

·基础研究·

大鼠纹状体 Patch 和 Matrix 间区及其神经元 形态学特征的观察

雷万龙*, 刘冰冰, 穆淑花, 李可一, 朱亚西
(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 Patch 和 Matrix 间区被证实与神经精神活动和躯体运动有关。本实验旨在探测 Patch 和 Matrix 间区及其神经元的形态学特征,为研究纹状体-Patch 和-Matrix 神经元的通路联系提供资料。【方法】成年雄性 SD 大鼠分别按照常规和电镜要求灌注固定、取脑和后固定;半导体或振动切片之后进行免疫组化 PAP 方法单标记和双标记;光镜下分别用 Photoshop 软件测量 Patch 和 Matrix 间区的面积并计算百分比;光镜和电镜下观察阳性神经元的结构;实验数据用 SPSS 软件统计处理。【结果】① Mor 阳性的 Patch 间区呈不规则形的斑块状散在分布于纹状体,在胼胝体深方存在一条恒定的阳性带状区。Patch 间区占纹状体面积的 9%,其面积在纹状体的头侧明显大于尾侧($P < 0.05$)。阳性结构呈细丝或絮状,阳性胞体不明显。② Calb 阳性的 Matrix 间区在纹状体内侧区染色较深,可见明显不规则的淡染色区,其形状与相邻片的 Patch 间区一致。Matrix 间区的面积明显大于 Patch 间区($P < 0.05$)。可见阳性树突和树突棘,但阳性胞体不明显。③ 电镜下分别可见 Mor 和 Calb 阳性树突和树突棘,其大多数接受兴奋性突触连接,而与阳性树突形成的突触多为穿孔型。抑制性突触少见,阳性胞体不明显。【结论】头侧纹状体密集分布的 Patch 间区、内侧纹状体 Calb 强烈反应,和阳性标记的树突、树突棘以及兴奋性突触为主的形态学特征,提示 Mor 和 Calb 阳性神经元分别具有特异性的神经通路连接和生理机能。

关键词: 纹状体; Patch 间区; Matrix 间区; Mor; Calb

中图分类号: R322 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)02-0121-05

Experimental Observation of Morphological Traits on Striatal Patch-Matrix Compartments and Their Neurons in Rats

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

(Department of Anatomy, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To explore the morphological traits of Patch-Matrix compartments and their neurons and to provide experimental mainstay for the study of Patch-Matrix nervous pathways.【Methods】Striatal Patch-Matrix compartments were considered to be involved in neuropsychiatric and somatosensorimotor actions. Adult male SD rats were fixed by perfusion fixation and the brains were removed according to the routine and electron microscopic requirements. The sections were conducted either with a Semiconductor-frozen microtome or with a vibratome, and then were single-labelled and double-labelled using immunohistochemical PAP method. Soon after that, areas and percentages of Patch-Matrix compartments were measured and calculated with Photoshop software under light microscope. The structures of positive neurons were observed under light and electron microscope. Experimental data were dealt with SPSS software.【Results】① μ -opioid receptor (Mor) positive Patch compartment was seen in a heterogeneous patchy distribution in striatum, and a constant positive zonal area presented in corpus callosum. The Patch compartment area accounted for 9% of striatal area, and was bigger in rostral striatum than in caudal striatum ($P < 0.05$). The positive structures in Patches appeared to be filament and flocculent and no positive perikarya was observed.② Calbindin (Calb) positive Matrix compartment appeared in whole striatum, and was more intense in the medial striatum than in the lateral striatum. Irregular slightly stained area was observed and its shape was consistent with the adjacent Patch compartment,

收稿日期:2008-10-29

基金项目:国家自然科学基金(30570572),广东省自然科学基金([2006]6),国家自然科学基金(30770679)

作者简介:雷万龙,人体解剖学教授,博士生导师,课题负责人,研究方向为脑缺血和神经退变性疾病病理机制;*通讯作者,雷万龙,

E-mail:wlei2001@yahoo.com

but the area of Matrix compartment was obviously larger than that of Patch compartment ($P < 0.05$). Positive dendrites and dendritic spines could be obviously observed by high-power light microscopy, but positive perikarya could not. ③ Both Mor and Calb positive immunoreactivity (IR) were predominantly localized in dendrites and dendritic spines which were observed under electronic microscopy (EM), and the majority of synapses formed with positive dendrites was perforated postsynaptic density (PSD). Inhibitory synapse was rare and positive perikarya was not obvious. 【Conclusions】 The morphological characteristics of dense distribution of Mor IR in rostral striatum in Patch compartment, intense Calb-labeling in the medial striatum, formation of asymmetric synapses for positive dendrites and dendritic spines, and present of perforated PSD on positive dendrites indicate that Mor and Calb positive neurons possess the special nervous pathways and physiological function respectively.

Key words: striatum; Patch compartments; Matrix compartment; Mor; Calb

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2): 121-125, 136]

作为基底核主要成分的纹状体因其直接位于皮质深方这一得天独厚的位置关系, 被称为基底核的中心或门户, 表明其对大脑皮质的活动可能产生重要影响。研究证实纹状体广泛接受大脑皮质、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机制调节躯体的运动和对病理性损害显示不同的敏感性^[2]。化学神经解剖学将纹状体分为 Patch 和 Matrix 两类边界清楚的间区^[3]; 前者为 Mor(μ -opioid receptor)受体富含区, 参与皮质边缘环路调节神经精神活动, 因此, 损害时出现神经认知功能障碍。而后者为 Calb(calbindin)富含区, 参与皮质感觉运动环路调节躯体运动, 此间区受损表现为躯体运动障碍^[4]。有关纹状体 Patch 和 Matrix 间区与纹状体-直接和-间接通路神经元的对应关系目前仍然存在争议, 但无论是细胞构筑学上神经元的分类还是神经化学上纹状体的分区, 均在正常生理机能和临床病理机制方面具有极其重要的意义。为此, 本实验应用免疫组化单标记和双标记技术探测 Patch 和 Matrix 间区的面积及其百分比, 光镜和电镜下观察证实阳性神经元的形态学特征, 旨在为进一步研究纹状体 -Patch 和 -Matrix 神经元的神经通路连接提供资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

正常雄性成年 SD 大鼠 5 只, 体质量 250 ~ 300 g(中山大学药学院实验动物中心提供)。

1.2 动物处理和切片

对 3 只大鼠用 250 g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉(2.7 mL/kg 体质量), 经心脏快速灌注 9 g/L 生

理盐水 300 mL, 继用 40 g/L 多聚甲醛(0.1 mol/L PB 配制, pH7.4) 400 mL 灌注固定。常规取脑后浸于 200 g/L 蔗糖(含 40 g/L 多聚甲醛)中, 4 °C, 直至沉底。随即进行半导体冰冻连续切片(片厚 30 μ m), 并将大脑切片按序收集于六孔板中, 用于 Mor 和 Calb 染色之后光镜观察和测量。另外 2 只大鼠用于电镜观察, 因此在快速灌注 9 g/L 生理盐水 300 mL 之后, 继用 40 g/L 多聚甲醛(含 150 ml/L 的苦味酸和 3 ml/L 戊二醛, pH7.4) 400 mL 灌注固定, 脑取出之后进行后固定, 之后进行振动切片(片厚 50 μ m)和 Mor、Calb 免疫组化标记。

1.3 免疫组化-PAP 方法和电镜组织的制备

1.3.1 Mor 和 Calb 单标记和双标记 对第 1 和第 3 孔的大脑切片进行 Mor 和 Calb 单标记, 步骤如下: ① 0.1 mol/L PB(pH 7.4)洗 3 次; ② 3 ml/L 双氧水(0.1 mol/L PB, pH 7.4), 室温, 30 min; ③ 分别滴加小鼠单克隆抗 Calb 抗体和兔多克隆抗 Mor 抗体(1 ml/L TritonX-100, 5 g/L BSA, 1:1000, Sigma 公司), 4 °C, 36 h; ④ 分别滴加小鼠 IgG 和兔 IgG (1 ml/L TritonX-100, 5 g/L BSA, 1:100, Sigma 公司), 室温, 3 h; ⑤ 分别滴加小鼠 PAP 和兔 PAP (0.1% TritonX-100, 0.5% BSA, 1:200, Sigma 公司), 室温, 2 h; ⑥ DAB-H₂O₂ 显色 2 ~ 8 min。各步骤之间用 0.1 mol/L PB(pH 7.4)洗 3 次, 每次 5 min。裱片之后常规脱水、透明、封片。

第 2 孔切片用于 Mor-Calb 双标记; 其方法是首先进行 Mor 单标记(同上述), 但所不同的是第 1 标记为 Nikle-DAB-H₂O₂ 显色。第 1 标记完成之后进行第 2 重的 Calb 标记(同上述)。各步骤之间用 0.1 mol/L PB(pH 7.4)洗 3 次, 每次 5 min。裱片之后常规脱水、透明、封片。

1.3.2 Mor 和 Calb 单标记和电镜组织的制备 Mor 和 Calb 单标记同上述, 所不同的是各种抗体配制

中免去 TritonX-100 和应用 Nikel-DAB-H₂O₂ 显色。免疫标记完成之后进行电镜组织的制备,步骤如下:将组织块入 20 g/L 锇酸液内,在室温固定 1 h,随后逐级酒精脱水,再入 10 g/L 醋酸铀 1 h,入 500 ml/L Spurr 室温 4 h,入 1000 ml/L Spurr 室温过夜(1000 ml/L Spurr 配制:ERL 20 g,DER 10 g,NSA 52 g,DMAE 0.8 g),再将包埋后的组织块粘贴于树脂柱上,置入烤箱 68 °C 过夜。完成固化之后进行电镜超薄切片和裱片,再入 40 g/L 醋酸铀染色 20 min,随后用 4 g/L 柠檬酸铅染色 2 min,详尽方法见我们先前的论文^[5]。

1.4 显微镜观察、计量和资料处理

光镜观察 Mor 和 Calb 阳性区域和结构;光镜低倍镜($\times 25$)下对纹状体进行显微数码摄片,然后分别用 Photoshop 软件测量 Patch 和 Matrix 间区的面积,并计算百分比。高倍镜($\times 400$)和电镜下观察阳性神经元的结构。对所获实验数据应用 SPSS 软件进行配对资料均数的 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 Mor 和 Calb 免疫标记的特异性以及 Patch 和 Matrix 间区的形态观察

纹状体神经元特征性地表达 Mor 和 Calb 抗

原,有关其蛋白质的生物学机能已有众多的研究报告。研究表明 Mor 和 Calb 抗体能够完美地标记整个纹状体,并在纹状体呈现边界清楚的大小和形态各异的染色区;分别称为 Patch 和 Matrix 间区。因此,本实验借助 Mor 和 Calb 作为 Patch 和 Matrix 间区的阳性标记,光镜下探测 Patch 和 Matrix 间区的面积并计算百分比,电镜观察阳性神经元的形态结构。对 3 只 SD 大鼠的大脑(含纹状体)系列切片在完成 Mor 和 Calb 免疫标记之后,光镜观察显示 Mor 阳性的 Patch 间区呈不规则的斑块状散在分布于纹状体,但在不同平面脑片的胼胝体深方存在一条较为恒定的阳性带状区(图 1A, D)。所获面积值的统计结果显示, Patch 间区占纹状体面积的 9%。Mor 阳性斑块的大小和分布密度在不同部位的纹状体有所不同;在头侧纹状体阳性斑块的大小和密度明显大于尾侧纹状体(图 1A, D),阳性标记的面积值及其百分比在两部位之间差异具有统计学意义($P = 0.003$ 和 $P = 0.021$,表 1)。Calb 阳性的 Matrix 间区在纹状体呈现大面积的深染色区,但其染色强度在纹状体内侧区明显高于背外侧区。在 Calb 阳性染色区内可见明显不规则的斑块状的淡染色区,其形态与相邻切片的 Mor 阳性区一致(图 1B, E)。统计结果显示 Calb 阳性的 Matrix 间区明显大于 Patch 间区($P = 0.002$,表 1)。

表 1 纹状体 Patch 与 Matrix 间区的面积和百分比比较

Table 1 Comparison of the area and percent between striatal Patch and Matrix compartments (area & %)

Animal	Rostral striatum				Caudal striatum				Whole striatum			
	Patch	Matrix	Striatum	Patch(%)	Patch	Matrix	Striatum	Patch(%)	Patch	Matrix	Striatum	Patch(%)
1#	4.3 ± 1.2	33.5 ± 8.2 ¹⁾	37.8 ± 7.2	12 ± 0.6	2.9 ± 0.6 ²⁾	43.0 ± 1.9 ¹⁾	45.9 ± 1.8 ³⁾	6 ± 0.1	3.7 ± 0.7	36.9 ± 4.0 ¹⁾	40.6 ± 3.3	9 ± 0.3
2#	4.2 ± 0.9	27.7 ± 5.8 ¹⁾	31.6 ± 5.4	13 ± 0.4	2.7 ± 0.5 ²⁾	42.2 ± 2.8 ¹⁾	44.9 ± 2.6 ³⁾	6 ± 0.1	3.4 ± 0.5	34.7 ± 3.8 ¹⁾	38.1 ± 3.8	9 ± 0.2
3#	3.7 ± 1.0	36.4 ± 4.5 ¹⁾	40.1 ± 3.9	10 ± 0.3	2.4 ± 0.7 ²⁾	41.7 ± 2.9 ¹⁾	44.1 ± 3.2 ³⁾	5 ± 0.1	3.0 ± 0.7	39.1 ± 2.5 ¹⁾	42.1 ± 2.4	7 ± 0.2
mean	4.3 ± 0.1	32.5 ± 4.4 ¹⁾	36.5 ± 4.4	12 ± 0.2	2.8 ± 0.1 ²⁾	42.6 ± 0.6 ¹⁾	44.5 ± 0.5 ³⁾	6 ± 0.1	3.6 ± 0.2	36.9 ± 2.2 ¹⁾	39.4 ± 1.8	9 ± 0.1

1) compared with Patch $P < 0.05$; 2) compared with area of Patch in rostral striatum $P < 0.05$; 3) compared with percent of Patch in rostral striatum $P < 0.05$

2.2 Mor 和 Calb 阳性神经元的形态学特征

光镜高倍镜下观察, Mor 和 Calb 阳性结构呈纤维或绒毛状,阳性胞体不明显。Calb 阳性纤维较为粗大,可见树突棘(图 2 A, B, D, E)。电镜观察显示, Patch 和 Matrix 间区的 Mor 和 Calb 阳性结构主要为神经元的树突和树突棘,同时可见它们主要

接受兴奋性(非对称型)突触传入(图 2 C, F)。具有显著特征的是 Mor 和 Calb 阳性树突的兴奋性突触大多数为穿孔型突触,而在阳性树突棘此类型突触则少见(图 2 C, F)。另外,较少见到与 Mor 和 Calb 阳性树突和树突棘形成的抑制性(对称型)突触,也未见到 Mor 和 Calb 阳性胞体。

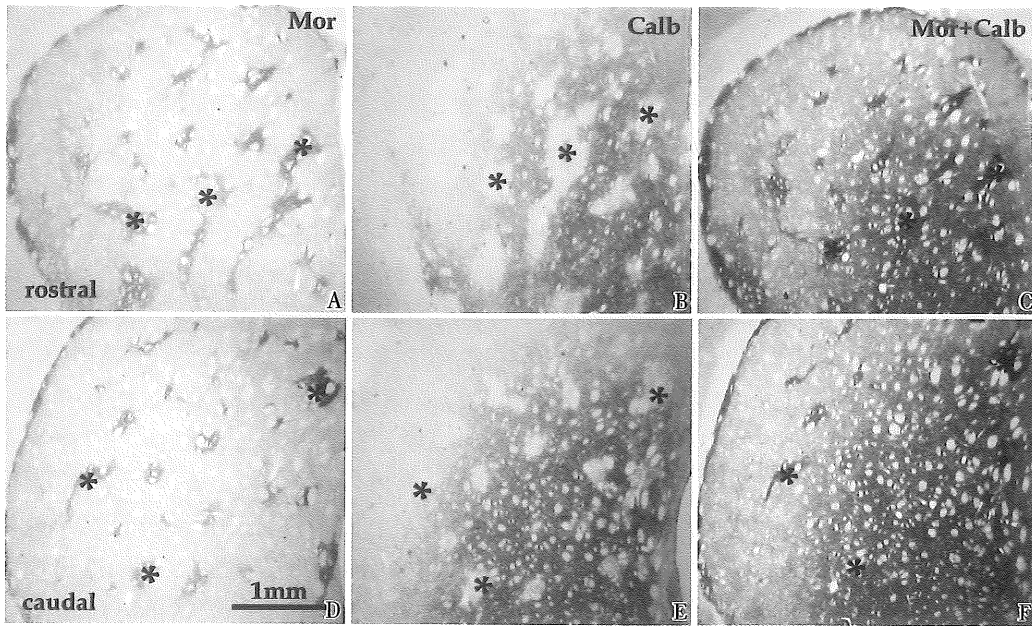


图 1 纹状体头侧和尾侧 Patch 和 Matrix 的特异性标记和面积比较

Fig.1 The labeling and comparison for rostral and caudal striatal Patch-Matrix compartments

Images A and D show Mor-labeled Patch compartments (black asterisks) at rostral (A) and caudal (D) striatum, respectively. Images B and E show Calb-labeled Matrix compartments at rostral (B) and caudal (E) striatum, respectively, and these black asterisks represent Patch compartments, which coincide with Mor-labeled Patch compartments in the images A and D, respectively. Images C and F show dual-labeling of Mor and Calb at rostral (C) and caudal (F) striatum, respectively. The magnified times above images is the same.

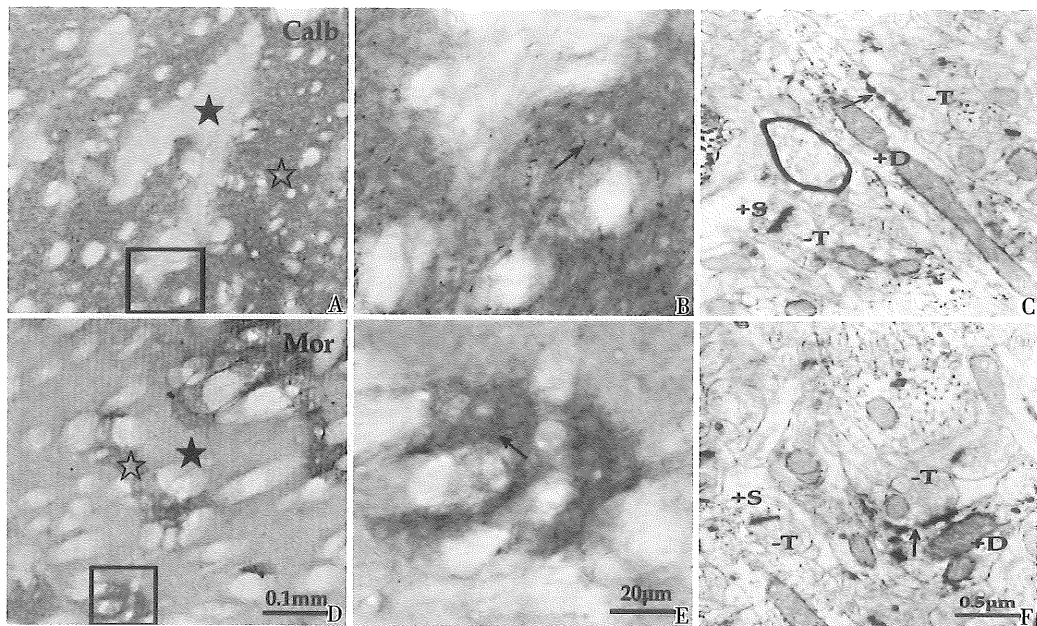


图 2 纹状体 Patch-Matrix 间区及其阳性神经元的光镜和电镜结构

Fig.2 The structures of Patch-Matrix compartments and positive neurons at light microscopy and electronic microscopy level

Image A shows Calb-labeled Matrix compartment (white asterisk) and Calb spared Patch compartment (olisterozone, black asterisk). Image B is an enlargement of the box in image A, and numerous fibers can be seen (arrow). Image C shows Calb-labeled dendrite (+D) and spine (+S) at EM level, and two asymmetric synapses present in the field, which connect with Calb-labeled dendrite and spine, respectively. The synapse on Calb positive dendrite can be clearly identified as a perforated PSD (arrow). Image D shows Mor-labeled Patch compartment (white asterisk), and Mor spared Matrix compartment (olisterozone, black asterisk). Image E is an enlargement of the box in image D, and slender fibers can be seen (arrow). Image F shows Mor-labeled dendrite (+D) and spine (+S) at EM level, and two asymmetric synapses that connect with Mor positive dendrite and spine, respectively. The synapse on Mor positive dendrite can be clearly identified as a perforated PSD (arrow). The magnified times above images is the same between images A-D, B-E, and C-F, respectively.

3 讨论

3.1 纹状体投射神经元与 Patch 和 Matrix 间区的关系

纹状体神经元根据形态和联系方面分为投射神经元和中间神经元两大类型。前者主要包括纹状体-黑质(直接通路)和纹状体-苍白球(间接通路)神经元。研究证实其以截然相反作用调节机体的活动和病理损害显示不同的敏感性^[2]。神经化学解剖学依据纹状体神经元特异性表达 Mor 和 Calb 蛋白并以此作为标记物将纹状体分为 Patch 和 Matrix 两类边界清楚的间区^[3]。纹状体神经元依此又被分为纹状体-Patch 和 -Matrix 神经元,从而使得它们与纹状体-直接通路和-间接通路神经元之间的关系变得更加复杂化。此不单是分类方法不同的问题,业已证实纹状体-Patch 和 -Matrix 神经元如同纹状体-直接通路和-间接通路神经元一样,在突触连接、化学成分、生理特性等方面具有较大的差异,因此也分别具有不同的机能。我们先前对纹状体-直接通路和-间接通路神经元系列的形态学研究显示,两条通路神经元在突触连接方面显著不同,但尚无法解释双通路神经元的生理和病理学特征^[5]。因此,研究证实纹状体-Patch 和 -Matrix 神经元的神经通路连接,既有助于对双通路神经元的生理作用和病理机制的理解,同时又有利于进一步证实纹状体-Patch 和 -Matrix 神经元本身的形态和生理特征。我们目前的结果显示 Patch 和 Matrix 间区在纹状体的分布具有特异性,尤其是 Patch 间区在头侧纹状体占据较大面积,此意味着纹状体 Patch 和 Matrix 间区可能接受大脑不同部位的突触传入,因为头侧和尾侧纹状体本身与大脑不同部位形成特异性的神经通路连接。虽然我们目前电镜观察的定性资料尚不能区别两者之间突触连接的差异,我们即将进行的免疫电镜双标记的定量实验将对此予以证实。具有价值的是本实验发现 Mor 和 Calb 阳性树突和树突棘主要接受兴奋性突触传入,此又一次证实了先前他人的研究^[6,7],尤其是我们观察到许多与 Mor 和 Calb 阳性树突所形成的兴奋性突触连接多为穿孔型突触,此具有极其重要的意义;业已研究证实此类型突触使突触后的反应更加强烈,因此具有更大的生理效应。

3.2 纹状体 Patch 和 Matrix 间区的生理及其病理联系

形态学研究证实纹状体 Patch 和 Matrix 间区神经元分别通过不同的神经通路执行不同的机能;前者接受皮质深 5 层、前边缘皮质和黑质的突触传入,而后的传入纤维主要来自皮质浅 5 层和皮质感觉运动区。此意味它们通过不同的神经通路以不同方式影响个体行为。有研究指出, Patch 间区神经元通过皮质边缘环路调节个体的神经精神活动,因此,损害时出现认知和神经精神障碍。而 Matrix 间区神经元则参与皮质感觉运动环路调节躯体运动,此间区受损表现为躯体运动障碍^[4]。有研究发现纹状体 Patch 和 Matrix 神经元对病理性损害也显示不同的敏感性;在 HD(Huntington's disease, HD)和兴奋毒性损伤时,纹状体 Patch 间区明显缩小和细胞严重丢失,而 Matrix 间区的 Calb 则表达增强^[8-10]。生物化学研究证实纹状体 Patch 和 Matrix 间区生理和病理学特征与间区内神经元特异性表达的蛋白成分密切相关, Patch 间区神经元特异性地高表达 Mor 受体蛋白,此在运动控制、药物成瘾和 PD(Parkinson's disease, PD)时鸦片类物质的作用,被假定为自动调节机制的基础,旨在防止多巴胺和其它神经递质对纹状体-直接通路和-间接通路神经元的过度激活^[11]。而纹状体 Matrix 间区神经元以高表达 Calb 为特征。Calb 为钙结合蛋白,被认为在钙通道处从时间和空间上限制钙流通,从而阻滞细胞膜去极化,有研究认为此结果可以使神经元免受兴奋毒性损伤^[11]。电生理学研究表明纹状体 Mor 和 Calb 神经元显示不同的电生理特征,在急性分离的纹状体神经元, Mor 的激活能够抑制高电压激动性钙内流,同时发现 Mor 被内源性和外源性的鸦片样物质激活之后,以不同的方式调节纹状体 Patch 和 Matrix 神经元的活动,由此影响个体的行为^[12,13]。因此,纹状体 Patch 和 Matrix 间区以及 Mor 和 Calb 神经元无论是在形态学方面的通路联系和突触连接,还是在神经化学方面的递质和受体类型,以及电生理学方面的电位特征,均直接关系到纹状体的生理作用和病理机制。

参考文献:

- [1] Reiner A, Medina L, Veenman CL. Structural and