

小脑电刺激对家鸽乙酰胆碱酯酶活力的影响

胡莹^{1,2}, 王鹏¹, 王烁^{3*}

(1. 天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300387; 2. 天津师范大学细胞遗传与分子调控天津市重点实验室, 天津 300387; 3. 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 选用成年健康家鸽, 对小脑进行连续电刺激后, 分别抽取家鸽外周血清及全脑测定乙酰胆碱酯酶活力变化, 以探讨鸟类小脑刺激与乙酰胆碱酯酶活力变化之间的相关性。结果表明: 在刺激小脑皮层后, 家鸽外周血清中乙酰胆碱酯酶活力显著上升 ($P < 0.05$); 而在刺激小脑皮层后, 脑组织中乙酰胆碱酯酶活力显著降低 ($P < 0.05$)。推测电刺激引起外周组织乙酰胆碱释放, 从而引起肌肉强直, 血清中胆碱酯酶的活力升高。而电刺激小脑使抑制性神经元功能兴奋, 脑中胆碱能神经元功能减弱, 乙酰胆碱的释放减少, 脑组织中胆碱酯酶的活力降低。

关键词: 家鸽; 乙酰胆碱酯酶; 小脑; 电刺激

中图分类号: Q424 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2010)02-0173-03

Activity of AchE after Electrical Stimulation of the Cerebellum of Pigeon

HU Ying^{1,2}, WANG Peng¹, WANG Shuo^{3*}

(1. Department of Chemistry and Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Cyto-Genetical and Molecular Regulation, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 3. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: To investigate the activity of AchE after stimulating the cerebellum of birds, 16 health pigeons were involved in the present experiment. The examination of AchE activities of both serum and cerebrum of pigeons were followed by a series of electrical stimulations on their cerebellums. The results showed that the activity of Ache from the serum increased significantly after the electrical stimulations while declined in the cerebrum ($P < 0.05$) compared with the control. It suggests that acetylcholine in serum probably increased after electrical stimulation which increase ache and eventually cause muscular rigidity. Meanwhile, the continuous excitement of inhibitory neurons in the cerebellum might reduce the activities of cholinergic neurons; thus the secretion of acetylcholine will decrease and down regulate the AchE activity in the cerebrum.

Key words: pigeon; Ache; cerebellum; electrical stimulation

中枢胆碱能神经系统是中枢胆碱能神经元及其纤维的投射部位 (Winkler *et al.*, 1995)。作为胆碱能神经元轴突末梢释放的一种重要的神经递质, 乙酰胆碱参与肌肉运动调节、学习、记忆和认知等重要功能。对于乙酰胆碱和乙酰胆碱酯酶的研究主要涉及在一定药物或者外界刺激下, 观察乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、乙酰胆碱化酶以及胆碱能受体的变化 (潘思源, 1992)。Faux 和 Padian (2007) 认为, 物理刺激鸟类和低等爬行类的小脑, 有可能是鸟类和爬行类病理性骨骼肌痉挛的原因之一。本论文拟利用保护电极对家鸽小脑进行电刺激, 以探讨鸟类小脑物理刺激与乙酰胆碱酯酶活力变化之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用健康成年家鸽, 雌雄不拘, 鸽体重 350 ~ 400 g。分为 2 组, 对照组和电刺激组各 8 只。

主要试剂 戊巴比妥钠 (上海化学试剂一厂), 以 3% 水溶液作为工作液; 肝素钠注射液 (天津市生物化学制药厂), 工作液浓度 5%; 乙酰胆碱酯酶试剂盒和考马斯亮蓝蛋白试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 其他试剂为国产分析纯。

主要仪器 RM6240 多道生理信号采集处理系统; 日本岛津 UV-2550 紫外-可见分光光度计。

1.2 实验方法

收稿日期: 2009-04-11 **接受日期:** 2009-06-03 **基金项目:** 天津师范大学细胞遗传与分子调控天津市重点实验室基金; 天津师范大学科技立项基金 (1D0301B); 天津师范大学开放实验室基金资助

作者简介: 胡莹, 女, 副教授, 研究方向: 动物生理, E-mail: hu.ing@263.net * 通讯作者 Corresponding author, E-mail: uslarky@163.com

致谢: 周颖和陈平为本实验的完成付出了巨大劳动, 王振英博士和董仕博士研究组在样品分析和数据处理上给予很大帮助, 在此一并致谢!

采血 于翼根静脉采血 1 ml, 加肝素 200 μ l, 1800 转 \times 5 min 离心, 取上清为对照, -80°C 待检验。

脑组织处理 对照组以 3% 戊巴比妥钠溶液 1 mL 注射于家鸽胸大肌, 待其充分麻醉后剪去枕部羽毛, 暴露顶骨, 小心开颅取全脑。称取脑组织湿重, 加 9 倍质量预冷生理盐水迅速匀浆, 3500 转 \times 10 min 离心, 取上清转入新管 -80°C 保存备用。实验组以同样方法开颅后暴露全脑, 以 RM6240 多道生理信号采集处理系统以保护电极连续刺激小脑至动物出现颈部肌肉收缩, 放置 40 min 后, 取血清、全脑依上述方法操作。

血清及全脑中乙酰胆碱酯酶活力的测定 血清及全脑中乙酰胆碱酯酶活力和脑组织蛋白含量的测定依照南京建成生物工程研究所乙酰胆碱酯酶试剂盒和考马斯亮蓝蛋白试剂盒说明书进行。统计学分析采用 SPSS 13.0 软件系统处理各组数据。

2 结果

2.1 电刺激家鸽小脑后的骨骼肌痉挛

以保护电极对家鸽小脑进行连续电刺激, 其颈部肌肉发生节律性痉挛及后张, 但后肢及尾部未见 Faux 和 Padian (2007) 报道的反张现象。

2.2 电刺激家鸽小脑后血清乙酰胆碱酯酶活力的变化

以成对样本 T 检验对实验组和对照组对家鸽血清乙酰胆碱酯酶活力数据进行分析 (表 1), 发现实验组家鸽在刺激小脑皮层后其血清中乙酰胆碱酯酶活力显著上升 ($P < 0.05$)。如表 1 所示, 实验组血清乙酰胆碱酯酶活力的平均值较对照组几乎上升了一倍, 就个体而言实验组的酶活力波动更为剧烈。

表 1 家鸽电刺激前后血清中乙酰胆碱酯酶活力比较 ($\bar{x} \pm s$)^{*}
Table 1 Comparison of acetylcholinesterase activities in serum after stimulate pigeon cerebellum ($\bar{x} \pm s$)^{*}

组别 Group	例数 Cases	乙酰胆碱酯酶活力 (U/ml) Activities of Ach-E
对照组	8	12.674 \pm 3.091
实验组	8	21.114 \pm 3.433

^{*} $P < 0.05$

2.3 电刺激家鸽小脑后脑组织乙酰胆碱酯酶活力的变化

用成对样本 T 检验对实验组和对照组脑组织中乙酰胆碱酯酶活力数据进行分析 (表 2), 发现实验组在刺激小脑皮层后脑组织中乙酰胆碱酯酶活力显

著降低 ($P < 0.05$)。

表 2 正常组与电刺激组家鸽脑中乙酰胆碱酯酶活力比较 ($\bar{x} \pm s$)^{*}
Table 2 Comparison of acetylcholinesterase activities in serum after stimulate pigeon cerebellum ($\bar{x} \pm s$)^{*}

组别 Group	例数 Cases	乙酰胆碱酯酶活力 (U/mgprot) Activities of Ach-E
正常组	8	12.089 \pm 3.368
实验组	8	6.270 \pm 2.381

^{*} $P < 0.05$

3 讨论

乙酰胆碱酯酶是胆碱能神经递质乙酰胆碱的水解酶, 不仅存在于中枢神经系统灰质、自主神经节、运动终板的神经末梢, 也存在于神经元突触前、后膜及大部分哺乳动物的红细胞内。其生理作用是催化水解神经末梢释放的乙酰胆碱, 直接参与自主神经功能的调节、肌肉运动、大脑思维、记忆等重要功能 (张镜如, 1995)。

3.1 电刺激小脑产生神经冲动, 引起肌肉收缩——血清中胆碱酯酶活力升高

乙酰胆碱主要是在运动神经末梢的轴浆中由胆碱经乙酰化后形成。神经冲动的传递主要通过乙酰胆碱的释放, 弥散到突触后膜与乙酰胆碱受体结合而引起去极化, 使肌纤维收缩。刺激使神经兴奋产生动作电位, 形成的神经冲动使乙酰胆碱释放至突触间隙引起肌肉收缩, 其在完成神经肌肉兴奋收缩耦联后即被分布在突触间隙和终板膜的乙酰胆碱酯酶迅速清除 (张镜如, 1995)。由此可见, 在刺激-神经冲动-肌肉收缩的过程中乙酰胆碱酯酶活力是变化的。乙酰胆碱与受体结合后, 迅速被受体附近的乙酰胆碱酯酶水解, 从而使乙酰胆碱的作用消失, 此时乙酰胆碱酯酶的活力升高。连续电刺激家鸽小脑, 产生神经冲动, 释放神经递质, 被突触后细胞接收, 经过电-化学-电的转换, 完成有效和准确的信息传递 (周旋等, 2006), 最终特定骨骼肌收缩, 家鸽出现颈部肌肉抽搐、头颈后张等形体变化。

有研究显示刺激小脑的一些部位可引起心血管活动的反应 (孙乐蓉等, 1999)。肌肉运动时心血管活动的整合形式与防御反应相似, 正在进行运动的肌肉血管会发生舒张。这可能与交感舒血管纤维有关。交感舒血管纤维在平时没有紧张性活动, 只有在动物处于情绪激动状态和发生防御反应时, 其末梢释放乙酰胆碱, 使骨骼肌血管舒张, 血流量增多 (张镜如, 1995)。推测当小脑接受电刺激时, 支配骨骼肌微动脉的交感神经中的舒血管纤维释放乙酰胆

碱,产生了类似于防御反应的肌肉运动-骨骼肌收缩。此时,乙酰胆碱酯酶水解乙酰胆碱,使乙酰胆碱酯酶活力升高。此外,电刺激家鸽的小脑,可引起细胞膜通透性增加,细胞内的乙酰胆碱大量释放出来进入血浆,从而引起血清中乙酰胆碱酯酶活性的增加。

3.2 电刺激小脑使得小脑的抑制功能增强——脑组织中乙酰胆碱酯酶的活力降低

鸟类的小脑比爬行类的发达(李永材等,1984),这与飞翔时小脑维持运动器官的协调和身体的平衡有着密切的联系。来自于脊髓、橄榄核、脑桥核、前庭核、三叉神经核、顶盖和前脑的许多传导束终止于鸟类小脑,小脑通过这些传导束接受感觉和运动信息,调节肌紧张和协调肌肉运动(陈蓉,王彬,1994)。

已有研究资料指出,鸟类小脑的皮层组成与哺乳类的相似,也由分子层、浦肯野细胞层和颗粒层构成。但鸟类小脑皮层的浦肯野细胞树突末梢较粗,而轴突侧支数量少,且苔状纤维(mossy fiber)较少。鸟类小脑的四肢躯体感觉传入与哺乳类的一样,通过脊髓通路经由苔状纤维和爬行纤维投射到小脑皮层的浦肯野细胞(陈蓉,王彬,1999)。因此,就小脑而言,其信息整合活动的过程和最终结果是:到达小脑皮层的全部信息被小脑皮层神经元环路整合成为浦肯野细胞的抑制性输出信息,由其对小脑深核神经元的紧张性放电活动进行“抑制性的雕刻作用”,从而将紧张性放电活动调制成特定形式的动作电位序列,再由小脑深核神经元轴突将此动作电位传输到中枢其他运动结构,如大脑皮层和脑干的运动核团活动,间接地调节了骨骼肌的收缩活动,从而实现其运动调节功能。

当小脑皮层受到电刺激时苔状纤维和爬行纤维(climbing fiber)释放递质,分别对颗粒细胞和浦肯

野细胞发挥兴奋作用。而浦肯野细胞通过轴突末梢释放递质,给小脑深核抑制性传入,使小脑的抑制功能增强,使得胆碱能神经元功能减弱或被抑制,从而使得脑组织中乙酰胆碱酯酶的活力降低。

综上所述,电刺激家鸽小脑,可出现类似哺乳动物角弓反射的现象,同时乙酰胆碱酯酶的活力在血清中明显升高,在脑组织中显著降低。推测电刺激产生的神经冲动,在外周释放出大量的乙酰胆碱,引起肌肉强直,血清中胆碱酯酶的活力升高;而电刺激小脑使小脑的抑制性神经元功能兴奋,脑中胆碱能神经元功能减弱,乙酰胆碱的释放减少,脑组织中胆碱酯酶的活力降低。可见,电刺激鸟类小脑后的角弓反射现象与胆碱酯酶活力存在一定的相关性,其相关的细胞分子机制还有待于更深入的研究。

4 参考文献

- 陈蓉,王彬. 1994. 家鸽小脑神经元对四肢躯体神经刺激传入的反应特征[J]. 湛江师范学院学报(自然科学版),6(1):81~87.
- 陈蓉,王彬. 1999. 家鸽小脑皮层浦肯野细胞电活动的研究[J]. 动物学研究,20(3):239~240.
- 李永材,黄溢明. 1984. 比较生理学[M]. 北京:高等教育出版社:348.
- 潘思源. 1992. 小鼠脑内乙酰胆碱、胆碱乙酰化酶、乙酰胆碱酯酶和M胆碱受体的昼夜变化[J]. 中国药理学报,12(2):148~151.
- 孙乐蓉,冯爱玉,宋承伟,等. 1999. 急性脑梗死电刺激小脑对肢体运动功能恢复的疗效[J]. 第二军医大学学报,20(10):817~818.
- 张镜如. 1995. 生理学(第四版)[M]. 北京:人民卫生出版社:41.
- 周旋,杨朝阳,李晓光. 2006. 神经肌肉接头中乙酰胆碱酯酶的研究进展[J]. 中国康复理论与实践,12(3):235~236.
- CM Faux, K Padian. 2007. The opisthotonic posture of vertebrate skeletons: postmortem contraction or death throes? [J]. Paleobiology, 33(2): 201~226.
- Winkler J, Suhr ST, Gage FH, et al. 1995. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory[J]. Nature, 375: 484~487.