

# 锡嘴雀延脑发声中枢注入 HRP 对上位脑细胞标记的研究\*

曾庆华 蓝书成

(东北师范大学生物系, 长春, 130024)

**摘要** 在雌、雄锡嘴雀 (*Coccythraustes coccythraustes*) 的延脑发声中枢中间核 (Intermedius nucleus, IM), 注入辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP), 标记上位脑控制发声核团有原纹状体粗核 (Nucleus robustus archistriatalis, RA) 和背中核 (Nucleus dorsalis medialis, DM)。其中 RA 双侧被标记, 并有明显的左侧优势, 特别是在雄性鸟中这种优势更为突出。

近年来, 有些学者<sup>[5,6,8,10]</sup>对鸟类与发声有关的脑神经核团进行了一定的研究。蓝书成在 1958、1962 年刺激了鸟类中脑引起鸣叫及植物性反应<sup>[2]</sup>, 又用锡嘴雀的气管鸣管支 (Tracheosyringeal, ts) 浸泡 HRP 24—48 小时后, 主要在 IM 核获得标记细胞证明控制锡嘴雀的 IM 核是延脑控制发声的主要核团<sup>[1]</sup>。但还未见有锡嘴雀 IM 核与上位脑发声中枢及各中枢间的联系等问题的报道。在锡嘴雀延脑发声核 IM 注入 HRP 继续追踪在中脑和大脑内发声相关核团的标记。

## 材料和方法

本实验选用成年锡嘴雀 36 只 (♂19、♀17) 用氨基甲酸己酯 1 克/公斤麻醉后, 将头固定在鸟头固定仪上, 参照 Stokes (1974) 金丝鸟脑图谱定位, 微玻璃管尖端吸入 40% 浓度的 HRP 溶液 (Sigma V1 HRP 溶解在 0.1 mol/L pH 8.3 的 Tris-HCl 缓冲液中)<sup>[4]</sup> 0.05 μl 分别注入 IM 核 (雄 15, 雌 13。左 15, 右 13), 通过调节电子步进器可准确地控制注入 HRP 的量和速度。注射点均在 IM 中心, 注射的 HRP 扩散均未超出 IM 范围 (见图 1)。动物存活 39—48 小时, 颈动脉灌注, 其中生理盐水 42℃, 80 ml, 固定液 (1.25% 戊二醛, 1% 多聚甲醛 pH 7.4

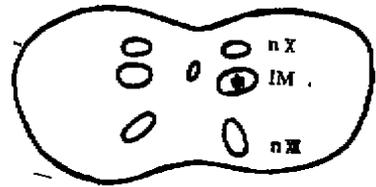


图1 HRP 在 IM 内的扩散范围 黑点示 HRP nX: 第 10 代脑神经核; nXI: 第 12 代脑神经核

的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液) 4℃, 80 ml, 然后剥去颅顶骨用基础平面切割仪<sup>[3]</sup>将脑切成冠状基础平面, 取脑在固定液中固定 4—8 小时后, 移入 20% 蔗糖磷酸液置 4℃ 冰箱过夜。然后做冰冻切片, 隔片取 1, 片厚 40—50 μm, 按 TMB<sup>[7]</sup> 反应, 明视野显微镜观察标记细胞并用测微尺测量标记核团大小。用金属微电极刺激 RA、DM 核, 引起发声反应后迅速将动物作颈动脉灌注, 固定, 冰冻切片, 明视野下观察到电极在 RA、DM 核的中心位置。电极尖端直径 6—10 μm, 电阻 1.2—1.5 兆欧。

## 结 果

(一) RA 的形态及定位 在 36 只动物 (雄 15 只, 雌 13 只。左 15 只, 右 13 只) 的 IM

\* 中国科学院科学基金资助的课题 (1986)

表 1 HRP 标记部位与数量

动物组号	每组例数	性别	IM	存活时间	标记部位与数量			
					RA		DM	
					左	右	左	右
1	8	♂	左	48	100	20	10	
2	7	♂	右	48	90	30	5	
3	7	♀	左	48	60	30	10	
4	6	♀	右	48	30	20	5	

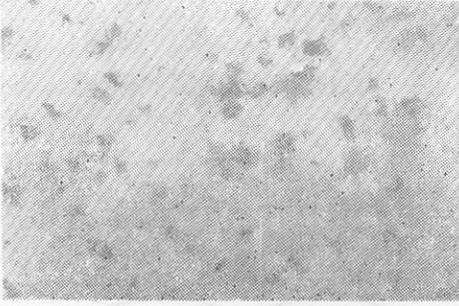


图 2 RA 核标记细胞

核中心位置 (P3, L0.8, H7) 注入 0.05  $\mu$ l 的 HRP 后,均在大脑原纹状体腹部内侧出现数量不等,形态和分布相同的 HRP 标记细胞(表 1)。被标记的 RA 核在横切面上呈椭圆形(图 2)。标记的前后范围长约 1 mm,宽约 0.8 mm,细胞的直径约 10—12  $\mu$ m,形态多样,有半月形、多极形和锥形。细胞排列不十分紧密。

参考 Stokes (1974) 金丝鸟图谱认为是 RA 核(图 3)。标记的细胞数量在♂和♀间、左右侧之间有明显的差异。在雄性锡嘴雀左侧 IM 核注入 HRP 后,左侧 RA 被标记细胞平均 100 个,右侧 20 个,左右约 5:1。在雄性右侧 IM 注入 HRP 后,左侧 RA 被标记细胞 90 个,右侧 30 个,左右约 3:1。在雌鸟左右侧 IM 分别注入 HRP 后,左侧标记的细胞多于右侧。

(二) DM 的形态及定位 在 IM 注入 HRP 后, RA 获标记细胞,同时 DM 核也获得标记细胞。DM 核位于中脑 ICO 核团内侧(见图 3),被标记的细胞约 8—10 个,细胞的形状呈多极形,平均直径 8—9  $\mu$ m,细胞分布较松散。DM 的长约 0.8 mm,宽约 0.7 mm,标记的特点为同侧性。ICO 其它部分无标记。

(三) 电刺激 RA, DM 引起动物发声 用金属微电极刺激鸟的 RA 核时,引起动物发声反应。当刺激波宽 0.1 ms,频率 100 次/秒,强度 4V 时,动物开始肌紧张,羽毛略蓬松,呼吸加快,但不发声。当强度增至 5V 时,动物开始鸣叫。叫的音量和时间随强度增加而增大和延长,增至 9V 时,音量不再增大。当鸟的两侧大脑被切除后,再刺激中脑 DM 核,波宽、频率同上,强度 4V—6V 时仍有发声反应。

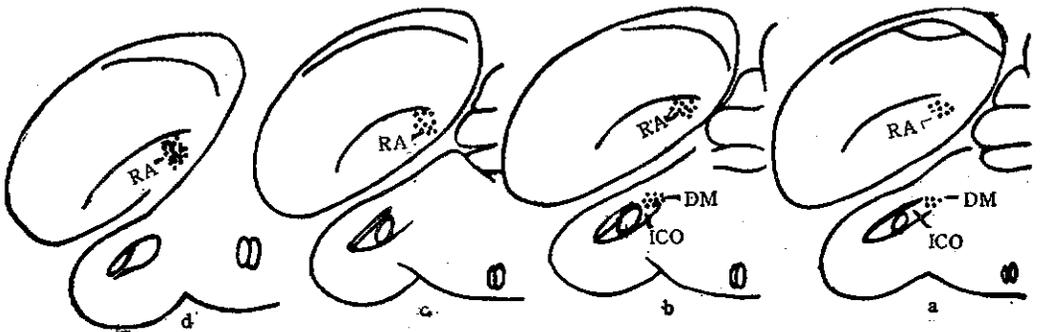


图 3 表示 HRP 注入 IM 核后,在 RA、DM 核获标记示意图。图中黑点表示标记细胞 ICO: 丘脑内核。每个横切面代表前后 200  $\mu$ m

## 讨 论

(一) 发声有关核团的探讨 根据实验结果,控制锡嘴雀发声的有关核团初步归纳有

RA, DM, IM。关于 RA 形态分布众说不一。Paton 1982<sup>[13]</sup> 在鸚鵡脑内确定 RA 核是并行于原纹状体背部边缘,并有许多松散的团块,在 RA 核团中平均有 20 个细胞。本实验表明 RA

核位于原纹状体腹部边缘内侧, 被标记的核团呈长椭圆形, 在雄性左侧 RA 标记细胞平均 100 个。锡嘴雀具有鸣啭的机能, 可能与发声核团 RA 发达有关。Nottebohm 1982 用金丝鸟从 RA 注入腺嘌呤核苷酸和 HRP 时, 在 ICO 中标记最强的是 DM 核。在 IM 核注入 HRP 后, 也只在 DM 核获标记, 与 Nottebohm 结果一致。

**(二) 发声的左侧优势** 发声控制中左侧优势在多种鸣禽鸟中已得到证实。<sup>[7,10-12]</sup>但是, 这种优势究竟出现在传导通路中的哪一级水平也众说不一。Nottebohm 等人提出左侧优势存在于 IM 核至外周神经间, 而 Paton 1980 认为鸣禽鸟的鸣管鸣肌仅接受单侧 IM 核控制。本实验表明左侧优势主要存在于 RA 与 IM 通路中。因为在 IM 左右侧分别注入 HRP 后, RA 标记都是左侧多于右侧。

**(三) 发声通路的投射方式** 由 RA 发出的纤维向 IM 投射和 ICO 向 IM 投射的方式有不同论点。Nottebohm 1976, 1982 报道金丝鸟控制发声的中枢及神经通路中认为从 RA 发出纤维向 IM 投射是同侧性的, ICO 向 IM 投射是双侧性的。IM 被注入 HRP 后, 双侧 RA, 同侧 DM 被标记。表明从 RA 向 IM 投射是双侧性, ICO 向 IM 投射是同侧性。这可

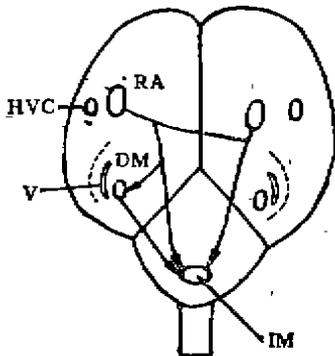


图 4 表示控制锡嘴雀发声的神经通路模拟简图

能是种属间实际差异 (见图 4)。关于 RA 到 IM 双侧投射经由的路线和方式, 在我们正在进行的实验中证明, 由 RA 发出的纤维中脑后束向下投射到丘脑段时, 又分出一束纤维横跨前联合中线。进入对侧中脑后束汇合投射到 UIM 核。

## 参 考 文 献

- [1] 凌长英等 1988 控制锡嘴雀、鸽发声的延髓运动神经核团的定位和比较 动物学报 34 (4): 358—363.
- [2] 蓝书成 1958 刺激鸟类中脑引起鸣叫及植物性反应的研究. 生理学报 22 (1): 22—27.
- [3] 蓝书成等 1985 切制鸟脑切片的基础平面定位及定位仪的制作. 东北师大学报自然科学版 1: 91—95.
- [4] 鞠躬等 1985 神经解剖学方法. 第一版 人民卫生出版社
- [5] Bottjer S. W. and A. P. Arnold 1982 afferent neurons in the hypoglossal nerve of the Zebra Finch (*Poephila guttata*) localization with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 210: 190—197.
- [6] Chen J. and M. F. Cheng 1980 motor control of vocal behaviour in ring doves (*Streptopelia risoria*). *Neurosci. Abstr.* 6: 75.
- [7] Lemon R. E. 1973 nervous control of the syrinx in whitethroated sparrows (*Zonotrichia albicollis*). *J. Zool.* 171: 134—140.
- [8] Manogue K. R. and F. Nottebohm 1982 relation of medullary motor nuclei to nerves supplying the vocal tract of bodgerigar. *J. Comp. Neurol.* 204: 384—391.
- [9] Mesulam M. 1978 tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with super sensitive for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem and cytochem.* 26(2): 106—117.
- [10] Nottebohm F. et al. 1976 control of song in the canary, *serinus canarius*. *J. Comp. Neurol.* 165: 457—486.
- [11] Nottebohm F. 1981 bilateral organization of the vocal control pathway in the bugerigar, *melospitacus undulatus*. *J. Neurol.* 1(11): 1279—1288.
- [12] Nottebohm F. et al. 1982 connection of vocal control nuclei in the canary telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 207: 344—357.
- [13] Paton J. A. and K. R. Manogue 1982 Bilateral interaction within the vocal control pathway of birds: two evolutionary alternative. *J. Comp. Neurol.* 212: 329—335.