

血清性激素在白腰文鸟前脑发声控制核团神经元 早期性双态分化中的作用*

曾少举 张信文 李雪生 左明雪**

(北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

(海南师范学院生物系, 海口市 571158)

摘要 本文究了雌、雄白腰文鸟 (*Lonchura striata swinhoi*) 不同发育时期前脑四个控制发声重要核团古纹状体核 (RA)、新纹状体前部巨细胞核外侧部 (LMAN)、X 区 (Area X) 和高级发声中枢 (HVC) 中神经元数量、体积和体内雌二醇 (E_2) 和睾酮 (T) 浓度的变化, 以揭示性激素对鸣禽发声核团性双态性分化的影响。结果发现: (1) HVC、LMAN 和 X 区在发育早期神经元数量和体积均呈显著性双态性差异, 而 RA 神经元直至 30 日龄 (P30) 后才显示出明显性别差异 ($P < 0.05$); (2) 除 RA 外, HVC、LMAN 和 X 区神经元体积的显著性双态性差异均发生在 P20 左右, P20 后雌、雄核团内的神经元体积仅有较小范围的波动; (3) RA 和 LMAN 神经元数量随年龄增长而逐渐减少; 雌、雄鸟 HVC 和雄鸟 X 区的神经元数量在 P20~30 间均增长, 雄鸟 HVC 的增长幅度显著大于雌鸟。P30 后 HVC 和 X 区的神经元数量不再增加, 开始小幅度减少; (4) 四个发声核团的神经元数量和体积在 P5~120 期间均出现 1~2 个急剧变化期, 此变化期与体内雌激素水平开始出现显著性差异的临界期及核团间神经联系开始建立的时期相对应; (5) 雌、雄鸟血清中 E_2 的水平在核团发育初期 (P5) 差异显著, 雌鸟为雄鸟的 7.45 倍, P5 后则呈相反方向变化趋势, 在 P15 时雄鸟中的 E_2 水平反超过雌鸟, 差异显著 ($P < 0.05$)。睾酮仅在发育 P50 后的雄鸟体内被检测出, 雌鸟中始终未能检测出 T 的存在。结果提示: 雌、雄白腰文鸟发育早期体内 E_2 浓度的变化启动了 HVC、LMAN 和 X 区早期神经元性双态性的分化和持续发育; 睾酮对雌、雄鸣禽发声控制核团中早期神经元的性双态性分化作用较小 [动物学报 49 (3): 353~361, 2003]。

关键词 白腰文鸟 发声控制核团 雌二醇 睾酮 性双态 神经元

Effects of serum sex steroid on the early neuronal dimorphism in forebrain vocal-control nuclei of songbird (*Lonchura striata*)*

ZEN G Shao-Ju ZHAN G Xin-Wen LI Xue-Sheng ZUO Ming-Xue**

(College of Life science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

(Department of Biology, Hainan Normal College, Haikou 571158, China)

Abstract We investigated the changes of neuronal numbers and neuronal sizes of four control-vocal nuclei: robust nucleus of the archistriatum (RA), lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (LMAN), Area X and high vocal center (HVC) from posthatching days (P) P5 to P120 in the songbird, striated mannikin (*Lonchura striata*) by use of histological method of nissl-staining. The serum estrodial concentrations from P5 to P50 and the serum testosterone concentrations from P5 to P120 were also tested to further understand the endocrine mechanism of sexual differences in the song control nuclei. The results were as follows: (1) The numbers of RA neuron were not significantly different between males and females before P30. The numbers of RA neuron decreased most significantly from P30 to P40, approximately corresponding to the time when the neural connections were established between RA and HVC. The neuronal numbers of

2002-05-08 收稿, 2002-12-30 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No: 39870097、30060027 和 30270449) [This research was funded by grants from National Natural Science Foundation of China (No. 38970097, 30060027 and 30270449)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: mxzuo@bnu.edu.cn

第一作者简介 曾少举, 男, 35 岁 博士。研究方向: 神经生物学。

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

RA in females decreased much more rapidly than those in males during P20 and P30, leading to the significant differences of RA neuronal number between males and females ($P < 0.05$). The numbers of LMAN neurons exhibited sexually significant differences even in P15. The numbers of LMAN neurons in both males and females decreased significantly only in two adjacent groups at P20 and P40. These two periods were approximately corresponded to the time when neural connections were formed between LMAN and RA or between HVC and RA respectively. The numbers of female area X neurons in males increased most significantly during P20 and P30, but they did not change significantly after P30. The outline of Area X in females could not be clearly distinguished, so the neuronal numbers of female Area X were not available in this study. The numbers of HVC neurons continued to increase before P30, but they increased no more after P30 both in males and females. The decrease of HVC numbers was most obvious in the period from P30 to P40 for both sexes. (2) The volumes of RA, LMAN, Area X or HVC neurons continued to increase before P30. However, they did not increase after P30. All the volumes of four nuclei increased most rapidly between P15 and P20. All the neuronal sizes exhibited a significant difference in both sexes after 20 days of age except RA. The sexual difference of RA neuronal volume was caused by the reduction of RA neuronal volumes in females, not by the increase of those in males after P30. The neuronal volumes in males increased more rapidly than those in females, leading to the sexual differences of neuronal volumes for other three nuclei. The serum estrodial concentrations in females was significantly higher than that in males at P5 ($P < 0.01$). Serum estrodial concentrations decreased during P5 and P10 in males, whereas those increased in males. As a result, there was no sexual difference in the serum estrodial level around P10. Owing to the continuous increase of estrodial in males or continuous decrease in females during P10 and P15, the serum estrodial concentration was higher in males than that in females around P15. However, the serum estrodial concentrations were no significant difference during P30 and P50. The serum testosterone was only detectable in males after P50, revealing that the plasma T was lower than 0.05 ng/ml (the lowest concentration to be detected in the present study) before P50. Plasma T increased with age significantly in males, but it was not detectable in any groups of females. Plasma T could not be detected in the present study during P5 and P50, indicating that T may take the least effect on the sexual differentiation. The short period of increase in the male plasma E_2 was important because it was accorded with the critical time of sexual differentiation. (3) Previous studies have shown that both the plasma E_2 and T can cause the nucleus volume and neuronal size to be increased, but only plasma E can cause more neurons to be produced. Thus, the relatively high serum estrodial level around P15 could cause males to produce more HVC neurons than females, and consequently the neuronal numbers of male HVC were more than in female HVC. As pointed by a previous report, the more numbers of the RA-projecting HVC neurons, the less RA neurons may die due to the innervations from HVC to RA. Therefore, the present result that the neuronal numbers of RA in males were more than those in females was accorded with the above report. The neuronal numbers of LMAN decreased most rapidly in two periods when the neural connections were formed between LMAN and RA or between HVC and RA respectively. This result suggests that the neural connections between LMAN and RA or between RA and HVC both affected the sexual differentiation of LMAN neuron numbers. The numbers of Area X neuron in females were less than those of males after P25. We assumed that this could be caused by the sexual difference of neural innervations from HVC (not shown in present study) as did in RA sexual differentiation. In addition, the sexual difference of neuron numbers of Area X might be caused by the difference of production of neurogenesis in the Area X around P15. [*Acta Zoologica Sinica* 49 (3): 353 - 361, 2003].

Key words Striated mannikin (*Lonchura striata*), Vocal control nuclei, Steroids, Sexual dimorphism, Neuron

在高等脊椎动物中, 鸣禽发声行为及其控制核团的性双态最为典型 (Nottebohm, 1976; Smith, 1997; 左明雪等, 1998)。鸣禽前脑的高级发声中枢 (High vocal center, HVC) 嗅区 X (Area X, X 区) 丘脑前背外侧核内部 (Medial portion of the dorsolateral nucleus of the anterior thalamus, DLM) 新纹状体前部巨细胞核外侧部 (Lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum,

LMAN) 古纹状体核 (Robust nucleus of the archistriatum, RA) 组成了控制鸣啭的学习记忆通路, 由 HVC RA 舌下神经核气管鸣管支 (Nucleus hypoglossi, pars tracheosyringalis, nXIIIts) 鸣肌组成了控制发声的运动通路 (Nottebohm *et al.*, 1976; Fortune *et al.*, 1995)。在上述通路中, 雄鸟中多数核团体积均比雌鸟大 2~7 倍。此外, 核团中神经元的数量、密度和大小等均表现出显著

的性双态 (Fortune, 1995; 左明雪等, 1998)。不同鸣禽中性双态产生的时间有较大差别。有些鸣禽发声控制核团从一开始出现就表现出显著的性别差异, 如 HVC、X 区的体积, 而有的则是在发育过程中逐渐形成的, 如 RA。有关鸣禽性双态性现象的研究已有大量报道, 如雌、雄鸣禽核团体积、神经元数量及密度的差异等, 然而关于鸣禽前脑发声控制核性双态产生的机制至今仍不清楚。

一些研究表明, 鸣禽前脑发声控制核性双态的产生可能与性激素的水平有关。对非鸣禽鹌鹑 (*Coturnix japonica*) 或鸣禽斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*) 的研究表明, 在雌鸟体内人工埋植雌二醇 (Estradiol, E_2), 能诱导雌鸟发育形成永久性的雄性发声系统 (Schlinger, 1991; Fortune, 1995)。睾酮 (Testosterone, T) 对雌鸟也有类似作用, 但其效果明显不如 E_2 。进一步的研究发现, E_2 或 T 均能提高神经元的存活率, 促进神经元体积的增长, 但仅 E_2 能影响神经元数量的增殖 (Nordeen *et al.*, 1989; Ball *et al.*, 2001; Grisham *et al.*, 2002)。这些实验说明了激素尤其是雌激素对鸣禽发声核团的性分化有重要作用。但也有一些研究表明, 在发声核团性双态产生期间, 雌、雄体内的激素水平并不一直有明显差别 (Hutchison *et al.*, 1984; Schlinger *et al.*, 1992)。此外, 前脑所有发声控制核中仅发现 HVC 含有雌激素受体 (Jacobs *et al.*, 1999; Gahr, 1996), 其它核团如 RA、X、LMAN 等均不可能直接受到雌激素的作用。这些研究表明, 性激素对发声核团性双态的产生可能还是相当复杂的, 它不但涉及雌、雄激素在发育不同时期的准确表达, 而且可能还存在其相互间的协同作用。

影响鸣禽发声核性双态性发育的另一重要因素可能与发声核团间神经联系建立的时间和方式有关。近期的研究表明, 雌、雄鸣禽发声核间的神经联系具有明显的性差异, 雄性前脑发声核团神经联系的数量远远超过雌性, 因此尽管雌、雄鸣禽中的某些核团 (如 RA) 在发育初期神经元的数量基本相同, 但由于雌鸟发声神经元过多失去来自其他核团的神经支配, 而无法建立正常的神经联系并最终导致神经元凋亡 (Bottjer *et al.*, 1985, 1986, 1989)。如 RA 和 LMAN 性双态的出现就与两者分别与 HVC 和 RA 神经联系建立的时间有关, 但同样的神经联系对 HVC 性双态的产生却无作用, 因为 HVC 与 RA 或 X 区神经联系建立之前, HVC 的

性双态就已出现 (Konish *et al.*, 1985, 1990)。显然, 鸣禽前脑发声脑区性双态性的分化既可能与性激素的作用时间有关, 又可能与核团间神经联系建立的时间和方式有关, 同时还可能是两者的相互作用。由于鸣禽脑区的性分化是一个长期渐变的发育过程, 前脑有些发声核团性双态的产生是由于雄性核团的发育速度超过雌性, 而有些则是由于雌性核团细胞数量急剧减少所引起, 这表明鸣禽发声核团性双态性的发育可能由不同发育时期组成, 每个时期发挥作用的主导因素可能不同。另外的研究表明, 雌、雄激素在发育过程中的表达有很大的不同, 它们各自作用的受体的临界期也可能不同, 迄今为止, 还未见将鸣禽性双态性分化过程进行分阶段研究的报道。本文通过研究鸣禽白腰文鸟 (*Lonchura striata swinhoei*) 前脑发声控制核发育过程中神经元数量、体积和性激素水平的变化, 试图揭示性激素对鸣禽性双态性早期分化的关键作用时期及机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组

白腰文鸟 203 只 (雄、雌鸟约各半) 购于北京军屯鸟类繁殖厂。从幼鸟孵出的当天 (P0) 到处死之间的天数为鸟的年龄, 按动物存活不同时间 (P5~120) 将鸟分成 11 组 (见表 1)。同一组鸟基本取自孵出的同一窝鸟, 以保证年龄的准确。

1.2 神经元数量及神经元体积的分析

实验鸟经氨基甲酸乙酯过量麻醉后, 经左心室灌流、固定。脑被切制成 $50\ \mu\text{m}$ 厚的连续冰冻矢状切片, 隔片取一, 尼氏染色。在显微镜下找到所选区域, 经显微图像处理系统 (SPOT) 采集图像, 应用图像处理系统软件, 确定所选面积菜单窗口 (核团或神经元大小), 将计算机得出的数据在 EXCEL 或 SPSS for Windows 软件包中进行数据处理。核团的所有面积之和与核团厚度相乘, 再除以放大倍数, 得到核团体积 (mm^3)。使用目镜网格测微尺 ($1.0\ \text{mm}^2$), 计数所选脑区神经元的数量, 再除以该区的面积与切片厚度的乘积, 得到神经元密度 (神经元数/ mm^3)。核团体积与神经元密度的乘积为核团神经元的数量。对每个选择测量的核团内, 随机选取 3~5 个视野, 用计算机鼠标画出神经元周长并在 SPOT 分析软件 (Image-Pro Plus) 下自动转换成神经元截面积 (本文所研究的发声核团内神经元的分布均为均匀分布)。在本文叙述中,

神经元截面积的变化可认为近似等于神经元体积的变化。

1.3 性激素含量的测定

每组随机选出实验鸟 7~13 只, 经注射器心脏取血约 1~2 ml, 血液静置 30 min 后, 3 500 r/min 离心 5 min, 取出血清, -20℃ 保存。样本经放射性碘标记的 E₂ 和 T 抗体 (北京北方生物技术研究所) 反应后, 由北京师范大学测试中心经 计数器 (SN-682 测定放射剂量, 上海光电仪器有限公司), 后换算为 E₂ 或 T 值。

本文数据均采用平均值 ± 标准差表示。实验数据用 SPSS 软件包进行统计检验前, 先用 One-Sample K-S 确定数据是否为正态分布, 再用 One-Way ANOVA 确定方差同质性, 然后对不同年龄段各核团变化进行显著性分析。显著性水平均设为 0.05。

2 结果

2.1 雌、雄 RA、LMAN、X 区和 HVC 神经元数量和体积的比较

前脑 RA、LMAN、X 区和 HVC 发育到一定时期后, 核团内神经元密度、神经元形态、核团着色深度与周围组织不同, 因而可与周围组织较易区分。大多数发声核团从形态学上开始能辨别其核团轮廓时就已经出现明显的性别差异, 即雄性核团均较雌性核团大。每个核团可与周围组织相区别的时间随发育会发生可塑性变化。雌、雄 RA 在 P5 时就能被辨认, 但直至 P40 时才表现出明显的性双态。雌、雄鸟的 LMAN 在 P15 时其核团轮廓就已十分清晰, 然而至 P40 后雌鸟反而不能与周围组织相区别。雄鸟的 X 区在 P20 时其核团轮廓可辨认, 但雌鸟的 X 区至发育成熟也很难与周围组织相区分。雌、雄鸟的 HVC 在 P20 后核团轮廓可辨认。

2.1.1 RA 神经元数量的雌、雄差异 P30 之前, 雌、雄鸟间 RA 的神经元数量无显著性差别。但 P30 后 RA 神经元数量在雌、雄鸟间开始出现显著性差别 ($P < 0.05$) (表 1)。雄性 RA 神经元数量在 P5~120 间未发生明显变化, 仅 P30~40 间神经元数量略有减少。雌性 RA 神经元的数量变化与雄性有较大不同。神经元数量的最大变化发生在

P30~40 间, RA 神经元数量平均减少了 30.15%。其中在 P25~30 和 P40~50 期间, RA 神经元数量分别减少了 22.29% 和 27.37%。

2.1.2 LMAN 神经元数量的雌、雄差异 雌、雄白腰文鸟 LMAN 自可辨别起其核团轮廓时 (P15) 就存在显著性差异 ($P < 0.05$)。在 P5~80 发育期间, 神经元数量随年龄的增加均发生明显减少, 但减少的时间段有所区别。

雄鸟 LMAN 神经元数量发生明显减少的时期是在 P20~60 间, 其中最显著的变化发生在 P40~50 间, 在此期间 LMAN 神经元数量减少了 1.95 倍。从 P60 后一直至 P120, 雄性 LMAN 神经元数量均无明显变化。雌性 LMAN 神经元数量在 P15~40 间随年龄的增加也发生明显减少, 发生明显减少的时间出现在 P20~25 和 P30~40 二个时间段, 在此期间 LMAN 神经元数量分别减少了 16.75% 和 35.66% (表 1)。P60 后雌鸟 LMAN 的界限不清, 难以与周围组织区分。

2.1.3 X 区神经元数量的雌、雄差异 雄鸟 X 区的神经元数量在 P20~30 间急剧增加, 10 d 内神经数量增加了 93.3%。从 P30 后, X 区神经元的数量开始缓慢减少, 但减少的幅度很小, 从 P30~120 间仅减少了 12.05% (表 1)。雌鸟 X 区的界线始终不清楚, 因而未能统计神经元数量。

2.1.4 HVC 神经元数量的雌、雄差异 雌、雄白腰文鸟 HVC 的神经元数量自核团发育初期就表现出显著的性别差异, P20 时雄鸟神经元数量就为雌鸟的 3.38 倍。随着年龄的增长, 雌、雄鸟神经元数量均出现先递增、后减少的明显波动变化, 其中雄鸟 HVC 神经元数量的变化幅度较雌鸟大。

雄鸟 HVC 神经元数量在 P20~30 间增加了 20.3%, 然而在 P30~40 间神经元数量却又减少了 15.6%。自 P40 后, 雄鸟 HVC 神经元数量虽缓慢减少, 但在各组间差别均不显著。雌鸟 HVC 神经元数量在 20~30 日龄间也有增加, 平均增加了 14.7%, 在 P30~40 期间, 雌鸟 HVC 神经元数量减少了 12.3%。与雄鸟相似, P40 后雌鸟 HVC 神经元数量仅缓慢减少, 在各组间差别均不显著 (见表 1)。

表 1 不同年龄段白腰文鸟发声控制核团内神经元的数量

Table 1 Neuron numbers of vocal-control nuclei in the striated mannikin during development

Age (days)	RA		LMAN		Area X	HVC	
	Males $\times 10^3$	Females $\times 10^3$	Males $\times 10^3$	Females $\times 10^3$	Males $\times 10^3$	Males $\times 10^3$	Females $\times 10^3$
5	2.11 \pm 0.22 ^a (n=8)	2.04 \pm 0.20 ^a (n=8)	-	-	-	-	-
10	2.06 \pm 0.15 ^a (n=9)	1.99 \pm 0.21 ^a (n=9)	-	-	-	-	-
15	2.03 \pm 0.12 ^a (n=7)	1.91 \pm 0.18 ^a (n=7)	9.15 \pm 0.88 ^a (n=8)	7.03 \pm 0.57 ^{a*} (n=8)	-	-	-
20	2.01 \pm 0.12 ^a (n=7)	1.88 \pm 0.17 ^a (n=8)	8.56 \pm 0.76 ^a (n=9)	6.83 \pm 0.48 ^{a*} (n=8)	42.80 \pm 8.67 ^a (n=7)	10.33 \pm 1.34 ^a (n=9)	3.06 \pm 0.85 ^{a*} (n=8)
25	1.99 \pm 0.12 ^a (n=7)	1.75 \pm 0.18 ^a (n=9)	7.45 \pm 0.63 ^b (n=7)	5.85 \pm 0.32 ^{b*} (n=8)	76.89 \pm 7.58 ^b (n=9)	12.04 \pm 1.87 ^b (n=8)	3.15 \pm 0.74 ^{a*} (n=9)
30	1.96 \pm 0.10 ^a (n=9)	1.36 \pm 0.14 ^{b*} (n=8)	6.40 \pm 0.42 ^c (n=8)	5.25 \pm 0.35 ^{b*} (n=9)	82.73 \pm 8.47 ^c (n=7)	12.43 \pm 1.92 ^b (n=8)	3.51 \pm 0.68 ^{b*} (n=8)
40	1.82 \pm 0.15 ^b (n=8)	0.95 \pm 0.09 ^{c*} (n=7)	5.06 \pm 0.34 ^d (n=8)	3.87 \pm 0.44 ^{c*} (n=8)	80.08 \pm 9.78 ^c (n=9)	10.49 \pm 1.34 ^c (n=8)	3.08 \pm 0.57 ^{c*} (n=8)
50	1.80 \pm 0.15 ^b (n=8)	0.69 \pm 0.08 ^{d*} (n=7)	2.60 \pm 0.32 ^e (n=6)	3.65 \pm 0.51 ^{c*} (n=7)	79.23 \pm 8.59 ^c (n=8)	10.28 \pm 0.98 ^c (n=8)	3.85 \pm 0.53 ^{d*} (n=9)
60	1.79 \pm 0.16 ^b (n=9)	0.65 \pm 0.07 ^{d*} (n=8)	2.39 \pm 0.45 ^f (n=9)	3.41 \pm 0.45 ^{c*} (n=8)	78.35 \pm 7.85 ^c (n=7)	9.54 \pm 1.47 ^c (n=7)	3.69 \pm 0.49 ^{d*} (n=7)
80	1.74 \pm 0.11 ^b (n=8)	0.63 \pm 0.08 ^{d*} (n=9)	1.95 \pm 0.51 ^f (n=7)	-	77.29 \pm 8.49 ^c (n=8)	9.09 \pm 1.58 ^c (n=9)	3.59 \pm 0.38 ^{d*} (n=8)
120	1.71 \pm 0.154 ^b (n=9)	0.61 \pm 0.101 ^{d*} (n=8)	1.73 \pm 0.47 ^f (n=9)	-	75.83 \pm 9.87 ^c (n=8)	8.66 \pm 0.95 ^c (n=8)	3.37 \pm 0.29 ^{d*} (n=9)

各核团体积值为平均值 \pm 标准差。不同字母上标 a~f 表示同列 (同一性别) 相邻组间体积值的差异显著 (One-Way ANOVA, Duncan 检验, $P < 0.05$)。* 号表示同年龄组间雌、雄鸟间的体积值差异显著 (双尾 t 检验, $P < 0.05$)。括弧中的数字为样本数 [Data are expressed as mean \pm standard deviation. Means with different superscripts (a~f) in same row (same sex) represent statistical difference (one-way ANOVA, Duncan's test, $P < 0.05$). Sample sizes are presented in parentheses. Means with * represent significantly statistical difference at the same age group between sexes (Independent-Samples t-test, two-tailed). There are no data available in the blank space]

2.2 HNC、LMAN、X 区和 RA 神经元体积的比较

HVC、LMAN、X 区和 RA 从发育初期均表现出神经元体积的持续增长。除 RA 外, 其余 3 个核团 HVC、LMAN 和 X 区从 P20 开始, 均一直表现出雌、雄间神经元体积的性双态性差异。RA 核的性双态性发生在 P30 之后。RA 核性双态性产生的主要原因是由于雌鸟神经元体积的减小所至, 而其余 3 个核团性双态的发生是由于雄鸟核团神经元体积的增长速度明显超过雌鸟 (图 1)。4 个核团的性双态性发生显著性差异 ($P < 0.05$) 的关键时期均发生在 P20 之后。

2.3 体内雌二醇和睾酮性激素浓度的变化

核团发育初期, 雌、雄白腰文鸟体内 E_2 的浓度就已出现极大的差异, P5 时雌鸟血清中 E_2 的浓度即为雄鸟的 7.49 倍。P5~10 期间是雌、雄鸟体内 E_2 浓度变化最为显著的时期, 在此阶段雌鸟 E_2 浓度下降了 3.12 倍, 而雄鸟 E_2 的含量上升了 2.0 倍, 因而此时雌、雄鸟中 E_2 的浓度已比较接近, 分别为 292.49 ± 76.4 和 244.27 ± 40.4 (pg/ml), 雌、雄间无显著性差异。P10 之后, 雌鸟 E_2 浓度继续下降而雄鸟 E_2 浓度继续增加, 至 P15 时出现显著性差异 ($P < 0.05$)。从 P15 后直至 P50, 尽管雌、雄鸟中 E_2 的浓度均出现不同的波动, 但变

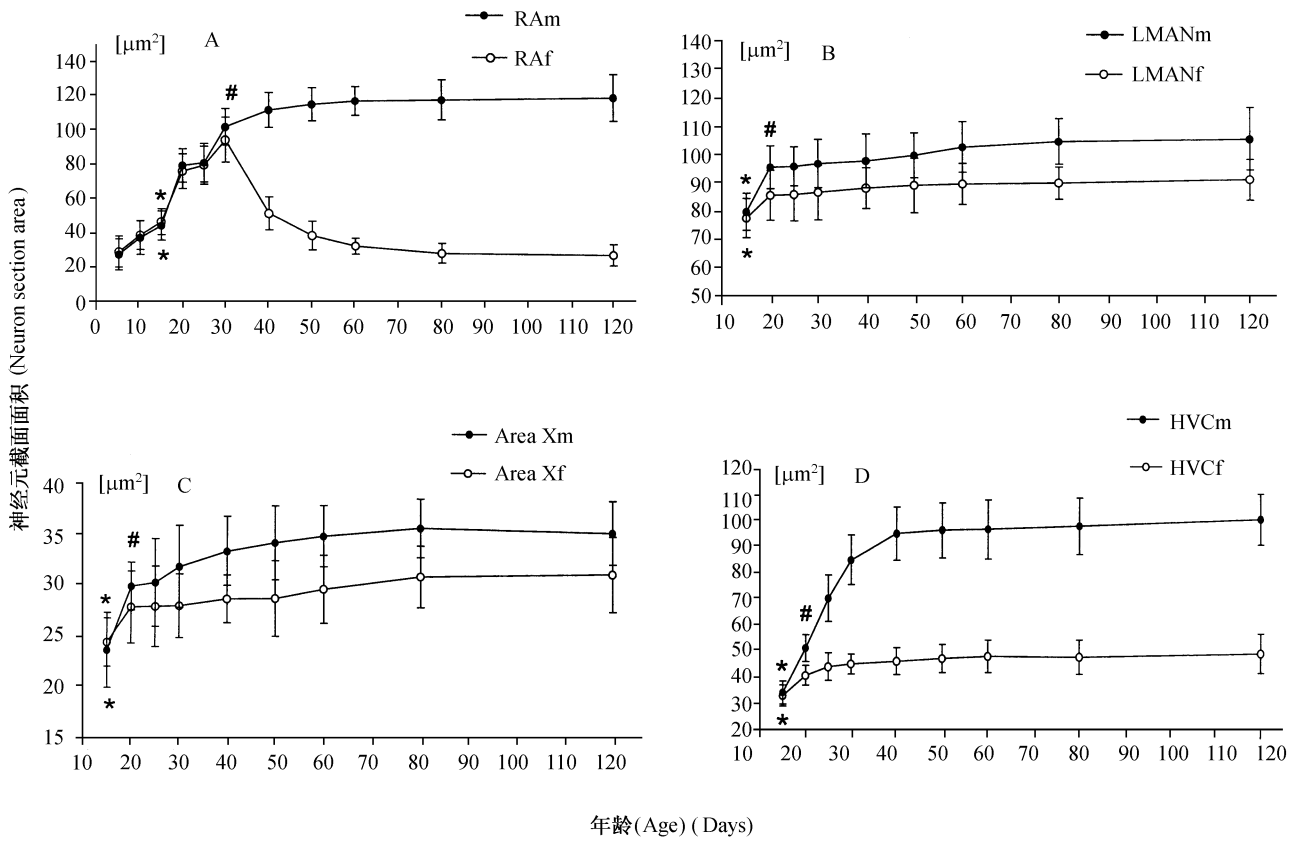


图 1 白腰文鸟发育过程中 RA、LMAN、Area 区和 HVC 神经元大小的变化

Fig. 1 The changes of neuronal size in RA, LMAN, Area X and HVC during development in the striated munnikin brain

核团的后缀 m、f 分别代表雌、雄鸟，* 表示符号所在年龄组的神经元大小值与其后同一性别各组神经元大小值间均差异显著，# 表示符号所在年龄组雌、雄神经元大小值间开始出现显著差异 ($P < 0.05$) (The postfix of nucleus 'm' and 'f' represent 'male' and 'female' respectively. The mark * represents significant difference of neuronal size between the mark * located group and any of its followed groups in the same sex. Neuronal sizes between males and females are significantly different in any groups indicated by the mark #)

化的幅值均较小，雌、雄间未出现明显的性差异。

P40 前在雌、雄鸟体内均检测不到 T，P40 后雄鸟血清中的 T 才被检测出。P60 后，不同发育阶段雄鸟血清中的 T 值均显示明显差异。雌鸟血清中的 T 值均未能被检测到 (表 2)。

3 讨论

大量研究表明，雄激素对动物雄性分化和雄性机能的维持具有重要作用。睾酮可刺激大多数动物雄性神经结构的分化，如缺少睾酮，则分化成雌性神经结构。然而在某些脊椎动物，雌激素对性双态性的分化同样具有重要作用，如缺乏雌激素，则引起雄性结构的发生 (Balthazart *et al.*, 1997)。给幼年雌性鸣禽人工埋植 E_2 或 T，会诱导发育形成永久性的雄性发声系统 (Schlinger, 1991; For-

tune, 1995; Arnold, 1997; Schlinger, 1998)，但睾酮的作用效果不如 E_2 明显。这表明鸟类性激素对鸟类发声控制神经核团的性双态性发育可能有别于其他动物，不但雌、雄激素对核团性分化发挥作用的关键时期有可能不同，雌、雄激素间还可能存在相互协同的作用关系。

应用 DNA 合成示踪剂 [^3H] 胸腺嘧啶核苷 (^3H TdR) 放射同位素示踪方法证明，鸣禽 HVC 和 X 区中神经元在 P15 ~ 20 时即已被 ^3H TdR 标记 (Nordeen *et al.*, 1988)，这表明 HVC 和 X 中的神经网络构筑至少在此期间就已开始。本次实验表明，恰好约在 P15 时，雄鸟体内 E_2 的水平开始显著高于雌鸟，而此时正好处于雌激素对雌鸟雄性化作用的临界期内，与雌激素雄性化最大作用的时间段一致 (Adkins-Regan *et al.*, 1994)。已有的研究

表 2 不同年龄段白腰文鸟性激素水平

Table 2 Steroid concentrations in serum during development in the striated mannikin

Age (Days)	Estradiol (pg/ml)		Testosterone (pg/ml)	
	Males	Females	Males	Females
5	121.89 ±35.45 ^a (n = 10)	913.46 ±139.45 ^{a*} (n = 11)	-	-
10	244.27 ±40.43 ^b (n = 13)	292.49 ±76.37 ^b (n = 11)	-	-
15	285.98 ±45.43 ^c (n = 13)	188.50 ±40.01 ^{c*} (n = 11)	-	-
25	245.23 ±41.23 ^d (n = 13)	211.35 ±34.21 ^d (n = 11)	-	-
30	209.57 ±58.45 ^e (n = 10)	233.02 ±47.97 ^e (n = 10)	-	-
40	183.06 ±27.89 ^e (n = 8)	249.01 ±40.13 ^e (n = 8)	-	-
50	183.49 ±52.48 ^e (n = 7)	185.97 ±76.62 ^e (n = 7)	80.45 ±13.89 ^a (n = 7)	-
60	nm	nm	91.24 ±18.56 ^a (n = 7)	-
80	nm	nm	175.28 ±23.81 ^b (n = 7)	-
120	nm	nm	548.62 ±28.74 ^c (n = 7)	-

nm: 未检测。-: 低于 50 pg/ml。各浓度值为平均值 ±标准差。同一性别各浓度值右上方若为同一字母 a~e, 表示该字母所代表的浓度值间差异不显著, 而不同字母间则差异显著 (One-Way ANOVA, Duncan 检验, $P < 0.05$)。*号表示同年龄雌、雄鸟间的激素浓度值差异显著 (双尾 t 检验, $P < 0.05$)。各浓度值下方括弧中的数字为样本数 [nm: not measured. -: lower than 50 pg/ml. Data are expressed as mean ± standard deviation. Means with different superscripts (a~e) in the same row or in the same sex are significantly different (one-way ANOVA, Duncan's test, $P < 0.05$). Sample sizes are shown in parentheses. Means with * are significantly different at the same age group between sexes (Independent-samples t test, two-tailed).

表明: E_2 或 T 均能提高神经元的存活率, 促进神经元体积的增大, 但两者中仅 E_2 能影响神经元数量的增殖 (Nordeen *et al.*, 1988), 体内埋植 E_2 可诱导神经元数量的增加 (Burek *et al.*, 1994, 1995)。近期应用原位分子杂交方法对鸣禽斑胸草雀研究的结果表明, P9 后雌激素受体在 HVC 中即开始表达, 并显示出明显的性别差异 (Jacobs *et al.*, 1999)。我们推测, 由于此时正是雄鸟雌激素水平不断升高时期并在 P15 时达到最高值, 在大量雌激素与受体的作用下, 诱导了神经细胞的大量增殖和细胞体积的增大, 导致雌、雄 HVC 性双态性的早期发育, 这种状态一直持续到 P25 前, 雄性 HVC 的神经元数量和体积仍在增长。在 P30 ~

50 期间, 雌激素水平在雌、雄鸟间已无明显差别, 因而 P30 后 HVC 中的神经元总数已不再增加, 体积的增长也趋于平缓。尽管 P10 前雌鸟体内的雌激素水平高于雄鸟几倍, 然而由于此时缺乏雌激素受体, 对 HVC 新生神经元的增殖可能不产生作用。目前所知, 在鸣禽前脑 HVC、RA、LMAN 和 X 区四个核团中, 惟有 HVC 中存在雌激素受体 (Jacobs *et al.*, 1999; Gahr, 1996), 这或许可以解释为什么上述四个核团在发育初期时, 惟有 HVC 核的性双态最为显著 (图 1)。

RA 在发育初期并未显示出性双态性, 直至发育至 P30 时才出现神经元数量和体积的显著差异, 这表明 P30 的雌激素水平未对 RA 早期的性双态性

发育产生影响。Konish *et al.* (1990) 指出斑胸草雀 RA 神经元在胚胎 6、7 d 就几乎全部产生, 出生后雌、雄 RA 神经元的数量均呈下降趋势, 其中雌鸟 RA 神经元数量的减少尤为显著。RA 的性双态主要发生在 P30 ~ 60 期间。由于在 P30 ~ 60 期间, 雌、雄鸟间的性激素水平均无明显差别, 推测 RA 的性双态可能不是由雌激素直接作用所引起。已往的研究表明, 在此期间雌鸟 RA 神经元出现大量凋亡, 因而推测可能与 RA 神经元的凋亡有关 (Konish *et al.*, 1990)。本实验中, 雌鸟 RA 神经元体积和神经元数量的变化趋势显示出明显的一致, 两者均是在 P30 后开始出现神经元凋亡和神经细胞体积萎缩的显著变化。我们的前期工作表明, RA 神经元凋亡主要与其缺少来自 HVC 核的神经支配有关。雄性白腰文鸟 HVC 与 RA 间的神经联系恰好是从 P30 后开始建立, 雄性 HVC 与 RA 间的神经联系数量显著超过雌性, 这表明失去神经支配的雌鸟 RA 神经元无法建立正常的神经联系而导致凋亡。这说明性激素可通过影响 HVC 间接导致 RA 的性双态性, 解剖学证据支持这一推测 (曾少举等, 2001)。

LMAN 的发育趋势与 RA 相似, 出生后神经元数量呈下降趋势, 但与 RA 不同的是, LMAN 在发育初期就表现出性双态性。X 区在 P20 之前的轮廓不易准确分辨, 因此 P20 前的 X 神经元数量难以记数。应用 DNA 合成示踪的一些研究表明, 在 P20 ~ 30 期间 X 区内标记的神经元数量在雌、雄鸟间已经存在性别差异 (Konishi *et al.*, 1990), 这表明尽管 P20 前无法准确测定雌、雄 X 区的范围, 然而神经元数量差异的性双态性显然已经存在。本实验通过神经元体积变化的数据表明, LMAN 和 X 区神经元体积的性双态性在 P20 就已建立, 由于雌激素对神经元体积增长的作用需要持续一定时间, 因此推测雌激素对 LMAN 和 X 区体积的早期发育有作用。但 LMAN 和 X 区中无雌激素受体存在 (Jacobs *et al.*, 1999; Gahr, 1996), 因而雌激素是通过何种途径影响这两个核团性双态性发育的还有待进一步研究。鸣禽性双态性的产生是一个渐进的发育过程, 许多鸣禽发声控制核团终存在性双态性的分化, 特别是性双态晚期的分化过程可能更为复杂, 由于此时体内雄激素、雌激素都可能在不同的作用时间独自或协同发挥作用, 同时核团间神经联系建立的时间和程度也直接影响核团内神经元数量的可塑性变化。我们前期工作已经

证明, HVC、RA 和 X 区体积的发育与核团之间建立神经联系的时间和程度有关 (曾少举等, 2001; 左明雪等, 2002), 这表明发声控制核的早期和晚期性双态性发育的机制可能有所不同。

致谢 黄瑜、邓伦斌参与了雌、雄激素含量的测定, 特此表示感谢。

参考文献 (References)

- Adkins-Regan, E., V. Mansukhani, C. Seiwert and R. Thompson 1994 Sexual differentiation of brain and behavior in the zebra finch: critical periods for effects of early estrogen treatment. *J. Neurobiol.* **25**: 865 ~ 877.
- Arnold, A. P. 1997 Sexual differentiation of the zebra finch song system: positive evidence, negative evidence, null hypotheses, and a paradigm shift. *J. Neurobiol.* **33**: 572 ~ 584.
- Ball, G. F. and S. A. MacDougall-Shackleton 2001 Sex differences in songbirds 25 years later: what have we learned and where do we go? *Microsc. Res. Tech.* **54** (6): 327 ~ 34.
- Balthazart, J., C. Castagna and G. F. Ball 1997 Aromatase inhibition blocks the activation and sexual differentiation of appetitive male sexual behavior in Japanese quail. *Behav. Neurosci.* **111**: 381 ~ 397.
- Bottjer, S. W., S. L. Glaessner and A. P. Arnold 1985 Ontogeny of brain nuclei controlling song learning and behavior in zebra finches. *J. Neurosci.* **5**: 1556 ~ 1562.
- Bottjer, S. W., E. A. Miesner and A. P. Arnold 1986 Changes in neuronal number, density and size account for increases in volume of song-control nuclei during song development in zebra finches. *Neurosci Lett.* **67**: 263 ~ 268.
- Bottjer, S. W., K. A. Halsema, S. A. Brown and E. A. Miesner 1989 Axonal connections of a forebrain nucleus involved with vocal learning in zebra finches. *J. Comp Neurol.* **279**: 312 ~ 326.
- Burek, M. J., K. W. Nordeen and E. J. Nordeen 1994 Ontogeny of sex differences among newly-generated neurons of the juvenile avian brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **78**: 57 ~ 64.
- Burek, M. J., K. W. Nordeen and E. J. Nordeen 1995 Estrogen promotes neuron addition to an avian song-control nucleus by regulating post-mitotic events. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **85**: 220 ~ 224.
- Fortune, E. S. and D. Margoliash 1995 Parallel pathways and convergence onto HVC and adjacent neostriatum of adult zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Neuro.* **360**: 413 ~ 441.
- Gahr, M. 1996 Developmental changes in the distribution of oestrogen receptor mRNA expressing cells in the forebrain of female, male and masculinized female zebra finches. *Neuroreport* **7**: 2469 ~ 2473.
- Grisham, W., J. Lee, M. E. McCormick, K. Yang-Stayner and A. P. Arnold 2002 Antiandrogen blocks estrogen-induced masculinization of the song system in female zebra finches. *J. Neuro*

- biol.* **51** (1): 1 ~ 8.
- Hutchison, J. B., J. C. Wingfield and R. E. Hutchison 1984 Sex differences in plasma concentrations of steroids during the sensitive period for brain differentiation in the zebra finch. *J. Endocrinol.* **103**: 363 ~ 369.
- Jacobs, E. C., A. P. Arnold and A. T. Campagnoni 1999 Developmental regulation of the distribution of aromatase and estrogen receptor mRNA-expressing cells in the zebra finch brain. *Dev. Neurosci.* **21**: 453 ~ 472.
- Konishi, M. and E. Akutagawa 1985 Neuronal growth, atrophy and death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch brain. *Nature* **315**: 145 ~ 157.
- Konishi, M. and E. Akutagawa 1990 Growth and atrophy of neurons labeled at their birth in a song nucleus of the zebra finch. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**: 3 538 ~ 3 541.
- Nordeen, E. J. and K. W. Nordeen 1988 Estrogen stimulates the incorporation of new neurons into avian song nuclei during adolescence. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **49**: 27 ~ 32.
- Nottebohm, F. and A. P. Arnold 1976 Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* **194**: 211 ~ 213.
- Schlinger, B. A. and A. P. Arnold 1991 Androgen effects on the development of the zebra finch song system. *Brain Res.* **561**: 99 ~ 105.
- Schlinger, B. A. and A. P. Arnold 1992 Plasma sex steroids and tissue aromatization in hatchling zebra finches: implications for the sexual differentiation of singing behavior. *Endocrinology* **130**: 289 ~ 299.
- Schlinger, B. A. 1998 Sexual differentiation of avian brain and behavior: current views on gonadal hormone-dependent and independent mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 407 ~ 429.
- Smith, G. T., E. A. Brenowitz and J. C. Wingfield 1997 Roles of photoperiod and testosterone in seasonal plasticity of the avian song control system. *J. Neurobiol.* **32**: 426 ~ 442.
- Zeng, S. J., X. W. Zhang and M. X. Zuo 2001 Sexual dimorphism and its neural mechanism of a song-control nucleus of songbird (*Lonchura striata*). *Acta Zoologica Sinica* **47** (5): 535 ~ 541. [曾少举, 张信文, 左明雪 2001 鸣禽白腰文鸟发声核团性双态的产生及其神经机制. *动物学报* **47** (5): 535 ~ 541.]
- Zuo, M. X., S. J. Zeng, Y. Sh and Z. Y. Huang 1998 The sexual differences of the vocal control nuclei in the telencephalon of songbird. *Acta Zoologica Sinica* **44** (3): 302 ~ 307. [左明雪, 曾少举, 时宇, 黄之瑜 1998 鸣禽白腰文鸟前脑发声控制核团的性双态性. *动物学报* **44** (3): 302 ~ 307.]
- Zuo, M. X., S. J. Zeng, W. M. Peng and X. W. Zhang 2002 Neural development of vocal behavior in striated mannikin (*Lonchura striata*) *Acta Zoologica Sinica* **48** (1): 50 ~ 57. [左明雪, 曾少举, 彭卫民, 张信文 2002 白腰文鸟发声行为神经发育的研究. *动物学报* **48** (1): 50 ~ 57.]