

# 鸡基底前脑胆碱能皮质投射神经元区的 ChAT 样免疫反应神经元

陈正礼, 范光丽, 赵慧英, 邱荣斌, 王跃嗣, 白占涛

(西北农林科技大学畜牧兽医学院, 杨凌 712100)

**摘要:**应用免疫组织化学 SP 法, 对 5 只产蛋高峰期鸡基底前脑胆碱能皮质投射神经元区的 ChAT 样免疫反应神经元的分布特征进行了研究。结果发现: 从内侧隔核至 Meynert 基底核, ChAT 样免疫反应神经元呈连续性分布, 且各区神经元的密度、大小及着色强度不均。MS、NDBV/H 及旧纹体膨大部的阳性细胞分布密集, 且突起较明显; 原始旧纹体部阳性细胞分布稀疏, 突起明显。结果表明, 在鸡的基底前脑胆碱能皮质投射神经元区广泛分布着 ChAT 样免疫反应神经元, 这为鸡的基底前脑—海马投射系统积累了资料, 表明该区在鸡的学习、记忆中起着重要的调节作用。

**关键词:** 基底前脑; 胆碱乙酰转移酶; 免疫组织化学 SP 法; 鸡

**中图分类号:** Q426      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0366-6964(2002)05-0454-04

在学习、记忆机理和 Alzheimer 型老年痴呆病 (Alzheimer disease AD) 的研究中, 基底前脑胆碱能皮质投射神经元区—内侧隔核 (Medial septal nucleus, MS) 斜角带垂直部与水平部 (Nuclei of diagonal band, vertical and horizontal divisions, NDBV/H) 及 Meynert 基底核 (Nucleus basalis of Meynert, NBM) 是受到高度关注的一个区域。脑内与学习、记忆有关的皮质结构均接受该区域的投射<sup>[1]</sup>。关于这方面的研究在哺乳动物上已进行了很多, 但在禽类, 特别是鸡上却缺乏有力的证据, 同时胆碱乙酰转移酶 (Choline acetyltransferase, ChAT) 是 Ach 的合成酶及胆碱能神经的标志酶。故本文用免疫组织化学 SP 法, 观察了鸡基底前脑该区的胆碱乙酰转移酶样免疫反应产物的分布特征。

## 1 材料与方法

**1.1 组织切片准备** 产蛋高峰期尼克红母鸡 5 只。保定后打开胸腔, 暴露心脏, 经主动脉插管, 后灌注 37℃生理盐水 500 mL, 快速冲洗净血液, 再用 4℃4%多聚甲醛进行先快后慢式灌注 500 mL。取脑, 置后固定液 4%多聚甲醛中 (4℃) 固定 24h 时, 移至 20%蔗糖 PB 液中 (4℃) 至脑沉底。恒温冷冻连续

冠状切片, 厚 35 μm, 隔 3 取 2。分两套分别用于免疫组织化学、尼氏染色和对照。

**1.2 免疫组织化学 SP 法** 切片依次进行如下处理: (1) 切片经 0.01 mol/L pH7.4 PBS 液漂洗 3 次, 10 min/次; (2) 切片入过氧化物酶阻断液 (A 液) (1 滴/张切片, 下同), 室温孵育 1 h; (3) 切片入非免疫动物血清 (B 液), 室温孵育 40 min; (4) 切片入小鼠抗 ChAT 单克隆抗体 (1:200, Boehringer Mannheim GmbH, A0703), 室温 2 h 后 4℃孵育 48~72 h; (5) 切片入生物素标记的第二抗体 (C 液), 室温孵育 1.5 h; (6) 切片入链亲和素—过氧化物酶液 (D 液), 室温孵育 1.5 h。上述各步间用 PBS 液漂洗 3 次, 10 min/次。(7) 入 DAB 反应液呈色 10~30 min; (8) 双蒸水阻断反应, 30 s。后进行贴片, 晾干, 脱水, 透明, 封片, 光镜观察, 摄影拍片。

**1.3 对照试验** 用 0.01 mol/L PBS 液代替一抗, 其余步骤同上。

## 2 结果

**2.1 基底前脑有关术语** Mesulam 等<sup>[1,2]</sup> 根据部位、细胞构筑与纤维联系, 将基底前脑 MS、NDBV、NDBH 及 NBM 4 部分所含的胆碱能皮质投射神经元群依次命名为 Ch1~4。另外, NBM 为大脑半球基底白质内的一些灰质团块, 为皮质下中枢所在。它包括尾状核、豆状核 (壳和苍白球)、屏状核和杏仁核簇。而在禽类, 尾状核和壳合称旧纹体膨大, 苍白

收稿日期: 2001-04-26

基金项目: 国家自然科学基金 (39670550)

作者简介: 陈正礼 (1975-), 男, 汉, 四川简阳人, 硕士, 现主要从事神经生物学方面的研究。

球为原始旧纹体<sup>[3]</sup>(图 A)。

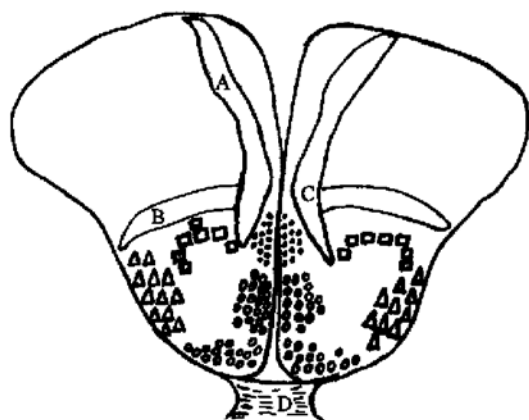


图 A 基底前脑胆碱能皮质投射神经元区分区示意图

注:A. 海马,B. 背侧板,C. 侧脑室,D. 视交叉,(·) 内侧隔核(MS), (●) Meynert 基底核(NBM)间质区,(□) 原始旧纹体(PSP),(△) 旧纹体膨大部(PSA),(○) 隔斜带核垂直部和水平部(NDBV/H)

## 2.2 MS-NDBV/H-NBM 的 ChAT-LI 神经元

从 MS 至 NBM 区, ChAT 样免疫反应(ChAT like immunoreactive, ChAT-LI)产物呈连续分布,且各区分布密度不同,蓝色微粒状免疫反应产物弥散分布于阳性神经元的胞浆,并可显示较长的突起及横切的突起。在 MS 区,ChAT-LI 神经元为小型神经元,胞体直径 5~15  $\mu\text{m}$ ,呈卵圆或梭形,细胞长轴与脑内侧面平行,有的细胞有突起,其延伸方向也与脑内侧面平行,此区阳性细胞分布较密集,染色较深。在 NDBV 区,大部分 ChAT-LI 神经元为大、中型。胞体直径 15~30  $\mu\text{m}$ ,呈卵圆形、梭形或多角形。细胞密度疏密不一,往往聚集成簇,沿脑内侧面向腹外侧倾斜延伸,形成内密外疏的两条细胞带,细胞突起明显,大部分朝向背腹纵面延伸(图 1)。在 NBDH 区 ChAT-LI 神经元的大小、形态与 NBDV 区相似,只是其细胞密度稍高,且密度呈现不均一性,为内疏外密,细胞突起也很明显,几呈水平走向(图 2)。在 NBDV/H 区,ChAT-LI 神经元染色均较深。在 NBM 区,旧纹体膨大部位于外侧和最前部,区域较大,ChAT-LI 神经元密集分布于此,为大、中型神经元,直径 15~30  $\mu\text{m}$ ,多角形,着色中等(图 3);原始旧纹体位于内侧和最后部,ChAT-LI 神经元呈向腹侧开口的“C”形分布于该区,分布稀疏,细胞直径 20~35  $\mu\text{m}$ ,着色较淡,呈苍白色(图 4)。在 NBM 区内还散在分布着一些中型阳性细胞,大多为梭形,突起明显,着色较深(图 5)。

2.3 对照试验结果 对照试验组切片为阴性。

## 3 讨论

3.1 研究结果表明,在 MS-NDBV/H-NBM 区均可见丰富的 ChAT-LI 神经元。黄耀德等<sup>[4]</sup>在猫上的试验结果与本研究结果基本一致,董新文在大鼠上所做的试验中 ChAT-LI 神经元的分布也基本呈此趋势<sup>[5]</sup>。以上的资料结合研究结果可以看出哺乳动物与鸡的基底前脑胆碱能皮质投射神经元区的 ChAT-LI 神经元的分布特点基本一致。从脑的发生上看,纹状体起源于端脑泡扩大后形成的大脑半球的腹部,大脑的新皮质和海马的古皮质都起源于纹状体上部<sup>[6]</sup>。纹状体属脊椎动物端脑的古老结构,在纹状体胆碱能神经元的 ChAT 表达中,鸟类与哺乳类的共性是系统发生上的共同之处。但是鸟类与哺乳类的最大区别在于鸟类新皮质很不发达,古皮质 海马分化不明显,这是二者在脑发育中的主要种属差异。

3.2 基底前脑发生较早,属旧皮质,其功能主要与嗅觉有关,还与学习、记忆功能有关,基底前脑胆碱能皮质投射神经元构成的基底前脑—海马胆碱能通路,参与学习、记忆过程的调节密切相关,参与长时程增强(LTP)的调节<sup>[6]</sup>。作者在鸡 MS-NDBV/H-NBM 区均发现了较高密度的 ChAT-LI 神经元,与以往在哺乳动物上所做的试验结果基本一致,同时在本研究中还在海马中发现:在海马的腹侧分布大量的带有膨体的细长 ChAT-LI 纤维;背侧为长短不一的纤维及终末,其间仅有少量 ChAT-LI 神经元。根据以往资料<sup>[7,8]</sup>指出的海马的胆碱能纤维主要是基底前脑投射的结论,结合本研究结果,认为鸡的基底前脑与海马也形成基底前脑—海马胆碱能通路,从而参与学习、记忆的调节。

3.3 在学习和记忆障碍为主要早期症状的 AD 患者脑标本发现基底前脑区有严重的神经原纤维缠结和细胞丢失,而且相关皮质内神经炎斑的多少与 NBM 细胞丢失成正相关性<sup>[9]</sup>。对这种病人的神经化学研究发现:海马和皮质利用乙酰胆碱神经元的突触前标记物明显下降<sup>[10]</sup>。最近研究证实这种病人的基底前脑区的神经元严重缺失,胆碱能神经元选择性变性<sup>[11]</sup>。而且基底前脑区的神经元缺失的百分比与海马的这种突触前标记物下降的百分比是一致的。因此认为基底前脑区的胆碱能神经元缺失与海马的这种标记物下降以及与出现的学习、记忆障碍有直接关系<sup>[11]</sup>,这些进一步证实了基底前脑—海马的胆碱能通路对学习、记忆功能起重要的作用。

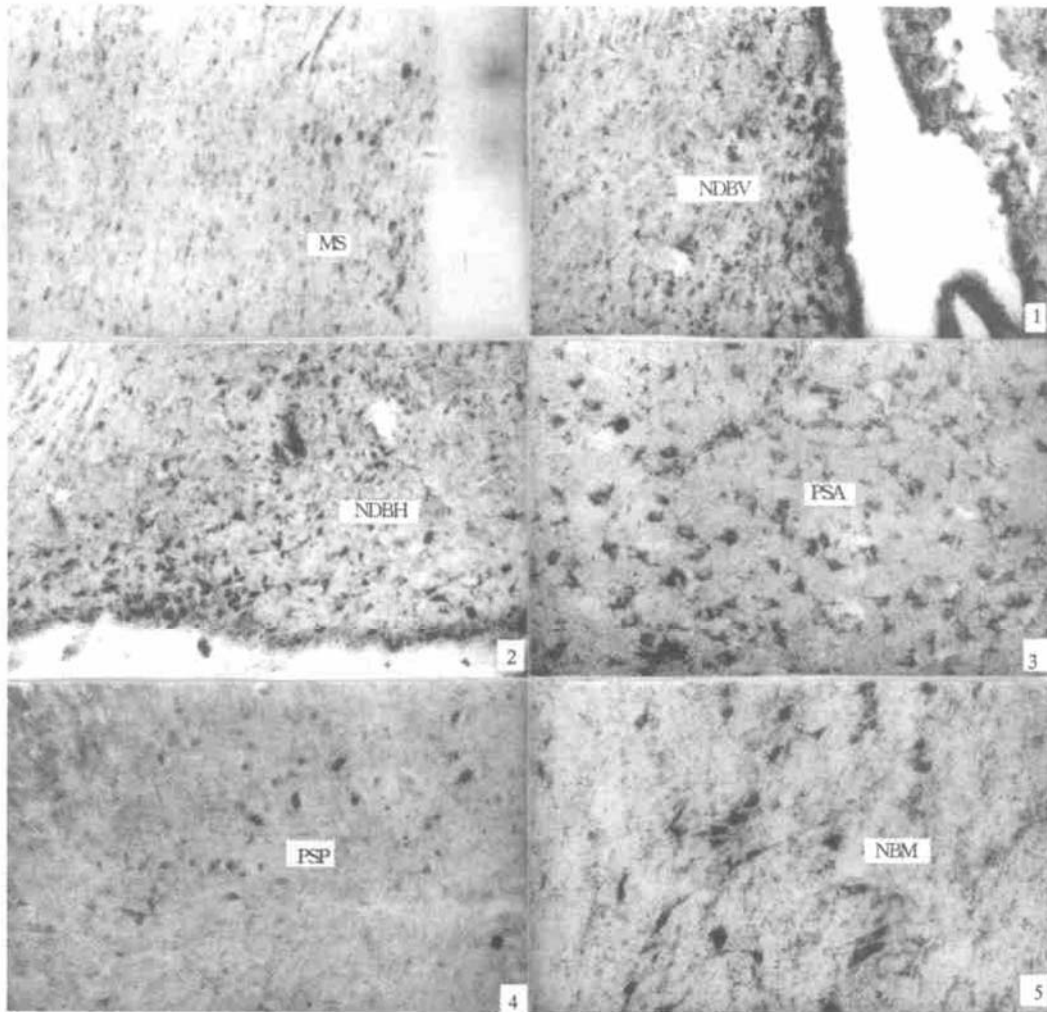


图 1 斜角带核垂直部(NDBV)ChAT-LI 神经元 10×10

图 2 斜角带核水平部(NDBH)ChAT-LI 神经元 10×10

图 3 旧纹体膨大部 ChAT-LI 神经元 10×20

图 4 原始旧纹体区 ChAT-LI 神经元 10×10

图 5 NBM 区散在的 ChAT-LI 神经元 10×20

Fig.1 ChAT-LI neurons in NDBV 10×10

Fig.2 ChAT-LI neurons in NDBH 10×10

Fig.3 ChAT-LI neurons in paleostriatum augmentatum 10×20

Fig.4 ChAT-LI neurons in paleostriatum primitivum 10×10

Fig.5 ChAT-LI neurons were scattered in NBM 10×20

#### 参考文献:

- [1] Mesulam M M, Mufson E J, Levey A I, et al. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey[J]. *J Comp Neurol*, 1983, 214: 170~ 197.
- [2] Mesulam M M, Mufson E J, Levey A I, et al. Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brain stem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry[J]. *Neuroscience*, 1984, 12: 669~ 686.
- [3] 田九畴. 畜禽神经解剖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 412.
- [4] 黄耀德, 洪秀华, 何宇红, 等. 猫基底前脑胆碱能皮质投射神经元投射区的 P 物质样免疫反应神经元[J]. *动物学研究*, 1999, 20(1): 26~ 31.
- [5] 董新文. 大鼠隔斜带复合体中含小白蛋白和胆碱乙酰化酶的神经元[J]. *解剖学报*, 1994, 25(1): 6~ 12.

- [6] 蔡文琴, 李海标. 发育神经生物学[M]. 北京科学出版社, 1999: 63~ 72.
- [7] Hirotsu I, Hori N, Katsuda N. Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices [J]. Brain Res, 1989, 482(1): 192~ 196.
- [8] 章惠英, 吴晋宝, 杨志忠, 等. 蒙古种沙土鼠背海马胆碱能投射来源[J]. 解剖学杂志, 1996, 19(5): 413~ 415.
- [9] Winkle J, Subr S T, Gage F H, et al. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory[J]. Nature, 1995, 375: 484~ 487.
- [10] Smith G. Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation[J]. Brain Res Rev, 1988, 13: 103~ 118.
- [11] Reisine T D, Yamamura H L, Bird E, et al. Pre and postsynaptic neurochemical alterations in Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 1978, 159: 477~ 481.
- [12] Whitehouse P J, Price D L, Struble R G, et al. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain[J]. Science, 1982, 215: 1237.

## Choline Acetyltransferase-Like Immunoreactive Neurons in Cholinergic Cortical Projection Neuron Areas of the Basal Forebrain in the Hen

CHEN Zheng-li, FAN Guang-li, ZHAO Hui-ying, QIU Rong-bin, WANG Yue-si, BAI Zhan-cao

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Northwest Sci-Tech

University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The distribution of cholineacetyltransferase-like immunoreactive (ChAT-LI) neurons in the basal forebrain cholinergic cortical neuron areas in the hen was studied by using the technique of immunohistochemistry SP. The results showed that a continuum of ChAT-LI neurons were distributed in the medial septal nucleus (MS), nuclei of diagonal band, vertical and horizontal divisions (NDBV/H), nucleus basalis of Meynert (NBM), but the density, size and staining of neurons in respectively areas weren't even. In MS, NDBV/H and paleostriatum augmentatum (PSA), the neurons were high density and the dendrite were obviously detected, but the neurons were sparsely distributed in the paleostriatum primitivum (PSP). The above results demonstrate that the ChAT-LI neurons were widely distributed in the basal forebrain cholinergic cortical neurons areas in the hen, which accumulate the materials for the projection system of basal forebrain to hippocampus in the hen and suggest that basal forebrain cholinergic cortical areas play an important role in modulation of the learning and memory.

**Key words:** Basal forebrain; Choline acetyltransferase; Immunohistochemistry SP; Hen

期刊名称	邮发代号	刊期	年定价(元)	编辑部地址	邮编	联系电话
辽宁畜牧兽医	8-75	双月刊	21.00	辽宁省辽阳市南环路11号	111000	0419-2303021
四川畜牧兽医	62-43	月刊	48.00	四川成都市武侯祠大街四号附1号	610041	028-85571981
畜禽业	62-184	月刊	66.00	四川省成都市人民南路4段53号嘉云台乙8A	610041	028-85252331
新疆畜牧业	58-110	季刊	10.00	新疆乌鲁木齐市新华南路23号	820001	0991-2818353
河北畜牧兽医	18-323	月刊	50.40	河北石家庄市裕华东路216号	050011	0311-6684589
广东畜牧兽医科技	自办发行	双月刊	33.00	广州市先烈东路135号	510500	020-87708158
湖北畜牧兽医	38-352	双月刊	24.00	武汉市武昌南湖	430064	027-87389001
湖南畜牧兽医	自办发行	双月刊	15.00	长沙市芙蓉区泉塘湖南省畜牧兽医研究所内	410131	0731-4615356
内蒙古畜牧科学	16-101	双月刊	30.00	呼和浩特市鄂尔多斯路内蒙古畜牧科学院	010030	0471-3958171
乳业科学与技术	自办发行	季刊	30.00	上海市彭联路101号	200072	021-36030471
甘肃畜牧兽医	54-49	双月刊	15.00	甘肃省平凉市崆峒东路143号	744000	0933-8635625
浙江畜牧兽医	自办发行	季刊	15.00	杭州市浙江大学动物科学学院转编辑部	310029	0571-86971701
江西畜牧兽医杂志	44-109	双月刊	21.00	江西省南昌市蛟桥省畜牧技术推广站内	330044	0791-3977707
吉林畜牧兽医	12-75	月刊	48.00	吉林省长春市同志街37号	130021	0431-5620754
上海畜牧兽医通讯	4-393	双月刊	30.00	上海市北翟路2901号	201106	021-62206294
内蒙古兽医	自办发行	季刊	12.00	呼和浩特市昭乌达路412号	010010	0471-4302287
山西畜牧兽医	自办发行	双月刊	21.00	太原市迎泽大街312号	030001	0351-4080460
广西畜牧兽医	48-107	双月刊	18.00	广西南宁市秀灵路75号广西大学东校园	530005	0771-3235650
安徽畜牧兽医	自办发行	双月刊	30.00	合肥市美菱大道421号	230001	0551-2619229
青海畜牧兽医杂志	56-10	双月刊	24.00	青海省畜牧兽医科学院	810003	0971-5318387
草原与草坪	54-13	季刊	16.00	甘肃省兰州市安宁区甘肃农业大学	730070	0931-7631144
肉品卫生	14-241	月刊	58.80	哈尔滨市南岗区中山路169号	150001	
黑龙江动物繁殖	14-264	季刊	14.00	哈尔滨市哈平路七公里省家畜繁育指导站内	150069	0451-6644242
贵州畜牧兽医	66-58	双月刊	27.00	贵州省贵阳市龙洞堡	550005	0851-5400593