猫小脑皮质 Glu/GABA 表达的老年性变化

张正亮, 温 波, 汤传宏, 华田苗*

(安徽师范大学 生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 衰老导致小脑的生理功能下降, 但其神经机制仍然不清楚。为此, 利用免疫组织化学方法标记猫小脑皮质内谷氨酸 (Glutamate, Glu) 和 γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric acid, GABA) 免疫反应阳性 (Glu-IR 和 GABA-IR) 结构, 探讨青年猫和老年猫小脑皮质 Glu/GABA 表达的老年性变化及其可能影响。并利用 Image-Pro Express 图像分析软件对小脑皮质各层 Glu 和 GABA 免疫反应阳性细胞密度及其灰度值进行测量。结果显示: 与青年猫相比, 老年猫小脑皮质内的 Glu 免疫反应阳性浦肯野细胞密度、颗粒层 Glu 免疫反应阳性细胞密度及其两者的免疫阳性反应灰度值均显著下降 ($P < 0.01$) (免疫反应强度与平均灰度值成反比); 老年猫分子层、浦肯野细胞层 GABA 免疫反应阳性神经元密度及其免疫反应强度均显著下降 ($P < 0.01$); 颗粒层 GABA 免疫反应阳性神经元密度无显著变化 ($P > 0.05$), 但神经元免疫反应强度显著减弱 ($P < 0.01$)。研究结果提示, 衰老过程中猫小脑皮质出现神经元 Glu 的表达增强、GABA 的表达减少等, 可能是小脑神经元丢失和精确调控能力下降等的重要原因之一。

关键词: Glu (谷氨酸); GABA (γ -氨基丁酸); 衰老; 小脑皮质; 猫

中图分类号: Q25; Q421 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)02-0152-07

Aged Changes of Glu/GABA Expression in the Cerebellar Cortex of Cats

ZHANG Zheng-liang, WEN Bo, TANG Chuan-hong, HUA Tian-miao*

(College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu Anhui 241000, China)

Abstract: The physiological function of cerebellum declines during ageing, but its neural mechanism is not still clear. Therefore, we applied an immunohistochemical method to exhibit the Glu and GABA immunoreactive (Glu-IR and GABA-IR) cells, to investigate aged changes of Glu/GABA expression in the cerebellar cortex of young adult and old cats, and to discuss the possible impact of these changes. Under the Olympus BX-51 light microscope, the density of the immunoreactive cells and its gray value in the molecular layer, Purkinje layer and granular layer were counted respectively with Image-Pro Express Software 5.1. Compared with young cats, the density and average grey value of Glu immunoreactive cells increased significantly in the Purkinje and granular layer of old cats ($P < 0.01$). The density and intensity of GABA immunoreactive neurons declined significantly in the molecular and Purkinje layers of old cats ($P < 0.01$). The density of GABA immunoreactive neurons showed no evident differences in the granular layer between young and old cats ($P > 0.05$), but the intensity of GABA immunoreactive neurons was visibly weaker in the granular layer of old cats ($P < 0.01$). The results indicated that changes of Glu/GABA expression in the cerebellar cortex during ageing may be one of the important factors mediating the functional degeneration of accurate timing and neurons lost in old individuals.

Key words: Glu (Glutamate); GABA (γ -Aminobutyric acid); Ageing; Cerebellar cortex; Cat

谷氨酸 (Glutamate, Glu) 和 γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric acid, GABA) 作为哺乳动物中枢神经系统主要的兴奋性和抑制性神经递质, 参与学习记忆

(Salinska & Stafiej, 2003; Davies et al, 1991)、突触可塑性 (McDonald & Johnston et al, 1990)、神经发育 (Chen et al, 1997)、神经保护 (Yao et al, 1998)、神

收稿日期: 2007-12-19; 接受日期: 2008-01-25

基金项目: 安徽省自然科学基金 (No.070413138); “安徽重要生物资源保护与利用研究”安徽省重点实验室科研基金; “生物环境与生态安全”安徽省高校重点实验室基金

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: tianmiaohua@gmail.com

第一作者简介: 张正亮 (1979—), 男, 硕士研究生, 研究方向为发育神经生物学, E-mail: zzlgoogle@163.com

经毒性以及细胞凋亡 (Monfort et al, 2002; Kosenko et al, 2003)等, 对于脑功能的正常维持有重要的作用。小脑是重要的运动调节中枢, 对各种事件起精确调速作用, 而这种功能的执行主要通过小脑皮质内 5 种神经元 (即分子层的星状细胞、篮状细胞、浦肯野细胞和颗粒层的颗粒细胞、高尔基细胞; 其中颗粒细胞释放兴奋性神经递质 Glu, 其余四种神经元释放抑制性神经递质 GABA), 由小脑内两种最主要神经递质 Glu 和 GABA 介导而完成 (Shou, 2006)。衰老时小脑生理功能出现衰退现象 (Marshall, 1982; Hilber & Caston, 2001), 这必然与小脑的结构和物质基础有关。衰老过程中小脑皮质形态结构等方面的变化已有较多研究 (Hui et al, 1999; Sabbatini et al, 1999; Hara et al, 1992; Jernigan et al, 2001; Zhang et al, 2006)。Glu 和 GABA 在衰老过程中的变化虽也有报道 (Yang et al, 1997; Najlerahim et al, 1990; Agaev & Ifraimova, 1977), 但主要是对小脑组织匀浆进行层析, 从小脑整体水平进行研究, 而且衰老过程中小脑皮质神经元有丢失现象 (Hui et al, 1999; Zhang et al, 2006), 因而不能准确地反映小脑皮质各层神经元表达的变化。另外, 关于小脑 Glu 和 GABA 表达的老年性变化观点还不尽一致。Glu/GABA 代表脑内兴奋性和抑制性神经系统的平衡状态, 两者之间不仅在代谢上相互转化, 在功能上也相互协调, 以往在小脑中的研究都是将两者分隔开的, 未见综合考虑其在小脑衰老过程中变化的研究。鉴此, 本实验以传统模式动物猫为研究对象, 从细胞水平上综合分析了青年猫和老年猫小脑皮质中各层 Glu 和 GABA 免疫反应神经元及其表达的老年性变化。以期探讨老年个体小脑功能衰退的神经机制提供一份有益的资料。

1 材料和方法

1.1 材料及组织准备

取健康的青年猫 (1—3 岁, 体重 2—2.5 kg) 和老年猫 (11—13 岁, 体重 3—3.5 kg) 各四只。盐酸氯胺酮 (40 mg/kg 体重) 深麻醉后开胸, 用 0.9 % 生理盐水经左心室灌注, 开腹, 并观察肝脏至发白后灌注含 4 % 多聚甲醛和 2.5 % 戊二醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (200 mL/kg 体重) 进行预固定, 接着开颅取出小脑, 切取小脑半球, 将其切成 1 cm×1 cm×1 cm 组织块, 置于 2.5 % 戊二醛中后固定 20—24 h, PBS (0.1 mol/L, pH 7.4) 冲洗、脱水、透明、石蜡

包埋, 作 6 μ m 连续矢状切片, 裱片于 APES 处理的载玻片上。每隔 10 张切片取 3 张, 形成 3 套切片 (100 片/套), 分别用于 Glu 和 GABA 的免疫组织化学染色及其阴性对照实验。

1.2 免疫组织化学 ABC 法

其中 2 套切片分别进行 anti-GABA 和阴性对照染色。石蜡切片脱蜡至水, 3 % H_2O_2 室温孵育 5 min, 以消除内源性过氧化物酶活性; 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min; 滴加正常山羊血清, 室温孵育 10 min, 封闭非特异性反应部位; 倾去血清, 勿洗, 滴加一抗 (兔抗猫 GABA 抗体: 1 : 3000), 37 °C 孵育 1 h; PBS 冲洗 5 min×3 次; 滴加生物素标记二抗 (羊抗兔 IgG 抗血清), 37 °C 孵育 10 min; PBS 冲洗 5 min×3 次; 滴加辣根酶标记三抗 (链酶卵白素, ABC), 37 °C 孵育 10 min, PBS 冲洗 5 min×3 次; DAB 显色, 自来水冲洗, 脱水, 透明, 封片。阴性对照实验采用正常山羊血清代替一抗, 其余步骤同上。

另外 1 套切片作 anti-Glu 免疫组织化学染色, 方法同上, 与上同时进行。

实验所用 Glu 和 GABA 兔抗猫血清及配套的免疫组织化学试剂盒、DAB 购自美国 Labvision 公司。

1.3 数据统计与分析

从青年组和老年组中分别随机取 20 张染色后的切片在 Olympus BX-51 型显微镜下观察, 并利用 Image-Pro Express 5.1 图像分析软件进行图像采集, 定量分析相关形态学参数, 包括测量 Glu 和 GABA 免疫阳性细胞密度、免疫阳性灰度值 (免疫反应强度与平均灰度值成反比)。(免疫阳性细胞以胞体或轮廓清晰进行统计)。

Glu 免疫组织化学染色切片在光镜 100× 下, 随机取 5 个区域, 计数采集区域内 Glu 免疫阳性浦肯野细胞数目, 并换算成单位宽度内的细胞数量即线密度 (n/mm), 并测量其免疫阳性灰度值; 再置于光镜 200× 下, 随机取 5 个分子层区域, 计数采集区域内 Glu 免疫阳性细胞数目, 测得区域面积, 取平均值后换算成细胞密度 (n/mm²), 并测量其免疫阳性灰度值; 最后于光镜 400× 下, 随机取 5 个颗粒层区域, 计数采集区域内颗粒层 Glu 免疫阳性神经元数目, 测得区域面积, 取平均值后换算成细胞密度 (n/mm²), 并测量其免疫阳性灰度值。

GABA 免疫组织化学染色切片的数值统计方法同 Glu 免疫组织化学切片。

采集的所有数据利用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,组间进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Glu 免疫染色

青年、老年猫小脑皮质各层中均可见 Glu 免疫阳性反应结构。免疫阳性反应呈棕黄色或黄褐色。分子层可见阳性纤维与阳性浦肯野细胞树突,但无 Glu 阳性细胞;浦肯野细胞层阳性细胞呈梨形,轮廓清晰,胞质着色较淡,伸进分子层的树突野明显着色;颗粒层整层分布有小而密集 Glu 阳性细胞,圆形(图 1a, b, c, d)。统计结果显示:老年猫较青年猫 Glu 阳性浦肯野细胞密度及其灰度值显著下降 ($P < 0.01$),密度下降 21.37%,平均灰度值下降 16.66%;老年猫较青年猫颗粒层 Glu 阳性细胞密度及其灰度值显著下降 ($P < 0.01$),密度下降 17.43%,灰度值下降 12.19% (表 1、2)。

2.2 GABA 免疫染色

GABA 免疫阳性神经元、阳性纤维和阳性斑点

在青年、老年猫小脑皮质各层中也均可见, (图 2)。与青年猫相比,老年猫小脑皮质分子层和浦肯野层阳性反应明显减弱(图 2a, b, c, d)。分子层中 GABA 免疫阳性细胞胞体较小,清晰,数目较多,分布于整层,主要为星形细胞和篮状细胞;浦肯野细胞层主要为一层形体较大的梨形细胞,其树突大多伸向分子层,部分浦肯野细胞胞体和突起着色明显;颗粒层有散在的、形体较大的 GABA 免疫阳性神经元,主要为圆形的高尔基细胞(图 2a, b, c, d)。统计结果表明:老年猫分子层 GABA 阳性细胞密度和 GABA 阳性浦肯野细胞密度较青年猫显著下降 ($P < 0.01$),分子层 GABA 免疫阳性细胞密度下降 35.32%;GABA 免疫阳性浦肯野细胞密度下降 62.63%,其胞径下降 9.23%;老年猫颗粒层 GABA 免疫阳性细胞密度变化不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。各层 GABA 能神经元免疫阳性反应强度均显著减弱,老年猫较青年猫分子层 GABA 免疫阳性神经元灰度值上升 20.02%,免疫阳性浦肯野细胞灰度值上升 29.36%,颗粒层免疫阳性神经元灰度值上升 11.97% (表 4)。

图 1 Glu 免疫组织化学染色显示青年猫和老年猫小脑皮质结构

Fig. 1 Structure of cerebellar cortex stained by Glu immunohistochemical method in young cat and old cat

青(a)、老(b)年猫小脑皮质分子层(mL)和浦肯野层(PC): 浦肯野细胞 (→) (标尺为 50 μm); 青(c)、老(d)年猫小脑皮质颗粒层(gl): 颗粒细胞 (→) (标尺为 25 μm)。

Molecular layer (mL) and Purkinje cell (pc) in the cerebellar cortex of young cat(a) and old cat(b): Glu immunoreactive Purkinje cell (→), (Bar=50 μm); granular layer (gl) in the cerebellar cortex of young cat(c) and old cat(d): Glu immunoreactive cell (→), (Bar=25 μm) .

表 1 青年猫和老年猫小脑皮质 Glu 免疫阳性细胞形态学参数比较 ($\bar{x}\pm SD$, $n=100$)

Tab.1 Morphological parameters of Glu immunoreactive cells in cerebellar cortex of young and old cats

	青年猫 Young cats	老年猫 Old cats
浦肯野细胞线密度 Linear density of Purkinje cells(n/mm)	11.46±3.39	8.97±2.81*
颗粒层神经元密度 Density of cells in granular layer(n/mm²)	8748.93±1374.09	7223.6±1166.32*

* $P<0.01$.

表 2 青年猫和老年猫小脑皮质 Glu 免疫阳性神经元平均灰度值比较($\bar{x}\pm SD$, $n=100$)

Tab. 2 Comparison of average grey value of Glu immunoreactive cells in cerebellar cortex of young and old cats

	青年猫 Young cats	老年猫 Old cats
浦肯野细胞 Purkinje cells	118.22±14.68	105.70±15.26*
颗粒层神经元 Cells in the granular layer	135.17±26.22	12.65±14.30*

* $P<0.01$.

图 2 GABA 免疫组织化学染色显示青年猫和老年猫小脑皮质结构

Fig. 2 Structure of cerebellar cortex stained by GABA immunohistochemical method in young cat and old cat

青(a)、老(b)年猫小脑皮质分子层(ml)、浦肯野层(pc)和颗粒层(gl): 浦肯野细胞(→), 分子层神经元(→), (标尺为 50μm); 青(c)、老(d)年猫小脑皮质分子层(ml): 分子层神经元(→) (标尺为 25μm)。

Molecular layer(ml)、Purkinje cell(pc) and granular layer(gl) in the cerebellar cortex of young cat(a) and old cat (b): GABA immunoreactive Purkinje cell (→), GABA immunoreactive neuron in molecular layer (→), (Bar=50μm); molecular layer (ml) in the cerebellar cortex of young cat(c) and old cat(d): GABA immunoreactive neuron in molecular layer (→), (Bar=25μm) .

2.3 Glu 与 GABA 免疫染色结果比较

Glu 和 GABA 免疫染色统计数据显示: 在青年猫中, Glu-IR 颗粒细胞密度(n/mm²): Glu-IR 浦肯野细胞密度(n/mm)=763.43: 1, 在老年猫中, Glu-IR 颗粒细胞密度(n/mm²): Glu-IR 浦肯野细胞密度

(n/mm)=805.31: 1, 其相对密度比上升 5.49%; 在青年猫中, 分子层 GABA-IR 细胞密度(n/mm²): GABA-IR 浦肯野细胞密度(n/mm)=55.24:1, 在老年猫中, 分子层 GABA-IR 细胞密度(n/mm²): GABA-IR 浦肯野细胞密度(n/mm)=95.60:1, 其相

对密度比上升 73.06%；在青年猫中，Glu-IR 浦肯野细胞平均灰度值:GABA-IR 浦肯野细胞平均灰度值=1.03，在老年猫中，Glu-IR 浦肯野细胞平均灰度值:GABA-IR 浦肯野细胞平均灰度值=0.72，其相对灰度值比下降 30.10%。

表 3 青年猫和老年猫小脑皮质 GABA 免疫阳性神经元形态学参数比较 ($\bar{x}\pm SD$, $n=100$)
Tab. 3 Morphological parameters of GABA immunoreactive neurons in cerebellar cortex of young and old cats

	青年猫 Young cats	老年猫 Old cats
分子层神经元密度 Density of neurons in molecular layer(n/mm^2)	428.63 $\pm$ 50.32	277.24 $\pm$ 41.36*
浦肯野细胞线密度 Linear density of Purkinje cells (n/mm)	7.76 $\pm$ 2.62	2.90 $\pm$ 1.93*
颗粒层神经元密度 Density of neurons in granular layer (n/mm^2)	7.68 $\pm$ 4.25	7.31 $\pm$ 4.36**
浦肯野细胞直径 Diameter of Purkinje cells (μm)	20.47 $\pm$ 1.89	18.58 $\pm$ 2.33*

* $P<0.01$; ** $P>0.05$.

表 4 青年猫和老年猫小脑皮质 GABA 免疫阳性神经元平均灰度值比较 ($\bar{x}\pm SD$, $n=100$)
Tab. 4 Comparison of average gray value of GABA immunoreactive neurons in cerebellar cortex of young and old cats

	青年猫 Young cats	老年猫 Old cats
分子层神经元 Neurons in molecular layer	114.21 $\pm$ 19.44	147.35 $\pm$ 23.76*
浦肯野细胞 Purkinje cells	120.92 $\pm$ 22.65	156.42 $\pm$ 19.28*
颗粒层神经元 Neurons in granular layer	148.75 $\pm$ 26.49	166.55 $\pm$ 23.46*

* $P<0.01$.

3 讨 论

3.1 Glu 表达的老年性变化

本实验显示，猫在衰老过程中小脑皮质神经元（颗粒细胞和浦肯野细胞）Glu 免疫反应强度（免疫反应强度与平均灰度值成反比）显著上升，即神经元的 Glu 表达增加，而以往学者对大鼠小脑整体水平的测量发现 Glu 的含量无显著变化(Yang et al, 1997; Benuck et al,1995; Najlerahim et al,1990)，推测主要由于衰老时颗粒细胞和浦肯野细胞密度下降，其神经元丢失所致。老年猫颗粒层 Glu 免疫阳性细胞(即为颗粒细胞)密度较青年猫显著下降，这与在人和大鼠小脑的 Nissl 染色结果(Hui et al, 1999; Renovell et al,1996)一致。颗粒细胞的轴突组成的平行纤维是浦肯野细胞主要的兴奋性传入纤维(Shou, 2006; Pisu et al,2003.)，因此，颗粒细胞的丢失可能会减弱对浦肯野细胞的兴奋性输入。浦肯野细胞本身是一种抑制性神经元，出现 Glu 免疫阳性反应主要是由于爬行纤维等在其胞体和突起表面形成兴奋性突触的原因（Glu 主要储存于突触囊泡中）(Shou, 2006)。老年猫浦肯野细胞密度比青年猫显著减小，这与在其它老年动物小脑皮质中观察结果一致（Sturrock,1989; Hara et al,1992; Hadj-Sahraoui et al, 2001）。浦肯野细胞是小脑皮质

唯一的传出神经元，它通过庞大的树突野接受分子层神经元、平行纤维等传来的信息并进行整合，传出信息投射至小脑髓质的深部核团。因此，衰老过程中浦肯野细胞丢失、阳性树突分支减少，必然会导致感觉信息的接受减少，同时，浦肯野细胞至小脑核团的信息输出也将减少。虽然颗粒细胞和浦肯野细胞的密度显著下降，但两者 Glu 免疫反应却显著增强，这与衰老过程中大鼠小脑谷氨酰胺合成酶活性提高(Najlerahim,1990)相适应。神经元 Glu 表达增加，一方面可能是作为其神经元和突触后膜 Glu 部分受体丢失(Ishige K,1995; Gutierrez,1997)的一种代偿性作用，另一方面又可产生神经兴奋毒性，引起细胞的损伤或凋亡(Beilharz et al, 1995; Johnson et al,1995; Li et al, 1995; Guegan et al, 1996)，成为细胞丢失的重要原因之一。

3.2 GABA 表达的老年性变化

衰老过程中小脑 GABA 含量的变化存在不同的观点，有学者（Yang et al, 1997）认为无显著变化，也有学者(Agaev & Ifraimova ,1977)认为是下降。本实验 GABA 免疫组织化学染色结果显示：老年猫小脑皮质神经元 GABA 免疫反应强度显著减弱，即其表达下降，特别是浦肯野细胞变化最为明显，这与对老年狗小脑(Agaev & Ifraimova ,1977)观察结果基本一致。GABA 表达的下降可能与衰老过

程中大鼠小脑皮质中的谷氨酸脱羧酶 (GAD, GAD 在一定程度上反映了 GABA 的存在)活性下降 (Felici et al,1989), 以及 GABA 受体减少(Ishige et al,1995; Gutierrez et al, 1997), GABA 转氨酶 (GABA-T) 活性降低(Sherif et al,1991)等相适应。GABA 免疫染色结果还显示: 在衰老过程中猫小脑皮质分子层神经元 (即星形细胞和篮状细胞) 密度和浦肯野细胞密度显著下降, 这与在大鼠小脑皮质 Nissl 染色的观察结果(Sturrock,1989)一致。分子层神经元与浦肯野细胞形成抑制性突触, 当浦肯野细胞接受平行纤维传来的神经冲动而兴奋时, 其周围浦肯野细胞同时由 GABA 能中间神经元 (主要为分子层星形细胞、篮状细胞) 的介导而抑制, 从而进行精确调节(Zou,2006)。所以星形细胞、篮状细胞等中间神经元丢失, 导致其周围抑制能力下降, 将会影响到小脑的精确调控能力。颗粒层 GABA 免疫阳性细胞 (为高尔基细胞) 虽然密度无显著变化, 但其免疫阳性强度也显著减弱。高尔基细胞接受到平行纤维、爬行纤维和苔藓纤维的兴奋性传入时, 随即反馈抑制周围颗粒细胞的活动, 造成颗粒细胞的兴奋性反应在空间上局限起来, 即由苔藓纤维直接兴奋的颗粒细胞处在兴奋状态, 而其外围的颗粒细胞则处在抑制状态, 从而进行精确调控 (Zou,2006)。因此, 高尔基细胞的 GABA 表达下降, 抑制能力减弱, 也可能对小脑的精确调控产生影响。

3.3 Glu 与 GABA 表达的老年性变化比较

Glu 和 GABA 作为一对重要的兴奋性和抑制性递质, 对维持小脑兴奋和抑制功能的平衡起至关重要的作用。衰老时, 小脑皮质神经元 Glu 含量增加, 而 GABA 的含量下降, 这将导致 Glu/GABA 比值发生变化, 兴奋性与抑制性失衡。例如, Glu-IR 浦肯野细胞与 GABA-IR 浦肯野细胞相对灰度值比下降 30.10%, 从一个侧面反应了兴奋性调节与抑制性调节在细胞水平上的失衡。另外, Glu-IR 颗粒细胞与 Glu-IR 浦肯野细胞相对密度比上升 5.49%, 因为颗粒细胞发出的平行纤维直接调节浦肯野细胞, 所以, 这将会使单个浦肯野细胞兴奋性传入增加; 分子层 GABA 能神经元对浦肯野细胞抑制能力减

弱, 但分子层 GABA-IR 细胞与 GABA-IR 浦肯野细胞相对密度比上升 73.06%, 因为星形细胞和篮状细胞能对浦肯野细胞产生抑制作用, 所以, 这会使单个浦肯野细胞抑制性传入增加。这两方面的增加, 将会使浦肯野细胞的兴奋性传入和抑制性传入能够达到阈或阈上刺激, 以弥补神经元丢失或 GABA 表达下降所造成兴奋性或抑制性刺激减弱, 从而保证信息的有效传递。

Glu 和 GABA 不仅在功能上相互协同, 在代谢上也可相互转化。衰老时小脑皮质神经元 Glu 含量增多和 GABA 含量减少, GAD (GAD 既是 Glu 的降解酶, 又是 GABA 的合成酶) 活性降低(Phillis et al,1999) 可能是其重要原因之一。Glu 的表达增强, 导致 Glu 受体受到过度刺激, 可能又会产生兴奋性毒性。GABA 具有神经保护作用, 能平衡神经元兴奋性异常(Yao et al, 1998)。因此, 衰老过程中神经元 Glu 的表达增强, Glu 受体受到过度刺激, 产生兴奋性毒性, 而 GABA 表达下降, 保护能力减弱, 可能引起神经元损伤或凋亡。GABA 还能提高脑的血流量 (Fergus & Lee, 1997), 衰老过程中小脑 GABA 表达下降时, 小脑的血流量减少, 将会导致物质供给能力下降和代谢废物不能及时运走, 脑组织受到损伤。因而 Glu 表达增强和 GABA 表达下降可能会进一步促进小脑的衰老。

综上所述, 衰老时, 猫小脑皮质内神经元 Glu 的表达增加, 产生兴奋性毒性, 可能是神经元丢失的重要原因; GABA 的表达下降, 抑制能力减弱, 可能会影响到小脑的精确调控; 兴奋性和抑制性信息虽然能进行有效传递, 但两者之间的平衡已发生变化; 星形细胞、篮状细胞、颗粒细胞和浦肯野细胞等神经元的丢失将会导致小脑信息输入和输出的总量减少。这些可能是小脑功能衰退的重要原因。然而, 衰老是一个复杂的生命现象, 是众多内因 (例如小脑内的甘氨酸、天门冬氨酸、神经因子、多种 Glu 受体和 GABA 受体等) 和外因共同作用的结果, 但本实验仅从细胞水平上, 利用免疫化学方法得出猫小脑皮质老年性变化的部分资料, 因此, 探索衰老时小脑生理机能的变化, 还需深入研究。

参考文献:

Agae TM, Ifraimova ZN. 1977. Age and changes in the concentration of dicarboxylic amino acids and GABA in different portions of the dog

cerebral cortex and cerebellum[J]. *Ukr Biokhim Zh*, 49 (2): 27-29.
Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD.

1995. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, **29** (1): 1-14.
- Benuck M, Banay-Schwartz M, DeGuzman T, Lajtha A. 1995. Effect of food deprivation on glutathione and amino acid levels in brain and liver of young and aged rats[J]. *Brain Res*, **678** (1-2): 259-264.
- Chen Z, Lu Q, Ye SM, Zhu JQ. 1997. The regulation of GABA on development of GABA receptors in embryonic mice cerebral cortex[J]. *Zooll Res*, **18** (3): 299-304. [陈 忠, 陆 勤, 叶世鸣, 朱剑琴. 1997. GABA 对小鼠大脑皮质中 GABA 受体胚胎发育的调节, 动物学研究, **18** (3): 299-304.]
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL. 1991. GABA autoreceptors regulate the induction of LTP[J]. *Nature*, **349** (6310): 609-11.
- Felici L, Bronzetti E, Amenta F. 1989. Enzyme histochemistry of glutamate dehydrogenase in ageing rat cerebellar cortex[J]. *Mech Ageing Dev*, **47** (3): 199-205.
- Fergus A, Lee KS. 1997. GABAergic regulation of cerebral microvascular tone in the rat[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, **17** (9): 992-1003.
- Guegan C, Boutin H, Boudry C, MacKenzie ET, Sola B. 1996. Apoptotic death in cortical neurons of mice subjected to focal ischemia[J]. *C R Acad Sci III*, **319** (10): 879-885.
- Gutierrez A, Khan ZU, Miralles CP, Mehta AK, Ruano D, Araujo F, Vitorica J, De Blas AL. 1997. GABAA receptor subunit expression changes in the rat cerebellum and cerebral cortex during aging[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, **45** (1): 59-70.
- Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Delhaye-Bouchaud N, Herrup K, Mariani J. 2001. Progressive atrophy of cerebellar Purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+sg))[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, **126** (2): 201-209.
- Hara H, Onodera H, Kato H, Kogure K. 1992. Effects of aging on signal transmission and transduction systems in the gerbil brain: morphological and autoradiographic study[J]. *Neuroscience*, **46** (2): 475-488.
- Hilber P, Caston J. 2001. Motor skills and motor learning in Lurcher mutant mice during aging[J]. *Neuroscience*, **102** (3): 615-623.
- Hui L, Hou JJ, Zhang R. 1999. Age-related changes of the cerebellar cortex thickness and the number of neurons in the rat cerebellum[J]. *Journal of Clinical Medical Officer*, **27** (1): 5-8. [惠 玲, 侯家骥, 张 让. 1999. 大鼠小脑皮质厚度及神经元数量的年龄性变化. 临床军医杂志, **27** (1): 5-8.]
- Ishige K. 1995. Age-related changes in [3H]baclofen binding in mouse cerebellum[J]. *Gen Pharmacol*, **26** (6): 1229-1235.
- Jernigan TL, Archibald SL, Fennema-Notestine C, Gamst AC, Stout JC, Bonner J, Hesselink JR. 2001. Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum[J]. *Neurobiol Aging*, **22** (4): 581-594.
- Johnson EM Jr, Greenlund LJ, Akins PT, Hsu CY. 1995. Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, **12** (5): 843-852.
- Kosenko E, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadel M, Erceg S, Sánchez-Perez AM, Felipe V. 2003. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide[J]. *Neurochem Int*, **43** (4-5): 493-499.
- Li Y, Chopp M, Jiang N, Zaloga C. 1995. In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, **28** (1): 164-168.
- Marshall JF. 1982. Sensorimotor disturbances in the aging rodent[J]. *J Gerontol*, **37** (35): 548-554.
- McDonald JW, Johnston MV. 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development[J]. *Brain research*, **15** (1): 41-70.
- Monfort P, Kosenko E, Erceg S, Canales JJ, Felipe V. 2002. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors[J]. *Neurochem Int*, **41** (2-3): 95-102.
- Najlerahim A, Francis PT, Bowen DM. 1990. Age-related alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain[J]. *Neurobiol Aging*, **11** (2): 155-158.
- Phillis JW, Song D, Guyot LL, O'Regan MH. 1999. Lactate reduces amino acid release and fuels recovery of function in the ischemic brain[J]. *Neurosci Lett*, **272** (3): 195-198.
- Pisu MB, Guioli S, Conforti E, Bernocchi G. 2003. Signal molecules and receptors in the differential development of cerebellum lobules. Acute effects of cisplatin on nitric oxide and glutamate systems in Purkinje cell population[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, **145** (2): 229-240.
- Renovell A, Giner J, Portoles M. 1996. Loss of granule neurons in the aging human cerebellar cortex[J]. *Int J Dev Biol*, **1**: 193-194.
- Sabbatini M, Barili P, Bronzetti E, Zaccheo D, Amenta F. 1999. Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex[J]. *Mech Ageing Dev*, **108** (2): 165-172.
- Salinska E, Stafiej A. 2003. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release[J]. *Neurochem Int*, **43** (4-5): 469-74.
- Sherif F, Eriksson L, Orelund L. 1991. GABA-transaminase activity in rat and human brain: regional, age and sex-related differences[J]. *J Neural Transm Gen Sect*, **84** (1-2): 95-102.
- Shou TD. 2006. Neurobiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 74-75. [寿天德. 2006. 神经生物学. 北京: 高等教育出版社, 74-75.]
- Sturrock RR. 1989. Changes in neuron number in the cerebellar cortex of the ageing mouse[J]. *J Hirnforsch*, **30** (6): 757-760.
- Yang BH, Huang MY, Jiang Y. 1997. The effects of aging on amino acid level in different region of rat brain[J]. *AminoAcid & Biotic Resources*, **19** (3): 32-34. [杨炳华, 黄美英, 蒋 滢. 1997. 衰老对大鼠脑区氨基酸水平的影响. 氨基酸和生物资源, **19** (3): 32-34.]
- Yao H, Wan Q, Huang YH, Wang FZ, Fan M. 1998. γ -Aminobutyric acid inhibits anoxia induced Ca^{2+} influx in neurons[J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, **14** (1): 5-9. [要 航, 万 勤, 黄燕华, 王福庄, 范 明. 1998. γ -氨基丁酸抑制缺氧所致神经元钙超载. 中国应用生理学杂志, **14** (1): 5-9.]
- Zhang C, Hua T, Zhu Z, Luo X. 2006. Age-related changes of structures in cerebellar cortex of cat[J]. *J Biosci*, **31** (1): 55-60.
- Zou ZZ. 2006. Histology & Embryology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 82-84. [邹仲之. 2006. 组织学与胚胎学. 北京: 人民卫生出版社, 82-84.]