文章编号:1000-5404(2010)08-0767-03

论著

# 外侧下丘脑 orexin 能神经元区微注射腺苷对大鼠睡眠-觉醒周期的影响

寸艳萍,夏建霞,李 洋,胡志安 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆市神经科学研究所)

**[摘要]** **目的** 探讨外侧下丘脑 orexin 能神经元区微注射腺苷对 SD 大鼠睡眠-觉醒周期的影响。**方法** 选用成年雄性 SD 大鼠 14 只,按 3 种不同的给药模式在外侧下丘脑 orexin 能神经元区分别微注射 1、10、20 nmol/μl 腺苷,以人工脑脊液为自身对照,然后采用脑电机同步记录大鼠的脑电和肌电活动,观察外侧下丘脑区微注射腺苷后大鼠睡眠-觉醒周期的变化。**结果** 与人工脑脊液自身对照相比,在大鼠外侧下丘脑分别微注射 1、10 nmol/μl 和 20 nmol/μl 腺苷后的 3 h 内,大鼠觉醒时间明显减少到人工脑脊液自身对照的 84%、62% 和 60%,并且大鼠睡眠时间均有不同程度的延长($P<0.05$)。在微注射 20 nmol/μl 腺苷后,大鼠觉醒时间持续减少了 3 h,并且与微注射 1、10 nmol/μl 腺苷后相比,其觉醒时间的减少和 NREM/REM 睡眠时间的增加也最明显。**结论** 在外侧下丘脑 orexin 能神经元区微注射腺苷促进大鼠睡眠。

**[关键词]** 腺苷;外侧下丘脑;orexin 能神经元
**[中图法分类号]** R338.24;R338.63;R977.4 **[文献标志码]** A

# Microinjection of adenosine into orexinergic zone of lateral hypothalamus on sleep-wake cycle in rats

Cun Yanping, Xia Jianxia, Li Yang, Hu Zhi'an (Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of extragenous adenosine (AD) by microinjection in the orexinergic area of rat lateral hypothalamus (LH) on the sleep-wake cycle. **Methods** A total of 14 male SD rats were given 1, 10 or 20 nmol AD and artificial cerebrospinal fluid (aCSF) as own control through three different models of microinjections into the LH. Their electroencephalogram (EEG) and electromyogram (EMG) were recorded by a polygraph recording instrument to observe the changes of sleep-wake after microinjections. **Results** AD administration to LH at doses of 1, 10 and 20 nmol decreased the total amount of wakefulness by 84%, 62% and 60% fold during that first 3-hour recording period and concomitantly increased non rapid eye movement (NREM) and REM sleep, when compared with aCSF treatment. The sleep-inducing effect was maintained even in 3 hour after the 20 nmol AD microinjection. The maximal sleep-inducing effect was obtained at the 20 nmol dose of AD administration into the orexinergic LH ($P<0.05$). **Conclusion** Unilateral microinjection of AD into orexinergic zone of LH promotes NREM/REM sleep of rats.

**[Key words]** adenosine; lateral hypothalamus; orexin neurons

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670668) and the Tackling Program of "Eleventh Five-Year Plan" Science and Technology of PLA (08G080);
Corresponding author: Hu Zhi'an, Tel: 86-23-68752254, E-mail: zhianhu@yahoo.com.cn

orexin 神经元胞体位于下丘脑侧下及穹窿周围区核团,数量仅约数千个,但其纤维及受体分布却十分广泛,又有明显的投射投向多个脑区。中枢 orexin 系统对觉醒起关键作用:orexin 能神经元密集地投向参与睡眠调控的脑区[1,2];orexin 基因敲除小鼠或其受体基因自发突变后导致发作性睡病样表型,包括猝倒和病态快速动眼(rapid eye movement, REM)睡眠[3,4]。另外,发作性睡病患者脑脊液及血浆中 orexin 水平也有降低[5]。外侧下丘脑的 orexin 神经元不仅作为觉醒激动系统中的一个结构参与觉醒促进作用,而且还通过对其他觉醒启动系统的统一控制实现睡眠-觉醒的调控。因此,研究下丘脑后外侧区的 orexin 神经元对探索睡眠-觉醒调节机制有重要意义。

腺苷(adenosine,AD)是广泛存在于中枢神经系统的一种小分子物质,属于中枢抑制性递质,具有强烈抑制胆碱能和谷氨酸能神经元的功能。腺苷为生理性睡眠因子,当全身或脑区局部给予腺苷或腺苷受体拟似剂(N6-cyclopentyladenosine, CPA)时均可诱发睡眠。传统观点认为腺苷的作用位点主要位于基底前脑,但

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30670668);全军"十一五"科技攻关项目(08G080)
**[通信作者]** 胡志安,电话:(023)68752254, E-mail:zhianhu@yahoo.com.cn

是最近一项下丘脑切片的膜片钳实验证明,在外侧下丘脑这个觉醒促进区给外源性腺苷后,会抑制 orexin 能神经元的活性[6,7]。本实验采用多导睡眠记录和微注射技术,研究外侧下丘脑 orexin 能神经元区微注射腺苷对大鼠睡眠-觉醒周期的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康成年雄性 Sprague-dawley(SD)大鼠 14 只,体质量 250~300 g,由本校实验动物中心提供。动物所处实验环境为:温度保持在22 ℃,室内光线自动控制在日间:夜间为12:12(早上 8 时灯亮),动物自由获取水和食物。手术前大鼠习服 10 d。

### 1.2 主要试剂

人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid,aCSF)(mmol/L):NaCl 124,KCl 3,$CaCl_2$ 2,$MgCl_2$ 2,$NaH_2PO_4$ 1.23,$NaHCO_3$ 26,D-glucose 10。AD 由美国 Sigma 公司提供。实验当天腺苷用新鲜 aCSF 配制成终浓度 1、10 mmol/L 和 20 mmol/L,放 4 ℃ 冰箱备用。羊多克隆抗 orexin-A 抗体,由美国 Sigma 公司提供。PV-9003 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购于北京中山金桥生物技术有限公司。

### 1.3 微注射模式

在每只大鼠的外侧下丘脑单侧微注射腺苷,以 aCSF 为自身对照,多导睡眠记录分析。将 14 只 SD 大鼠按照 3 种不同的模式给药。模式 1:3 只大鼠,在连续 4 d 分别微注射 1 μl 的 aCSF、AD(1 nmol/μl)、AD(10 nmol/μl)和 aCSF;模式 2:4 只大鼠,在连续 4 d 分别微注射 1 μl 的 AD(10 nmol/μl)、aCSF、AD(1 nmol/μl)和 aCSF;模式 3:7 只大鼠,在连续 4 d 分别微注射 1 μl 的 aCSF、AD(20 nmol/μl)、aCSF 和 AD(20 nmol/μl)。微注射均在每天的 9:30~10:00 进行,微注射速度为 0.2μl/min,微注射结束后 10:00 开始持续记录大鼠脑电和肌电活动。

### 1.4 手术方法

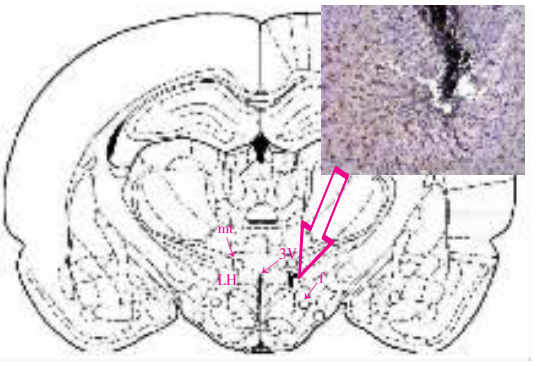
将 SD 大鼠经戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后,固定于脑立体定位仪上,暴露颅骨,按照 Paxinos 和 Watson 的大鼠脑立体定位图谱,在外侧下丘脑(前囟后 -3.3 mm,中线旁 1.5 mm,深度8.5 mm)处安置导药管。分别于冠状缝前 2 mm,左侧旁开2 mm 和人字缝前 1 mm,右侧旁开 4 mm 安置脑电电极;于双侧颈肌内分别插入肌电电极记录肌电图(EMG)。所有脑电、肌电电极和微量注射用外套管均用牙科粉固定于颅骨表面[8]。术后恢复 7 d。

### 1.5 多导睡眠图记录及分析标准

记录电极通过屏蔽导线连接到脑电图机上,同步记录脑电图(EEG)和肌电图(EMG)。皮质 EEG/EMG 信号经过放大、过滤(EEG 0.5~30 Hz;EMG 20~200 Hz),再用软件 SLEEPSIGN 以 128 Hz 扫描速度进行数字化、记录[8]。以 10 s 为 1 个分段时间,睡眠-觉醒周期分为:①觉醒期(wake,W):以额-枕叶引导出低幅快波脑电和明显的肌电活动为特征;②非快速眼动(non-rapid eye movement, NREM)睡眠:以睡眠的梭形波和高幅慢波为特征,肌电活动明显减少;③REM 睡眠:以低幅快波为特征,无明显的肌电活动。

### 1.6 组织学鉴定

实验结束后,用戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉动物,灌注固定断头取脑,放于 30% 蔗糖多聚甲醛中 4 ℃保存。待沉底后,用冷冻切片机做 30 μm 厚的冠状切片,orexin-A 免疫组化染色,免疫组织化学证实所有的微注射位点位于外侧下丘脑 orexin 能神经元区。在冠状示意图上显示了每只大鼠微注射尖端的位置,图 1 中的显微照片清楚地展示了微注射位点位于外侧下丘脑 orexin 能神经元区。




f:穹窿;LH:外侧下丘脑;mt:乳头丘脑束;3V:第三脑室

**图 1 外侧下丘脑微注射位点组织学鉴定**

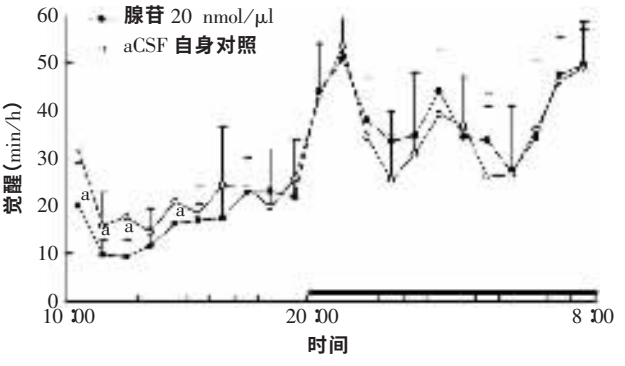
(小图:SABC ×100)

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析和 Bonferroni's post hoc 检验。

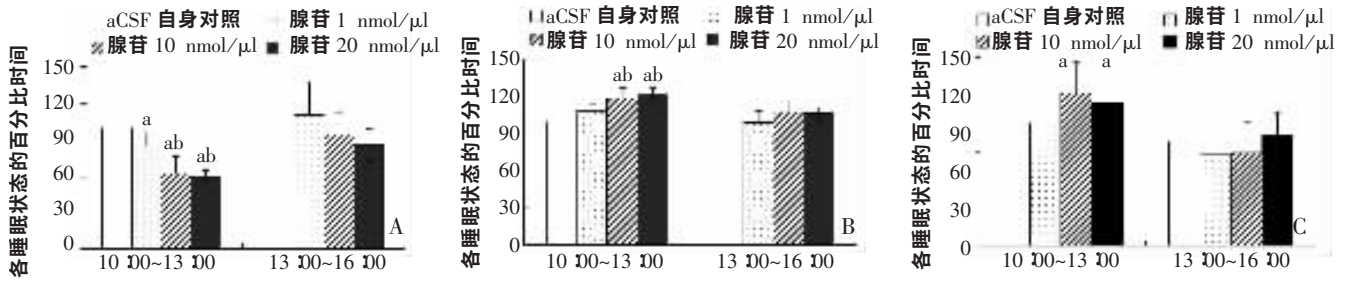
## 2 结果

在外侧下丘脑区微注射后,分别对 SD 大鼠 aCSF 自身对照和腺苷给药后的觉醒、NREM 和 REM 睡眠状态进行了分析。采用单因素方差分析和 Bonferroni's post hoc 检验,与 aCSF 自身对照相比,在给大鼠外侧下丘脑单侧微注射腺苷 20 nmol/μl 的第 1、2、3 小时内,腺苷明显减少觉醒时间($P<0.05$),分别减少到 aCSF 自身对照的 63%、61% 和 53%。并且在腺苷给药后的第 5 小时大鼠觉醒时间明显降低至 aCSF 自身对照的 78%。觉醒时间减少的同时伴有 NREM 和 REM 睡眠时间的增加。在其他时间段 aCSF 自身对照和腺苷给药后的觉醒时间、NREM 和 REM 睡眠时间的差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图 2。




a:$P<0.05$,与 aCSF 自身对照比较

**图 2 微注射腺苷后大鼠的觉醒周期变化情况**




A:6 h 内大鼠觉醒时间; B:6 h 内大鼠 NREM 睡眠时间;C:6 h 内大鼠 REM 睡眠时间

a:$P<0.05$,与 aCSF 自身对照比较; b:$P<0.05$,与腺苷 1 nmol/μl 组比较

**图 3　微注射后 6 h 内大鼠的总睡眠觉醒时间变化**

微注射腺苷 1、10、20 nmol/μl 后的 0 ~ 3 h 内觉醒时间分别为 aCSF 自身对照的 84%、62% 和 60%;并且在 10、20 nmol/μl 的高剂量腺苷给药后还伴有 NREM 和 REM 睡眠的显著增加。微注射腺苷 10、20 nmol/μl 分别与微注射腺苷 1 nmol/μl 相比,觉醒时间明显减少($P<0.05$),而 NREM 睡眠时间明显增加($P<0.05$),REM 睡眠时间无显著变化($P>0.05$)。在 3 ~ 6 h 内 SD 大鼠 aCSF 自身对照和腺苷给药后的觉醒时间、NREM 和 REM 睡眠时间没有统计学差异($P>0.05$)。见图 3。

## 3　讨论

外侧下丘脑 orexin 能神经元主要密集地投向参与睡眠调控的脑区,并且中枢 orexin 系统对睡眠-觉醒周期的调控起关键作用[1,9]。腺苷作为中枢神经系统内的一种能量代谢产物,随着神经元活动的增加而逐渐在脑内积聚。有报道显示外侧下丘脑 orexin 能神经元上表达腺苷 $A_1$受体[10];以往脑片膜片钳文献报道腺苷能抑制 orexin 能神经元活动[7]。腺苷作用于外侧下丘脑 orexin 能神经元区是否影响睡眠觉醒周期仍不清楚。

本实验结果显示,外侧下丘脑 orexin 能神经元区微注射给予不同剂量的腺苷后,均可以不同程度的引起觉醒时间的减少、NREM 和 REM 睡眠时间的增加;并且微注射 1、10、20 nmol/μl 剂量的腺苷引起大鼠觉醒的减少和睡眠的增加呈剂量依赖性。此结果与下丘脑脑片膜片钳报道[6]腺苷通过腺苷 $A_1$受体抑制 orexin 能神经元活动的论断相吻合。由此推断,在外侧下丘脑 orexin 能神经元区腺苷通过 $A_1$受体抑制 orexin 能神经元活动,从而引起睡眠增多,觉醒减少。该结论同在大鼠视前区[11]、基底前脑[12]以及前额叶[13]等脑区的腺苷作用结论相一致。这些结果提示外侧下丘脑和基底前脑一样也是腺苷发挥促睡眠作用的另一重要靶区。下一阶段我们将探讨生理状态下外侧下丘脑 orexin 能神经元区腺苷水平的变化情况,进一步观察腺苷和 orexin 能神经元的相互作用,深入了解它们对睡眠觉醒周期的影响。

## 参考文献:

[1] Peyron C, Tighe D K, van-den-Pol A N, *et al*. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems[J]. J Neurosci, 1998, 18(23): 9996 - 10015.

[2] Marcus J N, Aschkenasi C J, Lee C E, *et al*. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain[J]. J Comp Neurol, 2001, 435(1): 6 - 25.

[3] Chemelli R M, Willie J T, Sinton C M, *et al*. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation[J]. Cell, 1999, 98(4): 437 - 451.

[4] Lin L, Faraco J, Li R, *et al*. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene[J]. Cell, 1999, 98 (3): 365 - 376.

[5] Nishino S, Ripley B, Overeem S, *et al*. Low cerebrospinal fluid hypocretin (Orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy [J]. Ann Neurol, 2001, 50(3): 381 - 388.

[6] Liu Z W, Gao X B. Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect[J]. J Neurophysiol, 2007, 97(1): 837 - 848.

[7] Xia J, Chen F, Ye J, *et al*. Activity-dependent release of adenosine inhibits the glutamatergic synaptic transmission and plasticity in the hypothalamic hypocretin/orexin neurons[J]. Neuroscience, 2009, 162 (4): 980 - 988.

[8] Huang Z L, Sato Y, Mochizuki T, *et al*. Prostaglandin E2 activates the histaminergic system *via* the EP4 receptor to induce wakefulness in rats [J]. J Neurosci, 2003, 23(14): 5975 - 5983.

[9] Postnova S, Voigt K, Braun H A. A mathematical model of homeostatic regulation of sleep-wake cycles by hypocretin/orexin[J]. J Biol Rhythms, 2009, 24(6): 523 - 535.

[10] Thakkar M M, Winston S, McCarley R W. Orexin neurons of the hypothalamus express adenosine A1 receptors[J]. Brain Res, 2002, 944(1/2): 190 - 194.

[11] Methippara M M, Kumar S, Alam M N, *et al*. Effects on sleep of microdialysis of adenosine A1 and A2a receptor analogs into the lateral preoptic area of rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 289(6): 1715 - 1723.

[12] Arrigoni E, Chamberlin N L, Saper C B, *et al*. Adenosine inhibits basal forebrain cholinergic and noncholinergic neurons *in vitro*[J]. Neuroscience, 2006, 140(2): 403 - 413.

[13] 闫洁, 陈芳, 贾晓军, 等. 腺苷对小鼠前额叶皮质锥体细胞超极化激活阳离子电流的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30 (10): 903 - 905.

(收稿:2009-11-17;修回:2010-01-08)

(编辑　邓强庭)