

大麻素受体在成年大鼠脑组织中的分布特点*

吴永涛^{1,2} 刘宏亮^{1,3} 陈兴书² 蔡其燕² 姚忠祥^{2,3}

摘要 目的:研究大麻素 CB1、CB2 受体在成年大鼠脑组织的分布特点和规律,为进一步研究其功能打下基础。方法:用兔抗鼠 CB1、CB2 受体特异性抗体免疫组化染色,检测大鼠脑组织主要部位两种受体的表达分布情况。结果:CB1 受体阳性细胞在脑组织有广泛大量的分布,大脑皮质、胼胝体、海马、基底核区及小脑浦肯野细胞层、脑桥等区域均有较明显表达。CB2 受体阳性细胞的数量及分布部位与 CB1 受体表达基本一致,少数区域如胼胝体、小脑白质阳性细胞数相差较大,CB2 受体明显多于 CB1 受体的表达。结论:大麻素 CB1、CB2 受体在成年大鼠脑组织均广泛分布,并在多数部位表达情况一致,少数部位存在表达程度差异,提示其在神经系统中参与了某些生理及病理作用。

关键词 CB1 受体;CB2 受体;大麻素;脑组织;大鼠

中图分类号:R338.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-03-0197-03

Distributions of CB1 and CB2-positive cells in adult rat's brain/WU Yongtao, LIU Hongliang, CHEN Xingshu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(3): 197—199

Abstract Objective: To examine the expressions of cannabinoid receptor CB1、CB2 -positive cells in adult rat brain. **Method:** Immunohistochemical method was used to demonstrate the expressions of CB1、CB2 -positive cells in different regions of adult rat's brain. **Result:** CB1 receptors widely expressed in adult rat's brain, and concentrated in cortex, callosum, hippocampus, basal nucleus, cerebellum Purkinje layer and pons cerebelli. Distribution of CB2 receptors were similar to that of CB1 receptors in most cases, the quantitative differences existed in the regions of callosum and cerebellum. Expressions of CB2 receptors were more than that of CB1 receptors. **Conclusion:** Receptors of CB1 and CB2 both were widely expressed in adult rat's brain. The expression regions were similar, while in some regions the expression level were different. It might indicate that CB1 and CB2 receptors played some roles in physiological and pathological process in nervous system.

Author's address Department of Rehabilitation, Southwest Hospital, Chongqing, 400038

Key words CB1 receptor;CB2 receptor; Cannabinoid; brain; rat

大麻素具有镇痛、消炎、治疗帕金森病等广泛用途。大麻素通过 CB1、CB2 两种受体发挥作用。目前公认两种受体均为 G 蛋白偶联受体^[1],二者的氨基酸序列有 44% 同源性。

大麻素受体的分布和功能得到了越来越多的了解^[2-3],尤其在神经系统中起到的神经保护作用^[4]及干细胞的增殖^[5]等作用成为研究的热点。目前的研究显示, CB2 受体主要分布于外周,如脾脏边缘区、免疫细胞、扁桃体等,可能与大麻素免疫抑制作用有关^[6]。CB1 受体则主要位于脑、脊髓与外周神经系统中,可能与记忆、认知、运动控制的调节有关^[7]。近期发现两种受体在胶质细胞上也有表达^[8],但对二者在脑组织中的分布特征和可能意义尚还不清楚,因此本研究应用免疫组化染色方法,观察这两种大麻素受体在成年脑组织的分布特征,为更好地研究其在神经系统疾病防治中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 动物及标本

成年 Sprague-Dawley 大鼠(雌雄不限),体重 220—250g。1%戊巴比妥腹腔注射麻醉,生理盐水灌注 15min 后,4%多聚甲醛固定 20min,100ml/100g。低温下取出脑组织,后固定 12h。30%蔗糖溶液脱水过夜。OCT 包埋,恒冷冰冻切片切片机切片(10 μ m)。

1.2 试剂

抗体及试剂 CB1、CB2 抗体(sigma)、sABC kit(中杉公司)、DAB 显色试剂盒(中杉公司)、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 免疫组化

分别运用捞片法和贴片法两种技术,免疫酶标方法,切片以 0.01mol 的 PBS 缓冲液冲洗 5min $\times$ 3

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30572364)

1 第三军医大学西南医院康复科,重庆,400038

2 第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室

3 通讯作者

作者简介:吴永涛,男,硕士研究生

收稿日期:2008-08-26

次,3%的过氧化氢室温放置 20min,抑制内源性的过氧化物酶。0.01mol 的 PBS 缓冲液冲洗 5min×3 次。5%BSA 封闭液 37℃孵育 30min。入一抗 CB1、CB2 抗体 (1:300) 37℃孵育 2h 后将其放入 4℃过夜。次日 PBS 冲洗 5min×3 次,入二抗后放 37℃孵育 2h。PBS 缓冲液冲洗 5min×3 次。ABC 复合物 37℃孵育 45min。PBS 缓冲液冲洗 5min×3 次。DAB 显色:室温显色(控制反应时间),蒸馏水洗涤。裱片,烤干,脱水,透明(二甲苯),封片。设立阴性对照组(不加一抗),其余步骤及条件完全一致。间隔 5μm 做相邻切片,以同样的方法分别用两种抗体进行免疫组化染色。显微镜观察,数码相机照相。

2 结果

2.1 CB1 受体的表达特征

CB1 受体在大鼠脑组织表达较为广泛(图 1,见彩色插页),在大脑皮质、胼胝体、海马、基底核等部位表达较强。在脑的皮质各部位均有表达,表达的量与细胞类型因部位不同而有所差异。在大脑皮质,可见 CB1 受体有较广泛的分布和表达,阳性细胞数量数目较多。阳性细胞的着色部位多数为胞膜及胞体着色,部分细胞阳性着色部位位于核周,细胞突起上也可观察到阳性染色。在胼胝体,阳性细胞的数量中等,阳性显色部位多位于细胞突起,胞体较少染色。在海马,阳性细胞数量较多,CA1、CA3 区阳性结果较明显,阳性细胞多为细胞整体着色。在基底核区,阳性细胞的数量较皮质、海马略少但多于胼胝体区,阳性细胞多为整体着色,突起上未观察到二者的表达。

CB1 受体在小脑、小脑白质、小脑绒球、嗅脑等部位也有表达,在浦肯野细胞层表达量较多,阳性细胞的染色部位为整个胞体或核周,突起上也可见阳性染色。小脑白质区未发现明显阳性染色。小脑绒球可见浦肯野细胞及分子层的细胞有阳性表达,表达量中等,阳性部位多位于整个胞体。在嗅脑,可见小球层、僧帽细胞层及内部的白质区均有阳性染色,阳性细胞呈整体染色,表达量较多。

2.2 CB2 受体的表达特征

CB2 受体在大鼠脑组织也有较为广泛的表达(图 1),同样,在大脑皮质、胼胝体、海马、基底核等部位表达较强,整体情况与 CB1 受体的分布表达类似,阳性细胞大多为胞体着色,部分为核周着色,突起上也可见阳性着色。

两种受体比较可见在大脑皮质二者表达量差别不大,着色部位也无明显区别。但在胼胝体,CB2 受

体的阳性细胞数明显多于 CB1 受体,且在细胞突起上可见大量 CB2 受体阳性着色。在海马和基底核区,二者的表达未见明显区别。

CB2 受体在小脑、小脑白质、小脑绒球、嗅脑等部位的表达情况与 CB1 受体类似。不同的是,在小脑及小脑绒球的白质区可见 CB2 受体的阳性细胞,整个胞体染色。嗅脑的阳性细胞与 CB1 受体分布类似,白质区可见大量阳性细胞,且突起上阳性表达较明显。另外,在脑桥和延髓部位,也可观察到两种受体的表达。其中脑桥表达量较多,延髓表达量较少。

相邻切片可见(图 2,见彩色插页),小脑的同一个浦肯野细胞上表达此两种大麻素受体。

3 讨论

文献报道应用原位杂交和放射自显影技术研究 CB1、CB2 两种受体的分布^[9],但原位杂交技术在检测此两种受体时,检测的 mRNA 的位置不能与受体蛋白的位置很好对应,并且 mRNA 的水平与受体蛋白的水平也很难有较强的一致性。放射自显影技术虽然可以将受体的大体分布情况检测出,但很难区分出阳性细胞的情况,并且可能会掩盖微量表达的阳性结果^[10]。免疫组化的方法则可以较好的鉴定受体的阳性部位及其超微结构。本实验运用的 CB1、CB2 抗体分别以兔大麻素受体的前 77 个氨基酸残基、人大麻素受体的前 33 个氨基酸残基免疫提纯而成,可很好的用于鉴定和分析大鼠脑内两种受体的分布表达情况,从而更好的了解二者由于表达的异同可能所导致的功能的差异。

本实验发现大麻素受体 CB1、CB2 在整个大鼠脑组织中的表达比较广泛,大脑的皮质、海马、胼胝体、基底核、小脑、嗅球等区域都有明显的表达,阳性细胞多呈整体着色,也可见阳性部位在核周,细胞突起上可见较明显的着色。提示大麻素与神经系统多种功能密切相关。

大麻素受体 CB1、CB2 在嗅脑的表达量较多,二者表达量差别不大。在嗅球的表达很可能是嗅前核及内部的颗粒细胞僧帽细胞的传入纤维所致。两种受体在大脑皮质的表达类似,表达量较多,阳性细胞多为圆形。本实验观察到两种受体在胼胝体也有表达,CB2 受体的表达要强于 CB1 受体,突起上阳性染色较为明显,这种分布与大麻素受体促进神经突起生长的功能是一致的^[11]。并且此处多为神经纤维,提示它们可能与脱髓鞘及髓鞘形成相关,且 CB2 受体的作用可能强于 CB1 受体。

两种大麻素受体在海马有很强的表达,表达最

明显的区域是 CA1 和 CA3 区,二者在此区的表达量差别不大,CB1 受体的表达情况与放射自显影技术观察到的结果基本一致。表明 CB1 受体在海马角的锥体细胞有广泛的分布,而胞体和突起上的这种分布很可能与神经递质的传递有关。锥体细胞是皮质主要的传出神经元,海马结构的阳性染色很可能就与锥体细胞的投射相关。短时记忆和情绪的变化与吸食大麻有很密切的关系,大麻素受体在海马的分布与吸食大麻引起的功能变化是相符的^[8]。

大麻素受体在基底核区有比较强的表达,大麻素受体的这种表达与大麻素类的功能有密切联系,包括共济失调、不随意运动、运动不能等,近来发现 CB2 受体在丘脑具有调节神经性疼痛的作用^[12],这种分布与大麻素受体发挥作用是一致的。两种大麻素受体在小脑的表达最明显的是浦肯野细胞的表达,分子层也可见表达。另外本研究还发现在小脑白质区可见 CB2 受体的明显表达,几乎没有 CB1 受体的表达,小脑绒球分布与小脑基本相同,此白质区域的阳性细胞突起较多,因为此白质区神经元很少,故阳性细胞很可能为少突胶质细胞和星型胶质的细胞。这种分布提示大麻素受体可能参与了小脑的运动调节功能,而胶质细胞可能起到了很重要的作用。二者在此区的表达差异很可能提示它们在作用功能上存在联系和差异。

小脑的浦肯野细胞层中,同一个细胞表达 CB1、CB2 受体,更进一步的证实此两种大麻素受体在神经系统中具有密切的联系,很可能共同参与了某种生理或病理过程。

总之,两种大麻素受体的在大鼠脑组织内有非常广泛的分布,二者的分布特征在很大程度上具有一致性,同时表达的部位及数目又不尽相同,主要表现在胼胝体、小脑白质等区域的差别。它们在神经系

统的功能及可能的相互协调或影响的作用有待进一步研究探讨。

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, 54:161—202.
- [2] Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players [J]. *The AAPS Journal*, 2006, 28, 8(2):E398—306.
- [3] Marja D. Van Sickle Marnie Duncan, Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid cb2 receptors[J]. *Science*, 2005, 310:329.
- [4] Docagne F, Muñoz V, Clemente D, et al. Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 34:551—561.
- [5] Molina Holgado F, Rubio Araiz A, García Ovejero D, et al. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2007, 25(3): 629—634.
- [6] Ameri A. The effects of cannabinoid on the brain [J]. *Prog Neurobiol*, 1999, 58(4):315—48.
- [7] Pertwee RG. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview [J]. *International Journal of Obesity*, 2006, 30, 13—18.
- [8] Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, et al. Vela Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/akt signaling[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(22):9742—9753.
- [9] Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry [J]. *Neuroscience*, 1992, 48(3):665—668.
- [10] Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, et al. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 1998, 51:391—402.
- [11] Bromberg KD, Ma'ayan A, Neves SR, et al. Design logic of a cannabinoid receptor signaling network that triggers neurite outgrowth[J]. *Science*, 2008, 320(5878): 903—909.
- [12] Jhaveri MD, Elmes SJ, Richardson D, et al. Evidence for a novel functional role of cannabinoid CB2 receptors in the thalamus of neuropathic rats [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2008, 27(7):1722—1730.

中华医学会疼痛学分会第八届学术年会 暨中华疼痛学会成立二十周年庆典

由中华医学会疼痛学分会、《中国疼痛医学杂志》编辑部主办;北京博乾会议服务有限公司承办的中华医学会疼痛学分会第八届学术年会暨中华疼痛学会成立二十周年庆典将于 2009 年 9 月 4—8 日在北京国际会议中心举办。届时大会将邀请国内外疼痛学和相关学科的权威学者及著名专家做专题学术报告。

本次会议将对以下内容进行研讨:疼痛基础研究;头面痛;口腔颌面疼痛;颈腰痛;神经病理性疼痛;癌痛;骨关节疼痛;软组织痛;麻醉镇痛;微创介入镇痛;针刺镇痛;中医骨伤痛;产科镇痛;无痛诊疗技术;疼痛与心理。欢迎广大医务工作者参加此次会议。

报名方法详见:www.casp.org.cn。联系单位及地址:中华医学会疼痛学分会北京市海淀区学院路 38 号;邮编:100191。联系人及电话:任莉梅;电话:010-82801712, 010-82801705;E-mail:casp@bjmu.edu.cn。