

[文章编号] 1000-4718(2008)03-0519-04

慢性脑缺血大鼠脑 OX₁R 表达的变化*

吕瑞娟[#], 张博爱[△], 贾延劼

(郑州大学第一附属医院神经内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] 目的: 研究慢性脑缺血时脑食欲素受体-1(OX₁R)的表达及其随缺血时间的变化。方法: 通过结扎双侧颈总动脉建立慢性脑缺血模型, 通过水迷宫对慢性脑缺血大鼠的行为学进行评价, 免疫组化法观察 OX₁R 的表达, 双标免疫荧光进一步确定 OX₁R 表达的定位。结果: 缺血 15d 时大鼠的学习记忆能力明显减退, 1 月、2 月较缺血 15d 模型组的学习记忆能力有所好转。同时, 从缺血急性期一直持续到 15d OX₁R 的表达明显增高, 1 月时 OX₁R 的表达明显低于 15d, 2 月时 OX₁R 的表达再次增高。从组织学看: 15d 时部分细胞萎缩, 1 月时大部分细胞变形萎缩, 2 月时部分细胞形态恢复正常。双标免疫荧光证实 OX₁R 确实在神经元有表达。结论: 慢性缺血性脑损伤时 OX₁R 的表达呈双相性变化, 食欲素系统可能在缺血性脑损伤与修复过程中发挥一定的调节作用。

[关键词] 脑缺血; Orexin; OX₁R; 大鼠**[中图分类号]** Q189 **[文献标识码]** A

OX₁R expression in chronic ischemic brain tissue of rats

LÜ Rui-juan, ZHANG Bo-ai, JIA Yan-jie

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China. E-mail: zhangboaidoctor@hotmail.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the orexin-1 receptor (OX₁R) expression in chronic ischemic brain tissue of rats and the change following the ischemic process. **METHODS:** The cerebral ischemic model was established by ligating double carotid arteries in rats. The behavior of the models was evaluated by water maze. The OX₁R expression was determined by immunohistochemical technique, and the location of OX₁R expression was further confirmed by double immunofluorescent staining. **RESULTS:** The intelligence of rats 15 d after ligating double carotid arteries was impaired obviously, and improved in 1 month and 2 months compared with the model in 15 d. At the same time, the OX₁R expression increased obviously from acute phase until 15 d of cerebral ischemia and decreased notably in 1 month compared to the model in 15 d, and then increased significantly for the second time in 2 months of model. From the histology, partial neurons of 15 d model rats got atrophy, and most neurons in 1 month model rats got cytomorphosis and atrophy, however partial neurons in 2-month model rats recovered normally. The OX₁R expression was confirmed in neurons definitely by double immunofluorescent staining. **CONCLUSION:** During the pathologic process of chronic ischemic injury, orexin system has two-way regulatory functions through.

[KEY WORDS] Brain ischemia; Orexin; OX₁R; Rats

食欲素(orexin)是最初发现于背外侧下丘脑的 1 类神经肽, 含 orexin-A 和 orexin-B 2 种成分^[1,2]。能与 2 个配对的 G 蛋白受体-OX₁R 及 OX₂R 相结合。目前研究较多的是 orexin-A 及 OX₁R, 近来研究发现, 急性缺血性脑损伤可以导致 OX₁R 表达增高^[3]。慢性脑缺血时 OX₁R 的表达尚未见有关报道。本实验通过结扎双侧颈总动脉建立慢性脑缺血大鼠模型, 并进行行为学评价, 免疫组化法观察各动物慢性脑缺血时脑 OX₁R 的表达变化并与急性期对照, 探讨其意义。

材 料 和 方 法

1 实验动物及主要试剂

SPF 级健康 SD 大鼠, 月龄 12-15 个月, 体重 300-350 g, 雄雌不限, 由郑州大学医学院实验动物中心提供。山羊抗多克隆 OX₁R 抗体(200 mg/L)购自 Santa Cruz 公司, SP 免疫组化试剂盒(山羊)购自北京中杉生物试剂公司, NSE 小鼠抗体购自 Sigma 公司, 兔抗山羊 CY3 荧光试剂购自武汉博士德生物试剂公司, 其余试剂均为进口分装分析纯。

[收稿日期] 2006-09-16 [修回日期] 2007-05-15

* [基金项目] 河南省科技厅资助项目(No. 511040100); 河南省卫生厅科技创新人才工程资助项目(No. 2005032)

△ 通讯作者 Tel: 0371-66862073; E-mail: zhangboaidoctor@hotmail.com

中国协和医科大学北京协和医院神经内科在读博士

2 慢性脑缺血模型建立及实验分组

参照 Ohta 等^[4]复制慢性脑缺血大鼠模型。大鼠术前 12 h 禁食,4 h 禁水。用 1% 戊巴比妥钠 (10 mg/kg) 腹腔注射麻醉,保证手术期间有自主呼吸。仰卧固定,颈前部去毛消毒后沿颈正中切开,分离出双侧颈总动脉,双重丝线结扎,术中大鼠直肠温度保持在 36.5℃ - 37.5℃,术后送至有通风和空调设备的动物房饲养。

实验动物随机分为正常组、假手术组、术后 12 h 组、24 h 组、48 h 组、15 d 组、1 月组、2 月组 6 个时点,每组均在相应时点处死,假手术组亦在相应时点处死。每组 12 只。

3 大鼠学习记忆能力测试

采用水迷宫法进行学习记忆功能的测定。各组大鼠术前先进行预训练,剔除灵活性过差的大鼠,对其余大鼠进行正式训练,直到大鼠连续 3 次从起点到达终点安全台,游迷宫所需时间小于 10 s,错误次数小于 1 次为学会。对已学会游迷宫的大鼠,分别于术后不同时点再次游迷宫,衡量大鼠记忆功能,测量大鼠自迷宫起点至安全台终点所需时间(逃避潜伏期),连测 5 次,取其平均值。

4 脑组织切片的制备和脑组织 OX₁R 的表达测定及双标免疫荧光观察

各组动物达到规定时点时,采用 10% 水合氯醛麻醉(3-5 mL/kg, ip),用 50 mL 注射器接穿刺针小心插入左心室,同时剪开右心耳,注入灭菌温生理盐水,直至流出的液体变清后,再灌注 4% 多聚甲醛 0.1 mol/L PBS (pH7.2) 约 60 mL,再断头取脑后置 4% 多聚甲醛 0.1 mol/L PBS 固定 8 h,常规固定、石蜡包埋,连续冠状切片,片厚 2 μm。

应用 SP 染色试剂盒进行免疫组化染色,操作步骤按照试剂盒说明书进行。I 抗浓度为 1:200,4℃ 过夜;滴加生物素化 II 抗,37℃ 孵育 20 min;滴加试剂 SP,37℃ 孵育 20 min,DAB 显色,镜下控制时间,光镜观察。OX₁R 在海马主要表达于 CA1 区。采用盲法由经验丰富的病理科医生镜下计数,每张切片皮层、海马 CA1 区相同部位各计数 5 个镜下视野(×400),分别计出每个视野的阳、阴性细胞数平均值。细胞膜和胞浆染色棕黄的细胞为阳性,其余细胞为阴性。

取部分模型组 15 d 切片严格按照双标免疫荧光的步骤进行 OX₁R 的双标免疫荧光染色,在激光共聚焦显微镜(Olympus, FV300)下观察 OX₁R 的表达。

5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。行为学评价用单因素方差分析,皮层及海马阳、阴性细胞数用 χ^2 检验,有统计学差异时两两比较用 4 格表的 χ^2 检验进行统计学处理。

结 果

1 行为学评价

结果表明,逃避潜伏期(s)假手术组(38.146 ± 13.232)与正常组(32.427 ± 19.206)无明显差异,且与其它各组比较的统计学差异结果一致,遂仅以正常组与其它各组比较。模型组 15 d 逃避潜伏期(96.502 ± 25.571)较正常组显著延长($P < 0.01$),说明缺血 15 d 时大鼠的学习记忆能力明显减退。随着缺血时间的延长,模型组 1 月(74.607 ± 26.543)、2 月(67.834 ± 27.350)大鼠的学习记忆能力较 15 d 模型有所好转(与模型组 15 d 均有统计学差异, $P < 0.01$),但仍未达正常组水平(与正常组均有统计学差异, $P < 0.01$)。

2 OX₁R 的表达

结果提示,OX₁R 的表达于术后 12 h 增加,48 h 达高峰,持续到 15 d,略有下降但与急性期(包括 12 h、24 h、48 h)无统计学差异,1 月时下降到正常组水平,1 月后再次升高,2 月时达模型组 15 d 水平。

表 1 各组大鼠大脑皮层、海马 CA1 区各个时点及对照组 OX₁R 表达的阳性、阴性细胞数

Tab 1 The number of positive, negative OX₁R expression at all the time point in cerebral cortex (C) and hippocampus CA1 (H)

| Group | Positive (C) | Negative (C) | Positive(H) | Negative(H) |
|----------------------|------------------------|--------------|-----------------------|-------------|
| Control | 50 ± 27 ^{△□} | 62 ± 22 | 35 ± 16 ^{△□} | 49 ± 19 |
| 12 h after operation | 82 ± 1 ^{*●} | 50 ± 4 | 65 ± 2 ^{*●} | 69 ± 1 |
| 24 h after operation | 95 ± 21 ^{*●} | 59 ± 4 | 75 ± 11 ^{*●} | 67 ± 8 |
| 48h after operation | 111 ± 1 ^{*●} | 45 ± 3 | 66 ± 11 ^{*●} | 59 ± 1 |
| Model (15 d) | 114 ± 14 ^{*●} | 57 ± 6 | 82 ± 18 ^{*●} | 67 ± 4 |
| Model(1 month) | 45 ± 22 ^{△□} | 53 ± 31 | 37 ± 16 ^{△□} | 29 ± 18 |
| Model(2 months) | 69 ± 22 ^{*●} | 47 ± 22 | 58 ± 38 ^{*●} | 40 ± 27 |

* $P < 0.01$ vs control; [△] $P < 0.01$ vs model(15 d); [●] $P < 0.01$ vs model(1 month); [□] $P < 0.01$ vs model(2 months)。

3 免疫组化观察

各组皮层的 OX₁R 表达见图 1、各组海马 CA1 区的 OX₁R 表达见图 2。皮层及海马 CA1 区 OX₁R 表达:急性期较对照组(正常组)明显增加,细胞形态较正常组稍大,说明存在神经细胞的水肿;模型组 15 d 较急性期稍少($P > 0.05$),仍较正常组明显增多($P < 0.01$),部分细胞形态较正常组稍小;模型组 1 月较急性期、模型组 15 d 表达明显减少($P < 0.01$),与正常组比较无显著差异($P > 0.05$),细胞体积缩小,胞核浓缩、深染、结构不清;模型组 2 月较模型组 1 月表达增多($P < 0.01$)且部分细胞形态恢复正常,提示 2 月时部分神经元已自身修复。

4 模型组 15 d 海马 CA1 区的双标免疫荧光结果

图3中,A:I抗为山羊抗大鼠 OX_1R 抗体,II抗为兔抗山羊 CY3 标记的荧光图片(红色);B:I抗为小鼠抗大鼠 NSE 抗体,II抗为羊抗小鼠 FITC 标记的荧光图片(绿色);C:激光共聚焦显微镜下的双标图片(黄色)。NSE 是标记神经元的特异性抗体,因此 OX_1R 确实可以表达于神经元。

讨 论

Orexin 及其受体与摄食、调节营养与能量平衡、睡眠觉醒周期、神经内分泌及行为等多方面的生理功能有关^[5]。Siegel 等^[6] 研究发现 orexin 可能与神经元的完整性有关。Irving 等^[4] 研究发现大鼠急性

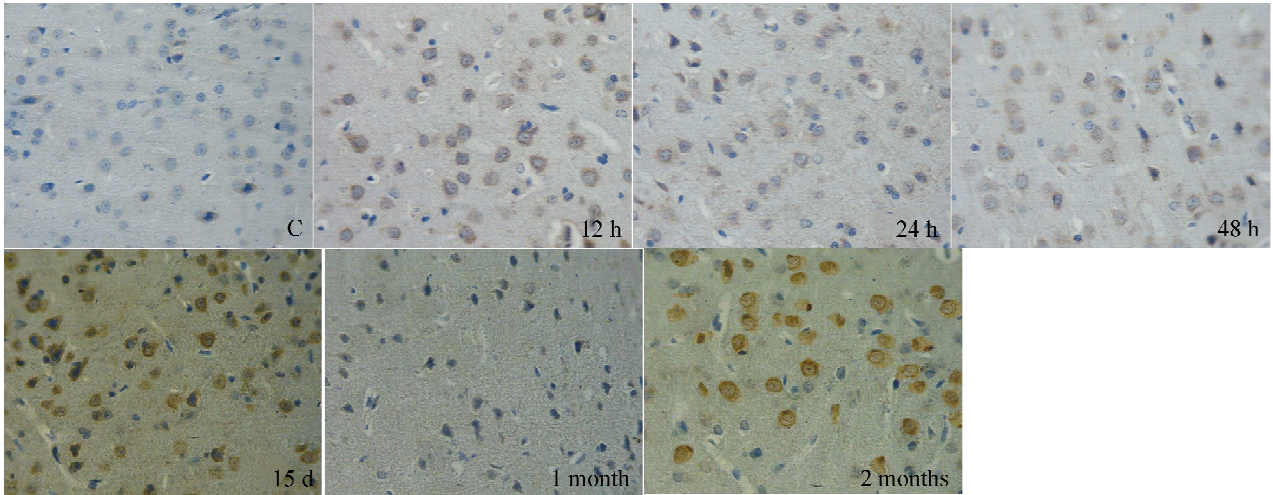


Fig 1 The OX_1R expression in chronic ischemic brain cortex of every group($\times 200$).

图1 各组皮层的 OX_1R 表达

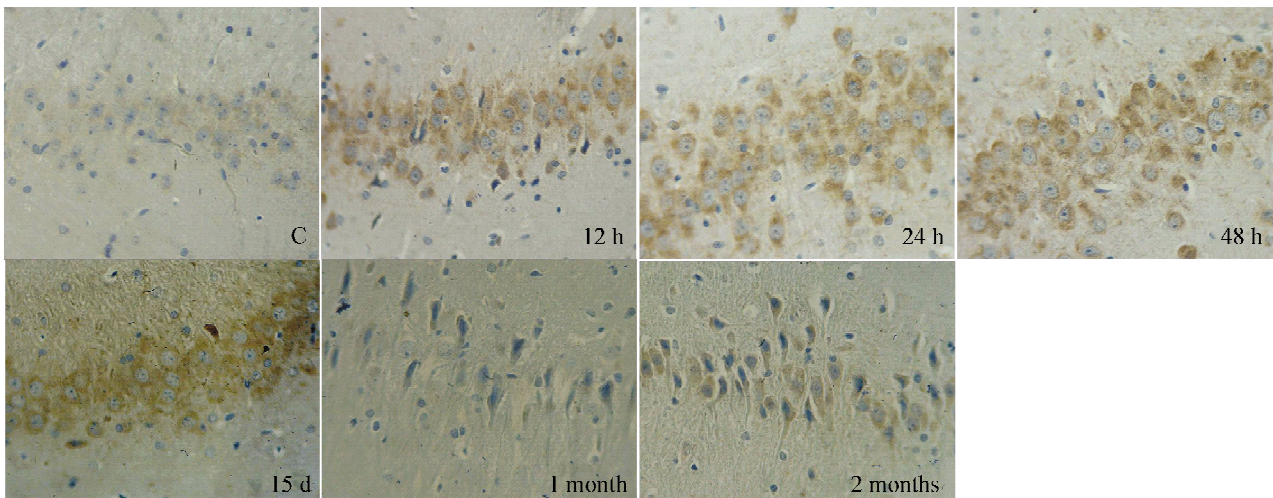


Fig 2 The OX_1R expression in chronic ischemic brain hippocamp CA1 of every group($\times 200$).

图2 各组海马 CA1 区的 OX_1R 表达

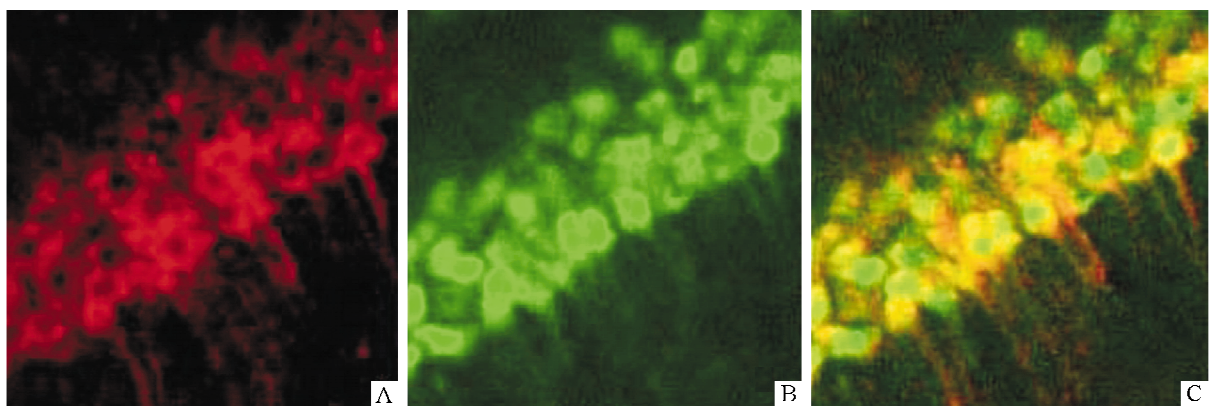


Fig 3 The OX_1R expression in chronic ischemic brain hippocamp CA1 of 15d model rats (double immunofluorescent staining, $\times 400$).

图3 15 d 模型组海马 CA1 区的双标免疫荧光

脑缺血时 OX₁R 表达增高, Nokamachi 等^[7]发现 1-2 d 时 OX₁R 的免疫活性达到高峰, OX₁R 除在神经元表达, 在外胶质细胞亦有表达。本实验发现脑缺血急性期、慢性期均有 OX₁R 表达, 与前人的研究结果一致, 并在其基础上研究了慢性脑缺血 OX₁R 表达及随缺血时间的变化, 提示 orexin 系统可能参与了慢性缺血性脑损伤的病理过程。

本研究通过水迷宫测量逃避潜伏期对慢性缺血性脑损伤模型大鼠行为学进行评价。缺血 15 d 时大鼠的学习记忆能力明显减退, 此时 OX₁R 表达明显增高; 缺血 1 月、2 月较 15 d 的学习记忆能力好转, 而缺血 1 月时 OX₁R 的表达较 15 d 时明显下降, 2 月时 OX₁R 的表达再次增高。造成这种现象的机制尚不清楚, 可能涉及以下原因。

缺血早期, 免疫和应激反应刺激 orexin - A 释放, orexin - A 促进 NPY、皮质激素释放因子 (CRF)、ACTH 升高, 进而导致糖皮质激素、肾上腺素增加。体内自主神经系统过度活化, 大量的 CRH、糖皮质激素和 NPY 对 orexin - A 产生强烈的反馈抑制作用, 加上自由基对 orexin - A 的破坏作用, 最终使 orexin - A 表达下调, OX₁R 反应性增高, 这种效应会维持一定时间。因此从缺血的急性期一直持续到 15 d OX₁R 表达均明显增高; 缺血 15 d 后, 免疫和应激反应逐渐减弱, CRF、糖皮质激素、自由基和 NPY 水平下降, orexin - A 表达开始上调, 恢复新的平衡^[8], OX₁R 表达下降; 缺血的后期 (2 月) 机体为促进自身修复下丘脑表达 OX₁R 再次增多。

从信号转导分析, orexin 系统在慢性缺血性脑损伤的病理过程中可能起双向调控的作用。缺血 15 d、1 月的改变可能与 OX₁R 介导的细胞凋亡作用有关。缺血早期 orexin - A 与 OX₁R 结合后, 通过 Gq 信号途径与磷脂酶 C (PLC) 偶联, 激活细胞膜上 PLC, 催化质膜磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂) 水解, 生成三磷酸肌醇 (IP₃) 和二酰基甘油 (DAG)。IP₃ 促进肌浆网或内质网储存的 Ca²⁺ 释放。细胞内 Ca²⁺ 超载导致细胞损伤或死亡^[9], 因此缺血 15d 时部分神经细胞萎缩; 严重的钙超载导致迟发性神经细胞损伤、凋亡, 故缺血 1 月时大部分神经细胞体积缩小, 胞核浓缩、深染、结构不清。缺血 2 月时的改变可能与 OX₁R 的神经保护作用有关。缺血的后期 OX₁R 激活了 Gs 信号途径, 激活腺苷酸环化酶, 产生 cAMP 第二信使, 继而激活 cAMP 依赖的蛋白激酶, 使 cAMP 含量增高, 促进转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白和 AKT 磷酸化, 并可能通过诱导其下游基因产物如脑源性神经生长因子、Bel - 2、c - Fos 等的表达促进缺血后神经细胞的存活、再生^[10]。

OX₁R 在脑内分布广泛, 本研究证实了大鼠的海马、皮层、下丘脑等部位均有表达, OX₁R 主要表达于

神经细胞的胞浆及胞膜, 部分胶质细胞亦有 OX₁R 表达, 众所周知胶质细胞为神经细胞的再生提供充足的营养, 提示胶质细胞的 OX₁R 表达可能有神经保护作用。本研究亦通过双标免疫荧光证实 OX₁R 的确可表达于神经元, 与 Tomoya 的研究一致。

OX₁R 表达的变化揭示了脑缺血机体损伤、修复的演变过程。缺血早期 OX₁R 表达及细胞形态的变化提示 OX₁R 可能与细胞的凋亡有关, 与 Rouet - Benzineb 等^[11]的研究一致。缺血后期 (2 月时) OX₁R 表达及细胞的改变可能与 OX₁R 的神经保护作用有关, 与近来关于 orexin 基因缺陷的鼠对持久性局灶性缺血有较高的死亡率的研究结果一致。由此看出 OX₁R 具有双向调节作用, 其具体机制仍需进一步的研究。

[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 [J]. *Cell*, 1998, 92(4): 573 - 585.
- [2] Ferguson AV, Samson WK. The orexin/hypocretin system: a critical regulator of neuroendocrine and autonomic function [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2003, 24(3): 141 - 150.
- [3] Irving EA, Harrison DC, Babbs AJ, et al. Increased cortical expression of the orexin - 1 receptor following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 324(1): 53 - 56.
- [4] Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, et al. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats [J]. *Neuroscience*, 1997, 79(4): 1039 - 1050.
- [5] Smart D, Jerman J. The physiology and pharmacology of the orexins [J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 94(1 - 2): 51 - 61.
- [6] Siegel JM, Nienhus R, Gulyani S, et al. Neuronal degeneration in canine narcolepsy [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(1): 248 - 257.
- [7] Nakamachi T, Endo S, Ohtaki H, et al. Orexin - 1 receptor expression after global ischemia in mice [J]. *Regul Pept*, 2005, 126(1 - 2): 49 - 54.
- [8] Taylor MM, Samson WK. The other side of the orexins: endocrine and metabolic actions [J]. *Am J Physiol*, 2003, 284(1): E13 - E17.
- [9] Ray SK, Fidan M, Nowak MW, et al. Oxidative stress and Ca²⁺ influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells [J]. *Brain Res*, 2000, 852(2): 326 - 334.
- [10] Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways [J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1636 - 1639.
- [11] Rouet - Benzineb P, Rouyer - Fessard C, Jarry A, et al. Orexin acting at native receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX₁ receptor suppress cell growth by inducing apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(44): 45875 - 45886.