

大鼠 Parv 中间神经元形态学特征及其在纹状体分布规律的探索

穆淑花, 刘冰冰, 朱亚西, 李可一, 雷万龙*
(中山大学中山医学院人体解剖学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】纹状体 Parv 中间神经元被认为是连接纹状体传入和传出神经元之间的枢纽。本实验旨在观察证实纹状体 Parv 神经元胞体、树突和轴突的形态学特征和在纹状体的分布及其与纹状体不同区域之间的关系。【方法】对成年雄性 SD 大鼠常规灌注固定和取脑;半导体冰冻切片之后进行免疫组化 PAP 方法单标记和双标记;光镜观察阳性神经元的形态并进行计数和计算其百分比;应用 SPSS 软件统计处理。【结果】Parv 阳性神经元在纹状体呈现散在不均匀分布,在纹状体背外侧区的分布多于其它区域 ($P < 0.001$);Parv 阳性神经元在 Matrix 间区分布的百分比显著高于 Patch 间区 (82.0%比 18.0%, $P < 0.001$);纹状体 Parv 阳性细胞为典型的中等大小的中间神经元(平均直径 11.68 μm),胞体呈多边形或卵圆形,外侧区胞体直径大于内侧区($P < 0.01$);阳性神经元树突密集,表面光滑和未见树突棘;神经元轴突细长,在纹状体可见其分支。【结论】Parv 阳性中间神经元在纹状体背外侧区的密集分布、高百分比聚集于 Matrix 间区和典型的中间神经元特征,提示其可能对纹状体不同区域的投射神经元具有选择性和特异性作用。

关键词: 纹状体; Parv 神经元; Patch 间区; Matrix 间区

中图分类号: R322 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)01-0069-05

Exploration on Morphology of Parv Interneurons and Their Distribution in Striatum in Rats

MU Shu-hua, LIU Bing-bing, ZHU Ya-xi, LI Ke-yi, LEI Wan-long*

(Department of Anatomy, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 Intrastratial Parv interneurons are considered to be the junction between striatal input and output neurons. This study purposes to confirm the morphology of Parv neurons and their distribution in striatum. 【Method】 Adult male SD rats were perfused and the brains were removed. The sections were conducted with a semiconductor-frozen microtome, then single labeling and double labeling were immunocytochemically conducted with PAP technique. Positive neurons were observed, counted, and calculated, and analyzed with SPSS. 【Results】 The distribution of Parv positive neurons in striatum was inhomogeneous, and was the most dense in the dorsal lateral area ($P < 0.001$); the distribution of Parv positive neurons in matrix compartment was apparently more than patch compartment (82.0% vs 18.0%, $P < 0.001$); Parv positive neurons in striatum were medium-sized cell bodies with polygonal or oval in shape (mean diameter is 11.68 μm), and were larger in the lateral area than that in the medial area ($P < 0.01$); the positive dendrites were dense and smooth without dendrite spines; the positive axons 1 were slender and their collaterals extended in striatum. 【Conclusion】 The characteristic of Parv positive neurons collecting mostly in lateral striatum and matrix compartment, as well as their traits of interneurons, indicated that they would affect the striatal projection neuronal function.

Key words: striatum; Parv neuron; patch compartment; matrix compartment

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1):69-73]

收稿日期: 2008-12-17

基金项目: 国家自然科学基金(30570572;30770679)

作者简介: 穆淑花, 博士生, E-mail: shuhuamu@163.com; * 通信作者, 雷万龙, 教授, 博士生导师, E-mail: wlei2001@yahoo.com

基底核在调节机体运动和认知功能方面具有极其重要作用。纹状体是基底核的主要成分,其广泛接受大脑皮质、丘脑和中脑的兴奋性传入,信息在纹状体加工处理之后,经过纹状体-直接和-间接通路分别输送到黑质和苍白球^[1]。但纹状体的双输出通路神经元以截然相反的作用调节机体的运动和对病理性损害显示不同的敏感性^[2]。纹状体投射神经元上述生理学和病理学特征可能与其中间神经元的调节作用有关,作为中间神经元主要类型的 Parv(parvalbumin)神经元被认为是连接纹状体传入和传出神经元之间的枢纽^[3-4],其作用可能直接影响纹状体投射神经元的生理特征和病理机制^[5]。纹状体投射神经元密集分布于整个纹状体,但在不同部位或区域则显示不同的生理和病理学特征;例如位于纹状体背外侧区的投射神经元被认为主要是调节躯体的感觉运动机能,而纹状体 Patch (μ -opioid receptor, Mor 阳性)和 Matrix(calbindin, Calb 阳性)间区的投射神经元也被证实具有不同的生理作用;前者参与皮质边缘环路调节精神情绪活动,后者参与皮质感觉运动环路调节躯体运动^[6]。为此,本实验应用免疫组化单标记和双标记技术观察证实纹状体 Parv 中间神经元的形态学特征及其分布规律,旨在从形态位置方面间接证实 Parv 中间神经元与纹状体不同区域的不同类型投射神经元之间的关系,两者之间的突触连接将在后续的双标记结合电镜超微结构的研究中证实。

1 材料和方法

1.1 材料

正常雄性成年 SD 大鼠 3 只,质量 250 ~ 300 g (中山大学北校区实验动物中心提供)。

1.2 取材切片

动物用 25 g/mL 水合氯醛腹腔注射麻醉(2.7 mL/kg),开胸经过心脏快速灌注 0.9 g/mL 生理盐水 300 mL,继用 4 g/mL 多聚甲醛(0.1 mol/L PB 配制,pH 7.4) 400 mL 灌注固定。常规取脑后浸于 20 g/mL 蔗糖(含 4 g/mL 多聚甲醛)中,4 °C,直至沉底。随即进行半导体冰冻切片(厚 40 μ m),将含有纹状体的大脑切片按序收集于六孔板中。

1.3 免疫组化-PAP 方法

1.3.1 Parv 单标记 对收集于第 1、3、5 孔的大脑

切片依次按如下步骤进行:① 0.1 mol/L PB(pH 7.4)洗 3 次;② 0.3% H₂O₂ (0.1 mol/L PB, pH 7.4), 室温,30 min;③ 小鼠单克隆抗 Parv 抗体(0.1% TritonX-100,0.5 g/mL BSA,1:1 000,Sigma 公司),4 °C,36 h;④ 小鼠 IgG(0.1% TritonX-100,0.5 g/mL BSA,1:100,Sigma 公司),室温,3 h;⑤ 小鼠 PAP (0.1% TritonX-100,0.5 g/mL BSA,1:200,Sigma 公司),室温,2 h;⑥ Nickel-DAB-H₂O₂ 显色 2 ~ 8 min。各步之间用 0.1 mol/L PB(pH7.4)洗 3 次,每次 5 min。第 1 孔显色完成后裱片,常规脱水、透明、封片。其余两孔分别用于第 2 重标记。

1.3.2 Parv-Mor,Parv-Calb 双标记 第 3、5 孔切片在完成 Parv 单标记之后,再依次按如下步骤进行第 2 重标记:① 0.1 mol/L PB(pH7.4)洗 3 次;② 第 3 孔和第 5 孔分别加入兔多克隆抗 Mor 抗体和小鼠单克隆抗 Calb 抗体 (0.1% TritonX-100,0.5 g/mL BSA,1:1 000,Sigma 公司),4 °C,36 h;③ 第 3 孔加入兔 IgG,第 5 孔加入小鼠 IgG (0.1% TritonX-100,0.5% BSA,1:100,Sigma 公司),室温,3 h;④ 第 3 孔加入兔 PAP,第 5 孔加入小鼠 PAP (0.1% TritonX-100,0.5 g/mL BSA,1:200,Sigma 公司),室温,2 h;⑤ DAB-H₂O₂ 显色 2 ~ 8 min。各步之间用 0.1 mol/L PB(pH7.4)洗 3 次,每次 5 min。显色完成之后进行常规裱片、脱水、透明和封片。

1.4 观察、计数和统计学处理

光镜观察 Parv 阳性中间神经元的形态;高倍镜下($\times 400$)测量阳性胞体直径(分别取最长和最短两条经线)并计数和测量阳性树突和轴突;分别计数位于 Patch 和 Matrix 间区的 Parv 阳性细胞;低倍镜数码照相之后,在照片上以十字线将纹状体分为背外侧区(dorsal lateral,DL)、腹外侧区(ventral lateral,VL)、背内侧区(dorsal medial,DM)、腹内侧区(ventral medial,VM) 4 个区域,并分别计数各个区域的阳性细胞。对所获数据用 SPSS 软件进行均数比较的单向方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 Parv 阳性神经元在纹状体的分布规律

对来自于 3 只 SD 大鼠纹状体 Parv 免疫组化染色的 30 张切片进行光镜观察,并分别计数各个区域的阳性细胞。Parv 阳性中间神经元在纹状体

呈现散在、稀疏及不均匀性分布,以背外侧区(DL)的阳性细胞数最多,占(37.1 ± 4.7)%,其次为腹外侧区(VL),占(26.3 ± 3.0)%,背内侧区(VM)和腹内侧区(DM)分别为(19.0 ± 4.1)%和(17.7 ± 3.6)%。方差分析比较两个内侧区 Parv 阳性中间神经元的数量没有统计学差异($P = 0.077$),而背外侧区显著多于其它区域($P < 0.001$,图 1A)。

2.2 纹状体 Parv 阳性神经元的分布与 Patch 和 Matrix 间区之间关系的证实

对 3 只 SD 大鼠的 30 张脑片分别进行 Parv-Mor 和 Parv-Calb 免疫组化双标记(Mor 和 Calb 抗体分别标记纹状体 Patch 和 Matrix 间区的神经元),光镜观察和计数 Parv 阳性中间神经元分别在纹状体 Patch 和 Matrix 间区分布的数量和百分比。结果显示 Parv 阳性中间神经元在 Patch 间区的分布为(18.0 ± 7.3)%,而(82.0 ± 7.3)%阳性细胞分布于 Matrix 间区($P < 0.001$,图 1B,1C)。

2.3 纹状体 Parv 阳性神经元胞体大小和形态的测量及观察

对 3 只大鼠脑片进行 Parv 免疫组化染色之后,光镜观察和测量纹状体内的 300 个 Parv 阳性神经元。结果显示 Parv 神经元为多边形或卵圆形,胞体中等大小,平均直径为 11.68 μm (图 1D)。在纹状体不同区域胞体大小有所不同,在腹外侧区和背外侧区分别为(12.8 ± 1.7) μm 和(12.4 ± 1.5) μm ,而在背内侧区和腹内侧区则分别为(10.9 ± 1.5) μm 和(10.7 ± 1.6) μm 。方差分析的统计结果显示两个外侧区胞体直径的相比没有统计学差异($P = 0.080$),两个内侧区域胞体直径的比较也没有统计学意义($P = 0.398$),但外侧区胞体直径大于内侧区($P < 0.01$)。

2.4 纹状体 Parv 阳性神经元树突和轴突的形态学特征

对 3 只大鼠纹状体内的 300 个 Parv 阳性神经元的光镜观察结果显示,阳性神经元的树突密集、粗细均匀、表面光滑和未见树突棘,树突的分支多至 3 级或以上(图 1E)。进一步对阳性树突各级分支的数量和长度进行观察和测量结果显示,初级树突平均为 3.72 支,长度为 8.41 μm ;第 2 级树突的数量为 5.59,长度为 12.07 μm ;第 3 级树突数量为 7.48,长度为 20.39 μm (表 1)。

光镜观察显示纹状体 Parv 阳性神经元轴突细长、表面平滑、少见粗大的膨体,一个胞体多为

表 1 纹状体 Parv 阳性中间神经元树突数量和长度的计数及测量

Table 1 Number and length of the dendrites of Parv positive neurons in the striatum

	No. of ramus	Length of ramus (μm)
Primary dendrites	3.72 ± 0.97	8.41 ± 3.59
Secondary dendrites	5.59 ± 1.56	12.07 ± 5.28
The third order dendrites	7.48 ± 1.99	20.39 ± 9.96

1 支轴突(图 1F),平均长度为 42.77 μm ,其细长的侧支清晰可见,其数量约有 1 ~ 3 支。

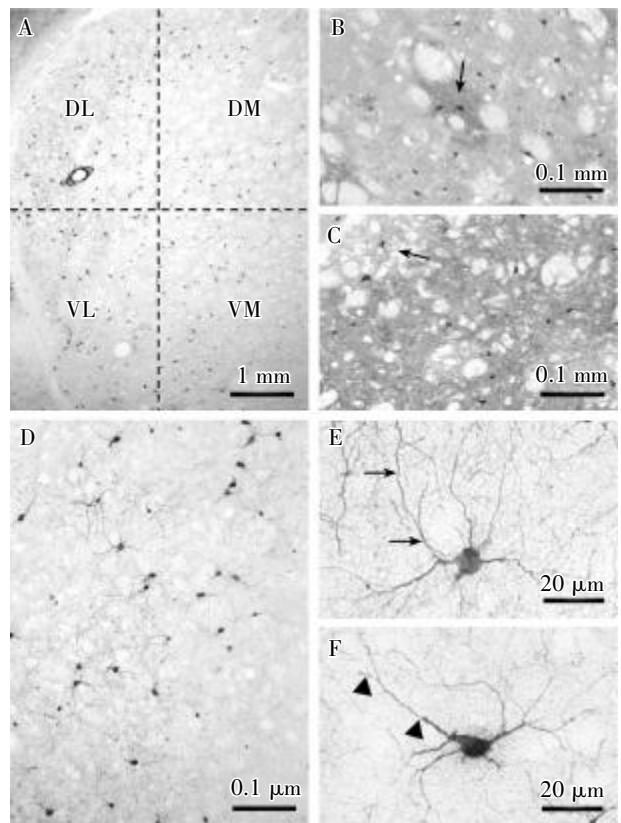


图 1 Parv 中间神经元在纹状体的分布和形态

Fig.1 The distribution and morphology of parv neurons in striatum

A shows the distribution of Parv neurons in striatal DL, DM, VL and VM (striatum is divided into four areas by crossed dashed line; DL, DM, VL and VM represent dorsal lateral, dorsal medial, ventral lateral and ventral medial areas of the striatum, respectively), and shows that their distribution in DL is more dense than that in other three areas. B is double-labeling for Parv with Mor, and the arrow shows two Parv neurons in the Patch compartment, and the olisterozone around it is Matrix compartment, in which many Parv neurons can be seen. C is double-labeling for Parv with Calb, and arrow shows the positive neuron located in the Patch compartment (olisterozone), and the dense staining area is Matrix compartment, in which many Parv positive neurons were observed. D shows the distribution and the morphology of Parv neurons, which are medium-

sized with polygonal or oval cell bodies. E shows Parv positive dendrites and their branches (arrows). F shows Parv positive axon and its collateral (arrowheads).

3 讨 论

3.1 纹状体神经元和 Parv 阳性神经元的分布特征

基底核领域的长期研究证实纹状体各种类型的投射神经元和中间神经元在胞体大小、树突分支、突触连接和分布形式方面存在较大差异,因此显示不同的机能特征。纹状体投射神经元主要分为纹状体-黑质(直接通路)和纹状体-苍白球(间接通路)神经元两类,研究证实其以截然相反的作用调节机体的运动和对病理性损害显示不同的敏感性^[2]。为揭示此生物作用和病理机制特征,我们已经从胞体大小、树突分支、突触传入连接方面对两类投射神经元进行了系列研究^[7],结果显示它们在形态学方面基本类似,但分别接受皮质纤维不同比率的突触传入,仅此资料尚无法解释纹状体投射神经元复杂的生理机能和病理机制。后期的电生理学提示纹状体中间神经元可能对投射神经元产生影响,尤其是 Parv 中间神经元的突触传入和传出连接极为复杂^[3-4];其一方面接受大脑皮质和丘脑的兴奋性传入,另一方面又与纹状体投射神经元形成抑制性突触连接。形态学对其在纹状体内的分布及其规律的研究尚不完善,已有的研究资料显示 Parv 阳性神经元在纹状体呈不均匀分布,主要分布于外侧部,尤其是在纹状体头部的分布密度最大、尾部最小^[8-10]。本实验将纹状体划分为背外侧、腹外侧、背内侧和腹内侧四个区域,并分别计算 Parv 阳性神经元在四个区域分布的百分比,结果显示其主要分布于背外侧区。虽然此结果与以往的研究基本类似,但本实验结果对 Parv 阳性神经元在纹状体分布的证实为更为具体,此结果对于后续研究 Parv 阳性神经元与纹状体不同区域投射神经元的联系具有重要意义,由于纹状体不同部位和区域显示不同的生理和病理学特征;背外侧区被认为主要调节躯体的感觉运动机能,此为该地区投射神经元机能的体现,密集分布于该区域的 Parv 阳性神经元可能与此有关。

神经化学解剖学将纹状体分为 patch 和 matrix 两个间区,而且证实其具有不同的生理作用;纹状体 patch 间区的投射神经元参与皮质边缘

环路调节精神情绪活动,而 matrix 间区则参与皮质感觉运动环路调节躯体运动^[6]。既然这些间区投射神经元的机能可能与 Parv 神经元有关,研究它们在纹状体不同间区的分布及其规律十分必要。本研究还比较了分布于纹状体 patch 和 matrix 间区的 Parv 阳性神经元的百分比。本次实验结果与先前作者所观察的 Parv 阳性神经元在 patch 间区分布的结果基本一致^[8],所不同的是我们同时采用 Mor 标记 patch 间区和 Calb 标记 matrix 间区^[11],并分别计数 Parv 阳性神经元的百分比。我们和他人均证实约 80% ~ 90% 的 Parv 阳性神经元分布于 matrix 间区,尽管 matrix 间区本身比 patch 间区大,如此高百分率的 Parv 阳性神经元分布于 matrix 间区,从位置关系方面推断它们与此间区的投射神经元势必存在突触联系。本研究室后继的双标记结合电镜超微结构的实验将对此予以证实。

3.2 纹状体 Parv 阳性神经元的形态特征

我们前期的研究显示两类纹状体投射神经元属于中等体积的神经元,胞体大小和形态基本一致,树突分支多且具有明显的树突棘^[7]。而纹状体不同类型的中间神经元胞体的大小和形态具有显著的差别。虽然有作者对 Parv 阳性神经元的大小和形态进行了观察^[12-13],我们发现本实验中免疫组化阳性 Parv 神经元的树突和轴突的数量多而且行程较长,此与他人所报道的树突分支稀少和二级以上树突少见的结果差异较大^[13-14],我们推测可能与实验技术有关。本实验在扩大样本数量的同时,又对纹状体 4 个区域的纹状体 Parv 阳性神经元胞体大小进行了比较,结果显示外侧区胞体大于内侧区,此结果尚未见到相关报导。本实验对 Parv 阳性神经元在纹状体的分布及其分布规律以及形态学观察,旨在为后期 Parv 中间神经元与纹状体不同类型投射神经元之间突触连接的研究打下基础和提供依据。

参考文献:

- [1] Reiner A, Medina L, Veenman CL. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates [J]. Brain Res Rev, 1998, 28(9): 235-285.
- [2] Reiner A, Albin RL, Anderson KD, et al. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington's disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(9): 5733-5737.

- [3] Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, et al. Striatal interneurons; chemical, physiological and morphological characterization [J]. *TINS*, 1995, 18(3):527-535.
- [4] Plotkin JL, Wu NP, Chesselet MF, et al. Functional and molecular development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons and their cortical inputs [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22(8):1097-1098.
- [5] Giampù C, DeMarch Z, D'Angelo V, et al. Striatal modulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) after excitotoxic lesions: implications with neuronal vulnerability in Huntington's disease [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(8):11-20.
- [6] Brouillet E, Hantraye P, Perrent RJ, et al. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(9):7105-7109.
- [7] Lei WL, Jiao Y, Del Mar N, et al. Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(8):8289-8299.
- [8] Ronald L, Cowan CJ, Piers C, et al. Heizmann Parvalbumin-containing gabaergic interneurons in the rat neostriatum [J]. *J Compar Neuro*, 1990, 302(2):197-205.
- [9] Domaradzka-Pytel B, Majak K, Spodnik J, et al. Distribution of the parvalbumin, calbindin-D28K and calretinin immunoreactivity in globus pallidus of the Brazilian short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*) [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2007, 67(99):421-438.
- [10] Wu Y, Parent A. Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin or NADPH-diaphorase: a comparative study in the rat, monkey and human [J]. *Brain Res*, 2000, 863(9):182-191.
- [11] 雷万龙,刘冰冰,穆淑花,等.大鼠纹状体 Patch 和 Matvix 间区及其神经元形态学特征的观察 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2009, 30(2):121-125.
- [12] Yasuo K, Charles JW, Sarah JA, et al. Emson Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization [J]. *Trends Neurosci*, 1995, 18(8):527-535.
- [13] Koós T, Tepper JM. Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons [J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(5):467-472.
- Alessandro M, Giuseppina M, Vincenza D, et al.
- [14] Neurotensin effects on N-type calcium currents among rat pallidal neurons: An electrophysiological and immunohistochemical study [J]. *Synapse*, 2006, 60(8):371-383.

(编辑 徐杰)

(上接第 19 页 from page 19)

参考文献:

- [1] Lee HS, Lee WJ, Han GR, et al. Motherless case in paternity testing [J]. *Forensic Sci Int*, 2000, 114(8):57-65.
- [2] Ayres KL. Relatedness testing in subdivided populations [J]. *Forensic Sci Int*, 2000, 114(9):107-115.
- [3] 陆慧玲,杨庆恩.用 ITO 方法计算两个个体的血缘关系机会 [J]. *中国法医学杂志*, 2002, 17(3):188-191.
- [4] 李海燕,台运春,陆慧玲,等.中国汉族人群 15 个 STR 基因座的等位基因频率调查 [J]. *中国法医学杂志*, 2004, 19(6):330-333.
- [5] 杨电,刘超,彭汝标,等.南方汉族、黎族人群 15 个 STR 基因频率调查 [J]. *法医学杂志*, 2002, 18(4):207-212.
- [6] 郭宏,林源,柳燕,等. D6S1043 和 D12S391 基因座在亲权鉴定中的应用 [J]. *法医学杂志*, 2007, 23(5):345-346.
- [7] 伍新尧,童大跃,朱运良,等. STR 分型作亲权鉴定时判断标准的研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010, 31(1):1-6.
- [8] 陈勇,伍新尧,孙宏钰,等.争议父(母)与真父(母)有血缘关系的亲权纠纷案鉴定 2 例 [J]. *中国法医学杂志*, 2003, 18(5):291-292.
- [9] 黄艳梅,区敬华,朱伟锋,等.汉族人群 Y 染色体多拷贝基因座 DYS464 遗传多态性 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(1):55-58.

(编辑 王晓鹰)