

网络出版时间: 2021-6-11 16:27 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210611.0928.005.html>

去甲肾上腺素对腹外侧视前区神经元的作用途径研究

郝利洁, 张平平, 程娟, 张乐莎, 王烈成

摘要 目的 研究去甲肾上腺素(NA)对腹外侧视前区(VLPO)中两种类型神经元(促睡眠神经元和中间神经元)的作用途径。方法 采用全细胞膜片钳技术,通过药理学方法在C57BL/6小鼠脑片上,研究NA对VLPO中两种类型神经元兴奋或抑制作用的途径。通过RT-PCR鉴定VLPO脑区NMDA受体表达的类型。结果 电生理结果显示,NA(100 $\mu\text{mol/L}$)对VLPO中间神经元的兴奋作用能被NMDA受体阻断剂(AP5)阻断($P < 0.05, n = 8$),不能被AMPA受体阻断剂(CNQX)和 γ -氨基丁酸受体阻断剂阻断。NA(100 $\mu\text{mol/L}$)对VLPO促睡眠神经元的抑制作用均不能被AP5、CNQX和氟马西尼(flumazenil)阻断。RT-PCR结果显示NMDA受体的3种亚型(GluN2A、GluN2B、GluN1)在VLPO中均有表达。结论 NA对VLPO中间神经元的兴奋作用是通过谷氨酸能神经元释放谷氨酸引起的间接效应,该兴奋效应由VLPO中间神经元上的NMDA受体介导。

关键词 去甲肾上腺素; 腹外侧视前区; 谷氨酸受体
中图分类号 R 338.3

2021-03-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81971236、81903590、81801317、31800997)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院生理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 郝利洁, 女, 硕士研究生;

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

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)07-1026-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.005

腹外侧视前区(ventrolateral preoptic nucleus, VLPO)是促进睡眠的中枢^[1-2],其在睡眠启动中起着重要作用。在中枢神经系统中,去甲肾上腺素(noradrenalin, NA)主要由蓝斑(locus coeruleus, LC)的神经元释放,是觉醒的重要递质^[3]。曾有学者^[4]提出促睡眠神经元与促觉醒神经元相互抑制的假说,其控制着睡眠觉醒之间的时相转换来维持睡眠或觉醒状态。80%的VLPO神经元为 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元和甘丙肽能神经元,向脑中与觉醒相关的众多区域发出纤维投射^[5],调节睡眠觉醒时相间的相互转换,是调节睡眠-觉醒节律的关键因素。有研究^[6]表明,在VLPO区域中促睡眠神经元约占2/3,中间神经元约占1/3。NA能够兴奋或抑制VLPO中两种类型神经元的兴奋性。有文献^[7]表明促睡眠神经元的激活有助于睡眠。然而,目前NA对VLPO区域的这两类神经元的兴奋和抑制作用途径是直接作用途径还是间接作用途径未见报道。该研究利用全细胞膜片钳技术和RT-PCR检测,探究NA对VLPO两种类型神经元的兴奋或

group, K-H solution was infused for 45 min to prepare *in vitro* whole heart ischemia for 30 min, and 10, 60 and 120 min post-ischemia reperfusion models were made. In MP group, K-H solution with morphine was perfused and K-H solution without morphine was perfused for 5 min each before ischemia, with a total of 3 cycles. Infarct volume (IS), area at risk (AAR) and IS / AAR were determined by 2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium (TTC) staining. Lactic dehydrogenase (LDH) activity in coronary artery outflow was measured by chemical colorimetry. Caspase-3 and cardiomyocyte apoptosis were detected after 10, 60 and 120 min of reperfusion *via* Western blot and TUNEL staining, respectively. **Results** Compared with sham group, the percentage of infarct volume at the end of reperfusion increased in IR group, LDH activity, Caspase-3 protein expression and cardiomyocyte apoptosis ratio significantly increased in IR group at each time point after reperfusion ($P < 0.05$). Compared with IR group, morphine pretreatment significantly decreased IS/AAR ratio, LDH active Caspase-3 protein level and myocardial apoptosis ratio ($P < 0.05$). LDH level at 10 min reperfusion, Caspase-3 protein expression at 60 min reperfusion and apoptosis rate at 120 min reperfusion were the highest in IR group and MP group. **Conclusion** The protective effect of morphine pretreatment on myocardium is associated with decreased expression of Caspase-3 protein at the early stage of reperfusion and decreased apoptosis of myocardial cells after reperfusion.

Key words morphine; Caspase-3; apoptosis; ischemia-reperfusion injury

抑制作用的途径。

1 材料与方法

1.1 动物与主要试剂 实验动物选用清洁级健康 C57BL/6 小鼠(15~21 d),购自安徽医科大学实验动物中心,饲养于安徽医科大学基础生理学实验室动物房。饲养环境:室温 22~24℃,相对湿度 40%~60%,人工控制 12 h 昼夜节律,自由摄食和饮水。主要试剂有:NA 购自天津金耀公司,CNQX 购自美国 abcam 公司,AP5 和 flumazenil 购自美国 Sigma 公司,逆转录试剂盒购自美国 promega 公司。

1.2 主要仪器 MultiClamp 700B 放大器、Axon Digidata 1550A 数模转换器(美国 Axon 公司);振动切片机(德国 Leica 公司);MODEL P-97 电极拉制仪、玻璃电极(德国 SUTTER 设备公司);95% O₂/5% CO₂ 的混合气(合肥虹珏公司)。

1.3 方法

1.3.1 电生理溶液组成 切片液(mmol/L):124 NaCl, 3 KCl, 1.2 NAH₂PO₄, 26 NAHCO₃, 0.5 CaCl₂, 4 MgSO₄, 10 dextrose 和 5 HEPES, 渗透压(798±10) kPa,pH(7.3±0.5),4℃保存。细胞外液(mmol/L):124 NaCl, 3 KCl, 1.2 NAH₂PO₄, 26 NAHCO₃, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 10 dextrose 和 5 HEPES,渗透压(798±10) kPa,pH(7.3±0.5),室温使用。电极内液(mmol/L):150 K-gluconate, 5 NaCl, 5 HEPES, 0.4 EGTA, 4 Mg-ATP, 0.5 Tris-GTP 和 5 phosphocreatine, 渗透压(798±10) kPa,pH(7.2±0.5)。

1.3.2 玻璃电极拉制 采用电极拉制仪控制尖端为 1 μm、入液电阻为 3~7 MΩ 的玻璃电极。

1.3.3 VLPO 离体脑片制备 从 15~21 d 的小鼠中制备含有 VLPO 的切片(厚度 300 μm)。小鼠先吸入异氟醚使其麻醉,然后用断头台断头。取脑,放置于含混合气(95% O₂/5% CO₂)的 4℃切片液中,使用振动切片机切割脑片,将切好的脑片移入含混合气的细胞外液中孵育,25℃孵育 1 h。将切片转移到记录浴槽中,加热细胞外液至 30℃,进行全细胞膜片钳记录。记录过程中,蠕动泵维持灌流速度为 2 ml/min。

1.3.4 RT-PCR

1.3.4.1 VLPO 的 RNA 提取 小鼠吸入异氟醚麻醉后,断头取脑用振动切片机切片,然后对照脑图谱,在 VLPO 所在的位置,采集含有 VLPO 的组织。每只小鼠可以取 40~50 mg,从 6 只小鼠中取材 200

mg 组织,放到 1.5 ml EP 管中,加入 1 ml TRIzol,使用匀浆器吹打研磨。研磨 0.5 h 后,加入 0.2 ml 氯仿,振荡 30 s,室温放置 2 min。12 000 r/min,4℃离心 15 min。取上清液于新的 EP 管中,加 0.5 ml 异丙醇,振荡 30 s,室温放置 10 min。12 000 r/min,4℃离心 15 min。弃掉上清液,加入 75% 乙醇 1 ml,振荡 30 s,7 500 r/min,4℃离心 5 min。弃上清液,用滤纸小心吸取残留液体,室温干燥 30 min,使乙醇充分挥发。沉淀溶于 20 μl DEPC 水,-20℃保存,备用。

1.3.4.2 RT-PCR 扩增及电泳 Promega GoScript Reverse Transcription System A5000 试剂盒说明书对样本 RNA 进行反转录。PCR 扩增程序为:25℃退火 5 min;42℃延伸 1 h;4℃、5 min;70℃延伸 15 min;4℃保存备用。PCR 扩增产物在 120 V 电压下使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。引物由生工生物工程(上海)有限公司设计合成。引物序列如表 1 所示。

1.4 统计学处理 研究中所有电生理原始数据用 Clampfit 10 分析。其他均使用 GraphPad Prism 7.0 软件对实验数据进行统计分析并作图。所有数据表示为 $\bar{x} \pm s$,采用配对 *t* 检验比较去 NA 给药前后动作电位发放频率的实验数据。在统计比较前,所有数据均被证实为正态分布,方差相等,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列
GAPDH	F: ACCCAGAAGACTGTGGATGG R: TTCAGCTCAGGGATGACCTT
GluN2A	F: TGCTCATCACCTCATCTCTCTC R: GATTGACCTCGCTCTGCTC
GluN2B	F: CACAAACATCATCACCCACAC R: TTGACTTCTCTGTGCCCTTC
GluN1	F: GCTGTACCTGCTGGACCGCT R: GCAGTGTAGGAAGCCACTATGATC

2 结果

2.1 VLPO 两种类型神经元的鉴定 高倍显微镜观察下,VLPO 中能看到有两种形态的神经元,一种是多极三角形(图 1A),这类神经元动作电位的发放频率能被 NA 抑制(图 2A),撤去 NA 后动作电位发放频率恢复到给 NA 前水平,是睡眠神经元;另一种是两极梭形(图 1B),这类神经元动作电位的发放频率能被 NA 兴奋(图 2B),撤去 NA 后动作电位发放频率同样能恢复到给 NA 前水平,是中间神经

元。采用全细胞膜片钳记录 VLPO 中两种神经元的放电均是自发放电。通过 VLPO 细胞的不同形态和对 NA 的不同响应,以此鉴别促睡眠神经元和中间神经元。

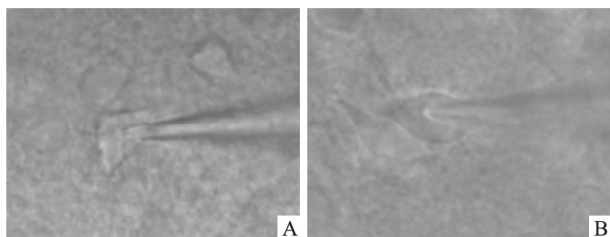


图1 小鼠脑片上 VLPO 中两类不同神经元的形态
A: 神经元的形态呈多极三角形; B: 神经元的形态呈两级梭形

2.2 NA 在阻断剂存在下对 VLPO 促睡眠神经元放电效应的影响 通过显微镜观察,在 VLPO 中选择钳制形态为多极三角形的细胞进行电生理记录。正常情况下,神经元动作电位的发放是连续的。待神经元的动作电位发放稳定后开始记录,时间记录流程是:稳定记录 2 min 后,给予 NA(100 $\mu\text{mol/L}$,下同) 10 s,观察其抑制效应,然后用细胞外液灌洗 2 min,恢复其自身动作电位发放频率,然后给予不同类型阻断剂(antagonist,下同) 3 min 后,在同时给予(NA + antagonist) 10 s,最后用含 antagonist 的细胞外液灌洗至其动作电位发放频率恢复。该研究把给予 NA 前 20 s 作为初始对照(Ctl),给 NA 时 20 s 的结果为 NA 的效应组(NA),细胞外液灌洗 1 ~ 2 min 后的 20 s 为其恢复组(Wash)。Antagonist 灌流

3 min 左右,即 NA + antagonist 前 20 s 为(Ctl + antagonist)组,给予 NA + antagonist 的 20 s 为(NA + antagonist)组,1 ~ 2 min 灌洗后的 20 s 为(Wash + antagonist)组。Antagonist 浓度分别为 CNQX(10 $\mu\text{mol/L}$)、AP5(50 $\mu\text{mol/L}$)、flumazenil(5 $\mu\text{mol/L}$),下同。当用 NA 鉴定细胞为促睡眠神经元时,再进行后续的实验。

统计结果如图 3 所示,在 CNQX + AP5 存在下,给 NA 后的动作电位发放频率显著低于 Ctl + CNQX + AP5 时动作电位发放频率($P < 0.01$; $n = 8$)。在 CNQX 存在下,给 NA 后的动作电位发放频率显著低于 Ctl + CNQX 时动作电位发放频率($P < 0.001$; $n = 7$)。在 AP5 存在下,给 NA 后动作电位发放频率显著低于 Ctl + AP5 时动作电位发放频率($P < 0.001$; $n = 8$)。在 flumazenil 存在下,给 NA 后动作电位发放频率显著低于 Ctl + flumazenil 时动作电位发放频率($P < 0.05$; $n = 7$)。结果说明,在 CNQX、AP5、flumazenil 存在的情况下,NA 对促睡眠神经元的抑制作用依旧存在。

2.3 NA 在阻断剂存在下对 VLPO 中间神经元放电效应的影响 通过显微镜观察,在 VLPO 中选择钳制形态为两极梭形的细胞进行电生理记录。待神经元的动作电位发放稳定后开始记录,时间记录流程和阻断剂使用浓度同 2.2。当用 NA 鉴定细胞为中间神经元时,再进行后续的实验。

统计结果如图 4 所示,在 CNQX + AP5 存在下,给 NA 后的动作电位发放频率与 Ctl + CNQX + AP5 时动作电位发放频率比较,差异无统计学意义($n = 8$)。

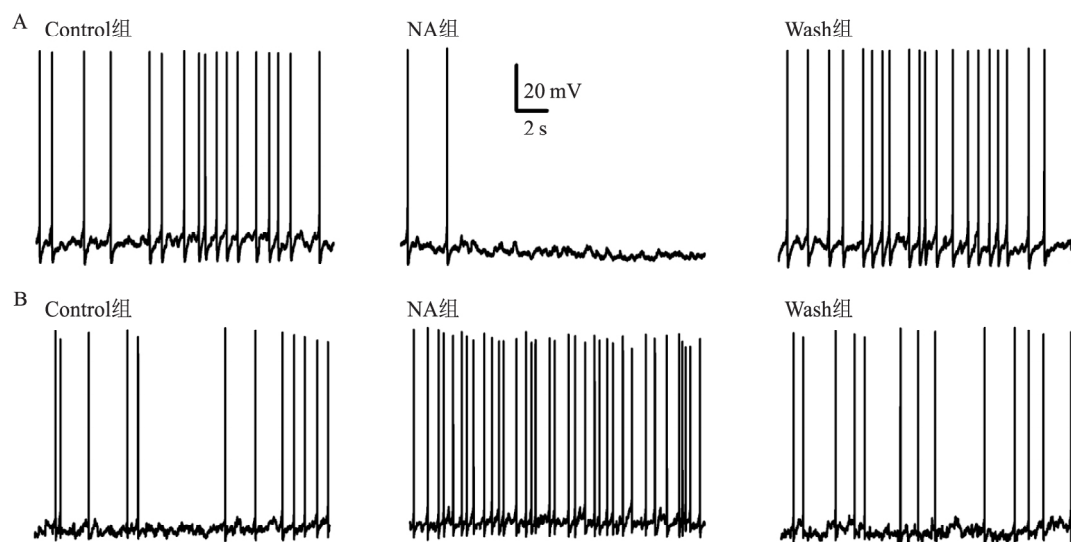


图2 VLPO 中两种神经元对 NA 的不同响应

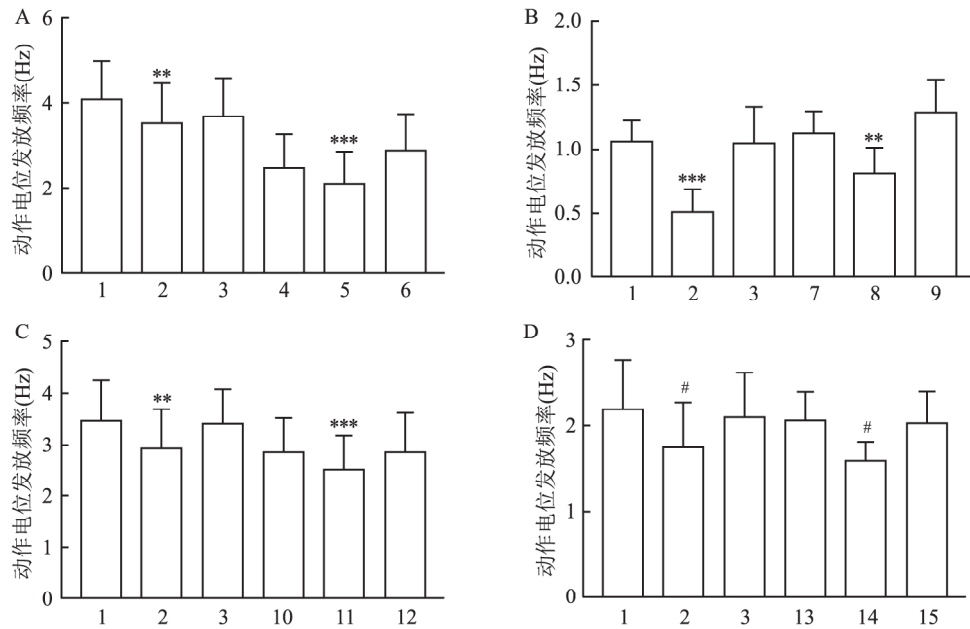


图3 NA在阻断剂存在下对促睡眠神经元动作电位发放频率的效应

A: CNQX + AP5 组; B: CNQX 组; C: AP5 组; D: flumazenil 组; 1: Ctl 组; 2: NA 组; 3: Wash 组; 4: Ctl + CNQX + AP5 组; 5: NA + CNQX + AP5 组; 6: Wash + CNQX + AP5 组; 7: Ctl + CNQX 组; 8: NA + CNQX 组; 9: Wash + CNQX 组; 10: Ctl + AP5 组; 11: NA + AP5 组; 12: Wash + AP5 组; 13: Ctl + flumazenil 组; 14: NA + flumazenil 组; 15: Wash + flumazenil 组; 与 Ctl 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 Ctl + flumazenil 组比较: # $P < 0.05$

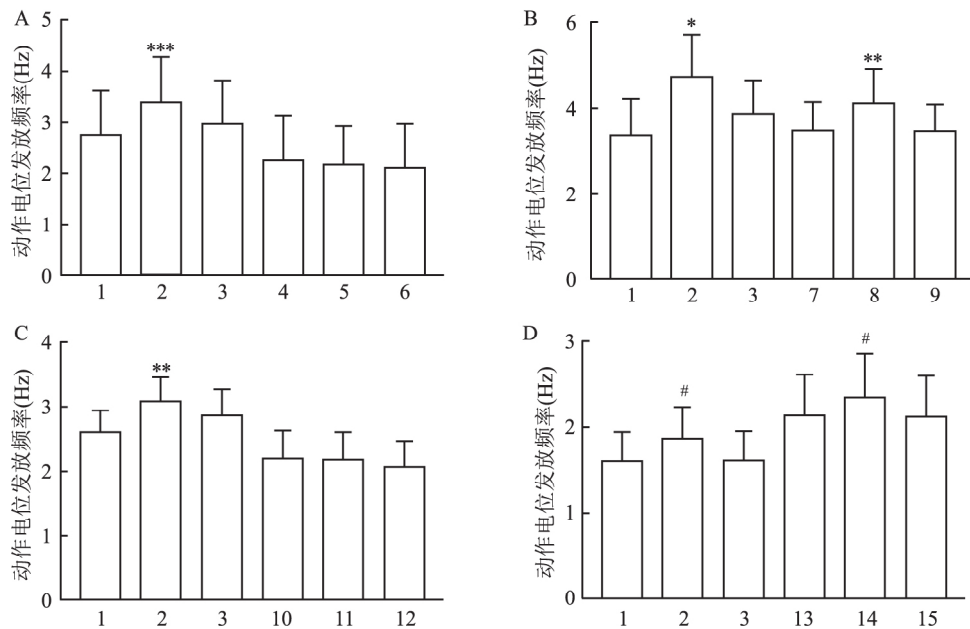


图4 NA在阻断剂存在下对中间神经元动作电位发放频率的效应

A: CNQX + AP5 组; B: CNQX 组; C: AP5 组; D: flumazenil 组; 1: Ctl 组; 2: NA 组; 3: Wash 组; 4: Ctl + CNQX + AP5 组; 5: NA + CNQX + AP5 组; 6: Wash + CNQX + AP5 组; 7: Ctl + CNQX 组; 8: NA + CNQX 组; 9: Wash + CNQX 组; 10: Ctl + AP5 组; 11: NA + AP5 组; 12: Wash + AP5 组; 13: Ctl + flumazenil 组; 14: NA + flumazenil 组; 15: Wash + flumazenil 组; 与 Ctl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 Ctl + flumazenil 组比较: # $P < 0.05$

在 CNQX 存在下,给 NA 后的动作电位发放频率显著高于 Ctl + CNQX 时动作电位发放频率 ($P < 0.01$; $n = 8$)。在 AP5 存在下,给 NA 后的动作电位发放

频率与 Ctl + AP5 时动作电位发放频率比较,差异无统计学意义 ($n = 8$)。在 flumazenil 存在下,给 NA 后的动作电位发放频率显著高于 Ctl + flumazenil 时动

作电位发放频率 ($P < 0.05$; $n = 7$)。结果显示,在 CNQX、flumazenil 存在的情况下,NA 对中间神经元的兴奋作用仍旧存在。然而,在 AP5 存在的情况下,NA 对中间神经元的兴奋作用消失。

2.4 用不同阻断剂预处理 VLPO 脑片后分析 NA 对 VLPO 神经元两种效应介导的受体途径 通过统计 NA 对动作电位发放频率抑制率或者兴奋率 (%) ($(\text{NA-Ctl}) / \text{Ctl} \times 100\%$) 和给予 antagonist 后,NA 对动作电位发放频率抑制率或者兴奋率 (%) [$(\text{NA} + \text{antagonist}) - (\text{Ctl} + \text{antagonist}) / (\text{Ctl} + \text{antagonist}) \times 100\%$]。比较给阻断剂前后 NA 对 VLPO 神经元的兴奋或者抑制幅度,结果显示,在 CNQX + AP5 组中,中间神经元给 antagonist 后的动作电位发放频率兴奋率 (5.223 ± 7.26) % 与给 antagonist 之前的动作电位发放频率兴奋率 (40.470 ± 13.59) % 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $n = 9$)。在 AP5 组,中间神经元给 antagonist 后的动作电位发放频率兴奋率 (3.636 ± 1.71) % 与给 antagonist 之前的动作电位发放频率兴奋率 (28.100 ± 6.86) % 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $n = 8$)。而其他组差异无统计学意义。这个结果显示,NA 对中间神经元的兴奋作用被 AP5 阻断。说明 NA 对 VLPO 中间神经元的兴奋作用是通过谷氨酸能神经元释放谷氨酸引起的间接效应,该效应由 VLPO 中间神经元的 NMDA 受体介导。

2.5 VLPO 内谷氨酸受体检测 先吸入异氟醚使小鼠麻醉,冰上断头取脑,然后用振动切片机切脑,取出含有 VLPO 的组织放入 1.5 ml 的 EP 管中,经过提取 RNA 和逆转录的一系列操作,得到的 PCR 扩增产物在 120 V 电压下使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 5 所示。NMDA 受体的 3 种亚型 GluN2A、GluN2B、GluN1 在 VLPO 脑区均有表达。M 是 DNA marker (DI2000); GAPDH 是内参。GluN2A、GluN2B、GluN1 是被检测样本。

3 讨论

去甲肾上腺素能神经元聚集的主要核团是 LC,研究^[8-10]表明 LC 在包括注意力、睡眠/觉醒和应激反应在内的许多生理功能中发挥关键作用。实验通过电凝和药理学等方法在 LC 脑区特异损毁或激活去甲肾上腺素能神经元,提示 NA 参与了睡眠和清醒行为的调节^[10]。Lu et al^[11]在他们的研究表明,在 VLPO 区域注射顺标示踪物发现,VLPO 的轴突对视结节乳头区域神经元的胞体及邻近树突有广泛的投射,对 LC、背侧及中缝核、基底前脑有少量的

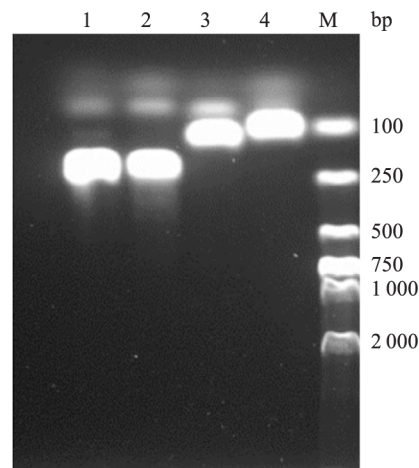


图5 VLPO 的 RT-PCR 检测结果

1: 内参 GAPDH; 2: GluN1; 3: GluN2B; 4: GluN2A; M: DNA marker (DI2000)

投射。Gallopini et al^[8]根据神经元的形态、大小、对药物的响应、递质的组成成功的在 VLPO 区域鉴定两类神经元,一类是促睡眠神经元,这类神经元的形态呈多级三角形,觉醒一些重要的递质如 NA、5-HT 对促睡眠神经元的作用是抑制的,同时它们具有低阈值发放特性 (low-threshold spike, LTS),并通过单细胞 RT-PCR 证实了这类神经元是甘氨酸能与 GABA 能的。另一类 GABA 能神经元,它是两极梭形、NA 兴奋性神经元,没有 LTS 特性^[12]。神经生物学研究表明,在中枢神经系统中,GABA 在脑中广泛存在,为主要的抑制性神经递质;谷氨酸是中枢神经系统含量最高、分布最广、作用最强的兴奋性神经递质。谷氨酸是种小分子氨基酸,这类神经递质能够结合包括 NMDA 受体、AMPA 受体、红藻氨酸受体的多个突触后受体。这些受体是阳离子的通道,能使带正电的离子,如 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 进入突触后细胞,导致去极化从而激活神经元。因此,在实验设计中,该课题组选取了 GABA 能受体阻断剂 (flumazenil),NMDA 受体阻断剂 (AP5),AMPA 受体阻断剂 (CNQX),探究 NA 对 VLPO 两类神经元的作用途径。

实验结果显示,NA 对 VLPO 促睡眠神经元的抑制作用均不能被 flumazenil、CNQX 和 AP5 阻断。NA 对 VLPO 中间神经元的兴奋作用被 AP5 阻断,而不能被 flumazenil 和 CNQX 阻断。在记录神经元自发放电过程中,任何一种阻断剂还是药物的作用,都会使神经元的动作电位发放频率发生改变,这是因为神经细胞在大脑中接收着各种各样的信号,对

神经递质和药物的反应极其敏感。因此,NA 对 VL-PO 中间神经元的兴奋作用可能是通过谷氨酸能神经元释放谷氨酸引起的间接效应,该效应由 VLPO 中间神经元的 NMDA 受体介导。而谷氨酸神经元的类型和谷氨酸的来源及上游脑区目前还不确定,此类谷氨酸神经元可能来自视网膜的自感光神经节细胞(ipRGCs),因为 ipRGCs 在脑中有广泛的投射,包括与睡眠相关的 VLPO,与非成像视觉密切相关的核团^[13-14],参与介导生物节律、瞳孔对光反射、睡眠与觉醒周期等生理功能,ipRGCs 在大脑中的投射末梢可以释放谷氨酸。

参考文献

- [1] Lu J, Greco M A, Shiromani P, et al. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(10): 3830-42.
- [2] Saper C B, Chou T C, Scammell T E. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness [J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24(12): 726-31.
- [3] Luppi P H, Charlety P J, Fort P, et al. Anatomical and electrophysiological evidence for a glycinergic inhibitory innervation of the rat locus coeruleus [J]. *Neurosci Lett*, 1991, 128(1): 33-6.
- [4] Luppi P H, Fort P. Sleep-wake physiology [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 160: 359-70.
- [5] Chou T C, Bjorkum A A, Gaus S E, et al. Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus [J]. *Neurosci*, 2002, 22(3): 977-90.
- [6] Gallopin T, Fort P, Eggemann E, et al. Identification of sleep-promoting neurons *in vitro* [J]. *Nature*, 2000, 404(6781): 992-5.
- [7] Schmidt T M, Taniguchi K, Kofuji P. Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development [J]. *Neurophysiol*, 2008, 100(1): 371-84.
- [8] Bai Y F, Ma H T, Liu L N, et al. Activation of galanin receptor 1 inhibits locus coeruleus neurons *via* GIRK channels [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(1): 79-85.
- [9] Winkowski P J, Radkowski M, Wszedybyl-Winklewska M, et al. Stress response, brain noradrenergic system and cognition [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 980: 67-74.
- [10] Chu N, Bloom F E. Norepinephrine-containing neurons: changes in spontaneous discharge patterns during sleeping and waking [J]. *Science*, 1973, 179(4076): 908-10.
- [11] Lu J, Bjorkum A A, Xu M, et al. Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep [J]. *Neurosci*, 2002, 22(11): 4568-76.
- [12] Wang Q, Yue X F, Qu W M, et al. Morphine inhibits sleep-promoting neurons in the ventrolateral preoptic area *via* mu receptors and induces wakefulness in rats [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(5): 791-801.
- [13] Hattar S, Kumar M, Park A. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse [J]. *Comp Neurol*, 2006, 497(3): 326-49.
- [14] Hannibal J, Fahrenkrug J. Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2004, 316(1): 99-113.

The pathway exploration of noradrenalin effects on two type neurons in the ventrolateral preoptic area

Bing Lijie, Zhang Pingping, Cheng Juan, et al

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

Abstract Objective To study the pathway of noradrenalin(NA) effects on two type neurons(sleep-promoting neurons, interneurons) in the ventrolateral preoptic area (VLPO). **Methods** The whole cell patch clamp technique and pharmacological methods were used to analyze the pathway of NA exciting or inhibiting effects on the two type neurons in the VLPO. The types of NMDA receptor expressions in VLPO were identified by RT-PCR. **Results** Electrophysiological results showed that the excitatory effects of NA(100 μmol/L) on VLPO interneurons were blocked by NMDA receptor blocker (AP5) ($P < 0.05$, $n = 8$), but not by AMPA receptor (CNQX) and GABA receptor blocker. The inhibitory effects of NA(100 μmol/L) on the sleep-promoting neurons of VLPO were not blocked by AP5, CNQX or flumazenil. RT-PCR results showed that three subtypes of NMDA receptor (GluN2A, GluN2B, GluN1) were expressed in VLPO. **Conclusion** The excitatory effects of NA on VLPO interneurons is an indirect effects caused by glutamatergic neurons releasing glutamate, which is mediated by NMDA receptor of VLPO interneurons.

Key words noradrenalin; ventrolateral preoptic area; glutamate recepte