中枢神经大麻素受体分布的细胞类型研究

吴永涛[1,2],冷少华[1],刘宏亮[1],姚忠祥[2] (第三军医大学:1. 西南医院康复科,2. 基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究不同脑区大麻素 CB1、CB2 受体分布的细胞类型,探索大麻素受体在中枢神经系统中的可能作用。**方法** 运用免疫荧光单标、双标的方法研究 2 种大麻素受体在成年大鼠不同脑区、不同类型细胞中的表达分布情况。**结果** 成年大鼠不同脑区的神经元中有 CB1、CB2 受体的表达,海马、大脑皮层、脑干以及小脑的浦肯野细胞层的神经元有较高表达,且 2 种大麻素受体的表达差异较小,基底神经节区有中等表达,而胼胝体区未发现有神经元表达。少突胶质细胞及星型胶质细胞中发现 CB1、CB2 受体的表达。**结论** 大麻素受体 CB1、CB2 在中枢神经系统多种类型的细胞中均有分布,可能通过多种途径参与神经系统功能调节。

[关键词] 中枢神经;大麻素受体;细胞类型;免疫组织荧光
[中图分类号] R322.81 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)04-0336-03

Cell types of cannabinoid receptor in central nervous

WU Yong-tao, LENG Shao-hua, LIU Hong-liang, YAO Zhong-xiang (Department of Rehabilitation, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the cell types of cannabinoid CB1 and CB2 receptor in different brain regions, and further explore the possible role of cannabinoid receptors in the central nervous system. **Methods** the distribution of the expression of 2 types of cannabinoid receptors in the adult rat brain cells was observed by the methods of immunofluorenscence double-staining. **Results** Expressions of two receptors in the adult rat brain neurons, such as the hippocampus, cerebral cortex, brainstem and cerebellar Purkinje cell layer were high without significant differences. Moderate expression was found in basal ganglia areas, and no expression in the corpus callosum. Expressions of these receptors were also found in oligodendrocytes and astrocytes. **Conclusion** The distribution of cannabinoid receptor CB1 and CB2 were in a variety of cell types of the central nervous system, which were involved in nervous system function through a variety of pathways.

Keywords: central nervous; cannabinoid receptor; cell type; immunofluorescence

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201404003
[收稿日期] 2014-05-28 [修回日期] 2014-06-10

程度地影响手术区操作。此外结肠镜充气由于患者存在腹式呼吸,直肠腔内压力存在波动,术野暴露不稳定。我们也感觉高清腹腔镜的清晰度优于高清肠镜。

目前我们仍在改进这项技术,下一步拟使用乳胶导尿管头端的气囊阻塞肠腔,改用 2 mm 腹腔镜器械作辅助操作,采用带倒刺的免打结缝线闭合创面,设计出预植有穿刺孔的硬性切口保护套盖代替手套以解决器械稳定性问题。总之,我们的目的是寻找出简便易行的经肛内窥镜微创手术方式,具有 TEM 术式的优点但无需昂贵的专用设备,达到肿瘤治疗要求,而且具有良好的应用和推广前景。

[参考文献]

[1] 王小云,徐美东,姚礼庆,等. 内镜黏膜下剥离术治疗结直肠侧向发育型肿瘤的疗效[J]. 中华消化外科杂志,2013,12(11):862 – 866.
[2] 李荣萍,唐 浩,黄伟平,等. 175 例结肠息肉的内镜治疗体会[J]. 局解手术学杂志,2012,21(2):206.
[3] Moore JS, Cataldo PA, Osler T, et al. Transanal endoscopic microsurgery is more effective than traditional transanal excision for resection of rectal masses[J]. Dis Colon Rectum, 2008, 51(7): 1026 – 1030.
[4] De Graaf EJ, Doornebosch PG, Tetteroo GW, et al. Transanal endoscopic microsurgery is feasible for adenomas throughout the entire rectum: a prospective study[J]. Dis Colon Rectum, 2009, 52(6): 1107 – 1113.
[5] De Graaf EJ, Burger JW, Van Ijsseldijk AL, et al. Transanal endoscopic microsurgery is superior to transanal excision of rectal adenomas[J]. Colorectal Dis, 2011, 13(7): 762 – 767.
[6] Sylla P, Rattner DW, Delgado S, et al. NOTES transanal rectal cancer resection using transanal endoscopic microsurgery and laparoscopic assistance[J]. Surg Endosc, 2010, 24(5): 1205 – 1210.
[7] Chamberlain RS, Sakpal SV. A comprehensive review of single-incision laparoscopic surgery (SILS) and natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) techniques for cholecystectomy[J]. J Gastrointest Surg, 2009, 13(9): 1733 – 740.
[8] Cid RC, Perez JC, Elosua TG, et al. Transanl resection using a single port trocar: a new approach to NOTES[J]. Cir Esp, 2011, 89(1): 20 – 23.
[9] Hompes R, Ris F, Cunningham C, et al. Transanal glove port is a safe and cost-effective alternative for transanal endoscopic microsurgery[J]. Br J Surg, 2012, 99(10): 1429 – 1435.

(编辑:周小林)

大麻素类物质主要有从天然植物中提取的大麻、人工合成的大麻和内源性大麻。目前公认的大麻素受体有 CB1、CB2 两种，均为 G 蛋白偶联受体[1]。随着大麻素的作用被逐渐发现和认可，其受体的分布情况也得到更多的研究[2]，但其在不同部位阳性细胞的具体类型、数量、及两种受体的共表达情况没有做具体的研究，特别对 CB2 受体的研究较少。既往研究表明，CB1 受体主要分布于神经系统，近期研究发现，CB2 受体在神经组织中也有较广泛的分布，大脑、小脑、脑干等多部位均有分布，且多种类型的细胞均表达该两种受体[3]，但具体细胞类型研究不够充分。CB2 受体在神经组织中的这种表达与前人大量研究的 CB1 受体有着密切联系，提示 CB2 受体同样参与神经系统的重要功能[4]。大麻素受体的分布研究主要通过放射自显影、原位杂交、PET[5-6]、免疫组织化学[7]等方法，每一种方法均有其自身的优点和缺陷。本文主要运用荧光双标的方法研究大麻素受体阳性细胞的类型，为解决上述问题提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 动物及标本

成年 Spraque-Dawley 大鼠（雌雄不限）10 只，体质量 220 ~ 250 g。1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉，生理盐水灌注 15 min 后，4% 多聚甲醛固定 20 min，1 mL/g。低温下取出脑组织，后固定 12 h。30% 蔗糖溶液脱水过夜。OCT 包埋，恒冷冰冻切片机切片（10 μm）。

1.2 抗体及试剂

CB1、CB2 抗体（sigma）、少突胶质细胞抗体 CC-1、神经元抗体 anti-βⅢ tubulin，GFAP 抗体，荧光二抗：Cy3、FITC，DAPI（sigma），多聚甲醛（重庆化学试剂厂）、甘油（北京红星化工厂）、戊巴比妥钠（上海试剂一厂）。

1.3 免疫荧光组织化学

分别以抗 CB1、CB2 抗体为一抗，选择特异性的荧光二抗，行免疫荧光化学染色，然后再次选取抗神经元或胶质细胞抗体为一抗，特异性荧光二抗，重复前述步骤，进行免疫荧光双标染色。具体双标情况如下（CB2 受体双标组合原理同上）。

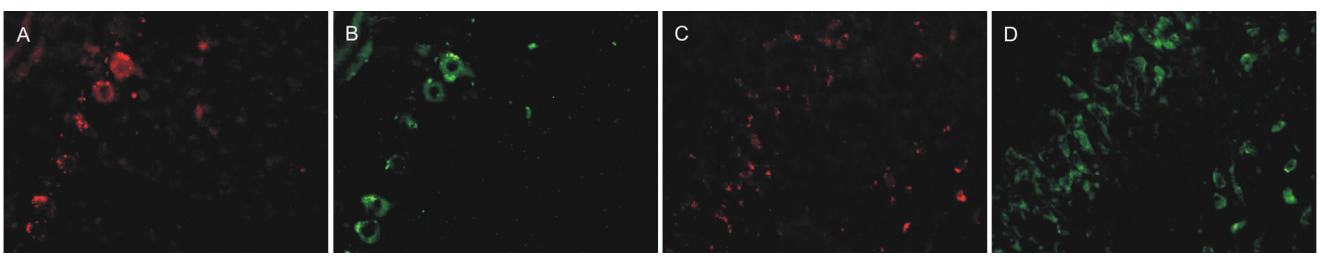
1.3.1 实验分组 一抗：抗 CB1/CB2 抗体，兔来源。二抗：cy3，山羊抗兔，红色荧光。一抗：Anti-βⅢ Tubulin/cc-1/ GFAP，小鼠来源。二抗：FITC，兔抗小鼠，绿色荧光。

1.3.2 荧光双标操作 贴片经 0.01M PBS 漂洗 5 min × 3 次；滴加正常封闭用血清（1% BSA/0.4% TritonX-100）室温下孵育 30 min；用滤纸吸去多余血清，滴加一抗，37 ℃ 2 h，后入 4 ℃ 冰箱过夜；0.01M PBS 漂洗 5 min × 3 次；滴加二抗，37 ℃孵育 2 h；0.01M PBS 漂洗 5 min × 3 次；滴加一抗，37 ℃ 2 h，后入 4 ℃冰箱过夜；0.01M PBS 漂洗 5 min × 3 次；滴加二抗，37 ℃孵育 2 h；0.01M PBS 漂洗 5 min × 3 次；吸掉多余 PBS 液，滴加 0.1‰DAPI 染核；中性树胶封片；olympus 显微镜观察，数码相机照相。

2 结果

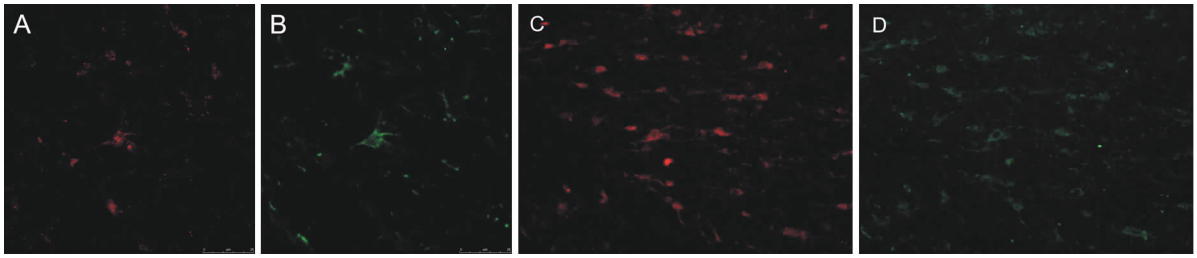
大麻素受体在脑组织中分布的神经细胞类型主要有神经元、少突胶质细胞及星型胶质细胞，不同的脑区及细胞类型表达二种受体存在差异。神经元中的表达情况（图 1）：大麻素 CB1、CB2 受体在大脑皮层、海马、基底神经节区、嗅球、脑桥的神经细胞以及小脑的浦肯野细胞层均有表达。在大脑皮层，表现为中等量的表达，着色部位多位于核周和胞体，突起上也有着色。在海马，2 种大麻素受体都有很强的表达，核周和胞体及突起上可见阳性着色，CA1 和 CA3 表达最强，二者无明显差别。在基底神经节区，二者的表达量及染色部位类似于其在大脑皮层的分布情况，CB2 的表达量略高。在嗅球，有较强表达，僧帽细胞层、小球层及嗅球内层白质均可见阳性神经细胞，二者表达量及染色部位差别不明显，多为胞体着色。在脑桥，表达很高，着色部位多位于核周和整个胞体，表达量上二者差别不明显。在小脑浦肯野细胞层，有很高的表达，表达量无明显差异，阳性部位多位于核周和突起上，少数细胞整个胞体着色。在胼胝体区也有二者的表达，特别是 CB2 受体的表达较明显，多位于核周和突起上。

少突胶质及星型胶质细胞的表达情况（图 2）：脑白质区是胶质细胞分布最集中的区域，同时也是我们研究胶质细胞分布的重点区域，根据免疫荧光染色结果，发现少突胶质细胞与星型胶质细胞中明确存在该 2 种受体的表达。比较 2 种胶质细胞，少突胶质细胞中阳性细胞比例明显高于星型胶质细胞，且阳性染色部位存在较大差异。



A：CB1 在浦肯野细胞层的双标表达（× 400）；B：神经元在浦肯野细胞层的双标表达（× 400）；C：CB2 在海马部位的双标表达（× 400）；D：神经元在海马部位的双标表达（× 400）

图 1 免疫荧光双标法检测 2 种大麻素受体 CB1、CB2 的分布



A:CB1 的双标表达(×400);B:星型胶质细胞的双标表达(×400);C:CB2 的双标表达(×400);D:少突胶质细胞的双标表达(×400)

图 2 免疫荧光双标法检测两种大麻素受体 CB1、CB2 的分布

3 讨论

大麻素受体 CB1 和 CB2 在成年大鼠脑组织中的分布很广泛,并且二者的分布有很大的相似性。如大脑皮层、海马、基底神经节区以及小脑等部位共同表达这 2 种受体。在脑组织中,CB1 受体主要分布于神经元来发挥其作用,而 CB2 受体在体内对神经元的功能研究尚不明确[8]。因此我们通过 2 种抗体荧光双标法,观察和验证在不同脑区的神经元上的表达情况。我们发现大鼠脑中的多数部位,如嗅脑、大脑、小脑及脑干中均有神经元表达此 2 种受体,二者在神经元中的分布情况大致相同。已知分布于神经元突触前膜的 CB1 受体可以调节递质的释放[9],提示 CB2 受体很有可能也参与了该过程。CB2 受体可能同样参与了神经递质的释放及信号传递[10]。同时发现 CB2 受体在脑桥和延髓的阳性细胞突起上的分布最为明显,表明 CB2 受体在该区域的递质释放方面也可能发挥重要的作用。这种分布对于神经细胞突起的生长是否密切联系尚待证实。而二者分布上的相似性更进一步说明 2 种大麻素受体存在相互协同或抑制作用。如小脑的浦肯野细胞及海马的锥体细胞是 2 种大麻素受体双标比较明显的神经细胞类型,这更有可能提示 2 种大麻素受体在运动及记忆认知方面共同有着重要的作用[11]。

大麻素受体 CB1 具有促进少突胶质前体细胞存活及分化的功能,CB2 受体可促进神经干细胞的增殖及大麻素受体具有促进神经细胞突起的生长等作用[12]。尤其在少突胶质细胞,大麻素激活其受体不仅能抑制炎症反应从而起到保护作用,同时在促进少突胶质前体细胞存活、增殖甚至分化等方面发挥了很重要的作用[13]。大麻素受体在星形胶质细胞上的表达同样也提示,在炎性脱髓鞘性疾病中,大麻素激活其受体作用于星形胶质细胞,起到抗炎和神经保护的作用。

2 种大麻素受体在成年大鼠脑内有广泛的表达,在不同脑区的神经细胞均有表达,且表达于多种神经胶质细胞中,说明二者存在于神经系统的多种类型的细胞中,提示位于细胞不同位置的大麻素受体发挥的作用可能不同。研究它们分布细胞类型上的差别及分布部位上区别,为更好地研究 2 种大麻素受体在神经细胞及胶质细胞发挥的作用奠定了良好的基础。

[参考文献]

[1] Howlett AC, Barth F, Bonner TI, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors[J]. Pharmacol Rev, 2002, 54(2): 161 – 202.

[2] Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players[J]. AAPS J, 2006, 8(2): 298 – 306.

[3] Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas[J]. Glia, 2010, 58(9): 1017 – 1030.

[4] Palazuelos J, Ortega Z, Diaz-Alonso J, et al. CB2 cannabinoid receptors promote neural progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling[J]. J Biol Chem, 2012, 287(2): 1198 – 1209.

[5] Vandeputte C, Casteels C, Struys T, et al. Small-animal PET imaging of the type 1 and type 2 cannabinoid receptors in a photothrombotic stroke model[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012, 39(11): 1796 – 1806.

[6] Casteels C, Koole M, Celen S, et al. Preclinical evaluation and quantification of [^{18}F]MK-9470 as a radioligand for PET imaging of the type 1 cannabinoid receptor in rat brain[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012, 39 (9): 1467 – 1477.

[7] Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do[J]. J Neuroendocrinol, 2008, 20(1): 10 – 14.

[8] Katona I, Freund TF. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain[J]. Annu Rev Neurosci, 2012, 35(1): 529 – 558.

[9] Howlett AC. Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction[J]. Br J Pharmacol, 2004, 142(8): 1209 – 1218.

[10] Zalesky A, Solowij N, Yücel M, et al. Effect of long – term cannabis use on axonal fibre connectivity[J], Brain, 2012, 135(7): 2245 – 2255.

[11] Jhaveri MD, Elmes SJ, Richardson D, et al. Evidence for a novel functional role of cannabinoid CB(2) receptors in the thalamus of neuropathic rats[J]. Eur J Neurosci, 2008, 27(7): 1722 – 1730.

[12] Moldrich G, Wenger T. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study[J]. Peptides, 2000, 21 (11): 1735 – 1742.

[13] Lou ZY, Zhao CB, Xiao BG. Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by the selective CB1 receptor antagonist[J]. J Neurosci Res, 2012, 90(1): 84 – 95.

(编辑:杨 颖)