

小鼠脊髓神经元内脑啡肽与 1 型囊泡膜谷氨酸转运体的共存

魏燕燕, 陈晶, 黄静, 李金莲, 武胜昔*

(第四军医大学人体解剖与组织胚胎学教研室暨梁詠璐脑研究中心, 西安 710032)

【摘要】 目的: 以 PPE-GFP 转基因小鼠为研究工具, 观察绿色荧光蛋白(GFP)阳性的脑啡肽(ENK)能神经元与 1 型囊泡膜谷氨酸转运体(VGLUT1)在脊髓的分布及共存情况。方法: 利用免疫组织化学和原位杂交双标染色的方法。结果: GFP 标记的 ENK 能神经元主要位于脊髓背角, 在 I-III 层最为密集, 背角深层内侧部及中央管周围呈中等密度分布, 散在分布于前角。VGLUT1 mRNA 阳性细胞广泛分布在脊髓各层。GFP/VGLUT1 双标细胞主要分布在脊髓背角, I-III 层双标细胞占 GFP 阳性细胞的 $22.95 \pm 1.10\%$, 占 VGLUT1 阳性细胞的 $27.91 \pm 2.42\%$; IV-VI 层中 $21.49 \pm 4.99\%$ GFP 阳性细胞表达 VGLUT1, $10.35 \pm 2.81\%$ VGLUT1 阳性细胞表达 GFP; 前角双标细胞占 VGLUT1 阳性细胞的 $1.07 \pm 0.37\%$, 占 GFP 阳性细胞的 $32.08 \pm 13.15\%$ 。结论: 双标结果表明脊髓内部分 ENK 能神经元表达 1 型囊泡膜谷氨酸转运体, 推测 ENK 能神经元可能通过调控谷氨酸的释放发挥感觉信息调控作用。

【关键词】 脑啡肽能神经元; 囊泡膜谷氨酸转运体; 原位杂交组织化学; 免疫组织化学; 小鼠

Co-localization of enkephalin and vesicular glutamate transporter 1 in the neurons of mouse spinal cord

Wei Yanyan, Chen Jing, Huang Jing, Li Jinlian, Wu Shengxi

(Department of Human Anatomy and K. K. Leung Brain Research Centre, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the coexistence of enkephalin (ENK)ergic neuron with vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in the spinal cord of the PPE-GFP transgenic mouse. **Methods:** Immunohistochemistry and *in situ* hybridization double staining methods. **Results:** GFP-positive cells were preferentially localized in the spinal dorsal horn and were particularly numerous in laminae I-III. The moderate density GFP-and scattered GFP-positive cells were also detected in the media part of deep lemina and around the central tube, and the ventral horn, respectively. VGLUT1 mRNA signals were present throughout the spinal cord. The GFP/VGLUT1 double-labeled neurons were mainly located in spinal dorsal horn. We found that $22.95 \pm 1.10\%$ of GFP-positive ENKergic neurons expressed VGLUT1 and $27.91 \pm 2.42\%$ of VGLUT1-positive neurons expressed ENK in the laminae I-III. The GFP/VGLUT1 double-labeled neurons constituted $21.49 \pm 4.99\%$ and $32.08 \pm 13.15\%$ of GFP-positive neurons in laminae VI-VI and the ventral horn, respectively. The GFP/VGLUT1 double-labeled neurons constituted $10.35 \pm 2.81\%$ and $1.07 \pm 0.37\%$ of VGLUT1-positive neurons in laminae VI-VI and the ventral horn, respectively. **Conclusion:** The present results showed that part of the spinal ENKergic neurons expressed VGLUT1. These results indicate that ENKergic neurons might be involved in the modulation of sensory information by regulating the release of glutamic acid.

【Key words】 enkephalin; vesicular glutamate transporter 1; immunohistochemistry; *in situ* hybridization; mouse

基金项目: 国家自然科学基金(81171052, 81070900); 陕西省自然科学基金(2011JQ4001)

* 通讯作者: 武胜昔 电话: 029-84774192, E-mail: shengxi@fmmu.edu.cn

脊髓背角是感觉信息传递与整合的初级门户,在接受来自脊髓上结构的下行调控的同时,还接受来自背根神经节的初级传入,此外脊髓背角还有大量固有的中间神经元和投射神经元,这些成分共同构成感觉信息调控环路^[1]。既往研究表明,内源性阿片肽-脑啡肽(Enkephalin, ENK)主要表达在脊髓背角,其在影响来自背根神经节感觉神经元初级传入终末的同时^[2],还可影响投射神经元对伤害性信息的感知能力^[3],此外还可调控中间神经元的反应性^[4],在感觉信息调控中发挥重要作用^[5]。

形态学及电生理学提示脊髓中 ENK 能神经元主要为中间神经元^[6,7]。依据其神经递质的不同,脊髓背角中间神经元可大致分为 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能抑制性中间神经元和谷氨酸能兴奋性中间神经元,这两类细胞在维持兴奋性与抑制性的动态平衡,维持局部环路发挥正常功能方面具有重要的作用。既往我们应用能特异性显示 ENK 能神经元的前脑啡肽原-绿色荧光蛋白(Preproenkephalin-green fluorescent protein, PPE-GFP)转基因小鼠,发现脊髓背角中 40% 的 ENK 能神经元同时表达 GABA,在调控 GABA 释放方面发挥抑制作用^[8],而 ENK 能神经元与兴奋性谷氨酸能神经元之间关系如何目前还所知甚少。囊泡膜谷氨酸转运体(resicular glutamate transporter, VGLUT)特异性地表达于谷氨酸能神经元的囊泡膜上,参与谷氨酸的转运和释放,因此被用作谷氨酸能轴突终末的标志物^[9],但小鼠脊髓内 VGLUT1 mRNA 的表达及与 ENK 能神经元的共存关系尚不清楚。

目前商品化的 ENK 抗体在脊髓内只能染出大量的纤维和终末很难染出胞体。基于这种需要,本研究使用了能够特异性显示 ENK 能神经元的 PPE-GFP 转基因小鼠。GFP 的表达受 PPE 启动子序列的调控,所有的 ENK 能神经元均表达 GFP^[8],为 ENK 能神经元的研究提供了一种非常特异和有效的工具。本实验运用 PPE-GFP 转基因小鼠,结合原位杂交和免疫组织化学双标方法,观察了 ENK 能神经元与 VGLUT1 mRNA 的共存关系。

材料和方法

1 材料

取 6 只成年 PPE-GFP 转基因小鼠(20~30 g),用 0.4% 戊巴比妥钠深麻后开胸,经心尖插管至升主动脉,用 15 ml DEPC-PBS(DEPC 1:1000 使用)快

速冲洗血液,再以 100 ml 含有 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PB, pH 7.4)灌注固定。灌注完毕后取出脊髓放入上述灌注液内过夜,放入含 30% 蔗糖(DEPC 水配制)的 PB 溶液中 4℃ 保存 24 h。恒冷箱(Leica CM1800)冠状和矢状切片,切片厚 30 μ m,将切片放于 DEPC-PBS 中保存 2 周备用。

2 方法

2.1 原位杂交探针的制备 包含 VGLUT1 探针的质粒^[10]用限制性内切酶线性化,将线性化的质粒作为模板用 T7, Sp6 RNA 聚合酶及地高辛(DIG)标记试剂盒体外转录,合成 DIG 标记的 VGLUT1 cRNA 正义探针及反义探针。

2.2 原位杂交和免疫组化双重标记染色 切片用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)漂洗后,用 2% (v/v) 过氧化氢(H_2O_2)处理 10 min 去除组织中的内源性过氧化物酶。再经过乙酰化处理, PB 清洗后于 58℃ 预杂交,向杂交液中加入 VGLUT1 反义探针及正义探针, 58℃ 继续孵育 16~18 h。杂交结束后,用 $2 \times$ SSC、 $0.2 \times$ SSC 37℃ 清洗切片,用 AP 抗 DIG(1:1000, Roche Diagnostics)和兔抗 GFP IgG^[11](1:100)室温孵育过夜。用 Tris 缓冲液(TNT)清洗切片,用生物素结合的山羊抗兔 IgG(1:1000, Vector)室温孵育切片 2 h,进而进行 NBT/BCIP(用 TS 9.5 配制)反应,观察有蓝紫色的杂交信号后,用 avidin 标记的辣根过氧化物酶复合物(1:100, Vector)室温孵育 2 h。用含 0.02% 二氨基联苯胺(DAB, Sigma)的 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)加入适量的 0.03% H_2O_2 呈色。室温干燥、脱水、透明、封片,显微镜观察并拍片。正义探针作为杂交实验的阴性对照,结果为阴性(未展示)。

统计学处理:随机选取 6 张切片进行阳性神经元的计数。为统一标准,仅对具有清晰阳性信号的神经元进行计数。分别计数 GFP 阳性细胞(棕色)、原位杂交信号(蓝色)及双标记细胞(蓝黑色)。计算双标细胞的个数分别占单标细胞数的百分比(%)。在计数阳性神经元的基础上计算双标神经元的百分比。

结 果

1 PPE-GFP 转基因小鼠 ENK 能神经元在脊髓的分布

GFP 阳性细胞主要分布在脊髓背角,在 I-III 层最为密集,背角深层内侧部及中央管周围呈中等密

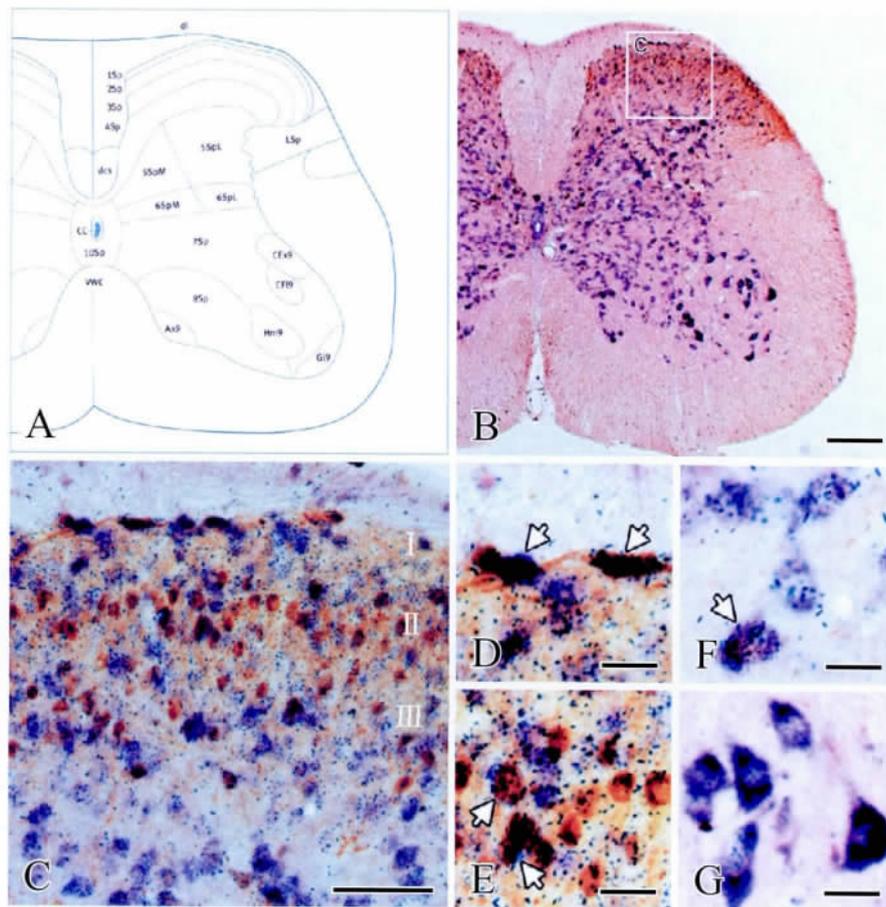


Fig. 1 *In situ* hybridization for VGLUT1 combined with IHC for GFP in transverse sections of the spinal cord. In this figure, *in situ* hybridization for VGLUT1 is the blue reaction product while that for GFP is brown. A: Schematic presenting the overview of the spinal cord. B: Lower magnification view of the VGLUT1 mRNA/GFP double-labeled signals in spinal cord. C: Higher magnification of the inset in B illustrates the morphological characteristics of laminae I-IV. D: Colocalization of GFP and VGLUT1 mRNA labeling in lamina I. Several neurons expressed both GFP and VGLUT1 mRNA (arrows). E: Colocalization of GFP and VGLUT1 mRNA signals in lamina II of the spinal cord (arrows). F: GFP and VGLUT1 mRNA colocalized neurons in the lamina VI (arrows). G: VGLUT1 mRNA labeled neurons in the spinal ventral horn. Bars = 250 μ m in B; 100 μ m in C; 25 μ m in D-G.

度分布,在前角呈散在分布(Fig. 1)。图中 GFP 免疫组织化学染色的阳性信号呈棕色。

2 VGLUT1 mRNA 在脊髓的分布

原位杂交结果显示: VGLUT1 mRNA 阳性细胞在脊髓的分布比较广泛。脊髓背角 I 层的 VGLUT1 mRNA 阳性细胞分布较少,胞体多呈梭型,与后角边缘平行排列(Fig. 1D, Fig. 2B), II 层的 VGLUT1 mRNA 阳性细胞分布较密集,胞体多呈梭型,细胞多为中小型(Fig. 1E, Fig. 2B);背角 III 层的 VGLUT1 mRNA 阳性细胞分布较 II 层稀疏,细胞多为中小型(Fig. 1E, Fig. 2B);背角 IV-VI 层的 VGLUT1 mRNA 阳性细胞分布多而均匀,细胞较 I-III 层细胞大(Fig. 1F, Fig. 2C);前角的 VGLUT1 mRNA 阳性细胞胞体分布较多,胞体形状多样,为中小型圆形、椭圆

型、梭型及三角形和大型三角形,在前角前内侧核及后内侧核的运动神经元分布明显(Fig. 1G)。

3 VGLUT1 与 GFP 阳性细胞在脊髓的共存

原位杂交与免疫组织化学双标结果显示: GFP/VGLUT1 共存细胞主要分布在脊髓背角(Fig. 1, Fig. 2) I-III 层双标细胞占 GFP 阳性细胞的(22.95 \pm 1.10)%,占 VGLUT1 阳性细胞的(27.91 \pm 2.42)%;其中 II 层双标细胞占 GFP 阳性细胞的(20.38 \pm 3.66)%,占 VGLUT1 阳性细胞的(24.40 \pm 4.26)%;III 层中(20.65 \pm 5.53)% GFP 阳性细胞表达 VGLUT1 (27.61 \pm 4.83)% VGLUT1 阳性细胞表达 GFP;前角双标细胞占 VGLUT1 阳性细胞的(1.07 \pm 0.37)%,占 GFP 阳性细胞的(32.08 \pm 13.15)% (表 1)。

表1 GFP 阳性、VGLUT1 mRNA 阳性和双标神经元在 PPE-GFP 转基因小鼠脊髓中的分布 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

层次	GFP + 细胞数	VGLUT1 + 细胞数	GFP/ VGLUT1 双标细胞数	双标细胞/ GFP 细胞(%)	双标细胞/ VGLUT1 细胞(%)
I 层	4.00 ± 0.82	6.25 ± 1.71	3.00 ± 0.82	74.18 ± 5.51	54.46 ± 32.13
II 层	37.00 ± 3.16	30.75 ± 0.96	7.50 ± 1.29	20.38 ± 3.66	24.40 ± 4.26
III 层	39.75 ± 7.54	29.75 ± 7.54	8.00 ± 1.42	20.65 ± 5.53	27.61 ± 4.83
IV-VI 层	37.50 ± 2.08	78.50 ± 8.19	8.00 ± 1.63	21.49 ± 4.99	10.35 ± 2.81
VII-X 层	2.75 ± 1.89	115.00 ± 6.06	1.25 ± 0.50	32.08 ± 13.15	1.07 ± 0.37

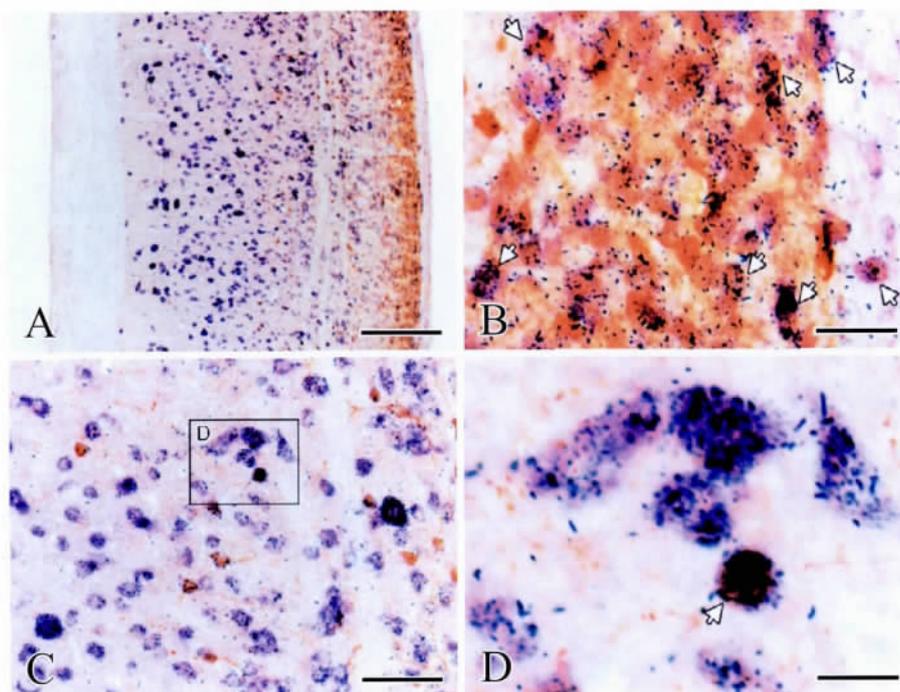


Fig.2 *In situ* hybridization for VGLUT1 combined with IHC for GFP in sagittal sections of the spinal cord. A: Lower magnification view of the double staining in the sagittal spinal cord. B: Higher magnification image of the laminae I-III. C: Higher magnification image of the lamina VI. D: Colocalization of GFP and VGLUT1 mRNA labeling in lamina VI. Several neurons expressed both GFP and VGLUT1 mRNA (arrows). Bars = 200 μm in A; 50 μm in B; 100 μm in C, D.

讨 论

借助特异性显示 ENK 能神经元的 PPE-GFP 转基因小鼠, 结合免疫组织化学和原位杂交双标技术, 本研究观察了脊髓中 ENK 能神经元与 VGLUT1 mRNA 在脊髓的分布和共存关系。

1 脊髓内 VGLUT1 mRNA 的分布

VGLUT 参与谷氨酸的转运和释放, 被用作谷氨酸能轴突终末的标志物^[9]。中枢神经系统中主要有三种 VGLUT (VGLUT1-3), 其中 VGLUT1 与 VGLUT2 在谷氨酸能轴突终末分布广泛, 且其分布具有互补性^[12,13]。有研究表明在脊髓背角, VGLUT1 阳性终末主要分布于 II 层内侧部、III 层以及 IV ~ VI 层内侧部, 与机械性感觉及本体感觉的传递有关; 而

VGLUT2 阳性终末主要分布于 I 层和 II 层, 与伤害性信息的传递有关^[14-16]。切断背根传入脊髓中 VGLUT1 的表达会明显减少, 而对 VGLUT2 的表达影响不大^[17]。本研究原位杂交结果显示 VGLUT1 mRNA 广泛分布于脊髓背角与前角的灰质中, 但在不同板层中的表达强度不同。在背角 I 层、IV ~ VI 层以及前角中, 特别是 IX 层运动核中, VGLUT1 mRNA 表达较强、胞体轮廓较清楚; 在背角 II/III 层 VGLUT1 mRNA 胞体较其他层小, 提示脊髓中表达 VGLUT1 mRNA 的谷氨酸能神经元可能包括投射神经元、中间神经元以及部分运动神经元, 其可能参与感觉信息调控及运动的调控。

2 脊髓中 ENK 与神经递质的共存关系

研究表明 ENK 在感觉信息调控中发挥重要作用

用^[5]。运用 PPE-GFP 转基因小鼠,我们的结果显示 ENK 能神经元主要分布于脊髓背角浅层和深层内侧部^[6,7]。我们既往的研究发现脊髓背角中 42% 的 ENK 能神经元同时表达 GABA^[8]。本研究结果观察到,脊髓背角中约 $22.44 \pm 1.89\%$ 的 ENK 能神经元同时表达 VGLUT1,提示 ENK 能神经元功能的复杂性,其可能对抑制性和兴奋性神经递质的释放均有调控作用。有研究报道,在其他脑区如杏仁核复合体、终纹床核等,ENK 也表达于 GABA 能神经元和谷氨酸神经元中^[18,19],这些结果提示可能存在 ENK 与神经递质的共释放。既往研究表明神经肽与小分子神经递质具有不同的释放机制,神经肽的释放需要胞内更高的钙离子浓度,且其囊泡的转运不依赖于轴突运输^[20]。ENK 可作用于阿片受体,通过突触前或突触后机制调控小分子神经递质的释放^[24,21],维持局部环路兴奋-抑制的动态平衡,参与脊髓中感觉信息的调控。

本研究提供了脊髓中 ENK 能神经元与 VGLUT1 共存的形态学依据,但其电生理学特征及功能等尚需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Wang D, Wu JH, Dong YX, *et al.* Synaptic connections between trigemino-parabrachial projection neurons and gamma-aminobutyric acid- and glycine-immunoreactive terminals in the rat [J]. *Brain Res*, 2001, 921: 133 - 137.
- [2] Ma W, Ribeiro-da-Silva A, De Koninck Y, *et al.* Substance P and enkephalin immunoreactivities in axonal boutons presynaptic to physiologically identified dorsal horn neurons. An ultrastructural multiple-labelling study in the cat [J]. *Neuroscience*, 1997, 77: 793 - 811.
- [3] Ruda MA. Opiates and pain pathways: demonstration of enkephalin synapses on dorsal horn projection neurons [J]. *Science*, 1982, 215: 1523 - 1525.
- [4] Yoshimura M, North RA. Substantia gelatinosa neurones hyperpolarized in vitro by enkephalin [J]. *Nature*, 1983, 305: 529 - 530.
- [5] Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brain-stem spinal pathways and endorphin circuitry [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1984, 7: 309 - 338.
- [6] Todd AJ, Spike RC. Co-localization of Met-enkephalin and somatostatin in the spinal cord of the rat [J]. *Neurosci Lett*, 1992, 145: 71 - 74.
- [7] Todd AJ, Spike RC, Russell G, *et al.* Immunohistochemical evidence that Met-enkephalin and GABA coexist in some neurones in rat dorsal horn [J]. *Brain Res*, 1992, 584: 149 - 156.
- [8] Huang J, Chen J, Wang W, *et al.* Neurochemical properties of enkephalinergic neurons in lumbar spinal dorsal horn revealed by pre-proenkephalin-green fluorescent protein transgenic mice [J]. *J Neurochem*, 113: 1555 - 1564.
- [9] Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, *et al.* Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons [J]. *Nature*, 2000, 407: 189 - 194.
- [10] Watakabe A, Ohsawa S, Hashikawa T, *et al.* Binding and complementary expression patterns of semaphorin 3E and plexin D1 in the mature neocortices of mice and monkeys [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 499: 258 - 273.
- [11] Tamamaki N, Nakamura K, Furuta T, *et al.* Neurons in Golgi-stain-like images revealed by GFP-adenovirus infection in vivo [J]. *Neurosci Res*, 2000, 38: 231 - 6.
- [12] Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H. Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain [J]. *J Comp Neurol*, 2002, 444: 39 - 62.
- [13] Varoqui H, Schafer MK, Zhu H, *et al.* Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses [J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 142 - 155.
- [14] Li JL, Fujiyama F, Kaneko T, *et al.* Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat [J]. *J Comp Neurol*, 2003, 457: 236 - 249.
- [15] Todd AJ, Hughes DI, Polgar E, *et al.* The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn [J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 17: 13 - 27.
- [16] Hughes DI, Polgar E, Shehab SA, *et al.* Peripheral axotomy induces depletion of the vesicular glutamate transporter VGLUT1 in central terminals of myelinated afferent fibres in the rat spinal cord [J]. *Brain Res*, 2004, 1017: 69 - 76.
- [17] Alvarez FJ, Villalba RM, Zerda R, *et al.* Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses [J]. *J Comp Neurol*, 2004, 472: 257 - 280.
- [18] Poulin JF, Castonguay-Lebel Z, Laforest S, *et al.* Enkephalin co-expression with classic neurotransmitters in the amygdaloid complex of the rat [J]. *J Comp Neurol*, 2008, 506: 943 - 959.
- [19] Poulin JF, Arbour D, Laforest S, *et al.* Neuroanatomical characterization of endogenous opioids in the bed nucleus of the stria terminalis [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33: 1356 - 1365.
- [20] Shakiryanova D, Tully A, Hewes RS, *et al.* Activity-dependent liberation of synaptic neuropeptide vesicles [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 173 - 178.
- [21] Bao L, Jin SX, Zhang C, *et al.* Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion [J]. *Neuron*, 2003, 37: 121 - 133.

(收稿日期: 2013-02-01)