

# 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

丁 丁<sup>1,2</sup>, 丁 睿<sup>1</sup>, 吴 芳<sup>1</sup>, 张 瑾<sup>1</sup>, 许 奇<sup>1</sup>, 解 敏<sup>1</sup>, 王烈成<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨促睡眠调节中枢下丘脑腹外侧视前区(VLPO)与促觉醒调节中枢结节乳头体核(TMN)之间是否具有双向调节的直接通路。方法 将SD大鼠随机分为对照组(ACSF组)与实验组(TMN+ACSF&VLPO+DiO组, TMN+DiO&VLPO+ACSF组),采用脑立体定位技术,核团内微量注射、冰冻切片等方法观察和记录大鼠VLPO和TMN分别注射细胞膜荧光探针Fast DiO后的TMN和VLPO的荧光信号。结果 TMN+ACSF&VLPO+DiO组大鼠注射Fast DiO术后72 h, TMN脑区神经细胞可见明显的绿色荧光; TMN+DiO&VLPO+ACSF组大鼠注射Fast DiO术后72 h, VLPO脑区神经细胞也可见明显的绿色荧光。结论 VLPO与TMN间有双向直接神经纤维投射。

**关键词** 腹外侧视前区; 结节乳头体核; 大鼠; 突触

中图分类号 R 338.63

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1376-03

睡眠和觉醒过程不仅仅是某个神经核团的单独活动,而且是全脑众多神经核团的集体活动(网络活动)过程。研究<sup>[1-2]</sup>结果表明,下丘脑腹外侧视前区(ventrolateral preoptic nucleus, VLPO)与结节乳头体核(tuberomammillary nucleus, TMN)分别是促睡眠中枢和促觉醒调节中枢之一。80%的VLPO神经细胞为 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)能神经细胞和甘丙肽能神经细胞,而TMN是脑中组胺能神经细胞胞体集中聚集的区域,这两个核团之间是否存在直接的双向纤维投射以及其递质释放对睡眠-觉醒节律的形成与维持起何作用是当前研究的热点。为了进一步证实VLPO和TMN核团是否存在双向纤维投射,该研究通过脑立体定位技术,在大鼠的VLPO和TMN脑区分别微量注射荧光探针Fast DiO<sup>[3]</sup>(一种可被纤

维末梢吞噬,通过轴浆运输达到胞体的荧光探针),观察TMN和VLPO脑区神经细胞是否表达荧光。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 清洁级成年SD大鼠32只,雌雄不拘,体重250~300 g,安徽医科大学实验动物中心提供。所有动物随机分组,对照组(12只)(ACSF组, VLPO与TMN均微量注射ACSF),实验组(各10只):① TMN+ACSF&VLPO+DiO组(TMN内微量注射ACSF以及VLPO内微量注射Fast DiO);② TMN+DiO&VLPO+ACSF组(TMN内微量注射Fast DiO以及VLPO内微量注射ACSF)。大鼠均置于室温22~24℃,湿度维持55%以及12 h明/暗(光照08:00-20:00)的通风环境中单独饲养,自由饮水与摄食,活动不受限制。

**1.1.2 药品与剂量** 细胞膜荧光探针Fast DiO(Ex=644 nm, Em=663 nm,分子量:881.72(美国LLC公司);戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂采购供应站分装厂进口分装提供),使用前用ACSF配置;ACSF成分(mmol/L):124 NaCl, 4.5 KCl, 1.6 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.1 MgCl<sub>2</sub>, 2.7 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 Glucose(pH=7.4)。

**1.1.3 主要仪器** 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 828 pH计(美国Orion公司);微量注射器(瑞士Hamilton公司);Leica冰冻切片机(德国Leica公司);荧光显微镜(日本Nikon公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物手术** 大鼠经戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将其头部固定于脑立体定位仪上,常规头部备皮,无菌手术操作暴露颅骨并用0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>烧灼清洁颅骨表面,将两个不锈钢引导管(22-gauge)按照Paxinos和Waston大鼠脑立体定位图谱<sup>[4]</sup>分别插入VLPO(AP:-0.36 mm; R:1.30 mm; H:-7.00 mm)和TMN(AP:-3.96 mm; R:1.50 mm; H:-7.70 mm),引导管底端距目的核团2 mm,供VLPO和TMN内微量注射荧光探针使用。注射

2014-05-18 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071075);教育部博士点基金新教师类(编号:20093420120004);安徽医科大学科研基金(编号:2013XKJ002、2013XKJ005)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医学高等专科学校基础部生理学教研室,合肥 230601

作者简介:丁 丁,女,硕士研究生;

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

完毕后,逐层缝合,送回动物室,自由饮水进食。术后将大鼠置于记录室中休息,待麻醉苏醒后观察动物行为活动。

**1.2.2 药物注射** 使用 Hamilton 微量注射器(针尖直径 26-gauge)通过引导管向目的核团注射 ACSF(对照组)或含荧光探针 ACSF(实验组) 3  $\mu\text{l}$ ,注射速度为 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,注射完毕滞针 3 min 防止药液溢出。

**1.3 组织学鉴定** 大鼠术后 72 h 后,行戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉并仰卧位固定于手术台上,暴露心脏,从心尖处进行灌注,首先注入 0.01 mmol/L PBS 液,待肝脏颜色变淡,心耳处流出液清亮后更换为 4% 多聚甲醛,先快后慢继续灌注(PBS 液用量约 200 ml,多聚甲醛用量约 250 ml)。灌注结束后完整取下脑组织并 4% 多聚甲醛固定 24 h,次日使用 30% 蔗糖 PB 溶液脱水至沉底。取各组大鼠的大脑的 TMN 和 VLPO 进行冰冻切片,片厚 20~25  $\mu\text{m}$ ,光学显微镜下观察引导管位置以及药物注射位点,仅对定位准确的大鼠进行实验数据的统计。共计 8 只大鼠因定位不准确予以剔除实验,其中对照组 4 只,实验组各 2 只。荧光显微下观察 Fast DiO 标记的荧光效果并拍照。

## 2 结果

**2.1 神经损伤严重程度 (neurological severity-score NSS) 评分** 采用双盲法,在标志物注入脑室后 2 h 和 24 h 对各组大鼠进行 NSS 评分。麻醉良好的动物在注射过程中没有发生抽搐、呼吸紊乱等异常情况。术后 24 h 所有大鼠评分已基本正常。

### 2.2 荧光显微镜观察荧光标记效果

**2.2.1 TMN + ACSF&VLPO + DiO 组** TMN + ACSF&VLPO + DiO 组在 VLPO 核团内注射荧光探针 Fast DiO 后 72 h, TMN 脑区可见明显的绿色荧光,荧光均匀存在于细胞质中,核未清晰显示,见图 1。神经细胞的荧光强度相对强,成像清晰,对比度高,容易辨别。TMN 之外的区域未见绿色荧光标记,绿色荧光可持续到药物注射后 120 h。而 VLPO 核团内注射 ACSF, TMN 脑区未见荧光(结果未显示)。

**2.2.2 TMN + DiO&VLPO + ACSF 组** TMN + DiO&VLPO + ACSF 组在 TMN 核团内注射荧光探针 Fast DiO 后 72 h, VLPO 脑区可见明显的绿色荧光,荧光均匀存在于细胞质中,核未清晰显示,神经细胞的荧光对比度高,容易辨认,但成像的密度较低,

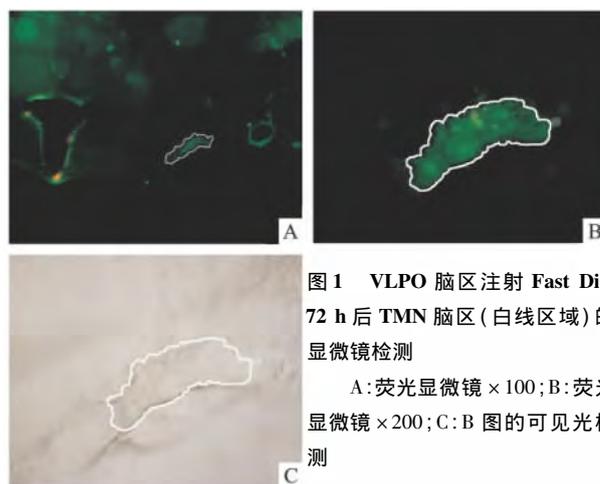


图1 VLPO 脑区注射 Fast DiO 72 h 后 TMN 脑区(白线区域)的显微镜检测  
A: 荧光显微镜  $\times 100$ ; B: 荧光显微镜  $\times 200$ ; C: B 图的可见光检测

见图 2。而 TMN 核团内注射生理盐水, VLPO 脑区未见荧光(结果未显示)。

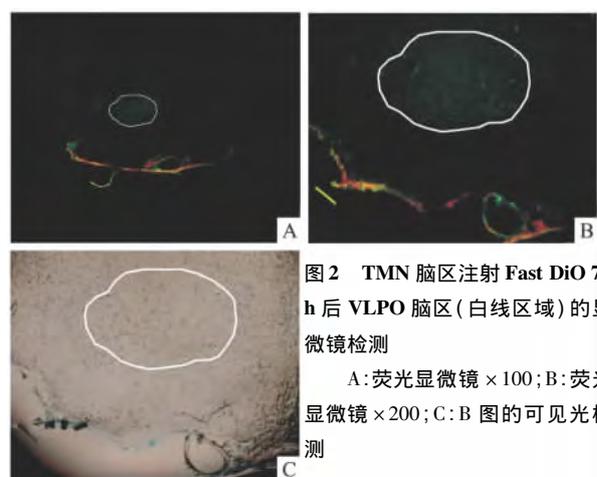


图2 TMN 脑区注射 Fast DiO 72 h 后 VLPO 脑区(白线区域)的显微镜检测  
A: 荧光显微镜  $\times 100$ ; B: 荧光显微镜  $\times 200$ ; C: B 图的可见光检测

## 3 讨论

Saper et al<sup>[5]</sup>曾提出促睡眠神经细胞与促觉醒神经细胞相互抑制的假说,即 flip-flop 模型,其控制着睡眠觉醒之间的时相转换。VLPO 80% 的神经细胞是 GABA 能和甘氨酸能神经细胞,且向脑中与觉醒相关的众多区域发出纤维投射,调节睡眠-觉醒时相间的相互转换<sup>[6]</sup>。下丘脑后部的 TMN 及其邻近区域含有组胺能神经细胞,是该神经细胞在中枢神经系统中聚集的唯一部位,其神经纤维以两条上行和一条下行通路广泛投射至全脑,其中以下丘脑核团,内侧隔核以及斜角带密度最高<sup>[7-8]</sup>。TMN 神经纤维直接向皮质进行投射的同时又间接地通过丘脑-皮质系统和基底前脑的胆碱能神经细胞共同激活皮质,维持觉醒,并同时接受 GABA 能抑制性纤维投射<sup>[7-9]</sup>。

轴浆运输是神经细胞的特性之一。神经细胞不

断地从胞体中将各种成分运输至轴突及其分支,也从支配的靶组织中摄取营养以维持其正常代谢,有效的轴浆运输必须依赖于完整的神经通路。细胞膜荧光探针 Fast DiO 是一种亲脂性荧光探针,可通过细胞膜进入纤维末梢,然后经过轴浆运输达到胞体的荧光探针。与膜结合或者与亲脂性生物分子结合时,其荧光强度显著增强。这种荧光探针可以被神经末梢吞噬,通过逆向轴浆运输到胞体,但是被吞噬后的荧光探针不能从细胞内释放出细胞<sup>[3]</sup>,因此是研究中枢核团中是否存在直接投射的理想工具。Sherin et al<sup>[10]</sup>发现 TMN 脑区有 GABA 能神经细胞末梢,推测此神经末梢来自 VLPO。本研究在 TMN 脑区注射 Fast DiO 荧光探针后,在 VLPO 神经细胞内检测到绿色荧光信号,表明 VLPO 肯定有神经纤维投射至 TMN。另外,在 VLPO 脑区注射 Fast DiO 荧光探针后,在 TMN 神经细胞内也能够检测绿色荧光信号,表明 TMN 也有神经纤维直接投射至 VLPO 脑区。研究<sup>[11]</sup>显示 VLPO 神经细胞可通过抑制 TMN 神经细胞的活动产生促睡眠效应。以上研究结果显示 VLPO 核团与 TMN 核团存在双向联系,进一步支持 Saper et al<sup>[5]</sup>提出的 flip-flop 模型假说。

### 参考文献

[1] Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, et al. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons [J].

*Neurosci* 2000, 20(11): 4217-25.

- [2] 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.
- [3] Zaidi F N, Whitehead M C. Discrete innervation of murine taste buds by peripheral taste neurons [J]. *Neurosci* 2006, 26(32): 8243-53.
- [4] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. San Diego: Academic Press, 2007.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Brown R E, Stevens D R, Haas H L. The physiology of brain histamine [J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 63(6): 637-72.
- [8] Haas H L, Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(2): 121-30.
- [9] Liu Y W, Li J, Ye J H. Histamine regulates activities of neurons in the ventrolateral preoptic nucleus [J]. *J Physiol*, 2010, 588(21): 4103-16.
- [10] Sherin J E, Elmquist J K, Torrealba F, et al. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(12): 4705-21.
- [11] 吴芳, 张瑾, 王烈成, 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进行调控 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志* 2014, 22(2): 97-100.

## The research of direct nerve fiber projections between ventrolateral preoptic nucleus and tuberomammillary nucleus in rats

Ding Ding<sup>1,2</sup>, Ding Rui<sup>1</sup>, Wu Fang<sup>1</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Physiology, School of Basic Medical Science Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Physiology, Anhui Medical College, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the research of the direct nerve fiber projections between ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) and tuberomammillary nucleus (TMN) in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group (ACSF group) and experimental groups (TMN + ACSF&VLPO + DiO group and TMN + DiO&VLPO + ACSF group). Brain stereotaxic technique, microinjection and frozen section technique were used to detect and record the fluorescence signal in TMN and VLPO after injecting fluorescence dye, Fast DiO, into VLPO and TMN, respectively. **Results** In TMN + ACSF&VLPO + DiO group, the green fluorescence signals in TMN could be detected after injected Fast DiO dye 72 h. Meanwhile, in TMN + DiO&VLPO + ACSF group, the green fluorescence signals could be detected in VLPO after injected Fast DiO dye 72 h. **Conclusion** There have bi-directional nerve fiber projection between VLPO and TMN.

**Key words** ventrolateral preoptic nucleus; tuberomammillary nucleus; rat; synapse