

# 光照刺激对母鸡间脑 c—fos 基因表达的影响<sup>①</sup>

狄 慧, 胡 满, 王尉宇, 陈 坤,  
张 毅, 兰晓宇

(河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071001)

**摘要:** 为了解光照对鸡产蛋的影响机理, 探讨了间脑内光信息传导通路。将 60 日龄母鸡右眼遮光 7 d 后接受 20 lx 的光照刺激 1.5 h, 暗适应 1.5 h 后灌注固定, 取脑制作石蜡切片, 通过免疫组化方法检测 c—fos 基因在间脑的表达。结果显示, 间脑内有大量 Fos 样免疫反应阳性神经元, 主要见于左侧, 分布于圆核(ROT)、室旁核(PVN)和缰核(HB)等核团内, 其中 ROT 和 PVN 内最多, 表明这些核团的神经元在光信息传递中起重要作用。

**关键词:** 母鸡; 间脑; c—fos 基因; 免疫组织化学

中图分类号: S 852.16

文献标识码: A

## Influence on the expression of c—fos gene by light stimulation in hen diencephalon

DI Hui, HU Man, WANG Wei-yu, CHEN Kun,  
ZHANG Yi, LAN Xiao-yu

(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** Hens of 60 day old were used to investigate the pathway of optical information in diencephalon so as to provide a solid base for exploring the mechanism of the effect of light on egg—laying. After wearing a blinder to keep dark for 7 days, the right eyes received a light stimulation of 20lx for 1.5h and kept in dark again for 1.5h. Following perfusing with fixative, their brains were removed and made into continuous paraffin sections. Using immunohistochemical method, expression of c—fos gene in diencephalon was examined. The result showed that a number of Fos—like immunoreactive positive neurons were observed in diencephalons. They were mainly present in left side, distributing in nucleus rotundus (ROT), paraventricular nucleus (PVN), and habenular nucleus (HB) etc., especially numerous in ROT and PVN, indicating that the neurons in these nuclei play important roles in the transfer of optical information.

**Key words:** hen; diencephalon; c—fos gene; immunohistochemistry

光照对鸡产蛋量产生影响<sup>[1-2]</sup>, 目前控制光照  
提高鸡产蛋性能已成为养鸡业重要的生产管理手

段, 利用光照来提高鸡的生产性能具有很大的潜力。  
但由于对光信息影响鸡生产性能的作用机理研究不

① 收稿日期: 2008—02—23

基金项目: 河北省自然科学基金(C2007000537); 河北农业大学校长基金(20040416); 河北省留学回国人员科技活动项目择优资助基金(2006173)。

作者简介: 狄 慧(1982—), 女, 河北唐山人, 硕士, 主要从事动物神经生物学研究。

通讯作者: 胡 满(1962—), 男, 河北保定人, 博士, 教授, 主要从事动物神经生物学研究。Tel: 0312—7528348。

E-mail: human@hebau.edu.cn

够深入,特别是神经系统在其中所起的作用还不十分清楚,很大程度制约了养鸡业科学利用光照进一步提高鸡的生产性能。光信息在母鸡脑内神经元间的传导通路还有待进一步研究。

在原癌基因家族中的即早基因(Intermediate early genes, IEG),能对外界刺激引起神经递质、激素、神经冲动等的传入信息在数分钟内作出反应,进行表达。*c-fos* 基因是 IEG 家族中最重要成员之一,普遍存在于中枢神经系统,正常情况下高度保守,表达水平很低,难以检测,在受刺激的情况下可以迅速短暂地表达,给予某一特定刺激,根据脑中 *c-fos* 基因的表达可以描绘出一个参与该信息传递过程的中枢通路<sup>[3-9]</sup>。本试验用免疫组织化学方法,通过研究间脑内由光照刺激引起的 *c-fos* 基因的表达,探讨母鸡间脑内参与光信息传递过程的中枢通路,为进一步了解光照对母鸡生产性能影响的神经调节机制打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和主要试剂

1.1.1 动物 60 日龄健康白来航母鸡 30 只,随机分为 3 组:试验组、对照组和空白对照组,每组 10 只。试验组动物右眼先遮光后接受光照刺激,对照组右眼一直遮光,空白对照组两眼不做任何处理。

1.1.2 试剂 兔抗 Fos(武汉博士德提供);SP 免疫组化试剂盒(由北京中杉金桥提供,含:3%  $H_2O_2$  去离子水、封闭用正常山羊血清工作液、生物素标记山羊抗兔 IgG、辣根酶标记链霉卵白素工作液);浓缩型 DAB 试剂盒(由北京中杉金桥提供,含:浓缩缓冲液、浓缩 DAB 溶液、浓缩过氧化氢溶液);美兰染色剂。

### 1.2 方法

1.2.1 光照刺激 试验组右眼戴眼罩遮光 7 d 后,将眼罩移至左眼,使右眼保持睁开状态,进行光照刺激 1.5 h(20 lx)。对照组右眼一直戴眼罩遮光,与试验组接受相同的光刺激。光刺激后暗适应 1.5 h。空白对照组不做任何处理,在正常条件下饲养。

1.2.2 灌流固定 所有动物肌注速眠新深度麻醉(按 0.8 mL/kg 体重),剪开右心房,从左心室和左右臂头动脉依次注入 20 mL 温生理盐水(约 25℃)、160 mL 含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L PB(pH7.4, 4℃)。取脑,并放在含 4% 多聚甲醛 0.1 mol/L PB 液中 4℃ 后固定 48 h。

1.2.3 石蜡切片的制备 修块取间脑部分→流水

冲洗→常规脱水→石蜡包埋→切片:做连续切片,切片厚度 10  $\mu$ m。

1.2.4 免疫组化染色 常规脱蜡至水,采用链霉卵白素-过氧化物酶连接法(Streptavidin-peroxidase conjugate method, SP 法)进行免疫组织化学染色。一抗为 50 倍稀释兔抗 Fos。用 0.01 mol/L PBS 替代一抗作阴性对照。

DAB 显色,镜下观察控制显色时间→蒸馏水充分冲洗→部分切片用 Unna 氏多色性美蓝染液复染→脱水,透明,中性树胶封片。

1.2.5 结果观察 切片在光学显微镜下观察,使用数码显微摄像装置(HD CE-30,永新光学股份有限公司)进行显微摄影。

## 2 结果与分析

### 2.1 Fos 蛋白样免疫反应的特点

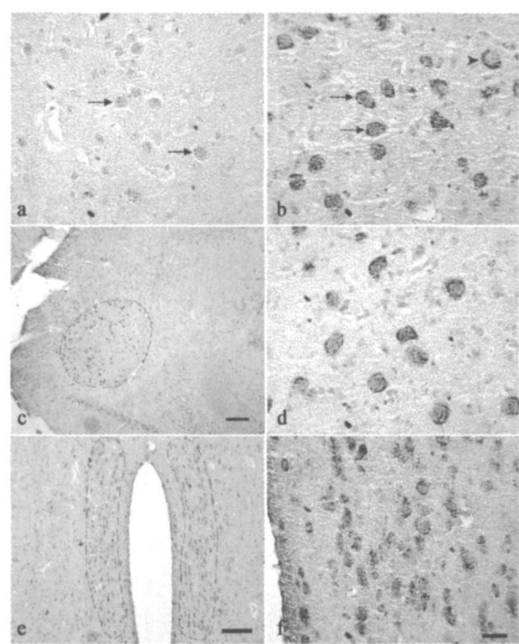
经 DAB 显色后 Fos 样免疫反应阳性物质呈棕黄色颗粒,细胞核与胞浆都有 Fos 蛋白的表达,但主要位于细胞核内。免疫组化不复染显微照片中可见清晰的棕色颗粒团(图 1a),美蓝复染显微照片中可见蓝色的胞浆包裹着的棕色颗粒团(图 1b)。

试验组间脑内见有大量 Fos 样免疫反应阳性神经元,主要在左侧。对照组和空白对照组的 Fos 样免疫反应阳性神经元很少。用 0.01 mol/L PBS 替代一抗作的阴性对照切片未见免疫反应阳性物质。由于鸟类的视神经经视交叉投射到对侧脑,表明这种 Fos 样免疫反应能代表遮光后由光照刺激诱导的 *c-fos* 基因的表达。

### 2.2 Fos 蛋白样免疫反应阳性神经细胞在间脑的分布

Fos 蛋白阳性样免疫反应神经元主要见于左侧,右侧也有一些。免疫反应阳性细胞分布较广,圆核(Nucleus rotundus, ROT)、室旁核(Paraventricular nucleus paraventricular nucleus, PVN)和缰核(Habenular nucleus, HM)等核团内均有阳性细胞分布,其中阳性细胞最多最明显的核团为 ROT 和 PVN。

在低倍镜下可见 ROT 边界清晰呈圆形或卵圆形,核内细胞个体较大,分布松散(图 1c),高倍镜下可见 ROT 大而清晰的神经细胞,且绝大多数呈圆形、卵圆形,深棕黄色阳性物质位于细胞核内(图 1d)。PVN 核在低倍镜下呈长楔形,神经元分布多而密集(图 1e),高倍镜下,可见细胞核深染,细胞呈椭圆形、圆形和多边形等(图 1f)。



箭头所指为 Fos 样免疫反应阳性神经元, 裸箭头所指为阴性神经元; c 中的标尺示 200 μm, e 中标尺示 100 μm, f 中标尺示 20 μm, 适用于 a, b, d 和 f.

图 1 Fos 样免疫反应阳性神经元在母鸡间脑的分布与形态

Fig. 1 The distribution and morphology of Fos-like immunoreactive positive neurons in hen diencephalon

3 讨论

鸟类间脑在视觉信息传递过程中起重要作用<sup>[7-9]</sup>, 离顶盖通路(视网膜—视顶盖—圆核—外纹体)是鸟类最主要的视觉通路, 圆核是该通路中的一个重要核团, 在颜色、亮度、图形等的视觉识别中, 起主要作用<sup>[10]</sup>。本研究用 c-fos 法这一功能形态学方法显示, 母鸡间脑圆核、室旁核和缰核等核团内神经元在光信息传递中起重要作用。

由于鸟类的视神经交叉, 试验组绝大多数 Fos 样免疫反应阳性神经元仅出现在接受光刺激眼的对侧间脑(左侧)。同侧间脑出现少量 Fos 样免疫反应阳性神经元, 原因可能有二: ①鸡视网膜节细胞的少量同侧投射的存在。O' Leary 等<sup>[11]</sup> 向眼球内注入 WGA-HRP 后, 在同侧间脑和中脑内观察到了一些标记纤维, 证明鸡的小部分视网膜节细胞投射到了同侧间脑和中脑。②与非视觉感光系统(non-visual photosensitivesystem, NVPS)的作用。Panda<sup>[12]</sup> 和 Ruby<sup>[13]</sup> 等发现大鼠和小鼠视网膜内存在一种特殊的含有黑视素(melanopsin), 且具备固有感光作用的节细胞(Intrinsically photo-responsive RGCs, ipRGCs), ipRGCs 在缺乏视杆细胞和视锥细胞的条件下, 对光线敏感, 并且将非视觉信号光

刺激传送到下丘脑, 参与生物钟(Circadian clock)调节, 而缺乏黑视素基因鼠则无法维持 24 h 正常生物钟规律<sup>[14]</sup>; 同侧的少量 Fos 蛋白还可能与其它因素有关, 还需进一步研究探讨。

参考文献:

[ 1 ] Lewis P D, Ciacciariello M, Ciccone N A, *et al.* Lighting regimens and plasma LH and FSH in broiler breeders [ J ]. Br Poult Sci, 2005, 46(3): 349—353.

[ 2 ] 额尔敦木图, 陈耀星, 王子旭, 等. 单色光对产蛋鸡血清中 LH 和 FSH 含量的影响 [ J ]. 中国农业科学, 2007, 40(9): 2079—2083.

[ 3 ] 祝美珍, 李志刚. 脑缺血后 c-fos 原癌基因表达 [ J ]. 河北医科大学学报, 2003, 24(3): 173—176.

[ 4 ] 王岩, 黄久仪. c-fos 原癌基因表达在脑缺血方面的研究进展 [ J ]. 上海医学, 2006, 29(3): 189—191.

[ 5 ] 马加海, 徐礼鲜. c-fos 原癌基因与痛觉调控 [ J ]. 国外医学麻醉学与复苏分册, 2000, 21(3): 141—143.

[ 6 ] Levyd Burstein R, Kainz V, *et al.* Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache [ J ]. Pain, 2007, 130(1—2): 166—176.

[ 7 ] Rogers L J, Deng C. Light experience and laterlization of the two visual pathways in the chick [ J ]. Behavioural Brain Research, 1999, 98(2): 277—287.

[ 8 ] Karten H J, Cox K, Mpodozis J. Two distinct populations of tectal neurons have unique connections within the retinotectototundal pathway of the pigeon (Columba livia) [ J ]. J Comp Neurol, 1997, 387(3): 449—465.

[ 9 ] Hu M, Naito J, Chen Y, *et al.* Afferent and efferent connections of the nucleus rotundus demonstrated by WGA-HRP in the chick [ J ]. Anat Histol Embryol, 2003, 32(6): 335—340.

[ 10 ] 唐宗湘. 鸟类离顶盖通路的结构和电生理特征 [ J ]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2000, 21(4): 21—25.

[ 11 ] O' leary D M, Gerfen C R, Cowan W M. The Development and Restriction of the Ipsilateral Retinofugal Projection in the Chick [ J ]. Brain Res, 1983, 312(1): 93—109.

[ 12 ] Panda S, Sato T K, Castrucci A M, *et al.* Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting [ J ]. Science, 2002, 298(5601): 2213—2216.

[ 13 ] Ruby N F, Brennan T J, Xie X, *et al.* Role of melanopsin in circadian responses to light [ J ]. Science, 2002, 298(5601): 2211—2213.

[ 14 ] 熊鲲, 黄菊芳, 罗学港. 非视觉感光系统的研究进展 [ J ]. 解剖学杂志, 2005, 28(3): 358—360.

(编辑:李 川)