

• 实验研究 •

# 大鼠脑中 P 物质和生长抑素免疫 反应性物质分布\*

乔小英 卢光启

(生理学教研室)

李海标

(组织胚胎学教研室)

**提 要** 用免疫组化 ABC 法作大鼠脑内 P 物质 (SP) 和生长抑素 (SOM) 免疫反应性物质定位。观察到 SP 阳性细胞和纤维存在于下列部位: ①边缘前脑和脑干内脏核: 岛叶皮质、终纹床核、杏仁中央核、室旁核、弓状核、孤束核、中缝大核和外侧网状核; ②边缘中脑: 脚间核、被盖腹核和被盖背核; ③尾壳核-苍白球-黑质系统; ④一些与视觉、听觉或平衡觉有关的核团。SOM 阳性细胞最集中的部位是下丘脑室周区; SOM 阳性纤维则广泛分布于以上的所有部位。结果认为脑内的 SP 细胞、SP 纤维和 SOM 纤维存在于 4 个调节系统中: ①内脏内分泌调节系统; ②情绪记忆调节系统; ③锥体外运动系统; ④视觉、听觉和平衡觉调节系统。SOM 细胞也明显集中于内脏内分泌调节系统中。

**关键词** P 物质 生长抑素 免疫组化 ABC 法 脑内调节系统

P 物质 (SP) 是最早发现的脑肠肽, 它首先由 von Euler 于 1930 年在肠道中发现, 到 1970 年又在下丘脑分离出 SP。生长抑素 (SOM) 则是在 1973 年首次从下丘脑中分离, 继后才发现于胃肠道及胰岛的内分泌细胞中。先前观察到 SP 在外周有强烈的收缩肠管和扩张血管作用<sup>[1,2]</sup>, 下丘脑的 SOM 有抑制生长激素释放的功能<sup>[1]</sup>, 近年的研究提示它们可能作为神经递质或调制物参与神经系统活动<sup>[3~5]</sup>。SP 和 SOM 存在于神经末梢或突触小体内<sup>[6,7]</sup>, 其释放受  $K^+$ 、 $Ca^{++}$ 、 $Mg^{++}$  等的调节<sup>[7]</sup>, 可能通过增加突触后膜 cAMP 浓度引起神经元活动变化<sup>[8]</sup>, 作用具有灵敏度高、起效慢、持续时间长等特点<sup>[9]</sup>。尤其值得注意的是, 免疫组化<sup>[10,11]</sup>和受体测定<sup>[12,13]</sup>等资料显示, 含这两种肽的胞体、纤维或受体均存在于边缘系统的多个部位 (包括下丘脑、杏仁体、隔区等) 以

及脑干网状结构、孤束核和迷走背核中。边缘系统在调节内脏、内分泌和情绪活动中具有非常重要的功能, SP 对其中大多数神经元具有兴奋作用<sup>[8,9]</sup>, 而 SOM 则主要是抑制神经元的活动<sup>[14]</sup>。另外 SP 在中枢作用引起血压升高<sup>[5]</sup>和胃运动抑制<sup>[3]</sup>, SOM 则抑制摄食<sup>[4]</sup>。这些结果提示 SP 和 SOM 均参与边缘系统的调节活动并发挥各自的功能, 其中部分可能是相互拮抗作用。过去用免疫组化方法对两种肽在中枢的分布进行过一些研究, 但观察部位较零散局限, 尤其是对 SOM 作系统的脑内定位仍然较少; 对 SP 阳性细胞的显示效果不佳。我们运用免疫组化 ABC 法对大鼠脑中的 SP 和 SOM 免疫反应性物质作系统定位, 以便理解和比较它们的功能。

## 材 料 和 方 法

实验用 SD 雄性大鼠 11 只, 体重 200~300 克 (其中 7 只动物侧脑室注射秋水仙碱 100 $\mu$ g/

\* 国家自然科学基金资助课题

15μl后存活24~30小时),经心脏升主动脉快速灌注生理盐水200ml再用含3%多聚甲醛和0.1%戊二醛的磷酸缓冲液500ml灌注约一小时。取脑干、间脑和环绕脑干的部分端脑,恒冷箱连续冠状切片厚度25μm,每4片取1片。将切片分成两套,按免疫组化ABC法漂浮染色,分别与兔抗SP血清(1:1000,美国Leeman博士的实验室—University of Massachusetts Medical School—提供)或兔抗SOM血清(1:1200,上海第二军医大学生理教研室提供)混和,在20℃孵育90分钟后置4℃中24~48小时。成色剂用DAB。

替代试验用正常血清代替一抗进行反应,吸收试验用SP和SOM抗原分别与相应抗血清混匀在4℃孵育24~48小时后继续反应,两种对照试验的结果均为阴性。

## 实验结果

脑室注射秋水仙碱有利于阳性胞体的显示,尤其是SP阳性细胞。正常动物SP阳性胞体只见于下丘脑和脚间核中,注射秋水仙碱后,大量SP阳性细胞出现在脑干间脑等多个部位。秋水仙碱也有助于脑干SOM细胞的显示。而阳性纤维则在正常动物中比较清楚。SP和SOM免疫反应性物质在大鼠脑中的分布情况大致如下:

### SP阳性细胞的分布

SP阳性细胞为胞质阳性型,胞核阴性,广泛见于端脑、间脑和脑干中。

端脑 岛叶皮质(IC)和梨状皮质偶见SP阳性的锥体或梭形细胞。嗅束核(NOT)散在有小梭形阳性细胞。终纹床核(BST)和隔区的SP细胞多成群排列于外侧部。杏仁中央核(ACE)布满圆形或椭圆形小阳性细胞。尾-壳核(CPU)嘴背内侧和尾腹侧有众多小卵圆形SP细胞。

间脑 下丘脑前区(AHA)、下丘脑背内侧核(DMH)、乳头体腹核和弓状核(ARH)有密集团团的SP细胞,多为梭形或三角形中小细胞,胞质中等度染色,突起交织成网。乳头体前核、乳头体外侧核和下丘脑腹内侧核SP细

胞淡染。室旁核(PVH)中以小细胞内侧部(mp)的SP细胞为多,其次是小细胞外侧部、小细胞背侧部和小细胞室周部(图1)。另外,间脑中还可见中小型SP细胞位于内侧缰核、丘脑前核背侧部和外侧膝状体的背外侧部。

脑干 中脑脚间核(IP)有大群小圆形SP细胞位于其背内侧,中脑中央灰质(PVG)和下丘(CIF)也见散在有SP阳性细胞。在中脑和脑桥交界处见几个明显的SP细胞群,分别位于被盖背核(NTD)、被盖腹核(VT)(图2)、蓝斑(LC)、蓝斑下核和臂旁核(PB)中。NTD的背部有大量中小梭形或多角形SP细胞混杂于密集粗大的阳性纤维中,其腹部散在有浅染的中型细胞,而中央部则阴性。VT的大椭圆形SP细胞与阳性纤维一起呈蜂窝状排列。PB的阳性细胞位于外侧部众多平行排列的纤维之间。在脑桥下段和延髓上段腹侧也见几群SP细胞:中缝大核(RM)内有成群水平排列的大多角SP细胞(图3);在RM腹内侧中线的中缝苍白核(RPa)中有几个圆形SP细胞;位于RM外侧的外侧网状核(RL)中也有一些中小细胞排列在网格状的纤维之间。散在的SP神经元还见于斜方体核(NTZ)、上橄榄核(OS)、耳蜗背核和前庭内侧核(NVM)中。位于延髓背侧的孤束核(SOL)和最后区(AP)富含SP细胞和纤维,SOL自连合核起全长均有中小型阳性细胞,在尾侧这些细胞多位于内侧中线附近,在中部位于背内侧(接近AP)和外侧,至嘴部时又见于外侧。AP的SP细胞为小圆、椭圆或三角形。延髓下段三叉神经脊束核(NTST)的外1/3部密集的阳性纤维中有一些中小型SP细胞。

### SOM阳性细胞的分布

SOM阳性细胞的分布也较广泛。它们除集中于下丘脑室周区(HPV)外,也见于下丘脑其它核团、脑干和端脑中。

端脑的SOM细胞较为分散。IC偶见SOM阳性锥体细胞。在环绕前联合前支的倚核中,成片的中小梭形SOM细胞伸延到腹外侧与NOT的梭形阳性细胞相连。BST的外侧部有中型

SOM 细胞。SOM 阳性细胞还见于隔内侧核、屏状核、杏仁复合体的中央核、内侧核和外侧核中。

下丘脑 HPV 的 SOM 细胞最为密集, 分布于从 DMH 平面到视前区平面, 而且胞质深染。这些细胞为小卵圆形或梭形, 沿第三脑室表面成 4~5 行排列, 有些嵌入室管膜细胞之间。在 PVH 平面, SOM 细胞稍散开, 分布在 PVH 的室周部和 mp。mp 的阳性细胞呈水平或斜行排列, 胞质染色稍浅。至内侧视前核, SOM 细胞仍为小梭形沿脑室表面排列并多见于腹侧(图 4)。视交叉上核(SC)也有一些 SOM 细胞。ARH 内大量小卵圆形 SOM 细胞位于致密的阳性纤维间。

脑干的 SOM 阳性细胞见于脑桥和延髓。NTZ-OS 复合体内有中小阳性细胞。RL 和 RM 中有几个多角形阳性细胞, 数量大大少于此处的 SP 细胞。SOL 中部和嘴部的背外侧有中小 SOM 细胞。

#### SP 阳性纤维和 SOM 阳性纤维的分布

高密度的 SP 阳性纤维位于苍白球(GP)、海马(HPC)、BST 基底部、ARH、IP、黑质(SN)网状带、SOL 背内侧部和 NTST 外侧部。ARH 的 SP 纤维看来与第三脑室室管膜伸张细胞有关, 可能是伸张细胞的基突, 交织成网密集围绕在神经元周围, 尤以腹内侧部最为明显(图 5)。而在此平面上正中隆起(ME)只有少量 SP 纤维。较密集的 SP 纤维见于 CPU、视上核(SO)、PVH、外侧缰核、终纹(ST)、NTD、PB 外侧部和下橄榄核(OL)。中等密度 SP 纤维分布在 ACE、杏仁内侧核、内囊、SC、PVG、RL、前庭神经核、迷走背核(DMN)和疑核(AMB)。而视束、中脑上丘、舌下神经核(Ⅻ)和 NTST 内侧部的 SP 纤维较少。

最密集的 SOM 阳性纤维位于 ME 外带, 冠状切面上均被横断。ARH 密集的 SOM 纤维似乎与第三脑室伸张细胞有关。IP 也有高密度 SOM 纤维。较密集的 SOM 纤维见于 SO、ST、SOL、DMN、OL 和 NTST 外侧部。中等密度 SOM 纤维见于 CPU、ACE、OS、NTD、PB、

LC、NVM、耳蜗神经核和 RL。少量 SOM 纤维见于 PVH、PVG 和 CIF。

SP 和 SOM 两种阳性纤维在大鼠脑中的集中部位有差异: 在 GP、HPC、SN 等部位 SP 纤维高度密集而少有 SOM 纤维; ME 外带 SOM 纤维最密集而 SP 纤维不多; IP 的 SP 纤维多分布于两侧而 SOM 纤维散布整个核团。

## 讨 论

本实验较系统地观察了自脑干到部分大脑皮质的 SP 和 SOM 阳性物质, 尤其是较详细地显示了其中众多部位的阳性细胞。其中大脑皮质、PVH、VT、SOL 和 AP 等处的 SP 阳性细胞在以往的资料中鲜有报道。一些实验能很好地显示阳性纤维, 却几乎看不到阳性细胞<sup>[10]</sup>, 据推测是因为 SP 在胞体内的贮存方法不同。我们认为最主要的原因是秋水仙碱的使用和一抗的选择。注射秋水仙碱对显示绝大多数脑区的 SP 阳性细胞和下丘脑外的 SOM 细胞是必要的。这些细胞在正常情况下只有淡影而难以辨认, 使用秋水仙碱后则成群被显出。秋水仙碱破坏细胞内的微管微丝使运输受阻而致胞体内递质浓度升高。尽量使用高稀释度的一抗, 才能减少对抗原的隐蔽, 有利于显示低浓度的抗原。本实验所使用两种抗血清在 1:200 时, 显不出阳性细胞且背景很深; 继续稀释到 1:300~1000 时, 将 DAB 显色时间稍延长, 阳性细胞才逐渐显出而且背景线。吸收试验和替代试验的对照结果阴性, 说明本实验所用的抗体有较好的特异性。

Cuello 和 Kanazwa<sup>[10]</sup>认为脑干有 3 大 SP 阳性纤维系统: ①室管膜-室周系统, 可能与去甲肾上腺素相互作用; ②中缝系统, 可能与 5 羟色胺相互作用; ③网状系统。有人认为 SP 只是初级感觉神经纤维的递质, 源于神经节<sup>[1,15]</sup>。本实验显示了脑内大量 SP 阳性细胞和纤维, 提示 SP 纤维自有脑中的来源, 并非只源于外周神经节。它们的功能可能远远超出初级感觉递质和痛觉传导的范围, 这样用 3 个系统的划分法亦不足以反映其功能。根据 SP 细胞和

纤维所在部位的功能,我们认为脑内至少存在4大SP能系统,参与这些系统的功能调节。

**一、内脏内分泌调节系统** 是其中最大的一个系统,拥有自皮质的IC、皮质下结构的ACE和BST、下丘脑的PVH、DMH、ARH、AHA到脑干的LC、PB、RM、RL、RPa、SOL等部位的SP细胞和纤维,以及延髓DMN和AMB的SP纤维。这些核团由于与延髓背侧的迷走复合体有直接联系而归入“内脏脑”<sup>[16]</sup>。其中IC是内脏调节的高级中枢,皮质下核和下丘脑也属边缘前脑。LC、PB、RM、RL、SOL、DMN、AMB则有重要的消化、呼吸和心血管调节作用以及内分泌的反馈调节作用<sup>[17]</sup>,并存在往返联系<sup>[19]</sup>。PVH、RM和RPa还直接支配脊髓中间外侧柱的交感节前神经元<sup>[18,18]</sup>。除SOL的部分SP纤维可能是外周的传入外<sup>[15]</sup>,这些核团的SP纤维可能主要来自系统内SP细胞的投射,发挥SP的升高血压<sup>[6]</sup>、兴奋呼吸<sup>[11]</sup>、抑制胃运动<sup>[3]</sup>等作用。

**二、情绪记忆调节系统** 乳头体、隔区和边缘中脑的VT、NTD、IP间的纤维联系是情感行为和学习记忆的基础<sup>[18]</sup>。SP脑室或中脑腹侧被盖给药可引起忧郁行为<sup>[19]</sup>,并且有促进记忆的作用<sup>[20]</sup>,支持SP影响学习记忆和情感行为的设想。

**三、锥体外运动系** 在CPU-GP-SN系统中大量SP样物质,胞体集中在CPU,而GP和SN中则存在高密度的SP纤维。CPU的SP细胞可能投射到GP和SN,而SN的多巴胺能神经元又投射到CPU和GP,两种递质可能在此系统中互相作用。

**四、视觉、听觉和平衡觉调节系统** 外侧膝状体(SP细胞)和上丘(少量SP纤维)与视觉调节有关;耳蜗核、下丘、NTZ、OS的SP细胞则可能与听觉有关;前庭神经核的SP纤维可能调节平衡觉。

当然SP作为痛觉传入递质的作用是重要的,本实验也观察到与之有关的NTST和PVG有SP细胞和纤维。但如此众多的SP免疫反应物广泛见于脑中,绝非是“痛觉功能”所能概括

的。

根据SOM免疫反应性物质的分布,也可知SOM并非只有调节垂体内分泌的功能。虽然ME外带的SOM纤维比SP纤维密集得多,SOM可能在此进入垂体门脉而到达垂体前叶抑制多种激素的释放,从而对内分泌系统产生重大的影响,但是SOM细胞和纤维还见于IC、BST、ACE、SOL和RL等与内脏调节密切相关的部位,提示SOM也具有重要的内脏调节功能。已有资料表明PVH的SOM细胞投射到迷走复合体<sup>[18]</sup>,SOM直接作用能抑制DMN副交感运动神经元的电活动<sup>[14]</sup>。另外,我们观察到在边缘中脑、CPU-GP-SN系统以及NTZ-SO复合体等部位也有SOM阳性纤维,提示SOM亦有可能在情绪记忆、锥体外系、听觉平衡觉等调节中起作用。

(本文5幅照片见插图1)

### 参 考 文 献

- [1] 龚岳亭. 生物活性肽—结构与功能. 第1版. 上海科学技术出版社. 1985:1.
- [2] Bartho L, Holzer P. Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility. *Neuroscience* 1985; 16(1):1.
- [3] Spencer SE, et al. Central modulation of gastric pressure by substance P: a comparison with glutamate and acetylcholine. *Brain Res* 1986; 385(2):371.
- [4] Morley JE, et al. The effect of vagotomy on the satiety effects of neuropeptides and naloxone. *Life Sci* 1982;30(22):1943.
- [5] Unger T, et al. Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II. role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur J Pharmacol* 1981; 71(1):33.
- [6] Alonso G, et al. Electron microscopic immunocytochemical study of somatostatin neurons in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus with spec-

- ial reference to their relationships with homologous neuronal processes. *Neuroscience* 1985; 16(2):297.
- [7] Schenker C, et al. Release of substance P from isolated nerve endings. *Nature* 1976; 264(5588):790.
- [8] Henry JL, Sessle BJ. Effects of glutamate, substance P and edoisin-related peptide on solitary tract neurones involved in respiration and respiratory reflexes. *Neuroscience* 1985; 14(3):863.
- [9] Le Gal La Salle, G and Ben Ari, Y. Microiontophoretic effects of substance P on neurons of the medial amygdala and putamen of the rat. *Brain Res* 1977; 135(1):174.
- [10] Cuello AC, Kanazawa I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1978; 178(1):129.
- [11] Taber-pierce E, et al. The somatostatin systems of the guinea pig brainstem. *Neuroscience* 1985; 15(1):215.
- [12] Shigematsu K, et al. Increased density of substance P binding sites in specific brainstem nuclei of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1986; 370(2):383.
- [13] Beal MF, et al. Somatostatin binding sites in human and monkey brain: localization and characterization. *J Neurochem* 1986; 46(2):359.
- [14] Comura Y, et al: Effect of somatostatin on the vagal motor neuron in the rat. *Brain Res Bull* 1986; 17(3):397.
- [15] Katz DM, Karten HJ: Substance P in the vagal sensory ganglia: localization in cell bodies and pericellular arborizations. *J Comp Neurol* 1980; 193:549.
- [16] Carpenter MB, Sutin J. *Human neuroanatomy*. 8th ed. New York: Williams & Wilkins Press. 1983:322~328.
- [17] Lightman SL, et al. Ascending noradrenergic projections from the brainstem: evidence for a major role in the regulation of blood pressure and vasopressin secretion. *Exp Brain Res* 1984; 55(1):145.
- [18] Sawchenko PE, Swanson LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 1982; 205(3):260.
- [19] Meisenberg G, et al. Behavioral alterations induced by substance P, bombesin, and related peptides in mice. *Peptides* 1986; 7(4):557.
- [20] Schlesinger K, et al. Substance P facilitation of memory: effects in an appetitively motivated learning task. *Behav Neural Biol* 1986; 45(2):230.

# DISTRIBUTION OF SUBSTANCE P AND SOMATOSTATIN IMMUNOREACTIVITY IN THE RAT BRAIN

Qiao Xiaoying    Lu Guangqi

(Department of Physiology)

Li Haibiao

(Department of Histology and Embryology)

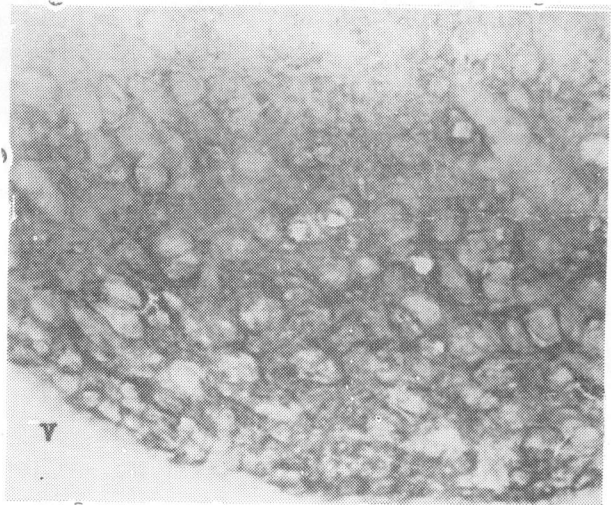
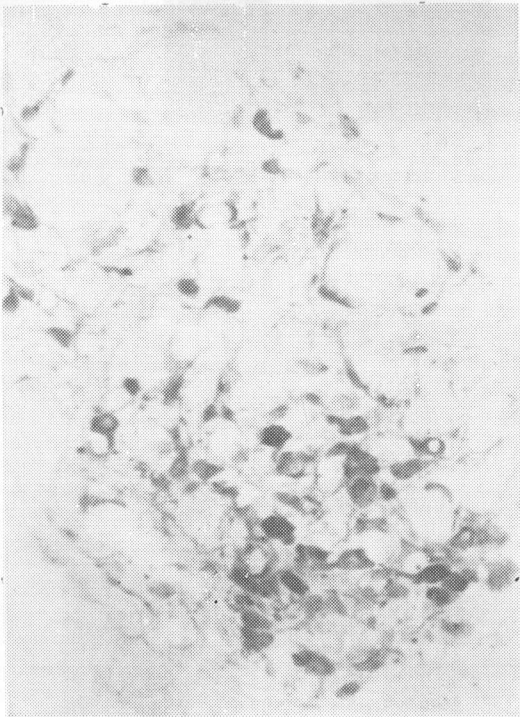
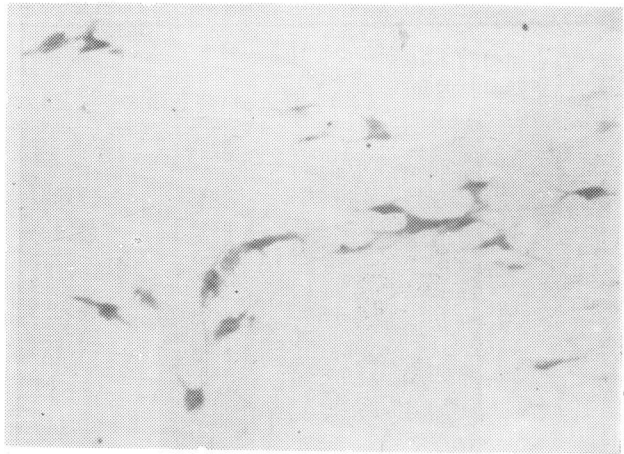
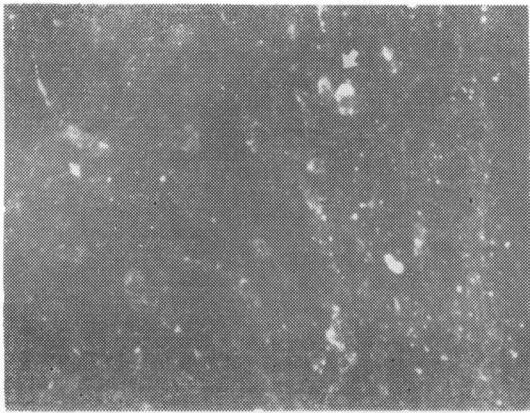
Substance P (SP) and somatostatin (SOM) immunoreactivity in the rat brain was localized with ABC immunohistochemical method. SP positive cells and fibers were found in the following regions: (1) limbic forebrain and brainstem visceral nuclei: insular cortex, bed nucleus (n.) of stria terminalis, central amygdaloid n., paraventricular n., arcuate n., solitary n., magnus raphe n. and lateral reticular n.; (2) limbic midbrain: interpeduncular n., ventral tegmental n. and dorsal tegmental n.; (3) caudate putamen n. - globus pallidus - substantia nigra system; (4) some nuclei related to visual, aural or equilibril regulation. SOM immunoreactive cells were concentrated most in periventricular region of hypothalamus, and they were also located in the above (1) and (4) nuclei; while SOM fibers were widespread in all the regions indicated above.

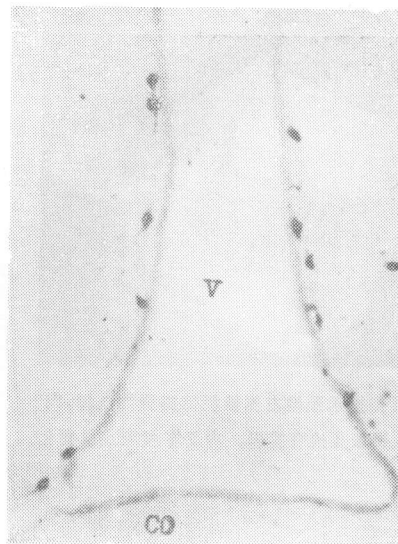
On the basis of these results, we recognize that SP cells, SP fibers and SOM fibers in the brain may exist in four regulation systems: (1) visceral and endocrine regulation system; (2) emotional and memorial regulation system; (3) extropyramidal system; (4) visual, aural and equilibril regulation system. SOM cells are also obviously localized in visceral and endocrine regulation system.

**Key words**    Substance P    Somatostatin    Immunohistochemical ABC method  
Regulation systems in the brain

# 大鼠脑中 P 物质和生长抑素免疫反应性物质分布

(正文见第27页)



$$\frac{1}{2} \left| \begin{array}{c} 3 \\ 5 \\ 4 \end{array} \right.$$


- 图1 室房核 SP 阳性细胞(个)暗视野观察( $\times 200$ )
- 图2 被盖腹核的 SP 阳性细胞和纤维( $\times 200$ )
- 图3 中缝大核的 SP 阳性细胞( $\times 200$ )
- 图4 视前内侧核的SOM 阳性细胞。第三脑室(V), 视交叉(CO)( $\times 100$ )
- 图5 弓状核的SP阳性纤维交织成网, 密集地围绕在神经细胞周围。第三脑室(V)( $\times 400$ )