

皮层体感 I 区躯体伤害感受神经元与非伤害感受神经元的形态学特征

张日辉 滕国玺

(中国医科大学脑研究所, 沈阳 110001)

摘要 应用细胞内记录及标记技术,从神经元水平探讨大脑皮层在伤害感受及其调制中的作用.强电脉冲刺激隐神经模拟躯体痛,观察了猫皮层体感 I 区 654 个伤害感受神经元对刺激隐神经的诱发反应后,对 30 个(伤害及非伤害)神经元电泳 Neurobiotin 进行胞内标记,以显示神经元在皮层内的分布及形态特点. Neurobiotin 标记细胞图象三维重建表明,电生理机能不同的伤害感受神经元与非伤害感受神经元在形态特征方面也存在差异($P<0.01$). 此结果在细胞水平为阐明皮层体感区在伤害感受性反应中的作用提供了实验资料,进一步从形态学方面为痛觉特异性学说提供了新的补充依据.

关键词 皮层体感区 痛觉 细胞内记录 细胞内标记 免疫组织化学

痛觉中枢机制是当前研究疼痛的热点之一.近年研究初步证实大脑皮层不仅感受痛觉信息,并且参与痛觉调制.因为痛觉是一种主观体验,伤害性冲动必然上升到大脑皮层而进入意识领域.本研究室曾报道皮层体感 I 区(Primary somatosensory cortex area, S I)伤害感受神经元(Nociceptive neurons, NCNs)的膜电学参数,即膜电阻 R_m 、时间常数 τ 、膜电容 C_m 等均较非伤害感受神经元(Non-nociceptive neurons, NNCNs)为大,从机能角度在膜被动特性的研究上为痛觉“特异性学说”提供了新的实验证据^[1, 2].不同机能的神经元可能有其相应的神经元形态特点. Peschanoki 等人^[3]对腹侧基底复合体(Ventrobasal complex, VB)中 NCNs 与 NNCNs 研究和 Tetsuya 等人^[4]对特异性伤害感受神经元和广动力范围(WDR)神经元及低阈值机械感受神经元的研究中都未发现有明显的形态学差异.近年来 Yamamura 等人^[5]在鼠扣带回前部的研究中,发现两种功能不同的神经元在形态上也有差别.关于 NCNs 与 NNCNs 的形态是否存在差异一直是痛觉研究争论的焦点之一.神经元功能和形态是否具有统一性的问题也存在着许多争议.本实验用在体细胞内记录和标记技术,观察躯体 NCNs 的电生理反应和神经元的形态特点,力求在细胞水平为探讨大脑皮层在痛觉感受及调制中的作用提供实验依据.

1 材料与方 法

成年健康猫(体重 2.0~3.0 kg, 雌雄不限)20 只. 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉麻醉,施行气管插管保证呼吸通畅或备人工呼吸. 剥离左后肢隐神经,安放双极刺激电极. 作第 4 脑室引流,在右侧 S I 区位置开颅(直径 8 mm)暴露 S I 区,进行细胞内记录^[6]. 按皮层沟回直观定位,将尖端直径 $\leq 0.5\mu\text{m}$ (电阻 30~50 M Ω)内充 Neurobiotin(1.5%, Sigma 公司)的醋酸钾(2 mol/L)溶液的玻璃微电极经推进器逐渐推入 S I 区隐神经投射区. 当微电极插入神经元并稍稳定后,给予隐神经刺激(单脉冲方波,强度 1.0 mA,波宽 0.5 ms),必要时用木棒触毛、有齿镊子钳夹后肢皮肤、静脉注射吗啡等检出 NCNs^[6].

本实验共观察 654 个伤害感受神经元的电生理反应. 电生理记录完成后,向其中 30 个神经元内电泳 Neurobiotin. 电泳参数为:强度+3 nA,波宽 200 ms,频率 1 Hz,时间 3~5 min. 电

泳完毕保持动物存活 3 h 以上. 实验结束后, 于左心室灌流生理盐水和多聚甲醛(4%)固定, 取脑块于 4℃冰箱同种固定液中过夜, 次日做冠状连续切片(厚 70 μm), 用 SABC 法进行免疫组化染色, DAB 显色, 中性红复染, 酒精、二甲苯系列脱水透明, 中性树胶封片. 光学显微镜下检查神经元的分布及形态, 用显微描绘管(drawing tube)在 400 倍光学显微镜下对连续切片的神经元进行形态绘图和图象三维重建. 用图象分析仪(HUZEX, 日本)测量胞体的大小, 顶树突及基树突均径、树突区分支范围. 顶树突直径在距胞体约 50 μm 处测量, 基树突均径是在一级树突分支前测量所有一级基树突的直径后, 求平均值. 树突棘数是在每个神经元树突棘最多的树突上随机取 2 段, 每段 50 μm , 在 400 倍光学显微镜下计数树突棘数后求其平均值, 代表每个神经元的树突棘数. 实验结果用 t 检验统计处理, 统计学差异在 $P < 0.05$ 时被认为有显著性意义.

2 结果

实验观察的神经元要求其静息电位绝对值在 $\geq 40\text{mV}$ 并能维持这一电位水平达 5 min 以上, 共观察 654 个神经元的诱发反应. 对其中 30 个神经元(NCNs 和 NNCNs)细胞内电泳 Neurobiotin 进行形态标记.

2.1 躯体 NCNs 的判定

当微电极插入神经元并稳定后, 刺激隐神经(电脉冲方波, 强度 1.0 mA, 波宽 0.5 ms), 根据诱发反应性质及潜伏期判断 NCNs 或 NNCNs. 必要时用木棒触毛, 有齿镊子钳夹后肢皮肤、静脉注射吗啡等进一步加以判定^[6]. 图 1 为一例非特异性 NCNs 对电刺激隐神经并注射吗啡后的反应. 电刺激隐神经诱发多个 EPSP(excitatory postsynaptic potential, EPSP, 包括伤害感受和非伤害感受反应成分), 注射吗啡后伤害感受反应成分首先被抑制, 最后非伤害感受反应成分也被抑制.

2.2 NCNs 与 NNCNs 的形态特性

(i) NCNs 和 NNCNs 在 SI 区的定位分布及形态分类. 在完成电生理特性观察后, 本实验成功地标记了其中的 30 个神经元. 按胞体形态及树突分布等主要特点将标记神经元分为锥体和非锥体细胞, 后者包括星形细胞、梭形细胞. 所标记的神经元大多位于大脑皮层的 III, IV, V 层, 在第 III 和 V 层

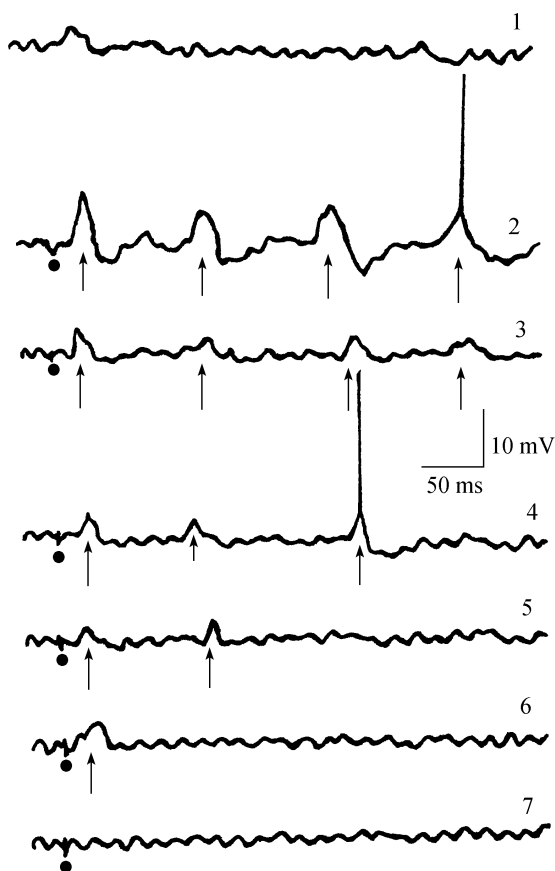


图 非特异性 NCNs 对电刺激隐神经及注射吗啡的反应

1——自发放电对照; 2——电刺激隐神经诱发的多 EPSP 和 EPSP 上的锋电位 (箭头所示); 3——注射吗啡后即刻电刺激隐神经诱发的多 EPSP; 4——注射吗啡 30 s 后电刺激隐神经诱发的 3 个成分 EPSP 及其上锋电位; 5——注射吗啡后 1 min 电刺激隐神经诱发的多 EPSP; 6——注射吗啡后 1 min 电刺激隐神经诱发的多 EPSP; 7——注射吗啡后 1 min 电刺激隐神经诱发的多 EPSP

标记的神经元的数量较多(占总数的 83.33%). 53%NCNs 位于第Ⅲ层, 多为锥体细胞 (13/17,80%);而 61.54%NNCNs 位于第Ⅴ层,锥体细胞占 6/13(46%).

(ii) NCNs 与 NNCNs 的主要形态特点. NCNs 的主要形态特点如表 1 所示, 与

表 1 S I 区躯体 NCNs 与 NNCNs 的形态特点比较^{a)}

形态特征	NCNs ($\bar{X} \pm S$) (n = 17)	NNCNs($\bar{X} \pm S$) (n = 13)
胞体面积/ μm^2	381.34 $\pm$ 168.30	587.90 $\pm$ 396.88
顶树突均径/ μm	7.45 $\pm$ 2.50	6.16 $\pm$ 1.58
基树突均径/ μm	4.22 $\pm$ 0.83	4.86 $\pm$ 1.51
基树突棘数/个	60.33 $\pm$ 17.38 ^{c)}	27.5 $\pm$ 2.50
最长基树突/ μm	176.97 $\pm$ 51.71 ^{b)}	256.93 $\pm$ 120.23
基树突分支范围/ μm^2	(3.31 $\pm$ 1.63) $\times 10^{4c)}$	(6.37 $\pm$ 2.24) $\times 10^4$
顶树突分支范围/ μm^2	(3.43 $\pm$ 2.04) $\times 10^{4c)}$	(1.95 $\pm$ 0.50) $\times 10^4$

a) 数值示均值 $\pm$ 标准差; b) $P < 0.05$; c) $P < 0.01$,为 NCNs 与 NNCNs 相比有统计学差异

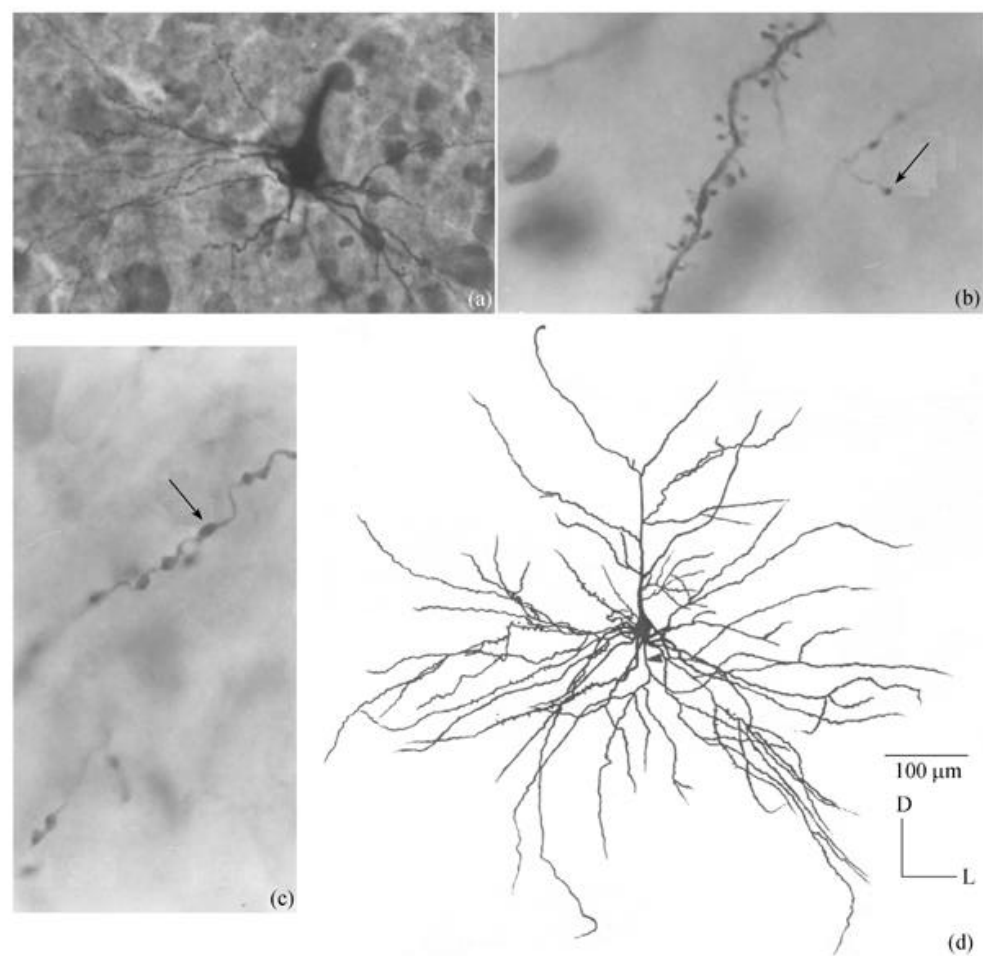


图 2 皮层 S I 区 Neurobiotin 标记的躯体 NCNs 的显微照片及三维重建图
(a) 锥体形 NCN($\times 160$); (b) NCN 树突棘和轴突终端似终扣($\uparrow, \times 800$); (c) 轴突上膨体($\uparrow, \times 800$); (d) NCN 的三维重建图($\times 160$)

NNCNs 相比, NCNs 基树突棘数及所追踪到的最长基树突存在显著差别($P < 0.01$), 树突分支范围差异也有显著意义($P < 0.01$). 胞体面积虽有较大差别, 但是统计学分析无显著意义.

从所标记 NCNs 的显微照片及三维重建图可见, NCNs 大多为锥体细胞(图 2(a)和(d)). 自胞体基部发出多条基树突围绕在胞体周围, 并呈锐角状分支, 在数百微米内形成基树突区, 基树突区呈半球形或椭圆形, 范围相对较 NNcNs 小($P < 0.01$), 基树突及其分支相对较密. 多数 NCNs 有高密度或低密度的树突棘(图 2(b), $P < 0.01$). 锥体细胞胞体顶端伸出一个主树突干, 在走向皮层表面途中分支, 到皮层表面附近分支范围逐渐扩大, 形成顶树突区, 分支范围较 NNcNs 大($P < 0.01$). 绝大部分 NCNs 有明显的长轴突延伸到白质及皮层下结构, 长轴突一般在进入白质前有 1~3 个呈直角的分支, 有的轴突进入白质前曲折盘旋形成复杂的网络, 其行程远近不一, 有的顺着白质纤维走向, 朝丘脑方向投射. 有的神经元在油镜下观察到其长轴突的投射终端似有终扣(图 2(b)). 产生抑制性反应或节律性放电的 NCNs 一般存有膨体(图 2(c)). 非锥体形 NCNs 多为星形细胞, 胞体为多角、圆形、椭圆形或不规则形, 胞体较小; 其基树突自胞体发出后呈辐射状穿行于胞体所在及邻近层次, 形成圆形的树突区, 树突干较粗, 分支后呈波浪状, 有大量树突棘; 轴突很短, 终止于细胞体附近, 形成篮状包围附近的锥体细胞胞体, 与锥体细胞的胞体可能形成突触.

NNCNs 有锥体细胞也有非锥体细胞, 锥体细胞(图 3(a)和(c))胞体大小不一, 树突形状各异、基树突区范围较大, 多为圆形, 基树突分支相对稀疏, 呈辐射状围绕在胞体周围, 追踪到的最长基树突平均为 $256.93 \mu\text{m}$, 而 NCNs 为 $176.97 \mu\text{m}$ ($P < 0.05$). 多数 NNcNs 无或只有低密度的树突棘(图 3(b)), 锥体细胞的顶树突多为一个主树突干, 从胞体发出后很快分支, 分支范围较小. 大部分 NNcNs 没有看到明显的顶树突及长轴突. 有的锥体细胞, 虽然数量少, 但细胞方位相反, 即顶树突向下走行, 而轴突上行, 在胞体附近形成轴突分支区, 轴突间似形成自身突触. 非锥体形 NNcNs 树突呈辐射状发出, 形成圆形的树突区, 树突棘较少, 未观察到明显的轴突.

3 讨论

(i) NCNs 与 NNcNs 的分布及形态差异. 本实验记录的感受神经元在皮层各层均有分布.

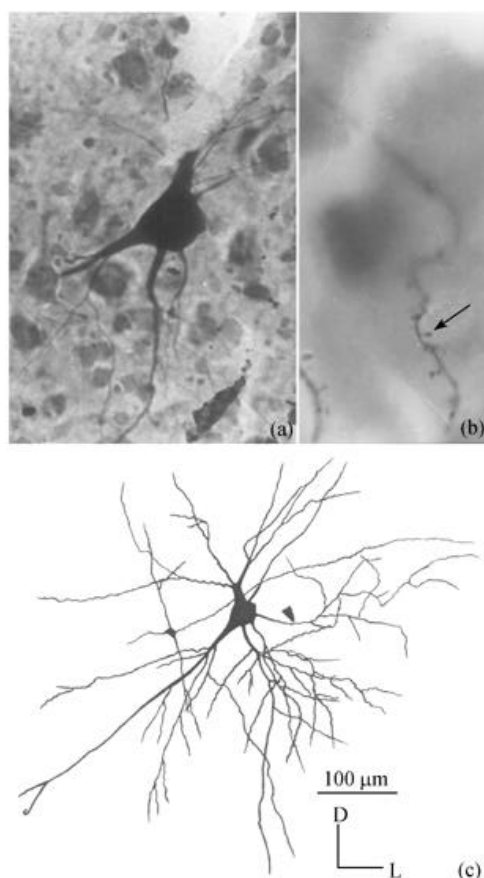


图3 皮层 S I 区 Neurobiotin 标记的 NNcNs 的显微照片及三维重建图

(a) 锥体形 NNcN($\times 160$); (b) NNcN 的树突棘($\uparrow$, $\times 800$); (c) NNcN 的三维重建图 ($\times 160$)

根据记录电极的(AP, LR, H)定位和免疫组织化学染色定位, 躯体 NCNs 主要位于皮层 III, IV, V 层, NNCNs 在各层均有分布. 有些研究者也看到类似的结果^[5,7,8]. 在实验中观察到在同一皮层柱中的神经元, 由于在皮层内分布层次不同, 自发电形式和刺激诱发反应也有差别. 这表明 S I 区伤害感受神经元除了呈柱状分布外, 也有特异的分布层次. S I 区神经元在分布位置、细胞构筑和功能方面都具有高度特异性.

NCNs 与 NNCNs 的形态是否存有差异, 一直是痛觉理论争论的焦点之一. 我们认为这些争论可能与研究部位、形态特征分析指标不同及神经元数量多少等有关. 由于研究方法的限制, 以往的形态学研究, 主要以胞体形态、大小等为根据. 随着标记技术及重建方法的进步, 人们认识到仅凭神经元胞体的分析已不能满足目前研究目的的需要. 而且神经元的胞体大多数是不规则的, 在不同切面或不同轴线上, 胞体形态及均径也不相同, 所以区别神经元的类型也不能简单地以胞体的若干参数为根据. 通过三维图象重建, 我们发现功能不同的 NCNs 与 NNCNs 有形态差异. 各类神经元形态上的差别更多的表现于微细结构上, 如树突分支形式, 树突棘的有无或树突棘的多少及其分布, 树突区的形状与大小, 轴突及其分支的走行和膨体等. 因此, 对神经元微细结构的统计分析对研究神经元的形态特点更具有重要的参考价值.

(ii) NCNs 和 NNCNs 的机能与形态的关系. 机能不同的神经元可能有其形态基础. 据此我们在完成电生理研究后, 又观察了 NCNs 和 NNCNs 的形态. 我们发现 NCNs 一般具有长轴突及少量的侧支, 其传出信息所至区域较集中; 有的轴突侧支密布于胞体邻近的广泛区域; 节律性放电的 NCNs 的轴突侧支上一般存有膨体. 资料表明, 膨体可能通过其释放的调质与效应细胞进行非突触性化学传递^[9]. 我们在实验中观察到的延迟性反应和持续性反应可能也与膨体释放的神经调质作用有关. 躯体 NCNs 和 NNCNs 具有的形态的某些差异也表现在两类神经元顶树突和基树突分支形式及其树突棘的有无和分布. NCNs 基树突区分支范围较 NNCNs 为小($P < 0.01$); 而顶树突区分支范围较 NNCNs 大($P < 0.01$). 多数 NCNs 有高密度或低密度的树突棘, 明显比 NNCNs 的多($P < 0.01$). 树突区一向被认为是神经元的感受区, 树突及树突棘是传入神经纤维形成突触的主要位置, 树突分支范围及树突棘多少表示了传入信息对神经细胞的影响关系, 限定了细胞接受传入的范围. 树突分支范围、朝向、分支形式和树突棘数量和分布等的不同反映神经系统回路中单个神经细胞的功能的不同, 这种变化可能是神经细胞对不同环境的反映, 也可能是由其遗传潜能及个别发育历史形成的神经回路中起不同作用的一种反映. Mungai 测量猫的体感皮层的锥体神经元, 发现胞体仅占神经元总面积的 4%, 而树突棘占总面积的 43%^[10]. 树突棘密度大则神经元接收传入信息的部位增加. 可见, 树突棘在感觉神经元中有着重要意义, 其对神经元的兴奋活动起积极的调制作用. 人类病理学研究指出, 一些神经综合征在确定的脑区常伴有侧棘的缺失或侧棘的病理改变. 侧棘的缺失或病理改变对正常认知功能的重要性, 在智力迟钝病人中已得到证实. 在这类病人的大脑皮层和海马, 可观察到广泛的侧棘缺失, 同时还伴有不正常的长而细棘柄的侧棘出现. 这些变化的严重性与综合征的严重性成正相关^[11~13]. 总之, 树突的存在不仅增加了一个神经元接受输入的面积; 树突的特殊分支形式及其表面树突棘的特殊分布, 也说明它们具有各种不同的机能意义.

本研究标记神经元的形态学分析结果表明 NCNs 与 NNCNs 存有形态差异, 形态差异也

反映机能上的不同. 据此, 我们认为 NCNs 与 NNCNs 不仅是电生理特性及膜被动特性不同^[1, 2], 在形态上也存有某些微细结构的差别, 机能与形态是相互统一的. 本实验结果为痛觉的“特异性学说”补充了新证据.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目 (批准号:39170294).

参 考 文 献

- 1 张日辉, 滕国玺. 猫皮层 S I 区神经元对刺激 VPL 的反应及其膜电学特性的研究. 生理学报, 1999, 51(1): 101~105
- 2 陈京红, 滕国玺. 大脑皮层内脏伤害感受与非伤害感受神经元膜电学特性比较. 科学通报, 1998, 43(14): 1467~1472
- 3 Peschanoki M, Lee C L, Ralston III H J. The structural organization of the ventrobasal complex of the rat as revealed by the analysis of physiologically characterized. Brain Res, 1984, 297(1): 63~74
- 4 Tetsuya N, Nozomu N, Toshikatsu Y. Intracellular HRP study of nociceptive neurons within the ventrobasal complex of the cat thalamus. Brain Res, 1992, 570: 323~332
- 5 Yamamura H, Iwata K, Tsuboi Y, et al. Morphological and electrophysiological properties of ACCx nociceptive neurons in rats. Brain Res, 1996, 735: 83~92
- 6 张日辉, 滕国玺. 皮层 S I 区伤害感受神经元膜电生理特性研究. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(4): 358~362
- 7 Roos A, Rydenhag B, Andersson S. Activity in cortical cells after stimulation of tooth pulp afferents in the cat. Intracellular analysis. Pain, 1983, 16: 49~60
- 8 Lamour Y, Guilbaud G, Willer J C, et al. Rat somatosensory(Sm I) cortex. II. Laminar and columnar organization of noxious and non-noxious inputs. Exp Brain Res, 1983, 49: 46~54
- 9 韩济生主编. 神经科学原理. 第2版. 北京:北京医科大学出版社, 1999. 268~283
- 10 Mungai J M. Dendritic patterns in the somatic sensory cortex of the cat. J Anat, 1967, 101: 403~418
- 11 Fifková E. Actin in the nervous system. Brain Res Rev, 1985, 9: 187~215
- 12 Fifková E, Delay R J. Cytolasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. J Cell Biol, 1982, 95: 345~350
- 13 Landis D M D, Reese T S. Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. J Cell Biol, 1983, 97: 1169~1178

(1999-08-11 收稿, 2000-01-03 收修改稿)