

# 大鼠孤束核中神经肽 Y 样神经元与咽肌运动神经元的联系 —PRV 和 NPY 免疫荧光双标记法研究

包新民 舒斯云

(第一军医大学珠江医院神经生物学研究室 广州 510282)

我们以前的工作已经证明支配咽肌运动的运动神经元位于疑核的半致密部<sup>[1]</sup>, 调节咽肌运动神经元的前运动神经元位于孤束核的中间亚核、中介亚核及吻内侧亚核<sup>[2]</sup>。神经肽 Y (NPY) 是广泛分布于周围组织和中枢神经系统的一种多肽。已经证明胃肠道中有 NPY 的胞体和纤维分布<sup>[3,4]</sup>, 孤束核中也有 NPY 分布<sup>[5]</sup>。虽然我们曾观察到孤束核的咽肌前运动神经元中有生长抑素(Somatostatin SOM)样神经元分布, 对疑核的咽肌运动神经元起调控作用<sup>[6]</sup>。但孤束核的咽肌前运动神经元中是否有 NPY 样神经元分布, 尚未见报道。假狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)能沿特异的神经通路跨突触感染, 并可用免疫组化显示 PRV 感染的第二级神经元。随着动物存活期的延长, 还能显示第三级以上神经元<sup>[7]</sup>。因此能直接证明中枢神经系统对某一脏器的神经支配及调控。用免疫组化双标记的方法还能研究这些调控神经元的递质性质。由于 NPY 对胃肠道有多种调节功能, 因此, 研究孤束核的咽肌前运动神经元中是否有 NPY 样神经元的分布, 可进一步阐明中枢神经系统对咽肌的调控。本文用 PRV 和 NPY 免疫荧光双标记方法研究了孤束核中 NPY 神经元和咽肌运动神经元间的联系。

## 材料和方法

实验组用 SD 大鼠 20 只, 体重 310—480 g。腹腔内注射 Ketamine (85 mg/kg) 和 Xylazine (12 mg/kg) 麻醉后, 将动物固定在定位仪上, 腹部向上, 将口腔尽量张开, 向前牵引舌根, 暴露软腭, 直至能清楚地看到悬雍垂为止。沿正中中线切开软腭, 暴露咽部。用

Hamilton 注射器将假狂犬病毒(Bartha 株, Dr.L.W. Enquist 赠送)2—4  $\mu$ l(浓度为  $5 \times 10^8$  plaque forming units/ $\mu$ l)分两点注射于咽肌中。用棉签轻轻擦干净注射部位, 尽量避免污染其他器官。动物存活 48 小时后, 再次在麻醉下向右侧侧脑室内注射秋水仙素 60—80  $\mu$ g, 动物再存活 24—54 小时后, 经心脏灌注取脑, 即先灌注生理盐水 100 ml, 再灌注 PLP 固定液 500 ml。将脑取出后在上述固定液中后固定 1—2 小时, 再放在含 30%蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中, 在冰箱中过夜。冰冻连续冠状切片, 片厚 35  $\mu$ m。然后进行免疫荧光反应, 即将切片放入羊抗 PRV(GB 284, 1:200, LW Enquist 博士赠送)和兔抗 NPY 血清(INCSTAR 公司, 1:3000)中同时孵育 36—48 小时(室温), 再在 FITC 标记的驴抗兔 IgG 和 Rodamine 标记的驴抗羊 IgG(Jackson, 1:200)中同时温育 4 小时(室温)。切片用磷酸盐缓冲液清洗后, 明胶贴片, 干燥后用缓冲甘油封片, 在 Leitz 荧光显微镜下观察、照相。

对照实验: (1) 将生理盐水注射于咽肌, 进行上述实验; (2) 用磷酸盐缓冲液(PBS)代替抗假狂犬病毒血清及抗 NPY 血清进行免疫荧光反应。

## 结 果

PRV 注射于咽肌后进行免疫荧光双标记的动物, 在脑干的孤束核及其周围的网状结构中可见许多阳性标记细胞。PRV 标记的细胞在 3 号滤色片(波长为 550 nm)下呈红色荧光, NPY 标记的细胞在 4 号滤色片(波长为 490 nm)下呈绿色荧光。荧光标记物呈细颗粒状分布在胞浆中。在荧光显微镜下用 4 号滤色片观察时可在孤束核的中介亚核、中间亚核以及周围的网状结构中见到许多 NPY 荧光标记细胞, 多为较小或中等大的卵圆形或多角形细胞, 直径约为 9—20  $\times$  6—12  $\mu$ m, 中央亚核中 标记细

胞较少(图版图1, 3)。转换3号滤色片观察时,可见在孤束核的中介亚核及中间亚核中有许多PRV标记细胞,分布的部位和NPY相似。许多荧光标记细胞既显示PRV荧光,又显示NPY荧光,即为PRV及NPY双标记细胞(图版图2, 4)。

对照实验结果:用生理盐水注射咽部及用PBS代替一抗的动物,脑中均未见阳性标记细胞。

## 讨 论

吞咽运动是由口腔、咽、食道等许多肌肉协调运动完成的复杂动作<sup>[8]</sup>。我们曾用PRV方法观察到调控咽肌运动的前运动神经元位于孤束核的中介亚核、中间亚核和吻内侧亚核及其周围的网状结构中<sup>[2]</sup>。NPY广泛存在于中枢和周围的神经元中。Wattchow等证明人食管的肌丛中有NPY的胞体和纤维存在<sup>[3]</sup>。Berk等在鸽的孤束核中观察到有很多NPY及P物质等神经肽的分布,不同亚核中神经肽的分布不同,可能和不同功能的调节有关<sup>[5]</sup>。本文用免疫荧光双标记法证明孤束核的中介亚核和中间亚核中有许多PRV和NPY双标记细胞。首次证明了孤束核中NPY样神经元和疑核咽肌运动神经元间的联系。

孤束核的咽肌前运动神经元中存在NPY的意义还不大清楚。Aggesteup等观察到人食管下段平滑肌及肠肌丛中有NPY纤维,裂孔疝和食管反流病人的食管平滑肌中NPY纤维很多,但食管弛张不能病人食管中NPY很少,认为NPY可调节食管下部括约肌的功能<sup>[9]</sup>。Geoghegan等向狗的侧脑室内注射NPY后观察到NPY能显著增加假饲、胃和胰腺分泌及胰岛素水平,切断迷走神经后阻断胃液分泌,认为NPY可能为脑相分泌的调节者<sup>[10]</sup>。Sheikh等认为NPY能抑制肠道运动、胃排空、胃酸分泌及胰液分泌,使血管收缩。这些机能可能是通过影响血流、调节神经元控制机制或直接作用于不同机能的细胞来实现的。并认为Y1及

Y2受体可能是NPY调节这些生理作用的结构蛋白<sup>[11]</sup>。Roman等认为NPY对NMDA受体有调节作用,这种作用是通过Sigma或PCP受体的相互作用来实现的<sup>[12]</sup>。本文在咽肌注射PRV后观察到大鼠孤束核中的NPY样神经元可和疑核中的咽肌运动神经元联系,推测孤束核咽肌前运动神经元中的NPY,可能通过受体对疑核中的咽肌运动神经元进行精细调控,以调节咽肌的运动。

## 摘 要

用PRV和NPY免疫荧光双标记法研究了大鼠孤束核中NPY样神经元对咽肌运动神经元的调控。PRV注射大鼠咽肌后,在孤束核的中介亚核和中间亚核中可见许多PRV和NPY双标记细胞。首次证明了大鼠孤束核中的NPY样神经元和咽肌运动神经元的联系。推测NPY可能对咽肌运动的精确调控有关。

**关键词:** 咽 孤束核 神经肽 Y 假狂犬病毒

## 参 考 文 献

- [1] Altschuler, S. M. et al., 1991, *J. Comp Neurol.*, 309(4): 402—414.
- [2] Bao X, et al., 1995, *Brain Res.*, 696(1—2): 246—249.
- [3] Wattchow, D. A. et al., 1987, *Gastroenterology*, 93(6): 1363—1371.
- [4] Aggestrup, S. et al., 1986, *Dig. Dis. Sci.*, 31(12): 1370—1375.
- [5] Berk, M. L. et al., 1993, *J. Comp. Neurol.*, 338(4): 521—548.
- [6] 包新民等, 1996, 第一军医大学学报, 16(3): 183—186.
- [7] Card, J. P. et al., 1990, *J. Neurosci.*, 10: 1974—1994.
- [8] Barret, R. T. et al., 1994, *Gastroenterology*, 107(3): 728—737.
- [9] Aggestrup, S. et al., 1987, *Digestion*, 36(2): 68—73.
- [10] Geoghegan, J. G. et al., 1993, *Gastroenterology*, 105(4): 1069—1077.
- [11] Sheikh, S. P. 1991, *Am. J. Physiol.*, 261(5 pt 1): G 701—715.
- [12] Roman, F. J., et al., 1991, *Neurosci, Lett.*, 122(2): 202—204.

# CONNECTION OF NEUROPEPTIDE Y-LIKE NEURONS IN THE NUCLEUS OF SOLITARY TRACT AND THE MOTOR NEURONS OF PHARYNGEAL MUSCLE IN THE RAT

BAO Xin Min and SHU Si Yun

(Department of Neurobiology, Zhu-Jiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282)

## ABSTRACT

Connection of the neuropeptide Y-like neurons of the nucleus of the solitary tract and the pharyngeal motor neurons in the rat was investigated using PRV and NPY double immunohistochemical fluorescence method. After PRV injection into the pharyngeal muscles, numerous PRV and NPY double labeling cells were observed in the interstitial subnucleus and intermediate subnucleus of the nucleus of solitary tract in the rat. This study offers the first evidence of connection of the NPY neurons and the pharyngeal motor neurons in the rat. It is suggested that NPY may play an important role in the regulation of the motor activity of pharyngeal muscle in the rat.

Key words: Pharynx Nucleus of solitary tract Neuropeptide Y Pseudorabies virus

## 实验技术

### 巨噬细胞细胞内吞过程中膜受体流动性的测量——两种标记受体方法的比较

雷国华\* 朴英杰\* 吴建春\*\* 鲍永耀\*

(\*中心实验室 \*\*南方医院儿科 第一军医大学 广州 510515)

细胞膜表面受体的移动和聚集,对于细胞内吞作用和细胞内信号的产生、传导有重要意义<sup>[1,2]</sup>。内吞作用和细胞内信号产生和传导主要由以下因素决定:第一,配体与细胞膜上相应受体的亲和力;第二,细胞膜上受体的数量;第三,配体-受体复合体在细胞膜上的聚集程度。这些因素与膜上受体的流动性有密切关系<sup>[3,4]</sup>。

利用 FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)技术测量膜受体的流动性,通常采用的是荧光分子直接标记配体(如 ConA-FITC),通过配体与细胞膜表面受体结合来标记受体。这种标记方法适合于测量无内吞效应的细胞或受体的流动性<sup>[5,6]</sup>,但不适合测量细胞内吞过程中膜受体的流动性。本文用 ABC(Avidin Biotin Complex)法<sup>[7,8]</sup>标记巨噬细胞膜受体,通过 FRAP 技术,首次实现了细胞

内吞过程中膜受体流动性的测量。

实验选择巨噬细胞<sup>2</sup>和伴刀豆凝集素 A(Concanavalin A, Con A),比较了用 Con A-Biotin + Avidin-FITC(ABC法)和 Con A-FITC(直接法)标记的巨噬细胞膜表面 Con A受体荧光强度,及静息状态和 ConA 刺激后巨噬细胞膜上 ConA 受体的扩散系数 D(Diffusion Coefficient)和荧光恢复率 R(Recovery)中的差异,并探讨了这两种标记细胞膜受体的方法对测量结果的影响。实验结果表明,ABC 标记方法具有测量灵敏度高、误差小的优点,可以较好地解决直接标记方法在测量细胞内吞过程中受体流动性测量的所遇到的问题。

## 材料和方法

### 一、实验仪器和材料

激光扫描共聚焦显微镜(ACAS 570),改良的