

1 例雄性朱鹮脑内脑啡肽的免疫组织化学分布

张学博^① 黄鑫欣^① 周荔平^② 张信文^{②*} 曾少举^① 刘斌^③ 左明雪^①

(^①北京师范大学生命科学学院 北京 100875 ;^②海南师范学院生物学系 海口 571158 ;

^③北京动物园 北京 100044)

摘要 :用免疫组织化学方法研究脑啡肽(ENK)在极危物种朱鹮(*Nipponia nippon*)脑内的分布,结合计算机图像分析仪检测免疫阳性细胞和末梢的灰度值。ENK阳性细胞、纤维和终末分布如下:发声核团有原纹状体中间区腹部、丘脑背内侧核外侧部、中脑丘间核、中脑背内侧核、延髓舌下神经核。听觉中枢有丘脑卵圆核壳区、中脑背外侧核壳区、脑桥外侧丘系腹核、上橄榄核、耳蜗核等。内分泌核团有视前区前核、旧纹状体增加部、下丘脑外侧核、下丘脑腹内侧核等。结果表明,朱鹮脑内ENK可能对发声、听觉和下丘脑内分泌的生理活动有一定的调制作用。

关键词 朱鹮 脑啡肽 免疫组织化学 发声-听觉中枢 下丘脑

中图分类号 :Q955 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2006)03-37-06

The Localization of Enkephalin in the Brain of a Male *Nipponia nippon*

ZHANG Xue-Bo^① HUANG Xin-Xin^① ZHOU Li-Ping^②

ZHANG Xin-Wen^② ZENG Shao-Ju^① LIU Bin^③ ZUO Ming-Xue^①

(^① College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875 ;^② Department of Biology,

Hainan Normal University, Haikou 571158 ;^③ Beijing Zoo, Beijing 100044, China)

Abstract :The distribution of enkephalin in the brain of a male *Nipponia nippon* was investigated by using the immunohistochemical method, and the numerical value of gray density was measured by the image processing system in computer. The enkephalin labeled terminals and cells distributed in the vocal control nuclei such as archistriatum intermedium pars ventralis (AiV), dorsolateral nucleus of the anterior thalamus (DLM), the nucleus intercollicularis (ICo), nucleus dorsalis medialis (DM), pars tracheosyringalis (nXIIIts), and nucleus hypoglossus (nXII) of *N. nippon*. In the auditory center such as the nucleus ovoidalis shell (Ov shell), the shell regions of mesencephalic lateral nucleus, pars dorsalis (MLd shell), nucleus ventralis lemnisci lateralis (VLV), superior olivary nucleus (SO) and the cochlear nucleus (nCo) etc; in the endocrine nuclei such as nucleus preopticus anterior (POA), paleostriatum primitivum (PA), nucleus ventromedialis hypothalamic (VMN), and nucleus lateralis hypothalamic (LHy) etc. The results indicate that enkephalin may play an important role in the vocal, auditory and endocrine function of hypothalamus.

Key words :*Nipponia nippon*; Enkephalin; Immunohistochemical methods; Vocal-auditory centre; Hypothalamic

自1981年在陕西省洋县重新发现朱鹮(*Nipponia nippon*)以来,目前已对这一世界极危物种的数量分布、种群动态与生态习性、生长发育与行为、人工繁殖及保护等濒危状况进行了大量的研究,但对其生理和解剖的研究较少^[1,2],对其脑的结构等国内外尚无报道。脑啡

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.30460042,30370472,30370196,30360030);

*通讯作者,E-mail:zhangxw2844@sina.com;

第一作者介绍 张学博,女,研究方向:脑与动物行为的神经调控机制。

收稿日期 2005-08-08,修回日期 2006-03-07

肽(met-enkephalin, ENK)是一种神经肽,因其为内源性类吗啡样物质,有镇痛和引起欣快感的作用,而受到神经化学领域的关注^[3]。本文在上述研究基础之上,采用免疫组织化学方法并结合计算机图像仪分析,对 ENK 在朱鹮脑内的分布进行了观察和灰度值分析,旨在为进一步研究 ENK 在发声-听觉通路、旁听觉通路与下丘脑控制生殖行为和相关功能中的作用及其调控机制提供形态学基础,也为进一步了解朱鹮这一极危物种提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料 朱鹮(♂)全脑由北京动物园(意外死亡 1 只)赠送,脑用于 ENK 免疫组织化学实验和焦油紫染色。ABC 复合物(Avidin-Biotin-Complex)为美国 Vector 公司产品,用 1:200, 0.03%的 Triton X-100 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液稀释;ENK 免疫组织化学试剂用 1:200 的兔(鸡)抗脑啡肽(met-ENK)血清(美国 Inastar Co 产品)。计算机图像分析系统为美国 SPOT-II (Spot digital camera:Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI)产品,分析软件为 Image Pro Analysis Software (Media Cybernetics, L. P., Silver Spring, Maryland)产品。

1.2 ENK-免疫组织化学方法 取朱鹮脑,浸入 4%多聚甲醛中固定和保存,再浸入 30%蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(4℃)中过夜,矢状冰冻切片(40 μm),切片分成 12 套,收集于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)内。其中 4 套作脑啡肽免疫组织化学反应,2 套作焦油紫染色,6 套备用。ENK 免疫组织化学染色方法如下(1)将切片置于 1:200 的兔(鸡)抗 ENK 血清中于室温下孵育 3 h;(2)Biotin 标记的羊抗兔 IgG 血清 1:200 室温孵育 2 h;(3)ABC 复合物内结合 2~3 h;(4)DAB(0.05%)和 H₂O₂(0.03%)内呈色 25 min。切片贴于涂有明胶的载片上,经脱水透明、封片。另 2 套切片作焦油紫染色,用以定位 ENK 免疫阳性神经纤维、终末或细胞在脑中的分布区域。朱鹮核团的定位和命名参考鸽脑立体定位图谱^[4]及张信文等以前的工

作^[5-6]。对照实验用正常牛血清代替一抗或省略 ENK 一抗,结果为阴性。

1.3 ENK 免疫阳性物质的灰度值分析 用计算机图像分析系统检测 ENK 免疫阳性神经细胞和纤维标记的平均灰度值。每套各取 5~8 张切片,每张切片测定 8~10 个左右 ENK 阳性神经细胞的胞体平均灰度值,取平均值,神经纤维和末梢取每张切片着色均匀的标记部位进行测量,每一区域连测两次,取平均值。灰度是指半透明介质光强度的指标,灰度值分为 0~256 个等级,值越小,免疫组织化学染色反应阳性产物表达越强,值越大,表达越弱。

2 结果

以计算机图像分析仪测定朱鹮二组切片 ENK 免疫阳性产物的灰度值,归纳成表 1。

2.1 ENK 在端脑的分布 在朱鹮的原纹状体中间区腹部(archistriatum intermedium pars ventralis, AiV)内有许多 ENK 免疫阳性神经细胞(图版 I:1),AiV 位于大脑半球中部腹侧边缘。在视前区前核(nucleus preopticus anterior, POA)有 ENK 免疫阳性神经细胞和终末分布(图版 I:2)。在旧纹状体增加部(paleostriatum primitivum, PA)内有许多散在分布的 ENK 神经细胞(图版 I:3),PA 背方以 LMD 为界,两侧紧邻中隔和原纹状体。

2.2 ENK 在间脑内的分布 在朱鹮的丘脑背外侧核内侧部(dorsolateral nucleus of the anterior thalamus, DLM)内有大量的 ENK 免疫阳性细胞,胞体呈椭圆形(图版 I:4)。在丘脑卵圆核壳(the nucleus ovoidalis shell, Ov shell)有许多 ENK 免疫阳性神经终末和纤维包绕 Ov 形成壳式结构(图版 I:5),但在 Ov 核中几乎没有标记存在。Ov 位于丘脑背中部,核团呈卵圆形,体积较大(图版 I:5)。在下丘脑外侧区(nucleus lateralis hypothalamic, LH_y)内有许多 ENK 免疫阳性细胞(图版 I:6)。LH_y 位于下丘脑的腹外侧。在下丘脑腹内侧核(nucleus ventromedialis hypothalamic, VMN)有许多 ENK 免疫阳性细胞(图版 I:7),位于下丘脑的腹部,核团界限不很

清晰。

2.3 ENK 在中脑内的分布 在朱鹮的中脑丘间核 (the nucleus intercollicularis, ICo) 中有一些 ENK 免疫阳性细胞和终末, 标记胞体主要分布在中脑背外侧核 (mesencephalicus lateralis, pars dorsalis, MLd) 和中脑背内侧核 (nucleus dorsalis medialis, DM) 之间的交界处 (图版 I : 8), ICo 在中脑侧脑室下方, 为一较大的梭形核团, 标记纤维分布在 ICo 和 MLd 周围区的喙侧和尾侧 (图版 I : 8)。朱鹮有密集的 ENK 免疫阳性神经终末充满 DM (图版 I : 8 : 9), DM 呈椭圆形, 正中纵切面积约 0.64 mm^2 (图版 I : 9)。在 MLd 壳上同时出现了许多标记细胞、终末与纤维, 在 MLd 核中几乎没有阳性标记的存在 (图版 I : 10)。MLd 位于中脑侧脑室下方的半环隆区中央, 形似椭圆形。

2.4 ENK 在脑桥内的分布 在朱鹮的脑桥外侧丘系腹核 (nucleus ventralis lemnisci lateralis,

VLV) 及周围有散在分布的 ENK 阳性神经终末与纤维 (图版 I : 11), 它位于脑桥的腹外侧, 核团呈椭圆形。在脑桥上橄榄核 (superior olivary nucleus, SO) 有 ENK 的免疫阳性细胞 (图版 I : 12)。SO 呈橄榄球形, 位于脑桥尾部的腹侧缘, 正中纵切面积为 0.69 mm^2 。

2.5 ENK 在延髓内的分布 在朱鹮的延髓耳蜗核 (the cochlear nuclei, nCo) 有 ENK 免疫阳性神经终末 (图版 I : 13), nCo 位于延髓的背侧, 第四脑室的内腹侧, 正中纵切面积约 1.09 mm^2 。在听神经 (NVII) 有一些纤维。在延髓舌下神经核 (nucleus hypoglossin, XII) 和舌下神经 (NXII) 内有许多 ENK 标记神经终末和纤维 (图版 I : 14, 15), nXII 位于延髓的背内侧, 核团呈不规则形, 正中纵切面积约 1.26 mm^2 , 灰度值分析 ENK 免疫标记神经纤维浓重 (图版 I : 14, 表 1)。

表 1 朱鹮脑内 ENK 免疫阳性物质的部分灰度值

Table 1 The density of the ENK positive substances in the brain of *Nipponia nippon*

核团名称 Names of nuclei	灰度值 Density
原纹状体中间区腹部 archistriatum intermedium pars ventralis, AiV	153.1 ± 18.1
视前区前核 nucleus preopticus anterior, POA	154.8 ± 28.3
丘脑背外侧核内侧部 dorsolateral nucleus of the anterior thalamus, DLM	132.6 ± 12.4
丘脑卵圆核壳 the nucleus ovoidalis shell, Ov shell	183.2 ± 13.6
下丘脑外侧区 nucleus lateralis hypothalamic, LH _y	171.7 ± 17.4
下丘脑腹内侧核 nucleus ventromedialis hypothalamic, VMN	174.2 ± 19.9
中脑丘间核 the nucleus intercollicularis, ICo	151.9 ± 22.4
中脑背外侧核壳 mesencephalicus lateralis, pars dorsalis shell, MLd shell	189.3 ± 24.5
中脑背内侧核 nucleus dorsalis medialis, DM	108.6 ± 10.9
脑桥外侧丘系腹核 nucleus ventralis lemnisci lateralis, VLV	127.9 ± 20.3
脑桥上橄榄核 superior olivary nucleus, SO	139.2 ± 14.3
延髓耳蜗核 the cochlear nuclei, nCo	91.5 ± 19.6
舌下神经 hypoglossus, NXII	160.1 ± 15.4
延髓舌下神经核 nucleus hypoglossin, XII	172.8 ± 17.2

3 讨论

现已证明 ENK 是脑内的神经调质, 是小分子五肽的阿片肽家族之一, 它可以抑制多种神经递质的释放, 以调节痛觉、发育、生殖等多个系统的生理功能^[3]。本实验结果表明, ENK 在朱鹮脑中的发声控制系统、听觉通路旁通路

和生殖内分泌相关的核团中都有广泛分布。

3.1 ENK 在发声控制系统中的分布 已知鸟类的鸣叫由脑内集中发育的神经核团所控制, 家鸽的直接发声控制通路由端脑的 AiV → DM → nXII, 然后支配气管鸣管肌^[5, 7]。本实验证明 ENK 广泛分布于朱鹮发声控制系统, 但是分布不均匀, 在 AiV → DM → nXII 脑区富含 ENK 胞体

及纤维,在发声相关中枢 DLM 和 IC_o 有浓密的标记,ENK 在发声中枢的广泛分布,提示 ENK 可能在发声控制中具有一定的生理作用。

3.2 ENK 在听觉通路和旁通路中的分布 鸟类的听觉通路主要由 nCo→SO→VLV→MLd→Ov→L 听区等组成^[4,7,8],此外还存在一条平行于听觉通路的旁听觉通路,主要由中脑 MLd 壳、IC_o、丘脑 Ov 壳和端脑的新纹状体旁听区等组成^[9]。本实验结果表明,在朱鹀的听觉通路、旁听通路有关的核团内有集中分布的 ENK 阳性反应产物,如在听神经、nCo、脑桥的 SO、VLV、MLd 壳、IC_o、Ov 壳等。但在听觉通路的主要中继核团 MLd、Ov 核中几乎没有标记的存在,而在旁听觉通路 MLd 壳、Ov 壳有浓密的标记,这些结构都参与听觉中继的生理反应^[9]。ENK 仅分布在旁听觉通路 MLd、Ov 等核团的壳上,提示 ENK 在旁听觉通路中可能起更多的调制作用,也提示听觉通路和旁听觉通路可能是两条不同功能的神经回路,这些工作有待于进一步深入研究。

3.3 ENK 在发声-听觉和生殖内分泌中的共存关系 鸟类的发声、听觉和生殖内分泌系统之间有密切的联系,已知鸟类与生殖内分泌有关的脑区包括视前区前核(POA)、PA 和下丘脑的各个亚核,如下丘脑外侧核(LHy)、下丘脑腹内侧核(VMN),这些脑区广泛参与了生殖活动有关的各种复杂行为的调控,如求偶炫耀、交配和生殖活动的完成^[9]。发声行为受听觉系统的反馈作用^[10,11],发声高位中枢接受听觉高位中枢 L 区的传入投射,从脑桥、中脑和间脑形成旁听觉通路与下丘脑的 VMN、LHy 和 POA 有直接的神经联系,以此组成了听觉-发声-内分泌下丘脑轴系统^[9,12]。实验结果表明,在发声-听觉通路、旁听觉通路和下丘脑控制生殖行为的内分泌核团等内均有 ENK 免疫阳性神经细胞或纤维分布,提示 ENK 可能对鸟类发声-听觉-内分泌下丘脑轴系统的生理活动有一定的调制功能。

本文对朱鹀脑的结构及 ENK 的分布作了初步研究,由于朱鹀是极濒危物种,实验例数仅

有 1 例,但上述结果是把朱鹀脑切片分成 12 套,其中 4 套作脑啡肽免疫组织化学反应,这对于朱鹀脑内 ENK 的定位分布有一定的重复证明。本文为进一步研究 ENK 在发声-听觉通路、旁听觉通路及下丘脑控制生殖行为和相关功能中的作用与调控机制提供形态学基础,也为进一步了解朱鹀脑功能提供了基础资料。

参 考 文 献

- [1] 范光丽,吴建云,马新武.朱鹀的前后肢比较解剖学观察. *动物医学进展*,1999,20(2):34~37.
- [2] Yamasina Y, Nakanishi G. *Nipponia nippon*. Tokyo: Newton Books, 1983, 3~21.
- [3] Durand S E, Liang W, Brauth S E. Methionine enkephalin immunoreactivity in the brain of the bundgerigar (melopsittacus): Similarities and differences with respect to oscine songbirds. *J Comp Neurol*, 1998, 393(2):145~168.
- [4] Karten H J, Hodós W. A Stereotaxic Atlas of the Pigeon. (*Columba livia*). Baltimore: Johns Hopkins Press, 1967, 174~187.
- [5] 张信文,蓝书成.家鸽、黄雀和黄喉鹀耳蜗核的定位与比较. *动物学报*, 1994, 40(1):51~57.
- [6] 张信文,蓝书成.黄雀古纹状体核的中枢联系——HRP 法研究. *解剖学报*, 1994, 25(1):20~26.
- [7] Veenman C L, Wild J M, Reiner A. Organization of the avian "corticostriatal" projection system: A retrograde and anterograde pathway tracing study in pigeons. *Comp Neurol*, 1995, 354(1):87~102.
- [8] 张信文,蓝书成.黄雀、黄喉鹀角状核和层状核的听觉通路及比较. *动物学报*, 1994, 40(4):390~398.
- [9] Cheng M F, Zuo M X. Proposed pathway for vocal self-stimulation: Met-enkephalinergic projections linking the midbrain vocal nucleus, auditory responsive thalamic regions and neurosecretory hypothalamus. *J Neurobiol*, 1994, 5:361~372.
- [10] Vates G E, Broome B M, Mello C V, et al. Auditory pathways of caudal telencephalon and their relation to the song system of adult male zebra finches (*Taenopygia guttata*). *Comp Neuro*, 1996, 366(5):613~642.
- [11] Vates W, Vicario D S, Nottebohm F. Reafferent thalamo "Cortical" loops in the song system of oscine songbirds. *J Comp Neurol*, 1997, 380:275~290.
- [12] 张信文,蓝书成.黄雀上纹状体腹侧尾核的中枢联系——HRP 法研究. *解剖学报*, 1993, 24(4):381~390.

图 版 说 明

1. AiV 内的 ENK 标记细胞 $\times 800$; 2. POA 内的 ENK 标记细胞 $\times 800$; 3. PA 内的 ENK 标记细胞 $\times 200$; 4. DLM 内的 ENK 标记细胞 $\times 100$; 5. Ov 壳内的 ENK 标记终末和纤维 $\times 400$; 6. LHy 内的 ENK 标记细胞 $\times 600$; 7. VMN 内的 ENK 标记细胞 $\times 600$; 8. ICo 和 DM 内的 ENK 标记细胞、终末 $\times 100$; 9. DM 内的 ENK 标记终末 $\times 300$; 10. MLd 壳内的 ENK 标记细胞、终末 $\times 200$; 11. VLV 内的 ENK 标记终末 $\times 40$; 12. SO 内的 ENK 标记细胞 $\times 200$; 13. nCo 内的 ENK 标记终末 $\times 200$; 14. nXII 内的 ENK 标记细胞和终末 $\times 100$; 15. NXII 内的 ENK 标记纤维 $\times 200$ 。

Explanation of Plate

1. Neurons labeled by ENK in AiV $\times 800$; 2. Neurons labeled by ENK in POA $\times 800$; 3. Neurons labeled by ENK in PA $\times 200$; 4. Neurons labeled by ENK in DLM $\times 100$; 5. Neurons and terminals labeled by ENK in Ov shell in *Carduelis spinus* $\times 80$. 6. Neurons labeled by ENK in LHy $\times 600$; 7. neurons labeled by ENK in VMN $\times 600$; 8. Neurons labeled by ENK in ICo and DM $\times 100$; 9. Neurons and terminals labeled by ENK in the DM $\times 600$; 10. Neurons and terminals labeled by ENK in MLd $\times 200$; 11. Neurons and terminals labeled by ENK in the VLV $\times 200$; 12. Neurons labeled by ENK in SO $\times 200$; 13. Neurons and terminals labeled by ENK in the nCo $\times 200$; 14. Neurons and terminals labeled by ENK in nXII $\times 100$; 15. Neurons and fibers labeled by ENK in the NXII $\times 200$.

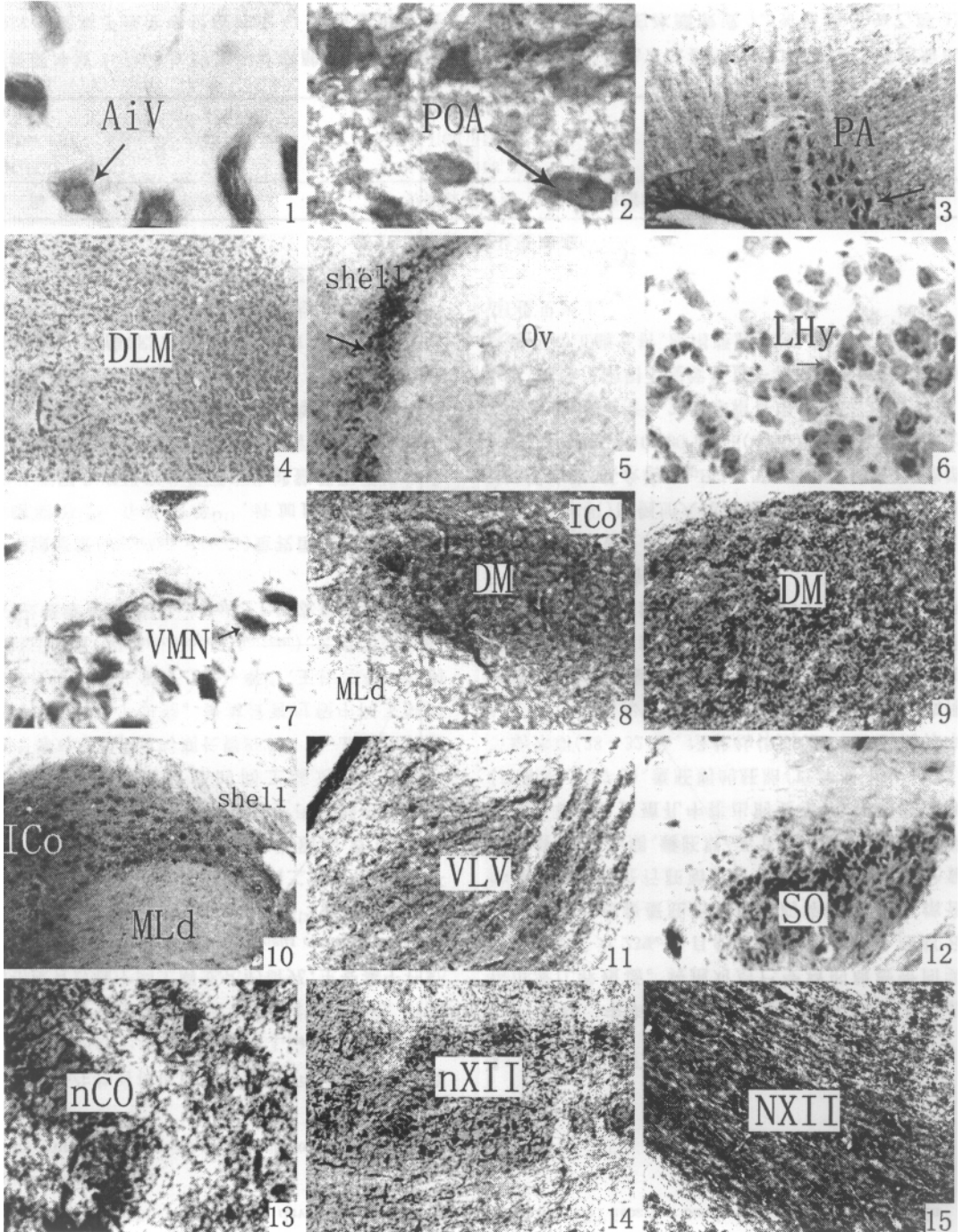
张学博等：1 例雄性朱鹮脑内脑啡肽的免疫组织化学分布

图版 I

ZHANG Xue-Bo *et al.* :The Localization of Enkephalin in the Brain of a Male

Nipponia nippon

Plate I



图版说明见文后