

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 μm, 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% H₂O₂ 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 μm 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) :1 455 ~ 1 470.

[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) :1 033 ~ 1 041.

[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 × 20, 其余图片的为 × 100。

Explanation of Plate

Distribution of the OXB-IR neurons in rabbit brain

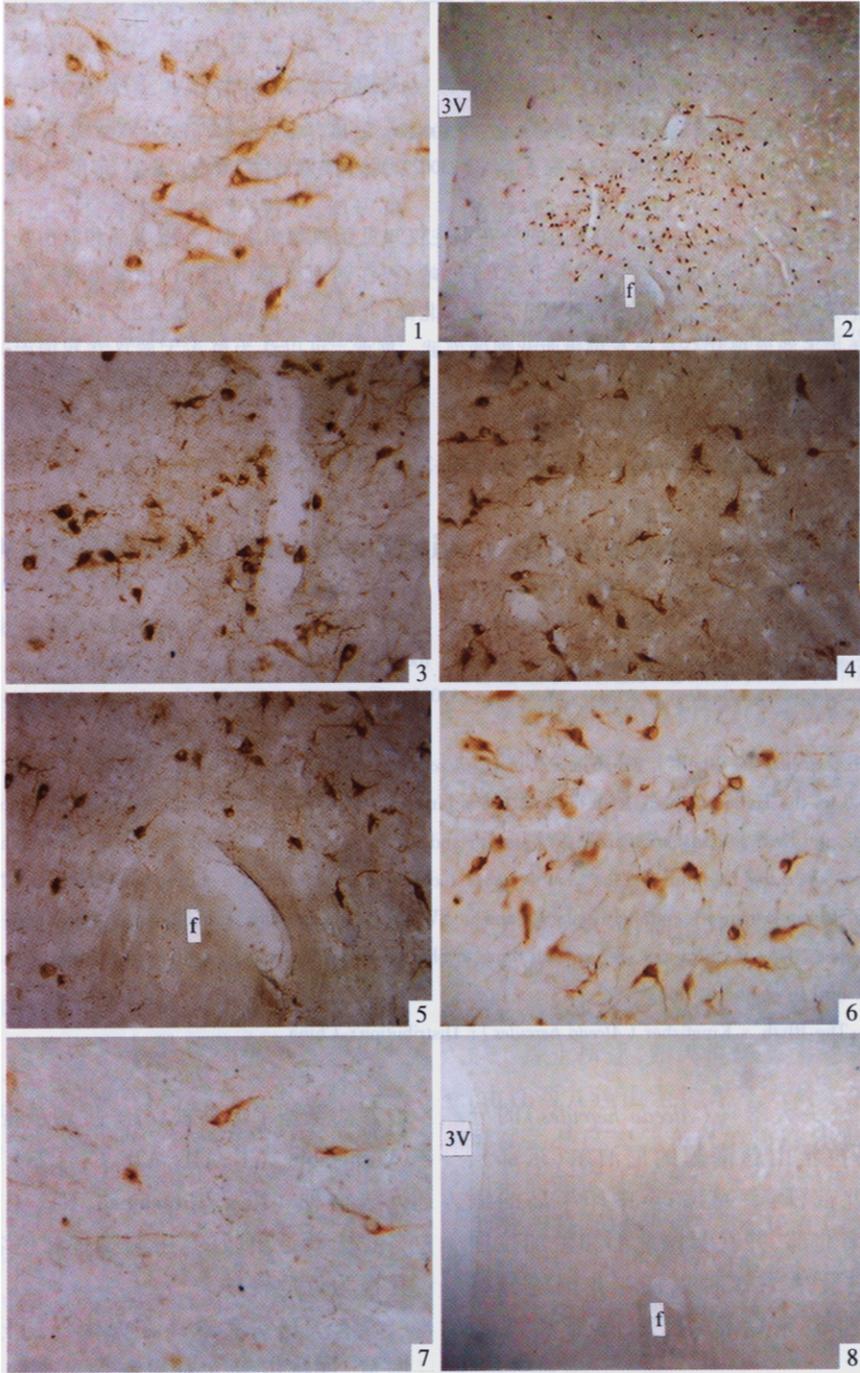
1. OXB-IR neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus; 2. transverse section of middle tuberal area of the hypothalamus; 3. OXB-IR neurons in the dorsomedial hypothalamic nucleus; 4. OXB-IR neurons in the lateral hypothalamic area; 5. OXB-IR neurons in the perifornical nucleus of the hypothalamus; 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 × 20, and that of the others is × 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