

糖尿病大鼠下丘脑室旁核 nNOS 免疫阳性神经元的变化

沈伟哉 袁宏生 袁国庆 暨南大学医学院解剖学教研室 广东 广州 510630 冤

摘要 目的 观察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 探讨 PVN 内 NO 在糖尿病发展中的作用机制 方法 建立链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型 于第 2 周周末取脑组织进行 ABC 免疫细胞化学法染色 定量分析 PVN 内 nNOS 免疫阳性神经元数目变化 结果 2 周时糖尿病组大鼠 PVN 内 nNOS 免疫阳性神经元数目与对照组相比无显著差异 $P>0.05$ 7 周时糖尿病组大鼠 PVN 内 nNOS 免疫阳性神经元数目显著高于对照组 $P<0.05$ 结论 PVN 内 nNOS 免疫阳性神经元数目在糖尿病中后期明显升高 糖尿病状态下 PVN 内 nNOS 活性改变可能与糖尿病神经内分泌及肾上腺素能途径改变有关

关键词 糖尿病 / 免疫学 / 下丘脑室旁核 / 神经元 / 一氧化氮合酶 / 一氧化氮

中图分类号 R322.8 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2003)07-0692-04

Changes of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of diabetic rats

SHENWei-zai, LINHong-sheng, GUOGuo-qing

Department of Anatomy, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510630, China

Abstract: Objective To explore the role of nitric oxide in the development of diabetes mellitus by observing the changes of neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-immunoreactive (nNOS-ir) neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) of diabetic rats. Methods Diabetic rat models were established by means of intraperitoneal streptozotocin injections. At the end of 2, 7 and 12 weeks after model establishment, tissue sampling was performed and the number of nNOS-ir neurons in PVN were counted and quantitatively analyzed. Results The number of nNOS-ir neurons in PVN of diabetic rats remained normal 2 weeks after model establishment ($P>0.05$) but was significantly increased by the time of 7 weeks ($P<0.05$); at the 12th weeks, the number of nNOS-ir neurons of diabetic group was still greater than that of the control group ($P<0.05$). Conclusion The number of nNOS-ir neurons in PVN increases significantly in middle and advanced stages of diabetes, suggesting the possible relations between the nNOS activity changes in PVN and the changes in cerebral neuroendocrine and adrenal activity in diabetic condition.

Key words: diabetes mellitus/immunology; paraventricular hypothalamic nucleus; neurons; nitric oxide synthase; nitric oxide

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 促肾上腺皮质激素释放激素等 提示脑部神经递质和肽类变化参与糖尿病病变过程中 中枢神经系统内的 NO 可参与外周血糖和血浆渗透压调节 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 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 体重 180~220 g 随机均分为 2 组 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 s.b.w. 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 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 周 糖尿病早期 后期

收稿日期 2003-03-14

基金项目 广东省卫生厅课题 1998290 广东省中医药管理局课题 00068

Supported by Guangdong Provincial Health Bureau (A1998290) and Guangdong Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (100068)

作者简介 沈伟哉 1956 年 上海人 博士 教授 邮址: tshenwz@jnu.edu.cn

两组各取 6 只动物，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，4000 r/min 离心，提取上清，-70℃ 低温冰箱内保存。常规灌注固定取脑，4% 多聚甲醛后固定，置于 4℃ 冰箱内保存。脑依次置于含 10% 蔗糖液、1 mol/L PB 配制过夜至沉底，将组织块以 O.C.T. 包埋，204 益恒冷箱中全脑连续冠状切片，厚 35 μm，每隔 6 取 1 张，收集所有切片，保存于 0.01 mol/L PBS 中。每个组织块依次取两套切片，一套做 nNOS 免疫组织化学染色，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；5% 正常羊血清漂洗，室温下保存 2 h；兔抗 nNOS 多克隆抗体（Santa Cruz 公司，工作浓度 1:1000，BT 液稀释）益湿盒孵育 96 h（PBT 液配制，0.1% BSA，0.1% Triton X-100，0.01 mol/L PBS 稀释）；生物素结合 IgG 益湿盒孵育 48 h；ABC 混合液益湿盒孵育 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。DAB 显色，镜下控制呈色程度，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 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。

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， $n = \sum G_n / N$ ，其中 G_n 为一侧 PVN 所含免疫阳性神经元的平均数， B_n 为每张切片两侧 PVN 断面所含免疫阳性神经元平均数， $n = \sum B_n / 2$ ， 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 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 \pm 0	6.5 \pm 0.4	6.2 \pm 0.5
Diabetic	32.1 \pm 1	25.1 \pm 0.8	26.2 \pm 0.4
t	7.536	5.704	5.890
P	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，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，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，周围糖尿病组 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，周围糖尿病组 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，周围糖尿病组 PVN 内 nNOS 免疫阳性神经元数目虽然低于中期，但仍然高于对照组，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 (Mean \pm SD)

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

Group	2weeks	7weeks	12weeks	Total	F	P
Control	68.67 \pm 0.09	68.73 \pm 0.55	69.57 \pm 0.07	68.99 \pm 0.57	31.220	0.000
Diabetic	70.00 \pm 0.34	82.14 \pm 0.63	76.00 \pm 0.76	76.05 \pm 0.24	42.353	0.000
t	1.387	12.313	11.250	16.390*	(F=39.782, P=0.000)**	
P	0.460	0.000	0.000	0.000*		

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

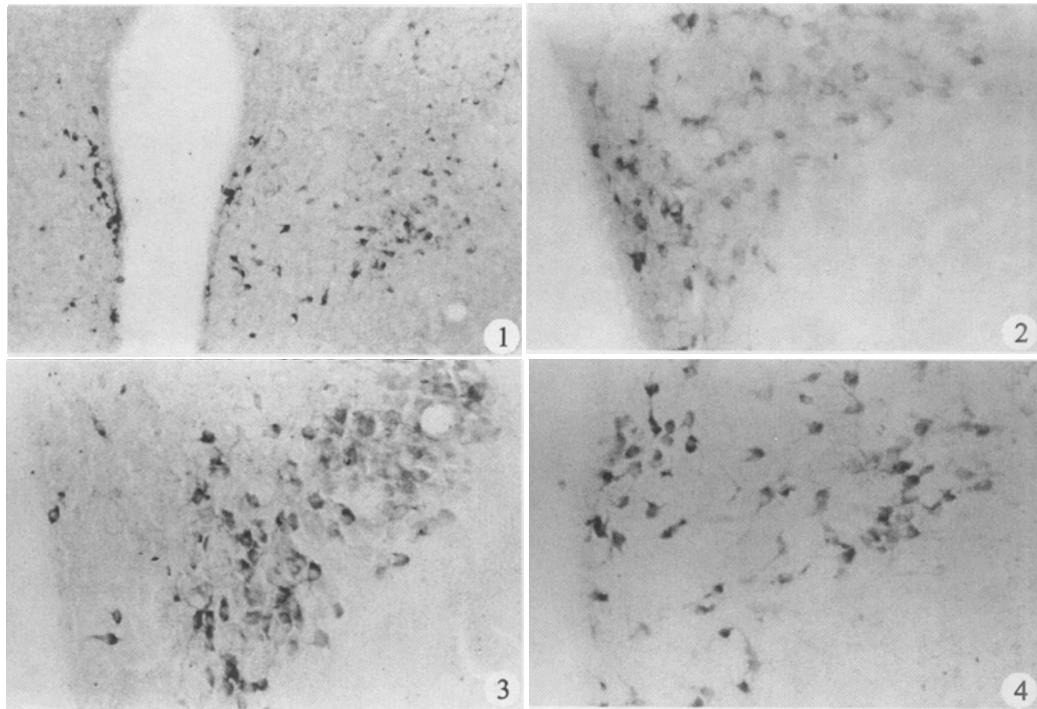


图 1 对照组大鼠下丘脑室旁核 nNOS 免疫阳性神经元 (伊00)

Fig.1 nNOS-immunopositive neurons in the thalamic paraventricular nucleus of normal rats 伊00 伊00 伊00

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 (伊00)

Fig.2 nNOS-immunopositive neurons in thalamic paraventricular nucleus of diabetic rats 2 weeks after model establishment 伊00 伊00 伊00

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 (伊00)

Fig.3 nNOS-immunopositive neurons in the thalamic paraventricular nucleus of diabetic rats at 7 weeks 伊00 伊00 伊00

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 (伊00)

Fig.4 nNOS-immunopositive neurons in thalamic paraventricular nucleus of diabetic rats at 12 weeks 伊00 伊00 伊00

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、VP、催产素、T、外,还可合生长抑素、啡肽、心房肽等神经肽类物质,参与神经内分泌调节。PVN 接受多重神经支配,并富含催产素、ABA 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。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,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、2 周则显著高于对照组。提示在糖尿病早期, PVN 内 nNOS 尚未激活。而在糖尿病中、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。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, 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。慢性肾衰大鼠出现高血压时, PVN 内 NOS mRNA、 NO_2^-/NO_3^- 量均明显增高。NOS 抑制剂 L-NAME 可增加 PVN 内 NE 水平。提示 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。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。

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,袁

AVP 代谢紊乱可能通过多种突触调控使细胞内 Ca^{2+} 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使 NOS 免疫阳性神经元对这些激活因素的应答能力下降且长期高水平 NO 可反馈性抑制 NMDA 受体 Ca^{2+} 内流减少使 NOS 活性下降并可引起 nNOS 中的巯基亚硝基化导致 nNOS 活性下降。

参考文献

- 响暂 Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *响暂 Diabetes*, 1995, 44(2): 147-51.
- 响暂 Yu WJ, Juang SW, Chin WT, et al. Decrease of nitric oxide synthase in the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *响暂 Neurosci Lett*, 1999, 272(2): 99-102.
- 响暂 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. *响暂中国糖尿病杂志 (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 streptozotocin. *响暂 Chin J Diabetes*, 1995, 3(2): 105-9.
- 响暂 韩中胜, 鞠躬. 下丘脑下行通路及其功能. *响暂生理科学进展 (Prog Physiol Sci)*, 1988, 19(3): 222-5.
- 响暂 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. *响暂解剖学报*, 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. *响暂 Acta Anat Sin*, 1994, 25(2): 123-7.
- 响暂 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. *响暂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. *响暂 Chin J Histochem Cytochem*, 1998, 7(1): 43-47.
- 响暂 Serino R, Ueta Y, Tokunaga M, et al. Upregulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *响暂 Diabetologia*, 1998, 41(6): 640-8.
- 响暂 Krukoff TL, Khalili P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons. *响暂 Comp Neurol*, 1997, 377(4): 509-19.
- 响暂 Ye S, Nosrati S, Campese VM. Nitric oxide (NO) modulates the neurogenic control of blood pressure in rats with chronic renal failure (CRF). *响暂 Clin Invest*, 1997, 99(3): 540-8.
- 响暂 Bains JS, Ferguson AV. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic input to type I neurons of the rat paraventricular nucleus. *响暂 J Physiol*, 1997, 499(Pt 3): 733-46.
- 响暂 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. *响暂 Neuroendocrinology*, 1995, 62(2): 187-97.
- 响暂 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. *响暂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 receptor mRNA expression in diabetic rats and the therapeutic effects of astragalus membranaceus. *响暂 Nephrol Dialy Transplant*, 1997, 6(3): 225-8.
- 响暂 梅元武, 刘秀, 童萋塘. 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. *响暂卒中与神经疾病*, 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. *响暂 Stroke Nerv Dis*, 1999, 6(1): 13-5.

连接 691 页

够会减少分离的细胞产量。本实验中细胞分离后我们采用免疫粘附选择法对分离的细胞悬液进行纯化，可使细胞纯度提高 15% 左右。

有关 ARDS 动物模型中肺泡域型细胞超微结构的观察大多是取肺组织直接进行电镜观察。本实验则是先对 ARDS 大鼠进行域型细胞的分离，纯化后再进行电镜观察。集中观察高纯度域型细胞的变化。观察的更加直接全面。不受肺间质水肿、肺泡细胞肿胀、肺毛细血管充血等的挤压及影响。避免了肺组织中 II 型细胞位于肺泡表面的低洼处及拐角处而不易观察到其超微结构改变的弊病。适用于主要针对域型细胞的实验观察。结果发现正常对照组域型细胞形状较规则。细胞表面有很多长短不一、粗细不等的微绒毛。细胞核明显。胞质内含有数量不等、大小不一的特征性板层小体。且可看到其不同的成熟阶段。由酸性的域型细胞相对不规则。细胞变性。甚至崩解。细胞表面微绒毛减少。胞质内板层小体排空明显增多而致空泡化。

并可见脱落的板层小体。综上所述所述。ARDS 大鼠域型细胞的改变以板层小体的变化最为突出。板层小体排空明显增多而致空泡化。提示 ARDS 发病机制与肺泡表面活性物质有重要关联。

参考文献

- 响暂 Nuckton TJ, Alonso JA, Kallet RH, et al. Pulmonary dead-space fraction as a risk factor for death in the acute respiratory distress syndrome. *响暂 N Engl J Med*, 2002, 346(17): 1281-6.
- 响暂 Zilberberg MD, Epstein SK. Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *响暂 Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(4 Pt 1): 1159-64.
- 响暂 Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *响暂 Am Rev Respir Dis*, 1986, 134(1): 141-5.
- 响暂 Mason RJ, Walker SR, Shields BA, et al. Identification of rat alveolar type II epithelial cells with anionic acid and polychrome stain. *响暂 Am Rev Respir Dis*, 1985, 131(5): 786-8.
- 响暂 Seeger W, Gunther A, Walrath HD, et al. Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. Pathogenetic role and therapeutic prospects. *响暂 Clin Invest*, 1993, 71(3): 177-90.