文章编号:1000-5404(2012)08-0715-04

论著

内侧内嗅皮层微注射 Orexin-A 对大鼠睡眠-觉醒及空间记忆的影响

齐爱萍,何 超,夏建霞,张 丹,陈 芳,阎 洁,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** 探讨内嗅皮层注射 Orexin-A 对 Sprague-dawley(SD)大鼠睡眠-觉醒周期以及对空间记忆的影响。**方法** 选用健康成年雄性 SD 大鼠 45 只,体质量 250~300 g,采用同步记录大鼠脑电和肌电活动,观察 Orexin-A 及 Orexin1 受体阻断剂 SB-334867 内侧内嗅皮层微注射后大鼠睡眠-觉醒周期变化。采用 T-迷宫交替选择次数,观察 SB-334867 内侧内嗅皮层微注射后大鼠 T-迷宫选择正确率的变化。**结果** 以人工脑脊液(ACSF)、二甲亚砜(DMSO)自身对照相比,分别给予大鼠内侧内嗅皮层双侧微注射 Orexin A 及 SB-334867 0.5 μl 后 3 h(11:00-12:00、12:00-13:00、13:00-14:00)觉醒周期时间无影响($P>0.05$),给药后 24 h 觉醒周期时间也无显著差异($P>0.05$)。微量注射药物后,Orexin-A(0.1 nmol/0.5 μl)及 SB-733467(6 mmol/0.5 μl)在11:00-14:00 3 h 内对觉醒时间、NREM 时间及 REM 时间均无影响($P>0.05$),即对3 h 内(11:00-14:00)大鼠总睡眠觉醒时间无显著性差异($P>0.05$)。与 DMSO 组比较大鼠内侧内嗅皮层双侧微注射 SB-334867 0.5 μl 后,T-迷宫交替选择正确次数明显减少,正确率下降,有显著性差异($P<0.001$)。**结论** 内侧内嗅皮层 Orexin 系统的支配可能参与了空间记忆,而不参与睡眠-觉醒周期调节。

[关键词] Orexin-A;内侧内嗅皮层;空间记忆
[中图法分类号] R338.25;R338.6;R341 [文献标志码] A

Effect of Orexin-A injected into medial entorhinal cortex of rats on sleep-wakefulness and spatial memory

Qi Aiping, He Chao, Xia Jianxia, Zhang Dan, Chen Fang, Yan Jie, Hu Zhi'an (Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of Orexin-A injected into medial entorhinal cortex (MEC) of rats on sleep-wake cycle and spatial memory of SD rats. **Methods** Forty-five healthy adult male SD rats, weighing 250 to 300 g, were included in this study. Their cerebral and myoelectrical activities were synchronically recorded, their sleep-wake cycle and accuracy rate of alternative selection in T-maze were observed after injection of Orexin-A and SB-334867. **Results** Oexin-A and SB-334867 showed no significant effect on sleep-wake cycle, NREM and REM sleep time of rats 3 h after they were injected into MEC of rats compared with that of ACSF and DMSO($P>0.05$). However, the accuracy rate of alternative selection in T-maze was significantly lower after injection of SB-733467 than after injection of DMSO($P<0.001$). **Conclusion** The Orexin system in MEC may be involved in spatial memory but not in sleep-wake cycle.

[**Key words**] Orexin-A;medial entorhinal cortex;spatial memory

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81071074). Corresponding author:Hu Zhi'an, Tel:86-23-68752254, E-mail:zhianhu@yahoo.com.cn

Orexin 是外侧下丘脑 Orexin 神经元产生的神经肽,有两个单体:Orexin-A 和 Orexin-B。大量研究报道,Orexin 系统通过兴奋皮层下促觉醒的核团启动和维持脑觉醒的过程[1-2]。新近报道 Orexin 系统还可支配认知功能相关脑区,包括前额叶皮层、隔海马区、基底前脑和海马,进而参与空间学习记忆等认知过程[3]。内嗅皮层(entorhinal cortex,EC)在海马和联合皮层的双向信息交流中起着接替站的作用。EC 浅层主要神经元接受新皮层的输入,投射至海马。深层主要接受海马(cornu ammonis area 1,CA1)和下托的输入,将其传回至新皮层。EC 可分为外侧内嗅皮层(lateral entorhinal cortex,LEC)和内侧内嗅皮层(medial entorhinal cortex,MEC)。目前认为 MEC 主要参与传递和处理空间信息,在空间学习记忆功能中具有重要的意义[4-5]。本实验室前期研究显示 MEC 浅层的主要神经元表达 Orexin 受体(Orexin receptors,OXR)——OX1R 和 OX2R。离体膜片钳实验证实 Orexin-A 能够

[基金项目] 国家自然科学基金(81071074)
[通信作者] 胡志安,电话:(023)68752254;E-mail:zhianhu@yahoo.com.cn

通过 OX1R 兴奋 MEC 主要神经元,增强其突触传递。然而,Orexin-A 在 MEC 对大鼠行为功能的影响还不清楚。因此,本研究首先采用脑电肌电记录方法,观测了外源性给予 Orexin-A 以及 OX1 受体阻断剂对睡眠-觉醒周期的影响;随后采用 T-迷宫模型,检测了 Orexin-A 对空间学习记忆的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性 SD 大鼠 45 只,体质量 250 ~ 300 g,由第三军医大学实验动物中心提供。分为 2 大组:睡眠-觉醒(两组对照组与给药组共 24 只),空间记忆(对照组与给药组共 21 只)。动物分笼饲养,12 h/12 h 明暗周期,动物自由获取水和食物。

1.2 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。DMSO 由上海西宝生物科技有限公司提供。Orexin-A:溶于 ACSF, SB-334867:溶于 DMSO,均由美国 Sigma 公司提供。

1.3 方法

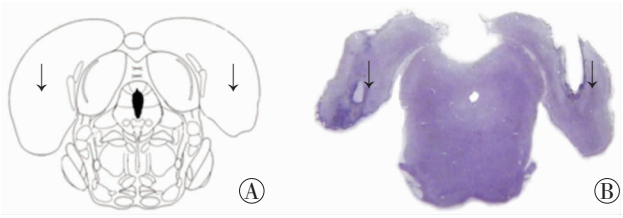
1.3.1 大鼠头部电极,套管埋置手术 经戊巴比妥钠(50 ml/kg)腹腔麻醉 SD 大鼠,固定于立体定位仪上,手术区皮肤消毒,暴露颅骨,按照 Paxinos 和 Watson 的大鼠脑立体定位图谱,在内嗅皮层(前囟后 8.4 mm,中线旁左右旁开 4.4 mm,深度 5.2 mm)处埋置药物注射套管。分别于冠状缝前 2 mm 和人字缝前 1 mm,右侧 4 mm 安置脑电电极;与双侧颈肌内分别插入肌电电极记录肌电图(EMG)。将暴露的脑电电极,肌电电极,套管及固定螺丝均用牙科粉固定于颅骨上。术后腹腔注射抗生素,恢复 7 ~ 10 d。

1.3.2 微注射模式 在第 1 组大鼠(6 只)内侧内嗅皮层双侧微注射 Orexin-A 0.1 nmol/0.5 μl,以 ACSF 为自身对照,经多导睡眠系统记录 24 h 并进行分析。分别记录常规睡眠 24 h 后,微注射 ACSF,记录 24 h;48 h 后再微注射 Orexin-A,平均每天在 10:30 – 11:00 进行微量注射,注射速度 0.5 μl/min,注射完成后 11:00 开始记录,用 SleepSigh 软件记录脑电、肌电 24 h。同样,在第 2 组大鼠(6 只)内侧内嗅皮层双侧微注射 Orexin1 受体阻断剂 SB-334867 6 mmol/0.5 μl,以 DMSO 为自身对照,经多导睡眠系统记录 24 h 并进行分析。分别记录常规睡眠24 h 后,微注射 DMSO,记录 24 h;48 h 后再微注射 SB-334867。平均每天在 10:30 – 11:00 进行微量注射,注射速度 0.5 μl/min,注射完成后 11:00 开始记录,用 SleepSigh 软件记录脑电、肌电 24 h。

1.3.3 脑电、肌电数据分析 记录结束后,运用 SleepSigh 分析软件进行结果数据分析处理。EEG/EMG 信号经放大,过滤(EEG 0.5 ~ 30 Hz;EMG 20 ~ 200 Hz),再用分析软件 SleepSigh 以 128 Hz 扫描速度进行数字化,记录。以 10 s 为一个分析阶段时间,睡觉-觉醒周期:觉醒期(wake, W):脑电出现低振幅高频率,波形不规则;肌电波动明显。非快速眼动(non-rapid eye movement, NREM)睡眠:脑电振幅较高,频率低,较规则(大脑皮质出现同步化高幅低频脑电波);肌电平稳,波动明显减少。快速眼动(rapid eye movement, REM)睡眠:低振幅快波为主要特征,无明显的肌电波动[6]。

1.3.4 T-迷宫训练 SD 成年雄性大鼠进行 mEC 区导管埋植手术,术后恢复 7 d 进行 T-迷宫适应 4 d,在适应期限制其摄食使体质量保持在实验前 80% ~90%。第 12 天开始正式的训练,2 次/d,首次选择臂均放食物(约为 45 mg)。在随后的 11 次选择中,动物必须交替选择才能得到食物的奖赏。若选择错误则得不到食物奖赏,直到其选择正确为止。训练达标的动物在间隔 24 h 后给药测试。微量注射给药剂量为:SB-334867 (6 mmol/0.5 μl);DMSO(0.5 μl)。给药 15 min 后进行 T-迷宫测试[7]。

1.3.5 核团定位 经戊巴比妥钠(65 ml/kg)腹腔麻醉大鼠。灌注断头取脑经冷冻切片(冠状切片 30 μm 厚),HE 染色定位。染色定位证实所有的微注射位点位于内侧内嗅皮层(图 1)。



A:脑图谱示意图;B:HE 染色鉴定药物注射部位 ↑:内嗅皮层

图 1 内侧内嗅皮层核团注射部位鉴定

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

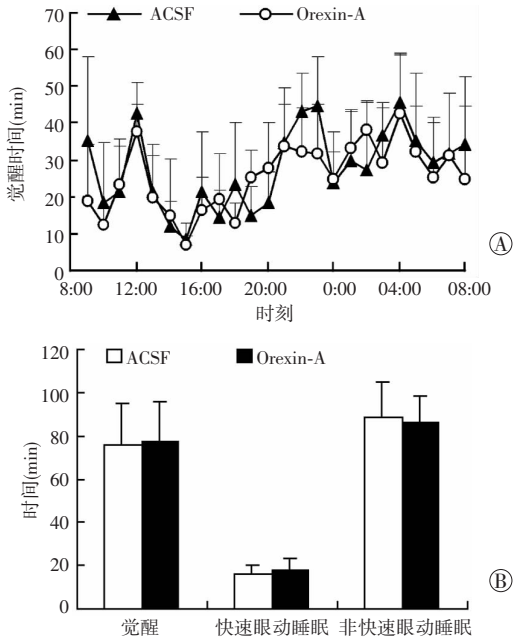
2.1 微注射 Orexin-A 对睡眠-觉醒周期的影响

与 ACSF 自身对照相比,分别在给大鼠内侧内嗅皮层双侧微注射 0.5 μl 后 3 h 11:00 – 12:00、12:00 – 13:00、13:00 – 14:00 觉醒周期时间无影响($P > 0.05$),给药后 24 h 觉醒周期时间也无显著差异($P > 0.05$)。微量注射药物后,Orexin-A 在 11:00 – 14:00 3 h 内对觉醒时间无影响($P > 0.05$),在11:00 – 14:00 3 h 内 NREM 时间无影响($P > 0.05$),在 11:00 – 14:00 3 h 后 REM 也无影响($P > 0.05$),即对 3 h 内(11:00 – 14:00)大鼠总睡眠觉醒时间无显著性差异($P > 0.05$)。见图 2。同样,与 DMSO 自身对照相比,分别在给大鼠内侧内嗅皮层双侧微注射 0.5 μl 后 3 h 11:00 – 12:00、12:00 – 13:00、13:00 – 14:00 觉醒周期时间无影响($P > 0.05$),给药后 24 h 觉醒周期时间也无显著差异($P > 0.05$)。微量注射药物后,SB-334867 在 11:00 – 14:00 3 h 内对觉醒时间无影响($P > 0.05$),在 11:00 – 14:00 3 h 内 NREM 时间无影响($P > 0.05$),在 11:00 – 14:00 3 h 后 REM 也无影响($P > 0.05$),即对 3 h 内(11:00 – 14:00)大鼠总睡眠觉醒时间无显著性差异($P > 0.05$)。见图 3。

2.2 微注射 Orexin1 受体阻断剂 SB-334867 对空间工作记忆的影响

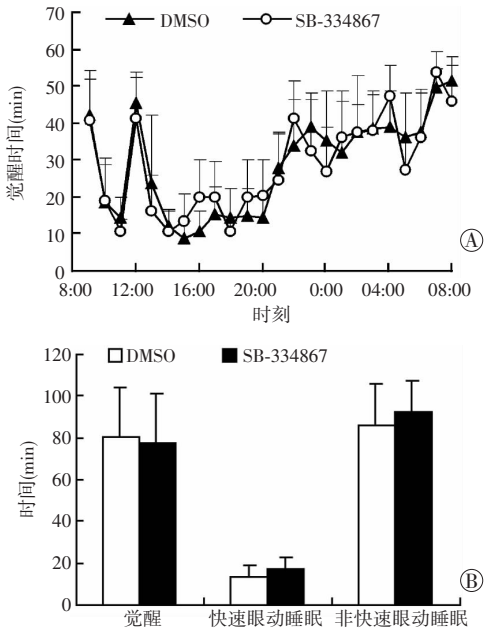
连续训练大鼠,使其 T-迷宫两次选择正确率在 80% 以上,随后,在内侧内嗅皮层区微注射,对 SD 大鼠 DMSO 组间对照和

Orexin1 受体阻断剂 SB-334867 给药后的 T-迷宫选择正确次数进行统计。大鼠内侧内嗅皮层双侧微注射 SB-334867 0.5 μl 后，T-迷宫交替选择正确次数明显减少，正确率下降（DMSO：66.36% ±4.08%，$n=10$；SB-334867：89.26% ±3.2%，$n=11$），有显著性差异（$P<0.001$）。



A：双侧微注射 0.5 μl Orexin-A 后大鼠 24 h 觉醒周期时间；B：给药后 3 h（11:00－14:00）内大鼠总睡眠觉醒时间

图 2　Orexin-A 对大鼠睡眠-觉醒周期的影响



A：双侧微注射 0.5 μl Orexin1 受体阻断剂 SB-334867 后大鼠 24 h 觉醒周期时间；B：给药后 3 h（11:00－14:00）内大鼠总睡眠觉醒时间

图 3　SB-334867 对大鼠睡眠-觉醒周期的影响

3　讨论

Orexin 系外侧下丘脑 Orexin 能神经元产生的神经肽。Orexin 神经元的纤维及 Orexin 的受体广泛分布于大脑的各个脑区，在觉醒，认知，能量平衡以及成瘾等中发挥重要的作用[2, 8-11]。目前认为，MEC 主要参与传递和处理空间信息，在空间认知功能中具有重要的意义[4-5]。Morris 水迷宫实验表明，双侧损毁 MEC 损害了大鼠空间记忆的获得及保持[5]。多通道胞外记录发现，MEC 存在空间选择性发放的网格细胞以及大鼠运动方向相关的方向细胞[4]。结合行为学证据进一步表明，MEC 可能通过运动的速度、方向而不依赖外界环境特征实现空间路线整合[12]。在前期的实验中，我们发现 Orexin 能神经元投射至 EC 浅层，并且在 EC 浅层的主要投射神经元上有 OX1R 和 OX2R 表达。同时，在离体的膜片钳实验中我们发现，Orexin-A 能够通过 OX1R 影响 EC 浅层主要投射神经元兴奋性及突触传递。然而，Orexin-A 对 EC 浅层主要投射神经元兴奋性调节的生理功能还不得而知。

鉴于 Orexin-A 在促觉醒中的重要作用，本研究首先观察了内嗅皮层微注射 Orexin-A 对大鼠睡眠-觉醒周期的影响。结果显示，Orexin-A 微注射到 MEC 未增加给药后 0～3 h 内每小时及 24 h 的觉醒时间。同时，也对 0～3 h 内觉醒和 REM 及 NREM 总时间无影响。该结果表明外源性给予 Orexin-A 到 MEC 对大鼠的睡眠-觉醒无影响。随后，微注射 OX1R 受体的阻断剂 SB-334867 到 MEC，发现阻断 OX1R 也未改变大鼠给药后 0～3 h 内觉醒时间和 REM 睡眠及 NREM 睡眠的时间。因此，上述实验结果说明，Orexin-A 在 MEC 对睡眠-觉醒无影响，提示内嗅皮层并不是 Orexin A 发挥促醒效应的靶区。

内嗅皮层是参与空间学习记忆的重要脑区，为进一步探讨 Orexin 系统兴奋内嗅皮层的生理意义，我们观察了微注射 Orexin A 至内嗅皮层对大鼠空间学习记忆的影响。微注射 OX1R 受体的阻断剂 SB-334867 和 DMSO 到 MEC 实验结果显示，双侧微注射 0.5 μl SB-334867 显著降低了大鼠在 T-迷宫中的选择正确率，提示抑制内源性的 Orexin-A 对 MEC 浅层主要投射神经元的兴奋性及突触传递影响，会造成大鼠的空间认知功能损害。回顾文献发现，Orexin 神经元纤维可通过影响学习记忆、认知功能相关的其他脑区如海马、前额叶皮层参与学习记忆的过程等[13]。研究证实，Orexin 神经元纤维和受体广泛的分布于海马，影响 Schaffer 侧支/联合纤维到 CA1 锥体神经元突触的 LTP，进而影响海马依赖的学习记忆功能。以上证据表明，Orexin 系统可通过多种途径参与学习记忆功能[3, 14]。

Orexin 系统参与学习记忆功能的具体机制尚不清楚。我们已证实 Orexin 系统能增加包括 MEC 在内的学习记忆相关脑区神经元的兴奋水平。由于 Orexin

系统最基本的功能是促进觉醒,我们进而推测,Orexin和其他相关觉醒递质在觉醒时可以选择性提高学习记忆相关脑区神经元的兴奋性,最终增加突触传递效率,易化信息编码和传递,为正常觉醒条件下学习记忆等高级认知功能的实现提供背景兴奋水平[15]。

参考文献:

[1] Berridge C W, Espana R A, Vittoz N M. Hypocretin/Orexin in arousal and stress[J]. Brain Res, 2010, 1314: 91-102.

[2] Sakurai T M, Mieda M, Tsujino N. The Orexin system: roles in sleep/wake regulation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1200: 149-161.

[3] Akbari E, Naghdi N, Motamedi F. Functional inactivation of Orexin 1 receptors in CA1 region impairs acquisition, consolidation and retrieval in Morris water maze task[J]. Behav Brain Res, 2006, 173(1): 47-52.

[4] Fyhn M, Molden S, Witter M P, *et al*. Spatial representation in the entorhinal cortex[J]. Science, 2004, 305(5688): 1258-1264.

[5] Steffenach H A, Witter M, Moser, M B, *et al*. Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex[J]. Neuron, 2005, 45(2): 301-313.

[6] 寸艳萍,夏建霞,李洋,等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8): 767-769.

[7] Zheng Y, Hamilton E, Begum S, *et al*. The effects of acoustic trauma that can cause tinnitus on spatial performance in rats[J]. Neuroscience, 2011, 186: 48-56.

[8] Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Role of Orexin in the regulation of glucose homeostasis[J]. Acta Physiol (Oxf), 2010, 198(3): 335-348.

[9] Teske J A, Billington C J, Kotz C M. Hypocretin/Orexin and energy expenditure[J]. Acta Physiol (Oxf), 2010, 198(3): 303-312.

[10] Sharf R, Sarhan M, Dileone R J. Role of Orexin/hypocretin in dependence and addiction[J]. Brain Res, 2010, 1314: 130-138.

[11] Smith H R, Pang K C. Orexin-saporin lesions of the medial septum impair spatial memory[J]. Neuroscience, 2005, 132(2): 261-271.

[12] Witter M P, Moser E I. Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex[J]. Trends Neurosci, 2006, 29(12): 671-678.

[13] Li B, Chen F, Ye J, *et al*. The modulation of Orexin A on HCN currents of pyramidal neurons in mouse prelimbic cortex[J]. Cereb Cortex, 2010, 20(7): 1756-1767.

[14] Aou S, Li X L, Li A J, *et al*. Orexin-A (hypocretin-1) impairs Morris water maze performance and CA1-Schaffer collateral long-term potentiation in rats[J]. Neuroscience, 2003, 119(4): 1221-1228.

[15] 胡志安,夏建霞. 觉醒系统的活动对学习记忆的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(11): 1091-1094.

(**收稿**:2011-12-20;**修回**:2012-01-18)

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)08-0718-01

特殊类型的T1a期肺癌1例

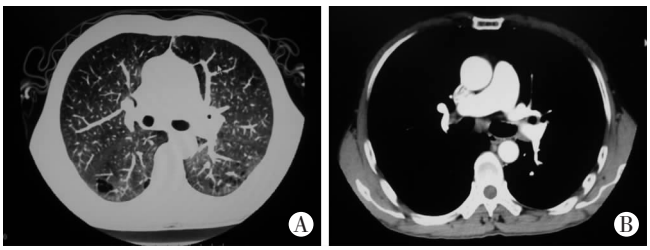
戴富强,邓 波,周景海,王如文 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心)

[**关键词**] 支气管内;肺癌;诊断

[**中图法分类号**] R734.2 [**文献标志码**] B

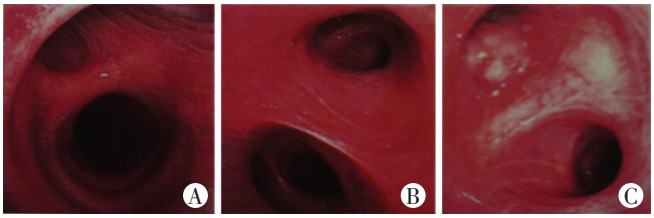
1 临床资料

患者,男性,51岁。因"咳嗽、咯血1个月"入院。入院前1个月,患者无明显诱因出现咳嗽,咯白色粘痰,并咯血或痰中带血,晨起明显。无气紧、胸痛等症状。体格检查中,双肺呼吸音清晰,未闻及明显的干湿罗音。既往吸烟史30年,吸烟指数>400支/年。外院以"肺炎"治疗1周,症状无缓解。行胸部CT检查:双侧肺野清晰,双肺纹理增多、紊乱,气管及叶、段支气管未见狭窄、闭塞等,未见肺部及纵隔区块影(图1)。遂继续抗炎、止血等对症处理,患者症状仍未见缓解。行纤支镜检查发现:左肺上叶尖后段支气管开口见菜花样新生物,附着于管壁,大小约1.5 cm,取活检病理提示为鳞状细胞癌(图2)。进一步实验室检查,白细胞10.73×10^9/L,中性粒百分数为75.3%,CRP 2.0 mg/L,但血清TSGF、CA125、CA199、AFP等肿瘤标志物未见升高。完善术前准备后,全麻下行全电视胸腔镜下左肺上叶切除、肺门纵隔淋巴结清扫术。术中见肿块位于左上叶尖后段支气管开口,大小约1.5 cm×1.0 cm×0.5 cm,未穿透支气管壁。术后病理结果为左上肺中分化鳞癌。术后恢复顺利,于第7天拔出胸腔闭式引流管,康复出院。



A:左尖后段开口平面肺窗;B:左尖后段开口平面增强纵隔窗

图1 左上肺中分化鳞癌患者左肺上叶切除、肺门纵隔淋巴结清扫术前胸部CT表现



A:右上叶支气管开口;B:左上下叶支气管开口;C:左尖后段支气管开口

图2 左上肺中分化鳞癌患者左肺上叶切除、肺门纵隔淋巴结清扫术前纤支镜观察

(下转737页)

[**通信作者**] 周景海;E-mail:zhzhlu1993@yahoo.com.cn