

兔脑内 Orexin B 免疫阳性神经元的分布定位

陈 敏 雷治海* 苏 娟

(南京农业大学 南京 210095)

摘要 :采用免疫组织化学方法研究了 10 只青紫蓝兔脑内 Orexin B 免疫阳性神经元的分布定位。结果显示 ,Orexin B 免疫阳性神经元分布于下丘脑的室旁核、背内侧核、穹隆周核、外侧区和后区以及底丘脑的未定带。以下丘脑背内侧核、穹隆周核和外侧区的阳性神经元数量较多 ,下丘脑室旁核、后区和未定带较少。表明了兔脑内 Orexin B 免疫阳性神经元的分布与 Orexin A 免疫阳性神经元的分布存在一些差异 ,提示两种 Orexin 的产生部位和生理功能可能也存在差异。

关键词 :兔 ;Orexin B 脑 ;免疫组织化学

中图分类号 :S852.1 **文献标识码** :A **文章编号** :0250-3263(2006)02-53-05

Localization of Orexin B-like Immunoreactive Neurons in Rabbit Brain

CHEN Min LEI Zhi-Hai SU Juan

(*Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China*)

Abstract :Localization of Orexin B-like immunoreactive (OXB-IR) neurons in rabbit brain was studied by immunohistochemistry. The OXB-IR neurons were observed in the hypothalamus and the subthalamus. In the hypothalamus , OXB-IR neurons were present in the paraventricular nucleus , dorsomedial nucleus , perifornical nucleus , and lateral hypothalamic area as well as posterior hypothalamic area , with the majority in the dorsomedial nucleus , perifornical nucleus and lateral hypothalamic area and the minority in the paraventricular nucleus and posterior hypothalamic area . Sparse OXB-IR neurons were also observed in the zona incerta(ZI) of the subthalamus . The results show that there are a few differences in the distribution between OXB-IR neurons and OXA-IR neurons in rabbit brain , suggesting that there are differences in synthetic sites and biological functions between Orexin A and Orexin B in the rabbit .

Key words :Rabbit ; Orexin B ; Brain ; Immunohistochemistry

Orexin 是 1998 年发现的一种神经肽 ,参与机体摄食、能量平衡、睡眠与觉醒周期、生殖、内脏活动和神经内分泌等活动的调控^[1-3]。Orexin 有 Orexin A 和 Orexin B 两种 ,均由 Orexin 前体 preproorexin 水解产生。Orexin A 为含有 33 个氨基酸的多肽 ,NH₂ 端为焦谷氨酸残基 ,COOH 端酰胺化 4 个半胱氨酸残基形成两套链内双硫键 ,分子量为 3 562 u。Orexin B 为含有 28 个氨基酸的多肽 ,为一线形肽 ,分子量 2 937 u。Orexin A 和 Orexin B 有 13 个氨基酸相

同。Orexin 通过其受体发挥作用。Orexin 受体有两种亚型 ,即 OX1R 和 OX2R ,属寡受体家族的 G 蛋白偶联受体。自 Orexin 发现以来 ,研究者用 RT-PCR、放免测定、免疫组化等方法对

基金项目 国家自然科学基金项目(No.30471248) ;

* 通讯作者 ,E-mail :leizh@njau.edu.cn ;

第一作者介绍 陈敏 ,硕士研究生 ;主要从事神经解剖学研究工作 ;现在河南信阳农业高等专科学校动物科学系工作 ;E-mail :chenmin8860@sina.com。

收稿日期 2005-09-19 ,修回日期 2006-01-17

Orexin 及其受体在多种动物的分布定位做了研究 ,Orexin 在脑内主要分布于下丘脑 ,在某些内脏器官和内分泌腺如睾丸、肠、胰和肾上腺内也存在^[4~9]。Orexin 受体的分布更为广泛。这些研究大多数是针对 Orexin A 的研究 ,有关 Orexin B 的研究较少 ;而且研究也发现尽管 Orexin B 的分布与 Orexin A 相似 ,但也存在一些差异^[4~10]。Ciriello 报道^[10]在大鼠中央杏仁核的外侧部和终纹床核前外侧亚核(紧靠内囊)处发现 Orexin B 免疫阳性神经元 ,这两处并无 Orexin A 阳性神经元分布。在蛙(*Rana ridibunda*)脑内 ,Orexin B 阳性细胞见于下丘脑视前区、视交叉上核、腹侧核和大细胞核^[11]。作者已对兔体内 Orexin A 的分布定位做了研究* ,关于 Orexin B 在兔体内的分布定位文献中未见研究报道。本实验用免疫组织化学法研究了 Orexin B 在兔脑内的分布定位 ,比较了 Orexin B 与 Orexin A 分布的差异 ,为研究 Orexin 在兔体的生理功能提供了形态学资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物 3~4 月龄健康青紫蓝兔 10 只 ,雌雄各 5 只 ,体重为 (2 ± 0.3) kg。

1.2 实验试剂 Orexin B(C-19)抗血清(SC-8071) ,Santa Cruz Biotechnology Inc 生产 ,购自上海吉泰科技有限公司。即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、水溶性封片剂和 DAB 显色试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 取材与切片 实验动物(兔)经耳静脉注射 20%氨基甲酸乙酯(5 ml/kg)麻醉后 ,剪开胸壁 ,暴露心脏 ,经左心室快速灌注 0.85% 的生理盐水(含 0.075% 柠檬酸三钠) ,同时剪开右心耳 ,灌至流出清亮液体为止(大约 200 ml) ;然后灌注用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)新鲜配制的 4%多聚甲醛固定液 ,约 2 000 ml。固定后取脑 ,置于同一固定液中后固定 4~6 h。固定好的组织块经 0.1 mol/L PBS 充分洗涤后 ,置于用 0.1 mol/L PBS 配制的 20%蔗糖溶液中 ,放置 4℃待其下沉后做冰冻切片。切片厚 20 μ m ,每

隔 10 片取 2 片 ,切片分 2 套 ,其中一套用于 Orexin B 免疫组化染色 ,另一套用于对照。切片裱贴于经多聚赖氨酸处理的载玻片上 ,室温干燥后置于 -20℃冰箱备用。

1.3.2 染色程序 切片经 37℃恒温箱干燥过夜后 ,按以下程序进行反应 :①切片经蒸馏水洗涤 5 min ;②然后用甲醇新鲜配制的 0.5% H_2O_2 室温处理 30 min ,以灭活内源性过氧化物酶 ,蒸馏水洗涤 3 次 ;③正常兔血清 37℃封闭 20 min ,甩去多余液体 ;④滴加一抗(山羊 Orexin B 抗血清) ,置湿盒中于 37℃孵育 3~4 h 或 4℃过夜 ;⑤滴加二抗(生物素标记的兔抗山羊抗体) ,37℃孵育 40 min ;⑥滴加试剂 SABC ,37℃作用 30 min ;⑦显色 将试剂盒中的 A、B、C 试剂各取 1 滴加于 1 ml 蒸馏水中 ,混匀后滴加到切片上 ,室温显色 ,显微镜下控制反应时间 ,蒸馏水洗涤 ,必要时用苏木精复染 ;⑧用水溶性封片剂封片。

免疫组织化学染色对照 :用 0.1 mol/L PBS 代替一抗 ,其余步骤不变。

1.3.3 观察 用 Olympus 双目显微镜对切片进行观察 ,兔脑核团参照猫脑立体定位图谱确定^[12]。在显微镜下观察 Orexin B 免疫阳性神经元分布。选取典型部位拍照。

2 结果

Orexin B 阳性神经元分布于兔下丘脑和底丘脑 ,阳性细胞的胞浆为棕褐色 ,细胞核未着色呈空泡状。细胞大小从 10~40 μ m 不等(图版 I :1~7)。在下丘脑 ,室旁核内 Orexin B 免疫阳性神经元数量中等 ,分布密集 ,胞体较大 ,多为卵圆形 ,突起明显 ,有 1~3 个突起(图版 I :1) ;背内侧核内 Orexin B 免疫阳性神经元数量较多 ,分布较为密集 ,以中小型细胞为主 ,胞体呈卵圆形、梭形或三角形 ,突起明显 ,为单极、双极或多极神经元(图版 I :2,3) ;下丘脑外侧区内 Orexin B 免疫阳性神经元数量较多 ,散在分布 ,

* 陈敏.兔体内 Orexin 的分布定位.硕士论文.南京农业大学,2005.

但在穹隆背外侧分布较密集(图版 I : 2 A)。穹隆周核内 Orexin B 免疫阳性神经元分布密集,胞体中等大小,呈多边形或卵圆形,突起不明显(图版 I : 2 B)。下丘脑后区内 orexin B 免疫阳性神经元数量中等,分布较为密集,胞体呈卵圆形或梭形,突起明显,多为双极神经元(图版 I : 6)。底丘脑未定带内出现少量 Orexin B 免疫阳性神经元,胞体较小,呈梭形,突起清晰可见(图版 I : 7)。

对照实验仅见背景染色,未发现阳性神经元分布(图版 I : 8)。

3 讨 论

3.1 关于 Orexin B 在脑内的分布定位 关于 Orexin 的分布定位已有很多文献报道,但对 Orexin B 的研究较少,文献中未见有关兔 Orexin B 分布定位的报道。本实验用免疫组化法研究了兔脑内 Orexin B 的分布定位。结果表明,在兔脑内, Orexin B 免疫阳性神经元主要分布于下丘脑室旁核、穹隆周核、背内侧核和后区,在底丘脑未定带出现少量免疫阳性神经元。本实验结果与别人在大鼠和蛙上的研究基本相似,但也存在差异。Cutler 等人报道 Orexin B 阳性神经元在大鼠主要分布于下丘脑外侧区和穹隆周核^[4]。Galas 发现 Orexin B 阳性细胞在蛙脑分布于视前区、视交叉上核和下丘脑腹侧核^[11]。此外,有人在大鼠杏仁中央核和终纹床核前外侧亚核(紧靠内囊处)发现少量的 Orexin B 免疫阳性神经元^[10]。本实验在兔脑内视前区、视交叉上核、杏仁中央核和终纹床核等处未发现 Orexin B 阳性细胞存在,这表明 Orexin B 神经元在脑内的分布存在种属差异。也可能与研究的方法与使用的抗体有关,有待进一步深入研究。

3.2 关于 Orexin B 与 Orexin A 分布的差异 作者以前的研究发现, Orexin A 免疫阳性神经元分布于下丘脑的视上核、室旁核、背内侧核、穹隆周核、外侧区、前区和后区以及底丘脑的未定带*。本文在视上核和下丘脑前区未观察到 Orexin B 免疫阳性神经元存在,表明兔的 Orexin

B 与 Orexin A 分布存在一定的差异。在大鼠上的研究也是如此,如多数研究者仅在大鼠下丘脑的诸多核团发现 Orexin A 免疫阳性神经元^[2~4, 13],未在下丘脑以外的脑区观察到 Orexin A 免疫阳性神经元的存在,但 Ciriello 等人却在大鼠的杏仁中央核和终纹床核前外侧亚核发现少量 Orexin B 免疫阳性神经元^[10]。其结果也表明 Orexin B 与 Orexin A 的分布可能存在一定差异。

3.3 Orexin 的分布与功能的关系 据文献报道, Orexin 参与机体摄食、能量平衡、睡眠与觉醒周期、生殖、内脏活动和神经内分泌等活动的调控^[1~3]。本研究发现,兔 Orexin B 免疫阳性神经元主要分布于下丘脑室旁核、穹隆周核、背内侧核、下丘脑外侧区和后区以及底丘脑的未定带,这些区域与摄食、神经内分泌、睡眠等的调控有关,为理解兔 Orexin 的作用部位及生理功能提供了形态学资料。

Orexin 有 Orexin B 和 Orexin A 两种, Orexin B 与 Orexin A 的分布存在差异。Orexin 通过其受体发挥作用,其受体有 OX1R 和 OX2R 两种, Orexin B 和 Orexin A 与 OX1R 和 OX2R 的亲合力不同,这两种受体的分布存在一定的差异^[3],这也提示 Orexin B 与 Orexin A 的功能可能也存在一些差异。如有人报道将 Orexin 注入下丘脑不同的区域后, Orexin A 仅在一狭窄的区域内有效,而注射 Orexin B 无效^[3]。这些问题有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 1998 **92**(4): 573 ~ 585.
- [2] Voisin T, Rouet-Benzineb P, Reuter N, *et al.* Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci* 2003 **60**(1): 72 ~ 87.
- [3] 雷治海. 开胃素(Orexin)的研究进展. 畜牧与兽医,

* 陈敏. 兔体内 Orexin 的分布定位. 硕士论文. 南京农业大学, 2005.

- 2003, **35**(8):40~43.
- [4] Cutler D J, Morris R, Sheridhar V, *et al.* Differential distribution of Orexin-A and Orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides*, 1999, **20**(12):1455~1470.
- [5] 李庆梅, 雷治海, 陈敏等. 猪下丘脑开胃素 A 的分布定位. 南京农业大学学报, 2005, **28**(2):99~102.
- [6] 李庆梅, 雷治海, 陈敏等. 开胃素 A 在猪一些器官内的分布. 解剖学杂志, 2005, **28**(3):290~291.
- [7] Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, *et al.* Orexin-A in the human brain and tumor tissues of ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Peptides* 2000, **21**:565~570.
- [8] Iqbal J, Pompolo S, Sakurai T, *et al.* Evidence that Orexin-containing neurons provide direct input to gonadotropin-releasing hormone neurons in the ovine hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2001, **13**(12):1033~1041.
- [9] Ohkubo T, Tsukada A, Shamoto K. cDNA cloning of chicken Orexin receptor and tissue distribution: sexually dimorphic expression in chicken gonads. *J Mol Endocrinol*, 2003, **31**(3):499~508.
- [10] Ciriello J, Rosas-Arellano M P, Solano-Flores L P, *et al.* Identification of neurons containing Orexin-B (hypocretin-2) immunoreactivity in limbic structures. *Brain Res*, 2003, **967**(1-2):123~131.
- [11] Galas L, Vaudry H, Braun B, *et al.* Immunohistochemical localization and biochemical characterization of hypocretin/Orexin-related peptides in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*. *J Comp Neurol*, 2001, **429**(2):242~252.
- [12] Alvin L B, Edward G J. The Thalamus and Basal Telencephalon of the Cat—A Cytoarchitectonic Atlas with Stereotaxic Coordinates. Wisconsin: the University of Wisconsin Press, 1963.
- [13] Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, *et al.* Distribution of Orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res*, 1999, **827**(1-2):243~260.

图 版 说 明

兔脑内 OXB-IR 神经元的分布

1. 下丘脑室旁核内 OXB-IR 神经元; 2. 下丘脑结节区中部切面; 3. 下丘脑背内侧核内 OXB-IR 神经元; 4. 下丘脑外侧区 OXB-IR 神经元; 5. 下丘脑穹隆周核内 OXB-IR 神经元; 6. 下丘脑后区内 OXB-IR 神经元; 7. 未定带内 OXB-IR 神经元; 8. 对照实验, 以 PBS 代替一抗, 下丘脑内未见 Orexin B 免疫阳性神经元; f: 穹隆; 3V: 第三脑室。

图 2 和 8 的放大倍数为 $\times 20$, 其余图片的为 $\times 100$ 。

Explanation of Plate

Distribution of the OXB-IR neurons in rabbit brain

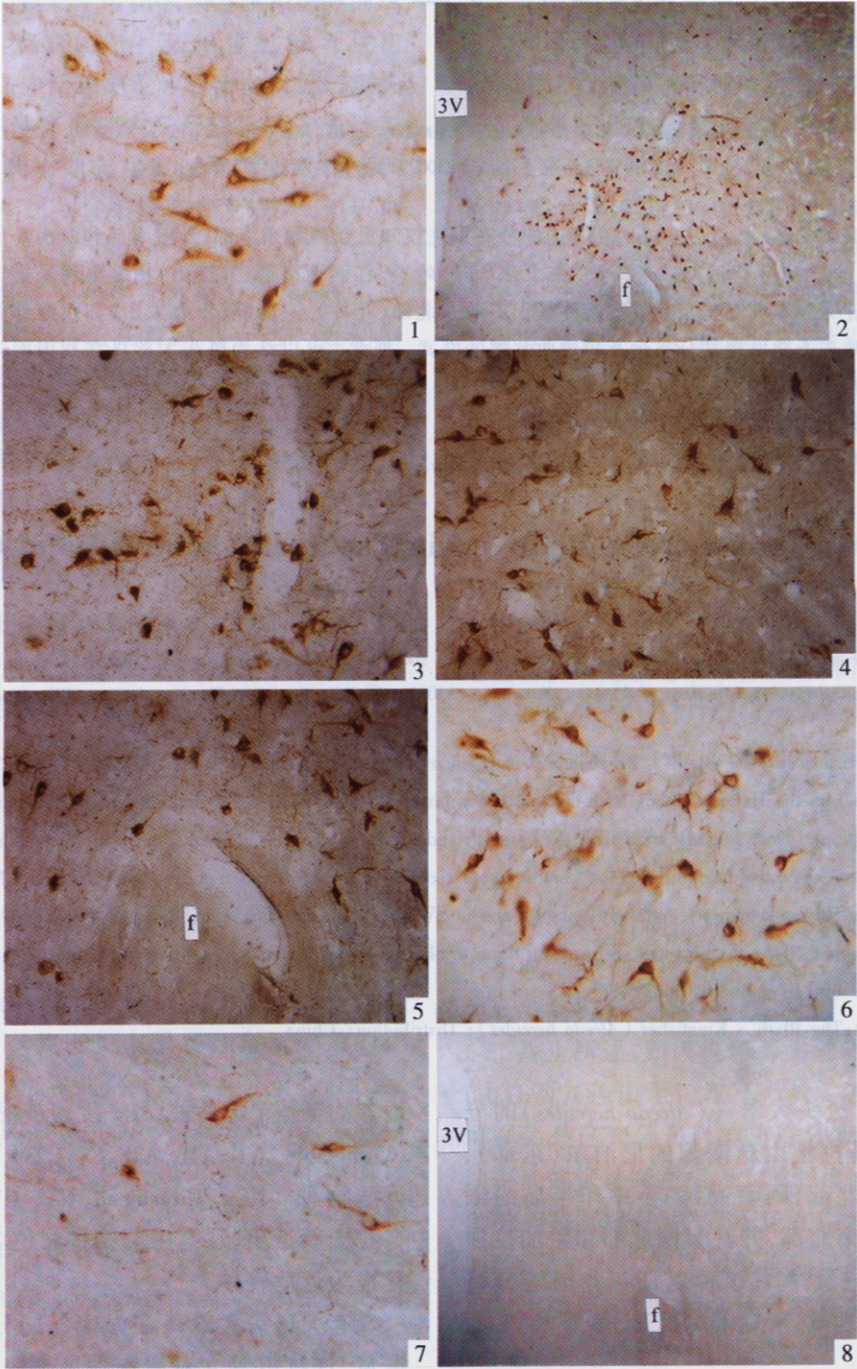
1. OXB-IR neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus; 2. transverse section of middle tuberal area of the hypothalamus; 3. OXB-IR neurons in the dorsomedial hypothalamic nucleus; 4. OXB-IR neurons in the lateral hypothalamic area; 5. OXB-IR neurons in the perifornical nucleus of the hypothalamus; 6. OXB-IR neurons in the posterior hypothalamic area; 7. OXB-IR neurons in the zona incerta; 8. control experiment, no OXB-IR neurons in the hypothalamus; f: fornix; 3V: the third ventricle.

Magnification of picture 2 and 8 is $\times 20$, and that of the others is $\times 100$.

陈 敏等:兔脑内 Orexin B 免疫阳性神经元的分布定位

图版 I

CHEN Min *et al.* : Localization of Orexin B-like Immunoreactive Neurons in Rabbit Brain Plate I



图版说明见文后