

牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠脑神经型一氧化氮合酶表达的影响

周健洪¹, 陈东风¹, 杜少辉², 黎 晖¹, 李伊为¹, 邓汝东¹, 张赛霞¹

(1 广州中医药大学解剖学教研室, 广东 广州 510405; 2 深圳市中医院内科, 广东 深圳 518000)

[摘要] 目的: 探讨牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠脑神经型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)表达的影响。方法: 将 SD 大鼠随机分成正常对照组、模型组、牛珀至宝微丸组。模型组静脉注射内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)1.5 mg/kg、腹腔注射 D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GalN)100 mg/kg 造成内毒素休克模型, 牛珀至宝微丸组用药 7 d 后再作以上处理。用免疫组织化学方法检测各组 nNOS 在不同脑区的表达。结果: nNOS 阳性细胞广泛分布于大脑皮质、层, 海马分子层, 齿状回多形层, 脑干网状结构, 小脑分子层、颗粒层和普尔基涅细胞层。在大脑皮质、海马、脑干及小脑各部位, 牛珀至宝微丸组的 nNOS 阳性细胞数略高于正常对照组, 但明显低于模型组($P < 0.05$)。结论: 牛珀至宝微丸有部分下调内毒素休克所致广泛脑区 nNOS 过度表达的作用。

[关键词] 牛珀至宝微丸; 内毒素休克; 神经型一氧化氮合酶; 免疫组织化学; 动物, 实验

[中图分类号] R285.5; R363.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)02-0115-04

Effect of Niupo Zhibao Pellet on expression of neuronal nitric oxide synthase in brain of endotoxin-induced shock rats

ZHOU Jian-Hong¹, CHEN Dong-Feng¹, DU Shao-Hui², LI Hui¹, LI Yi-Wei¹, DENG Ru-Dong¹, ZHANG Sai-Xia¹

(1. Department of Anatomy, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong Province 510405, China; 2. Department of Internal Medicine, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong Province 51800, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Niupo Zhibao Pellet (NPZBP) on the expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the brain of endotoxin-induced shock rats. Methods: SD rats were randomly divided into normal control group, endotoxin-induced shock model group and NPZBP-treated group. Lipopolysaccharide (LPS) (1.5 mg/kg i.v.) and D-galactosamine (D-GalN) (100 mg/kg i.p.) were administered to the rats in endotoxin-induced shock model group, as well as to the rats in NPZBP-treated group after seven-day treatment, to induce the shock. The expression of nNOS in the brain of the rats in each of the 3 groups was measured by immunohistochemical methods. Results: In the 3 groups, nNOS immuno-positive cells distributed widely in layer , , of the cerebral cortex, the molecular layer of hippocampus, the polymorphic layer of the dentate gyrus, the reticular formation of brain stem, and the molecular, granular and Purkinje cell layer of the cerebellar cortex. The number of immuno-positive cells in the NPZBP-treated group was slightly higher than that of the normal control group, and significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$) in many regions of the brain, including cerebral cortex, hippocampus, brain stem and cerebellar cortex. Conclusion: NPZBP can inhibit the over-expression of nNOS in wide area of the brain in endotoxin-induced shock rats.

KEY WORDS Niupo Zhibao Pellet; endotoxin-induced shock; neuronal nitric oxide synthase; immunohistochemistry; animals, laboratory

J Chin Integr Med, 2005, 3(2):115-118

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.39970914), 广东省中医药管理局基金资助项目(No.98447), 深圳市科技局基金资助项目(No.200004087)

[作者简介] 周健洪(1966-), 男, 主管技师.

Correspondence to: CHEN Dong-Feng, Associate Professor. E-mail: cdf27212@21cn.com

全世界每年约有 30 万人患中毒性休克,虽然抗生素已广泛应用并且有重症监护的支持,但其病死率仍高达 35% ~ 60%;而病毒感染所致的休克病死率可能更高,内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞外膜的主要成分,是引起内毒素性休克的主要因素^[1]。内毒素休克及其所致的多脏器衰竭,仍是临床面临的一个难题。牛珀至宝微丸由水牛角、琥珀等组成,具有醒神开闭、祛邪固脱之功,临床研究表明对感染性休克所致的内厥外脱等证有较好的疗效,并在内毒素性休克动物实验研究中得到进一步证实^[2]。近年研究表明,内毒素休克与 NO 生成密切相关^[3]。我们在前期研究中发现牛珀至宝微丸可通过调控诱生型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 表达来减轻内毒素对肺^[4]、肝^[5]、肾^[6] 的损伤。然而,目前国内在外在毒素对脑神经型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 表达研究方面报道很少。因此,本研究应用 nNOS 免疫组织化学方法,观察牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠脑内 nNOS 表达的影响,以期牛珀至宝微丸在内毒素休克时调控脑内 nNOS 表达提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 动物与药品 健康普通级 SD 大鼠 33 只,体质量 220 ~ 250 g,雌雄不限,雌鼠无孕,由广州中医药大学实验动物中心提供。LPS 为 Sigma 产品;兔源大鼠 nNOS 单抗、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒,由武汉博士德生物工程有限公司提供。牛珀至宝微丸由江西中医学院热病研究室提供(批号:9901),主要成分为水牛角、琥珀、玳瑁、麝香、牛黄、朱砂、血竭、藏红花、大黄、石菖蒲、郁金等,将微丸溶于水,制备成含生药量 2 mg/ml 的口服液,根据成人日服药量折算成大鼠灌胃剂量为 20 mg/kg。

1.2 分组及处理措施 SD 大鼠随机分成正常对照组、模型组、牛珀至宝微丸组,每组 11 只。牛珀至宝微丸组灌胃牛珀至宝微丸悬溶液,20 mg/kg,2 次/d。牛珀至宝微丸组用药 7 d 后与模型组一同进行造模。

1.3 造模及标本制备 参照文献^[7]。动物于造模前禁食 12 h,自由饮水,造模时腹腔注射 10% 水合氯醛 0.3 ml/kg 麻醉,分离右颈总动脉,插 PE50 管,BL-410 生理仪观察血压变化。待血压稳定 10 ~ 20 min 后记录正常对照组、模型组、牛珀至宝微丸组血压分别为(13.5 ± 0.5)、(13.7 ± 0.3)、(13.9 ± 0.6) kPa。正常对照组不作处理,其余二组于尾静脉注射 LPS 1.5 mg/kg,腹腔注射 D-GalN

100 mg/kg。注射 LPS 后 15 min,模型组和牛珀至宝微丸组血压下降至(9.1 ± 1.0) kPa,表明内毒素休克模型造模成功。对照组注射等量生理盐水。各组造模 6 h 后,处死动物,开胸,经升主动脉插管,先用生理盐水 150 ml 冲去血液,继而灌注含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.4)350 ml,注毕立即取脑置于相同的新鲜灌注液固定至组织块沉底,再取材,梯度乙醇脱水,二甲苯透明、浸蜡、包埋,石蜡切片,片厚 10 μm。

1.4 nNOS 免疫组化反应 用 SABC 法。(1)先烤片,恒温烤箱内 60 放置 1 h;(2)脱蜡,梯度酒精脱水,PBS 洗 10 min × 3 次;(3)新鲜 3% H₂O₂ 中 10 min 灭活内源性过氧化物酶,双蒸水洗 10 min × 3 次;(4)切片置于 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中进行微波抗原修复,25 min;(5)冷却后,滴加抗原修复液 30 min,双蒸水洗 10 min × 3 次;(6)滴加正常山羊血清 60 min,不洗,甩去多余液体;(7)滴加兔抗鼠 nNOS 一抗(1:2 000),室温下(25) 孵育 1 h,再 4 过夜,PBS 洗 10 min × 3 次;(8)滴加生物素化山羊抗兔 IgG,室温下 60 min,PBS 洗 10 min × 3 次;(9)滴加试剂 SABC,室温 60 min,PBS 洗 15 min × 4 次;(10)DAB 显色,室温下 20 min,双蒸水多次洗涤;(11)脱水,透明,中性树胶封片。

免疫组化染色对照:同一组切片中,分别用正常山羊血清和 PBS 代替 nNOS 一抗作孵育,其余步骤同上,用以检查 nNOS 免疫反应的特异性。

1.5 病理组织观察 取免疫组化反应阳性切片的相邻切片苏木素和伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色进行病理观察。

1.6 统计学方法 每只动物随机取 5 张 nNOS 阳性细胞染色切片,在光学显微镜下 (× 20) 对每张切片阳性细胞进行计数,取其平均值,所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠不同脑区 nNOS 表达 各组大鼠不同脑区 nNOS 阳性细胞数见表 1。

2.1.1 大脑皮质 nNOS 表达 nNOS 的阳性反应明显,分布于 和 层内。nNOS 免疫阳性细胞结构完整,胞体呈圆锥体、三角形,胞浆棕褐色,突起明显。正常对照组和牛珀至宝微丸组 nNOS 胞浆染色较浅,阳性细胞数较少(见图 1A);模型组 nNOS 胞浆染色较深,阳性细胞数较多(见图 2A)。

2.1.2 海马 nNOS 表达 在锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层内,可观察到体积较小的 nNOS 阳性细胞。海马分子层和齿状回多形层内有散在的、较大

的阳性细胞,胞体呈椭圆形、圆形。正常对照组和牛珀至宝微丸组 nNOS 阳性细胞数少,阳性染色较浅,突起不明显(见图 1B);模型组 nNOS 阳性细胞数多,阳性染色较深,突起明显(见图 2B)。

2.1.3 脑干网状结构 nNOS 表达 nNOS 阳性反应比较明显,多数 nNOS 阳性细胞分布于外侧区,网状纤维之间主要散布梭形阳性神经元,突起长而明显。正常对照组和牛珀至宝微丸组亦出现少数椭圆形 nNOS 阳性细胞,其突起不明显,阳性细胞数较少(见

图 1C);模型组阳性细胞数较多,胞体呈圆形,无突起,或胞体呈椭圆、三角形,突起明显(见图 2C)。

2.1.4 小脑 nNOS 表达 分子层内有散在的、体积较小的 nNOS 阳性细胞,未见突起;颗粒层内有致密的、边界不清、胞体小、无突起的 nNOS 阳性细胞;而两层之间观察到梨形、体积较大的 nNOS 阳性细胞,突起短而明显。正常对照组和牛珀至宝微丸组阳性细胞少(见图 1D),而模型组阳性细胞多(见图 2D)。

表 1 各组大鼠脑区 nNOS 阳性细胞数

Tab 1 Numbers of nNOS immuno-positive cells in brain of rats in different groups

Group	n	Number of nNOS immuno-positive cells			
		Cerebral cortex	Hippocampus	Brain stem	Cerebellum
Normal control	50	18.2 ± 1.9	9.2 ± 2.6	7.3 ± 1.7	3.3 ± 1.3
Model	50	23.7 ± 3.8*	14.6 ± 2.8*	11.4 ± 1.5*	6.4 ± 1.2*
NPZBP-treated	50	21.4 ± 1.6	12.6 ± 2.8	9.4 ± 1.5	4.1 ± 1.3

($\bar{x} \pm s$, Cells)

* $P < 0.05$, vs normal control group; $P < 0.05$, vs model group

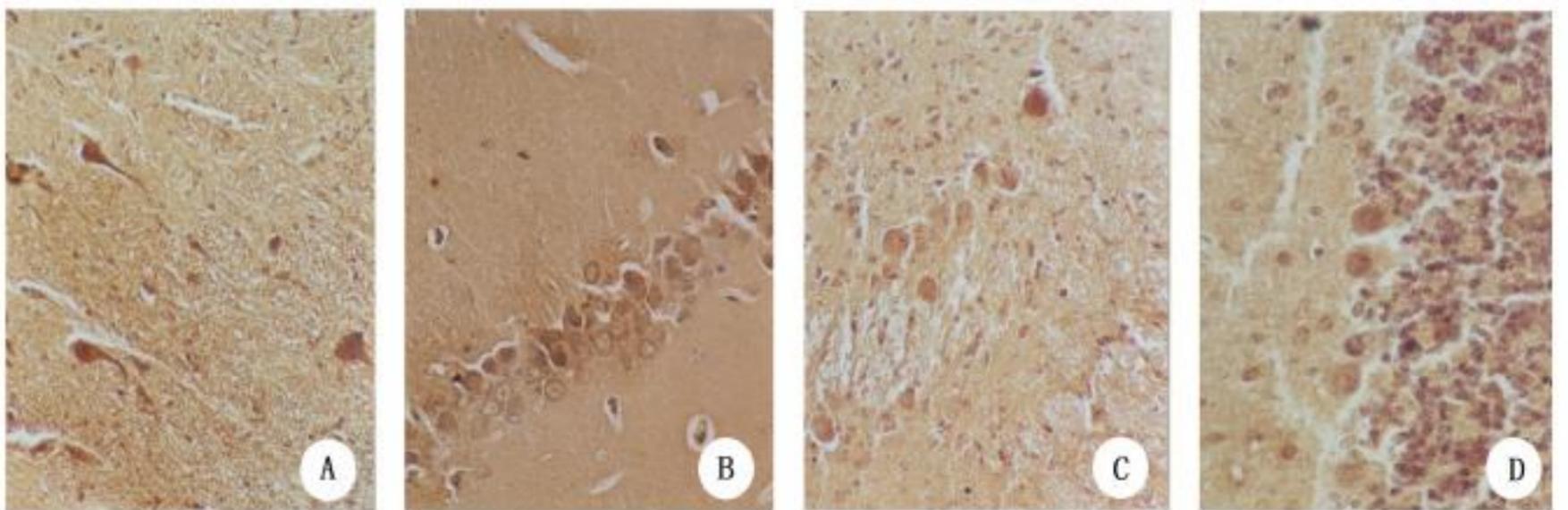


图 1 牛珀至宝微丸组大鼠不同脑区 nNOS 免疫阳性细胞 (HE 染色)

Fig 1 nNOS immuno-positive cells in different parts of the rat brain in NPZBP-treated group (HE staining)

A: Cerebral cortex (×40); B: Hippocampus (×20); C: Reticular formation of brain stem (×20); D: Cerebellar cortex (×40)

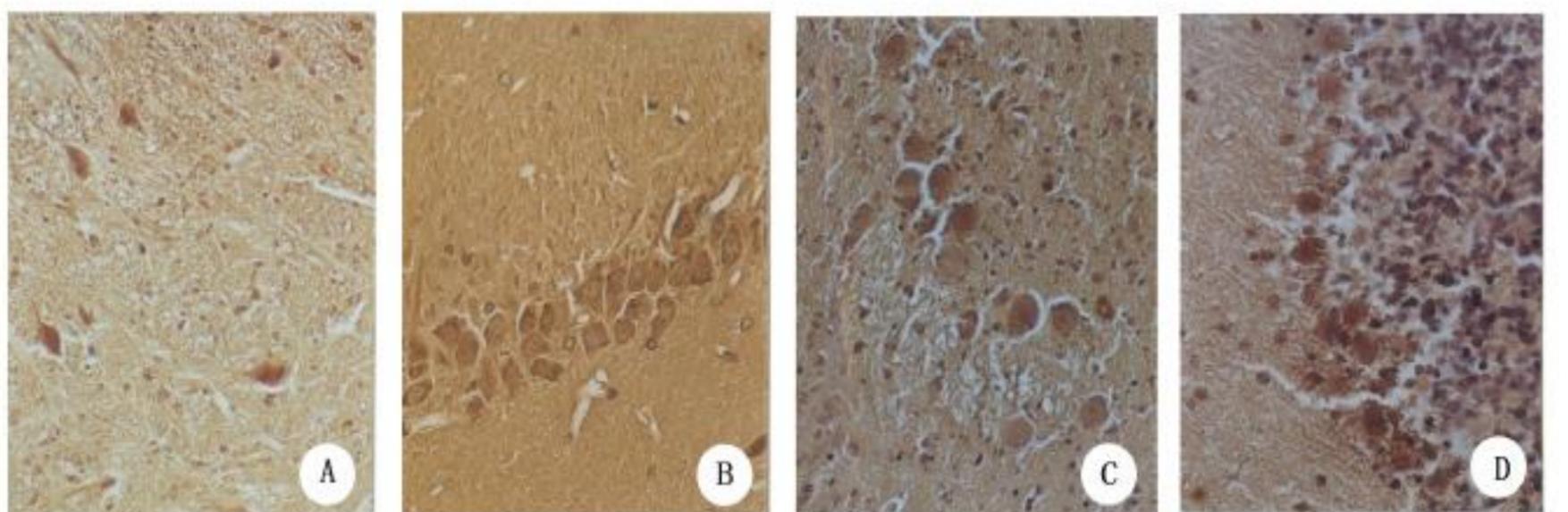


图 2 模型组大鼠不同脑区 nNOS 免疫阳性细胞 (HE 染色)

Fig 2 nNOS immuno-positive cells in different parts of the rat brain in model group (HE staining)

A: Cerebral cortex (×40); B: Hippocampus (×20); C: Reticular formation of brain stem (×20); D: Cerebellar cortex (×40)

2.2 病理组织观察 正常对照组神经元完整, 结构正常。模型组可见神经元死亡, 出现很多细胞死亡留下的空泡, 部分神经元核固缩深染, 核仁异染色体消失, 并见胶质细胞广泛增生; 而牛珀至宝微丸组则损伤较轻, 尚能观察到形态结构完整的神经元细胞。

3 讨论

本实验发现, 内毒素休克时大脑皮质、海马、脑干和小脑 nNOS 阳性神经元染色增强, nNOS 神经元异常增多, 表明内毒素休克时脑 nNOS 有过度表达。过度表达的 nNOS 起着神经毒性作用^[8]。内毒素休克早期出现线粒体损伤的广泛性和严重性, 造成神经细胞能量代谢障碍, 产生过多的氧自由基, 细胞内能量不足, 使细胞膜及肌浆网 ATP 依赖的钙运转失灵, 不能将胞浆中过多的 Ca^{2+} 摄入肌浆网或泵出细胞外, 导致细胞内 Ca^{2+} 超负荷; 而 nNOS 却对 Ca^{2+} 浓度高度敏感, 当 Ca^{2+} 浓度水平升高时, 导致 nNOS 过度表达产生过量 NO, 从而造成细胞毒性。本实验 HE 染色结果提示模型组可见神经细胞死亡。亦有实验表明, 过量 NO 可抑制线粒体功能而致神经细胞高能磷酸耗竭而死亡^[9]。目前多认为 nNOS 介导缺氧复氧早期神经毒性作用^[10]。因此, 内毒素引起的脑 nNOS 过度表达介导内毒素休克早期神经毒性作用。

牛珀至宝微丸组方是根据清代何廉臣《重订广温热论》所载犀珀至宝丹而化裁, 具有通瘀开窍、辟秽化浊的功能。为了更有利于体内吸收, 本课题组将其改为微丸剂型。何氏称至宝丹“大剂通瘀直达心窍, 又能上清脑络, 下降浊阴, 专治一切时邪内陷血分, 瘀塞心房, 不省人事”。nNOS 过度表达产生大量 NO, 可认为是中医所称的“邪毒”, 邪毒过盛, 为“亢则害”, 因此治疗上遵循“承乃制”、“损其有余”。实验发现, 牛珀至宝微丸组大鼠脑组织 nNOS 表达显著低于模型组, 表明牛珀至宝微丸可能对内毒素休克大鼠脑组织的 nNOS 过度表达有部分抑制作用, 同时 HE 染色结果提示牛珀至宝微丸可改善脑损伤。有学者证实, 抑制 nNOS 的产生对神经元具有保护作用^[11], 并发现 nNOS 基因敲除小鼠可显著抵抗神经元损伤^[12]。因此, 牛珀至宝微丸通过部分抑制“过亢”的 nNOS, 减轻 nNOS 神经毒性作

用, 从而起到对内毒素休克后脑损伤的保护作用。

[参考文献]

- 1 Glauser MP, Zanetti G, Baumgarther JD, *et al*. Septic shock: pathogenesis [J]. *Lancet*, 1991, 338 (8769): 732-736.
- 2 万兰清, 马超英, 耿 耘, 等. 开闭固脱法治疗感染性休克 106 例的临床与实验研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 1994, 10(增刊): 60-63.
- 3 Anggard E. Nitric oxide: mediator, murder, and medicine [J]. *Lancet*, 1994, 343(8907): 1199-1206.
- 4 黎 晖, 杜少辉, 李伊为, 等. 牛珀至宝微丸对内毒素休克鼠肺组织中一氧化氮合酶活性的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2002, 19(4): 305-308.
- 5 杜少辉, 周大桥, 张 悦, 等. 牛珀至宝微丸对内毒素休克时蛋白激酶 C 调控一氧化氮生成的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2002, 9(4): 189-193.
- 6 李伊为, 邓汝东, 陈东风, 等. 牛珀至宝微丸对内毒素休克肾组织诱生型一氧化氮合酶表达的影响 [J]. *解剖学研究*, 2003, 25(1): 13-15.
- 7 Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal [J]. *J Surg Res*, 1980, 29(2): 189-201.
- 8 Vincent AM, Maiese K. Nitric oxide induction of neuronal endonuclease activity in programmed cell death [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 246(2): 290-300.
- 9 Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase [J]. *FEBS Lett*, 1994, 356(2-3): 295-298.
- 10 Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia [J]. *Stroke*, 1997, 28(6): 1283-1288.
- 11 Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, *et al*. Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(12): 8419-8429.
- 12 Hara H, Huang PL, Panhian N, *et al*. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(4): 605-611.

[收稿日期] 2004-05-27 [本文编辑] 白玉金