

兴奋下丘脑腹外侧视前区对结节乳头体核 c-Fos 表达的影响及其受体途径

丁睿, 王媛, 丁正霞, 吴芳, 许奇, 张瑾, 王烈成

摘要 目的 研究兴奋下丘脑腹外侧视前区(VLPO)对结节乳头体核(TMN) c-Fos 表达的影响及其受体途径。方法 免疫组织化学方法检测 VLPO 代谢型谷氨酸受体 5(mGluR5)和 TMN γ -氨基丁酸 A 受体 $\beta 1$ 亚型($GABA_A R\beta 1$)的表达;采用脑立体定位技术,观察微量注射谷氨酸(L-Glu)兴奋 VLPO 后对 TMN c-Fos 表达变化的影响。结果 mGluR5 于 VLPO 存在阳性表达,同时 $GABA_A R\beta 1$ 于 TMN 存在阳性表达;与对照组相比,VLPO 内微量注射 L-Glu 后,大鼠的 TMN 区域 c-Fos 表达量明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 存在于 VLPO 和 TMN 的 mGluR 及 $GABA_A R$ 介导 VLPO-TMN 的通路调节,VLPO 可通过 $GABA_A R$ 抑制 TMN 神经元活动。

关键词 下丘脑腹外侧视前区; 结节乳头体核; c-Fos; 免疫组织化学

中图分类号 R 338.2+7; R 33-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1219-04

脑内的睡眠和觉醒系统分别由众多的神经核团和递质组成,彼此间形成相互作用、相互制约的神经网络。下丘脑腹外侧视前区(ventrolateral preoptic

nucleus, VLPO)与结节乳头体核(tuberomammillary nucleus, TMN)分别是睡眠和觉醒系统的调节中枢^[1]。80%的 VLPO 神经元为 γ -氨基丁酸(γ -aminohutyric acid, GABA)能和甘丙肽能,而 TMN 是脑中组胺能神经元胞体聚集的区域,这两个核团之间相互的纤维联系以及递质释放对睡眠-觉醒节律的产生与维持有何作用是近年来研究的热点。为了进一步探讨这两个脑区在睡眠和觉醒调节中介导的受体,该实验在相关理论的基础上,检测了促睡眠中枢 VLPO 脑区代谢型谷氨酸(mGlu)受体与促觉醒中枢 TMN 脑区 $GABA_A$ 受体的表达以及兴奋 VLPO 核团后检测 TMN 区域 c-Fos 表达量的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性成年 SD 大鼠 30 只,SPF 级 270~300 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。首先随机抽取用于免疫组化检测相关受体的大鼠 5 只。将剩下的大鼠随机分为对照组[人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)组,VLPO 微量注射 ACSF]、实验组[L 型谷氨酸(L-glutamic acid, L-Glu)组,VLPO 微量注射 L-Glu],实验组和对照组各 10 只。所有大鼠手术前后置于温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 和相对湿度(55 ± 5)%适宜的通风环境中单独饲养,饮水与食物充足,活动不受限制,光照周期为 12 h 黑暗+12 h 光照。

2015-03-31 接收

基金资助:国家自然科学基金(编号:81071075、81401100);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2014A116)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生理教研室,合肥 230032

作者简介:丁睿,男,硕士研究生;

王烈成,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wanglic-heng@ahmu.edu.cn

tion of MCF-7 cells and to evaluate the potential value of the A20 gene as the therapeutic target of breast cancer. **Methods** Synthesized siRNA targeted to A20 gene or negative control siRNA were transfected into MCF-7 cells by using lipofectamine 2000. CCK8 assay, Annexin V and 7-AAD double staining cytometry, Transwell assay were performed to investigate the effect of knockdown A20 mRNA expression on the proliferation, apoptosis, migration of MCF-7 cells, respectively. **Results** It can inhibit the proliferation and migration as well as promote the apoptosis in MCF-7 cells by knockdown A20 mRNA expression. **Conclusion** A20 gene plays an important role in the proliferation, apoptosis and migration of MCF-7 cells and it could be a potential therapeutic target of breast cancer.

Key words A20 gene; human breast cancer cell line MCF-7; RNA interference; cell proliferation; cell apoptosis; cell migration.

1.1.2 主要试剂 Anti-mGluR5、Anti-GABA_ARβ1 (美国 Millipore 公司); Anti-c-Fos antibody (英国 Abcam 公司); 免疫组化检测试剂盒、PBS 缓冲液 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 戊巴比妥钠 (天津市光复精细化学研究所) 临用前使用蒸馏水配置 (50 mg/kg, 腹腔注射); ACSF 成分 (mmol/L): 124 NaCl, 4.5 KCl, 1.6 NaH₂PO₄, 2.1 MgCl₂, 2.7 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 Glucose (pH = 7.4 ± 0.5); L-Glu (0.5 mol/L, 美国 Sigma 公司) 临用前使用 ACSF 配置; 多聚甲醛 (天津市光复精细化学研究所); 二甲苯 (上海苏懿化学试剂有限公司); 梯度酒精 (合肥天帆医药科技有限公司)。

1.1.3 仪器 脑立体定位仪 (深圳瑞沃德公司); ZH-GSZ 高速颅骨钻 (淮北正华公司); MODEL 828pH 计 (美国 Orion 公司); 微量注射器 (瑞士 Hamilton 公司); Leica 石蜡切片机 (德国 Leica 公司); 超纯水制备设备 (香港 Heal force 公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 动物手术 大鼠经戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔麻醉后, 将其头部固定于脑立体定位仪上; 无菌手术操作暴露颅骨并用 H₂O₂ 清洁颅骨表面。按照 Paxinos 和 Waston 大鼠脑立体定位图谱将一根不锈钢导管 (22-gauge) 插入 VLPO (AP: -0.36 mm; R: 1.30 mm; H: -7.00 mm), 导管底端距离目的核团 2 mm, 供 VLPO 内微量注射药物使用; 之后引导管以牙科水泥固定于颅骨表面, 缝合创口。术后将大鼠置于自由饮水摄食的笼中单独饲养, 并及时观察其麻醉苏醒状态和健康状况, 如发现有异常情况应及时摒弃并重新制造动物模型。

1.2.2 药物注射 大鼠麻醉苏醒恢复至正常生理状态后进行微量注射, 注射前应佩戴橡胶手套对大鼠进行适量抚摸, 以尽量消除其对给药操作的恐惧。使用微量注射器 (针尖直径 26-gauge) 通过引导管向目的核团注射药液 (实验组) 或 ACSF (对照组) 1 μl, 注射速度为 1 μl/min, 注射完毕留针 1 min 防止药液溢出, 药物注射后 2 h 取材。

1.2.3 取材 大鼠腹腔麻醉, 剪开胸腔暴露心脏; 将灌注流从心尖插入, 经左心室直至主动脉, 同时剪开右心耳, 快速注入生理盐水约 200 ml; 看到肝脏变白, 缓慢注入 4% 多聚甲醛约 500 ml, 整个灌注时间大约持续 3 h; 随后断头并用止血钳小心拨开颅骨取出脑组织, 此时脑组织应为无血色的黄白色; 再用刀

片切成约 0.5 cm 厚度, 最后放入 4% 多聚甲醛固定 6 h。

1.2.4 免疫组化检测 mGluR5、GABA_ARβ1、c-Fos 蛋白的表达 脑组织块经脱水浸蜡后制成大小合适的蜡块, 使用石蜡切片机将蜡块制成厚度为 4 μm 的切片, 90 °C 下烤箱烤片 20 min。二甲苯脱蜡梯度酒精水化, 柠檬酸溶液高温修复抗原; 冷却至室温后 3% H₂O₂ 去离子水室温孵育 20 min 以阻断内源性过氧化氢酶, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 下同; 甩干后滴加山羊血清室温孵育 30 min 封闭非特异性抗原。甩去血清, 分别滴加 mGluR5 一抗 (1:200)、GABA_ARβ1 一抗 (1:200)、Anti-c-Fos 一抗 (1:200), 用 PBS 代替一抗作为空白对照, 4 °C 过夜, PBS 冲洗; 滴加二抗 37 °C 孵育 30 min, PBS 冲洗; 辣根酶标记链霉卵白素 37 °C 孵育 30 min, 最后 DAB 显色, 自来水充分冲洗、复染、透明、封片, 镜下观察阳性细胞呈现棕黄色。

1.2.5 半定量分析 高倍镜视野 (×400) 下采集 5 个 TMN 区域图像, 使用 Image Pro Plus 6.0 分析软件处理图像, 用累计光密度 (integrated optical density, IOD) 值反映蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 mGluR5 在 VLPO 区域的表达 通过免疫组化染色后, 在高倍镜下观察, 与用 PBS 代替一抗的空白对照相比, mGluR5 在 VLPO 区域阳性表达明显, 呈现棕黄色的强染色, 定位于胞质膜, 核呈蓝色, 细胞容易辨认, 结构清晰。见图 1。

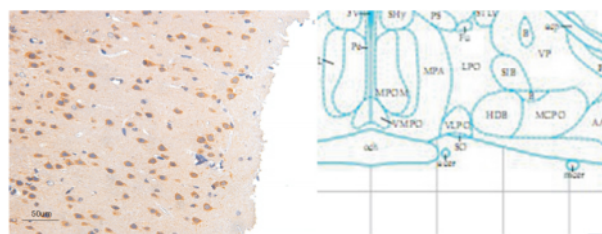


图 1 mGluR5 在 VLPO 区域的表达 ×400

2.2 GABA_ARβ1 在 TMN 区域的表达 免疫组化染色后, 在高倍镜视野下观察, 与用 PBS 代替一抗的空白对照相比, TMN 区域的 GABA_ARβ1 为棕色或棕黄色阳性表达, 定位于细胞膜, 核呈蓝色, 细胞

容易辨认,结构清晰。见图2。

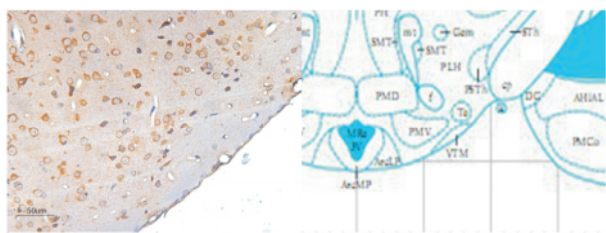


图2 GABA_ARβ1在TMN区域的表达 ×400

2.3 c-Fos 蛋白表达的变化 分别观察实验组与对照组大鼠 TMN 的 c-Fos 染色情况,各取5个视野,通过 Image Pro Plus 6.0 分析软件统计出各照片中阳性染色颗粒的 IOD 值。结果显示,与对照组(53.98 ± 2.02)相比,在 VLPO 脑区微量注射 L-Glu 后,检测到大鼠的 TMN 区域 c-Fos 表达量(21.82 ± 1.22)明显减少,IOD 值差异有统计学意义($t = 11.10$, $P < 0.01$)。见图3。

3 讨论

早在二十世纪初, von Economo 就提出视交叉前区域和下丘脑后部分别存在促睡眠和促觉醒中枢的猜想,而这一假设已被近年来的研究证实。睡眠与觉醒中枢这种“跷跷板”此消彼长相互制约的模型是被广泛接受的睡眠觉醒周期调节机制^[2]。VLPO 是目前比较认可的促睡眠调节中枢,如果损毁大鼠 VLPO 会导致持续性的觉醒增加^[3]。VLPO 向下丘脑后部 TMN 的组胺能神经元、蓝斑去甲肾上腺素能神经元、中缝背核的 5-羟色胺能神经元以及脑桥外背侧被盖核的胆碱能神经元等发出纤维投射,而这些受到投射的区域与觉醒密不可分^[4]。觉醒状态时,VLPO 神经元也会受到来自多巴胺能和去甲肾

上腺素能这样的单胺能神经元的抑制^[5]。TMN 位于乳头体吻端和视交叉尾侧所形成的下丘脑后部的第三脑室层,是组胺能神经元胞体集中存在的区域,此区域的 GABA_AR 是 VLPO 促睡眠作用的重要桥梁^[6-7]。TMN 在睡眠觉醒周期调节中扮演着至关重要的角色^[8]。此核团作为睡眠的可控开关在觉醒期间动作电位发放增强,而在非快动眼睡眠(non-rapid eye movements, NREM)和快动眼睡眠(rapid eye movement, REM)阶段动作电位发放停止^[9-10]。本实验室曾通过逆向荧光示踪技术显示 VLPO 与 TMN 间存在双向直接纤维投射联系^[11]。通过多导睡眠描记显示,VLPO 内微量注射 L-Glu 可使大鼠觉醒减少, NREM 和总睡眠时间增多,睡眠加深。而用 GABA_A 受体拮抗剂荷包牡丹碱和 L-Glu 相继分别微量注射于 TMN 和 VLPO 时,大鼠觉醒增加, NREM 和 REM 以及总睡眠时间减少^[12]。这说明用于 L-Glu 兴奋 VLPO 可引起促睡眠效应,此效应通过向 TMN 注射 GABA_A 受体拮抗剂而被抑制。本实验在前期研究的基础上,旨在探究 VLPO-TMN 通路对睡眠-觉醒调控所介导的膜受体,通过检测显示在 VLPO 脑区存在 mGluR5,同时在 TMN 脑区存在 GABA_AR。

c-Fos 蛋白是即刻早期基因 c-Fos 转录翻译的产物,是一种核内磷酸化蛋白。基础状态下 c-Fos 在中枢神经系统的水平非常低,然而各种应激状态下 c-Fos 蛋白的表达能够被瞬时快速的诱导,由于这一特性,其常被作为神经元激活的标志。有研究^[13]显示激动大鼠延髓头端基底前脑腺苷受体会增加睡眠,诱导 VLPO 的 c-Fos 表达增加。L-Glu 是中枢神经系统中重要的兴奋性神经递质,其受体分布于大脑各个区域。至今已鉴定并分离出的 mGluR 有

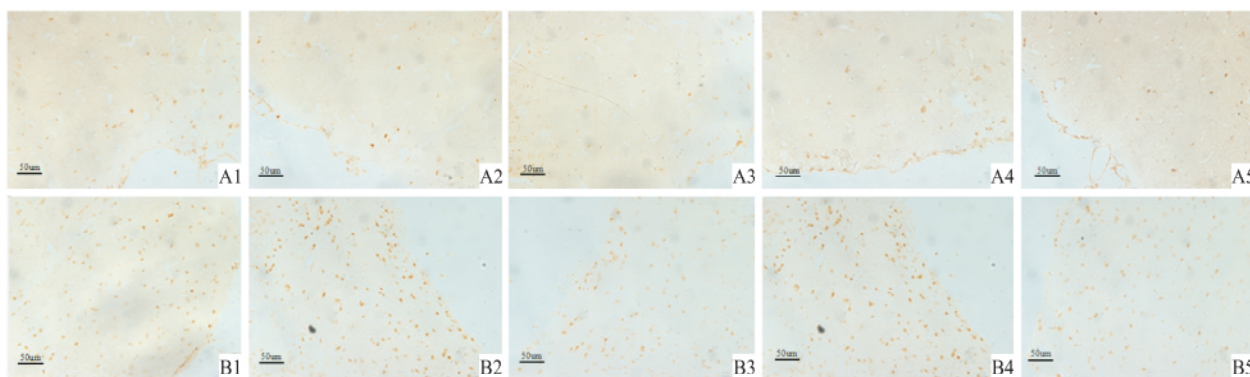


图3 TMN 区域 c-Fos 的表达 ×400

A: 实验组; B: 对照组; 1~5: 各组5个视野

8 种。研究^[14]表明 mGluR2/3 参与了大鼠睡眠觉醒的调节。本实验则通过核团内注射 L-Glu 用以激动 VLPO, 观察 TMN 脑区神经元激活状态来探究两者之间的联系以及对睡眠觉醒周期的调节作用。结果显示, VLPO 被激动后, TMN 脑区 c-Fos 的表达量明显减少, 提示 VLPO 神经元释放 GABA 对 TMN 神经元的功能活动产生了抑制性效应, 而 VLPO 的 GABA 能神经元作为 GABA 递质投射的源头正是由于 L-Glu 对其产生的兴奋作用。不难推测, 作为促睡眠中枢, VLPO 的促睡眠作用是当其神经元兴奋后释放抑制性神经递质并作用于觉醒中枢 TMN, 进而抑制 TMN 的促觉醒效应。本实验只观察了 VLPO 对 TMN 的影响, 作为觉醒中枢的 TMN 是如何发挥其觉醒调节作用需要进一步研究。

参考文献

- [1] Ko E M, Estabrooke I V, McCarthy M, et al. Wake-related activity of tuberomammillary neurons in rats [J]. *Brain Res*, 2003, 992 (2): 220 - 6.
- [2] Saper C B, Scammell T E, Lu J, et al. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms [J]. *Nature*, 2005, 437 (7063): 1257 - 63.
- [3] Vetrivelan R, Saper C B, Fuller P M, et al. Armodafinil-induced wakefulness in animals with ventrolateral preoptic lesions [J]. *Nat Sci Sleep*, 2014, 6: 57 - 63.
- [4] Chou T C, Bjorkum A A, Gaus S E, et al. Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(3): 977 - 90.
- [5] Saper C B, Fuller P M, Pedersen N P, et al. Sleep state switching [J]. *Neuron*, 2010, 68 (6): 1023 - 42.
- [6] Yanovsky Y, Schubring S, Fleischer W, et al. GABAA receptors involved in sleep and anaesthesia: $\beta 1$ -versus $\beta 3$ -containing assemblies [J]. *Pflugers Arch*, 2012, 463(1): 187 - 99.
- [7] Liu Y W, Li J, Ye J H. Histamine regulates activities of neurons in the ventrolateral preoptic nucleus [J]. *J Physiol*, 2010, 588(Pt 21): 4103 - 16.
- [8] Haas H L, Sergeeva O A, Selbach O. Histamine in the nervous system [J]. *Physiol Rev* 2008, 88(3): 1183 - 241.
- [9] Sakai K, Takahashi K, Anaclet C, et al. Sleep-waking discharge of ventral tuberomammillary neurons in wild-type and histidine decarboxylase knock-out mice [J]. *Front Behav Neurosci*, 2010, 4: 53.
- [10] Takahashi K, Lin J S, Sakai K. Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(40): 10292 - 8.
- [11] 丁丁, 丁睿, 吴芳, 等. 大鼠下丘脑腹外侧视前区和结节乳头体核的直接神经纤维投射研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2014, 49(10): 1376 - 8.
- [12] 吴芳, 张瑾, 丁睿, 等. 下丘脑腹外侧视前区通过抑制结节乳头体核大鼠睡眠觉醒的调控作用 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2014, 23(2): 97 - 100.
- [13] Scammell T E, Gerashchenko D Y, Mochizuki T, et al. An adenosine A2a agonist increase sleep and induce Fos in ventrolateral preoptic neurons [J]. *Neuroscience*, 2001, 107(4): 653 - 63.
- [14] Ahnaou A, Dautzenberg F M, Geys H, et al. Modulation of group II metabotropic glutamate receptor (mGlu2) elicits common changes in rat and mice sleep-wake architecture [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603 (1-3): 62 - 72.

The effect of c-Fos expression in tuberomammillary after exciting ventrolateral preoptic and its receptor passway

Ding Rui, Wang Yuan, Ding Zhengxia et al

(Dept of Physiology, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of c-Fos expression in tuberomammillary nucleus (TMN) after exciting ventrolateral preoptic (VLPO) and its receptor passway. **Methods** The expressions of mGluR5 in VLPO and GABA_A $\beta 1$ in TMN were determined by immunostaining. L-Glutamate (L-Glu) was microinjected into VLPO with stereotaxic technique to observe the changes of c-Fos expression in TMN. **Results** Positive protein of mGluR5 could be identified by Anti-mGluR5 in VLPO and also positive protein of GABA_A R was identified in TMN by Anti-GABA_A $\beta 1$. c-Fos expression in TMN reduced after microinjecting L-Glu in VLPO compared with the control group. The difference between them was significant ($P < 0.01$). **Conclusion** The metabotropic glutamate receptor in VLPO and GABA receptor in TMN mediate the regulation of VLPO-TMN passway. VLPO inhibits the TMN neuronal activity via GABA_A R.

Key words ventrolateral preoptic; tuberomammillary nucleus; c-Fos; immunohistochemistry