

· 论 著 ·

内毒素血症对新生鼠脑一氧化氮合酶表达的影响

王华, 杜秀华, 吴玉斌

(中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

【摘 要】 目的 在脑的正常发育及一些病理条件下,一氧化氮合酶(NOS)发挥一定作用,但不同亚型的NOS作用不同。该研究观察正常新生鼠脑以及内毒素血症时新生鼠脑3种一氧化氮合酶(NOS)亚型蛋白的表达,并探讨脂多糖(LPS)和地塞米松(DXM)对其表达的影响。**方法** 生后健康7日龄Wistar大鼠68只,随机分为对照组、内毒素血症组(腹腔内注射E. coli LPS 5 mg/kg)及DXM组(LPS 5 mg/kg + DXM 10 mg/kg),分别于用药后2,4,6,24 h取脑进行NOS免疫组织化学染色。**结果** 正常对照组新生大鼠脑神经元型NOS(nNOS)明显表达,内皮型NOS(eNOS)微弱表达,诱导型NOS(iNOS)无表达。LPS腹腔注射后4 h nNOS表达开始增加;eNOS及iNOS表达于6 h开始增加,3者表达均于24 h时达高峰;3种NOS表达阳性细胞主要分布于脑皮质、海马、下丘脑、脑室旁核团、纹状体神经细胞。除此之外,nNOS在梨状皮质有较强表达,eNOS及iNOS在血管内皮细胞呈微弱表达。3种NOS亚型蛋白表达在DXM注射后2~6 h受到明显抑制,并持续至用药后24 h。**结论** 正常新生鼠脑表达nNOS及eNOS,无iNOS表达;LPS诱导3种NOS亚型的表达,其表达的部位及受诱导表达的程度亦不同,提示NOS在中枢神经系统的正常发育及LPS诱导的内毒素血症脑损伤发病中发挥一定作用,DXM具有神经细胞保护作用。**【中国当代儿科杂志,2004, 6(3): 203-206】**

【关 键 词】 脂多糖;内毒素血症;脑;一氧化氮合酶;新生,大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2004)03-0203-04

Effect of endotoxemia on the expression of nitric oxide synthase in the brain of neonatal rats

Hua WANG, Xiu-Hua DU, Yu-Bin WU. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: wanghua62@hotmail.com)

Abstract: Objective In the brain, three isoforms of nitric oxide synthase (NOS), namely neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), and endothelial NOS (eNOS), have been implicated in biological roles, each isoform exhibiting different roles. This study aims to investigate the effects of lipopolysaccharide (LPS) and dexamethasone on the three isoforms expressions in neonatal rats by using a model of endotoxemia induced by LPS. **Methods** LPS (5 mg/kg) or LPS (5 mg/kg) plus dexamethasone (10 mg/kg) or sterile saline (controls) was injected intraperitoneally into 68 7-day-old Wistar rats. The rats were sacrificed 2, 4, 6 or 24 hrs after injection respectively. The expressions of NOS isoforms were examined by the immunohistochemical technique. **Results** nNOS was detected, but in contrast iNOS was not detectable, and eNOS was only faintly expressed in the brain of the controls. The nNOS expression was increased 4 hrs after LPS injection and the iNOS and eNOS expressions were increased 6 hrs after LPS injection. The expressions of the three isoforms reached a peak 24 hrs after LPS injection. Positive immunoreactivity was detected in the cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, paraventricular nucleus and striatum. In addition, nNOS was also detected in the limbic cortex. eNOS or iNOS was faintly expressed in the endothelial cells of cerebral blood vessels. The expressions of three NOS isoforms were remarkably inhibited between 2 and 6 hrs after dexamethasone administration and the inhibition effect

【收稿日期】 2003-07-20; **【修回日期】** 2003-11-29

【作者简介】 王华(1962-),女,博士,副教授。主攻方向:神经系统疾病临床与基础研究。

【通讯作者】 王华,辽宁省沈阳市和平区三好街36号,中国医科大学附属第二医院儿科,邮编:110004。

continued until 24 hrs after administration. **Conclusions** nNOS and eNOS may be identified and iNOS is not detectable in the brain of normal neonatal rats. LPS can induce the expressions of three NOS isoforms, and the distribution and intensity of the expressions of three NOS isoforms varies, suggesting that NOS may play roles in the central nervous system development and brain damage in LPS-induced endotoxemia. Dexamethasone has a neuroprotective effect against brain damage induced by endotoxemia.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(3): 203-206]

Key words: Lipopolysaccharide; Endotoxemia; Brain; Nitric oxide synthase; Neonatal rat

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种短暂存在的气体性第二信使分子,能调节血管、免疫和神经传导等作用,具有许多生理及病理功能。NO通过一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化精氨酸而合成。迄今为止,已发现3种NOS亚型,即神经元型NOS(nNOS, NOS1)、诱导型NOS(iNOS, NOS2)及内皮型NOS(eNOS, NOS3)。在脑内3种NOS亚型可自行或受诱导而表达。本研究应用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的新生大鼠内毒素血症动物模型,探讨LPS及地塞米松(dexamethasone, DXM)对3种NOS亚型蛋白表达的影响,同时观察3种NOS亚型于生理及病理条件下表达的动态变化。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制作与分组

生后健康7日龄Wistar大鼠68只,体重 17 ± 3 g,雌雄不限(中国医科大学试验动物中心提供),其中8只在实验过程中死亡,未用于实验。其余60只随机分成3组,每组20只。对照组:腹腔内注射0.9%生理盐水100 μ l;内毒素(LPS)组:E. coli LPS(血清型055:B5, Sigma, 美国)5 mg/kg,溶于0.9%生理盐水100 μ l腹腔注射;DXM组:LPS 5 mg/kg及DXM 10 mg/kg,溶于0.9%生理盐水100 μ l腹腔注射。各组动物分别于注射后2, 4, 6, 24 h行颈椎脱位处死,取鼠脑固定于4%多聚甲醛/PBS(pH 7.4)溶液中,24 h后制成石蜡组织块。

1.2 免疫组织化学染色

选取侧脑室体部冠状断面制作5 μ m石蜡切片,以1:200稀释的兔抗大鼠nNOS、iNOS、eNOS多克隆抗体(IgG, Santa Cruz公司产品, 美国)作为一抗,按免疫组织化学SP(福州迈新公司)染色方法进行染色,DAB显色,以苏木素做核复染。每次染色中用非免疫正常兔IgG或PBS替代一抗,未见假阳性染色(阴性对照)。表达结果强度判定:阴性(-):细胞内无着色;弱阳性($\pm$):细胞内淡黄色颗粒;阳性(+):细胞内见黄色颗粒;中等阳性(++):

细胞内见较深棕黄色颗粒;强阳性(+++):细胞内见大量深棕黄色颗粒。

2 结果

2.1 LPS诱导的NOS蛋白表达变化

2.1.1 LPS对nNOS表达的影响 免疫组织化学染色显示,正常新生鼠脑内可见明显nNOS表达。脑不同部位nNOS的染色强度不同,染色最强处主要分布于下丘脑和脑室旁神经核团,脑皮质中仅有少数锥体细胞表现为阳性免疫染色(图1)。LPS腹腔注射2 h时nNOS蛋白表达无明显变化,4 h时开始增加,6 h时nNOS染色增浓,24 h时呈高峰状态,阳性细胞分布于锥体细胞、梨状皮质、海马各区(CA1, CA2, CA3, DG)、下丘脑、脑室旁核团、纹状体(见表1、图2)。DXM 2~4 h nNOS表达受到明显抑制,注射后6 h脑髓质内可见少量nNOS表达(图3),以后DXM作用逐渐减轻,用药后24 h脑内各部nNOS表达分布与DXM用药前基本相似,但程度略减轻。

2.1.2 LPS对eNOS表达的影响 正常新生鼠脑可见eNOS散在微弱表达,主要位于脑室旁核、纹状体神经细胞、血管内皮细胞,皮质内偶见锥体细胞呈阳性染色(图4)。给予LPS后6 h时eNOS蛋白表达开始增加,24 h时最强,下丘脑、脑室旁神经核团eNOS染色较明显,海马、脑皮质(包括锥体细胞和多形神经元)和血管内皮细胞染色较前增强(见表2、图5)。DXM 2~4 h eNOS表达受到轻微抑制,用药后24 h脑内各部eNOS表达分布与DXM用药前基本相同。

2.1.3 LPS对iNOS表达的影响 对照组、内毒素血症组在LPS腹腔注射后2 h、4 h时鼠脑中所有区域均未见iNOS蛋白表达。给予LPS后6 h始见iNOS散在表达(图6),24 h表达最强,主要位于皮质锥体细胞层、海马、下丘脑、脑室旁核团、纹状体。血管内皮细胞也有微弱染色(表3、图7)。DXM 2~4 h iNOS表达受到明显抑制,以后DXM作用逐渐减轻,24 h时脑内各部iNOS表达分布与DXM用药前基本相同略减少(图8)。

表 1 内毒素血症新生鼠脑 nNOS 蛋白表达的动态变化

Table 1 Dynamic changes of nNOS expression in the brain of neonatal rats with endotoxemia										
	脑皮质	梨状皮质	CA1	CA2	CA3	DG	脑室旁核	纹状体	下丘脑	血管内皮
对照组										
2 h	++	++	+	+	++	+	++	++	++	-
4 h	++	++	+	+	++	+	++	++	++	-
6 h	++	++	+	+	++	+	++	++	++	-
24 h	++	++	+	+	++	+	++	++	++	-
LPS 组										
2 h	++	++	+	+	++	+	++	++	++	-
4 h	++	++	+	+	++	+	++	++	++	-
6 h	+++	+++	++	+	++	+	+++	+++	+++	-
24 h	+++	+++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	-
DXM 组										
2 h	+	+	±	+	+	±	+	+	+	-
4 h	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-
6 h	++	++	+	+	+	+	++	+	++	-
24 h	++	++	+	+	+	+	++	+	++	-

表 2 内毒素血症新生鼠脑 eNOS 蛋白表达的动态变化

Table 2 Dynamic changes of eNOS expression in the brain of neonatal rats with endotoxemia										
	脑皮质	梨状皮质	CA1	CA2	CA3	DG	脑室旁核	纹状体	下丘脑	血管内皮
对照组										
2 h	±	±	+	-	±	-	±	±	-	±
4 h	±	±	+	-	±	-	±	±	-	±
6 h	±	±	+	-	±	-	±	±	-	±
24 h	±	±	+	-	±	-	±	±	-	±
LPS 组										
2 h	±	±	+	-	±	-	±	±	-	±
4 h	±	±	+	-	±	-	±	±	-	±
6 h	+	+	±	-	+	-	++	+	+	+
24 h	++	+++	++++	++	+++	+	++++	++++	++++	++
DXM 组										
2 h	±	±	±	-	+	-	-	±	+	±
4 h	+	+	+	±	++	-	±	++	+	±
6 h	+	+	+	+	++	±	+	++	++	±
24 h	++	++	+	+	+++	±	+++	++	+	+

表 3 内毒素血症新生鼠脑 iNOS 蛋白表达的动态变化

Table 3 Dynamic changes of iNOS expression in the brain of neonatal rats with endotoxemia										
	脑皮质	梨状皮质	CA1	CA2	CA3	DG	脑室旁核	纹状体	下丘脑	血管内皮
对照组										
2 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPS 组										
2 h	+	+	±	±	+	±	±	±	±	-
4 h	+	+	±	±	+	±	±	±	±	-
6 h	++	++	±	±	+	±	++	+	+	-
24 h	+++	+++	++	++	+++	+	++++	++++	++++	+
DXM 组										
2 h	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±
4 h	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±
6 h	-	-	-	-	±	-	±	±	±	±
24 h	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+

3 讨论

迄今为止, LPS 对成年大鼠 iNOS 表达影响的研究报道较多, 但有关正常新生鼠及 LPS 诱导的新生鼠内毒素血症时 3 种亚型 NOS 的表达及其分布的研究国内外尚未见报道。本研究对正常生后 7 日龄鼠脑 3 种亚型 NOS 蛋白表达进行了观察, 结果显示: 新生鼠脑内 nNOS 的表达比较广泛, eNOS 的表达散在、且表达微弱, 新生鼠脑内未见 iNOS 蛋白表达。脑不同部位 nNOS 的染色强度不同, 染色最强处主要分布于下丘脑和脑室旁神经核团, 脑皮质中仅有少数锥体细胞表现为阳性免疫染色。本结果与国外学者在人体中的研究结果大致相同^[1]。提示 nNOS、eNOS 的表达参与了脑发育过程, 并在其中发挥一定生理作用。

很早发现 NOS 有 3 种亚型, 最近又发现了第 4 种亚型, 即线粒体 NOS (mtNOS)。其中 nNOS、eNOS、mtNOS 为组织结构型, 其活性激活需钙-钙激活的钙调蛋白机制存在, 与快速、早期 NO 的释放有关; iNOS 活性与细胞内钙浓度无关, iNOS 引物序列具有 LPS 诱导性, 仅在炎症时表达并在较晚期释放 NO。本研究对 LPS 诱导的 3 型 NOS 的蛋白表达观察结果显示: 相同剂量 LPS 所诱导的 iNOS 蛋白表达强度不及 nNOS 和 eNOS 表达, 其表达强度依次为 nNOS、eNOS、iNOS。表达时程研究提示 LPS 腹腔注射 2 h 时 nNOS、eNOS 蛋白表达无明显变化, 4 h 时开始增加, 6 h 时染色增强, 24 h 时呈高峰状态; iNOS 于 6 h 开始表达, 24 h 时呈最大表达。三者染色阳性细胞分布于锥体细胞、梨状皮质、海马、下丘脑、脑室旁核团、纹状体, 包括神经元、神经胶质细胞。除此之外, 部分血管可见 eNOS、iNOS 染色, 前者更强些。提示 nNOS、eNOS 与 iNOS 在中枢神经系统炎症反应中由于基因表达方式不同, 可能通过不同机制而发挥不同的作用^[2]。

有研究发现 nNOS 敲除鼠的神经细胞可以耐受兴奋性氨基酸的神经毒性^[3], 提示由 nNOS 诱导产生的 NO 可导致神经元损伤。与此相反, eNOS 参与脑缺血时神经元保护过程及机体的血压调节, 神经元表达的 eNOS 还与神经元功能有关。另外, 正常情况下 iNOS 不表达, 病理条件下 iNOS 表达增加, iNOS 和 nNOS 基因敲除鼠脑缺血时梗塞面积减

少, eNOS 敲除鼠脑缺血时梗塞面积增加^[4]。说明 iNOS 和 nNOS 来源的 NO 是有神经毒性的, 而 eNOS 来源的 NO 具有神经保护作用。

近年, DXM 的神经保护作用引起了研究者的注意。Zhang 等^[5]发现 DXM 通过诱导 I κ B 的合成抑制 NF- κ B 活性而减少 LPS 诱导的 iNOS mRNA 的表达及 NO 的生成, 而且还可降低 NO 所致神经毒性。本研究结果也表明给予 10 mg/kg DXM 可抑制 LPS 诱导的 nNOS、iNOS mRNA 的表达, 但对 eNOS mRNA 表达影响不大。迄今为止, DXM 的神经保护作用机制尚不清楚, 有研究发现 DXM 可上调抑制凋亡的 bcl-x mRNA 及下调早期-快反应基因 c-jun mRNA^[6]的表达, 推测其作用机制可能与基因水平调控有关。但是, 确切的结论尚有待于进一步研究。

(全部图片见封底)

[参 考 文 献]

- [1] Kawahara K, Gotoh T, Oyadomari S, Kajizono M, Kuniyasu A, Ohsawa K, et al. Co-induction of argininosuccinate synthase, cationic amino acid transporter-2, and nitric oxide synthase in activated murine microglial cells [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 90(2): 165-173.
- [2] Rodrigo J, Alonso D, Fernandez AP, Serrano J, Richart A, Lopez JC, et al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation [J]. *Brain Res*, 2001, 909(1-2): 20-45.
- [3] Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal NOS deficient mice [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(8): 2475-2487.
- [4] Iwase K, Miyataka K, Shimizu A, Nagasaki A, Gotoh T, Morita M, et al. Induction of endothelial nitric oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment [J]. *J Biochem*, 2000, 127(16): 11929-11933.
- [5] Zhang WY, Gotih T, Oyadomari S, Gotoh T, Nagasaki A, Iwase K, et al. Co-induction of inducible nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in cytokine-stimulated PC12 cells and high output production of nitric oxide [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 83(1-2): 1-8.
- [6] Macaya A, Munell F, Ferrer I, de Torres C, Reventos J. Cell death and associated c-jun induction in perinatal hypoxia-ischemia. Effects of the neuroprotective drug dexamethasone [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 56(1-2): 29-37.

(本文编辑: 吉耕中)

内毒素血症对新生鼠脑一氧化氮合酶表达的影响

(正文见第203页)

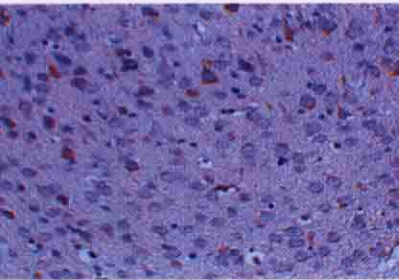


图1 对照组新生大鼠脑皮质锥体细胞nNOS 散在表达 (SP 染色, × 400)
Figure 1 Scattered expression of nNOS in pyramidal cells of the cerebral cortex in the brain from normal neonatal rats (SP × 400)

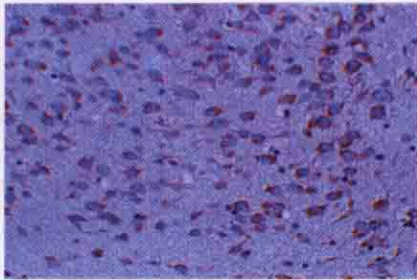


图2 LPS 24 h 组新生大鼠脑室旁核nNOS 表达 (SP 染色, × 400)
Figure 2 Expression of nNOS in paraventricular nuclei of the cerebral cortex in neonatal rats 24 hrs after LPS administration (SP × 400)

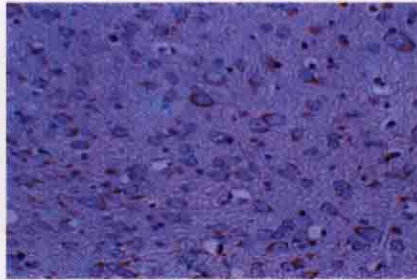


图3 DXM 6 h 组新生大鼠脑皮质锥体细胞nNOS 表达 (SP 染色, × 400)
Figure 3 Expression of nNOS in pyramidal cells of the cerebral cortex in neonatal rats with endotoxemia 6 hrs after DXM administration (SP × 400)

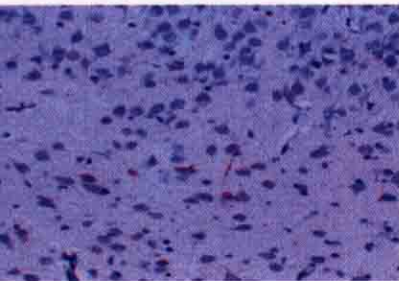


图4 对照组新生大鼠脑室旁核eNOS 微弱表达 (SP 染色, × 400)
Figure 4 Faint expression of eNOS detected in paraventricular nuclei in the brain from normal neonatal rats (SP × 400)

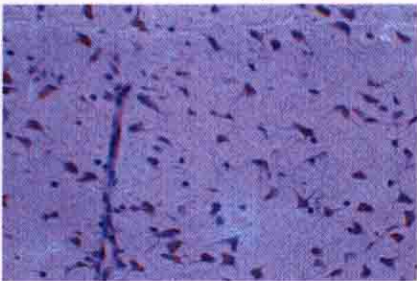


图5 LPS 24 h 组新生大鼠脑室旁核eNOS 表达 (SP 染色, × 400)
Figure 5 Expression of eNOS detected in paraventricular nuclei in neonatal rats 24 hrs after LPS administration (SP × 400)

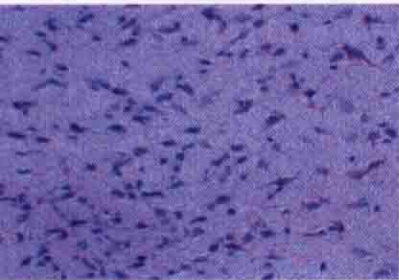


图6 LPS 6 h 组新生大鼠脑皮质iNOS 表达 (SP 染色, × 400)
Figure 6 Expression of iNOS in the cerebral cortex in neonatal rats 6 hrs after LPS administration (SP × 400)

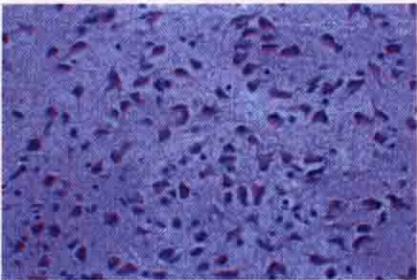


图7 LPS 24 h 组新生大鼠脑室旁核iNOS 表达 (SP 染色, × 400)
Figure 7 Expression of iNOS detected in paraventricular nuclei in neonatal rats 24 hrs after LPS administration (SP × 400)

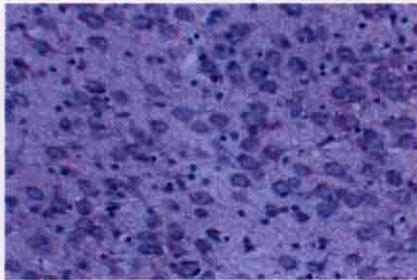
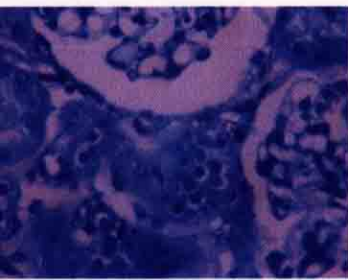


图8 DXM 24 h 组新生大鼠脑皮质eNOS 表达减少 (SP 染色, × 400)
Figure 8 Decreased expression of eNOS detected in the cerebral cortex in neonatal rats with endotoxemia 24 hrs after DXM administration (SP × 400)

肥大细胞在大鼠慢性肾功能不全模型肾脏中的分布及意义

(正文见第229页)



1



2

图1 甲苯胺蓝染色肥大细胞
胞浆颗粒呈紫红色的细胞为肥大细胞 (光镜 × 400)
图2 类胰蛋白酶抗体免疫组化阳性细胞
免疫组化后呈棕红色的细胞为类胰蛋白酶抗体阳性细胞即肥大细胞 (光镜 × 360)