

大白鼠弓状核内生长抑素 mRNA 分布的原位杂交组化研究

印克杰* 戴晓章 周平 童鑫康

(南京医科大学人体解剖教研室 南京 210029)

摘要 本文用原位杂交组织化学技术对大鼠下丘脑弓状核内生长抑素 mRNA (SOMmRNA) 的分布进行研究, 发现生长抑素 mRNA 主要分布于弓状核的神经元胞体及近端树突内。含 SOMmRNA 的神经元可分为浓染大细胞及淡染小细胞两种类型。结果表明弓状核内某些神经元可以合生长抑素。

关键词 大鼠 弓状核 生长抑素 mRNA 原位杂交组织化学

弓状核是下丘脑内的重要核团, 含有多种神经内分泌细胞, 其神经元的轴突主要参与构成结节漏斗束, 终止于正中隆起处的垂体门脉系统, 输送促垂体激素释放因子和抑制因子, 以控制垂体前叶激素的合成与分泌^[1]。生长抑素是下丘脑合成的内分泌激素之一, 具有抑制垂体前叶生长激素释放的功能。免疫荧光和免疫细胞化学研究已证实生长抑素在下丘脑内具有广泛分布, 并参与机体内广泛的功能活动^[2-5]。但这些研究未能肯定弓状核内是否有合成生长抑素神经元的存在^[2, 6-8]。为了澄清这一问题, 本文于 1993 年 9 月—1994 年 1 月, 采用原位杂交组织化学法从分子水平研究弓状核内生长抑素转录 RNA (SOMmRNA) 的分布, 以期为神经生物学提供新的形态学资料。

1 材料和方法

成年 SO 两性大鼠 5 只, 2% 戊巴比妥钠麻醉后用含 4% 多聚甲醛、0.3% 苦味酸的磷酸缓冲液经心灌注固定, 取下丘脑, 用振动切片沿冠状面作厚 50 μ m 切片, 挑取所有弓状核平面的下丘脑切片按下法做原位杂交组织化学反

应:

1.1 预杂交 待杂交反应的切片分别通过 0.1mol/L 甘氨酸、0.4% Tritonx-100、1 μ g/ml 蛋白酶 k、0.25% 乙酸酐、2 \times SSC (柠檬酸钠氯化钠) 等溶液室温下各 15—20min。预杂交的目的是降低杂交反应后切片的背景、减弱切片的非特异性染色以及增强探针的细胞穿透性。

1.2 杂交 经预杂交后的切片, 置于含地高辛标记的生长抑素反意 cRNA 探针 (浓度为 0.5 μ g/ml) 的杂交液中 43 $^{\circ}$ C 杂交 24h。

1.3 杂交后冲洗及显色 杂交后的切片用梯度 SSC 冲洗后, 入 1:1000 的碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体溶液中 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日再次冲洗后用 NBT 和 BCIP 显色 12h。显色后贴片、透明、封片, 光镜下观察。

对照试验采用以下方法: (1) 切片未入杂交液前先用 RNA 酶孵育 1h; (2) 用生长抑素反意 cRNA 单链替代反意 cRNA 探针进行杂交

* 现在上海医科大学神经生物学教研室 200032。
收稿日期: 1994-03-10, 修回日期: 1994-07-06

反应; (3) 杂交液中不加生长抑素反意 cRNA 探针, 其余步骤相同。对照试验结果均为阴性。

上述探针、抗体及有关试剂均购自第二军医大学, 其中生长抑素反意 cRNA 探针是采用体外转录法 (*In vitro* transcription) 制备的。

2 实验结果

光镜下生长抑素 mRNA (SOMmRNA) 的杂交反应物呈蓝色或蓝黑色均质状, 主要分布在弓状核神经元的胞质及近端突起内, 胞核无杂交反应物沉积, 为色淡的圆形区, 易与胞质鉴别。未见含 SOMmRNA 杂交反应物的纤维和终末。不同平面弓状核内含 SOMmRNA 阳性神经元的数量不尽一致, 吻侧弓状核(漏斗前部平面)内 SOMmRNA 阳性神经元的数量

最多, 平均每张切片一侧约有 30—40 个, 而尾侧平面弓状核内 SOMmRNA 阳性神经元的数量较少, 每张约 10—20 个。SOMmRNA 阳性神经元有圆形、椭圆形、梭形、梨形和不规则形等多种形态。根据其大小, 染色深浅度可将之分成两类: 一类为浓染色深的大型细胞, 直径约 12—20 μm , 多集中分布于靠近第三脑室壁处; 另一类为淡染的小型细胞, 直径约 8—12 μm , 一般远离第三脑室弥散分布于弓状核内。多数 SOMmRNA 阳性神经元无明显突起, 部分神经元有 1—3 个突起, 可伸向第三脑室腔或与脑室壁平行及成一定角度 (见图 1、图 2)。弓状核内 SOMmRNA 阳性神经元向背侧及腹侧分别与下丘脑室周核及正中隆起内的 SOMmRNA 阳性神经元相延续, 围绕第三脑室周缘形成一密集细胞带 (图 1)。

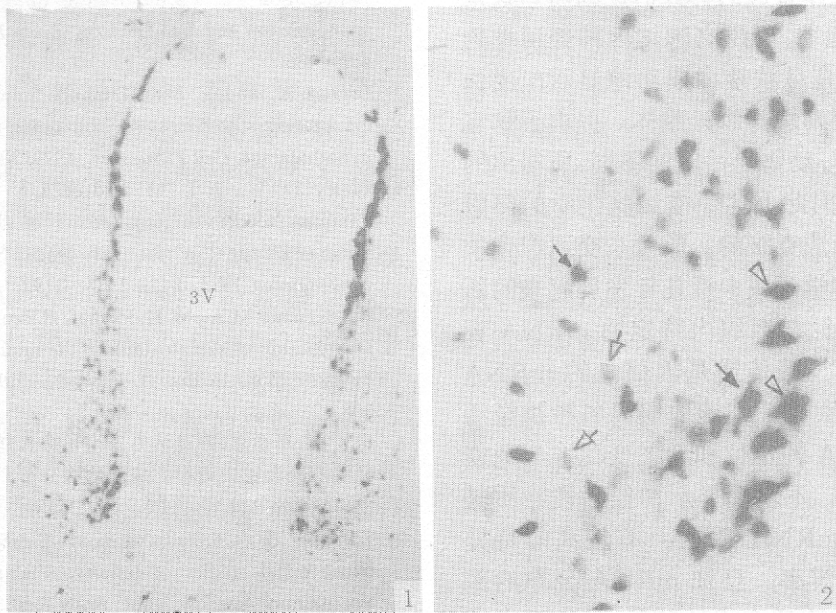


图 1 漏斗前部平面弓状核内 SOMmRNA 的分布; 2.5×10 ; 图 2 示浓染的大细胞 (∇) 和淡染的小细胞 (\downarrow), SOMmRNA 也分布于部分神经元的近端突起内 (\downarrow), 5×20 。

3 讨论

以往免疫细胞化学研究对大鼠弓状核内生长抑素样免疫反应阳性神经成分的分布有着不同的报道: 部分学者的研究结果表明生长抑素样免疫反应阳性神经元胞体主要位于视前区和

下丘脑前部的室周区, 弓状核内仅存在生长抑素样免疫反应阳性纤维和终末, 不含有阳性神经元^[2, 7, 9]; 也有一些学者在弓状核内显示出生长抑素样免疫反应阳性细胞^[8]。本文用非放射性原位杂交组化法观察到大鼠弓状核内存在大量含 SOMmRNA 的神经元, 其分布范围及数

量与上述后一类学者的研究相似,从而在分子水平证实了弓状核内确有许多神经元能够合成生长抑素,为弓状核的神经内分泌机能提供了新的结构基础。至于以往研究结果存在差异的原因可能是由于免疫细胞化学技术的局限性所致。目前免疫细胞化学法是从形态学角度研究基因表达的最常用方法,然而它所观察的是物质合成的最终产物,在许多情况下,神经活性物质如神经肽在胞体中合成后,通过轴浆流迅速运输至神经元突起的远端,此时免疫细胞化学所显示的抗原部位就并非是物质合成的真正部位,因此难以显示胞体内含量较少的某种抗原^[10],所以一些研究得出了弓状核内无生长抑素样免疫反应阳性神经元胞体的结果。但有的学者在做免疫细胞化学反应前,先给动物脑室腔内注射一定量的秋水仙碱,通过其阻断轴浆流的作用,抑制在胞体合成的神经活性物质运送至神经元突起的远端,以提高胞体内神经活性物质的含量,因而在弓状核内成功地显示出生长抑素样免疫反应阳性神经元胞体。但由于秋水仙碱用量不一样,动物存治时间不同,所得出的结果又有差异,因此上述免疫细胞化学的局限性靠其本身是无法克服的。原位杂交组织化学技术是神经生物学领域中近几年发展起来的新技术,它通过探针与组织内特定的 mRNA 在切片上进行杂交,使传递基因信息的 mRNA 可视化,从而观察单一细胞中编码各种神经活性物质的 mRNA 的定位和动态变化。与免疫细胞化学法相比,不仅能显示神经活性物质基因转录水平的 mRNA,而且具有较高的特异性、敏感性和分辨率。已知 mRNA 分布的部位即是神经活性物质合成的部位,传统观点认为 mRNA 位于胞体内,突起内不含有,而本文的研究发现 SOMmRNA 不仅分布于弓状核神经元的胞体内,而且也见于其突起内(近端树突内),说明近端树突不但可以贮存而且可以同胞体一样合成生长抑素。不过本文未发现弓状核内有含 SOMmRNA 的纤维及终末,至少可说明轴突内不能合成生长抑素。

电生理研究已发现生长抑素对脑各级水平的神经元有抑制作用,对促甲状腺素释放激素(TRH)、促黄体激素释放激素(LHRH)的释放也有抑制性影响,而这二种神经激素均可由弓状核内的神经元产生^[9]。另据朱长庚^[6]1985年对大鼠弓状核内生长抑素样免疫反应阳性结构的免疫电镜研究中,发现弓状核内存在以含生长抑素样免疫反应阳性轴突末梢为突触前成分的轴-树突触,由此可推测弓状核内的生长抑素除了抑制垂体前叶细胞分泌生长激素的经典作用外,还可能参与对其它促垂体激素释放激素的直接或间接控制。

参 考 文 献

- 1 许绍芬. 神经生物学. 上海医科大学出版社, 1990, 207.
- 2 Bennett-Clarke C., M. A. Romagnano and S. A. Joseph. Distribution of somatostatin in the rat brain: telencephalon and diencephalon. *Brain Res.*, 1980, **188**(2): 473—486.
- 3 Dierick K. and F. Van. Desande. Immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 1979, **201**: 349—359.
- 4 Finley J.C.W., J. L. Maderdrut, L.J. Roger et al. The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1981, **6**(11): 2173—2192.
- 5 Romagnano M.A., W.H. Pilcher, C. Bennett-Clarke et al. Distribution of somatostatin in the mouse brain: effect of neonatal MSG treatment. *Brain Res.*, 1982, **234**(2): 387—398.
- 6 朱长庚, 邓德忠, 卢金活等. 生长抑素样免疫反应在大鼠弓状核和正中隆起的超微结构分布. *动物学报*, 1985, **31**(4): 344—347.
- 7 Kawano H., S. Daikaku and S. Saito. Immunohistochemical studies of intrahypothalamic somatostatin-containing neurons in rat. *Brain Res.*, 1982, **242**(2): 227—232.
- 8 Ohtsuka M., S. Hisano and S. Daikaku. Electromicroscopic study of somatostatin-containing neurons in rat arcuate nucleus with special reference to neuronal regulation. *Brain Res.*, 1983, **262**(2): 191—199.
- 9 朱长庚, 邓德忠, 卢金活等. 神经免疫细胞化学. 科学出版社, 1990, 202.
- 10 张建华. 原位杂交组织化学技术在神经科学研究中的应用及其进展. *神经解剖学杂志*, 1991, **7**(11): 133—144.