

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性 SD 大鼠 34 只, 体重 200~250g, 由第一军医大学实验动物中心提供。颗粒型饲料喂养。饮用自来水。动物房温度维持在(18~26)℃。昼夜暗周期为 12 h 昼 12 h 夜。实验前在上述条件下饲养 2 d。将动物随机分为以下 3 组: ① GABA 免疫组化组; ② 只 GABA 免疫组化组; ③ 只 GABA_{B1} 原位杂交组; ④ 只

1.2 灌注取材

1.2.1 GABA 免疫组织化学组 大鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛 5ml/kg b.w. 麻醉动物。开胸后剪开右心耳。经左心室插管至升主动脉。快速输入 0.9% 生理盐水 100ml。将血液冲洗干净。快速灌注含 2.5% 戊二醛和 10 g/L 焦亚硫酸钠的 0.1mol/L 二甲砷酸溶液 500ml。开颅取脑后置于上述固定液中。后固定约 2 h。再置于含 30% 蔗糖的 0.1mol/L 磷酸缓冲液中 (4℃, pH7.4) 直至沉底。恒冷箱切片在 -20℃ 条件下进行连续冠状切片。切片厚度为 20 μm。将切片收集于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中。依次分成 2 套。准备分别进行 GABA 免疫组化及免疫组化对照实验。

1.2.2 GAD 免疫组织化学组 腹腔内注射 10% 水合氯醛 5ml/kg b.w. 麻醉动物。开胸后剪开右心耳。经左心室插管至升主动脉。快速输入 0.9% 生理盐水 100ml。将血液冲洗干净。再快速输入含 4% 多聚甲醛的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 200ml (4℃, pH7.2)。然后缓慢灌注含 4% 多聚甲醛的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 300ml。持续约 2 h。开颅取脑。置于含 30% 蔗糖的 0.1mol/L 磷酸缓冲液中 (4℃, pH7.4) 直至沉底。恒冷箱切片在 -20℃ 条件下进行连续冠状切片。切片厚度为 20 μm。将切片收集于 0.1mol/L 磷酸缓冲液中。依次分成 3 套。分别进行相对分子质量为 65000 和 67000 的两种 GAD 免疫组化及免疫组化对照实验。

1.2.3 原位杂交组 在操作过程中严格防止 RNA 酶污染。大鼠用 10% 水合氯醛 3.5ml/100g b.w. 腹腔内注射麻醉。开胸。剪开右心耳。经左心室插管至升主动脉。快速输入 100ml 生理盐水。快速灌注。然后用 DEPC 水配制的含 4% 多聚甲醛的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 250ml。快速灌注。再用 250ml 慢速滴注。持续 2 h 后取脑。置于由 DEPC 水配制的含 30% 蔗糖溶液中 4℃ 过夜。恒冷箱切片。切片厚度为 30 μm。贴于事先经多聚赖氨酸处理过的载玻片上。切片分两套。一套行 GABA_{B1} 受体的原位杂交。另一套做对照实验。

1.3 免疫组化

1.3.1 免疫组化步骤 切片先经 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 15min。依次再加入 0.3% Triton X-100。37℃ 孵育 30min。0.01mol/L 的 PBS 清洗

15min。依次分别加入兔抗大鼠 GABA_{B1} hemicon 美国抗体。相对分子质量分别为 65000 和 67000 的两种 GAD 抗体。由 Prof. Jen-Yan Wu, University of Kansas 馈赠。按 1:1000 效价于在湿盒中 4℃ 孵育 48 h。0.01mol/L 的 PBS 清洗 15 min。依次加入羊抗兔 IgG 1:1000。美国室温孵育 4 h。0.01mol/L 的 PBS 洗 15min。依次再加入卵白素-生物素复合物 (Vector, 美国) 1:1000。中室温孵育 3 h。0.01mol/L 的 PBS 洗 15min。依次用硫酸镍胺增强的二氨基联苯胺 (DAB) 法显色。切片用 0.1% 明胶裱于载玻片上。室温下干燥。依次经 70% 酒精、5% 酒精、5% 酒精、90% 酒精及 100% 酒精脱水。二甲苯透明。PX 封片。OLYMPUS 显微镜下观察照相。

1.3.2 免疫组化对照组 用正常兔血清分别代替一抗后进行上述免疫组化反应。

1.4 分子原位杂交

1.4.1 杂交前的处理 所用试剂经灭菌的 0.1% DEPC 漂洗。碳酸二乙酯 (K2CO3) 配制。所用器械及器皿均经 80~200℃ 高温烘烤 4 h 以上。操作过程在无菌环境下进行。将切片分为两套。分别用于探针的杂交及对照组。

1.4.2 合成寡核苷酸探针 依据 Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=nucleotide&list=GenBank>) 公布的 GABA_{B1} 受体 DNA 序列, 选择编码外显子的部分。由 Oligonucleotide 软件确定 227~246 间碱基片段作为与 mRNA 互补的寡核苷酸探针。由 TaKaRa 公司合成。具体序列为 5'-AACTAACCAAGCGGCTGAAA-3'。

1.4.3 寡核苷酸探针尾端标记及检测 购买 Roche 公司 DIG- 尾端标记试剂盒。按以下步骤操作: ① 100 pmol 寡核苷酸探针用灭菌的蒸馏水稀释至终体积 10 μl。② 依次加入下列试剂: 反应缓冲液 10 μl, 4% 蔗糖, 0.1mol/L NaCl 溶液 10 μl, 0.1mol/L DIG-dUTP 溶液 10 μl, 0.1mol/L ATP 溶液 10 μl, 0.1mol/L 末端转移酶 10 μl。③ 混合。离心。37℃ 孵育 15min。置于冰面上。加入 2 μl 0.2mol/L 的 EDTA。80℃ 终止反应。

1.4.4 探针的检测 探针标准品与上述标记 DIG 探针样品进行稀释。使终浓度分别为 100 ng/ml 和 1 fmol/ml。醋酸纤维膜上按 1ml 标准进行点样。254nm 紫外线照 2~3min。探针 buffer 1.5mol/L Tris-HCl, 15mol/L NaCl。室温下洗 15 min。探针 buffer 域 Buffer 玉配制 0.5% Blocking 室温下洗 30min。探针袋内加入由 Buffer 域按照 1:1000 稀释的 Anti-DIG-AP 绵羊抗 DIG 抗体。7℃ 孵育 30~45 min。探针 buffer 玉 室温下洗 2 次。5min。探针 buffer 芋 1.5mol/L Tris-HCl, 1mol/L NaCl, 0.05mol/L MgCl2。室温下洗 2 次。10min。探针 buffer

状体内尾壳核内只有散在阳性表达细胞苍白球内可见较多阳性表达细胞

而在尾壳核与苍白球交界处的边缘区内呈明显的阳性表达可见许多 GABAR_{B1} mRNA 阳性的梭形及卵圆形的细胞其长轴呈背腹方向走行排列成密

集的带状

此外在海马 CA1 CA2 和 CA3 等处可见许多呈表达阳性的细胞大脑皮层的阳性细胞集中在锥体细胞层对照组均为阴性

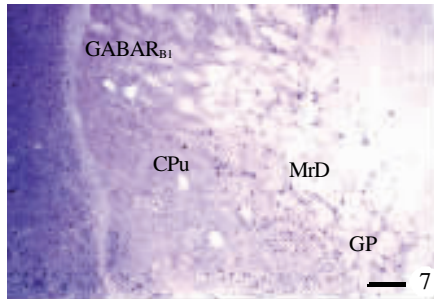


图 7 GABAR_{B1} 原位杂交阳性胞体在纹状体边缘区中的表达 标尺=50 微米

Fig.7 Expression of GABAR_{B1} cells with positive results of in situ hybridization in the marginal division of the striatum (Bar=50 微米)

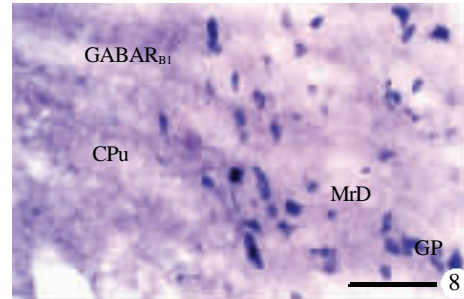


图 8 图 7 的高倍放大 标尺=50 微米

Fig.8 Magnification of Fig. 7 (Bar=50 微米)

Arrow indicates the fusiform cells positive of GABAR_{B1} demonstrated by in situ hybridization in the marginal division

3 讨论

GABA 是中枢神经系统内主要的抑制性神经递质由谷氨酸经 GAD 催化脱羧而成含有 GAD 的神经元就可以认定是 GABA 能神经元因而 GABA 和 GAD 的免疫组织化学均能显示 GABA 能神经元分布及投射 GABA 广泛分布在脑的许多部位 Bertel 等曾用 GAD 免疫组化观察到大鼠的纹状体内有中等密度的 GAD 阳性纤维分布还可见少量中等大小的 GAD 阳性细胞 Ribak 等在苍白球见到大量的 GAD 阳性纤维分布而在纹状体中则数量较少并在纹状体中观察到中等大小的圆形或卵圆形的 GAD 阳性胞体但纹状体边缘区是否有 GABA 分布尚未见报道 GAD 抗体有 65000 和 67000 两种相对分子质量 7000 的 GAD 抗体比 65000 的 GAD 敏感性较高不需秋水仙素即能显示胞体本研究采用 GABA 抗体及两种相对分子质量的 GAD(65000 及 67000) 抗体研究了 GABA 在边缘区分布结果发现纹状体中的不但有较多的 GAD 免疫阳性纤维及少量胞体同时还见到较多的 GABA 免疫阳性纤维两者的分布基本上一致 GABA 和 GAD 免疫反应阳性纤维均集中分布在尾壳核与苍白球交界处的边缘区内呈密集的带状分布首次观察到纹状体中的 GABA 能纤维主要集中分布在纹状体的边缘区中

GABA 受体的 GABAR_{B1} 免疫阳性胞体可见于基底节的各部且各部位分布的数量不同 Berthele 等用原位杂交方法研究了 GABA 受体 GABAR_{B1} 和 GABAR_{B2} mRNA 在人脑的表达在人脑纹状体中可见中等量的 GABAR_{B1} mRNA 表达 Charara 等用免

疫组化研究了猴基底节 GABAR_{B1} 的分布袁观察到 GABAR_{B1} 的分布和大鼠原位杂交的结果相似袁电镜观察证明 GABAR_{B1} 受体广泛分布在突触前和突触后部位袁控制猴基底节的突触传递遥我们在纹状体尾壳核与苍白球交界处的边缘区内观察到许多 GABAR_{B1} mRNA 阳性细胞首次证明边缘区内有较多的 GABAR_{B1} mRNA 阳性细胞的表达袁可能对边缘区的功能有重要的作用遥

GABA 对学习记忆功能有重要的作用遥 Frra 发现向扣带回注入 GABA 激动剂会损害记忆的保持袁相反使用其拮抗剂会提高记忆的保持遥 Yu 和 Getova 也发现应用 GABAR_B 受体拮抗剂治疗可明显改善小鼠的学习记忆遥 Schuler 注意到缺乏 GABAR_{B1} 受体的 Balb/c 小鼠会出现自发性癫痫尧痛觉过敏以及记忆上的损害遥这些实验表明 GABAR_{B1} 受体和学习记忆功能关系密切遥 GABAR_{B1} 受体对学习记忆的这种作用可能是通过抑制性调节实现的遥 GABAR_B 受体属与 G 蛋白偶联的受体袁分布在突触前的 GABAR_B 受体袁能阻滞钙通道袁减少钙离子内流袁减少兴奋性递质的释放袁起到突触前抑制的作用遥分布在突触后的 GABAR_B 受体袁是通过激活 G 蛋白袁调节细胞内蛋白激酶产生磷酸化作用袁而增加钾导袁产生突触后抑制效应遥我们在纹状体边缘区内观察到存在大量的 GABAR_{B1} 受体的表达袁提示抑制性氨基酸 GABA 对边缘区在学习与记忆过程中起着抑制性调控作用遥

Giorgetti 通过微透析向皮层局部给 GABAR_A 受体激动剂时袁乙酰胆碱没有增加袁然而应用 GABAR_B

受体激动剂时则会引起乙酰胆碱释放量的增加。乙酰胆碱是和记忆有关的重要递质。Abellan^等通过原位杂交观察到中缝核 5-HT 神经元中有 GABA_{B1} 受体 mRNA 表达。应用 GABA_{B1} 受体激动剂氯丁氨酸 flufen 会增加 5-HT 的释放。Castellano^等研究了内啡肽和 GABA 能药物的相互作用。认为内啡肽影响记忆的作用是通过和 GABA 机制的相互作用完成的。我们以往的工作已经证明边缘区内存在丰富的乙酰胆碱、5-HT 及内啡肽等递质。因此边缘区的神经元很可能通过 GABA_{B1} 受体来调控乙酰胆碱、5-HT 和内啡肽等递质的释放。影响边缘区的学习与记忆功能。

参考文献

- Abellan MT, Noda Y, Kameyama T. GABAergic modulation of memory with regard to passive avoidance and conditioned suppression task in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 1988, 94(1): 69-73.
- Steele PM, Mauk MD. Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength. *Neurophysiol*, 1999, 81(4): 1559-66.
- Giorgetti M, Bacciottini L, Giovannini MG, et al. Local GABAergic modulation of acetylcholine release from the cortex of freely moving rats. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(6): 1941-8.
- Abellan MT, Adella H, Honrubia MA, et al. GABA_{B1} receptors in serotonergic neurons: effect of baclofen on 5-HT output in rat brain. *Neuroreport*, 2000, 11(5): 941-5.
- Berthele A, Platzer S, Weis S, et al. Expression of GABA(B1) and GABA(B2) mRNA in the human brain. *Neuroreport*, 2001, 12(15): 3269-75.
- Shu SY, Penny GR, Peterson GM. The "marginal division": a new subdivision in the neostriatum of the rat. *J Chem Neuroanat*, 1988, 1: 147-63.
- Shu SY, Bao XM, Zhang CY, et al. A new subdivision, marginal division, in the neostriatum of the monkey brain. *Neurochem Res*, 2000, 25(2): 231-7.
- Shu SY, Bao X, Li S, et al. A new subdivision of mammalian neostriatum with functional implications to learning and memory. *J Neurosci Res*, 1999, 58(2): 242-3.
- 李胜修, 舒斯云, 包新民, 等. 海人藻酸损毁纹状体边缘区后对大鼠学习和记忆功能影响的研究. *神经解剖学杂志*, 1996, 12(1): 37-41.
- Li SX, Shu SY, Bao XM, et al. Influence on learning and memory function of the rat following kainic acid lesioning in the marginal division of the striatum. *Chin J Neuroanat*, 1996, 12(1): 37-41.
- 舒斯云, 包新民, 李胜修, 等. 脑内一个和学习记忆有关的新区的发现和初步研究. *中国基础科学*, 2001, 1(4): 10-6.
- Shu SY, Bao XM, Li SX, et al. A new area with function of learning and memory in human brain. *Chin Basic Sci*, 2001, 1(4): 10-6.
- 王虹, 舒斯云, 包新民. N-甲基-D-天门冬氨酸 2B 受体 mRNA 在纹状体边缘区的表达. *第一军医大学学报*, 2001, 21(8): 574-6.
- Wang H, Shu SY, Bao XM. Expression of NMDA2B receptor mRNA in the marginal division of rat striatum. *Fir Mil Med Univ*, 2001, 21(8): 574-6.
- 王均, 舒斯云, 包新民, 等. 海人藻酸损毁大鼠纹状体边缘区后对海马长时程增强的影响. *第一军医大学学报*, 2002, 22(2): 132-6.
- Wang J, Shu SY, Bao XM, et al. Effects of kainic acid that damages the marginal division of rat striatum on hippocampal long-term potentiation. *Fir Mil Med Univ*, 2002, 22(2): 132-6.
- Shu SY, Ju G, Fang LZ. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett*, 1988, 85(2): 169-71.
- 舒斯云, 包新民. 神经元: 细胞和分子生物学. *北京: 科学出版社*, 2001, 155.
- Oertel WH, Mugnaini E. Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci Lett*, 1984, 47(3): 233-8.
- Ribak CE, Vaughn JE, Roberts E. The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *Comp Neurol*, 1979, 187(2): 261-83.
- Charara A, Heilman TC, Levey AI, et al. Pre- and postsynaptic localization of GABA(B) receptors in the basal ganglia in monkeys. *Neuroscience*, 2000, 95(1): 127-40.
- Farr SA, Uezu K, Creonte TA, et al. Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 2000, 65(3): 363-8.
- Yu Z, Cheng G, Hu B. Mechanism of colchicine impairment on learning and memory, and protective effect of CGP36742 in mice. *Brain Res*, 1997, 750(1-2): 53-8.
- Getova DP, Bowery NG. Effects of high-affinity GABA_B receptor antagonists on active and passive avoidance responding in rodents with gamma-hydroxybutyrolactone-induced absence syndrome. *Psychopharmacology (Berl)*, 2001, 157(1): 89-95.
- Schuler V, Luscher C, Blanchet C, et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron*, 2001, 31(1): 47-58.
- Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, et al. GABA(B) is essential for G-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *J Neurosci*, 2001, 21(20): 8043-52.
- Castellano C, Introini-Collison IB, McGaugh JL. Interaction of beta-endorphin and GABAergic drugs in the regulation of memory storage. *Behav Neural Biol*, 1993, 60(2): 123-8.
- Shu SY, McGinty JF, Peterson GM. High density of zinc-containing and dynorphin B- and substance P-immunoreactive terminals in the marginal division of the rat striatum. *Brain Res Bull*, 1990, 24(2): 201-5.
- 舒斯云, 包蓉, 包新民, 等. 猴脑内一个细胞形态和免疫细胞化学反应特殊的区域 - 纹状体边缘区. *中国神经科学杂志*, 1999, 15(1): 35-9.
- Shu SY, Bao R, Bao XM, et al. Marginal division, an area with special cytoarchitecture and immunocytochemical reactivities in the striatum of the monkey brain. *Chin J Neurosci*, 1999, 15(1): 35-9.
- 张魁华, 舒斯云, 包新民. 大鼠纹状体边缘区内 5-HT_{2A} 受体的分布. *原位杂交和免疫组织化学研究*. *神经解剖学杂志*, 2000, 16(1): 33-6.
- Zhang KH, Shu SY, Bao XM. Distribution of 5-HT_{2A} receptor in marginal division of rat striatum. *In situ hybridization and immunohistochemical study*. *Chin J Neuroanat*, 2000, 16(1): 33-6.