大鼠脊髓内代谢型谷氨酸受体的定位*

李云庆 王智明 施际武

(第四军医大学基础部解剖学教研室、梁铨璐脑研究中心, 西安 710032)

重本隆一 水野 昇

(京都大学医学部高级脑形态学研究室, 日本京都 606)

关键词 代谢型谷氨酸受体 脊髓 免疫组织化学 大鼠

谷氨酸 (Glutamate, Glu) 是哺乳动物神经元的主要兴奋性递质。Glu 受体有 N-甲基-D-天门冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸酯 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate, AMPA) / 红藻酸 (kainic acid, KA) 受体和代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptor mGluR) 三种类型^[1,2]。借助分子生物学技术, 已成功地克隆了 mGluR 受体的 7 种亚型^[1,2], 制成了特异性抗体, 并普查了大鼠全脑内 mGluR5 亚型^[3] 和小脑内 mGluR2、mGluR3 亚型^[4] 的分布。已知脊髓后根节内有许多含 Glu 的神经元, 许多研究结果都表明 Glu 是将外周伤害性刺激信息向中枢传递的重要递质之一。但 Glu 受体在脊髓内的分布尚未见详细的报道。本研究用免疫组织化学法观察了 mGluR 的 5 种亚型 (mGluR1, 1 α , 2, 3, 5) 在大鼠脊髓内的定位分布。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用雄性成年 Sprague-Dawley 大鼠 6 只, 体重 200~250g。动物在戊巴比妥钠腹腔注射麻醉下开胸, 经左心室插管, 先以 0.9% 盐水冲洗血液, 再以含 4% 多聚甲醛和 0.2% 苦味酸的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PB, pH7.3) 灌注固定, 灌注完毕, 立即取脊髓, 按颈、胸、腰、骶、尾段的分界, 将其分成颈、胸、腰、骶、尾 5 段, 置入上述新鲜固定液中后固定 4~6 h (4℃)。再移入含 30% 蔗糖的 PB 中 (4℃) 至沉底。制冠状连续冰冻切片, 片厚 30 μ m。各段脊髓每隔 12 张切片取 1 张为 1 组, 共分 13 组收集于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲的盐溶液 (PBS) 中备用。

1.2 染色程序

用免疫组织化学 ABC 法进行染色: (1) 取 4 组切片分别置入兔抗 mGluR 的 5 种亚型的 4 种抗血清中 (4℃) 孵育 48 h, 抗体稀释度均为 1 μ g/mL^[3,4]。由于 mGluR2 和 mGluR3 的氨基酸序列非常相似^[2], 用免疫学方法无法分别制成抗 mGluR2 或 mGluR3 的抗体, 而只能得到一种既抗 mGluR2, 又抗 mGluR3 的抗血清, 故本研究所用的抗 mGluR2 和 mGluR3 两种的抗体为同一种抗血清^[4]。4 种抗体均由日本京都大学重本隆一和水野昇先生自制^[3,4]; (2) 依次将切片

1995-01-23 收稿, 1995-06-01 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目

置入生物素结合的羊抗兔血清(1:200, 稀释)和卵白素标记的辣根过氧化物酶复合物(1:100, 稀释), 在室温下分别孵育3 h和1 h; (3)用二氨基联苯胺和 H_2O_2 呈色。

其余的9组切片, 用正常兔血清和 PBS 代替一抗, 随后的步骤与上述染色程序相同, 进行非特异性对照(4组)和阴性对照(4组)染色。另1组切片用 Nissl 法染色, 以便对免疫反应阳性结构定位。

2 实验结果

本研究根据 Paxinos 和 Watson 的图谱^[9]对大鼠脊髓进行分层。在光镜下, 用免疫组织化

图1—6

1. 大鼠脊髓颈段外侧颈核内的 mGluR1 样阳性胞体(箭头)。DH: 后角; LF: 侧索。标尺 = 100 μ m;
2. 示大鼠脊髓腰段 IX 层的 mGluR1 α 样阳性运动神经元胞体(箭头)和神经纤维。LF: 侧索。标尺 = 80 μ m;
3. 大鼠脊髓胸段后角 III 和 IV 层内中等数量的 mGluR1 α 样阳性神经纤维, I 和 II 层内无阳性结构。此外, 还可在外侧脊索核 (LSN) 内见到 mGluR1 α 样阳性神经元胞体(箭头), I~IV: 脊髓后角 I~IV 层。标尺 = 100 μ m;
4. 大鼠脊髓骶段骶髓后连合核内的 mGluR2/3 样阳性胞体(箭头), 胞浆内的免疫反应阳性产物呈颗粒状。标尺 = 100 μ m;
5. 大鼠脊髓胸段后角 I 层和 II 层内密集的 mGluR5 样阳性胞体和神经纤维, III 和 IV 层内仅有中等数量的阳性神经纤维。LSN: 外侧脊索核; PF: 后索; I~IV: 脊髓后角 I~IV 层, 标尺 = 240 μ m;
6. 为图 5 方框内部分的高倍像, 示 mGluR5 样阳性胞体(箭头)的胞浆内呈颗粒状的免疫反应阳性产物和神经纤维内密集的阳性神经纤维。I~III: 脊髓后角 I~III 层, 标尺 = 120 μ m。

学法染出的5种mGluR亚型的免疫阳性反应见于神经元胞体和神经纤维的胞膜上和胞浆内,胞体胞浆内的阳性产物多呈颗粒状(图4~6)。

在脊髓的全长中,少数浓染的mGluR1样阳性胞体和神经纤维仅见于外侧颈核(图1)和X层,X层内的阳性胞体数从吻侧向尾侧逐渐增加。中等数量的mGluR1 α 样阳性胞体和神经纤维见于胸髓中间带外侧核、骶髓副交感核、Onuf核、VIII和IX层(图2)及外侧颈核(图3),少数至中等数量的阳性神经纤维广泛地分布于III~VII层(图3)和X层。少数淡染的mGluR2和mGluR3样阳性胞体和神经纤维也仅见于外侧颈核、X层和骶髓后连合核(图4),X层的阳性胞体数从吻侧向尾侧也逐渐增加。许多浓染的mGluR5样阳性胞体和神经纤维密集地分布于脊髓I层和II层,II层内的阳性胞体的数量又明显地多于I层,而III和IV层内仅见中等数量的阳性神经纤维(图5,6),外侧颈核(图5)和骶髓后连合核内可见少数淡染的阳性胞体和神经纤维。

非特异性对照组和阴性对照组各节段的切片上均未染出免疫反应阳性结构。

3 讨论

3.1 mGluR的分型和分组

最近的分子生物学和药理学研究提示,mGluR是有别于NMDA受体和AMPA/KA受体的一种独特的Glu受体,它们通过偶联细胞内的磷脂酰肌醇水解/ Ca^{2+} 信号传递和影响细胞内cAMP的含量,从而改变细胞的代谢活动^[1,2]。分子克隆的结果还显示,mGluR至少有7种亚型,其中mGluR1亚型又可分为1 α 和1 β 两种亚亚型^[2]。根据mGluR各亚型的氨基酸序列相似性、偶联的细胞内第二信使的不同和对激动剂的选择,可将这7种亚型分为3组:(1)mGluR1和5,(2)mGluR2和3及(3)mGluR4、6和7^[2]。mGluR1和5亚型刺激G蛋白偶联的磷脂酰肌醇水解和细胞内 Ca^{2+} 的移动,使君子酸(quisqualate, QA)对它们的作用最强;激活mGluR2~4,6,7各亚型可抑制腺苷酸环化酶的活性,使cAMP的含量降低,Glu对mGluR2和3亚型的作用最强,而mGluR6和7亚型主要与L-2-氨基-4-磷酸丁酸(L-2-amino-4-phosphonobutyrate, L-AP4)结合^[1,2]。本研究发现mGluR5样阳性胞体和神经纤维主要位于脊髓后角浅层,mGluR1、mGluR2和mGluR3样阳性胞体和神经纤维主要分布于外侧颈核和X层,mGluR1 α 样阳性胞体和神经纤维主要分布在胸髓中间带外侧核、骶髓副交感核、Onuf核、VIII和IX层等与运动有关的核团、III~VII和X层及外侧颈核,mGluR1和mGluR1 α 样阳性胞体和神经纤维的分布也不相同,即mGluR1样阳性胞体和神经纤维主要分布于外侧颈核和X层,而mGluR1 α 样阳性胞体和神经纤维主要分布在上述与运动有关的核团,这些结果表明本研究所观察到的5种mGluR亚型在脊髓的主要分布区域有所不同,从形态学上支持上述mGluR的分型和分组,即同组mGluR各亚型的分布相似,不同组的mGluR的分布则有差别。值得注意的是,即使具有相同信号转导系统和激动剂选择性的同一组的mGluR各亚型,在脊髓内的定位也有差异,说明它们的功能可能不同。

3.2 Glu作为传递伤害性刺激信息递质的证据

Glu能选择性地兴奋脊髓后角I和II层内的神经元,这种兴奋作用与刺激后根内C纤维所致的反应相同。对外周施以伤害性刺激后,脊髓后角内Glu的浓度明显增高。P物质(SP)也是将外周伤害性刺激信息向中枢传递的重要神经活性物质,Glu和SP共存于大鼠脊

髓后根节细胞^[6], SP受体也密集地分布于脊髓后角 I 层和 II 层^[7]. 有人^[8]认为虽然 SP 和 Glu 在初级传入终末内可以同时释放, 但 SP 只是 Glu 的调质, Glu 才是真正传导外周伤害性刺激信息入中枢的兴奋性递质.

3.3 mGluR5 亚型可能参与伤害性刺激信息的传递

本研究用免疫组织化学法在脊髓内观察到 mGluR 的 4 个亚型中, 只有 mGluR5 样阳性胞体和神经纤维密集地分布于脊髓后角的 I 层和 II 层. 由于脊髓后角浅层主要接受外周的伤害性刺激信息, 脊髓后根节内有许多 Glu 能神经元, 后角浅层有大量含 Glu 的初级传入终末, Glu 是传递外周伤害性刺激信息的重要神经递质, 所以本研究的结果提示, 脊髓的 mGluR 各亚型中, 只有 mGluR5 亚型可能主要参与躯干和四肢的伤害性刺激信息的传递. 而 mGluR1 α 样阳性胞体和神经纤维主要位于与运动有关的核团, 所以 mGluR1 α 可能参与 Glu 对运动的调控.

参 考 文 献

- 1 魏东升, 胡国渊. 兴奋性氨基酸受体的分子生物学. 神经科学, 1994, 1(1): 43~50
- 2 Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. Annu Rev Neurosci, 1994, 17: 31~108
- 3 Shigemoto, R, Nomura S, Ohishi H *et al.* Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. Neurosci Lett, 1993, 163(1): 53~57
- 4 Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R *et al.* Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3 in rat cerebellar cortex. Neuron, 1994, 13(1): 55~66
- 5 Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney: Academic Press, 1986
- 6 Battaglia G, Rustioni A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. J Comp Neurol, 1988, 277: 302~312
- 7 Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R *et al.* Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. J Comp Neurol, 1994, 347: 249~274
- 8 Dubner R, Bennett G J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. Annu Rev Neurosci, 1983, 6: 381~418