

# 腹腔注射 LPS 对大鼠海马 nNOS 和 iNOS 表达的影响

钟 萍<sup>1</sup> 吴丹红<sup>2</sup>

(1 上海市中西医结合医院神经内科 上海 200082 2 上海市交通大学附属第三人民医院神经科 上海 201900)

**摘要** 目的: 探讨外周免疫刺激对大鼠海马 nNOS 和 iNOS 表达的影响。方法: 腹腔注射 LPS 600 $\mu$ g/kg 建立免疫激发大鼠模型, 对照组注射等量的生理盐水, 2.5h 后用 RT-PCR 技术, 观察两组大鼠海马 nNOS mRNA 和 iNOS mRNA 的表达变化, 检测 OD 值并进行统计学分析。结果: 腹腔注射 LPS 组大鼠海马的 nNOS 和 iNOS 的 mRNA 水平较对照组高。结论: 海马在大鼠机体的免疫应激反应中起重要调节作用, iNOS 和 nNOS 来源的 NO 是该调节过程中的重要信使分子。

**关键词:** “海马”; “一氧化氮合酶”; “细菌脂多糖”

**中图分类号:** R338 **文献标识码:** A

## Effects of intraperitoneal injection of LPS on expression of nNOS and iNOS in rats hippocampus

ZHONG Ping, WU Dan-hong

(Department of Neurology, Traditional and Western Medicine Integrated Hospital, Shanghai 200082, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of peripheral immune stimulation on expression of nNOS and iNOS in rats hippocampus. **Methods:** Rats of experiment group were intraperitoneally injected LPS, control rats were treated by saline. 2.5h after treatment, RT-PCR was used to observe the expression of nNOS mRNA and iNOS mRNA. After their OD value was detected, we make statistic analyses. **Results:** The level of nNOS mRNA and iNOS mRNA in LPS treated rats hippocampus were increased more obviously than that in control rats. **Conclusion:** Rats Hippocampus plays an important role in its immunomodulation process in which NO made by nNOS and iNOS acts as one of important signal molecules.

**Key words:** “LPS”; “hipcampus”; “NOS”

## 0 前言

一氧化氮(nitric oxide, NO)在海马神经免疫调节(neuroimmunomodulation)中的作用近年来越来越引人关注<sup>[1]</sup>。NO 是一种极易扩散的气体, 是神经递质及细胞内和细胞间的信使分子, 参与调节室旁核等多个免疫相关脑区的功能活动, 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化合成, NOS 包括 3 种亚型, 即神经型、诱导型和内皮型(nNOS, iNOS, eNOS)<sup>[2]</sup>。本实验利用腹腔注射细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)建立免疫激发的大鼠模型<sup>[3]</sup>, 并在转录水平观察海马内 nNOS 和 iNOS 的表达, 以探讨这两种来源的 NO 是否在海马免疫调节中的发挥作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康成年雄性 SD 大鼠 10 只, 体重 200~220g, 在较恒定温度(25℃左右)、安静、避强光的环境中饲养一周后, 随机分为实验组和对照组各 5 只。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型制作:** 实验组动物给予腹腔注射 LPS(Sigma, B7:0128) 600 $\mu$ g/kg, 对照组注射等量生理盐水。注射后, 动物存活 2.5h。

**1.2.2 RT-PCR 反应:** 剥离大鼠大脑, 分离两组大鼠双侧海马组织, 实验组和对照组分别置于 Eppendorf 管中, 匀浆。用 Trizol 一步法抽提总 RNA、定量与电泳鉴定。PCR 引物序列采用 Primer premier5 软件设计, 交由上海捷倍思基因技术有限公司合成, 以  $\beta$ -actin 作为内参。nNOS, iNOS,  $\beta$ -actin 的预期产物长度分别为: 532bp, 347bp, 462bp, PCR 上下游引物分别是, 5'-CACGGACGACACGGATAG-3, 5'-CACTGACACTTCGCACAAA-3; 5'-CACGGACGACACGGATAG-3, 5'-CACTGACACTTCGCACAAA-3; 5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3, 5'-GGTCTTACGGATGTCAACG-3。RT-PCR 采用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 的二步法进行, 即 1 $\mu$ g 总 RNA 置于 20 $\mu$ l 的逆转录反应体系中, 进行逆转录反应; 再取 3 $\mu$ l 反转录产物加入到 20 $\mu$ l 的 PCR 反应体系中, 按常规条件进行 PCR 反应。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以标准 DNA marker 为参照鉴定 RT-PCR 产物。

### 1.3 结果观察和统计方法

在紫外光下观察结果并拍照。采用 Scion Image 图像分析系统进行灰度扫描, 并以  $\beta$ -actin 校正作相对定量分析, 以计算 nNOS 的 mRNA 表达水平, 数值以光密度值(OD)表示。

## 2 结果与分析

采用 Trizol 一步法分别提取实验组和对照组 SD 大鼠双侧全部海马组织细胞的总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 可见 3 条清晰泳带, 分别是 28S 亚基、18S 亚基、5S 亚基(图 1), 表明所提取的总 RNA 完整, 无明显降解, 可用于进一步实验。

RT-PCR 反应结果中, 各泳道均可见 1 条特异性泳带, 与 DNA marker 相对照, iNOS,  $\beta$ -actin 和 nNOS mRNA 的 RT-PCR

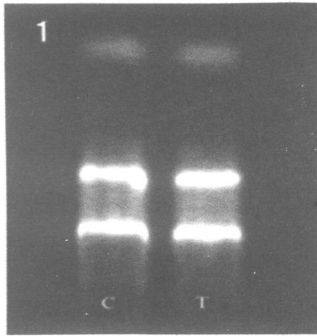
作者简介: 钟萍, (1970-), 女, 硕士, 主治医师  
研究方向: 临床神经康复。

E-mail: zphgl@163.com

(收稿日期: 2006-04-17 接受日期: 2006-05-20)

产物分别泳带介于 300bp 和 400bp、400bp 和 500bp 及 500bp 和 600bp 泳带之间,各扩增产物大小与预期相一致(图 2)。统计分析结果如表 1 所示,由此知悉, LPS 刺激组双侧海马组织的

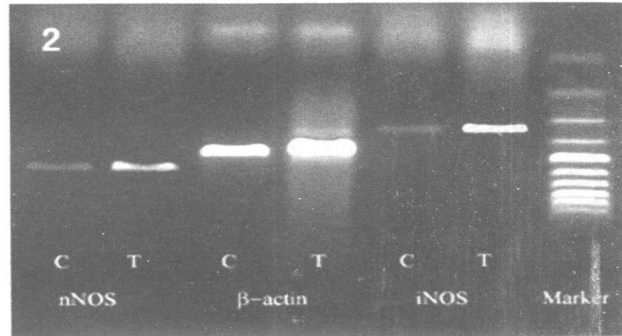
nNOS mRNA 和 iNOS mRNA 的表达水平较对照组高,且二者在两组的表达差异均具有统计学意义。



C:对照组;T:实验组(C: control group; T: experiment group)

图 1 大鼠海马组织总 RNA 凝胶电泳图

Picture 1 Electrophoresis of the rats hippocampal total rRNA



C: 对照组;T: 实验组(C: control group; T: experiment group)

图 2 大鼠海马 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Picture 2 Electrophoresis of the RT-PCR products of rats hippocampus

### 3 讨论

本实验观察结果发现腹腔注射 LPS 可以使海马的 nNOS 和 iNOS mRNA 水平升高,表明外周的免疫刺激可激活海马细胞 nNOS 和 iNOS 的基因转录,故而可能使其这两种酶合成增多,NO 水平升高,NO 可能作为一种信使分子参与海马调控免疫的活动,也可能作为一种效应分子,影响海马的功能活动。但 LPS 刺激后海马 nNOS 的表达,并非由单一因素的决定,而是刺激信号、海马内神经递质以及受体的密度、比例和亲和力等调节因素之间的平衡决定<sup>[1]</sup>。

腹腔注射 LPS 是一种外周免疫刺激方法,免疫信息是如何传递到中枢并激活海马细胞呢?这是一个错综复杂的多途径过程,其具体机制至今尚无定论,但免疫因子在这个过程中作用不容忽视。研究发现,免疫刺激可影响海马内细胞因子(如 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$ )的含量<sup>[1,4]</sup>,这些细胞因子可能作为第一信使,将免疫信息传递给第二信使,多种第二信使通路(cAMP, Ca<sup>2+</sup>, DAG-PKC, NO 等)的激活均可诱导 c-fos, c-jun, NK- $\kappa$ B 等转录因子的表达,最后调控靶基因(nNOS 和 iNOS 等)的激活<sup>[5-7]</sup>。正常状态下中枢神经系统的 iNOS 不表达,只有一定的刺激才能诱导星形胶质细胞和小胶质细胞表达<sup>[8]</sup>,在我们实验中,对照组大鼠少量表达的 iNOS,可能是腹腔注射生理盐水的刺激诱导的。

通常认为,NO 在海马中的作用是多重的,低水平生理条件模式的 NO 可能是有益的,可以增强、介导和保护神经活动;但内、外源性过高水平的 NO,可能是有害的,可造成海马神经细胞的损伤。本实验中的这种水平的刺激,很难断定产生的 NO 属于调节量还是有害量,这两种来源的作用效果是否一致。研究表明,应激条件下,糖皮质激素可反馈抑制 nNOS 的表达<sup>[9]</sup>,但不能抑制已活化的 iNOS<sup>[10]</sup>,且 iNOS 在很低浓度时就能与钙调蛋白形成牢固的复合物,这些特点决定了一旦 iNOS 被激活诱导,其活性便可持续相当长时间,从而大量、持续地生成 NO<sup>[11]</sup>。故从神经损伤的角度而言, iNOS 水平的升高对海马细胞的神经毒性作用可能更大,是海马功能损害的潜在危险之一。

### 参考文献

- [1] Lathe R. Hormones and the hippocampus [J]. *Endocrinol*, 2001, 169 (5): 205- 31
- [2] 韩济生. 神经科学纲要[M]. 第一版. 北京: 北京医科大学、北京协和医科大学出版社, 1993
- [3] Utsuyama M, Hirokawa K. Differential expression of various cytokine receptors in the brain after stimulation with LPS in young and old mice [J]. *Experimental Gerontology*, 2002, 37(2- 3): 411- 420
- [4] Nicolas PT, Dave G, Sergey EI, et al. Pro- inflammatory and anti- inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide [J]. *Brain Research Bulletin*, 2001, 54(4): 443- 453
- [5] Haas HS, Schauenstein K. Neuroimmunomodulation via limbic structures - - the neuroanatomy of psychoneuroimmunology [J]. *Prog Neurobiol*, 1997, 51(2): 195- 222
- [6] Briski, KP. Pharmacological manipulation of central nitric oxide/ guanylate cyclase activity alters Fos expression by rat hypothalamic vasopressinergic neurons during acute glucose deprivation [J]. *Chem Neuroanat*, 1999, 17(1): 13- 19
- [7] Ohki K, Yoshida K, Hagiwara M, et al. Nitric oxide induces c- fos gene expression via cyclic AMP response element binding protein (CREB) phosphorylation in rat retinal pigment epithelium [J]. *Brain Res*, 1995(1- 2), 696: 140- 144
- [8] Law A, O' donnell J, Gauthier S, et al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired long- evans rats [J]. *Neuroscience*, 2002, 112(2): 267- 275
- [9] Reagan LP, McUthlek CR, McEwen BS. Corticosterone and Phenyton reduce neuronal nitric oxide synthase messenger and expression in rat hippocampus [J]. *Neuroscience*, 1999, 91(1): 211- 219
- [10] Kinugawa K, Shimizu T, Yao A, et al. Transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in cultured neonatal rat cardiac myocytes [J]. *Circ. Res*, 1997, 81(12): 911- 921
- [11] Nishida K, Ohtay Y, Ishiguro I. Role of gastric mucosa constitutive and inducible nitric oxide synthase in the development of stress induced gastric mucosal lesion in rats. *Biochemical and biophysical research communications* [J]. 1997, 236(2): 275- 279