

prepro-orexin 细胞及其神经纤维在致病模型大鼠中的变化 *

陈福顺 王 卓 王湘庆 郎森阳[△]

(解放军总医院神经内科 北京 100853)

摘要 目的:研究癫痫模型大鼠中 prepro-orexin 及其神经纤维在不同时间点的变化情况,以阐明 prepro-orexin 在癫痫发生中的作用,深化癫痫的发病机制。方法:本研究采用海人酸腹腔注射诱发大鼠癫痫发作,并分别于癫痫终止后 8 小时、1、3、7 天和慢性复发时间点行免疫组化方法检测 prepro-orexin 免疫反应阳性细胞数及其神经纤维的变化情况。结果:prepro-orexin 免疫阳性细胞的分布主要在外侧下丘脑和穹隆周围核,在海马、大脑皮层及其他大脑组织中并未检测到,各组之间 prepro-orexin 阳性细胞数进行方差分析表明其差异并不显著, $P>0.05$,而其免疫阳性神经纤维主要分布在下丘脑、丘脑室旁核及海马,数量稀少。结论:大鼠致痫后,随着时间的推移,prepro-orexin 免疫阳性细胞总体减少,但未具有统计学意义,但并不能完全认为其与癫痫发作无关,而其免疫反应神经纤维稀少。

关键词 颞叶癫痫;Prepro-orexin;大鼠;下丘脑

中图分类号 Q95-3 R742.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)04-619-04

The Changes of Theprepro-Orexin Cells and its Nerve Fibers in the Rat Epilepsy Model*

CHEN Fu-shun, WANG Zhuo, WANG Xiang-qing, LANG Sen-yang[△]

(Department of Neurology, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the changes of the prepro-orexin and its nerve fibers in the rat epilepsy model at different time points. Methods: Seizures were induced by intraperitoneal injection of kainic acid. The changes of the prepro-orexin immunoreactive cells and nerve fibers were detected by immunohistochemistry at 8 hours, 1, 3, 7 days and chronic relapsing time after the termination of epilepsy respectively. Results: Prepro-orexin immunoreactive cells distributed mainly in the hypothalamus and perifornical nuclei, and were not detected in the hippocampus, cerebral cortex and other brain tissues. Its immunoreactive nerve fibers distributed sparsely in the hypothalamus paraventricular thalamic nucleus and the hippocampus; Conclusion: The overall reduction of the prepro-orexin immunoreactive cells is not statistically significant, but can't be fully considered that they have nothing to do with the seizure. And their immunoreactive fibers distributed sparsely.

Key words: Temporal lobe epilepsy; Prepro-orexin; Rat; Hypothalamus

Chinese Library Classification (CLC): R742.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)04-619-04

前言

癫痫是最常见的神经系统疾病之一,其突出的临床特点是具有反复发作性、每次发作的不可预知性(反射性癫痫除外),以及必须至少 3 年以上时间的服药治疗。极大的影响了病人的身心健康,给家庭和社会也带来了巨大的压力,因此,探讨癫痫发病机制及治疗途径已成为神经病学和神经科学急需解决的课题。癫痫的发病机制极其复杂,但最后通路是兴奋性和抑制性不平衡导致大脑神经元异常放电。GABA 是中枢神经系统最主要的抑制性神经递质,各类癫痫的发生几乎都与脑内 GABA 的功能变化有关。而 Martin G 等人证实 orexins 能增强 GABA 电流^[1], Denis B 等人实验证明 Orexin 是如何兴奋 GABA 能神经元^[2],因此,orexins 可能与癫痫有关,是一系列生化、解剖和电生理改变导致癫痫的自发性活动或癫痫持续状态。作为

orexins 水解来源的 orexin 前体—prepro-orexin(prepro-OX)^[3,4],对其研究并不多,而且目前对于 prepro-orexin 与癫痫多时间点的关系研究国内外尚未见报道。因此,本研究采用海人酸腹腔注射诱发大鼠癫痫发作,采用免疫组化方法检测 prepro-orexin 及其神经纤维在不同时间点的变化情况,以试图阐明 prepro-orexin 在癫痫发生中的关联。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重 250-300g,由中国人民解放军总医院动物中心提供。

1.2 主要仪器和试剂

冰冻切片机为 Lei CA CM1900, Olympus BX53 显微镜,海人酸(编号 KA0250)购自 sigma 公司,兔抗 prepro-orexin 抗体

* 基金项目:国家自然科学基金(30971025)

作者简介:陈福顺(1979-)男,硕士研究生,电话:18901268013, E-mail: shun96321@yahoo.com.cn

△通讯作者:郎森阳,教授,博士生导师,电话:13501145329, E-mail: langsy@263.net

(收稿日期:2011-08-12 接受日期:2011-08-31)

(编号 AB3096)为 Chemicon 公司产品,兔二步法检测试剂盒(编号 PV-6001)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组及模型制作 本实验符合卫生部实验动物使用与管理指导意见和解放军总医院实验伦理委员会的有关规定。实验大鼠分笼饲养,饲料与水充足供应,自由摄取。动物房室温 22℃,湿度 20%-30%,12h-12h 明暗交替。

先饲养适应 1 周后,按动物体重大小编号,随机化分为 6 组,每组 5 只,1 组为对照组 2-6 组为海人酸(KA)组。KA 组按腹腔注射 KA 诱发急性癫痫发作 SE 后的时间段分 5 组(时间点为发作后的 8 小时、1 天、3 天、7 天、慢性复发型组),慢性复发型组为 KA 组注射 KA 诱发 SE 成功 7 天后再用阈下剂量的 KA(4 mg/kg)制作慢性复发型癫痫模型。对照组为腹腔注射等量生理盐水。观察 KA 组大鼠出现痫性发作的时间和表现,并使痫性发作持续 30 分钟后,腹腔注射地西泮(10mg/kg)终止发作。各组于相应时间点灌注取材。

1.3.2 大鼠癫痫变化强度分级及判断标准 按 Racine RJ 描述的 5 级标准:1 级,闭眼、竖毛、胡须抖动、嗅、面部抽搐;2 级,点头运动、咀嚼运动、沿着面部肌肉痉挛;3 级,一侧前肢抬起、轻微阵挛;4 级,用后肢站起伴有两侧前肢的阵挛;5 级,站立、双侧前肢阵挛加重,失去平衡跌倒伴全身阵挛^[5]。致病成功标准为达 Racine 分级 4 级以上。

1.3.3 免疫组织化学染色 2%戊巴比妥钠(50mg/kg)将大鼠麻醉后,经左心室刺入升主动脉,剪开右心耳,先快速灌注冷 PBS 200ml 后,再灌注 4%多聚甲醛 0.1molPBS (pH 7.4,4℃)250ml,开颅取脑,固定于上述灌注液中,然后经含 15%、20%、30%蔗糖的 PBS 溶液先后梯度脱水沉底,待脑组织沉底后,取脑组织修块,根据 Paxinos 大鼠图谱定位神经核团,自对耳线 10.70mm 处开始至对耳线 2.7mm 止的范围内于冰冻切片机上行厚度为 30μm 的冠状连续切片。分别将切片置于 24 孔中,每孔为连续的 10 张,并用冻存液 -20℃ 保护切片。选取切片时每只动物选取 4 片,选取部位为对耳线 6.7mm 至 5.7mm 范围内的连续 4 孔,每孔各取 1 片。用兔抗 prepro-orexin 抗体检测 prepro-orexin 及其神经纤维在大鼠下丘脑、皮层、海马及丘脑室旁核等的表达。具体如下:(1)EDTA 95℃,15min,PBST 洗片,3min×3 次;(2)3% H_2O_2 去离子水孵育 10min,以阻断内源性过氧化物酶,PBST 洗片,3min×3 次;(3)滴加 10%羊血清,孵育 30min;(4)滴加一抗兔抗 prepro-orexin 抗体(1:100,Chemicon)4℃,48h,PBST 3min×3 次;(5)弃去一抗,PBS 洗片,3min×3 次;(6)滴加山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体,室温孵育 30min,PBS 洗片,3min×3 次;(8)DAB 显色 6min,终止反应;(9)裱片,自然晾干后,依次脱水透化,中性树胶封片。镜下观察阳性表达部位呈棕黄色。

1.3.4 图像处理 利用图像分析系统对每张免疫组织化学染色切片进行定量分析。免疫组化染色切片经 Olympus BX53 显微镜在 10 倍下观察,并以其配备的 Cannon 数码相机利用 Olympus Cell Sens Ver1.2.1 图像摄取软件摄取图像,图像像素为 5184×3456。用 Image-Pro Plus 图像分析系统定量测定每张切片相应部位的阳性细胞数及神经纤维的累积光密度(OD)

及其测量面积(area),测量面积截取每张切片相同部位丘脑室旁核处 753185μm²。

1.3.5 统计方法 数据采用均数±标准差($\bar{X} \pm S$),使用 SPSS17.0 统计软件处理数据,采用区组方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 prepro-orexin 免疫阳性细胞的变化情况

对各组脑组织的多部位免疫组化切片实验表明,prepro-orexin 免疫阳性细胞的分布主要在外侧下丘脑和穹窿周围核,在海马及大脑皮层及其他大脑组织中并未检测到。

2.1.1 prepro-orexin 免疫阳性细胞数 在对照组及致病后不同的时间点,prepro-orexin 免疫阳性细胞的数目见表 1,各区组 prepro-orexin 免疫组化染色结果见图 1 所示。

表 1 prepro-orexin 免疫阳性细胞数
Table 1 Counts of prepro-orexin containing neurons

Group	N	Mean	S
Controls	5	82.72	53.546
8h	5	79.40	47.834
1d	5	72.50	51.320
3d	5	73.43	38.682
7d	5	52.00	37.829
Chronic relapsing	5	69.25	43.043
Total	30	72.16	45.675

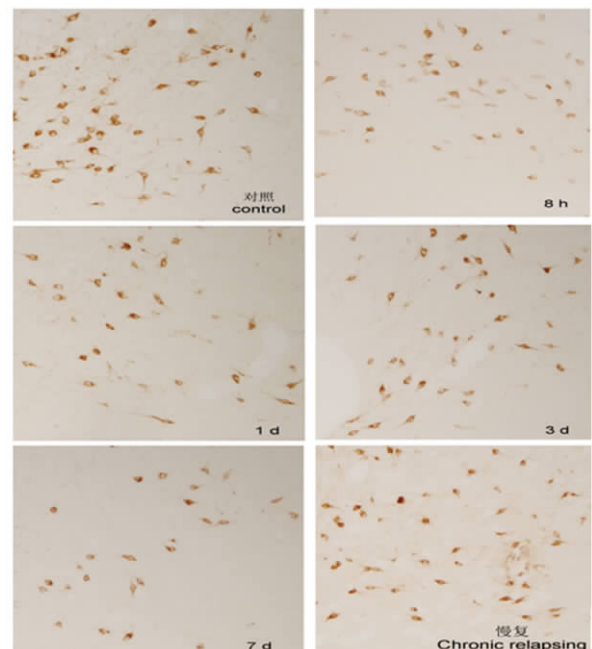


图 1 prepro-orexin 免疫组化染色片

Fig. 1 Prepro-orexin immunohistochemistry

2.1.2 prepro-orexin 免疫阳性细胞数变化 对各组 prepro-orexin 免疫阳性细胞数进行方差分析,结果如表 2 所示,各区组之间差异显著性 P 值 $P>0.05$,其差异并无统计学意义,而

prepro-orexin 免疫阳性细胞数随癫痫发作后时间的推移,其变化趋势呈现一路向下趋势,但在慢性复发后又升高,具体如图2所示。

表2 prepro-orexin 免疫阳性细胞数 ANOVA 分析

Table 2 Counts of prepro-orexin containing neurons ANOVA analysis

	Squares	df	Mean square	F	Significance
Between groups	8271.165	5	1654.233	0.784	0.564
Within the group	181571.390	86	2111.295		
Total	189842.554	91			

Note: $\alpha=0.05$, $P>0.05$.

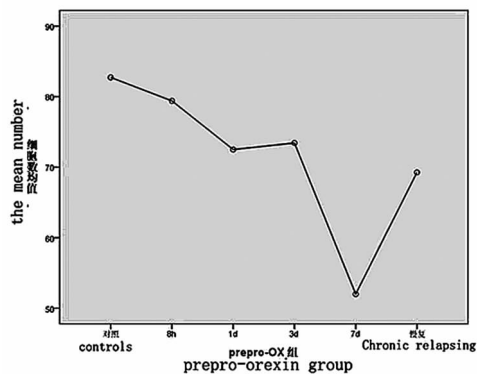


图2 prepro-orexin 免疫阳性细胞数变化曲线

Fig. 2 The counts' curve of prepro-orexin containing neurons

2.1.3 prepro-orexin 神经纤维的变化 经免疫组化染色切片检

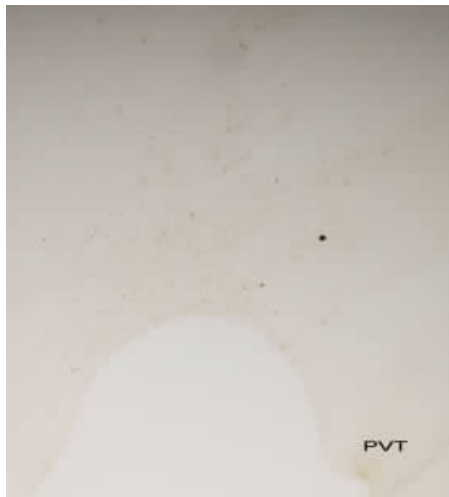


图3 对照组室旁核

Fig. 3 The paraventricular of the control group

是下降的,与本研究结果的变化趋势是相符合^[18]。prepro-orexin 免疫反应阳性神经纤维发现极少,主要分布在下丘脑、丘脑室旁核及海马,并且数量稀少。

综上实验所得结果,可推测作为 orexin-A、orexin-B 的前体 prepro-orexin 在癫痫大鼠癫痫诱发癫痫发作过程中,其阳性细胞数有变化,尽管并未具有统计学意义,但并不能完全认为其与癫痫发作无关,尤其是在慢性复发时变化较大,值得深思,同

测结果表明 prepro-orexin 免疫反应阳性神经纤维分布稀少,可在海马、室旁核、下丘脑等处检测得到。如图3、图4所示。

3 讨论

1998年2组研究人员各自发现了 orexin,其由前体 prepro-orexin 水解而来^[3,4],大鼠 prepro-orexin 由569个核苷酸序列编码,含有130个氨基酸的蛋白质,包括1个分泌信号序列和3个附加区,可在蛋白酶作用下水解为 orexin-A 和 orexin-B,其 orexin 系统与饮食^[4,6,7]、交感神经活动^[8]、以及睡眠与觉醒状态的调控有关^[9],发作性睡病也与其功能障碍有关^[9-12];在体内存在 orexins 的2个受体--OX1R、OX2R,广泛分布于中枢神经系统^[4,13,14,15,16,17]。目前对于 prepro-orexin 的研究较少,与癫痫的关系更是稀少,而关于其在癫痫发生的过程中随时间的推移,多时点下是否有变化,及其变化趋势如何更是尚未见报道。本实验对此进行了探索研究。

通过对 prepro-orexin 采用免疫组化方法检测,结果表明 prepro-orexin 阳性细胞分布在下丘脑和穹隆周围核,在海马、大脑皮层等其他处并未检测到。Morale A 等采用原位杂交技术也持了此点^[18]。各组之间 prepro-orexin 阳性细胞数进行方差分析表明其差异并不显著, $P<0.05$,这说明在整个致病发生后 prepro-orexin 阳性细胞的数量并未发生具有统计学意义的变化,但其变化曲线总体的变化是下降的,尤其在致病后的第7天出现了变化较大的减少,之后尽管致病模型大鼠慢性复发,其数量仍较致病后第7天增加,这是较为有意思的。Morales A 等人对匹罗卡品诱导的大鼠颞叶癫痫模型检测其 prepro-orexin mRNA 水平的组织浓度,发现在下丘脑处致病后1-3天其值

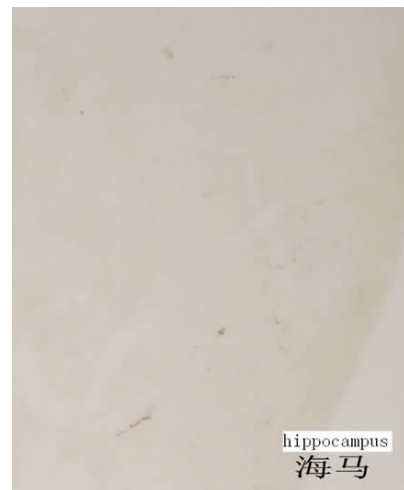


图4 对照组海马

Fig. 4 The hippocampus of the control group

时本实验也说明了 prepro-orexin 应是并非直接参与癫痫发作过程,而是可能是先要分解为 orexin-A、orexin-B 之后再起作用,此推论有赖于对 orexin 的进一步实验中以证实。

致谢

感谢协和医科大学左萍萍老师及其课题组诸位老师的帮助与指导。

参考文献(References)

- [1] Martin G, Fabre V, Siggins GR, et al. Interaction of the hypocretins

- with neurotransmitters in the nucleus accumbens [J]. Regul Pept. 2002,104:111-117
- [2] Burdakov D, Liss B, Ashcroft FM. Orexin excites gabaergic neurons of the arcuate nucleus by activating the sodium--calcium exchanger[J]. J Neurosci. 2003, 23:4951-4957
- [3] de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998,95:322-327
- [4] 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[J]. Cell, 1998,92:573-585
- [5] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: Cortical areas [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1975,38:1-12
- [6] Ida T, Nakahara K, Katayama T, et al. Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats [J]. Brain Res, 1999,821:526-529
- [7] Yamada H, Okumura T, Motomura W, et al. Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000,267:527-531
- [8] Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, et al. Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats [J]. Am J Physiol, 1999, 277:R1780-R1785
- [9] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation [J]. Cell, 1999,98:437-451
- [10] Lin L, Faraco J, Li R, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene[J]. Cell, 1999,98:365-376
- [11] Nishino S, Ripley B, Overeem S, et al. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy[J]. Lancet, 2000,355:39-40
- [12] Peyron C, Faraco J, Rogers W, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains[J]. Nature medicine, 2000,6:991-997
- [13] Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, et al. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain[J]. FEBS letters, 1998,438:71-75
- [14] Greco MA, Shiromani PJ. Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats [J]. Brain research. Molecular brain research, 2001,88:176-182
- [15] Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, et al. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord[J]. Neuroscience, 2001,103:777-797
- [16] Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, et al. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain [J]. The Journal of comparative neurology, 2001,435:6-25
- [17] Cluderay JE, Harrison DC, Hervieu GJ. Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system [J]. Regul Pept. 2002,104:131-144
- [18] Morales A, Bonnet C, Bourgoin N, et al. Unexpected expression of orexin-b in basal conditions and increased levels in the adult rat hippocampus during pilocarpine-induced epileptogenesis [J]. Brain Res, 2006,1109:164-175

• 重要信息 •

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学专家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供參考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。