

IFN- γ 在大鼠胸段脊髓内的分布^{*}

胡 格, 欧阳五庆, 杨增岐, 赵友琴,

李育良, 陈树林, 孙志宏, 赵慧英

(西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 为进一步探讨免疫-神经-内分泌三大系统之间的关系, 用免疫组织化学 SP 法, 对大鼠胸段脊髓内 IFN- γ 样免疫反应产物的分布进行了研究。结果表明, IFN- γ 样免疫反应产物广泛分布于胸段脊髓各板层。其中背角 I、II、III 层, 胸髓中间带外侧核, 腹角 IX 层内可见到较高密度的阳性胞体和树突。中间带和腹角内的阳性胞体的树突还伸向外侧索和腹索, 有时可达脊髓边缘。

[关键词] IFN- γ ; 胸段脊髓; 免疫-神经-内分泌网络; 免疫组织化学 SP 法; 大鼠

[中图分类号] S852.4⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)02-038-03

1977 年 Besedovsky 提出“免疫—神经—内分泌网络”(immune-neuro-endocrine network, I-N-EN)学说^[1], 使它成为医学生物学中的一个重大理论课题和许多科学工作者热衷研究的焦点。随着研究的不断深入, 人们认识到生物体内的这一网络的各组成部分之间的相互作用, 对维持正常的生理功能和机体内环境的稳定起着重要的作用。参与这个网络的物质除神经递质和内分泌激素以外, 还有细胞因子(cytokines)。神经、内分泌和免疫 3 类细胞都能产生递质、激素及细胞因子, 并且都有这些物质的受体。细胞因子作为一种介质(mediator), 不仅可以激活免疫系统, 而且对神经内分泌系统也有重要的调节作用。 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)作为一种细胞因子, 由多种细胞产生, 并具有一种或多种生物学活性的糖蛋白, 有抗病毒、抗肿瘤和调节免疫反应等活性。目前, 已有 IFN- γ 在大鼠脊神经节小细胞、交感神经节细胞、下丘脑乳头体核和中脑背侧被盖内分布的报道^[2]。为了阐明神经系统和免疫系统之间的内在联系, 本试验用抗鼠 IFN- γ 单克隆抗体和链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组织化学染色法(简称 SP 法)对胸段脊髓内 IFN- γ 的分布进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材 料

实验用 SD 大鼠(由第四军医大学实验动物研

究中心提供), 体重 200 ± 20 g, 15 周龄, 雌雄不拘。动物用体积分数 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉, 开胸腔, 经左心室插管至主动脉, 先用 400 mL 生理盐水快速冲洗, 继用质量浓度 40 g/kg 多聚甲醛(pH 7.4) 400~500 mL 灌注固定, 取出胸段脊髓, 于质量浓度 40 g/kg 多聚甲醛溶液中后固定 10 h, 然后移入体积分数 20% 蔗糖 PB 液中 4 过夜。待材料沉底后, 在冰冻切片机上切连续横切片, 片厚 25 μ m (隔 3 取 1)。切片收集在 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 中。

1.2 方 法

免疫组织化学染色(SP 法, SP 试剂盒购自福州迈新公司): 将切片经 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 h 后, 一组切片依次进行下列各步: 过氧化酶阻断溶液(试剂 A), 室温下孵育 30 min; 非免疫性动物血清(试剂 B), 室温下孵育 40 min; 鼠抗 γ IFN 抗体(1:2000, Sigma), 室温下孵育 2 h 后, 移入 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 68~72 h; 生物素标记的第二抗体(试剂 C), 室温下孵育 60 min; 链亲和素-过氧化物酶溶液(试剂 D), 室温下孵育 40 min。除第二步后漂洗 5 min 外, 其他各步骤之间用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 10 min。其中第一抗体用含小牛血清白蛋白、0.01 mol/L PBS、体积分数 0.03% 叠氮钠和质量浓度 2 g/kg Triton X-100 的血清白蛋白稀释。最后用 DAB 蓝色呈色液呈色 15~20 min。切片在 0.01 mol/L PBS 中漂洗后, 用

* [收稿日期] 2000-11-13

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39770557)

[作者简介] 胡格(1973-), 男(蒙古族), 内蒙古通辽人, 在读硕士, 主要从事神经生物学方面的研究工作。

质量浓度 10 g/kg 铬矾明胶内贴片, 室温下自然干燥后, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

对照实验用 PBS 或双蒸水代替第一抗体, 其他步骤同上。结果未见阳性反应产物。

另一组切片进行 Nissl 氏染色, 用以与 IFN- γ 免疫阳性细胞化学染色的切片对照观察, 以确定脊髓各层和核团的境界及范围。最后用光学显微镜观察并照相。

2 结果

在正常大鼠胸段脊髓灰质各板层都见到大小不等、形态不一的 IFN- γ 样阳性神经元。在背角 I、II、III 层内 IFN- γ 样阳性神经元胞体以圆形和梭形的小型细胞为主(直径约 6~8 μm), 排列比较密集, 偶尔还见到较大的细胞(图 1)。在 IV、V、VI 层内细

胞排列较疏松, 多为梭形、三角形和椭圆形的中型细胞(直径约 12~30 μm) (见图 1)。

在中间带 VII 层可见散在分布的中小型细胞, 呈三角形、椭圆形和梭形, 但在 VII 层胸髓中间带外侧核有相对较集中的梭形、三角形和椭圆形的中型细胞(直径约 14~40 μm)。部分阳性胞体的外侧树突经外侧索可投射至外侧缘(图 2, 3)。

在腹角 VIII、IX 层, 可见许多阳性多极的梭形和星形大型细胞(直径 35~60~400 μm)。IX 层阳性细胞少于 VIII 层, 细胞也相对较大(图 4)。这些阳性胞体的树突向外侧和内侧延伸, 许多进入腹索, 部分行至腹缘(图 4)。

在白质内可见到大量的有髓神经纤维、无髓神经纤维及神经终末(图 1, 3, 4)。

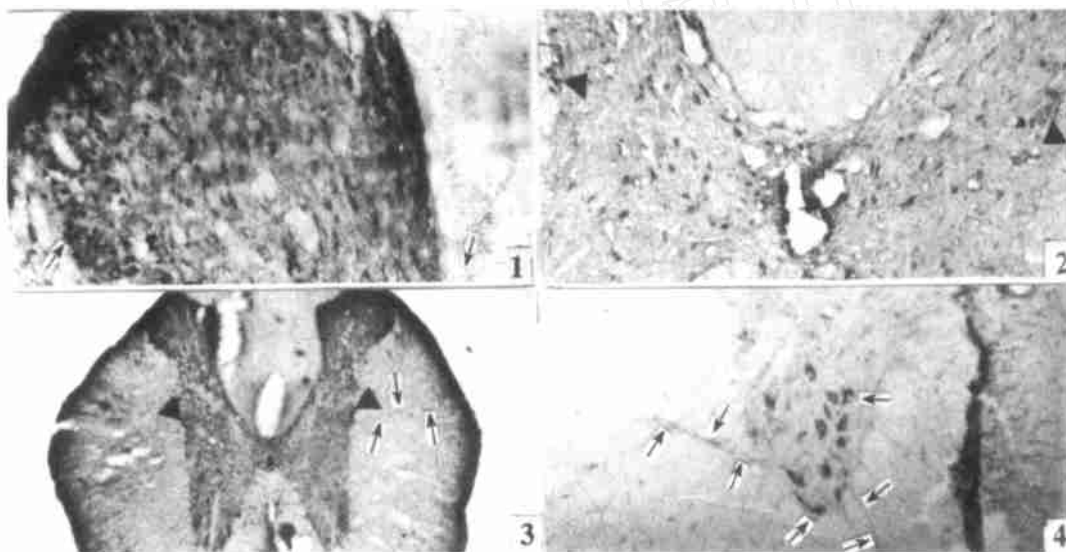


图 1~4 IFN- γ 在大鼠胸段脊髓内的分布

1. 胸段脊髓背角 IFN- γ 阳性神经元(大箭头)及白质内的阳性神经纤维 $\times 200$; 2. 胸段脊髓中间带副交感运动核内 IFN- γ 阳性神经元(黑三角) $\times 100$; 3. 胸段脊髓中间带副交感运动核内 IFN- γ 阳性神经元(黑三角)及向边缘延伸的树突(小箭头) $\times 40$; 4. 胸段脊髓腹角大型 IFN- γ 阳性神经元(大箭头)及向腹侧索和边缘延伸的树突(小箭头) $\times 100$

Fig 1-4 Distribution of IFN- γ in the spinal cord of rat

1. IFN- γ I neurons (big arrows) in thoracic dorsal horn and IFN- γ I fibers in the substantia alba $\times 200$; 2. IFN- γ I neurons (black triangle) in intermediolateral nucleus of thoracic spinal $\times 100$; 3. IFN- γ I neurons (black triangle) in intermediolateral nucleus of thoracic spinal and its dendrite (small arrows) extending to the verge $\times 40$; 4. Big type of IFN- γ I neurons (big arrows) in thoracic ventral horn and the dendrite (small arrows) extending to the ventral trace $\times 100$

3 讨论

传统认为, IFN- γ 主要是由活化的 T 细胞和 NK 细胞分泌的。关于 IFN- γ 在神经系统内分布至今未见详细报道。Kiefer 等^[2]曾报道, IFN- γ 样免疫反应产物分布于大鼠脊神经节、交感神经节、下丘脑乳头体核和中脑背侧被盖内, 并且在胸、腰骶髓处, 脊神经节小细胞发出的 IFN- γ 样免疫反应阳性纤维进入背根神经索, 投射至脊髓背角的胶状质。对于

这种神经元内存在细胞因子的现象, 作者认为 IFN- γ 可能为一种新的神经肽和有效的神经调质, 参与靶器官免疫过程的神经调控。本实验室最近也发现, IFN- γ 广泛分布于下丘脑(待发表)。本试验结果表明, IFN- γ 样阳性产物广泛分布于胸段脊髓背角。脊髓背角神经元属感觉性, 是传递通路上的二级神经元或中间神经元, 接受经背根传入脊髓的来自体表、体内和本体的各种感觉纤维。已获得的资料结合本研究推论, 脊髓背角的 IFN- γ 样阳性神经元可能与

背根节内 IFN- γ 样初级感觉神经元和下丘脑 IFN- γ 样阳性神经元有一定的功能联系,背角的 IFN- γ 样阳性神经元发出的神经纤维可能加入到对侧脊髓-丘脑束,以 IFN- γ 为介质,参与下丘脑的功能变化,影响下丘脑-垂体-靶腺-免疫器官之间的反馈联系来调节免疫功能。

脊髓中间带是植物性神经节前神经元所在部位,胸髓中间带外侧核(ML)是交感节前神经元集中之处^[3]。王亚奇等^[4]还证实,ML既接受来自内脏的信息,也接受来自躯体的信息。Burstein等^[5]证明,大鼠 ML有向下丘脑投射的神经元。下丘脑是整合内分泌与植物神经功能活动的较高级中枢。IFN- γ 在脊髓中间带的分布,至今则尚未见报道。本试验表明,IFN- γ 样阳性神经元较集中分布于 ML,而且部分阳性胞体的外侧树突经外侧索可投射至外侧缘,为针刺体表躯体部位调节内脏活动提供了初步的形态学证据。由此可以联想,针刺效应可能以 IFN- γ 等活性物质为介导,通过神经和血管途径对内分泌和免疫系统起调节平衡作用。

在胸段脊髓腹角未见 IFN- γ 分布的报道。本研

究所显示的Ⅷ、Ⅸ层内 IFN- γ 样阳性神经元可能接受来自背角的感觉信息,构成脊髓内部反射弧的传出部分,可能还参与腹角内的神经回路(通过中间神经元)。

祖国医学对人体调控机制的认识有独特的理论体系和行之有效的调节手段。这种整体的非特异性的调节理论与现代医学“I-N-EN”学说有很多相似之处。祖国医学对疾病的诊治是注重全身机能的调整,一些有效的治疗方法(包括针灸、中药等)之所以取得很好的疗效,很可能是通过神经内分泌系统的作用达到调整机体免疫功能的目的。IFN- γ 等活性物质可能是 I-N-EN 相互作用的物质基础。细胞因子与 I-N-EN 关系的研究还处于初级阶段,仍有许多问题尚待解决,不过以 I-N-EN 学说来研究中医学理论,也许会有助益。

致谢:本文在修改过程中承蒙田九畴教授的热情指导,在组织学观察方面得到范光丽教授、贾维真老师和卿素珠博士的帮助,在此一并致谢

[参考文献]

- [1] Besedovsky H, Sorkin E. Network of immune-neuroendocrine interactions[J]. Clin Exp Immunol, 1977, 27(1): 1.
- [2] Kiefer R, Keutberg G W. Gamma interferon-like immunoreactivity in the rat nervous system[J]. Neurosci, 1990, 35(3): 725.
- [3] 田九畴, 张绍雄. 畜禽神经解剖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 74.
- [4] 王亚奇, 秦秉志, 李继硕. 内源性阿片肽在骶髓排尿反射中的意义的形态学探讨—渍变法、HRP 逆行标记法和免疫组化法相结合的光镜研究[J]. 神经解剖学杂志, 1991, 7(1): 49.
- [5] Burstein R, Wang J L, Elde R P, et al. Neurons in the sacral parasympathetic nucleus that project to the hypothalamus do not also project through the pelvic nerve-A double labeling study combining fluoro-gold and cholera toxin B in the rat[J]. Brain Res, 1990, 506(1): 159.

Distribution of IFN- γ in the spinal cord of rat

HuGe, OUYANG Wu-qing, YANG Zeng-qi, ZHAO You-qin,

LI Yu-lan, CHEN Shu-lin, SUN Zhi-hong, ZHAO Hui-yang

(College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract For further study on the correlation of the immunology, nerve and endocrine, the IFN- γ immunoreactive structures in the spinal cord of rat were studied by using the technique of immunohistochemistry SP. The results indicate that: IFN- γ immunoreactive structures were widely distributed in thoracic the spinal cord. The IFN- γ immunoreactive cells and dendrites with higher density were detected in the I, II and III layer of whole spinal cord, the thoracic intermediolateral nucleus, the IX layer of ventral horn. The immunoreactive dendrite of intermediolateral and ventral horn extend to the lateral and ventral trace, some to the verge of spinal cord.

Key words: IFN- γ ; spinal cord; I-N-EN; immunohistochemistry SP; rat