

大鼠蓝斑核内神经激肽 1 受体阳性神经元与 γ -氨基丁酸和 P 物质样阳性终末的联系

祁健 徐岩 赵廷宝

【摘要】 目的 观察大鼠蓝斑核内神经激肽 1 (NK1) 受体阳性神经元与 γ -氨基丁酸 (GABA)、P 物质 (SP) 样阳性终末之间的关系。**方法** 选用 250 ~ 300 g 雄性 SD 大鼠 40 只, 分别采用免疫荧光双重组织化学染色结合免疫前包埋电镜双重染色方法, 观察 GABA、SP 样阳性终末与大鼠蓝斑核内 NK1 受体阳性神经元的联系。**结果** 激光共聚焦显微镜下可见 GABA、SP 样阳性终末与 NK1 受体阳性神经元之间形成密切接触。在电镜下可见二氨基联苯胺 (DAB) 反应产物标记的 GABA 阳性纤维和终末与免疫金颗粒标记的 NK1 受体阳性神经元胞体及其树突之间形成以对称性为主的突触联系; DAB 反应产物标记的 SP 阳性纤维和终末与免疫金颗粒标记的 NK1 受体阳性神经元胞体及其树突之间形成以非对称性为主的突触联系。**结论** 蓝斑核内 GABA 和 SP 样终末与 NK1 受体阳性神经元形成密切接触, 提示蓝斑核内的 NK1 受体阳性神经元可能接受 GABA 或 SP 样阳性终末的调控。

【关键词】 蓝斑; 受体, 神经激肽 1; γ -氨基丁酸; P 物质; 大鼠

基金项目: 国家自然科学基金 (31500856); 中国博士后科学基金 (2015M572714)

Connections between the neurokinin 1 receptor-like immunoreactive neurons and the γ -aminobutyric acid- or substance P-positive axonal terminals in locus coeruleus of the rat Qi Jian, Xu Yan, Zhao Tingbao. Department of Spinal Cord Injury and Rehabilitation, the General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China

Corresponding author: Zhao Tingbao, Email: doctorzhaotingbao@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the connections between neurokinin 1 (NK1) receptor-like immunoreactive (LI) neurons and γ -aminobutyric acid- (GABA), substance P- (SP) positive axonal terminals in Locus Coeruleus (LC) of the rat. **Methods** Immunofluorescent histochemical double-staining combining double-staining of electron microscope technique was used to observe the connections between NK1 receptor-LI neurons and GABA- or SP-positive axonal terminals in 10 male SD rats (250 - 300 g). **Results** Under laser confocal microscopy, some of these GABA-, SP-LI axon terminals were observed to make close appositions with NK1 receptor-LI neuronal cell bodies and dendritic processes. Under electron microscope, some of these GABA-LI axon terminals by diaminobenzidine (DAB) were observed principally to make symmetric synapses with NK1 receptor-LI neuronal cell bodies and dendritic processes labeled with nano-gold particles. Some of these SP-LI axon terminals labeled by DAB were observed principally to make asymmetric synapses with NK1 receptor-LI neuronal cell bodies and dendritic processes labeled with nano-gold particles. **Conclusions** GABA-, SP-LI axon terminals were observed to make close appositions with NK1 receptor-LI neuronal cell bodies and dendritic processes within LC. The NK1 receptor-LI neurons within LC are regulated by the GABA or SP-positive axonal terminals.

【Key words】 Substance P; Receptors, neurokinin-1; Gamma-Aminobutyric acid; Locus coeruleus; Rats

Fund program: National Natural Science Foundation of China (31500856); China Postdoctoral Science Foundation (2015M572714)

蓝斑位于第四脑室底, 脑桥前背部, 是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 内合成去甲肾上腺素的主要部位^[1]。蓝斑能够接受来自三叉神经感觉核和脊髓背角的伤害性信息, 同时将疼痛信息投射到丘脑和皮层^[2-4], 其发出的纤维下行抑制伤害性信息的传递^[5]。蓝斑内存在大量神经激肽 1

(neurokinin 1, NK1) 受体阳性神经元, 参与伤害性信息的处理^[6]。以往的研究结果表明, NK1 受体阳性神经元接受伤害性信息并将其传递至丘脑, 在此过程中 NK1 受体阳性神经元接受来自其他脑区的调控^[7]。例如, 蓝斑可能接受来自其他脑区的 P 物质 (substance P, SP) 终末。在神经病理性模型上, 蓝斑激活 NK1 受体能够产生镇痛作用^[7]。蓝斑也可能接受 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能神经元调控^[8-9]。电生理结果表明, 给予 GABA

受体激动剂毒蝇蕈醇能够抑制蓝斑神经元的活性^[10]。上述研究结果表明,蓝斑内 GABA、SP 终末以及 NK1 受体阳性投射神经元在伤害性信息的传递和整合中起着重要的作用,但是它们之间的纤维联系尚缺乏报道。因此,本实验应用免疫荧光双重标记技术以及免疫前包埋电镜双标技术,观察 GABA、SP 样阳性终末与 NK1 受体阳性神经元之间形成的接触。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性成年 SD 大鼠 40 只,250 ~ 300 g, SPF 级,由济南军区总医院实验动物中心提供,合格证编号:20140006。实验过程中每笼饲养不超过 3 只动物,保持室内恒温(22 ~ 25 ℃)。为不干扰动物昼夜生物节律,动物室每日早 8:00 至晚 8:00 开灯,行为学实验均在早 9:00 至晚 6:00 进行。实验预先得到的济南军区总医院动物实验委员会的认可。按体质量编号,采用数字表法随机分为 4 组:第 1、2 组为免疫荧光组,第 3、4 组为电镜组。每组 10 只大鼠。

1.2 方法

1.2.1 免疫荧光染色实验的组织制备 戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔内麻醉第 1、2 组大鼠,共计 20 只。升主动脉插管用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值 7.2 ~ 7.4)150 mL 冲洗血液,用含有 4% 多聚甲醛以及 75% 饱和苦味酸的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液[phosphate buffer(PB), pH 值 7.3]500 mL 持续灌注固定,前 250 mL 快速灌注,后 250 mL 以每秒 1 滴的速度进行灌注。灌毕立即取脑,置于上述灌注液中固定 2 h,然后将脑置于含 30% 蔗糖的 0.1 mol/L PB (pH 值 7.4)中进行冰冻保护,直至组织沉底。在 DTM-1000 冰冻切片机(Kryostat 1720; Leitz, Mannheim, Germany)上行冠状切片,片厚 30 μm,放到 0.01 mol/L PBS (pH 值 7.4)中保存。所有的切片用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次。

1.2.2 免疫荧光染色 室温下,用含 20% 正常山羊血清的 0.01 mol/L PBS 封闭抗体 1 h,然后把上述方法获得的第 1、2 组切片分别放在以下混合抗体中进行孵育。(1)兔抗 GABA 抗体(1 g/mL, A2052; Sigma, St. Louis, MO)和豚鼠抗 NK1 受体抗体(1 g/mL, AB5800; Chemicon, Temecula, CA);(2)兔抗 SP 抗体(1 g/mL, AB139; Chemicon)和豚鼠抗 NK1 受体抗体(1 g/mL; Chemicon)。用含 5% 正常山羊血清、0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 稀释抗体。室温下过夜。切片在 PBS 中漂洗 3 次,放入 biotiny 结合的羊抗兔抗体(1:200; Vector, Burlingame, CA)孵育 4 h。切片在 PBS 中

漂洗 3 次,然后在 Alexa Fluor 488 结合的羊抗豚鼠抗体(1:400; Molecular Probes, Eugene, Oregon)和 Texas Red 标记 avidin D (1:200; Vector)中孵育 4 h。切片在 PBS 中漂洗 3 次,贴片,甘油封片。在激光共聚焦显微镜下观察(FV1000, Olympus)。

1.2.3 免疫前包埋电镜染色实验的组织制备 戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔内麻醉第 3、4 组大鼠共 20 只,升主动脉插管用 0.01 mol/L PBS (pH 值 7.2 ~ 7.4)150 mL 冲洗血液,用含有 4% 多聚甲醛、15% 饱和苦味酸及 0.05% 戊二醛的 0.1 mol/L PB (pH 值 7.3)500 mL 快速灌注固定,在 0.5 h 内灌注完。灌毕后立即取脑,将脑组织放入不含戊二醛的固定液中进行后固定 6 h,然后将脑置于含 30% 蔗糖的 0.1 mol/L PB (pH 值 7.4)中进行冰冻保护直至组织沉底。振动切片机低位脑干冠状切片,片厚 50 μm。所有的切片用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次。

1.2.4 免疫前包埋电镜染色 将第 3、4 组切片放入液氮,在 0.05 mol/L Tris-buffered saline (TBS, pH 值 7.3)中洗 3 次,然后将切片放入含有 20% 正常山羊血清中的 TBS 中封闭 60 min。分别放在以下混合抗体中进行孵育:(1)兔抗 GABA 抗体(1.5 g/mL)和豚鼠抗 NK1 受体抗体(1.5 g/mL);(2)兔抗 SP 抗体(1.5 g/mL)和豚鼠抗 NK1 受体抗体(1.5 g/mL)。用含 2% 正常山羊血清、0.3% Triton X-100 的 0.05 mol/L PBS 稀释抗体。室温下孵育 24 h,在 TBS 中漂洗 3 次,切片在 biotin 结合的羊抗兔血清(1:200, vector)和 1.4 nm 免疫金颗粒标记的羊抗豚鼠血清(1:50, Nanoprobes)混合液中孵育 16 ~ 18 h。此后,对切片依次进行如下处理:(1)1% 戊二醛后固定 10 min;(2)HQ Silver kit (Nanoprobes)进行 8 ~ 14 min 的银加强反应;(3)ABC Elite Kit (Vector)孵育 2 h;(4)切片在含有 0.02% 二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)和 0.003% H₂O₂的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.6)内成色 10 ~ 20 min。上述各步骤之间均用 PBS 洗片 3 次,每次 10 min。将经上述免疫组织化学双重染色的切片置于 1% 锇酸溶液固定 1 h,在含 70% 乙醇的饱和醋酸铀溶液中过夜,梯度乙醇及环氧丙烷脱水,Epon-812 平板包埋、聚合。在解剖显微镜下切取蓝斑的小块组织片,将其粘在环氧树脂柱上,超薄切片,将切片裱于覆有支持膜的单孔铜网上。枸橼酸铅染色,Philips CM-100 电镜观察、摄片。

2 结果

激光共聚焦显微镜下可观察到蓝斑内存在大量的 NK1 受体阳性神经元,且同时伴有树枝状的突起,而 GABA 和 SP 样阳性终末密集分布在蓝斑内。

蓝斑内的 NK1 受体阳性神经元多为椭圆形、梭形或不规则形,大小不等。NK1 受体样免疫反应性产物主要沿着神经元胞膜和初级树突膜分布,镜下可以观察到 NK1 受体阳性神经元的胞体与 GABA 和 SP 样阳性终末密切接触(图 1),同时 NK1 受体样阳性结构与这些终末之间的接触也可见于近端树突。在电子显微镜下,突触前结构中充满着直径 40 nm 左右的圆形突触囊泡,运用特异性 GABA 或 SP 免疫化学染色、DAB 呈色的方法,结果显示突触前终末内充满了电子高密度的 DAB 反应产物,这些并非随机排列的突触囊泡主要集中于活性区,证实该终末为 GABA 或 SP 的阳性终末。突触后结构的树突或胞体可见线粒体等,它与末梢的生物合成及膜再生有关,NK1 受体样免疫反应性产物,呈高密度的黑色圆形和椭圆形的纳米金小颗粒,分布在树突膜的表面(图 2)。可见 DAB 反应产物标记的 GABA 阳性纤维和终末与免疫金颗粒标记的 NK1 受体阳性神经元胞体及其树突之间形成以对称性为主的突触联系;DAB 反应产物标记的 SP 阳性纤维和终末与免疫金颗粒标记的 NK1 受体阳性神经元胞体及其树突之间形成以非对称性为主的突触联系。

3 讨论

蓝斑参与多种生理功能,包括对疼痛信号的处理及调节^[5]。伤害性刺激促进蓝斑去甲肾上腺素

释放增加,其后许多神经递质和受体参与蓝斑对伤害性刺激的处理^[5]。NK1 受体是 7 个跨膜的 G 蛋白偶联受体,自从抗 NK1 受体的血清研发以来,针对中枢神经系统内的 NK1 阳性神经元进行了大量的研究,主要集中在其分布^[6]、纤维联系^[11-13]和化学特性^[14]。蓝斑存在大量的 NK1 受体阳性神经元。应用免疫组织化学染色技术可以观察到 NK1 受体阳性产物主要分布在神经元和树突的胞膜上。

NK1 受体接受含有 SP 的初级传入信息^[7]。在蓝斑内含有 SP 的纤维终末主要作用于去甲肾上腺素能神经元树突的近端。行为药理学实验观察显示,在活体内局部给予 SP 能够增加蓝斑核神经元的活性并产生镇痛作用,而给予 NK1 受体抑制剂 WIN 51708 能够抑制这种作用^[7]。以往的研究表明,在伤害性刺激下,大多数 NK1 受体阳性神经元出现受体内化现象^[15]。受体内化后刺激细胞内磷脂酶 C,磷脂酶 C 催化磷脂酰肌醇生成肌醇三磷酸和二酰基甘油,之后依次导致 Ca^{2+} 和蛋白激酶 C^[15] 活化,从而引起神经递质的释放。但是它们的纤维联系还未见报道。本研究结果显示,蓝斑内 NK1 受体阳性神经元接受 SP 的传入联系,这为研究蓝斑核 NK1 受体阳性神经元处理疼痛信息的机理提供了直接的形态学证据。蓝斑主要接受来自导水管周围灰质、延脑头端腹内侧、外侧下丘脑的纤维联系^[7]。蓝斑内的 SP 纤维终末是否来自这些脑区还

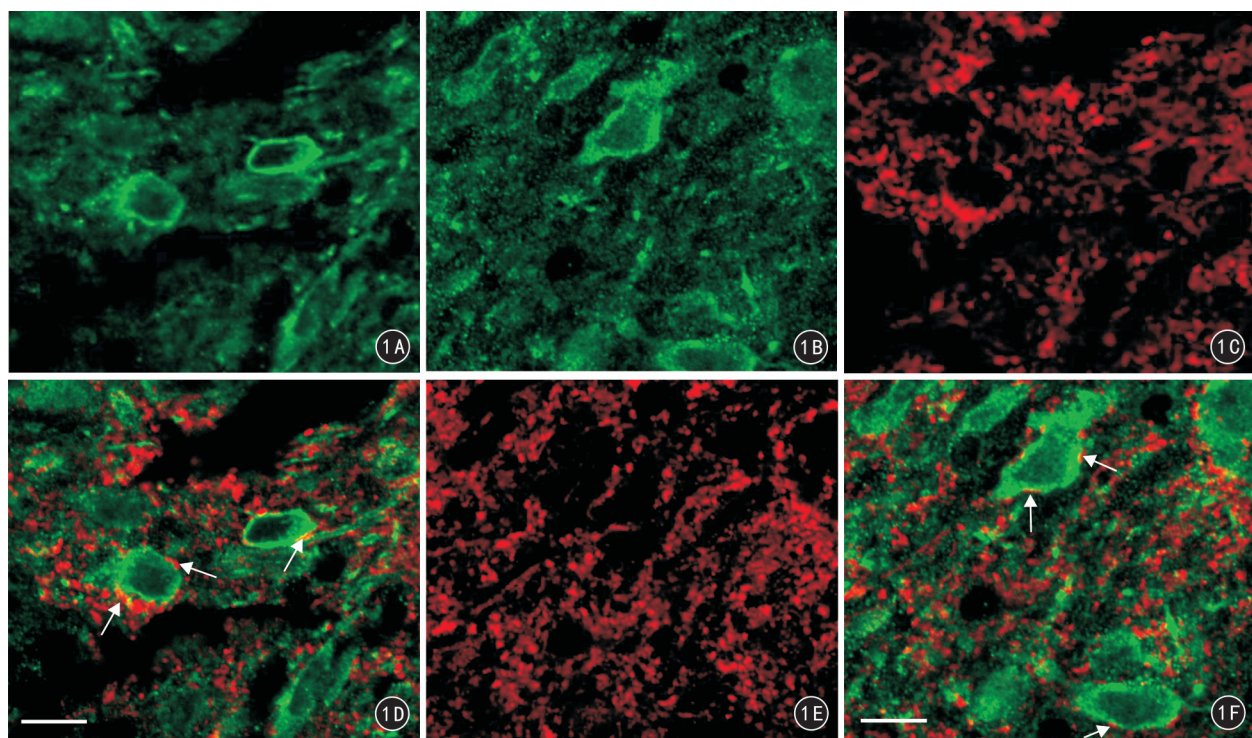


图 1 蓝斑内 P 物质(SP)、 γ -氨基丁酸(GABA)与 Neurokinin 1 受体(NK1R)的免疫荧光染色双标结果。NK1R 样免疫阳性主要分布在细胞膜表面和树突膜上(1A、1B);SP 样阳性结构为纤维和终末,纤维多串珠状,终末则散在分布(1C);GABA 样阳性结构为末端膨大的终末,大量分布在蓝斑中(1D);SP 样阳性纤维、GABA 样阳性纤维与 NK1R 阳性神经元形成密切接触(1D、1E、1F,箭);标尺 = 20 μ m (免疫荧光染色 $\times 60$)

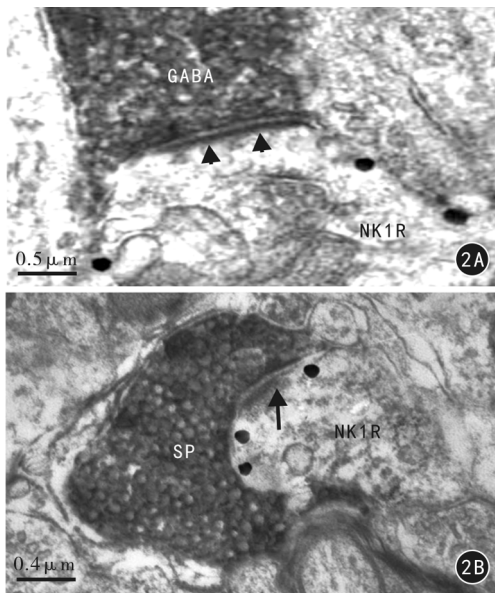


图2 蓝斑内 P 物质 (SP)、 γ -氨基丁酸 (GABA) 与 Neurokinin 1 受体 (NK1R) 的免疫电镜双标结果。蓝斑内过氧化物酶标记的 GABA、SP 阳性纤维终末 (2A、2B) 与银颗粒标记的 NK1R 样免疫阳性树突形成对称性 (箭头) 或非对称性 (箭) 的突触联系

不是很清楚。在疼痛条件下 SP 作用于 NK1 受体阳性神经元其内在的细胞途径还需要进一步研究。

GABA 是经典的抑制性神经递质,主要存在于中间神经元^[16]。本实验证明大量的 GABA 的终末和 NK1 受体阳性神经元的胞体和树突形成密切接触。这表明伤害性信息在蓝斑的传递和处理过程中,同时受到了抑制性中间神经元的调节。以往的文献报道,GABA 通过轴-轴突触产生突触前抑制,以及通过轴-体或轴-树突触产生突触后抑制效应^[17]。体外实验证明,NK1 受体阳性神经元受到 GABA 的控制^[18],给予 GABA 受体激动剂毒蝇蕈醇能够抑制蓝斑神经元的活性^[10]。综合以上结果推测 GABA 通过 GABA 受体作用于 NK1 受体阳性神经元^[19]。蓝斑内的 GABA 能终末除了来自于局部的中间神经元以外,也可以来源于上位脑结构内的其它下行抑制系统^[11]。

综上所述,在蓝斑核内 GABA 和 SP 能终末与 NK1 受体阳性神经元形成密切接触,可能在伤害性信息的传递及调控过程中发挥重要作用,但是三者之间详细的突触结构特点以及内在作用机制还需要进一步形态学和电生理学研究。

参 考 文 献

- [1] Sara SJ. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(3): 211-223. DOI: 10.1038/nrn2573.
- [2] Craig AD. Spinal and trigeminal lamina I input to the locus coeruleus anterogradely labeled with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) in the cat and the monkey[J]. Brain Res, 1992, 584(1-2): 325-328.
- [3] Voisin DL, Guy N, Chalus M, et al. Nociceptive stimulation activates locus coeruleus neurones projecting to the somatosensory thalamus in the rat[J]. J Physiol, 2005, 566(Pt 3): 929-937. DOI:10.1113/jphysiol.2005.086520.
- [4] Wenzel J, Kunde D, David E, et al. Chemoarchitecture of the Guinea pig brain (Cavia porcellus.)[J]. J Hirnforsch, 1971, 11(6): 447-466.
- [5] Szabadi E. Modulation of physiological reflexes by pain: role of the locus coeruleus[J]. Front Integr Neurosci, 2012, 6(6): 94. DOI:10.3389/fnint.2012.00094.
- [6] Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, et al. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat[J]. J Comp Neurol, 1994, 347(2): 249-274. DOI:10.1002/cne.903470208.
- [7] Muto Y, Sakai A, Sakamoto A, et al. Activation of NK₁ receptors in the locus coeruleus induces analgesia through noradrenergic-mediated descending inhibition in a rat model of neuropathic pain[J]. Br J Pharmacol, 2012, 166(3): 1047-1057. DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01820.x.
- [8] Todd AJ, Spike RC. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal Horn[J]. Prog Neurobiol, 1993, 41(5): 609-645.
- [9] Taylor BK. Spinal inhibitory neurotransmission in neuropathic pain[J]. Curr Pain Headache Rep, 2009, 13(3): 208-214.
- [10] Jin X, Cui N, Zhong W, et al. GABAergic synaptic inputs of locus coeruleus neurons in wild-type and Mecp2-null mice[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 304(9): C844-C857. DOI: 10.1152/ajpcell.00399.2012.
- [11] Li JL, Kaneko T, Mizuno N. Synaptic association of dopaminergic axon terminals and neurokinin-1 receptor-expressing intrinsic neurons in the striatum of the rat[J]. Neurosci Lett, 2002, 324(1): 9-12.
- [12] Li YQ. Substance P receptor-like immunoreactive neurons in the caudal spinal trigeminal nucleus send axons to the gelatinous thalamic nucleus in the rat[J]. J Hirnforsch, 1999, 39(3): 277-282.
- [13] Li H, Li YQ. Collateral projection of substance P receptor expressing neurons in the medullary dorsal Horn to bilateral parabrachial nuclei of the rat[J]. Brain Res Bull, 2000, 53(2): 163-169.
- [14] Todd AJ. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal Horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor[J]. Exp Physiol, 2002, 87(2): 245-249.
- [15] Polgár E, Campbell AD, Macintyre LM, et al. Phosphorylation of ERK in neurokinin 1 receptor-expressing neurons in laminae III and IV of the rat spinal dorsal Horn following noxious stimulation[J]. Mol Pain, 2007, 3(3): 4. DOI:10.1186/1744-8069-3-4.
- [16] Wang D, Li YQ, Li JL, et al. γ -Aminobutyric acid- and glycine-immunoreactive neurons postsynaptic to substance P-immunoreactive axon terminals in the superficial layers of the rat medullary dorsal Horn[J]. Neurosci Lett, 2000, 288(3): 187-190.
- [17] Mackie M, Hughes DI, Maxwell DJ, et al. Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord[J]. Neuroscience, 2003, 119(2): 461-472.
- [18] Wu SX, Wang W, Li H, et al. The synaptic connectivity that underlies the noxious transmission and modulation within the superficial dorsal Horn of the spinal cord[J]. Prog Neurobiol, 2010, 91(1): 38-54. DOI:10.1016/j.pneurobio.2010.01.005.
- [19] Kato G, Yasaka T, Katafuchi T, et al. Direct GABAergic and glycine inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by *in vivo* patch-clamp analysis in rats[J]. J Neurosci, 2006, 26(6): 1787-1794. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4856-05.2006.

(收稿日期:2015-08-30)

(本文编辑:章新生)