

白腰文鸟嗅叶 X 区的神经回路与 P 物质的免疫组化定位*

张信文^① 曾少举^② 李佳^② 马骏^② 杨利^② 左明雪^{②**}

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

摘要:用双向神经示踪剂生物素结合的葡聚糖胺和 SP-免疫组织化学方法研究白腰文鸟发声学习中枢嗅叶 X 区的神经投射和 P 物质在发声中枢及相关核团内的分布。结果表明: X 区接受发声与听觉整合中枢上纹状体腹侧尾核(HVC)以及中脑 AVT 的传入投射,由 X 区发出的神经纤维投射到丘脑外侧核内侧部(DLM)。在 HVC、DLM、新纹状体前部巨细胞核和发声控制中枢古纹状核内有许多的 SP-免疫阳性神经细胞,在 X 区、中脑背内侧核和延髓舌下神经核等有大量的 SP-免疫阳性神经纤维或终末等。提示 P 物质可能在发声中枢内起重要的生理作用。

关键词:嗅叶 X 区;发声中枢;神经回路;P 物质;白腰文鸟

中图分类号:Q42 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2003)03-29-04

Nerve Circuit of Area X and Immunohistochemical Localization of Substance P in *Lonchura striata swinhoei*

ZHANG Xin-Wen^① ZENG Shao-Ju^② LI Jia^② MA Jun^② YANG Li^② ZUO Ming-Xue^②

(^①Department of Biology, Hainan Normal College, Haikou 571158;

^②College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: The neural tracer biotinylated dextran amine (BDA) and immunohistochemical methods were used to study neuronal connections in area X of the lobus and the expression of substance P in the striated mannikin. The results indicate that area X receives projections from the high vocal control center (HVC) and ventral area of Tsai (AVT). It projects to the dorsolateral nucleus of the anterior thalamus (DLM). The substance P labeled fibers and neurons were distributed in the area X, the HVC, the DLM, the magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (MAN), robus archistriatum (RA), the nucleus dorsalis medialis (DM), the nucleus hypoglossi and the pars tracheosyringalis (nXIIIts). The substance P in the vocal control center may play an important role.

Key words: Area X; Vocal centre; Nerve circuit; Substance P; *Lonchura striata swinhoei*

鸟类的鸣声是传递信息的主要方式,包括个体识别、求偶或觅食,这对生存和繁衍有着重要的作用。鸣禽的鸣啭能力是通过后天学习而获得的^[1],这与人类幼儿学习会话的过程相似但简单得多^[2],故此将鸣禽作为研究语言机理的动物模型是可行的^[3]。发声受脑内各级发声中枢的控制,已知端脑上纹状体腹侧尾核

(HVC)是发声控制的高位中枢,嗅叶 X 区是发

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39960014, 30060027),教育部、海南省骨干教师基金资助项目;

** 通讯作者;

第一作者介绍 张信文,男,45岁,教授,硕士;研究方向:鸟类生理学;E-mail: zhangxw2844@sina.com。

收稿日期:2002-07-10,修回日期:2003-02-10

声学习与记忆的重要中枢^[4], 损毁了 HVC 后失去了正常的鸣啭能力, 损毁了 X 区后失去了学习鸣啭的功能^[5,6]。但至今对发声控制及相关功能的产生机制及参与这些功能的调控物质尚不清楚。P 物质作为脑内一种重要的神经调质, 已证明广泛分布于哺乳动物的中枢神经系统和外周内, 并在机体的生理活动中起着重要的功能^[7,8]。但对鸣禽发声控制及相关核团内 P 物质的分布尚未见详细报道。为此, 作者用 BDA 双向示踪方法并结合 SP-免疫组织化学方法, 研究了白腰文鸟华南亚种 (*Lonchura striata swinhoei*) X 区的神经投射及 SP-免疫阳性神经细胞或纤维在发声控制及相关核团中的定位, 旨在为进一步研究 P 物质在发声控制和相关功能中的作用及其调控机制提供形态学基础。

1 材料与与方法

1.1 神经投射双向示踪法 选用成年白腰文鸟 12 只(♂ 8, ♀ 4), 体重 12~17 g, 用 10% 氨基甲酸乙酯胸大肌麻醉(1 ml/100 g)后, 将其固定在鸟头立体定位仪上, 参照金丝雀脑立体定位图谱^[9]和张信文等以前的工作^[10,11], 用微玻璃管(尖端外径 40 μm)将 5% 0.02 μl 的 BDA(biotinylated dextran amine)(Sigma)溶液, 经四道压力程控显微注射仪(美国 Bio Probes, PM 2000B-Z)注入 X 区内。术后动物存活 4 d, 在深度麻醉下经左心室灌流生理盐水 80 ml、固定液(含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.4) 100 ml, 取脑后浸入 30% 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中, 4℃ 过夜, 切制 40 μm 的脑矢状冰冻切片, 隔片取一, 经 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤后, 直接置 ABC 复合物 4℃ 孵育 12 h, 经 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液漂洗(pH 7.4)。DAB-nickel 成色反应, 光镜观察。

1.2 SP-免疫组织化学方法 选用成年白腰文鸟 8 只(♂ 4, ♀ 4), 10% 氨基甲酸乙酯深度麻醉动物, 开胸经左心室灌流生理盐水 100 ml 冲洗血液, 再用 150 ml 含 0.2% 戊二醛、4% 多聚甲醛和 0.2% 苦味酸的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.2)灌注 15 min。灌毕立即取脑, 浸入 4%

多聚甲醛中固定 4~8 h, 在 30% 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液内 4℃ 过夜。切制 40 μm 矢状冰冻切片, 收集于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)内, P 物质免疫组织化学染色: 切片置 1:200 的抗 P 物质血清中室温下放置 3 h; Biotin 标记的羊抗兔 IgG 血清 1:200 室温孵育 2 h; ABC 复合物内结合 2~3 h; DAB (0.05%) 和 H₂O₂ (0.03%) 内呈色 25 min。然后将切片贴于涂有明胶的载片上, 脱水透明, 加拿大中性树脂封片。另一套切片做焦油紫染色, 用于定位 P 物质免疫阳性神经纤维、终末和细胞在发声中枢内的分布区域。白腰文鸟核团的定位和命名以金丝雀脑立体定位图谱^[9]和张信文等的工作为依据^[10,11]。对照实验用正常牛血清代替一抗或省略 SP 一抗。

2 结果

2.1 X 区的神经纤维联系 选 12 例压力注射部位准确的动物作观察, 图版 I:1 为 X 区注射 BDA 的注射中心, BDA 注射范围基本上局限于 X 区内。双向标记物可见于以下区域:(1)在发声控制的高位中枢上纹状体腹侧尾核(HVC)有大量密集的标记神经元, HVC 位于新皮层下方, 核团呈梭形(图版 I:2), HVC 投射到 X 区的神经元是多突起, 分支较长的多极神经元(图版 I:3);(2)在同侧中脑 AVT 内见到大量的标记神经元(图版 I:4);(3)在丘脑背外侧核的内侧部(DLM)内有密集的标记终末(图版 I:5)。

2.2 SP-免疫阳性神经细胞或纤维在发声中枢和相关核团内的分布 选 8 例动物作 SP-免疫组织化学结果观察, 可见 SP-免疫阳性反应产物分布于:(1)在 X 区内有许多的 SP-免疫阳性神经纤维, 终末及少量的神经细胞(图版 I:6);(2)在 HVC 内有较多的 SP-免疫阳性神经细胞(图版 I:7);(3)在丘脑 DLM 内有大量的 SP-免疫阳性神经细胞和终末(图版 I:8);(4)在新纹状体 MAN 中有许多的 SP-免疫阳性神经细胞(图版 I:9);(5)在古纹状体核(RA)中有许多的 SP-免疫阳性神经细胞(图版 I:10);(6)在发声控制中枢中脑背内侧核(DM)内有密集的 SP-

免疫阳性神经纤维和终末(图版 I:11);(7)在延髓舌下神经核气管鸣管部(nXIIIts)有较密集的 SP-免疫阳性神经纤维和终末(图版 I:12)。

3 讨论

3.1 嗅叶 X 区的神经回路 本实验 BDA 双向示踪结果表明,由 X 区发出的神经纤维投射到间脑 DLM 核团,X 区接受发声控制的高位中枢 HVC 的传入投射。作者以前的研究表明,由发声学习中枢新纹状体前部巨细胞核的内侧部(mMAN)投射到 HVC,由 DLM 发出的神经纤维投射到新纹状体前部巨细胞核外侧部(LMAN)^[10],由 LMAN 再发出神经纤维投射到发声控制的主要运动中枢古纹状体核核(RA),由 RA 支配延髓舌下神经核气管鸣管部(nXIIIts),然后支配鸣肌的运动^[11]。作者最近的工作表明,损毁了白腰文鸟的 X 区或 MAN,实验鸟失去了学习鸣啭的能力。损毁了 HVC 或 RA,实验鸟失去了正常鸣啭的功能。而 HVC 接受内侧 MAN 的传入投射,由此组成一条 mMAN→HVC→X 区→DLM→LMAN→RA 的发声学习的神经回路。

3.2 发声中枢及相关核团内 SP-免疫组化定位 在哺乳动物中已证实了 P 物质作为速激肽家族,是由 11 个氨基酸组成的神经调质,广泛分布于中枢神经系统 and 外周内,并具有多种重要的生理功能^[7,8,12]。本实验结果表明,许多的 P 物质免疫阳性神经纤维、终末和神经细胞分布在发声学习中枢嗅叶 X 区,在发声中枢及相关核团 HVC、MAN、DLM、RA、DM、nXIIIts 也有许多的 P 物质免疫阳性神经细胞或终末,但在发声中枢的其它邻近脑区均很少见有丰富的 P 物质免疫阳性反应产物。提示 P 物质在发声中枢

及相关核团内可能起某种重要的生理作用。

参 考 文 献

- [1] Catchpole C K, Slater P J. Bird Song. UK: Cambridge University Press, 1995. 69 ~ 129.
- [2] Doupe A J, Kuhl P K. Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. *Annu Rev Neurosci*, 1999, 22: 567 ~ 631.
- [3] Brainard M S, Doupe A J. Auditory feedback in learning and maintenance of vocal behaviour. *Nat Rev Neurosci*, 2000, 1(1): 31 ~ 40.
- [4] Airey D C, Kroodsmas D E, Devoogd T J. Differences in the complexity of song tutoring cause in the amount learned and in dendritic spine density in a songbird telencephalic song control nucleus. *Neurobiol Learn Mem*, 2000, 73: 274 ~ 281.
- [5] Nottebohm F, Alvarez-Buylla A, Cynx J, et al. Song learning in birds: the relation between perception and production. *Phil Trans R Soc (Lond) B*, 1990, 329(1): 115 ~ 123.
- [6] Burt J M, Lent K L, Beecher M D. Lesions of the anterior forebrain song control pathway in female canaries affect song perception in an operant task. *J Neurobiol Mar*, 2000, 42(4): 487 ~ 499.
- [7] Nakanishi S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci*, 1991, 14(1): 123 ~ 126.
- [8] Otsuka Y K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev*, 1993, 73(2): 229 ~ 308.
- [9] Stokes T C, Leonard C M, Nottebohm F. The telencephalon, diencephalon and mesencephalon of the canary, *serinus canarius*, in the stereotaxic coordinates. *J Comp Neurol*, 1974, 156(2): 337 ~ 374.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Liu S J, Ju G. Substance P-link immunoreactive nerve fibers in the pars distalis of the adenohypophys is of macaque monkeys. *Neurosci Lett*, 1998, 94: 1 ~ 4.

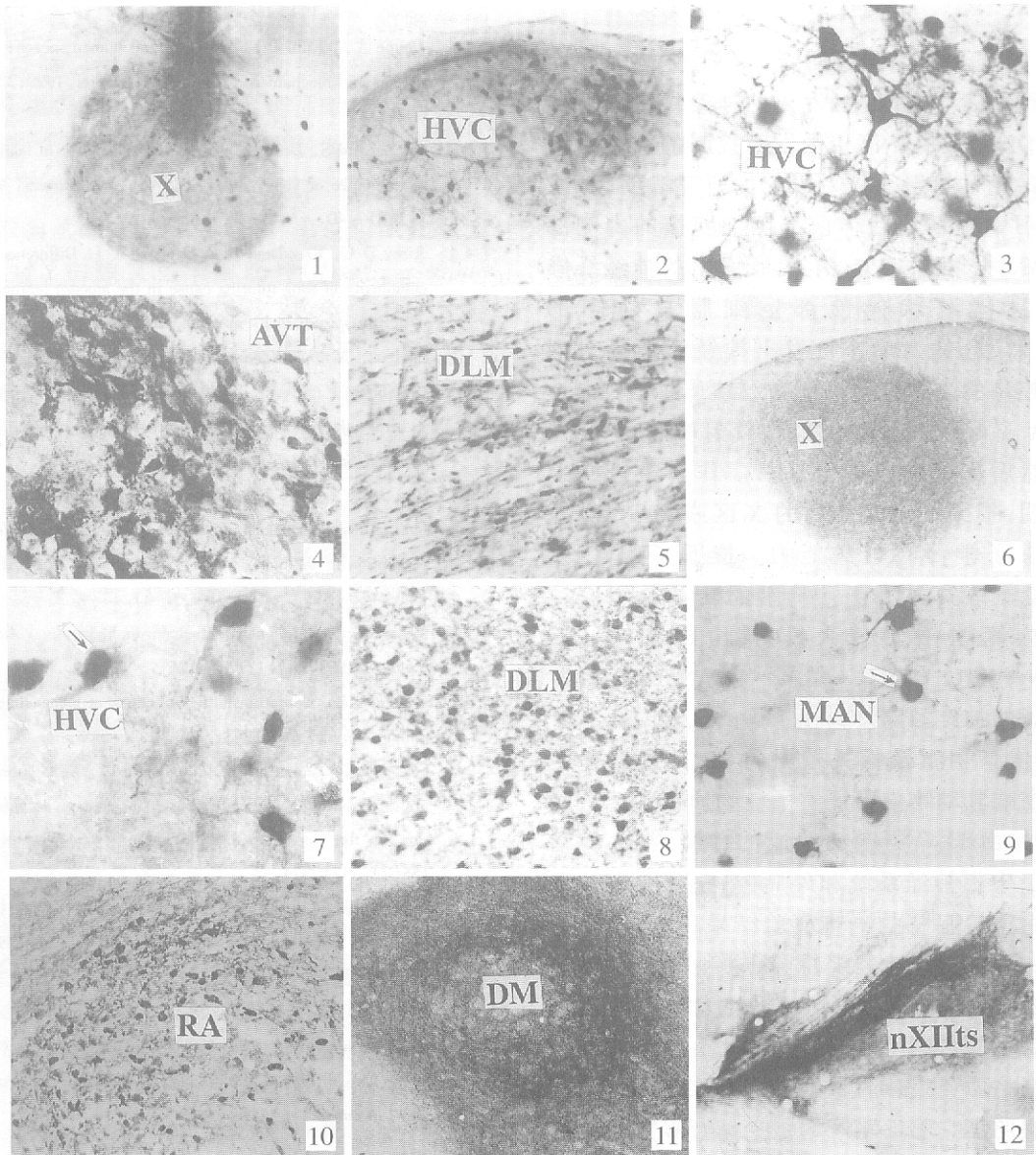
张信文等:白腰文鸟嗅叶 X 区的神经回路与 P 物质的免疫组化定位

图版 I

ZHANG Xin-Wen *et al.*: Nerve Circuit of Area X and Immunohistochemical Localization

of Substance P in *Lonchura striata swinhoei*

Plate I



1. 1例白腰文鸟一侧X区注入BDA后的ABC法显示的注射中心 ×40; 2. 上纹状体腹侧尾核(HVC)内的标记神经细胞 ×40; 3. HVC内多突起的标记神经细胞的形态 ×400; 4. AVT内多突起的标记神经细胞 ×400; 5. DLM内的神经纤维和终末 ×400; 6. X区内SP-免疫阳性神经纤维和少量的神经细胞 ×40; 7. HVC内的SP-免疫阳性神经细胞 ×400; 8. DLM内SP-免疫阳性神经细胞和神经纤维 ×150; 9. MAN内的SP-免疫阳性神经细胞 ×400; 10. RA内的SP-免疫阳性神经细胞 ×150; 11. DM内的神经纤维和终末 ×150; 12. nXIIIts内的神经纤维和终末 ×150