论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1046-03

长时连续作业对大鼠下丘脑及背缝核 orexin-A 和受体的影响

王 臻[1],谌小维[2],张春青[1],樊宏孝[2],程赛宇[1],阮怀珍[1],胡志安[2] (第三军医大学基础医学部:[1]神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,[2]基础医学教学实验中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究长时连续作业对大鼠促觉醒肽 orexin-A 及受体表达的影响。**方法** 使用长时连续作业动物模型,采用免疫组织化学方法结合图像分析技术测定 orexin-A 及受体 OX1R 在下丘脑外侧区,背缝核的变化。**结果** 经过长时连续作业训练后,跑台组与对照组相比,orexin-A 阳性细胞在下丘脑外侧区、orexin-A 阳性纤维在背缝核及 OX1R 在背缝核均显著减少。**结论** 长时连续作业可造成促觉醒肽 orexin-A 和 OX1R 的表达降低。

关键词: 长时连续作业;orexin-A;疲劳;觉醒;免疫组织化学

中图法分类号: R338.27;R341;R446.6 **文献标识码:** A

Effects of long-term continuous operations on orexin-A and OX1R expression in the rat brain

WANG Zhen[1], CHEN Xiao-wei[2], ZHANG Chun-qing[1], FAN Hong-xiao[2], CHENG Sai-yu[1], RUAN Huai-zhen[1], HU Zhi-an[2] ([1]Department of Neurobiology, [2]Experimental Center of Basic Medicine, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of long-term continuous operations on orexin-A and its receptor (OX1R) expression in the lateral hypothalamic area (LHA) and dorsal raphe nucleus (DR) of a rat model. **Methods** Rats exercised for two circadian cycles using a treadmill protocol. Subsequently, immunohistochemical techniques combined with quantitative analysis of images techniques were performed to detect the expression of orexin-A and OX1R in rat LHA and DR. **Results** The number of orexin-A immunoreactive neurons in LHA, orexin-A immunoreactive fibers and OX1R in DR of operational animals was significantly decreased as compared with control group ($P<0.01$). **Conclusion** Rat alertness activities are deleteriously influenced by long-term continuous operations, which may be related to the depressed expression of orexin-A and its receptor in the arousal systems.

Key words: long-term continuous operations; orexin-A; fatigue; wakefulness; immunohistochemistry

在现代生活和现代化高科技战争中,长时间连续的工作已经成为了一种必然[1]。本室前期研究表明,大鼠经过连续作业后,其觉醒时间、夜间的行为活动、警觉能力以及认知功能显著减少或者降低,即长时连续作业可明显损害大鼠的觉醒能力。文献[2]报道,长时间高强度运动可造成多种脑代谢和神经递质的改变。orexin 被认为是维持觉醒状态的一种重要神经肽,orexin 在觉醒控制中的功能已经被广泛认可[3-5]。orexin 通过刺激多个皮层下觉醒系统使皮层激活,这些皮层下觉醒系统包括蓝斑核、背缝核、结节乳头体、非特异性丘脑-皮层投射系统,以及基底前脑的组胺能神经元和胆碱能神经元等[6]。同许多下丘脑后部神经元一样,orexin 能神经元也发出弥散性投射至表达 OXR 受体的大脑皮层。迄今文献尚少见报道长时连续作业对 orexin 系统的影响。本研究通过建立多因素复合的大鼠长时作业模型,以探讨长时连续作业对促觉醒肽 orexin 系统的影响,旨在揭示长时连续作业损害觉醒能力的神经机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 SD 大鼠 14 只,体质量 200~250 g,

基金项目: 第三军医大学军事医学创新预研基金资助项目(XJYY200310) Supported by the Research Foundation for Military Medicine Innovation of Third Military Medical University (XJYY200310)

作者简介: 王 臻(1980-),女,河南省商丘市人,硕士研究生,主要从事睡眠与觉醒方面的研究。电话:(023)68752232,E-mail: tcl0403@eyou.com

通讯作者: 胡志安,电话:(023)68753704, E-mail: zhianhu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-11-24;**修回日期:** 2006-01-05

雄性，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2　主要仪器和试剂　　小动物可调速跑台（天津体育学院运动医学研究所）；羊抗鼠 orexin-A（1∶2 000）为 Santa Cruz 公司产品；兔抗鼠 orexin-R1（1∶100）为 Chemicon 公司产品；正常山羊血清、兔血清、生物素标记 IgG 二抗、辣根酶标记链霉卵白素等均为北京中杉金桥公司产品。

1.2　方法

1.2.1　实验动物饲养条件　　动物饮水，摄食自由。室内环境的明暗周期各为 12 h，07:00 ~ 19:00 为明周期，19:00 ~ 07:00为暗周期。

1.2.2　分组和处理　　实验大鼠习服 3 d 后分为 2 组：对照组 6 只，跑台组 8 只。跑台组大鼠采用连续 48 h（两个昼夜周期）作业模式，即（18 +6）h ×2 模式，每个昼夜周期包括作业阶段和休息阶段两个部分：①跑台作业阶段：第 1 天 19:00 ~ 第 2 天 13:00（18 h），进行跑台训练；②休息阶段：第 2 天 13:00 ~ 19:00（6 h），置于鼠笼中，自由活动，自由摄食水。跑台作业过程：20 min 作业 +20 min 作业暂停，作业和作业暂停视为 1 个周期。跑台参数设定：作业时：坡度 0°，速度 15 m/min；作业暂停时：坡度 0°，速度 7 m/min。作业暂停过程中，跑台速度较为缓慢，由于跑道长约 1 m，则动物每次最多有 9 s 的运动暂停时间，此时运动因素影响作用降到最低，而只是达到睡眠剥夺的目的，此过程称为作业暂停。整个过程中连续给予电刺激，刺激强度 20 V，刺激频率 60 Hz，一旦动物停止运动则会受到电击，可迫使其继续运动。每 4 个周期后将动物置于笼中，自由摄食水 15 min。作业前所有动物均未进行过跑台适应训练。对照组不进行跑台作业，置于鼠笼中，自由活动，但进食水时间和跑台组动物一致。

1.2.3　免疫组织化学方法　　跑台训练结束后当日 21:00 时处死动物进行免疫组化测定。主要步骤为：跑台组及对照组大鼠经 1% 戊巴比妥钠（50 mg/kg）腹腔注射麻醉后，经心脏灌注生理盐水 300 ml，4% 多聚甲醛液（4 ℃）400 ml，开颅取脑，置于 4% 多聚甲醛液（4 ℃）10 h 后固定，再置于 30% 蔗糖多聚甲醛液（4 ℃）中脱水 72 h。冰冻切片机冠状位切片，切片厚 30 μm，按照大鼠脑立体图谱挑选脑片，每个动物的每个部位取材 8 片。脑片在 0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min 2 次，0.3% Triton-X100 漂洗 10 min；3% H_2O_2 灭活 30 min；0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min 2 次，0.3% Triton-X100 漂洗 10 min；正常血清室温孵育 1 h 后直接加入一抗工作液，37 ℃温箱孵育 2 h，4 ℃冰箱过夜；如上漂洗 3 次；脑片加入二抗工作液 37 ℃温箱孵育 3 h；如上漂洗 3 次；三抗工作液 37 ℃温箱孵育 1 h；如上漂洗 3 次；DAB 显色后脱水封片。

1.2.4　图像分析　　利用图像分析系统对每张免疫组织化学染色切片进行定量分析。免疫组织化学染色切片经 Olympus BX60 显微镜观察，经显微镜上配备的数码照相机利用图像摄取软件 Olympus DP Controller2.1.1 摄取图像，图像为 1 360 × 1 024像素，每一帧图像涵盖脑冠状切片左右两侧阳性神经元或阳性纤维，摄取的图像用 Image Pro Plus5.0 图像分析软件进行分析。定量分析每幅图像中免疫反应神经元的数目和累积光密度（IOD）[7]，阳性的神经纤维分析面积和累积光密度（IOD）。

1.3　统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 行 t 检验。

2　结果

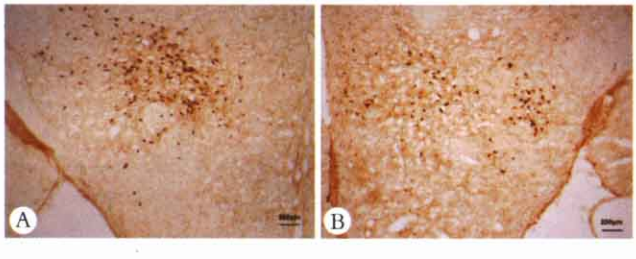
2.1　下丘脑外侧区神经元 orexin-A 的表达

定量分析每张下丘脑外侧区免疫组织化学染色切片，每一帧图像涵盖脑冠状切片左右两侧阳性神经元。光镜下观察到 orexin-A 阳性细胞位于下丘脑外侧区，阳性染色分布于细胞质。观察到对照组 orexin-A 在下丘脑外侧区阳性细胞较多，跑台组 orexin-A 在下丘脑外侧区阳性细胞较少，与对照组相比显著减少（$P < 0.01$，图 1、表 1）。

表 1　orexin-A 和 OX1R 的表达

组别	例数	背缝核 orexin-A		下丘脑外侧区 orexin-A		背缝核 OX1R	
		面积（μm^2）	IOD	个数	IOD	个数	IOD
对照组	6	170 300 ±81 639	9 456 100 ±778 765	72 ±20	3 834 292 ±217 811	230 ±13	6 409 714 ±2 015 364
跑台组	8	34 130 ±14 023[a]	4 431 032 ±264 190[a]	16 ±7[b]	169 944 ±14 228[b]	153 ±30[a]	2 299 862 ±874 022[a]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与对照组比较



A：对照组；B：跑台组

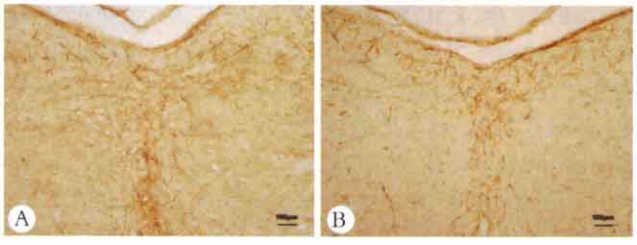
图 1　对照组和跑台组 orexin-A 在下丘脑外侧区神经元的表达　（DAB ×4）

2.2　orexin-A 神经纤维在背缝核的变化

光镜下可见 orexin-A 阳性纤维沿背缝核分布，观察到对照组 orexin-A 在背缝核阳性神经纤维较密集，跑台组 orexin-A 在背缝核阳性神经纤维较稀疏，两者之间存在显著差异（$P < 0.05$，图 2、表 1）。

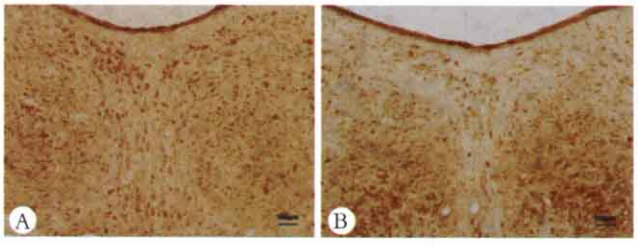
2.3　背缝核 OX1R 的表达变化

阳性细胞 OX1R 呈梨形，从胞体伸出的突起不超过 3 个。其中，对照组 orexin-A 在背缝核阳性神经细胞较多，跑台组 orexin-A 在背缝核阳性神经细胞较少，跑台组减少的数量相对于对照组有统计学意义（$P < 0.05$，图 3、表 1）。



A:对照组; B:跑台组

图2 对照组和跑台组背缝核神经纤维中 orexin-A 的表达 (DAB×10)



A:对照组; B:跑台组

图5 对照组和跑台组背缝核神经元中 OX1R 的表达 (DAB×10)

3 讨论

长时连续作业在日常工作以及军事等多个领域十分普遍,其所引起的一系列不利影响严重干扰了操作人员的工作能力,因此连续作业对机体的影响作用及其不利因素的防护研究已逐渐引起各国研究者的广泛兴趣[8,9]。本室使用的长时连续作业动物模型包含了多种干扰因素,如长时间机体运动因素、躲避电刺激的脑力活动因素(条件反射)、电刺激所致的应激和精神紧张因素以及睡眠剥夺因素等,从而较好地模拟了多种复杂的作业环境(如军事作业等)。长时连续作业可对机体的各种正常功能产生复杂影响,但其核心应该是觉醒能力的下降(即觉醒不良,arousal deficit)和认知功能的受损[10]。但是尚少见报道长时连续作业是如何影响觉醒能力和认知功能的。

新近观点认为,觉醒系统包含觉醒启动区和觉醒调节系统,觉醒启动区主要位于下丘脑外侧区(lateral hypothalamic area, LHA),该结构包含 orexin 能神经元;觉醒调节系统包括蓝斑去甲肾上腺素能、背缝核5-羟色胺能、黑质多巴胺能、基底前脑胆碱能和结节乳头体核组胺能神经元(后者主要参与行为控制)。尽管各个觉醒调节系统本身都具有兴奋皮层和维持觉醒的作用,但其活动的协调性和统一性均需要在下丘脑后外侧区 orexin 能神经元觉醒启动系统的控制下实现。已有文献报道,脑脊液内给予 orexin-A 可以使正常动物觉醒增加和 REM 睡眠减少,将小鼠的 orexin 基因敲除可出现发作性睡病样表现,这些已知的结果证实了 orexin-A 量的改变可以造成觉醒时间的减少和睡眠时间的增多。由此本实验选择下丘脑外侧区和背缝核来观察 orexin-A 和 OX1R 的变化,前者是 orexin 生成的部位,后者是重要的觉醒系统核团。所得结果显示经过长时连续作业后,跑台组大鼠的 orexin-A 阳性细胞在下丘脑外侧区与对照组大鼠的阳性细胞相比减少,同时,在背缝核 orexin-A 阳性纤维跑台组与对照组的阳性纤维相比显著减少;OX1R 在背缝核也显著减少。综合本实验结果可得出如下结论,即长时连续作业引起了 orexin-A 表达的显著减少并造成 orexin-A 纤维支配靶区 OX1R 的明显下调。

本室曾报道,长时连续作业可导致大鼠夜间的行为活动、觉醒时间、警觉能力以及认知功能显著减少或者降低。本实验显示长时连续作业后促觉醒肽 orexin-A 在下丘脑外侧区和背缝核的表达降低及 OX1R 在背缝核数量的下调。鉴于 orexin 系统在觉醒维持方面的关键作用,我们可推测正是促觉醒肽 orexin-A 表达降低,使动物觉醒能力下降,进而影响损害其警觉能力和认知功能。

长时期连续作业是如何通过减低 orexin-A 的生成和 OX1R 的下调来损害觉醒系统的机制还需要进一步研究。

参考文献:

[1] WESTCOTT K J. Modafinil, sleep deprivation, and cognitive function in military and medical settings[J]. Mil Med, 2005, 170(4): 333-335.

[2] 樊双义, 谌小维, 樊宏孝, 等. 长时连续作业对大鼠觉醒能力的损害作用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(21): 2151-2153.

[3] SONG C H, XIA J X, YE J N, *et al*. Signaling pathways of hypocretin-1 actions on pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex[J]. Neuroreport, 2005, 16(13): 1529-1533.

[4] BERRIDGE C W, ESPANA R A. Hypocretins: waking, arousal, or action?[J]. Neuron, 2005, 46(5): 696-698.

[5] XIA J, CHEN X, SONG C, *et al*. Postsynaptic excitation of prefrontal cortical pyramidal neurons by hypocretin-1/orexin a through the inhibition of potassium currents[J]. J Neurosci Res, 2005, 82(5): 729-736.

[6] 宋承辉, 胡志安. Orexin:觉醒通路中一种重要的下丘脑神经肽[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(13): 1207-1209.

[7] SUN G, NARITA K, MURATA T, *et al*. Orexin-A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA expression in hyperphagic rats induced by hypothalamic lesions and lactation[J]. J Neuroendocrinol, 2003, 15(1): 51-60.

[8] BOUTREL B, KOOB G F. What keeps us awake: the neuropharmacology of stimulants and wakefulness-promoting medications[J]. Sleep, 2004, 27(6): 1181-1194.

[9] CALDWELL J A, CALDWELL J L. Fatigue in military aviation: an overview of US military-approved pharmacological countermeasures[J]. Aviat Space Environ Med, 2005, 76(7 Suppl): C39-C51.

[10] LIEBERMAN H R, BATHALON G P, FALCO C M, *et al*. Severe decrements in cognition function and mood induced by sleep loss, heat, dehydration, and undernutrition during simulated combat[J]. Biol Psychiatry, 2005, 57(4): 422-429.

(编辑 龙 亮)