

· 简 报 ·

第三脑室注射组胺诱导下丘脑内 *c-fos* 的表达^①

张 静 程世斌 王竹立 卢光启

(中山医科大学生理教研室; 广州, 510089)

主题词 基因, *fos*; 基因表达; 组胺; 神经通路

中图分类号 R 338.27

近年来, 癌基因 *c-fos* 表达法作为一种反映神经功能通路的方法被广泛应用^[1], 该方法通过显示 *c-fos* 表达可受刺激的多级神经元依次显示出来, 能较明显地反映出与某一功能有关的神经通路。组胺(HA)作为脑内的一种神经递质, 参与对内脏活动和激素分泌等功能活动的调节。本实验室一直从事脑内 HA 调节胃酸分泌的机制的研究。已知第三脑室注射 HA 对五肽促胃液素诱导的胃酸分泌有抑制和兴奋双重效应^[2], 这些效应可能与脑内促肾上腺皮质激素释放激素(CRF)、 β -内啡肽有关^[3-5]。CRF 和 β -内啡肽均是下丘脑产生的肽类物质, 它们广泛参与多种生理功能的调节。但组胺能神经系统与产生这些递质的脑内核团的关系尚不清楚。有文献报道 HA 刺激下丘脑 *c-fos* 的表达^[6], 并能激活下丘脑-垂体-肾上腺轴, 但未探讨其作用机制。本研究采用癌基因 *c-fos* 免疫组化法显示 HA 作用的脑内途径以便说明 HA 作用的中枢机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 SD 雄性大鼠, 体质量 200~300 g, 由本校实验动物中心提供。

1.2 第三脑室埋管及注药法

用 15 g/L 戊巴妥钠(45~50 mg/kg)腹腔麻醉大鼠, 按本室常规使用的方法行第三脑室埋管术^[2], 单笼饲养 5~7 d 后, 在清醒状态下用自动推注机经埋管注射药物。

1.3 组织准备

第三脑室注药 90 min 后, 麻醉大鼠。经心脏灌注生理盐水 100 mL 冲洗积血, 继之灌注 4 °C 40 g/L 多聚甲醛 500 mL 固定, 维持约 1.5 h。断头取脑, 后固定 4 h, 在含 300 g/L 蔗糖的 0.1 mol/L PBS 液中浸泡至脑块下沉。自前连合平面至乳头体平面行冠状冰冻切片, 收集切片于含 φ (H_2O_2)=0.3% 的 0.01 mol/L 的 PBS 中。

1.4 免疫组织化学 SLAB 法

全过程缓冲液为 0.01 mol/L PBS, pH 7.4~7.6。具

体步骤如下: ①PBS 洗切片 5 min \times 3, 进入含 3 g/L Triton X 100 的正常羊血清中室温浸泡 30 min; ②兔抗 *c-fos* 抗体(1:1 000) 4 °C, 48 h; ③即用型生物素标记的羊抗兔 IgG 抗体, 4 °C, 12 h; ④即用型辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 4 °C, 8~12 h; ⑤DAB 试剂盒显色 2~7 min 后, 裱片, 脱水, 透明, 封片后光镜观察。以上各步骤间均用 PBS 洗 5 min \times 3。免疫组化对照组采用替代试验, 用正常血清代替一抗, 其余步骤同上, 结果均为阴性。

1.5 主要试剂

二盐酸组胺(中国科学院上海东风试剂厂); 盐酸苯海拉明(广州明兴制药厂); 兔抗 *c-fos* 多克隆抗体, 过氧化物酶标记的链霉卵白素显色试剂盒(北京中山生物制品公司)。

1.6 图像分析和数据处理

用图像分析系统计数每只动物室旁核(PVN)和弓状核(ARC)的 Fos 免疫反应细胞数。数据输入计算机用 SPSS for Windows 软件进行统计学处理, 全部数据用均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)表示, 不同组别的 Fos 阳性神经元数行两组间的 *t* 检验。

2 结 果

2.1 第三脑室注射 HA, Fos 蛋白在下丘脑内的表达

第三脑室注射(i. c. v) 10.0 μ g HA(溶于 5 μ L 生理盐水中, 以下同), 在下丘脑 PVN 和 ARC 可见密度集的 Fos 蛋白阳性反应。在室旁核内, Fos 免疫反应细胞主要集中内侧小细胞亚核(PVN_{mp}), 而在大细胞亚部位(PVN_{np})只见较少的 Fos 免疫反应细胞。在仅注射消毒生理盐水的对照动物, 一部分在上述部位无 Fos 蛋白阳性反应, 少数动物见散在阳性细胞, 但其数量与实验组动物有明显差异(表 1), 说明脑室注射 HA 可以诱导 PVN、ARC 的 *c-fos* 表达。

2.2 第三脑室预先注射 H₁ 受体拮抗剂对 HA 诱导作用的影响

第三脑室注射 H₁ 受体拮抗剂苯海拉明 10.0 μ g, 30 min 后, 再注射 10.0 μ g HA, 发现在 PVN 和 ARC 只有少量

Fos免疫反应阳性细胞,其数量与单独注射HA组相比,差异明显(表1),而单纯注射苯海拉明,未见上述核团呈现Fos蛋白阳性反应。说明HA诱导下丘脑室旁核PVN、ARC *c-fos* 基因表达的作用可被苯拉明部分地阻断。

2.3 第三脑室预先注射H₂受体拮抗剂对HA诱导作用的影响

第三脑室注射H₂受体拮抗剂雷尼替丁10.0 μg, 30 min后,再注射10.0 μg HA,发现在PVN和ARC仍有大量Fos免疫反应阳性细胞,其数量与单独注射HA组相比,差异无显著意义(表1)。

2.4 非特异性表达

第三脑室注射各种药物或生理盐水,在大脑皮质和丘脑中间核都可见散在的Fos阳性神经元,考虑为其他刺激引起的非特异性表达。

表1 脑室注射药物后下丘脑PVN¹⁾和ARC²⁾的Fos阳性细胞数
Table 1 The numbers of fos immunoreactive neurons in PVN and ARC of hypothalamus after i. c. v. different drugs $n(\bar{x} \pm s/(1)^3)$

Treatment	PVN	ARC
Group 1 i. c. v. NS(4) ⁴⁾	45.75 ± 4.03	28 ± 3.92
Group 2 i. c. v. HA(6)	578.50 ± 17.79	346.50 ± 15.57
Group 3 i. c. v. DH ⁷⁾ +HA(6) ⁵⁾	247.33 ± 10.92	133.00 ± 10.51
Group 4 i. c. v. RT ⁸⁾ +HA(6) ⁶⁾	550.50 ± 17.65	341.00 ± 11.02

1)PVN; paraventricular nucleus; 2)ARC; Arcuate nucleus 3) *n* (the number of *c-fos* immunoreactive cells per nucleus)/(1); 4)Group 1. vs Group 2; $P < 0.001$; 5)Group 3 vs Group 2; $P < 0.01$; 6) Group 4 vs Group 2; $P > 0.05$; 7)DH; diphenhydramine hydrochloride; 8)RT; ranitidine

3 讨论

c-fos 是一种存在于正常神经元细胞核内的原癌基因,可被多种刺激诱导而快速表达。本研究结果表明,第三脑室注射组胺可诱导清醒大鼠下丘脑室旁核、弓状核大量神经元 *c-fos* 基因表达,由于 *c-fos* 表达已被公认为神经元活动的标志,所以可以认为HA激活了下丘脑内上述核团的几种神经元。已知在下丘脑内含有丰富的组胺神经纤维和组胺受体⁷⁾,组胺可以通过其受体直接激活下丘脑内的内分泌神经元。放射性标记技术的应用表明,组胺H₁受体密集在大鼠下丘脑,而H₂受体在下丘脑较少发现⁸⁾。本实验第三脑室预先注射H₁受体拮抗剂苯海拉明可以部分地阻断HA诱导PVN、ARC *c-fos* 基因表达的作用,而预先注射

H₂受体拮抗剂雷尼替丁对HA的作用没有显著影响,说明HA的作用可能主要由H₁受体介导。有文献报道组胺能神经系统对下丘脑-垂体-肾上腺轴有激活作用,但作用的受体机制尚不十分清楚。本实验室以前的研究表明,HA对胃酸分泌依剂量不同有抑制和增强双重作用,H₁受体激动剂2-pyridylethyamine(PEA)可模拟HA的作用,H₂受体激动剂则不能³⁾。HA和PEA的抑酸作用及HA增强胃酸分泌的作用都可被H₁受体拮抗剂苯海拉明阻断^{2,5)},结合本实验的结果,可以推测,HA调节胃酸分泌的作用可能正是通过H₁受体激活下丘脑内分泌神经元,使其释放递质而实现的。

在PVN内HA诱导的Fos免疫反应阳性神经元主要集中在内侧小细胞部,与CRF神经元在PVN内的分布吻合;HA也可激活下丘脑弓状核神经元,而β-内啡肽神经元在脑内主要存在于这一部位。已知HA抑制胃酸分泌的作用有脑内CRF和β-内啡肽的参与⁴⁾,HA增强胃酸分泌的作用也与CRF有关^{3,5)},而CRF和β-内啡肽脑室注射对胃酸分泌确有影响。因此推测,HA兴奋的可能正是室旁核CRF神经元和弓状核β-内啡肽神经元。但直接的证据尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 张 遐,鞠 躬. *c-fos* 癌基因的诱导和显示. 生理科学进展, 1991, 22(4): 299
- 王竹立,卢光启. 第三脑室注射组胺及其受体激动剂对五肽促胃液素诱导的大鼠胃酸分泌的影响. 生理学报, 1992, 44(3): 261
- 孙成钢,王竹立,王天忠,等. 脑室注射组胺H₁受体激动剂对大鼠胃酸分泌的作用机制. 生理学报, 1993, 45(6): 581
- 李民友,王竹立,卢光启. 组胺H₁受体激动剂PEA抑制胃酸分泌效应的中枢机制. 生理学报, 1995, 47(3): 259
- 张 静,王竹立,卢光启. 第三脑室注射组织胺增强五肽促胃液素诱导的胃酸分泌的作用机制. 生理学报, 1997, 49(4): 439
- Kjaer A, Larsen P J, Knigge U, et al. Histaminergic activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 1994, 135(5): 1171
- Schwartz J C, Arrang J M, Garbarg M, et al. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physio Rev*, 1991, 71: 1
- Kanba S, Richelson E. Histamine H₁ receptors in human brain labelled with ³H Doxepin. *Brain Res*. 1984, 304: 1

(1998-02-23 收稿 1998-07-07 修回)