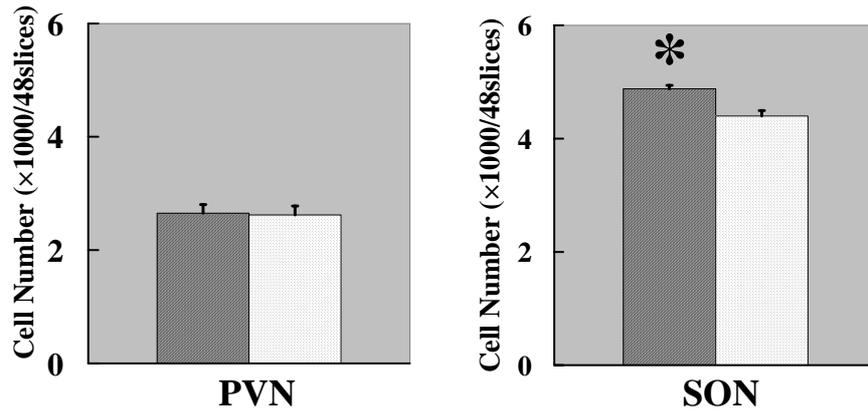


Fig. 4 Cell numbers of nNOS positive neurons in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) of salt-sensitive hypertensive rats (dashed column) and of normotensive rats (scattered column).

Data are mean \pm SE. n=5. *P<0.05 vs. the normotensive rats group.

Nucleus	DS8%	DS0.4%
DLPAG	2159 \pm 22 (56)*	1557 \pm 49 (56)
PPT	1812 \pm 59 (56)*	1589 \pm 52 (56)
DRN	305 \pm 38 (56)	267 \pm 43 (56)
LDT	3464 \pm 300 (56)*	2694 \pm 203 (56)
LPB	1662 \pm 43 (56)*	1324 \pm 34 (56)
RM	441 \pm 8 (60)	433 \pm 9 (60)
RVLM	2370 \pm 80 (60)*	1783 \pm 58 (60)
NTS	1066 \pm 44 (60)*	767 \pm 40 (60)
SON	4878 \pm 28 (48)*	4398 \pm 43 (48)
PVN	2648 \pm 69 (56)	2621 \pm 72 (48)

Table. 1 Comparison of nNO- positive cell numbers between hypertensive (DS8%) and normotensive (DS0.4%) rats.

DLPAG, dorsolateral periaqueductal gray (中脳中心灰白質背外側核); PPT, pedunclopontine tegmental nucleus (脚橋被蓋核); DRN, dorsal raphe nucleus (背側縫線核); LDT, laterodorsal tegmental nucleus (背外側被蓋核); LPB, lateral parabrachial nucleus (外側結合腕周囲核); RM, raphe magnus (大縫線核); RVLM, rostral ventrolateral medulla (吻側腹外側延髓); NTS, nucleus tractus solitarius (弧束核); SON, suprapoptic nucleus (視索上核); PVN, paraventricular nucleus (室棒核). Data are mean \pm SE. The number in parentheses indicates the number of slices counted. *P<0.05 vs. the normotensive rats group (DS0.4%).

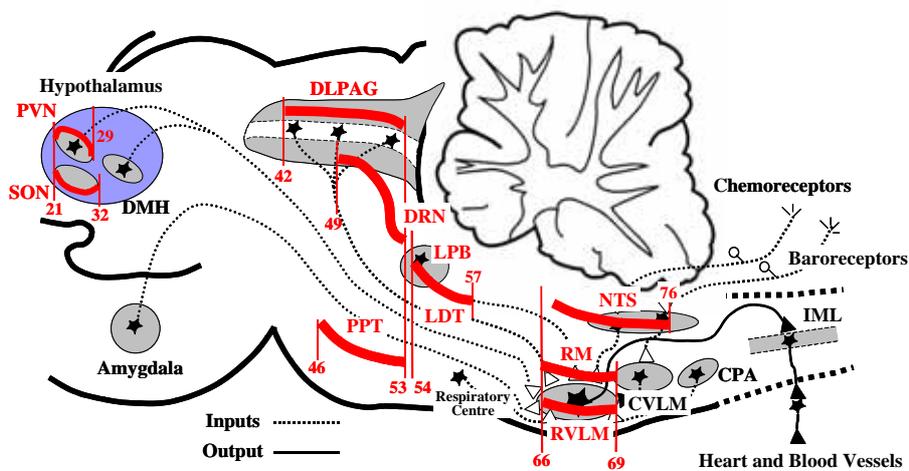


Fig. 5 Summary: The distribution of nNOS neurons through the hypothalamus to the medulla oblongata.

The number of nNOS neurons in these nuclei except for PVN and two raphe are greater in salt-sensitive hypertensive rats than in normotensive rats.

Sympathoinhibitory nNOS Neurons in the Brain of Salt-Sensitive Hypertensive Dahl Rats.

Yasuhiro Nishida¹, Megumi Tandai-Hiruma¹, Jouji Horiuchi², Takehito Kemuriyama¹,
Haruhisa Hirakawa¹

¹National Defense Medical College, Department of Physiology II

²University of Sydney, Department of Physiology

Summary

Background: We have previously demonstrated that the nNOS neuronal system in the brainstem was enhanced in salt-sensitive hypertensive Dahl rats. Immunohistochemical study revealed that the number of nNOS containing neurons (nNOS neurons) in the brainstem was greater in hypertensive rats than in normotensive rats.

Objective: To investigate how the above nNOS neuronal system is working in the hypothalamus and medulla oblongata of hypertensive Dahl salt-sensitive (DS) rats, we determined the distribution of nNOS neurons in the hypothalamus and medulla oblongata.

Design and methods: Dahl rats were fed either a regular-salt (0.4% NaCl) or a high-salt (8% NaCl) diet for 4 weeks. **Immunohistochemical staining:** Rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg, ip) and perfused through the ascending aorta with 300 ml of heparinized saline followed by 400 ml of freshly prepared 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2). The brain was removed and postfixed at 4°C overnight. The fixed brain was placed in 10, 20, and finally 30% sucrose in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2) at 4°C overnight. The brain was then frozen in powdered dry ice, blocked in the coronal plane, and sliced a thickness of 40 μm on a cryostat. The slices were collected in PBS(-) and free-floating brain slices were undergone to the immunohistochemical procedure using anti-nNOS antibody for the 1st antibody, biotinylated 2nd antibody, and ABC reagent. They were then detected with diaminobenzidine tetrahydrochloride.

Results: nNOS neurons were localized in several nuclei through the brainstem to the hypothalamus; the paraventricular nucleus (PVN), supraoptic nucleus (SON), the dorsolateral periaqueductal gray (DLPAG), pedunclopontine tegmental nucleus (PPT), dorsal raphe nucleus, laterodorsal tegmental nucleus (LDT), lateral parabrachial nucleus (LPB), rostral ventrolateral medulla (RVLM), nucleus tractus solitarius (NTS), raphe magnus. The number of nNOS neurons in these nuclei, except for the two raphes and PVN, was significantly greater in hypertensive than in normotensive DS rats.

Conclusions: These findings suggest that central nNOS neurons in SON, DLPAG, PPT, LDT, LPB, RVLM, and NTS may be the sites for sympathoinhibitory regulation in salt-sensitive hypertensive Dahl rats.