文章编号:1000-5404(2007)02-0105-03

论著

Orexin A 对麻醉大鼠前额叶皮层神经元单位放电的影响及其机制研究

陈伯成[1],赵红梅[2],谌小维[1],薛 丽[1],杨天德[3],胡志安[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生理学教研室,重庆市神经科学研究所,[2]基础医学部基础医学教学实验中心,重庆 400038,[3]新桥医院麻醉科,重庆 400037)

提 要: 目的 研究 orexin A 对麻醉大鼠前额叶皮层神经元自发放电的影响,并初步探讨其作用机制。**方法** 用玻璃微电极记录大鼠前额叶皮层神经元的单位放电,分别观察侧脑室给予 orexin A、组胺 H_1 受体拮抗剂 pyrilamine、以及 pyrilamine + orexin A 后放电活动的变化。**结果** 侧脑室给 orexin A 溶液可明显增加前额叶皮层神经元的自发放电频率;而给 pyrilamine 对前额叶皮层神经元自发放电频率无显著影响;给予 pyrilamine 预处理后,orexin A 未能引起前额叶皮层神经元放电频率发生改变。**结论** Orexin A 对麻醉大鼠前额叶皮层神经元放电活动有明显的兴奋性,这一作用可能与活跃的组胺能系统有关。

关键词: pyrilamine;orexin A;前额叶皮层神经元;单位放电
中图法分类号: Q516;R338.25;R338.8 **文献标识码**: A

Effect of orexin A on single-unit activity in prefrontal cortex of anesthetized rats

CHEN Bo-cheng[1], ZHAO Hong-mei[2], CHEN Xiao-wei[1], XUE Li[1], YANG Tian-de[3], HU Zhi-an[1] ([1]Department of Physiology, [2]Experimental Center, College of Medicine, Chongqing 400038, [3]Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of orexin A on the spontaneous unit discharges of the prefrontal cortical neurons in anesthetized rats. **Methods** The unit discharges of neurons in the prefrontal cortex were recorded by glass microelectrode technique before and after intracerebroventricular injection of orexin A, pyrilamine (a histamine H_1 receptor antagonist), or pyrilamine + orexin A. **Results** Extracellular single-unit recordings were obtained from a total of 55 prefrontal cortical neurons. Orexin A significantly induced the increase of the discharge rate. But no changes of discharge rate were observed after administration of pyrilamine. In contrast, orexin A failed to exert an excitatory action on unit discharges of cortical neurons following pretreatment with pyrilamine in the lateral ventricle. **Conclusion** Orexin A exerts an excitatory action on prefrontal cortical neurons, which probably results from activation of histamine H_1 receptor pathways.

Key words: pyrilamine; orexin A; prefrontal cortical neurons; single-unit firing

目前研究证明,下丘脑神经肽 orexins (orexin A 和 B)是一类重要的促醒肽。orexin 神经元的丢失或受体基因的突变,将引起人、鼠及犬的睡眠紊乱疾病——发作性睡病的发生[1,2]。在生理状态下,外源性给予 orexins 可明显延长和增强觉醒,并减少睡眠[3]。此外,最近 Kushikata 等[4]研究表明侧脑室给予 orexin A 和 B 还可缩短戊巴比妥的麻醉时间,迄今这种麻醉促醒效应的机制并不清楚。已知前额叶皮层(prefrontal cortex)是觉醒水平高度相关的脑区,在脑行使许多高级认知功能如记忆和注意时发挥着重要作用[1,5]。本研究采用玻璃微电极细胞外记录法,首先观察侧脑室给予 orexin A 对麻醉大鼠前额叶皮层神经元活动的影响,随后进一步观察组胺 H_1 受体拮抗剂 pyrilamine 对 orexin A 所引起的皮层神经元反应的影响,以期探讨组胺途径是否参与了 orexin A 对皮层的作用过程。

1 材料与方法

1.1 实验动物及药品

健康成年雌性 SPF 级 SD 大鼠 55 只,由第三军医大学实验

基金项目:国家自然科学基金(30370465),全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA195)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370465) and the General Program of the "Eleventh Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (06MA195)

作者简介:陈伯成(1965-),男,湖北省广水市人,硕士,副主任医师,主要从事麻醉复苏方面的研究,现在广西南宁解放军303医院工作。电话:(0746)3565422-65010
通讯作者:胡志安,电话:(023)68752254,E-mail: zhianhu@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-02-22;修回日期:2006-09-21

动物中心提供,体质量230~270 g。Orexin A和组胺H_1受体拮抗剂pyrilamine购自美国Sigma公司;乌拉坦购于上海元越化工有限公司;人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)(mmol/L):NaCl 126, KCl 2.5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 2, NaH_2PO_4 1.25, $NaHCO_3$ 26, 葡萄糖10, pH 7.4。Orexin A和pyrilamine均用新鲜ACSF配制成溶液;其余试剂为市售分析纯。

1.2 实验分组

大鼠用随机数排序分组法分为4组:①对照组($n=12$),侧脑室给予ACSF;②Orexin A组($n=16$),侧脑室给予4 nmol orexin A;③Pyrilamine组($n=11$),通过侧脑室单独给予150 μg pyrilamine;④Pyrilamine + orexin A组($n=16$):先后分别给予150 μg pyrilamine和4 nmol orexin A。每次给药体积10 μl,给药时间为3 min,pyrilamine和orexin A给药间隔3 min。

1.3 电生理记录

用25%乌拉坦(4 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠。头部固定于江湾Ⅰ型C立体定向仪框架上,调整门齿沟平面高度使其比耳间线平面低2.4 mm。参照Paxinos-Watson图谱(1986),定位侧脑室并插入不锈钢金属套管(直径0.8 mm)。侧脑室坐标:前囟后0.8 mm, 右侧旁开1.6 mm,颅骨表面下3.4 mm。套管用牙托水泥固定。实验时经套管注入药物,具体方法参照文献[6,7]进行。随后定位前额叶皮层:前囟前2.7~4.2 mm, 右侧旁开0.5 mm,颅骨开窗直径为1~1.5 mm,单位放电记录深度为皮层表面以下0.3~4.5 mm。用尖端3~5 μm玻璃微电极,管内充灌3 mol/L KCl溶液作为记录电极,电阻为4~10 MΩ,由微推进仪垂直脑表面插入。前额叶皮层自发放电信号经微电极放大器输入RM6240多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂)示波记录,同时监听放电。在每次给药前,神经元自发放电需至少稳定10 min,给药后持续记录放电活动30 min,每隔3 min统计1次放电频率平均值,并作频率直方图处理(采样bin宽10 s)。

1.4 统计学处理

单位放电频率用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0软件进行配对t检验。

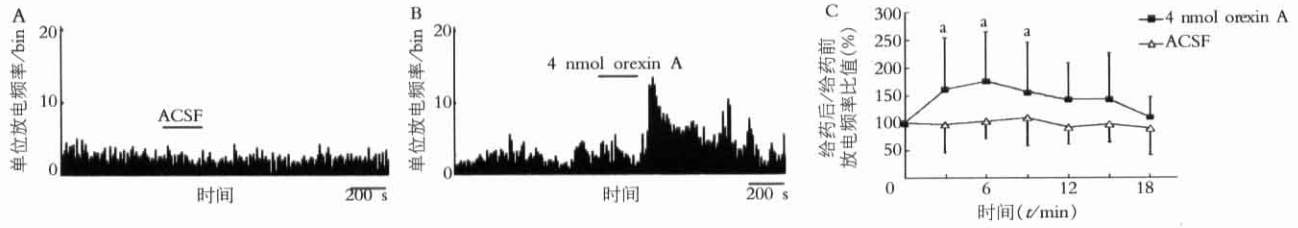
2 结果

2.1 Orexin A对麻醉大鼠前额叶皮层神经元电活动的兴奋作用

待自发放电至少稳定10 min后,经侧脑室注入4 nmol orexin A溶液。如图1所示,orexin A可明显增加前额叶皮层神经元的发放频率($n=16$),在6 min内达到高峰,与基础值比较,给药结束后前9 min各时间段明显增加($P<0.05$)。相反,对照组给予同体积ACSF,所记录的神经元放电活动并无显著变化($n=12$, $P>0.05$)。

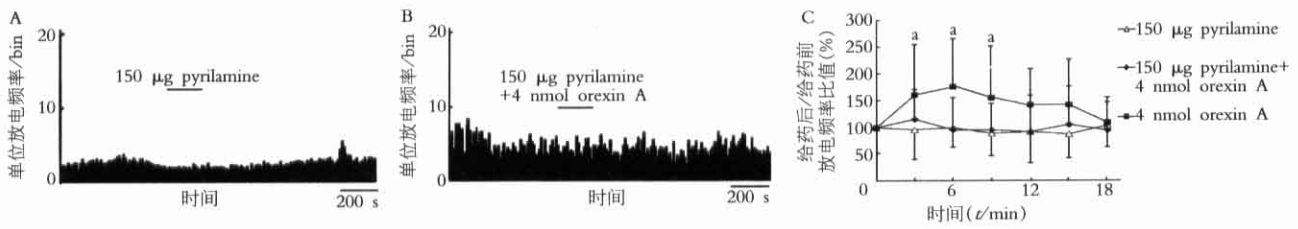
2.2 组胺H_1受体拮抗剂pyrilamine对orexin A兴奋前额叶皮层神经元电活动的抑制效应

实验中,首先通过侧脑室单独给150 μg pyrilamine,如图2A所示,对额叶皮层放电频率无明显影响($n=11$, $P>0.05$)。然后,侧脑室先给予150 μg pyrilamine预处理,紧接着再给4 nmol orexin A溶液,给药前后皮层神经元放电频率并无显著变化($n=16$, $P>0.05$)(图2B、C)。



A: 对照组; B: orexin A组; C: 给药后/给药前放电频率比值-时间图 a: $P<0.05$,与给药前比较

图1 Orexin A对麻醉大鼠前额叶皮层神经元电活动的兴奋作用



A: pyrilamine组; B: pyrilamine + orexin A组; C: 给药后/给药前放电频率比值-时间图 a: $P<0.05$,与给药前比较

图2 Pyrilamine对orexin A兴奋前额叶皮层神经元电活动的抑制作用

3 讨论

本研究采用玻璃微电极细胞外记录的方法观察了orexin A对前额叶皮层神经元的单位放电活动的影响情况。结果表明,侧脑室给予orexin A可引起乌拉坦麻醉大鼠前额叶皮层神经元放电频率明显增加。此

外，已有行为学证据显示，orexin A 具有缩短戊巴比妥钠麻醉时间促觉醒效应[4]。我们的研究结果进一步从电生理学上证实了 orexin A 在麻醉中的促醒作用，同时也提示了这种促醒效应可能与前额叶皮层脑区的活动增强有关。然而，关于 orexin A 影响麻醉大鼠前额叶皮层放电活动的机制目前了解甚少。

研究表明，orexins 既可通过纤维投射直接兴奋皮层[5,8]，又能通过间接途径来调节皮层活动，而在间接途径中又主要涉及皮层下的组胺能系统、去甲肾上腺素能系统和背缝核 5-羟色胺能系统等相关觉醒脑区[1,2]。采用侧脑室给药，这两种途径都可能涉及，在本实验中，我们特别关注的是组胺能途径在 orexins 麻醉促醒中的可能作用。结果显示，单独给予 H_1 受体拮抗剂 pyrilamine 对皮层神经元放电没有显著影响，提示 pyrilamine 对前额叶皮层放电活动并无影响。进一步研究表明，pyrilamine 预处理后，orexin A 并不能影响前额叶皮层放电活动，表明 orexins 的皮层兴奋作用与活化的组胺能系统相关。实际上，到目前为止已有较多的文献报道了 orexin 能神经元与组胺能系统间的相互关系。研究证实，orexin 能纤维与结节乳头体核的组胺能神经元间存在直接的突触联系[2]，且 orexins 能够兴奋分离的组胺能神经元。此外，微透析方法显示了 orexin A 可以增加下丘脑结节乳头体核和额叶皮层的组胺释放[9,10]。特别是，行为学研究表明组胺受体拮抗剂可阻断 orexin A 的促觉醒效应[2]。因此，现已可以基本确定 orexins 的促皮层兴奋作用与组胺能途径有关。

本实验在在体条件下，通过电生理的方法揭示了组胺系统介导 orexin A 的皮层兴奋效应，从而部分地弄清了 orexin A 麻醉促醒效应的皮层兴奋机制，即 orexin A 麻醉催醒作用的神经药理机制可能是首先通过兴奋组胺途径，以此间接地激活皮层神经元神经，从而最终达促进觉醒、逆转麻醉。然而，orexin A 的这一作用是否还涉及直接途径与其他皮层下觉醒调节系统有待进一步实验证明。

参考文献：

[1] Jones B E. Arousal systems [J]. Front Biosci, 2003, 8: 438 - 451.

[2] Sutcliffe J G, De-Lecea L. The hypocretins: setting the arousal threshold [J]. Nat Rev Neurosci, 2002, 3(5): 339 - 349.

[3] Shigemoto Y, Fujii Y, Shinomiya K, *et al*. Participation of histaminergic H_1 and noradrenergic alpha 1 receptors in orexin A-induced wakefulness in rats [J]. Brain Res, 2004, 1023(1): 121 - 125.

[4] Kushikata T, Hirota K, Yoshida H, *et al*. Orexinergic neurons and barbiturate anesthesia [J]. Neuroscience, 2003, 121(4): 855 - 863.

[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] 贾晓军，王艳芳，赵红梅，等. Orexin-A 对急性乙醇中毒昏迷大鼠的实验性促醒疗效研究 [J]. 第三军医大学学报，2006，28(8)：750 - 752.

[7] 陈伯成，赵红梅，谌小维，等. 纳洛酮对麻醉大鼠前额叶皮层神经元单位放电的影响及其机制研究 [J]. 第三军医大学学报，2005，27(23)：2324 - 2327.

[8] 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.

[9] Huang Z L, Qu W M, Li W D, *et al*. Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(17): 9965 - 9970.

[10] Hong Z Y, Huang Z L, Qu W M, *et al*. Orexin A promotes histamine, but not norepinephrine or serotonin, release in frontal cortex of mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(2): 155 - 159.

（编辑　汪勤俭）

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价，确定文献的检索范围，提高检索结果的适用性，每一篇文章或资料应标识一个文献标识码。一般按照以下 5 种标准：

A：理论与应用研究学术论文（包括综述报告）

B：实用性技术成果报告（开发）、理论学习与社会实践总结（注释）

C：业务指导与技术管理性文章（包括领导讲话、指示决定等）

D：一般动态性信息（通讯、服道、会议活动、专访等）

E：文件、资料（包括历史资料、统计资料、机构、人物、书目、知识介绍等）

不属于上述各类的文章以及文摘、要讯、启白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部