

GABA 免疫阳性神经元在三黄鸡小脑内的分布*

罗厚强 彭克美** 王家乡 唐丽 程佳月 张高英 宋卉 刘华珍

华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

摘要 为探明三黄鸡小脑皮质各层的细胞构筑和 GABA 免疫反应神经元在其小脑内的分布情况, 采用尼氏染色和免疫组织化学 SABC 技术, 对 10 羽三黄鸡的小脑进行了研究。研究发现: 三黄鸡小脑皮质各层的细胞构筑与北京鸭、乌鸡、鸽子和非洲鸵鸟的大体相似; GABA 免疫阳性细胞位于小脑皮质的蒲肯野细胞层中, 阳性较明显; 小脑中央核也有大量阳性神经元, 多数呈梭形或不规则多边形, 多数神经元胞质呈强阳性染色。以上结果表明: GABA 阳性神经元在三黄鸡小脑皮质各层均有分布, GABA 可能在介导小脑复杂功能中发挥重要作用。

关键词 三黄鸡; 细胞构筑; 小脑; γ -氨基丁酸

中图分类号 S 852.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0597-04

禽类小脑作为脑的第二大结构, 是动物躯体重要的运动调节中枢, 具有保持躯体平衡、调节肌紧张和协调随意运动的作用, 而这些功能的完成都与小脑皮质有着密切的关系。 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA) 是一种广泛存在于哺乳动物神经系统中的抑制性神经递质, 在动物体内起着十分重要的作用。GABA 存在于哺乳动物和人的小脑皮质中早已有过报道^[1-2], 但 GABA 阳性神经元在三黄鸡小脑的定位和分布未见报道。本试验以三黄鸡为对象, 探讨 GABA 阳性神经元在三黄鸡小脑内的分布规律, 旨在为进一步研究三黄鸡 GABA 的生理功能及其作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

成年健康三黄鸡 10 羽, 购自湖北省种鸡场, 雌雄不限, 平均体质量 1.2~1.4 kg。用氨基甲酸乙酯按每千克体质量 1 g 的剂量, 经生理盐水稀释成 10%, 经跖静脉注射全身麻醉。然后, 分别用生理盐水和 4% 多聚甲醛磷酸缓冲固定液(pH 7.4)经左心室灌注固定。固定完全后迅速开颅取小脑, 石蜡包埋, 制成 5 μ m 厚的纵向连续切片(矢状切面), 每隔

4 片取 1 片, 切片分为 3 套。第 1 套采用尼氏染色, 观察细胞的构筑。第 2 套采用免疫组化 SABC 法染色, 一抗及 SABC 试剂盒均购自武汉博士德公司。步骤如下: (1) 切片脱蜡至蒸馏水; (2) 切片用 3% H_2O_2 (现用现配) 室温下反应 10 min, 以便灭活内源性过氧化物酶; (3) 经微波抗原修复后, 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min; (4) 甩去多余的液体, 滴加适当稀释的一抗(兔抗 GABA, 1:100), 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜; (5) PBS 洗 3 次, 滴加生物素化二抗(山羊抗兔 IgG), 37 $^{\circ}C$ 反应 20 min; (6) PBS 洗 3 次, 滴加 SABC, 37 $^{\circ}C$ 反应 20 min; (7) PBS 洗 4 次, 滴加 DAB 显色剂, 室温条件下控制反应时间; (8) 脱水, 透明, 封片。第 3 套切片做阴性对照, 用 PBS 代替一抗, 其他步骤同 SABC 法。明视野显微镜中观察 GABA 阳性神经元在三黄鸡小脑中的分布, 用 Nikon 显微镜成像系统进行显微照像。

1.2 统计分析

采用图像分析系统 HPIAS-100 进行分析, 每张切片按照统一标准随机截取 10 个视野, 测定免疫阳性细胞的数量, 所得数据以平均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$)表示。

收稿日期: 2009-12-23; 修回日期: 2010-03-05

* 国家自然科学基金项目(30471249, 30972152)和国家博士点基金项目(200805040023)资助

** 通讯作者. E-mail: kmpeng@sohu.com

罗厚强, 男, 1984 年生, 硕士. 现在工作单位: 温州科技职业学院. 研究方向: 禽类中枢神经发育. E-mail: chviolet@tom.com

2 结果与分析

2.1 三黄鸡小脑的细胞构筑

三黄鸡小脑皮质由外向内依次为分子层、蒲肯野细胞层和颗粒层。分子层位于皮质浅层,较厚,神经元稀少,主要由浅层的星形细胞和深层的蓝状细胞组成。蒲肯野细胞层位于分子层深部,由一层排列规则、胞体较大的蒲肯野细胞组成,细胞主要为梨形、圆形或椭圆形,核仁明显,极易着色,直径约为 $9.3\sim 19.0\ \mu\text{m}$,细胞顶端发出多条粗的树突伸向分子层,胞体的基部发出一条细的轴突伸向小脑深部。颗粒层位于小脑皮质的最深层,由密集排列的颗粒细胞和少量的高尔基细胞组成。小脑中央核在白质内位于小脑室(三黄鸡的小脑室较小)的两侧,主要由小脑内侧核、中间核和外侧核组成。中央核在正中矢状切面的大小长径为 $(1.95\pm 0.05)\ \text{mm}$,宽径为 $(0.44\pm 0.03)\ \text{mm}$ 。其中小脑内侧核位于第四脑室两背侧壁内,神经元体积较大,直径约为 $13.75\sim 31.25\ \mu\text{m}$,胞体呈椭圆形、多角形、长梭形,细胞排列紧密,多数细胞染色较深,胞核大多位于细胞中央。中间核体积较小,同其他核团不易区分。小脑外侧核主要位于小脑中间核的外侧,神经元体积较小,直径约为 $12.5\sim 20.35\ \mu\text{m}$,大部分呈梭形、椭圆形或不规则多边形,细胞排列松散,细胞染色较深,胞核位于细胞中央。小脑中央核神经元细胞胞体、

树突、胞核及其核仁清晰可见,尼氏体成细颗粒状或斑块状堆积(图 1-1~图 1-3)。

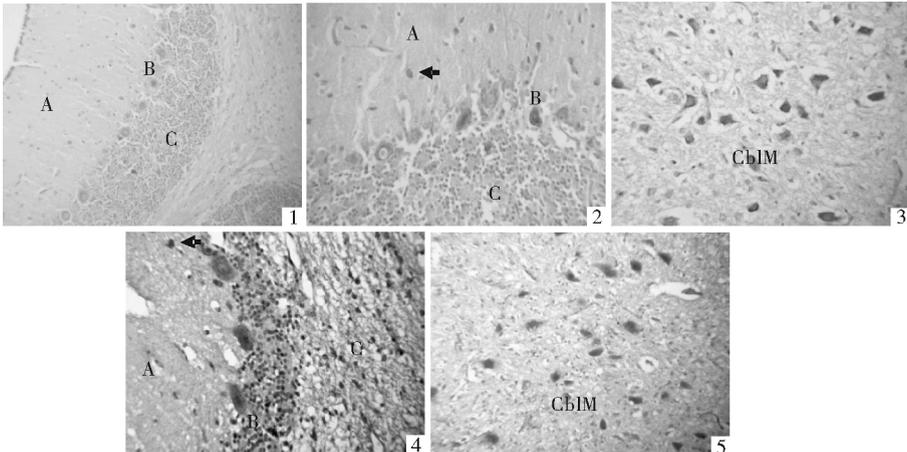
2.2 免疫组化结果

GABA 免疫反应物在三黄鸡小脑皮质各层中均可见 GABA 免疫阳性神经元、阳性纤维和阳性斑点。分子层中的 GABA 免疫阳性神经元胞体较小,清晰,数目较多,分布于整个分子层,主要分布在蓝状细胞;蒲肯野细胞层的 GABA 免疫阳性神经元为体形较大的蒲肯野细胞,其胞体呈梨形,树突伸向分子层,部分蒲肯野细胞胞体和主树突着色明显;颗粒层的 GABA 免疫阳性神经元主要是椭圆形的高尔基细胞,数量较少,分布较为分散;GABA 免疫反应物在各核团区域均出现许多较大体积阳性神经元,特别是小脑内侧核,多数呈梭形或不规则多边形,多数神经元胞质呈强阳性(图 1-4,图 1-5)。GABA 免疫反应物在三黄鸡小脑内分布的具体测定数据如表 1 所示。

表 1 GABA 免疫阳性产物三黄鸡小脑内的分布

Table 1 Distribution of GABA-immunopositive cells in the cerebellum of Sanhuang chicken

项目 Item	面积/ μm^2 Area	积分光度 Optical density	平均灰度值 average Gray scale
蒲肯野细胞层 Purkinje cell layer	239.52 ± 0.58	88.32 ± 0.61	116.70 ± 0.12
小脑中央核团 Cerebellar nuclei	436.42 ± 0.58	193.86 ± 0.62	105.07 ± 0.14



1. 三黄鸡的小脑皮质结构(10×20 ,Nissl 染色) The structure of cerebellar cortex in Sanhuang chicken(10×20 ,Nissl); 2. 三黄鸡的小脑皮质结构(10×40 ,Nissl 染色) The structure of cerebellar cortex in Sanhuang chicken(10×40 ,Nissl); 3. 三黄鸡小脑内侧核(10×20 ,Nissl 染色) The Nucleus cerebellaris medialis(CbIM) in Sanhuang chicken(10×20 ,Nissl); 4. GABA 阳性神经元在三黄鸡小脑蒲肯野细胞层中的分布(10×40 ,SABC 染色) The distribution of GABA-immunopositive cells in the cerebellum(10×40 ,SABC); 5. GABA 阳性神经元在三黄鸡小脑内侧核内分布(10×20 ,SABC 染色) The distribution of GABA-immunopositive cells in the Nucleus cerebellaris medialis(10×20 ,SABC); A:分子层 Molecular layer; B:蒲肯野细胞层 Purkinje cell layer; C:颗粒层 Granular layer; ←:篮状细胞 Basket cell.

图 1 GABA 阳性神经元在三黄鸡小脑中的分布

Fig. 1 Distribution of GABA-immunopositive cells in the cerebellum of Sanhuang chicken

3 讨论

3.1 三黄鸡小脑的细胞构筑

三黄鸡小脑的正中矢状切面为近似圆形,其分层与文献报道的乌鸡^[3]、鸽子^[4]和非洲鸵鸟^[5]的小脑相同,由外向内依次为分子层、蒲肯野细胞层和颗粒层。笔者通过观察,发现三黄鸡的小脑内侧核发达,神经元数量较多,细胞体积较大,细胞排列紧密,而乌鸡的小脑内侧核不太发达,神经元数量较少,细胞排列松散,表明三黄鸡此核团较发达,这与乌鸡的研究结果^[3]不一致,三黄鸡此核团同其他2个核团不易区分,分界不明显,这与鸽子^[4]、非洲鸵鸟^[5]的研究结果一致。从鸽子善于飞翔的能力来看,鸽小脑调节躯体运动的能力明显强于三黄鸡和乌鸡。但三黄鸡的小脑中央核比乌鸡的发达是否表明三黄鸡的小脑在调节其运动的能力比乌鸡强,这还有待进一步的研究。

3.2 三黄鸡 GABA 阳性神经元在小脑中分布

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种非蛋白质组成的天然氨基酸,广泛分布于动植物体内。在动物体内,GABA几乎只存在于哺乳动物、甲壳类动物、昆虫和一些寄生虫的神经组织中,其中脑组织中的含量大约为每克组织0.1~0.6 mg,免疫学研究表明,其含量最高的区域为脑中黑质。GABA是目前研究较为深入的一种重要的抑制性神经递质,参与多种代谢活动,具有很高的生理活性,介导了40%以上的抑制性神经传导。1950年Robert等^[6]和Awapara等^[7]在鼠脑内发现了GABA,后来研究者又发现GABA是在人脑能量代谢过程中起重要作用的活性氨基酸^[8]。因此无论是哺乳动物还是禽类的中枢神经系统中,GABA都是非常重要的抑制性神经递质,GABA的作用主要是通过突触后膜上的GABA受体结合,引起突触后膜超极化而发生抑制性作用的。本试验发现,GABA免疫阳性神经元不仅在小脑皮质的蓝状细胞、蒲肯野细胞层及高尔基细胞中有大量的表达,而且还在小脑内侧核也有大量的表达,这与其他学者对鹌鹑^[9]、猫^[1]、鼠^[10-11]的研究结果一致。

小脑皮质对脑其他部位的影响主要是通过蒲肯野细胞的传出作用来实现的^[12]。蒲肯野细胞是小脑皮质中唯一的传出纤维,大多终止于中央核,其轴突还可投射到前庭外侧核^[13]、脊髓^[14],这充分表明小脑内存在从蒲肯野细胞到小脑中央核、前庭外侧

核、脊髓的信息传递的通路,这样小脑皮质直接调控运动的多种精细功能。有研究表明,GABA还可能通过其受体来调节从蒲肯野细胞到小脑中央核的信息。小脑中央核中的GABA_A受体参与了动物的眨眼动作^[15],GABA_B受体参与了小脑皮层蒲肯野细胞与小脑深部核团之间的神经传递,因此GABA也就成为小脑传出通路中唯一的递质。由于鸽子具有飞翔的能力,而三黄鸡飞翔能力退化,三黄鸡的中央核没有鸽子发达,神经元数量也较少,这可能是鸽小脑蒲肯野细胞对小脑中央核的抑制作用比三黄鸡要强,笔者推测是鸽小脑蒲肯野细胞分泌较多的GABA的缘故。随着对小脑研究的深入,发现小脑还参与非运动的活动,如摄食调节^[16]、学习记忆^[17]等功能。采用顺行和逆行追踪及电生理的方法研究指出,小脑和下丘脑之间存在着广泛的双向联系,且小脑向下丘脑的投射纤维主要起源于小脑深部核团,终止于下丘脑的广泛区域^[18],这是否意味着GABA也参与了摄食及学习记忆等活动仍需进一步的研究来证实。

参 考 文 献

- [1] 张正亮,张大银,申林,等. 猫小脑皮质 GABA 能神经元年龄相关性变化[J]. 动物学杂志,2007,42(6):34-40.
- [2] VINCENZO B, LUISA R, DANIELA V, et al. GABA immunoreactivity in the human cerebellar cortex: a light and electron microscopical study[J]. The Histochemical Journal, 2001, 33: 537-543.
- [3] 陈文钦,彭克美,刘华珍,等. 乌鸡小脑的解剖学及神经肽 Y 神经元分布的研究[J]. 动物医学进展, 2005, 26(1): 51-54.
- [4] 陈文钦,刘华珍,罗冠中,等. 神经肽 Y 免疫反应神经元在鸽小脑中的定位-SABC 法研究[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(2): 180-183.
- [5] 罗厚强,王艳红,石留红,等. 非洲鸵鸟小脑 3 个神经核团的细胞构筑[C]//中国畜牧兽医学学会. 中国畜牧兽医学学会解剖学及组织胚胎学第十五次学术研讨会论文集. 杨凌: [出版者不详], 2008: 33-37.
- [6] ROBERTS E, FRANKEL S. Gama-amino acid in brain: its formation from glutamic acid[J]. J Biol Chem, 1950, 187: 55-63.
- [7] AWAPARA J, LANDUA A J, FREEST R, et al. Free gamma-aminobutyric in brain[J]. J Biol Chem, 1950, 187: 35-39.
- [8] 郭晓娜,朱永义,朱科学. 生物体内 γ -氨基丁酸的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(2): 70-72.
- [9] 范海燕,黄秀明,李东风. GABA 能神经元在鹌鹑脑内的分布[J]. 东北师范大学学报: 自然科学版, 2006, 29(2): 217-219.
- [10] CARMEN M, GUADALUPE G A, LAURA C B, et al. Expression of GABA ρ subunits during rat cerebellum development [J]. Neuroscience Letters, 2008, 432(1): 1-6.

- [11] CHITOSHI T, YOSHIRO I. Transient expression of GABA_A receptor $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunits in differentiating cerebellar neurons[J]. *Developmental Brain Research*, 2004, 148: 169-177.
- [12] 韩济生. 神经科学原理[M]. 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 550-552.
- [13] 金大成, 吕永利. 胚胎神经肽 Y 的免疫组织化学研究[J]. 中国医科大学学报, 1997, 26(2): 120-122.
- [14] 彭克美, 冯悦平. 5 种家禽小脑至脊髓的直接投射-HRP 逆行追踪法研究[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(5): 454-458.
- [15] TOSHIRO S, SHOGO E. GABA_A receptors in deep cerebellar nuclei play important roles in mouse eyeblink conditioning[J]. *Brain Research*, 2008, 1230: 125-137.
- [16] ZHU J N, ZHANG Y P, SONG Y N, et al. Cerebellar interpositus nuclear and gastric vagal afferent inputs reach and converge onto glycemia-sensitive neurons of the ventromedial hypothalamic nucleus in rats[J]. *Neuroscience Research*, 2004, 48: 405-417.
- [17] BAO S, CHEN L, KIM J J, et al. Cerebellar cortical inhibition and classical eyeblink conditioning[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 1592-1597.
- [18] ZHANG Y P, MA C, WEN Y O, et al. Convergence of gastric vagal and cerebellar fastigial nuclear inputs on glycemia-sensitive neurons of lateral hypothalamic area in rat[J]. *Neurosci Res*, 2003, 45: 9-16.

Distribution of GABA-immunopositive Cells in Cerebellum of Sanhuang Chicken

LUO Hou-qiang PENG Ke-mei WANG Jia-xiang TANG Li
CHENG Jia-yue ZHANG Gao-ying SONG Hui LIU Hua-zhen

College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In order to investigate the cytoarchitecture of cortex and the distribution of GABA-immunopositive cells in the cerebellum of Sanhuang chicken, the cerebellums of ten Sanhuang chicken were studied by Nissl staining and SABC techniques. The results showed that the cytoarchitecture of cerebellar cortex of Sanhuang chicken was similar to that of Pekin duck, silky fowl, pigeon and African Ostrich. GABA-immunopositive cells were located in the Purkinje cell layer of cerebellar cortex, and their immunopositive were especially strong. A large number of GABA-immunopositive cells were also distributed in the cerebellar nuclei, which taking on fusiform or irregular polygon and their cytoplasm were intensively stained. The results of the present study demonstrated that GABA-immunopositive cells were distributed in the cerebellar cortex, which had a vital influence on maintaining cerebellar complicated function.

Key words Sanhuang chicken; cytoarchitecture; cerebellum; GABA

(责任编辑: 边书京)