

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2019) 03 - 0205 - 06

Orexin - A 对脊髓腹角神经元基本电生理参数及尼古丁电流的作用

黄 艳 高凌云 朱苏月 张环环 汪萌芽 郑 超

(皖南医学院 细胞电生理研究室 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 研究 orexin-A 对脊髓腹角神经元基本电生理参数及烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR) 的作用。方法: 使用 7 ~ 12 d 的新生 SD 大鼠。麻醉后 将含有腰骶膨大的脊髓分离并切片。用木瓜蛋白酶(papain 0. 18 g/30 mL 人工脑脊液消化切片并孵育 40 min。显微镜下选取腹角, 使用抛光的巴斯德吸管进行神经元的急性机械分离。对贴壁的健康神经元进行穿孔膜片钳记录。结果: ①急性分离的脊髓腹角神经元状态良好, 具有形状多样的胞体和完整的突起; ②9 个急性分离的脊髓腹角神经元有自发动作电位; ③持续灌流 orexin-A(OXA) 2 min 后, 在 5 例细胞记录到 4 个脊髓腹角神经元的自发动作电位放电频率增加了(63. 64 ± 5. 25) % 幅度等参数无明显变化; ④在 15 个神经元, 有 12 例细胞给予 0. 3 mmol/L 尼古丁诱导出内向电流, 幅度为(142. 97 ± 75. 02) pA, 用 100 nmol/L OXA 进行 2 min 的预处理, 可显著抑制电流幅度至(69. 07 ± 61. 07) pA($P < 0. 001$), 抑制率为(54. 75 ± 22. 62) %; ⑤在 9 个神经元中有 7 例细胞给予尼古丁诱导的电流幅度为(129. 31 ± 69. 38) pA, 将 100 nmol/L OXA 共同施用于神经元, 尼古丁诱导的电流幅度降为(68. 61 ± 34. 98) pA, 在此基础上, 通过施用 orexin-1 受体(OX1R) 拮抗剂 SB334867(10 μmol/L) 2 min 后可阻断 OXA 对尼古丁诱导电流的抑制作用, 电流幅值为(93. 46 ± 56. 45) pA。因此 SB334867 可完全取消 OXA 对尼古丁电流的抑制作用。但对于另两例神经元, SB334867 并未阻断 OXA 的抑制作用。结论: Orexin-A 可能通过 OX1R 对脊髓大部分腹角神经元的尼古丁电流具有抑制作用, 但不能排除 orexin-2 受体(OX2R) 也参与 OXA 作用的可能性。

【关键词】Orexin-A; 脊髓腹角神经元; N 型乙酰胆碱受体(nAChR); 穿孔膜片钳记录

【中图分类号】R-332; R 338. 21 **【文献标志码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2019. 03. 001

Effects of orexin-A on basic electrophysiological parameters and nicotinic current in spinal ventral-horn neurons

HUANG Yan, GAO Lingyun, ZHU Suyue, ZHANG Huanhuan, WANG Mengya, ZHENG Chao

Cell Electrophysiology Laboratory, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the effects of orexin-A on basic electrophysiological parameters and nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in spinal ventral-horn neurons. **Methods:** Neonatal SD rats aged 7-12 days were used as experimental animals. After anesthesia, the spinal cord containing the lumbosacral enlargement was separated and sliced. The slices were digested with digestive enzyme (Papain 0. 18 g/30 mL artificial cerebrospinal fluid, ACSF) and incubated for 40 minutes. The ventral horn was selected for acute mechanical dissociation of neurons with fire-polished micro-Pasteur pipette. Single cells were dissociated and perforated patch-clamp recording was performed. **Results:** ①The isolated ventral horn neurons were in good condition with large diverse somata and intact processes; ②The spontaneous action potentials of 9 acutely isolated spinal ventral horn neurons were recorded; ③After 2 minutes of continuous perfusion of orexin-A (OXA), the spontaneous action potential discharge frequency of the four spinal ventral horn neurons was increased (63. 64 ± 5. 25) % with no significant change in other parameters such as amplitude; ④In 12 of the 15 neurons, 0. 3 mmol/L nicotine induced inward current with amplitude of (142. 97 ± 75. 02) pA, and bath application with 100 nmol/L orexin-A for 2 minutes significantly inhibited the current amplitude to (69. 07 ± 61. 07) pA ($P < 0. 001$), that is, inhibition ratio was (54. 75 ± 22. 62) % and ⑤In 7 of the 9 neurons, the nicotine-induced current amplitude was (129. 31 ± 69. 38) pA, 100 nmol/L orexin-A was co-administered to the neurons, and the nicotine-induced current amplitude decreased to (68. 61 ± 34. 98) pA. On this basis, the inhibitory effect of OXA on nicotine-induced current was blocked by administration of the orexin-1 re-

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200828, 31271155); 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目(gxyqZD2016175, gxyq2017034); 安徽省高校自然科学研究项目(KJ2018A0266); 皖南医学院博士科研启动基金(rcqd201609)

收稿日期: 2018-12-04

作者简介: 黄 艳(1994-), 女, 2016 级硕士研究生, (电话) 17855369244, (电子信箱) 906565490@qq. com;

郑 超, 男, 副教授, 硕士生导师, (电子信箱) chaozheng10@fudan. edu. cn, 通信作者;

汪萌芽, 男, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) wangmy@wnmc. edu. cn, 通信作者。

ceptor (OX1R) antagonist SB334867 (10 $\mu\text{mol/L}$) for 2 minutes. The current amplitude was (93.46 \pm 56.45) pA. Therefore SB334867 completely nullified the inhibition of nicotine current by orexin A. But for the other two neurons, SB334867 did not prevent the inhibition of orexin A. **Conclusion:** Orexin-A probably via OX1Rs has an inhibitory action on nicotine currents in most of ventral horn neurons in spinal cord but the possibility of OX2R involvement in the orexin-A effects cannot be excluded either.

【Key words】 orexin-A; spinal ventral horn neurons; nicotinic acetylcholine receptor (nAChR); perforated patch-clamp recordings

Orexin(食欲素,也称为 hypocretin),由来自同一前体蛋白水解酶加工的两种神经肽 orexin-A(OXA)和 orexin-B(OXB)组成^[1],通过结合并激活两种独立的 G 蛋白耦联受体,即 orexin-1 受体(OX1R)和 orexin-2 受体(OX2R),产生对神经元的调节作用^[1-2]。目前,有关 orexin-A 在脊髓上的分布及神经纤维投射的研究居多,但有关 orexin-A 对脊髓功能的研究较少见,尤其在脊髓腹角神经元的运动控制功能上。随着对 orexin 神经元的深入研究,有学者提出 orexin 能系统和胆碱能、单胺能系统之间存在交互作用^[3]。在 orexin 投射到腹侧被盖区、基底前脑等大脑多个区域都表现出与胆碱能神经元的协同作用,表现在成瘾、睡眠与觉醒等方面^[4-5]。而在脊髓发育期,胆碱能传递与负责产生运动行为的神经回路相关。在生理学和行为学研究中,烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)的激活与调节胆碱能信号传导有关^[6]。并且 nAChR 亚型介导了乙酰胆碱对脊髓运动神经元的兴奋作用^[7]。提示 nAChR 在脊髓运动控制中扮演着重要角色。这为我们的实验开展提供了理论依据,但是 orexin 是否对脊髓腹角神经元上的 nAChR 有调制作用,从而直接或间接地影响脊髓腹角的运动控制? 尚未见报道。因此,本研究采用 7~12 d 的新生大鼠脊髓腹角神经元急性分离联合单细胞穿孔膜片钳记录技术研究 OXA 对脊髓腹角神经元上 nAChR 功能的影响,并进行初步的机制分析。为进一步深化对脊髓运动控制机制的认识提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用 7~12 d 的新生 Sprague-Dawley (SD) 乳大鼠,雌雄不拘,母鼠乳喂养,购于江苏省南京市江宁区青龙山动物繁殖场。动物许可证号码 SCXK(苏):2017-0001。

1.2 药品与溶液 参考实验室前期工作^[8],配制用于脊髓切片制备和酶消化的人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF),配方为 (mmol/L): NaCl 124.0; NaHCO₃ 24.0; KCl 5.0; KH₂PO₄ 1.2; CaCl₂ 2.4; MgSO₄ 1.3; Glucose 10.0; 通入混合氧(95% O₂ + 5% CO₂) 后使 pH 达到 7.35~7.45。配制用于分离细胞和穿孔膜片钳记录的标准细胞外液,配方为

(mmol/L): NaCl 150.0; KCl 5.0; MgCl₂ 1.0; CaCl₂ 2.0; HEPES 10.0; Glucose 10.0; 用 Tris-base 调节 pH 至 7.36。配制电极内液,配方 (mmol/L): K-gluconate 120.0; KCl 20.0; MgCl₂ 2.0; EGTA 0.5; HEPES 20.0; Na₂-ATP 2.0; Na-GTP 0.5; 用 KOH 调节 pH 至 7.26,并调节渗透压至 290~300 mOsm / (kg·H₂O),最后用滤头(Millex GV filter unit, 0.22 μm) 过滤后,于 -20℃ 下保存。配制穿孔药 Amphotericin B (AB) 母液,浓度为 40 g/L,冷冻备用;使用浓度为 200 mg/L。烧制琼脂,冷藏备用。配制实验所需药品的母液:0.1 mol/L 尼古丁(Nicotine, Nic), 0.1 mmol/L orexin-A, 10 mmol/L SB334867。除 AB、SB334867 需用二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DM-SO) 溶解外,其余配液皆用去离子水(Purelab Flex, ELGA LabWater, UK) 配制并冷冻备用。其中, HEPES、Tris-base、K-gluconate、EGTA、Na₂-ATP、Na-GTP、Nicotine 均购于 SIGMA 公司; Amphotericin B (AB)、orexin-A、SB334867 购于 Tocris Bioscience 公司; 普通试剂购于国药集团化学试剂有限公司。将玻璃微电极毛坯(Sutter Instrument, Inc., USA) 利用微电极拉制仪(Model PC-40 Puller, NARISHIGE, Japan) 拉制成实验所需微电极,再灌注含穿孔药的电极内液,入液电极电阻为 5~10 M Ω 。

1.3 急性分离脊髓腹角神经元 参考实验室前期工作^[8],取 7~12 d 的新生乳大鼠,麻醉后,游离出含腰骶膨大的脊髓,修剪神经根,剪取合适长度,用琼脂固定于震荡切片机(Vibratome, Technical Products International Inc., USA) 上,切取 4~5 片厚度 300~500 μm 的切片,将脊髓切片置于室温(23~25℃) 孵育 30 min 左右,从剥离脊髓至切片完成整个过程控制在 15 min 以内;将孵育好的切片移入含有木瓜蛋白酶(Papain) 的 ACSF 中,并在 33℃ 的恒温水浴锅中连续消化 20~25 min;将消化好的脊髓切片再移入新鲜 ACSF 中置室温下孵育约 1 h 终止消化,全程通混合氧气(95% O₂ + 5% CO₂);在显微镜下沿中央管对半切取脊髓腹侧,置于含氧饱和的标准细胞外液的小培养皿(35 mm \times 10 mm, Corning, NY, USA) 中,并用自制的不同口径的巴斯德吹管机械吹打成单细胞,静置 15 min 使细胞贴壁。

1.4 穿孔膜片钳记录 将静置好的小培养皿放置

在荧光倒置显微镜(Leica DMI 3000 B, Germany)下观察,选择状态良好、胞体较大、突起较多的神经元,调节显微镜使目标细胞位于视野中央,使用图像采集软件(LAS V3.8, Leica, Germany)拍摄记录细胞形态;在低倍镜下,调节给药管位置,使其冲洗管管口对准细胞;将拉制成形的玻璃微电极充灌含穿孔药的电极内液,并固定于微操纵仪(MP-225, Sutter Instrument Inc., USA)的电极夹持器上,调节微操纵仪,使电极尖端入液,测定电极电阻为5~10 MΩ,可用于实验,调节电极使其尖端处于细胞附近;高倍镜下调节电极使其尖端处于神经元胞体的正上方,缓慢下电极,同时联合Multiclamp 700B和Clampex 10.6(Axon Instrument Inc., USA)软件观察,当电极尖端接触到细胞时,给予适当的负压,使电极电阻达到GΩ,形成高阻封接后,给予电容补偿,在电流钳模式下,记录神经元的自发放电情况;再转换成电压钳模式,钳制电位为-70 mV,在穿孔药的作用下,待细胞自动破膜,观察接入电阻Ra等参数,当Ra < 60 MΩ时,可进行膜片钳记录(patch clamp recording);通过快速灌流给药系统(SF-77B Perfusion Fast-step, Warner Instrument Corporation, USA)^[8],给予nAChR激动剂尼古丁,记录所钳制神经元的电流变化,在此基础上,给予神经肽orexin-A,记录其对尼古丁诱导的内向电流的影响,并使用OX1R选择性阻断剂SB334867分析orexin-A对尼古丁电流影响的作用机制。

1.5 数据采集与分析 用图像采集软件拍摄细胞形态;使用Clampex 10.6软件记录保存数据,并用Clampfit 10.6软件、SPSS 18.0对数据进行分析 and 制图。数据以均数 ± 标准差表示,统计方法为配对t检验和单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察 采用酶消化、机械吹打法急性分离脊髓腹角神经元,在显微镜下观察到神经元胞体形状多样化,从极端发出的突起多,形态完整且有分支,细胞状态良好(图1)。

2.2 急性分离脊髓腹角神经元的自发放电 在显微镜下找到可钳制细胞,使用玻璃微电极进行高阻封接,进行电容补偿后,在电流钳模式下,记录其自发动作电位,放电稳定且连续,放电频率为(10.71 ± 7.04) Hz (n = 9, 典型图见图2A)。

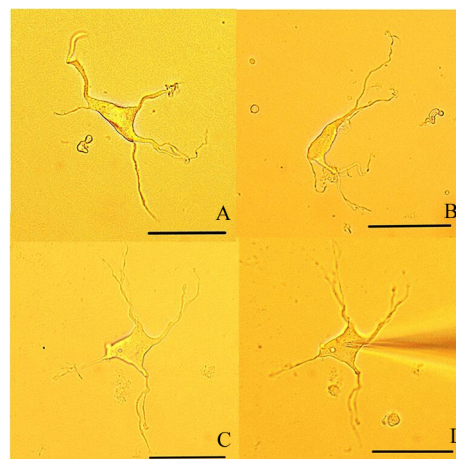


图1 显微镜下脊髓腹角神经元的形态
A: 胞体呈菱形的神经元,从极端发出五条突起,并有分支; B: 胞体呈梭形的神经元; C: 胞体呈四边形的神经元,从极端发出4条突起,且分支多而完整; D: 是C细胞在玻璃微电极钳制时的状态。图中所有标尺均为50 μm。

图1 显微镜下脊髓腹角神经元的形态

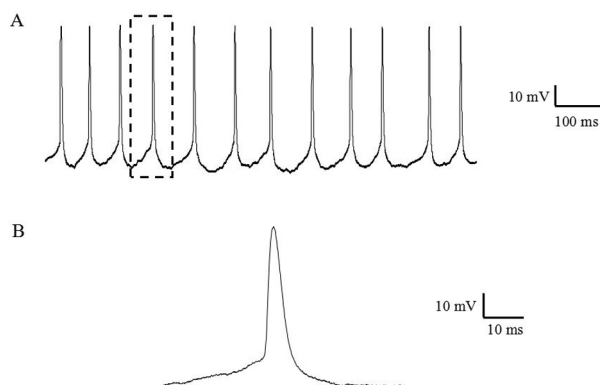
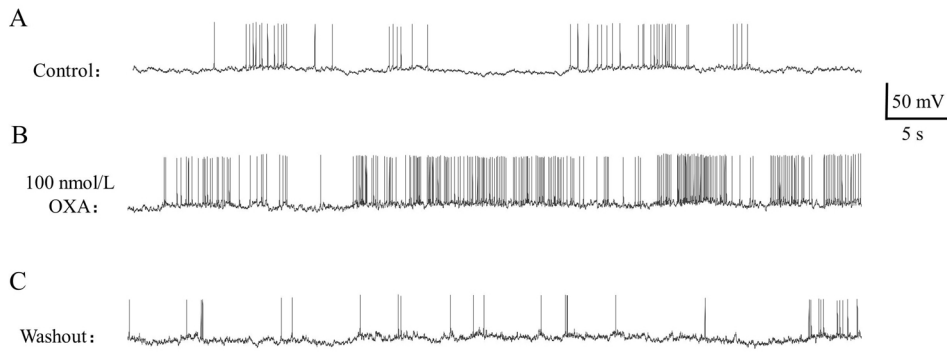


图2 急性分离的脊髓腹角神经元的自发动作电位
A: 单个神经元连续放电1 s,放电频率为12 Hz,动作电位的幅度为71.83 mV; B: 由(A)选取放大的典型动作电位。

图2 急性分离的脊髓腹角神经元的自发动作电位

2.3 Orexin-A对脊髓腹角神经元自发动作电位的影响 操作如上,记录到4个脊髓腹角神经元在1 min内持续的自发放电,其动作电位幅度为(63.90 ± 23.33) mV,放电频率为(5.75 ± 2.49) Hz;持续灌流orexin-A(100 nmol/L) 2 min后,动作电位幅度为(72.00 ± 12.51) mV,与灌流前相比差异无统计学意义(P > 0.05),但放电频率增加至(16.25 ± 7.95) Hz,较灌流前增加(63.64 ± 5.25)%,差异有统计学意义(P < 0.05);最后用标准细胞外液灌流冲洗2 min后,动作电位幅度为(54.14 ± 9.86) mV,放电频率为(5.00 ± 4.69) Hz,较灌流前差异无统计学意义(P > 0.05)。结果见图3和表1。



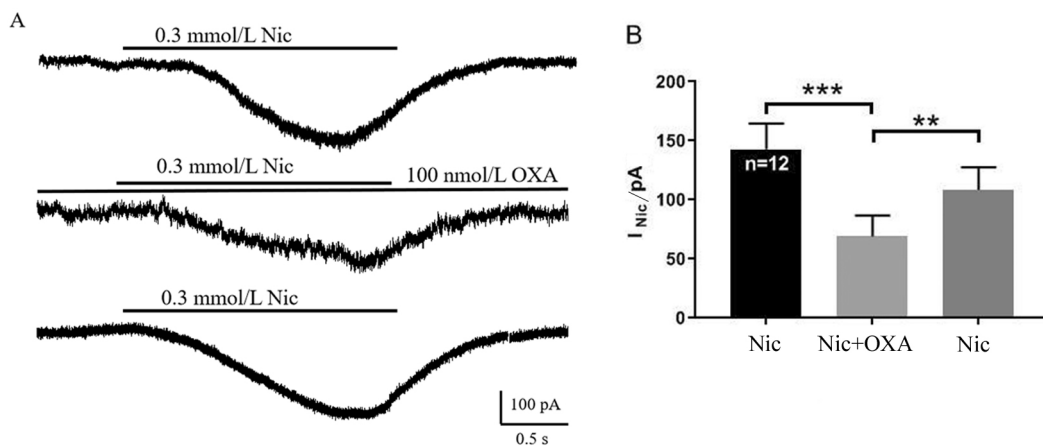
A: 1 min 内神经元的自发放电; B: Orexin-A 灌流 2 min 后 同一神经元的自发放电; C: 用标准细胞外液冲洗 2 min 后同一神经元的自发放电。

图 3 Orexin-A 对脊髓腹角神经元自发动作电位的影响

表 1 新生大鼠脊髓腹角神经元在 orexin-A 灌流前后的电生理参数比较

	Orexin-A 灌流前	Orexin-A 灌流后	配对 <i>t</i>	<i>P</i>
动作电位				
幅度/mV	63.90 ± 23.33	72.00 ± 12.51	0.961	0.407
放电频率/Hz	5.75 ± 2.49	16.25 ± 7.95	3.364	0.044
阈电位/mV	-48.77 ± 12.08	-51.54 ± 5.74	0.400	0.716
超射/mV	8.08 ± 5.54	9.35 ± 5.69	3.004	0.057
锋电位				
幅度/mV	53.26 ± 20.49	61.07 ± 10.40	0.706	0.531
半幅时程/ms	2.62 ± 0.97	2.94 ± 0.74	1.385	0.260
最大上升斜率/(mV/ms)	42.58 ± 30.34	39.36 ± 25.81	0.674	0.548
上升时间/ms	0.35 ± 0.26	0.24 ± 0.09	0.649	0.563
最大下降斜率/(mV/ms)	-24.33 ± 22.48	-17.80 ± 14.02	1.205	0.314
下降时间/ms	0.58 ± 0.23	0.94 ± 0.59	1.478	0.236

2.4 Orexin-A 对脊髓腹角神经元尼古丁电流的作用 在记录的 15 个神经元中的 12 例细胞,首先应用 0.3 mmol/L 尼古丁在脊髓腹角神经元上诱发的电流幅度为 (142.97 ± 75.02) pA; 再给予 100 nmol/L orexin-A 预处理 2 min 后,可显著抑制尼古丁电流至 (69.07 ± 61.07) pA ($P < 0.001$),抑制率为 (54.75 ± 22.62)%; 使用标准细胞外液灌流冲洗 2 min 后,再次记录尼古丁电流幅度为 (108.59 ± 62.95) pA,与给予 orexin-A 后记录的尼古丁电流相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。各组间尼古丁电流幅度均值差异有统计学意义 ($F = 3.598, P = 0.039$) 结果见图 4。



A: 典型记录图显示 orexin-A (100 nmol/L) 对尼古丁电流的作用; B: Orexin-A 对尼古丁电流的影响 ($n = 12, * P < 0.01, ** P < 0.001$)。

图 4 脊髓腹角神经元上 orexin-A 对尼古丁电流的影响

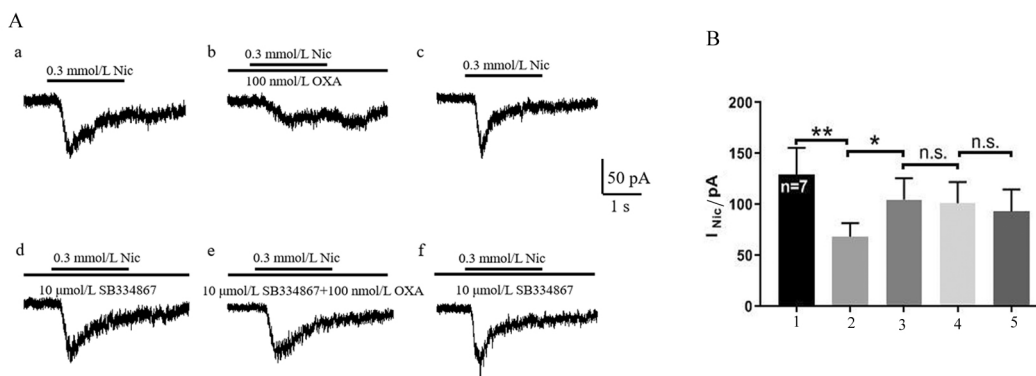
2.5 SB334867 对 orexin-A 抑制尼古丁电流的影响

如图 5 所示,在 9 个细胞中记录到 7 个脊髓腹角神经元,应用 0.3 mmol/L 尼古丁诱发的全细胞电流平均幅度为 (129.31 ± 69.38) pA; 给予 100 nmol/L orexin-A 后电流被抑制到 (68.61 ± 34.98) pA ($P <$

0.01); 使用标准细胞外液冲洗 2 min 后,尼古丁电流平均幅度恢复至 (104.67 ± 55.72) pA ($P > 0.05$); 在此基础上,给予 OX1R 选择性阻断剂 SB334867,使得 orexin-A 对尼古丁电流的抑制作用消失,电流幅度为 (93.46 ± 56.45) pA,与使用含 SB334867 的标准细胞外液灌流

冲洗 2 min 后所记录的尼古丁电流幅度(101.33 ± 54.72) pA 相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。各

组间尼古丁电流幅度均值差异无统计学意义($F = 1.090$, $P = 0.379$)。



A: a. 0.3 mmol/L 尼古丁诱发的内向电流; b. 给予 100 nmol/L orexin-A 对尼古丁电流有抑制作用; c. 用标准细胞外液冲洗后, 尼古丁电流得以恢复; d. 给予 10 μmol/L SB334867 对尼古丁电流幅度无影响; e. 同时给予 orexin-A 与 SB334867 后, 尼古丁电流无明显改变; f. 用含 SB334867 的外液冲洗后, 以 d 为参照, 尼古丁电流无明显变化。B: SB334867 与 orexin-A 对尼古丁电流幅度影响的统计图($n = 7$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。1. Nic; 2. Nic + OXA; 3. Nic; 4. Nic + SB334867; 5. Nic + OXA + SB334867。

图 5 SB334867 对 orexin-A 抑制尼古丁电流的作用

3 讨论

脊髓腹角神经元中 nAChR 在运动控制中扮演重要角色。本研究发现 orexin-A 主要通过 OX1R 介导, 对大部分脊髓腹角神经元尼古丁电流具有抑制作用。提示 orexin-A 可通过 OX1R 对脊髓运动控制发挥调制作用。实验所记录的急性分离的脊髓腹角神经元形态、自发动作电位及其电生理参数与本实验室前期报道基本一致^[8]。实验结果显示, orexin-A 能增加脊髓腹角神经元的放电频率, 这之前报道的结果类似^[9-10]。研究表明, OX1R 在神经元胞体、树突等突触后结构中表达并发挥效应^[11-12]。该分离细胞的研究中, orexin-A 对脊髓腹角神经元的兴奋效应可能源于直接作用于突触后膜上 OX1R; 但在脊髓切片, 即存在完整突触的情况下, orexin 还可以通过突触前膜上的 OX1R 易化谷氨酸释放来发挥效应, 从而引起脊髓运动神经元的放电频率和兴奋性的提高^[10]。为了明确 orexin-A 对脊髓腹角神经元的作用是否还存在突触前机制, 仍需进一步开展研究。

虽然大多数实验表明 orexin-A 是一种兴奋性的神经肽, 并能在多种神经元上诱发出内向电流^[12-14], 但也有学者提出 orexin 也具有抑制性作用^[15]。本实验观察到单独给予 orexin-A 并不能在脊髓腹角神经元诱发全细胞电流(数据未显示), 但可抑制大部分的脊髓腹角神经元上尼古丁电流, 这之前的报道既有相同之处, 也有不同之处, 提示 orexin-A 在脊髓腹角神经元上的作用具有特殊性。此外, 本研究还发现 orexin-A 能增加腹角神经元的自发放电频率, 这似乎与抑制尼古丁电流自相矛盾,

其实不然。首先, 这可能与不同的胞内信号转导通路有关。OX1R 是 G 蛋白耦联受体, 研究发现 orexin-A 可通过 OX1R 激活 Gi/o/PI-PLC/IP3/Ca²⁺/PKC 抑制大鼠视网膜神经节细胞上 AMPA 电流^[16], 但是又可以通过 Gq/PI-PLC/IP3/Ca²⁺/PKC 信号转导增加神经节细胞上的 L 型钙电流^[17]。这说明在同一类神经元上也可能存在不同的信号转导途径而产生不同的调节效应。其次, 取决于对 Ca²⁺ 的依赖性。Orexin-A 与 OX1R 结合后能激活 PLC, 生成三磷酸肌醇(IP3)和二酰甘油(DAG)等第二信使, 进而促使胞内钙库释放引起胞浆中 Ca²⁺ 浓度和 PKC 活性升高^[18], 使神经元细胞膜上的受体发生磷酸化, 从而改变了受体功能, 这与近期报道类似^[19]。目前, 尚未有研究发现 orexin-A 在其他脑区下调尼古丁电流的机制, 所以 orexin-A 提升腹角神经元的放电频率, 或许是其作用于不同受体、通道等后产生的综合效应, 而对尼古丁电流的压抑可能只是其中的一个方面。

为分析 orexin-A 对 nAChR 的作用机制, 本实验应用 OX1R 选择性阻断剂 SB334867 作用于脊髓腹角神经元上, 实验结果显示, 在 SB334867 单独存在的情况下并不影响背景尼古丁电流, 进一步实验发现在灌流 SB334867 后能完全取消 orexin-A 对尼古丁电流的抑制作用, 说明在这 7 个细胞 orexin-A 完全是通过 OX1R 来发挥作用。但实验中还有 2 例神经元无明显的变化, 即在这 2 个细胞上可能不是通过 OX1R 来介导, 或许存在 OX2R 或者通过腺苷酸环化酶耦联而不是 PLC 发挥作用的第 3 种 orexin

受体, 尽管这种假定的受体仅在大鼠嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 中提出^[20]。根据目前的实验结果来看, orexin-A 通过 OX1R 介导对脊髓大部分腹角神经元上的尼古丁电流有抑制作用。

【参考文献】

- [1] SAKURAI T , AMEMIYA A , SHII M *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior [J]. *Cell* ,1998 ,92 (5) : 573 - 585.
- [2] LEBOLD TP , BONAVENTURE P , SHIREMAN BT. Selective orexin receptor antagonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2013 23: 4761 - 4769.
- [3] KOHLMEIER K. A. , TYLER *et al.* Differential actions of orexin receptors in brainstem cholinergic and monoaminergic neurons revealed by receptor knockouts: implications for orexinergic signaling in arousal and narcolepsy [J]. *Front Neurosci* 2013 7: 246.
- [4] SIMMONS SJ , GENTILE TA , MO L *et al.* Nicotinic receptor blockade decreases fos immunoreactivity within orexin/hypocretin-expressing neurons of nicotine-exposed rats [J]. *Behav Brain Res* , 2016 314: 226 - 233.
- [5] FERRARI LL , AGOSTINELLI LJ , KRASHES MJ *et al.* Dynorphin inhibits basal forebrain cholinergic neurons by pre- and postsynaptic mechanisms [J]. *J Physiol* 2016 594(4) : 1069 - 1085.
- [6] MENELAOU E , UDVADIA AJ , TANGUAY RL *et al.* Activation of $\alpha 2A$ -containing nicotinic acetylcholine receptors mediates nicotine-induced motor output in embryonic zebrafish [J]. *Eur J Neurosci* , 2014 40(1) : 2225 - 2240.
- [7] MINE N , TANIGUCHI W , NISHIO N *et al.* Synaptic modulation of excitatory synaptic transmission by nicotinic acetylcholine receptors in spinal ventral horn neurons [J]. *Neuroscience* 2015 290: 18 - 30.
- [8] 高凌云, 张环环, 查盈盈, 等. 急性分离的脊髓腹角神经元膜片钳记录技术 [J]. *皖南医学院学报* 2017 36(6) : 511 - 515.
- [9] SHENG Q , XUE Y , WANG Y , *et al.* The subthalamic neurons are activated by both orexin-a and orexin-b [J]. *Neuroscience* , 2018 , 369: 97 - 108.
- [10] YAMUY J , FUNG SJ , XI M *et al.* Hypocretinergic control of spinal cord motoneurons [J]. *J Neurosci* 2004 24(23) : 5336 - 5345.
- [11] HAY YA , ANDJELIC S , BADR S *et al.* Orexin-dependent activation of layer VIB enhances cortical network activity and integration of non-specific thalamocortical inputs [J]. *Brain Struct Funct* , 2015 220(6) : 3497 - 3512.
- [12] CHEN XY , CHEN L , DU YF. Orexin-A increases the firing activity of hippocampal CA1 neurons through orexin-1 receptors [J]. *J Neurosci Res* 2017 95(7) : 1415 - 1426.
- [13] ZHANG J , LI B , YU L *et al.* A role for orexin in central vestibular motor control [J]. *Neuron* 2011 69(4) : 793 - 804.
- [14] KOLAJ M , CODERRE E , RENAUD LP. Orexin peptides enhance median preoptic nucleus neuronal excitability via postsynaptic membrane depolarization and enhancement of glutamatergic afferents [J]. *Neuroscience* 2008 155(4) : 1212 - 1220.
- [15] MARTIN G , FABRE V , SIGGINS GR *et al.* Interaction of the hypocretins with neurotransmitters in the nucleus accumbens [J]. *Regul Pept* 2002 104(1-3) : 111 - 117.
- [16] ZHENG C , DENG QQ , LIU LL *et al.* Orexin-A differentially modulates AMPA-preferring responses of ganglion cells and amacrine cells in rat retina [J]. *Neuropharmacology* 2015 93: 80 - 93.
- [17] LIU F , WENG SJ , YANG XL *et al.* Orexin-A potentiates L-type calcium/barium currents in rat retinal ganglion cells [J]. *Neuroscience* 2015 305: 225 - 237.
- [18] 宋承辉, 胡志安. Orexin: 觉醒通路中一种重要的下丘脑神经肽 [J]. *第三军医大学学报* 2003(13) : 1207 - 1209.
- [19] SACHIDANANDAN D , REDDY HP , MANI A *et al.* The neuropeptide orexin-a inhibits the gaba (a) receptor by pkc and ca^{2+} / camkii-dependent phosphorylation of its $\beta(1)$ subunit [J]. *J Mol Neurosci* 2017 61(4) : 459 - 467.
- [20] NANMOKU T , SOBE K , SAKURAI T *et al.* Orexins suppress catecholamine synthesis and secretion in cultured PC12 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 274(2) : 310 - 315.