



高等医学院校教材

供基础、临床、预防及相关专业使用

医学神经生物学

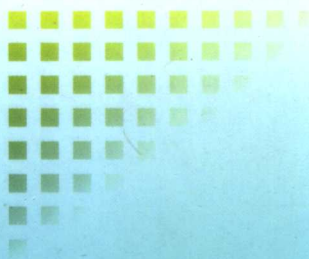
基础

Y

IXUE SHENJING

SHENGWUXUE JICHU

● 阮怀珍 蔡文琴 主编



第四军医大学出版社

医学神经生物学基础

主 编 阮怀珍 蔡文琴

编 者 (以姓氏笔画为序)

阮怀珍 杨 忠 李淑蓉

陈鹏慧 范晓棠 胡志安

袁碧波 蔡文琴

第四军医大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学神经生物学基础/阮怀珍,蔡文琴主编. —西安:第四军医大学出版社,2006. 4
ISBN 7-81086-254-5

I. 医… II. ①阮… ②蔡… III. 人体生理学:神经生理学 IV. R338

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 016462 号

医学神经生物学基础

主 编 阮怀珍 蔡文琴

责任编辑 土丽艳 王文岚

出版发行 第四军医大学出版社

地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)

电 话 029-84776765

传 真 029-84776764

网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>

印 刷 西安新华印刷厂

版 次 2006 年 5 月第 1 版 2006 年 5 月第 1 次印刷

开 本 787×1092 1/16

印 张 18.5

字 数 410 千字

书 号 ISBN 7-81086-254-5/R·196

定 价 32.00 元

(版权所有 盗版必究)

前 言

神经生物学是神经科学中的基础学科,是一门从分子、细胞和整体水平研究神经系统的结构、功能与发育等问题的综合性科学,它的研究涉及医学各个传统的学科,如解剖学、生理学、生物化学、药理学、病理学、免疫学、细胞生物学及分子生物学等。近几年来,这门仅有40年历史的学科,取得了突飞猛进的发展。因此,将神经生物学这门学科纳入医学课程体系已是形势发展的需要。第三军医大学于1997年建立了独立的神经生物学教研室,为研究生开设了神经生物学课程,并逐步纳入医疗系本科生的课程体系。本书正是基于本科生的教学需要而编著的。

近几年神经科学迅猛发展,但受学生的基础知识和教学时数的限制,不可能在有限的篇幅内对各个方面进行全面详细及深入的介绍,因此,本书命名为“医学神经生物学基础”。全书约40万字,共分12章,包括神经生物学的地位、研究方法、形态学基础,神经递质与神经肽,神经元信号传导,感知觉,神经系统对运动的调控,神经内分泌与神经免疫调节,大脑高级整合功能,神经营养因子及中枢神经系统的发育,脑损伤修复与神经再生,以及某些神经系统疾病的基础与临床等。既注重神经生物学的基本理论基础,又注重神经生物学的学术前沿,如胚胎干细胞、神经干细胞及神经元分化迁移的调控,神经胶质细胞特别是嗅神经被膜细胞在神经再生中的作用,神经与神经内分泌整合的概念及研究进展,神经元信号传导的多种途径,包括突触、受体、离子通道等,具有较强的创新性。在编写中既注意到神经生物学的完整性,又突出了我校在中枢神经系统的发育与再生,学习和记忆以及痛觉的调制等研究领域的优势及部分研究成果,具有自身的特色。

编者中有从事神经生物学教学及研究多年的老专家,但以我室在神经生物学教研工作中崭露头角的中、青年科技工作者为主。由于知识水平的限制,疏漏和谬误在所难免,敬请读者批评指正。

本书可作为医学本科生教材,也可供从事神经科学研究的研究生及基础与临床的科技工作者参考。希望本书的出版能够为我国神经生物学的教学贡献一点微薄的力量。最后对第三军医大学校领导及教保处为本书的出版所给予的支持表示衷心的感谢。

蔡文琴

2006年2月

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 概述	(1)
一、神经生物学概况	(1)
二、神经科学的发展史	(2)
第二节 常用神经生物学研究方法	(3)
一、形态学方法	(4)
二、神经组织培养技术	(6)
三、电生理学方法——膜片钳	(8)
第二章 中枢神经系统的细胞组织构成	(12)
第一节 神经元与突触	(12)
一、神经元	(12)
二、突触	(14)
第二节 神经胶质细胞	(21)
一、星状胶质细胞	(22)
二、少突胶质细胞	(26)
三、小胶质细胞	(28)
四、其他类型的神经胶质细胞	(29)
第三节 中枢神经系统组织学	(30)
一、大脑皮质	(30)
二、小脑皮质	(32)
三、脊髓灰质	(34)
四、海马	(34)
第三章 神经递质与神经肽	(36)
第一节 概述	(36)
一、神经递质	(36)
二、神经调质	(36)
三、经典神经递质与神经肽共存	(37)
第二节 乙酰胆碱	(38)
一、胆碱能神经元的胞体定位及纤维投射	(38)
二、乙酰胆碱的代谢	(39)
三、乙酰胆碱受体	(40)

四、乙酰胆碱的生理功能	(41)
第三节 儿茶酚胺	(42)
一、儿茶酚胺能神经元的胞体定位及纤维投射	(42)
二、儿茶酚胺的代谢	(43)
三、儿茶酚胺受体	(45)
四、儿茶酚胺类递质的生理功能	(46)
第四节 5-羟色胺	(48)
一、5-羟色胺能神经元胞体定位及纤维投射	(48)
二、5-羟色胺的生物代谢	(49)
三、5-羟色胺受体	(50)
四、5-羟色胺的生理功能	(50)
第五节 兴奋性和抑制性氨基酸	(51)
一、兴奋性氨基酸	(51)
二、抑制性氨基酸—— γ -氨基丁酸	(54)
第六节 一氧化氮	(57)
一、一氧化氮的生物合成	(57)
二、一氧化氮合酶在中枢神经系统中的分布	(57)
三、一氧化氮的作用方式	(57)
四、神经系统中一氧化氮的生理作用	(58)
第七节 神经肽	(58)
一、神经肽概述	(58)
二、下丘脑神经肽	(62)
三、垂体肽	(64)
四、阿片肽	(66)
五、脑肠肽	(68)
六、其他神经肽	(71)
第四章 神经元信号传导	(75)
第一节 神经元电信号传导	(75)
一、电压门控性离子通道	(75)
二、化学门控性离子通道	(79)
三、静息膜电位	(80)
四、突触后电位	(83)
五、动作电位	(85)
第二节 神经元化学信号传导	(88)
一、膜代谢性受体	(88)
二、G蛋白跨膜信号转导	(89)
三、胞浆内第二信使	(93)

四、即刻早期基因家族与第三信使	(97)
第五章 感知觉	(101)
第一节 感知觉概述	(101)
一、感受器的活动特征	(101)
二、感觉信号在感觉通路中的编码	(102)
三、感知觉的一般规律	(102)
第二节 视觉	(103)
一、光感受与信息处理	(103)
二、视觉中枢的神经机制	(107)
第三节 听觉	(112)
一、声音信息的感受与传递	(112)
二、声音的分析	(116)
三、听觉的中枢分析	(117)
第四节 痛觉及其调制	(118)
一、痛觉与伤害性感受器的激活	(118)
二、躯体痛觉的初级整合——脊髓背角	(120)
三、痛觉的调制	(123)
第六章 神经系统对运动的调控	(126)
第一节 脊髓反射行为及其控制	(126)
一、脊髓运动神经元	(127)
二、脊髓中间神经元的整合作用	(129)
三、脊髓反射行为	(131)
四、高位中枢对脊髓反射性行为的调控	(133)
第二节 随意运动的控制	(134)
一、大脑皮质对随意运动的控制	(134)
二、初级运动皮质与运动的执行	(137)
三、运动前区在运动计划中的重要作用	(138)
四、顶后叶皮质在运动调制中的重要作用	(139)
第三节 节律性行为和姿势的控制	(140)
一、节律性行为——行走与奔跑	(140)
二、姿势的控制	(142)
第四节 脑干与运动控制	(143)
一、网状结构	(143)
二、中枢前庭系统	(145)
第五节 小脑对运动的调节	(148)
一、小脑的解剖学分部及结构特征	(148)

二、小脑皮层神经元环路的组成及其活动	(149)
三、小脑的神经联系、起源和功能	(151)
第六节 基底神经节对运动的调控	(154)
一、基底神经节的组成	(154)
二、纹状体运动纤维与大脑皮层的回路	(155)
三、神经回路中的递质关系	(156)
第七章 神经内分泌与神经免疫调节	(158)
第一节 下丘脑-垂体系构成神经内分泌的主轴	(158)
一、下丘脑的结构和功能	(159)
二、神经垂体及其与下丘脑的关系	(164)
三、脑垂体的血管分布与下丘脑控制腺垂体分泌的关系	(164)
四、下丘脑控制垂体的枢纽——正中隆起	(165)
五、下丘脑神经内分泌活动的神经-体液调节	(166)
第二节 脑是激素作用的靶器官	(168)
一、激素对脑的作用机理	(168)
二、几类激素对脑发育的影响	(169)
三、激素对神经系统功能的影响	(172)
第三节 神经-内分泌-免疫调节网络	(172)
一、神经系统和内分泌系统对免疫功能的调节作用	(173)
二、免疫系统对神经系统和内分泌系统的调节作用	(175)
三、内分泌系统和神经系统的相互关系	(177)
第八章 大脑高级整合功能	(178)
第一节 学习与记忆	(178)
一、学习与记忆的类型	(178)
二、学习记忆的种系发展与个体发育	(180)
三、学习记忆的神经机制	(181)
四、中枢神经系统的可塑性	(185)
第二节 语言和思维	(190)
一、语言和思维脑功能一侧化概念的形成与发展	(191)
二、语言、思维脑功能一侧化的电生理学研究	(192)
三、右脑和语言思维活动	(192)
四、语言脑功能一侧化和第二语言的获得	(193)
第三节 生物节律与睡眠	(194)
一、生物节律	(194)
二、睡眠与觉醒	(197)

第九章 神经营养因子	(202)
第一节 神经营养素家族	(203)
一、神经生长因子	(204)
二、脑源性神经营养因子	(205)
三、其他神经营养素	(206)
四、神经营养素受体及其信号转导	(207)
五、神经营养素的作用	(210)
六、神经营养素与神经系统变性病	(213)
第二节 其他神经营养因子	(215)
一、睫状神经营养因子	(215)
二、胶质细胞源性神经营养因子	(219)
三、成纤维细胞生长因子	(222)
四、胰岛素样生长因子	(225)
五、表皮生长因子家族	(227)
第十章 中枢神经系统的发育	(230)
第一节 干细胞	(230)
一、胚胎干细胞	(230)
二、神经干细胞	(234)
第二节 中枢神经系统的发生与分化	(236)
一、神经管的形成和早期分化	(236)
二、脊髓的发育	(239)
三、脑的发生	(240)
第三节 中枢神经系统发育的特点	(243)
一、神经诱导现象	(243)
二、神经细胞分化现象	(243)
三、神经细胞的迁移现象	(243)
四、神经细胞的程序性死亡	(245)
第四节 脑发育异常及发育中的脑损伤	(245)
一、脑发育异常	(246)
二、发育脑的易损性	(246)
第十一章 脑损伤修复与神经再生	(248)
第一节 神经损伤与再生	(248)
一、神经元胞体反应	(248)
二、神经轴突对损伤的反应——轴突溃变	(252)
三、神经再生	(253)
四、胶质细胞对 CNS 再生的影响	(254)

第二节 神经干细胞与脊髓损伤修复	(256)
第十二章 临床神经生物学基础	(259)
第一节 概述	(259)
一、脑老化	(259)
二、神经系统遗传性疾病	(261)
三、神经系统变性病	(264)
第二节 阿尔茨海默病	(264)
一、阿尔茨海默病的病理学	(265)
二、阿尔茨海默病的分子遗传学	(270)
三、影响阿尔茨海默病的其他因素	(274)
第三节 帕金森病	(275)
第四节 神经系统其他退行性疾病	(280)
一、亨廷顿病	(280)
二、肌萎缩性侧索硬化	(282)
三、Wilson 病	(285)
四、脊髓空洞症	(285)
五、遗传性共济失调	(285)
参考书目	(286)

第一章 绪 论

第一节 概 述

一、神经生物学概况

神经生物学是一门从分子细胞和整体水平研究神经系统的结构、功能与发育等问题的综合性科学。1966年美国哈佛大学成立了世界上第一个神经生物学系以来,这门仅有40年历史的学科已取得了突飞猛进的发展。

神经生物学(neurobiology)是基础神经科学的主干,神经科学(neuroscience)可以分为基础神经科学和临床神经科学两大部分,后者以研究与神经系统有关的病症为主,前者侧重基础理论。基础神经科学中还有一大门极为重要的计算神经科学(computational neuroscience),它与神经生物学有密切关系,但其独立的方法和内容超出了生物医学范围,而和电脑、人工智能及信息科学关系密切。神经科学的目标是认识脑、保护脑和创造脑,它的重点在脑,所以也有人把神经科学称之为脑科学(brain science)。

神经生物学的特点:首先它是以研究神经系统为目的的综合科学,它包括研究神经系统的各个传统学科,如解剖学、组织化学、病理学、免疫学、分子生物学以及心理学等。其次它是生命科学中一门基础实验科学,神经生物学的大量研究工作是在进行动物实验。有的文献往往将神经生物学与神经科学(neuroscience)两个名词混用,但是严格讲,神经科学是个总称,除神经生物学外,还包括计算神经科学以及临床神经科学即神经病学、神经外科学及精神病学等。除此以外,神经生物学还是一门研究神经系统的新兴的、综合的、基础的实验科学。神经生物学作为一个学科独立出来是数十年来生命科学飞速发展的自然结果。研究神经系统的学者逐步认识到,必须跨越传统学科的范畴,才能真正取得对神经系统研究的突破。

神经生物学的研究范围十分广泛,根据近年的发展,分为以下六个学科领域:

(1) 分子神经生物学(molecular neurobiology)是神经系统研究的一个层次,是在分子水平研究与神经细胞或神经活动有关的化学物质。着重研究神经系统内各种分子的结构、功能、种类、多样性和来源,如受体蛋白、离子通道蛋白和神经营养性物质等的结构与功能,神经系统遗传性疾病的基因定位和变异的研究等都属于分子神经生物学的研究范畴。

(2) 发育神经生物学(developmental neurobiology)是神经科学中一个新兴的重要的分支学科,它的研究包括神经细胞谱系的追踪,神经元发生、诱导、迁移和分化,轴突与树突的发育,突触的发生和神经网络的形成,各脑区的组织发生,发生后的发育、成熟、老化、退变,神

经系统的可塑性,损伤后的再生和修复,以及神经系统退行性疾病的发生机理与脑内移植的应用等。

(3) 细胞神经生物学(neurocytology)是在细胞或亚细胞水平上研究神经系统及其组成成分。如神经细胞骨架成分、线粒体等的结构和功能,细胞水平的各种调控等;神经递质、调质、神经营养因子及各种细胞因子等,及其作用机理及细胞内信号途径、细胞凋亡的发生机理及基因调控等。

(4) 比较神经生物学(comparative neurobiology)是从种系发生上研究神经系统从低级到高级的进化进程及进化规律。某些低等动物如线虫、海兔、乌贼、水蛭等,其神经元总数很少,神经系统组成较简单,是研究神经细胞迁移、突触形成、学习与记忆、各种神经化学物质对神经活动影响的良好实验动物。比如线虫(*Caenorhabditis elegans*)是细胞定数动物,成虫体细胞一共有 1090 个,其中 103 个注定要发生程序性死亡(programmed cell death, PCD),线虫虫体透明,在相差显微镜下,可利用核折光率的不同观察细胞凋亡的过程,PCD 的基因调控机制最先也是从线虫研究上突破的。

(5) 系统神经生物学是以功能系统为研究对象的分支,如躯体运动系统、各种感觉系统、对内脏活动调控的胃肠壁内神经系统(enteric nervous system)、心血管及免疫系统等的神经支配。

(6) 行为神经生物学是在活着的完整动物上,应用行为学或心理学方法,研究神经系统与学习记忆、情感、睡眠与觉醒等生物钟现象,各种内外环境改变对动物行为的影响等。转基因动物及基因敲除(knock out)技术的应用,使基因功能和动物行为的研究得到了很大的进展。

以上只是就研究层次为主题的分支范围,但实际上各学科领域间常有交叉和重叠。如神经系统发育的基因调控,既包括发育神经生物学又包括分子神经生物学的多层次的研究,不能截然分开。

二、神经科学的发展史

上古时代,人们认为“心”为“思”之器官。直至 17 世纪 Willis 才把思维及人体主宰功能定位于大脑。古希腊的哲学家在描述精神和灵魂的概念时,认为思想依靠脑,最早提及了脑的功能。中国古代医学也有“脑为诸髓之海”的描述。

尽管思维、意识、学习、记忆等脑的高级功能最容易引起人们的研究兴趣,但人类对脑的认识都是从最基本的结构与功能活动开始研究的。1543 年, Vesalius 精确描述了人体神经系统的大体解剖结构;1798 年, Galvani 发现了神经活动的电学性质。

19 世纪末叶,在显微镜发明之后,解剖学家 Golgi 发明了选择性显示神经细胞的银染法,即使用至今的 Golgi 氏法。该法可在神经组织切片上显示出少量完整的神经细胞,包括其胞体与突起。生活在同一时代的 Cajal 用此法作了大量的系统观察,1891 年确认神经系统由独立的边界清楚的细胞所组成,这些细胞可有不同的类型并相互联系,但并非是胞浆借突起相互通连的一个合体细胞。Cajal 等工作是对脑认识的一个非常重要进展,初步确定了神经系统结构的细胞(也即神经元)学说。与此同时在生理学方面,英国生理学家 Sherrington 对脊髓的生理功能进行了大量研究,他推想如果 Cajal 关于神经元的认识是正确

的,那么感觉神经到达脊髓的游离末梢必然会以某种特殊的接点与运动神经元发生联系。他在1897年出版的生理学教科书中首次把这种接点称为“突触”。这是继神经元学说之后,神经科学研究中的又一个重要里程碑。后来 Sherrington 还提出了“反射”、“反射弧”以及“整合”的概念。20世纪40年代苏联的 Pavlov 在此基础上提出了条件反射的实验及学说,为现代神经生理学奠定了基础。把原来属于“心理”领域的脑的高级功能纳入了神经生理学的研究范围。

本世纪上半叶,随着各种新技术、新方法的出现,对神经系统的新认识、新进展逐渐增多。1920年德国的 Loewi 等人用蛙心灌流实验显示迷走神经末梢释放“迷走物质”使心脏抑制,在此基础上神经末梢释放化学物质的概念逐步得到了建立。结合 Langley 和 Dale 等工作,逐步证明神经递质作用于受体的信使作用,将化学传递理论由神经肌肉接头扩大到神经接点——突触上来。

50年代, Hodgkin、Huxley 和 Katz 提出了神经元质膜的离子学说,建立了一套可兴奋膜理论。1957年 Eccles 用微电极技术对中枢神经元及突触传递的机制进行了研究,为阐明中枢神经系统的功能做出了突出的贡献。此外50年代发明的电子显微镜,极大地促进了人们对神经元和突触细微结构的认识,进一步支持并巩固了神经元学说。

60年代以后,各种新技术、新方法大量出现并迅速大面积地应用到实际研究中去,如辣根过氧化物酶及荧光染料等束路追踪技术、免疫组织化学技术、免疫电镜技术、放射免疫测定法、电子计算机显微图像分析技术、脱氧葡萄糖法及神经细胞的体外培养法等。70年代以后,出现了显示神经细胞内 mRNA 的原位杂交法, DNA 重组技术,研究神经递质受体分布的定位法,研究神经元质膜离子通道的膜片钳技术等。特别是分子生物学的发展和分子生物学方法在脑研究中的应用,使许多神经系统结构和功能的研究进入了分子水平研究阶段。80年代以后,正电子发射断层扫描技术和磁共振成像技术的应用,可以无损伤地研究活动状态下的脑,以了解脑在正常活动状态下的功能,也可用于脑疾病或损伤的诊断。

90年代神经生物学有了飞跃的发展,更新了许多传统的观念,对脑的结构和功能有了进一步深入的理解,对神经系统疾病的发病机理及防治更前进了一步。就发育神经生物学而言,除神经系统发育及再生的基因调控外,对胶质细胞的功能已赋予了新的内容。胚胎干细胞、神经干细胞以及嵌合体的建立,为神经细胞的发育、诱导、分化提供了新的研究手段,也为脑内移植等展示了光辉的前景。中枢神经的再生过去认为是不可能的,现在应用综合手段如胚胎组织脑内移植,应用抗抑制因子抗体和神经营养因子等都能不同程度地促进中枢神经系统的再生。新近科技工作者还发现过去不为人注意的嗅神经被膜细胞具有比雪旺细胞和星状胶质细胞更强的促轴突再生的能力。这些为神经损伤,特别是脊髓截瘫的患者带来一线曙光。虽然如此,解释、破译脑的奥秘并使之为人类健康服务,将是21世纪的重大课题,任重而道远。

第二节 常用神经生物学研究方法

神经生物学是一门典型的综合性学科,包含众多研究领域,且发展极快。多学科、多层次的研究是神经科学研究的一个显著特点,因而其所涉及的研究方法与手段也是纷繁复

杂、包罗万象。其中既包括了传统生物形态学科的研究方法,同时生物机能与代谢的研究手段也广泛被采用。近几年来,分子生物学技术正被引入这一领域,一些新近发展起来的新技术如计算机模拟网络、无创脑成像技术及单个活细胞分析技术等,也已显示了既往研究方法所不具有的优势。

一、形态学方法

(一)神经束路示踪法——辣根过氧化物酶法

轴浆运输是神经细胞的特性之一,神经元有长短不等的轴突,需要从细胞体不断地将各种成分运输至轴突及其分支以维持神经元代谢;神经末梢所释放的神经肽及合成经典递质所需的酶也在胞体合成;影响细胞代谢的物质,如神经营养因子,从末梢逆向传送到胞体。这些运输现象称为轴浆运输(axoplasmic transport)。根据运输速度分快轴浆运输和慢轴浆运输,快轴浆运输又有顺行和逆行之分,慢轴浆运输则全为顺行,快的顺行运输速度为50~500mm/d,快逆行运输速度为50~80mm/d,慢轴浆运输速度约为5mm/d。中枢神经系统内轴浆运输的速度约为周围神经系统的一半。轴浆运输是个耗能的过程,其机制尚不完全清楚,研究显示微管(microtubule)在轴浆运输中起关键作用。树突也有类似的运输现象。

1. 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)法的原理

HRP法是应用最广泛的神经束路示踪法。HRP是一种含血红素基的植物糖蛋白,将其注入动物体内,可沿轴浆运输线路示踪神经束路。HRP在 H_2O_2 存在条件下,可催化外加联苯胺的氧化反应,反应产物具有特定颜色,如与二氨基联苯胺(DAB)反应呈黄色,与四甲基联苯胺(TMB)反应呈蓝黑色,从而可将标记神经元及其突起显现出来。HRP肌肉注射,可由肌肉神经末梢吸收,沿轴突逆行运输至胞体,标记运动神经元及其树突;HRP神经元胞体区注射,可沿顺行轴浆运输至其传出纤维分布区。

2. HRP法的优点

①方法简便,实验周期仅数天;②HRP细胞内注射,可显示神经元胞体、树突及轴突全貌,形态细节优于Golgi银染法;③DAB-HRP反应产物具有较高的电子密度,既适于光镜也适宜电镜观察;④HRP也可经神经纤维束内注射或经神经断端浸泡吸收。

3. HRP法的主要缺点

①标记过路纤维,既有顺行轴浆运输标记,又有逆行轴浆运输标记,故解释实验结果应审慎;②有效注射范围较难确定。一般认为,中心深染而不能辨认其结构的区域为有效区,而其他可辨认结构的周边区为无效区。

近年来又发展了结合HRP(又称酶标配体)技术,即将植物凝集素(如麦芽凝集素Wheat germ agglutinin, WGA)或细菌毒素(如霍乱毒素Cholera toxin, CT)与HRP共价耦联,做成酶标配体,由于配体(植物凝集素和细菌毒素)能高度特异性地与受体结合,使HRP通过胞饮作用而被摄取。有报道这种由受体介导的胞饮比无受体介导的一般胞饮效率高得多,故提高了灵敏度,降低了使用剂量。

(二)免疫细胞化学技术

1. 基本原理

免疫细胞化学有时又称免疫组织化学,它是利用抗原与抗体结合的免疫学原理,用标

记的抗体(或抗原)对细胞或组织内相应的抗原(或抗体)进行定性、定位及定量的检测,通过对标记物进行组织化学的呈色反应后,用显微镜在组织原位进行观察。凡是能作为抗原或半抗原的物质,如各种蛋白质、多肽、核酸、激素、磷脂、多糖、受体及病原体都可用相应的特异性抗体在组织或细胞水平用免疫细胞化学的手段检出和研究。

免疫细胞化学技术具有特异性强、敏感性高等突出优点,现今已有大量商品化抗体及各类试剂盒出现,使免疫细胞化学技术得到了广泛开展,已成为生物学和众多医学学科的常用研究手段。根据所用标记物的不同,免疫细胞化学技术可分为免疫荧光细胞化学技术、免疫酶标细胞化学技术、免疫金/银细胞化学技术、免疫铁蛋白技术、亲和免疫细胞化学技术以及免疫电镜技术等。而近年来在核酸分子原位杂交技术中采用生物素、地高辛等非放射性物质标记探针,再和相应的免疫细胞化学方法结合进行显色,已发展成为杂交免疫细胞化学技术。

2. 主要过程与步骤

免疫细胞和(或)组织化学技术的全过程主要包括:①抗原的提取和纯化;②免疫动物或进行细胞融合(单克隆抗体);③抗体提取纯化和效价检测;④标记抗体;⑤细胞或组织切片标本制备;⑥免疫细胞化学反应和显色;⑦观察和记录结果。现在许多抗原及特异性抗体均有商品化供应,使用不同标记物的二抗和三抗试剂盒国内外亦有众多厂家生产,因此免疫细胞化学技术的过程已被大大简化,研究者须做的主要工作常常就是制备标本和免疫染色。但要进行一种新的抗原物质的研究时,还须进行抗原、抗体的自行制备。

有了特异性强、质量高的抗体,对组织材料的正确处理及标本制备是获得良好免疫细胞化学结果的前提。标本的制备过程中组织的固定与切片是两个主要环节。固定的目的是为了保持细胞与组织的原有形态结构,防止抗原丢失和组织自溶,因此最大限度地保存抗原和维持组织细胞形态是理想固定液的两条标准。目前尚没有适用于所有抗原的万能固定液,故需根据不同抗原并结合文献进行摸索选择。对脑组织而言,Zamboni's液、4%多聚甲醛等是较常使用的固定剂。中枢神经组织由于组织柔嫩、难以快速取材,因此多对动物进行灌注固定,首先用温生理盐水通过主动脉插管冲洗尽血液,再用预冷固定液灌注,取出组织后再用相同固定液后固定12~24h。培养神经组织或细胞的固定较为简单,用温生理盐水或磷酸缓冲液冲洗后固定数十分钟即可,其中冷丙酮或丙酮与乙醇的混合液最为常用。

除细胞涂片或培养组织外,取材的神经组织常须进行组织切片以便染色,神经生物学的研究中由于细胞较大,同时为了便于神经纤维追踪,切片厚度常控制在20~30微米。常用的切片方法包括冰冻切片、石蜡切片、振动切片及超薄切片等。其中冰冻切片是最常用的方法,其主要优点是能较完好地保存抗原活性从而增加或确保抗原的检出率。冰冻切片中为了减少冰晶的形成,最好选择恒冷箱切片机进行,同时在切片前注意将组织置于20%~30%蔗糖溶液至组织下沉以减少组织含水量。用液氮对组织先进行速冻后再行切片染色常也能取得较好结果。

免疫染色无疑是免疫细胞化学中最关键的步骤,一般染色程序主要包括:①用标记抗体与标本中抗原反应结合;②用磷酸盐缓冲液(PBS)洗去未结合成分;③直接观察结果(免疫荧光直接法),或显色后用普通光学显微镜观察(免疫酶直接法)。在此基础上发展出了

间接法、多层法与双标记法等方法。

同时在免疫染色过程中为了增加特异性染色,减少或消除非特异性染色,常常在特异性抗体(一抗)孵育前及孵育过程中加用 H_2O_2 预孵,动物血清封闭,蛋白酶消化及除垢剂(TritonX-100等)处理等步骤。最后须强调,免疫组织及细胞化学均须设置对照实验。

(三)神经系统功能活动形态定位法

要全面了解神经系统,常需要将功能和形态研究相结合。现在一些方法能将形态定位与细胞功能活动结合起来,如脱氧葡萄糖法、c-fos 法、细胞色素氧化酶法,以及一氧化氮合酶法等。主要介绍一氧化氮合酶法。

还原型磷酸烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,或还原型辅酶 II - 黄递酶(reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase),简称 NADPH-diaphorase 或 NADPH-d,是一种一氧化氮合酶(nitric oxidase synthase),对脑中产生 NADPH-d 的神经元可以进行特异性的组织化学标记(Hope BT 等,1991)。此法最早报道于 1983 年(Scherer-Singler 等),当时这种 NADPH-d 特异性神经组织化学法并未引起普遍关注。近几年一氧化氮(NO)的多种重要生理作用受到重视,此种组织化学技术随之广泛应用。例如,已知 NO 是 Hebb 突触的突触后神经元向突触前神经元释放的一种逆行性信使,与学习和记忆的长时程增强(LTP)现象有关。NADPH-d 阳性神经元对脑缺血及兴奋性神经毒素具有选择性拮抗作用。NADPH-d 阳性神经元在舞蹈病患者的纹状体中可选择性地免受损害等。NADPH-d 组化法很简便,用 NADPH 和氯化硝基四氮唑蓝(nitroblue tetrazoline chloride, NBT)与固定后的脑切片一起孵育,NADPH-d 阳性神经元可把 NBT 还原为不可溶的深蓝色 formazan 反应产物。NADPH-d 组化法和不同的神经递质及神经活性物质的免疫组织化学法可联合应用,标记共存神经元。并且 NADPH-d 标记可以呈现 Golgi 样的完整神经元形态。

二、神经组织培养技术

(一)概述

神经组织培养就是从机体中取出神经组织或细胞,模拟机体内生理条件在体外进行培养,使之生存和生长。1907 年 Harrison 用蛙的淋巴液在体外成功培养蛙胚神经管和肌肉组织,观察到神经突起由神经元长出,创立了在体外观察与研究活组织的方法,并以此支持了神经元学说。广义的神经组织培养包括器官、组织及细胞水平的培养。器官培养是将神经组织切成小薄片,使器官的原基、器官的一部分或整个器官在体外存活,生长并基本保持其原有的结构与功能,如脊髓连同背根神经节的联合培养,在发育神经生物学中常采用的神经板、神经嵴与神经管培养等。组织培养是将神经组织切成薄片,观察从组织生长或迁移出来的细胞,但培养中的组织常难以长时间维持其原有结构。细胞培养则是将神经组织用物理或酶学的方法将组织分离成单个细胞进行培养,这也是当今最常用的神经组织培养方法。自 80 年代以来,分离细胞培养更逐步向单一型细胞培养发展。几种方法各有其优缺点,应根据实验目的进行选择。

自组织培养方法建立至今,由于方法与技术的不断改进和发展,特别是近二十余年来商品化合成培养基的出现, CO_2 恒温孵箱和超净工作台的普及使用,以及神经科学的日益受重视,神经组织培养在神经生物学领域得到了广泛应用。该方法具有简化细胞生长环

境、明确生长条件、便于施加实验因素及容易获得活体直接观察结果等优点,因而其已成为研究神经系统结构与功能的有效手段。神经组织培养可用来研究各种理化因素(如激素、生长因子、药物、毒物和温度等)对活细胞的直接影响,并容易观察记录;而组织培养与多种方法的联合应用,可研究某种因素对细胞增殖、分化、代谢、运动、分泌等影响与调节的动态过程,获得在体实验难以达到的研究目的。当然组织培养作为一种方法也存在一定的不足,其中最重要的一点就是尽管培养技术不断发展,培养组织与细胞与在体环境仍存在相当差异,这是研究者在观察与解释结果时必须牢记的。

培养的神经组织细胞作为一个易于操作的实验对象,除直接用相差显微镜观察外,几年来各种不同的技术方法正被广泛引入,如流式细胞技术,通过对培养细胞样本的免疫荧光或荧光染色,可测定细胞内特定蛋白、受体及核酸等成分的变化,并可对细胞进行细胞周期分析和分选,还能提供细胞众多的形态参数。与电生理方法、共聚焦显微镜及免疫细胞化学技术相结合,可了解细胞的功能状况。此外,就研究领域而言,神经组织培养在神经药理学实验中具有特有的优势,它避免了血脑屏障、代谢等因素的干扰,药物能直接作用于细胞,便于观察其效应及毒副作用。

对神经细胞而言,当其在动物胚胎晚期或新生期分化决定后一般即认为是不再增殖细胞,因此神经细胞的培养除神经干细胞外,一般均视为原代培养;而神经胶质细胞多为终身可分裂细胞,且它们在体外培养时也相对容易存活,因此常可建立起较稳定能传代的细胞系。另外一些肿瘤细胞株如 PC12 细胞(肾上腺嗜铬细胞瘤)、多种胶质细胞瘤细胞株等,在一定条件下也常作为神经元及胶质细胞的体外培养模型。

(二)神经组织培养与其他组织培养的差异之处

神经系统无论在动物或人都是机体最复杂的结构,神经元是一种高度分化的细胞,形态上有胞体与突起之分,且在动物出生后很少分裂,因此神经组织培养特别是神经细胞的分离培养较其他组织细胞常需要更高的条件,培养方法也较为特殊。神经组织培养存活的标志是:在分离细胞培养的标本中,种植后 24 小时内细胞贴壁,并逐渐生长出数十微米长的突起;器官培养的标本只要组织片薄,不漂浮,即是贴壁,而后有生长晕长出,组织片一般是存活的。培养组织或细胞的贴壁与培养的支持底物及培养基有一定关系,而影响神经细胞存活很关键的一点是所取组织的部位与动物的年龄。

神经元的体外培养一般取材于胚胎或新生动物的神经组织,根据不同研究目的,多取材于 CNS 的灰质或 PNS 的神经节。如有报道大脑皮层在小鼠一般以胚胎 16~21 天较好,大鼠则胚胎 19 天左右为最佳,而小脑神经元的培养大都取自临产或新生动物,该部位由于颗粒细胞在数量上占有绝对优势,因此是培养 CNS 单一神经元的一个理想的组织来源,纹状体细胞培养以 10 天左右的大鼠胚胎取材较为容易,存活率较高。一些特殊部位的取材可参阅相关文献。

神经细胞的生长特性决定了只有当其接种在一定的底物(或称生长基质)上时才能获得良好的生长和分化,因此体外培养时一般不直接将神经细胞种植到玻璃或塑料表面,而是首先在容器或玻片表面粘附一层类似细胞外基质的生物大分子。在神经元的体外培养中常用的粘附底物有多聚赖氨酸、多聚鸟氨酸、鼠尾胶和层粘连蛋白等,其中多聚赖氨酸须使用分子量大于 7 万者,常用浓度为 0.1%,它能使神经元较快贴壁,但维持时间不长,鼠尾