DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.003
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0885-04

论著

大鼠生后伏膈核细胞形态的发育变化

赵妍君[1],王宗华[2],刘应兵[1],阴正勤[2],王仕军[2] ([1]四川大学华西基础医学与法医学院生理学教研室,成都 610041;[2]第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠生后伏膈核细胞形态的发育变化规律。方法 选取出生后1个月内不同时期的大鼠,分别进行尼氏染色和免疫组化染色,借助于计算机辅助图像分析系统,测量不同组别大鼠伏膈核的细胞密度、细胞直径并比较树突的发育特征。结果 细胞直径随年龄呈增长趋势,至出生后30 d(PD30)已基本接近成年水平。细胞密度在出生后0~15 d(PD0~PD15)呈下降趋势,之后基本不再变化。在发育过程中,主树突、次级树突和末梢树突的数目不断增多,树突棘密度显著增高。结论 出生后一段时期内伏膈核细胞在形态上仍要经过一个不断成熟和完善的过程,不同发育阶段其形态差异非常显著,这一特征对理解伏膈核的发育具有重要意义。

关键词:伏膈核;发育;形态学;大鼠
中图法分类号:R322.81;R329.24;R339.3 文献标识码:A

Morphological changes of rat nucleus accumbens neurons during postnatal development

ZHAO Yan-jun, WANG Zong-hua, LIU Ying-bing, YIN Zheng-qin, WANG Shi-jun (Department of Physiology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To explore the morphological features of nucleus accumbens (NAC) cells in rats during postnatal development. Methods The morphological changes of NAC cells on different postnatal days were studies by Nissl's and immunohistochemical stainings. Cellular diameters, cell densities and dendrite branches were measured and compared with image analyzing system. Results Cellular densities were decreased significantly with age before postnatal day 15 (PD15), and cellular diameters increased during the whole postnatal period, and after PD15 were close to the level of the adult. The marked morphological differences during postnatal development were further confirmed by the dramatic increase of the amount of primary, secondary and terminal dendrites and spines. Conclusion The results provide morphologically critical period of development in postnatal NAC.

Key words: nucleus accumbens; development; morphology; rats

伏膈核(Nucleus accumbens, NAC)是腹侧纹状体的主要构成部分,作为边缘系统和锥体外运动系统的分界面,它在行为、动机、奖赏和毒品成瘾中起重要作用,并与多种神经精神性疾病的发生有密切关系,已经受到神经科学界越来越多的关注,研究还表明,这类疾病的发生与NAC等脑结构的发育紊乱密切相关[1]。为探讨NAC的发育变化规律,本研究从形态学角度对出生后一个月内大鼠NAC进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康Wistar大鼠,雌雄不限共41只。出生日定为生后0 d (Postnatal day 0, PD0)。尼氏染色取PD0、PD5、PD10、PD15、PD20、PD25及PD30共7组,每组3只。免疫组化染色取PD5、PD10、PD20及PD30共4组,每组5只。

1.2 方法

在腹腔内注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)的麻醉状态下开胸,先以100 ml生理盐水经左心室快速冲净血液,再用50~100 ml含4%多聚甲醛的0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.4)灌注固定1 h。开颅取脑,修整脑组织块,移入含30%蔗糖的上述新鲜固定液中(4 ℃)待其沉底。用恒冷箱切片机做冠状冷冻切片,片厚35 μm。切片直接裱于涂有蛋白甘油的载玻片上,室温干燥,10%甲苯胺蓝染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Olympus AH3显微镜观察并照相。参考Paxinos和Watson大鼠脑立体定位图谱[2],以前联合、新纹状体、膈区和脑室为标志对伏膈核进行定位。利用计算机辅助图像分析系统(Southern Micro System, USA)随机选取细胞测量细胞直径,计算细胞密度(选取标本的同一部位、大小相同的3个视野进行计数)。

应用振动切片机冠状切面上将伏膈核切成300 μm的薄片,在利用盲法膜片钳技术寻找细胞的过程中,通过记录电极向细胞内注入0.5% biocytin(生物胞素,Sigma, USA)观察神经元的形态[3],染色20 min后,缓慢旋出电极,将脑片转移至固定液中(含4%多聚甲醛,15%饱和苦味酸,0.01 mol/L磷酸缓冲液,pH=7.4),置于4 ℃冰箱中过夜,次日用0.01 mol/L磷酸缓冲液(PBS)漂洗5 min×3次,然后移入0.1%Triton X-100(Sigma, USA)孵育1 h(37 ℃),置于HRP-Streptavidin复合物(S-P试剂盒,福州迈新公司)中孵育2 h,0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次,DAB显色,裱片,晾干,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下寻找细胞并照相,计数主树突、次级数突和末稍数突分支(20×或40×物镜),在远端树突上随机选取一定的长度定性评估树突棘密度[4](油镜100×)。

1.3 统计学处理

应用SPSS统计软件进行统计处理。结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用单因素方差分析进行多个样本均数间的两两比较。

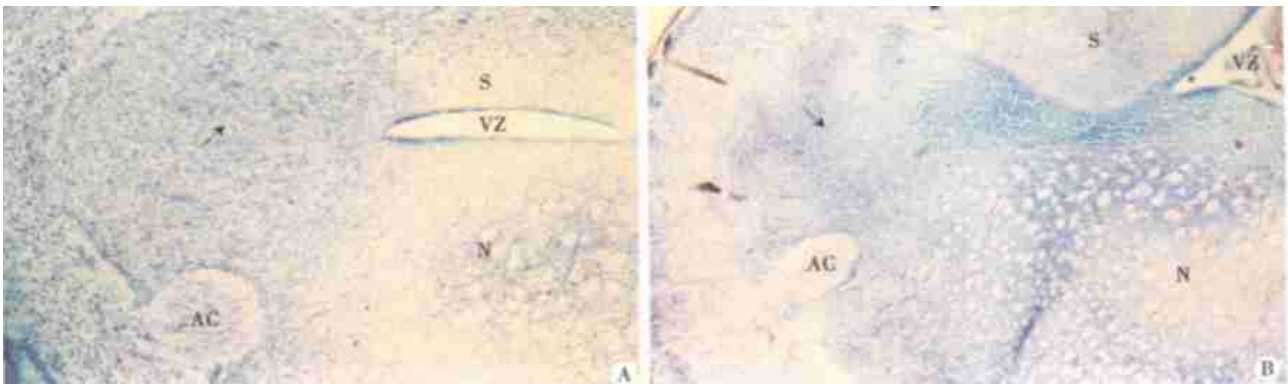
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070254)
作者简介:赵妍君(1977-),女,河南省南阳市人,硕士研究生,助教,主要从事神经发育方面的研究。电话:(023)68754000-73153
收稿日期:2002-03-21;修回日期:2002-06-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 伏膈核形态的发育变化

随着日龄的增长，同一冠状切面上伏膈核的面积和形态相应发生变化，面积逐渐增大，整个核团的形态变化大致要经过卵圆形、圆形和不规则形，同时，与其周围标记物的相对位置也随之变化，见图 1。



Note the different areas and shapes in A and B; AC: Anterior commissure; N: Neostriatum; S: Septum; VZ: Ventricle zone; Arrow: NAC

图 1 PD15(A)和 PD0(B)的伏膈核 (冠状面，尼氏染色×40)

Fig 1 NACs from PD15 (A) and PD0 (B) (Coronal section, Nissl's stain× 40)

2.2 细胞密度与细胞直径的变化趋势

细胞密度在 PD0～PD15 呈下降趋势，PD15 之后达到相对稳定水平，见表 1，图 3。细胞直径随年龄呈增长趋势，相邻两组之间均有显著性差异，见表 1，图 4。

表 1 PD0～PD30 大鼠伏膈核细胞直径(n=86)和密度(n=63)($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Cellular diameter of cells (n=86) and density (n=63) of NAC from PD0—PD30 rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	Cellular diameter(μm)	Cellular density(number/mm²)
PD0	4.11±0.55	221.22±27.91
PD5	6.63±0.94★★	192.00±14.80※
PD10	8.64±0.37★★	160.78±37.53※
PD15	10.38±0.76★★	131.33±42.24※
PD20	12.10±1.18★★	127.00±26.70
PD25	12.93±0.48★	129.56±26.38
PD30	15.67±1.67★★	141.67±22.43

★: $P<0.05$, ★★: $P<0.01$; ※: $P<0.05$ *vs* neighbour group

2.3 细胞形态随发育的变化特征

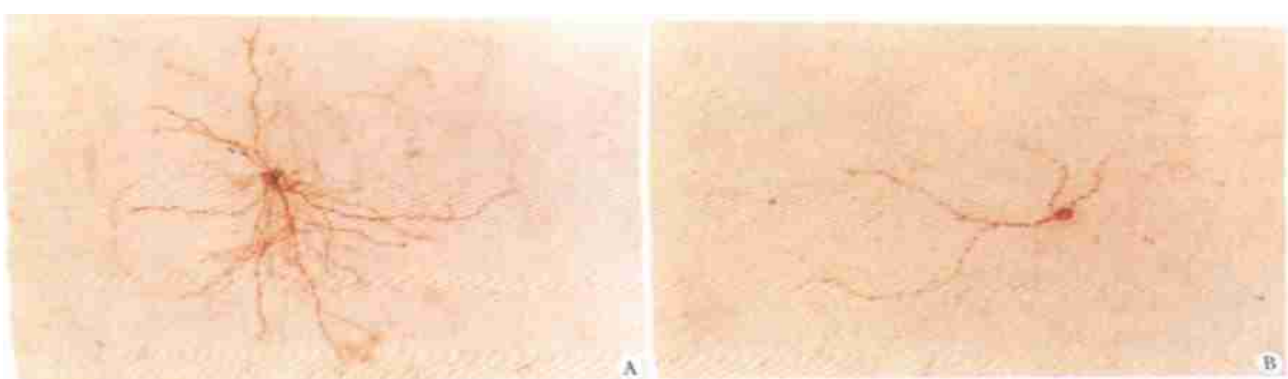
伏膈核神经元的胞体呈圆形、椭圆形或多边形。随着日龄的增长，主树突、次级树突和末稍树突分支均明显增多，见表 2，图 2A，B。定性的观察表明树突棘的变化也非常明显，PD5～PD10 神经元树突上无或几乎无树突棘，PD10～PD20 开始出现，PD20 之后几乎所有的神经元树突上都具有树突棘，树突棘的分布具有一定的规律，在靠近胞体的树突干上一般无树突棘，而在第一级分支之后密度增高。在树突上有时尚可观察到膨体或串珠样物质。

表 2 PD5～PD30 大鼠伏膈核神经元树突的形态学特性($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Morphological properties of dendrites of NAC neurons at PD5—PD30 in rats($\bar{x}\pm s$)

Group	n	number of primary dendrites	number of secondary dendrites	number of terminals
PD5	10	1.8±1.0	2.1±1.2	2.0±1.3
PD10	11	2.5±0.7	4.2±1.7☆	8.1±2.8☆
PD20	11	3.6±0.5☆	5.8±1.4☆	14.8±2.6☆
PD30	8	4.4±0.7☆	8.4±1.5☆	22.1±3.0☆

☆: $P<0.05$, ☆☆: $P<0.01$ *vs* neighbour group



Note the difference in dendrite branches and spines in A and B

图 2 PD30(A)和 PD5(B)大鼠的伏膈核神经元 (S-P×200)

Fig 2 NAC neurons from PD15(A) and PD5(B) rats (S-P× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

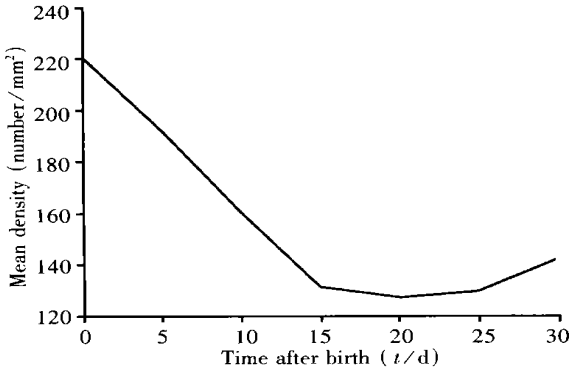


图 3　细胞密度随日龄的变化

Fig 3　Changes of cellular densities along with postnatal days

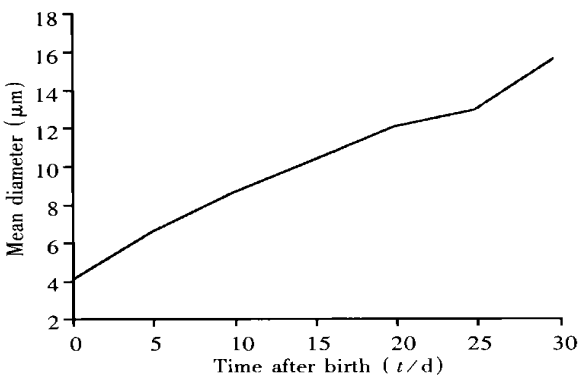


图 4　细胞直径随日龄的变化

Fig 4　Changes of cellular diameters along with postnatal days

3　讨论

大鼠神经系统的许多区域在出生后尚未发育成熟, 其形态和功能仍需经过一定时间才能达到成年水平。本实验通过测量细胞密度和细胞直径以及对神经元树突形态的研究探讨伏膈核的发育特征。结果表明在出生后 1 个月内细胞密度和直径均具有显著的发育规律, 细胞密度在 PD15 之前显著下降, 来自新纹状体的研究提示幼年和成年新纹状体的细胞数目基本保持不变[5], 但因其体积的不断增大使细胞密度随年龄增长不断下降。细胞直径至 PD30 时已经达到成年水平[6]。因此, 在整个发育过程中, 基于出生后神经元的数目相对恒定这一前提下, 我们不难发现这些因素之间的相互联系, 即随着细胞直径的增长, 细胞体积增大, 整个伏膈核体积增大, 导致细胞密度的下降。

成年伏膈核神经元的特征是具有小到中等大小的胞体, 树突上分布着大量的树突棘, 被称为 MS (Medium spiny) 神经元[6], 它是伏膈核神经元的主要构成部分, 约占伏膈核神经元总数的 95%。我们利用 biocytin 标记的细胞内染色表明, 幼年大鼠伏膈核神经元形态学上与成年存在着显著差异, 除胞体直径不断增长外, 树突分支增多, 以末稍树突的增多最为明显, 远端树突上出现树突棘, 在发育过程中, 有时尚可观察到曲张体或串珠样物质, 类似的报道也见于新纹状体, 新纹状体内绝大多数的神经元也是 MS 神经元, 对幼年大鼠新纹状体 MS 神经元的研究表明在生后最初 3 周内[5,7], 随着来自皮层等的兴奋性输入纤维的不断长入, 树突棘的密度相应增加, 形成大量的轴突－树突棘突触, 提示幼稚与成熟神经元的输入输出整合不同。

相应的电生理学研究也表明在生后 2～3 周尤其是第 1 周内 NAC 神经元的静息膜电位和输入阻抗都要发生显著性变化[8]。静息膜电位和输入阻抗是生理学上评估神经元成熟度的重要指标, 它们从功能上反映了神经元的成熟状态。Liu 等[3] 依据细胞膜输入阻抗对出生后一个月内的细胞发育成熟度进行划分, 发现海马齿状回颗粒细胞的电生理学成熟度和形态学成熟度之间密切相关, 即高输入阻抗神经元的胞体较小, 树突分枝短粗、稀疏, 多见于幼年动物; 低输入阻抗神经元细胞胞体较大, 树突分枝多、长、丛密, 见于较为成熟的动物。这些研究表明神经元形态和功能的成熟是紧密相关的。形态结构的正常发育是维持正常的生理功能的必要前提, 在发育过程中, 随着神经元形态的成熟其功能也在不断成熟和完善。

伏膈核作为边缘和锥体外运动系统的分界面, 是边缘和锥体外运动系统的整合中枢, 接受皮层、丘脑、海马、杏仁体和腹侧背盖区等广泛的纤维输入, 在伏膈核整合后发出的轴突主要投射至苍白球。伏膈核等边缘脑结构的发育紊乱是导致诸如精神分裂症等神经精神性疾病的关键环节, 结构发育紊乱导致了功能发育障碍[9], 因此, 临床和实验研究都试图从神经发育的关键期对此类疾病进行研究和治疗, 然而, 对脑发育的研究毕竟是一个刚刚起步的新领域, 对伏膈核的发育研究更为缺乏, 本实验从形态学角度对大鼠伏膈核发育的一些基本特征进行初步探讨, 为进一步研究伏膈核的发育奠定基础, 同时又可以为临床寻找有利的治疗时机提供理论参考。

参考文献:

[1] Weinberger D R, Lipska B K. Cortical maldevelopment, anti-psychotic drugs and schizophrenia: a search for common ground[J]. Schizophr Bull, 1995, 16(2): 87－110.

[2] Paxinos G, Watson C. The rat brain atlas in stereotaxic co-ordinates(2nd ed.)[J]. Orlando, FL: Academic, 1986.

[3] Liu Y B, Peter A L, Pasternak J F, *et al*. Developmental changes in membrane properties and postsynaptic currents of granule cells in rat dentate gyrus[J]. J Neurophysiol, 1996, 76(2): 1 074－1 088.

[4] Meredith G E, Agolia R, Arts M P M. Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus accumbens of the rat

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[J]. Neurosci, 1992, 50(1): 149—162.

[5] Sharpe N A, Tepper J M. Postnatal development of excitatory synaptic input to the rat neostriatum: an electron microscopic study[J]. Neurosci, 1998, 84(4): 1 163—1 175.

[6] O' Donnell P, Grace A A. Physiological and morphological properties of accumbens core and shell neurons recorded *in vitro*[J]. Synapse, 1993, 13(2): 135—160.

[7] Tepper J M, Sharp N A, Koos T A, *et al*. Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light-and electron-microscopic studies [J]. Dev Neurosci, 1998, 20(2—3): 125—145.

[8] Belleau M L, Richard A W. Postnatal development of electrophysiological properties of nucleus accumbens neurons[J]. J Neurophysiol, 2000, 84(5): 2 204—2 216.

[9] Al Amin H A, Shannon W C, Weinberger D R, *et al*. Delayed onset of enhanced MK-801-induced motor hyperactivity after neonatal lesions of the rat ventral hippocampus[J]. Biol Psychiatry, 2001, 49(6): 528—539.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)08-0888-02

448 例乙肝标志物不同模式血清循环免疫复合物的检测及临床意义

Detection of circulating immune complexes in different mode of hepatitis B marker and its clinical significance

姚 磊，周长邵，张 征，余明芳 （第三军医大学附属新桥医院检验科，重庆 400037）

循环免疫复合物（Circulating immune complexes, CIC）的检测，对各种免疫损伤引起的疾病诊治十分重要，对病毒性肝炎，特别是乙型肝炎发病机制的研究及其诊断、治疗、预后判断更是实验室比较重要的指标。本实验检测了乙肝病毒标志物不同模式的血清 CIC 的含量，现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床标本来源

均为本院住院及门诊病人血清标本，共 611 例。其中以 5 项指标全部阴性者为对照组。

1.2 HBV 标志物检测

采用 ELISA 法，试剂盒由上海科华公司提供。

1.3 循环免疫复合物检测

采用 PEG 一酚试剂显色法[1]

1.4 统计学处理

采用各组间均数 t 检验在计算机上进行统计学处理，以 $P<0.05$ 表示差异显著，$P<0.01$ 表示差异非常显著，两组率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

不同乙肝病毒标志物模式的血清 CIC 含量的变化见表 1，其中以 163 例 5 项全部阴性的病人血清 CIC 的含量作为对照组。以测定组 $\bar{x}+2s\geqslant 7.25$ 为阳性阈值。

表 1 HBV 标志物不同模式 CIC 结果（$\bar{x}\pm s$）

	HbsAg	抗 HBs	HBeAg	抗 Hbe	抗 HBc	n	$\bar{x}\pm s$	阳性数	阳性率%
A	+	−	+	−	+	31	7.73±3.58*	14	45.2
B	+	−	−	+	+	134	6.84±2.19*	58	43.3
C	+	−	−	−	+	37	8.14±2.19**	18	48.6
D	−	+	−	−	−	66	5.76±3.11	16	27.2
E	−	−	−	+	+	89	6.28±2.27*	35	39.3
F	−	+	−	−	+	36	5.13±3.31	10	27.8
G	−	+	−	+	+	32	5.65±2.41	8	25.0
H	−	+	−	+	−	23	4.91±1.87	3	13.0
I	−	−	−	−	−	163	4.57±1.34	21	12.8

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ 与 I 组相比

3 讨论

有研究资料表明 HBV 感染时所出现的系统性表现与免疫复合物造成的组织损伤有着密切关系，如多发性结节性动脉炎，血清病样症候群，肾小球肾炎等[2]，因此 CIC 的检测对研究肝炎发病机制有重要意义。

本实验结果显示 HBsAg 合并其它乙肝病毒抗原或抗体阳性组及抗 HBe、抗 HBc 阳性组患者血清 CIC 含量较对照组显著升高。这几种模式均提示 HBV 的增殖复制，而 HBV 的增殖往往会激活机体免疫应答，进而使机体产生的抗原与抗体形成免疫复合物，导致 CIC 含量增高，文献[3]报道，CIC 阳性的乙型肝炎患者往往提示处于活动状态，IC 形成与肝病的活动性有一定联系，至于肝脏功能损害是否由 IC 沉着所致，因缺乏病理活检资料，故难以定论。我们认为，HBsAg 阳性的乙肝患者，一方面由于病毒持续存在或自身抗原的刺激使免疫应答持续进行，IC 大量形成，另一方面，肝脏功能损害，肝脏 kupffer 细胞清除 CIC 的能力降低，这两方面可能导致是 CIC 含量升高的主要原因，而CIC的肝脏外沉着往往引起被沉着的组织器官免疫病理损

（下转 891 页）

作者简介：姚 磊（1968— ），男，河南省南阳市人，博士研究生，主治医师，讲师，主要从事临床检验方面的研究，发表论文 19 篇。电话：（023）68755637

收稿日期：2001-09-15；修回日期：2002-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net