



糖尿病大鼠下丘脑室旁核nNOS 免疫阳性神经元的变化

研究发现,在糖尿病状态下,脑部多种神经递质和激素的合成、释放及代谢异常,包括乙酰胆碱、肾上腺素、去甲肾上腺素、血管加压素、促肾上腺激素释放激素等[1],提示脑部神经递质和肽类变化参与糖尿病病变过程。中枢神经系统内的NO可参与外周血糖和血浆渗透压调节[2],在具有高血糖、高血浆渗透压、多食、多饮、多尿等临床表现的糖尿病病变过程中可能发挥重要作用。

本研究通过ABC免疫细胞化学方法观察了糖尿病大鼠下丘脑室旁核(PVN)内神经元型一氧化氮合酶(nNOS)免疫阳性神经元数目的变化。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国Sigma公司,以0.1 mol/L pH 4.2枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液新鲜配成2%的溶液。葡萄糖酶法测定试剂盒(批号000302)购自上海捷门生物技术公司。

1.2 实验动物及动物模型建立

36只健康雄性SD大鼠(购自第一军医大学实验动物中心),体质量(200±20)g,随机均分为2组。(1)糖尿病组:大鼠禁食12 h后一次性腹腔内注射链脲佐菌素55 mg/kg·b.w.。(2)对照组:注射同等体积0.1 mol/L枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。第10天时血糖≥16.65 mmol/L者确定为糖尿病大鼠[3]。成模后每周监测1次定性尿糖和体质量,实验期间对糖尿病大鼠未使用胰岛素治疗。

1.3 动物取材

于成模后第2、7、12周,即糖尿病早、中、后期[2],两组各取6只动物,2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉下开胸。用无菌注射器从左心室内采血5 ml,室温静置析出血清,10 000 r/min离心,提取上清,-70℃低温冰箱内保存。常规灌注固定取脑,入4%多聚甲醛后固定,置于4℃冰箱内保存。脑依次置于含10%、20%、30%蔗糖液(0.1 mol/L PB配制)过夜至沉底。将组织块以O.C.T.包埋,-204℃恒冷箱中全脑连续冠状切片,片厚35 μm,隔6取1,收集所有切片,保存于0.01 mol/L PBS。每个组织块依次取两套切片,一套做nNOS免疫组织化学染色,另一套做尼氏染色。

1.4 血糖测定

血清葡萄糖测定采用葡萄糖酶法。具体操作按试剂盒说明书进行。

1.5 ABC免疫细胞化学染色

免疫细胞化学染色采取漂浮染色法,具体步骤如下:漂片入0.1%H₂O₂溶液,室温下保存1 h;1.5%正常羊血清(不漂洗),室温下保存2 h;兔抗nNOS多克隆抗体(Santa Cruz公司),工作浓度1:2000(PBT液稀释),4℃湿盒孵育96 h(PBT液配制:0.1%BSA,0.1% Triton X-100,0.01 mol/L PBS稀释);1:200生物素结合IgG,4℃湿盒孵育48 h;1:50 ABC混合液,4℃湿盒孵育24 h;上述各步骤除正常羊血清外,皆用0.01 mol/L PBS(pH=7.2)漂洗5 min×3;DAB显色,镜下控制呈色程度。裱片,自然干燥,常规脱水、

透明、封片。对照实验：阴性对照用0.01 mol/L PBS代替一抗，阳性对照由一抗试剂盒提供。

1.6 计数方法

每只大鼠选取5张PVN断面切片，置Olympus显微镜下观察免疫阳性神经元，仅计数10×40倍光学显微镜下细胞核轮廓清晰的免疫阳性神经元。每张切片两侧PVN断面免疫阳性神经元均计数3次，取其均值作为两侧PVN断面的免疫阳性神经元数目(A、B)。

按下述公式计算一侧PVN所含免疫阳性神经元的平均数 G_n ，代表该只大鼠PVN内免疫阳性神经元数目： $G_n = \Sigma S_n / N$ 。其中 G_n 为一侧PVN所含免疫阳性神经元的平均数； S_n 为每张切片两侧PVN断面所含免疫阳性神经元平均数， $S_n = (A+B) / 2$ ； ΣS_n 为所有切片中PVN两侧核团断面所含免疫阳性神经元平均数之和； N 为观察PVN的总切片数， $N=5$ 。

1.7 数据处理

实验数据用SPSS 10.0进行统计分析，主效应与交互效应分析用重复测量方差分析，单独效应分析用两样本t检验和重复测量方差分析。

2 结果

2.1 血糖变化

整个实验期间，对照组血糖值维持在正常水平；而糖尿病组大鼠血糖明显升高，始终处于高血糖水平(高于16.65 mmol/L)，与对照组相比有显著差异(表1)。

表 1 建模后糖尿病大鼠血糖的变化 ($n=6$, mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Changes of blood sugar in diabetic rats
($n=6$, mmol/L, $Mean\pm SD$)

Group	Time (week)		
	2	7	12
Control	6.4±1.0	6.5±1.4	6.2±0.5
Diabetic	32.1±1.1	25.1±1.8	26.2±1.4
<i>t</i>	7.536	5.704	5.890
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

2.2 下丘脑室旁核(PVN) nNOS免疫阳性神经元形态及计数

PVN 内分布有大量的nNOS免疫阳性神经元，nNOS免疫阳性物质为深棕色，定位于胞质，胞核周围着色明显，胞核不着色。nNOS免疫阳性神经元主要分布PVN的大细胞部，尤以腹内侧明显，密集分布，胞体大，卵圆形，突起较短，可见突起伸向第三脑室；PVN小细胞部散在分布少量免疫阳性神经元，胞体中等大小，椭圆或梭形，长轴多呈内外走向。定量结果显示(表2)，对照组PVN内nNOS免疫阳性神经元数目无明显改变。在糖尿病早期(2周)，糖尿病组PVN内nNOS免疫阳性神经元数目与实验对照组相比无显著差异($P>0.05$)。糖尿病中期(7周)，糖尿病组PVN内nNOS免疫阳性神经元数目明显高于实验对照组，与实验对照组相比均有显著差异($P>0.05$)。糖尿病后期(12周)，糖尿病组PVN内nNOS免疫阳性神经元数目虽然低于中期，仍然高于对照组，与实验对照组相比有显著差异($P>0.05$)。对照组和糖尿病组nNOS免疫阳性神经元形态见图1~4。

表 2 糖尿病大鼠下丘脑 PVN nNOS 免疫阳性神经元的变化 (个, $\bar{x}\pm s$)

Tab.2 nNOS immunopositive neurons in the thalamic paraventricular nucleus of diabetic rats (pc., $Mean\pm SD$)

Group	2 weeks	7 weeks	12 weeks	Total	<i>F</i>	<i>P</i>
Control	68.67±4.09	68.73±4.55	69.57±2.07	68.99±3.57	31.220	0.000
Diabetic	70.00±4.34	82.14±3.63	76.00±4.76	76.05±4.24	42.353	0.000
<i>t</i>	1.387	12.313	11.250	16.390*	(F=39.782, P=0.000)**	
<i>P</i>	0.460	0.000	0.000	0.000*		

F* statistic and *P* value of main effect; *F* statistic and *P* value of crossover effect.

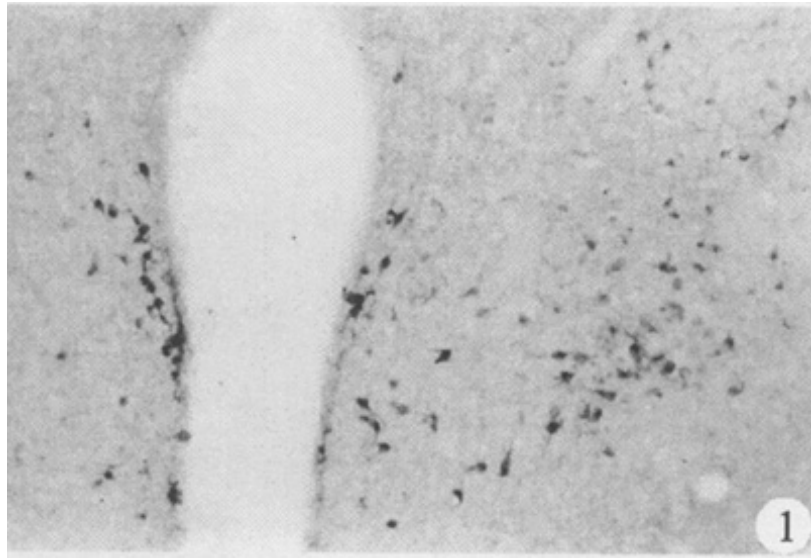


图1 对照组大鼠下丘脑室旁核nNOS免疫阳性神经元 (×100)

Fig.1 nNOS-immunopositive neurons in the thalamic paraventricular nucleus of normal rats (×100)

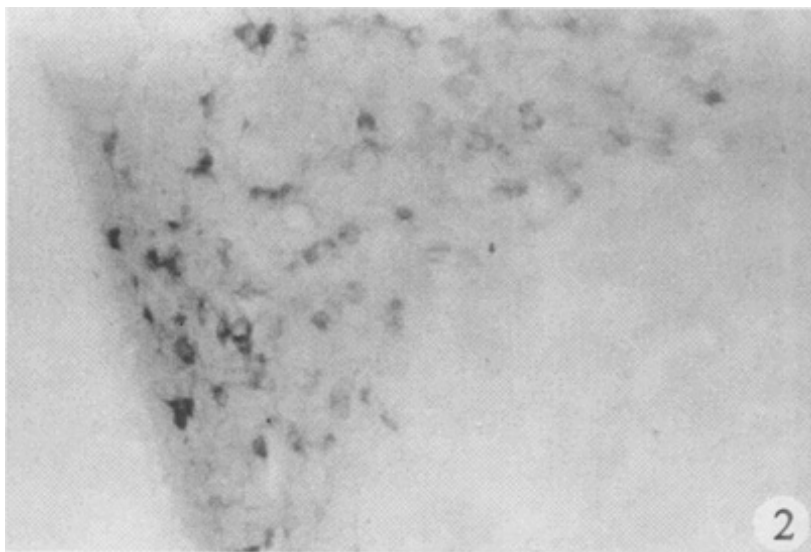


图2 建模2周时糖尿病大鼠下丘脑室旁核nNOS免疫阳性神经元 (×200)

Fig.2 nNOS-immunopositive neurons in thalamic paraventricular nucleus of diabetic rats 2 weeks after model establishment (×200)

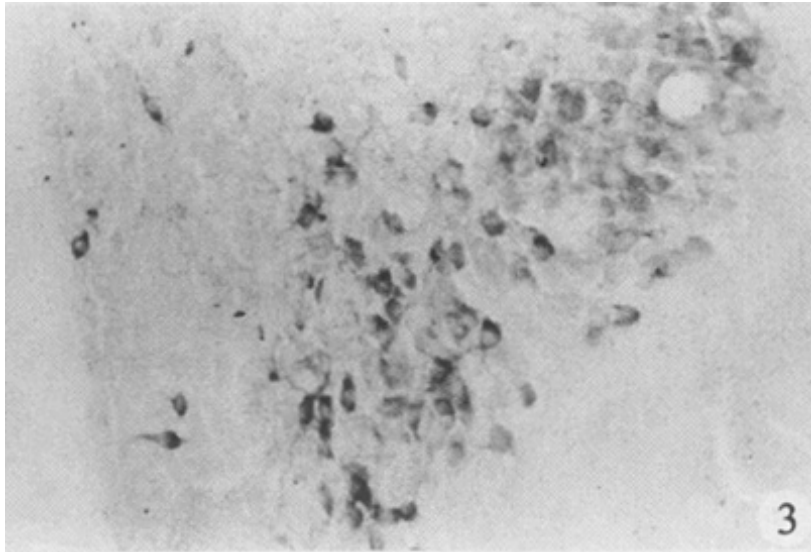


图3 建模7周时糖尿病大鼠下丘脑室旁核nNOS免疫阳性神经元 (×200)

Fig. 3 nNOS-immunopositive neurons in the thalamic paraventricular nucleus of diabetic rats at 7 weeks (×200)

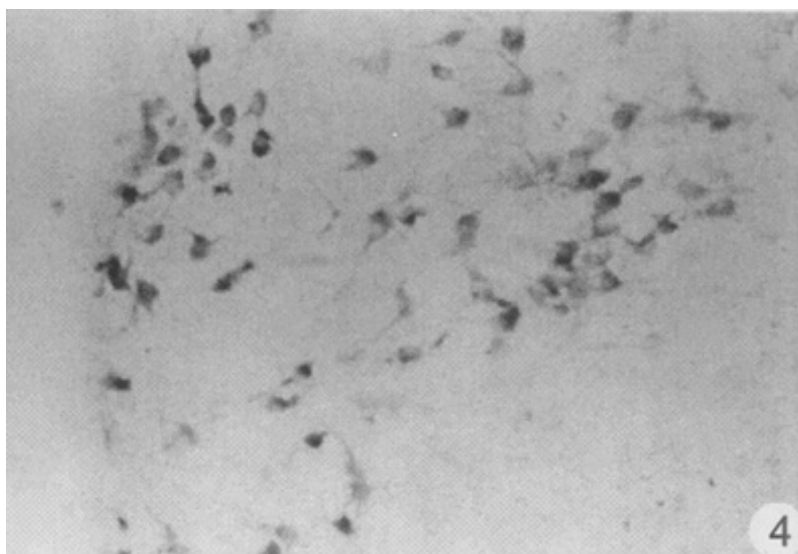


图4 建模12周时糖尿病大鼠下丘脑室旁核nNOS免疫阳性神经元 (×200)

Fig. 4 nNOS-immunopositive neurons in thalamic paraventricular nucleus of diabetic rats at 12 weeks (×200)

*F statistic and P value of main effect; **F statistic and P value of crossover effect.

3 讨论

PVN为异质性核团，既具有神经内分泌功能，又参与植物神经活动的调控，是神经体液调节的关键部位之一。除血管加压素(AVP)和催产素(OT)外，PVN还可合成生长抑素、脑啡肽、心房肽等神经肽类物质，参与神经内分泌调节[4]。PVN接受多重神经支配，并富含催产素、GABA能神经元及儿茶酚胺能神经末梢，提示下丘脑神经内分泌活动存在多种突触调控[5]。研究发现，NOS阳性神经元分布于PVN的所有亚核内，主要集中于PVN的大细胞部[6]，而大细胞部主要含AVP和OT神经元，提示PVN大细胞部的nNOS神经元可能与AVP和OT神经元部位重叠。本研究观察到nNOS免疫阳性神经元主要分布于PVN的大细胞部，支持以上观点。

另外，本研究结果显示，糖尿病组大鼠成模2周时PVN内nNOS免疫阳性神经元数目未见显著改变，而7

周、12周则显著高于对照组。提示在糖尿病早期, PVN内nNOS尚未激活; 在糖尿病中、后期nNOS活性增加。有报道成模4周时糖尿病大鼠 PVN内nNOS mRNA表达上调, 用胰岛素治疗使血糖恢复正常可抑制此反应, 提示PVN内nNOS神经元参与了糖尿病的发生发展[7]。糖尿病PVN内nNOS活性的改变, 可能与交感神经机制活性改变有关。PVN源性的NO对交感神经活动可能具有抑制性调节机制, 在束缚应激大鼠, 多个交感神经中枢(如PVN)的NOS神经元活性增加, 提示NO直接或间接参与各级中枢水平的交感神经活动[8]。慢性肾衰大鼠出现高血压时, PVN内NOS mRNA、NO₂⁻/NO₃⁻量均明显增高, NOS抑制剂L-NAME可增加PVN内NE水平[9]。PVN内NO抑制交感神经活动的机制可能包括GABA途径和Glu/NMDA途径。研究表明NO可刺激GABA释放, 引起GABA突触后效应[10]。激活GABA受体可消除PVN内注射L-NAME产生的增加动脉压和心率作用; 阻断GABA受体可消除NO供体SNP降低动脉压和心率的作用。PVN的NOS神经元有NMDA受体, Glu可通过激活NMDA受体, 刺激NOS神经元释放NO[11]。

本实验的结果提示, 在糖尿病早期, 以上因素改变尚不足以激活PVN内nNOS。随着糖尿病状态持续存在, 交感神经途径活性增强, 脑内儿茶酚胺增多, AVP、OT代谢紊乱[12], 可能通过多种突触调控, 使细胞内Ca²⁺浓度增加, 对PVN内nNOS免疫阳性神经元产生激活作用。但在糖尿病后期各激活因素的活性下降, nNOS免疫阳性神经元对这些激活因素的应答能力下降; 长期高水平NO可反馈性抑制NMDA受体, Ca²⁺内流减少, nNOS活性下降, 并可使nNOS中的巯基亚硝基化, 导致nNOS活性下降[13]。

参考文献:

- [1] Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression[J]. *Diabetes*, 1995, 44 (2): 147-51.
- [2] Yu WJ, Juang SW, Chin WT, et al. Decrease of nitric oxide synthase in the cerebrocortex of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Neurosci Lett*, 1999, 272 (2): 99-102.
- [3] 于德民, 吴锐, 尹潍, 等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. *中国糖尿病杂志*(Chin J Diabetes), 1995, 3(2): 105-9. Yu DM, Wu R, Yin W, et al. A study on experimental diabetes animal models induced by streptozocin[J]. *Chin J Diabetes*, 1995, 3(2): 105-9.
- [4] 韩中胜, 鞠躬. 下丘脑下行通路及其功能[J]. *生理科学进展*(Prog Physiol Sci), 1988, 19 (3): 222-5.
- [5] 朱长庚, 张喜京, 刘庆莹, 等. 下丘脑室旁核神经元多重神经支配的电镜研究[J]. *解剖学报*, 1994, 25(2): 123-7. Zhu CG, Zhang XJ, Liu QY, et al. An electron microscopic study of multiple innervations of neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus[J]. *Acta Anat Sin*, 1994, 25(2): 123-7.
- [6] 刘曾旭, 吕诚, 熊树明. 大鼠下丘脑内一氧化氮合酶阳性神经元的分布[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1998, 7(1): 43-7. Liu ZX, Lu C, Xiong SM. The distribution of nitric oxide synthase reactive neurons in hypothalamus of rats[J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 1998, 7(1): 43-47.
- [7] Serino R, Ueta Y, Tokunaga M, et al. Up regulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Diabetologia*, 1998, 41(6): 640-8.
- [8] Krukoff TL, Khalili P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing[J]. *J Comp Neurol*, 1997, 377(4): 509-19.
- [9] Ye S, Nosrati S, Campese VM. Nitric oxide (NO) modulates the neurogenic control of blood pressure in rats with chronic renal failure (CRF) [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99 (3): 540-8.
- [10] Bains JS, Ferguson AV. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABA-ergic inputs to

type I neurones of the rat paraventricular nucleus[J]. J Physiol, 1997, 499 (Pt 3): 733-46.

[11] Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, et al. Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors[J]. Neuroendocrinology, 1995, 62 (2): 187-97.

[12] 陈靖, 顾勇, 马骥, 等. 糖尿病大鼠精氨酸血管加压素系统异常及黄芪的治疗作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1997, 6(3): 225-8.

Chen J, Gu Y, Ma J, et al. AVP and its V1 α receptor mRNA expression in diabetic rats and therapeutic effects of astragalus memberanaceus[J]. J Nephrol Dialy Tranplant, 1997, 6 (3): 225-8.

[13] 梅元武, 刘秀, 童萼塘. 脑缺血早期大脑皮质区神经元型一氧化氮合酶活性的变化[J]. 卒中与神经疾病, 1999, 6(1): 13-5.

Mei YW, Liu X, Tong ET. The changes of nitric oxide synthase activity in cortical neurons during early cerebral ischemic period[J]. Stroke Nerv Dis, 1999, 6(1): 13-5.

参考文献:

[1] Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression[J]. Diabetes, 1995, 44 (2): 147-51.

[2] Yu WJ, Juang SW, Chin WT, et al. Decrease of nitric oxide synthase in the cerebrocortex of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Neurosci Lett, 1999, 272 (2): 99-102.

[3] 于德民, 吴锐, 尹淮, 等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. 中国糖尿病杂志(Chin J Diabetes), 1995, 3(2): 105-9. Yu DM, Wu R, Yin W, et al. A study on experimental diabetes animal models induced by streptozocin[J]. Chin J Diabetes, 1995, 3(2): 105-9.

[4] 韩中胜, 鞠躬. 下丘脑下行通路及其功能[J]. 生理科学进展(Prog Physiol Sci), 1988, 19 (3): 222-5.

[5] 朱长庚, 张喜京, 刘庆莹, 等. 下丘脑室旁核神经元多重神经支配的电镜研究[J]. 解剖学报, 1994, 25(2): 123-7.

Zhu CG, Zhang XJ, Liu QY, et al. An electron microscopic study of multiple innervations of neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus[J]. Acta Anat Sin, 1994, 25(2): 123-7.

[6] 刘曾旭, 吕诚, 熊树明. 大鼠下丘脑内一氧化氮合酶阳性神经元的分布[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1998, 7(1): 43-7.

Liu ZX, Lu C, Xiong SM. The distribution of nitric oxide synthase reactive neurons in hypothalamus of rats[J]. Chin J Histochem Cytochem, 1998, 7(1): 43-47.

[7] Serino R, Ueta Y, Tokunaga M, et al. Up regulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Diabetologic, 1998, 41(6): 640-8.

[8] Krukoff TL, Khalili P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing[J]. J Comp Neurol, 1997, 377(4): 509-19.

[9] Ye S, Nosrati S, Campese VM. Nitric oxide (NO) modulates the neurogenic control of blood pressure in rats with chronic renal failure (CRF) [J]. J Clin Invest, 1997, 99

(3): 540-8.

[10] Bains JS, Ferguson AV. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABA-ergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus[J]. J Physiol, 1997, 499 (Pt 3): 733-46.

[11] Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, et al. Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors[J]. Neuroendocrinology, 1995, 62 (2): 187-97.

[12] 陈靖, 顾勇, 马骥, 等. 糖尿病大鼠精氨酸血管升压素系统异常及黄芪的治疗作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1997, 6(3): 225-8.

Chen J, Gu Y, Ma J, et al. AVP and its V1 α receptor mRNA expression in diabetic rats and therapeutic effects of astragalus memberanaceus[J]. J Nephrol Dialy Tranplant, 1997, 6 (3): 225-8.

[13] 梅元武, 刘秀, 童萼塘. 脑缺血早期大脑皮质区神经元型一氧化氮合酶活性的变化[J]. 卒中与神经疾病, 1999, 6(1): 13-5.

Mei YW, Liu X, Tong ET. The changes of nitric oxide synthase activity in cortical neurons during early cerebral ischemic period[J]. Stroke Nerv Dis, 1999, 6(1): 13-5.

[回结果列表](#)