

神经药理学基础

THE BASIS OF NEUROPHARMACOLOGY

罗焕敏 主编



暨南大学出版社
JINAN UNIVERSITY PRESS

神经药理学基础

From Basic and Pre-clinical Pharmacology to Clinical

神经药理学基础



神经药理学基础

THE BASIS OF NEUROPHARMACOLOGY

罗焕敏 主编



暨南大学出版社
JINAN UNIVERSITY PRESS

中国·广州

图书在版编目 (CIP) 数据

神经药理学基础/罗焕敏主编. —广州: 暨南大学出版社, 2011. 6

ISBN 978 - 7 - 81135 - 733 - 2

I. ①神… II. ①罗… III. ①神经系统疾病—药理学—研究生—教材 IV. ①R971

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 010222 号

出版发行: 暨南大学出版社

地 址: 中国广州暨南大学

电 话: 总编室 (8620) 85221601

营销部 (8620) 85225284 85228291 85228292 (邮购)

传 真: (8620) 85221583 (办公室) 85223774 (营销部)

邮 编: 510630

网 址: <http://www.jnupress.com> <http://press.jnu.edu.cn>

排 版: 广州市天河星辰文化发展部照排中心

印 刷: 佛山市浩文彩色印刷有限公司

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 12.625

字 数: 304 千

版 次: 2011 年 6 月第 1 版

印 次: 2011 年 6 月第 1 次

定 价: 25.00 元

(暨大版图书如有印装质量问题, 请与出版社总编室联系调换)

前 言

神经药理学 (neuropharmacology) 是神经科学 (neuroscience) 的重要组成部分, 是药理学与神经生物学、神经解剖学、神经生理学、神经化学、神经病学等学科之间的交叉学科。脑的正常功能及脑部疾病的药物治疗是神经药理学研究的主要内容, 也是现代科技的前沿, 因为人类的大脑是全宇宙最复杂的构造之一, 还存在许多未知的事物等待着人们去探索。也正因为如此, 美国国会将 20 世纪最后 10 年定为“脑的十年” (Decade of the Brain 1990—1999); 诺贝尔奖获得者、DNA 双螺旋结构的发现者之一 JD Watson 则预测“21 世纪是脑的世纪”, 呼吁人们为弄清人类自己的“脑”而积极努力地工作。

神经药理学的具体内容主要包括传出神经系统药理和中枢神经系统药理两大部分。虽然新药层出不穷、不断涌现, 但药物作用的基本规律、内源性生物活性物质及其作用靶点、作用机制等知识却是相对固定的。因此, 本书重点阐述相关内容的基础知识, 故定名为“神经药理学基础”。希冀读者通过对本书的研读奠定必要的神经药理学基础, 以便进一步学习和研修神经药理学各论。

本书在编写过程中, 参考了大量的国内外相关文献和专著, 如邹冈主编的《基础神经药理学》(1999), 张均田、张庆柱、张永祥主编的《神经药理学》(2008), 张庆柱主编的《基础神经药理学》(2009), 邵福源、王宇卉主编的《分子神经药理学》(2005), Nestler EJ、Hyman SE、Malenka RC 主编的 *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* (2009), Katzung BG、Masters S、Trevor A 主编的 *Basic and Clinical Pharmacology* (2009) 等。在此, 谨向以上文献或专著的原作者表示感谢。

本书各章节的作者均是相关领域的专业人员, 他们分别来自中国医学科学院暨北京协和医学院、北京大学、中山大学、郑州大学、暨南大学、中国药科大学等。各位作者尽心尽责, 使本书得以如期出版, 在此对他们的辛勤劳动表示衷心感谢。我还要特别感谢暨南大学研究生部给本书提供了“暨南大学研究生教材经费资助”, 也要感谢暨南大学出版社的同仁们对本书出版的大力支持。

本书既可以作为研究生的教材, 也可以作为神经科学和药理学相关教学和科研人员的参考书。但由于我们的学识和水平有限, 加之时间仓促, 不足之处在所难免, 恳请各位读者批评指正。

罗焕敏

2010 年 9 月于暨南园

目 录

前 言	1
第一章 绪论	1
一、神经药理学研究对象	1
二、内源性活性物质药理学	1
三、神经药理学在神经科学中的作用	2
四、神经药理学的细胞学基础	2
五、神经细胞的生物电	7
六、神经药理学研究方法	7
七、神经递质和神经调质	13
八、突触传递过程和药物作用环节	14
第二章 受体	15
一、简史	15
二、定义	16
三、受体的特性	17
四、受体的分类	18
五、受体的调节	19
六、配体与受体相互作用的若干学说	19
七、研究受体的方法	22
八、受体研究的展望	26
第三章 脑内单胺能神经系统	30
一、概述	30
二、儿茶酚胺类神经递质	30
三、去甲肾上腺素与肾上腺素	31
四、多巴胺	36
五、5-羟色胺	39
六、组胺	44
第四章 胆碱能神经及相关疾病与药物	47
一、胆碱能神经的分布	47
二、胆碱能神经的生理功能	47

三、胆碱能神经的递质——ACh	48
四、胆碱能神经的受体——ACh 受体	52
五、胆碱能神经系统相关疾病	57
第五章 氨基酸类递质	63
一、兴奋性氨基酸——Glu	63
二、抑制性氨基酸——GABA	72
三、抑制性氨基酸——Gly	77
第六章 神经肽	79
一、神经肽的发展简史	79
二、神经肽的概念和分类	80
三、神经肽的生物合成与代谢	81
四、神经肽的作用及特点	82
五、神经肽与经典递质的共存	84
六、神经肽各论	85
第七章 腺苷和三磷酸腺苷	95
一、简史	95
二、腺苷和 ATP 的来源与代谢	95
三、嘌呤能神经假说	96
四、腺苷与 ATP 的作用	97
五、腺苷受体	98
六、ATP 受体	108
七、影响腺苷作用的药物	116
八、前景与展望	117
第八章 细胞内信使、蛋白磷酸化和膜的信号转导	123
一、环一单磷酸腺苷和腺苷酸环化酶	126
二、环一单磷酸鸟苷和钙离子	127
三、第二信使依赖性蛋白磷酸化	127
四、细胞内信使、蛋白磷酸化与神经功能	129
五、神经营养因子调节的信号通路	130
六、抑制神经突起生长的信号通路	132
第九章 离子通道的药理	136
一、作用于钠通道的药物	136
二、作用于钾通道的药物	139
三、作用于钙通道的药物	141

四、作用于氯通道的药物	143
五、作用于化学门控性通道的药物	144
第十章 神经营养因子及其受体	147
一、神经营养因子及其他具有神经营养作用的物质	147
二、神经营养因子受体	153
第十一章 抗脑衰老及抗老年痴呆药物	166
一、抗脑衰老药物	166
二、抗老年痴呆药物	169
第十二章 神经干细胞的调控	183
一、神经干细胞的解剖学位置	184
二、内源性 NSCs 靶向性迁移及其机制	185
三、影响神经干细胞增殖、分化、自我更新的调控因素	186

第一章 绪 论

一、神经药理学的研究对象

神经药理学 (neuropharmacology) 是研究药物和内源性活性物质 (endogenously active substances) 对神经系统作用的科学, 是药理学中一个十分活跃的分支领域。神经系统控制着整个机体, 全身所有器官的活动都会反映到神经系统中来, 作用于神经系统的药物的影响面较广。作为机体的一部分, 神经系统也比其他任何一个器官或系统更为复杂, 因此, 作用于神经系统的药物的作用机制也十分复杂。

在神经药理学中, 研究药物对自主神经系统作用的部分称为自主神经药理学 (autonomic pharmacology); 研究药物对动物行为影响的称为行为药理学 (behavioral pharmacology); 研究药物对人类精神活动影响的称为精神药理学 (psychopharmacology)。20 世纪 50 年代以前, 精神病人需要长期住院并只能接受电休克或胰岛素休克疗法。此后, 治疗精神病药物被发现, 精神病进入化学治疗的年代, 多数病人服药后得以恢复正常生活。因此, 精神药理学迅速发展起来。但无论是行为还是精神活动都是神经系统功能的表现, 行为药理学或精神药理学理应属于广义的神经药理学范畴。事实上, 神经药物和精神药物之间并没有截然的界线。例如, 吗啡 (morphine) 是一种经典的镇痛药, 但它也有十分强烈的精神效应。从作用机理上看, 所谓精神药物 (psychotropic drugs) 几乎无一例外地是作用于突触传递过程的药物。

二、内源性活性物质药理学

神经药理学不仅研究药物对神经系统的作用, 还研究神经系统各种内源性活性物质 (即递质、调质或其他活性物质) 对神经系统的作用, 以及药物和内源性活性物质与其受体的相互作用, 这类研究具有重大而深远的意义, 对化学传递学说的奠定作出了重大贡献。Dale 把研究内源性活性物质作用的科学称为 autopharmacology, 即“内源性活性物质药理学”。一方面, 内源性活性物质本身常可作为药物应用, 如肾上腺素、去甲肾上腺素等, 许多神经药物就是通过模拟内源性活性物质结构而加以改造合成的, 如拟交感药和拟胆碱药; 另一方面, 许多对神经系统有高度选择性作用的药物是通过受体产生效应的, 但受体不可能事先为外源性药物而设置, 必然有其内源性配体, 因此深入研究这些药物的作用机制, 最终可能可以找到新的内源性活性物质。脑啡肽的发现就是长期研究吗啡作用机制的结果, 是药物→受体→内源性配体发现的最著名的例子。

以上事实证明, 药物和内源性活性物质的关系是密不可分的。药物可能会不断更新, 而内源性活性物质及其受体是不会淘汰的。因此, 本书重点围绕内源性活性物质及其受体来叙述, 药物则根据与它们的相互作用来介绍。故本学科也可称之为“内源性活性物

质神经药理学”(neuropharmacology of endogenously active substances)。

三、神经药理学在神经科学中的作用

神经药理学是一门基础科学,和神经解剖学、神经化学、神经生理学、神经生物学、神经病理学等共同形成了综合性的神经科学(neuroscience)。一方面,神经药理学提供了大量有关神经递质和突触传递的知识,且作用于神经系统的药物也可作为分析神经系统功能的工具;另一方面,神经药理研究也大量采用了神经科学其他学科的理论和技术,因此与神经科学其他学科有着极为紧密的联系。目前,神经科学更加综合,按层次和对象可分为分子神经科学、细胞神经科学、系统神经科学、发育神经科学和行为神经科学,传统的分支界线已被打破。因此,神经药理学已经与神经科学其他学科更紧密地融合在一起,在神经科学中发挥着日益重要的作用。

四、神经药理学的细胞学基础

1. 神经元

根据突起的多少,神经元可分为单极、双极和多极细胞。单极细胞只有一根突起,但它很快一分为二,如背根神经节细胞,它作为一级感觉神经元,任务是忠实地把外周传入冲动传向中枢。双极细胞有一根树突和一根轴突,如视网膜、嗅上皮的感受细胞及中枢神经系统内的颗粒细胞均属双极细胞。绝大多数神经元属于多极细胞(图1-1),即它有一根以上的树突和一根轴突。典型的神经元有树突、胞体和轴突三部分。

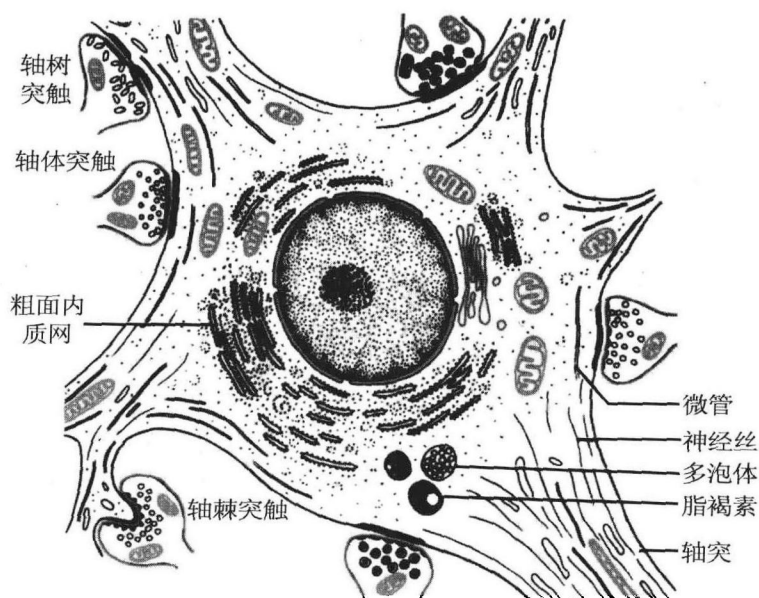


图1-1 多极神经元超微结构模式图

(1) 胞体 (soma)。

神经元的细胞核在胞体中显得特别大,但神经元有很长的突起,细胞核和胞浆的比例仍与一般细胞相近。细胞核中有一个或更多的核仁,DNA 转录为 mRNA 在核仁中进行。细胞核表面的核膜上有核孔,是核内外物质交换的通道。细胞核以外的胞体部分称为核周体 (perikaryon)。

(2) 粗面内质网 (rough endoplasmic reticulum)。

在核周体中有粗面内质网和游离的核糖体 (free ribosome),它们是合成蛋白质的场所。粗面内质网由规则且平行排列的扁平小池 (cisternae) 构成,小池膜外侧附着许多核糖体 (polyribosome) 颗粒,这些固定的多核糖体及游离的核糖体在光学显微镜下表现为尼氏小体 (Nissl body)。

(3) 高尔基氏器 (Golgi apparatus)。

高尔基氏器也是由规则而平行排列的扁平小池构成。因小池膜上不附着核糖体颗粒又被称为无颗粒网质。它们是新合成的蛋白质装入囊泡或分泌颗粒的场所。

(4) 线粒体 (mitochondria)。

神经元的胞体、树突、轴突及末梢都有线粒体,它是氧化磷酸化产生能量的细胞器,其数量多少代表代谢旺盛的程度。

神经微管 (microtubule) 和神经细丝 (neurofilament) 这些结构伸展到树突和轴突中,起维系神经元形态和转运物质的作用。神经微管是一种外径为 24 ± 2 nm、内径为 14 ± 2 nm 的空心管状结构,由 13 根直径为 5 nm 的纤维丝螺旋状排列而成。每根纤维丝又由球状微管蛋白 (tubulin) 亚基聚合而成。神经微管在胞体中较少,在树突中较多。在轴突中的多少视有无髓鞘而定,前者较少,后者较多。神经细丝是直径为 9 ~ 10 nm 的纤维状结构,通常以束状分布,胞体内较多而树突中较少。还有一种更细的纤维状结构,直径为 5 nm,称为微丝 (microfilament),只在神经元发育和再生的过程中出现。

(5) 突触 (synapse)。

神经元之间或神经元和其他效应细胞之间的衔接处称为突触。位于树突的突触叫轴突—树突 (axo-dendritic) 突触,位于胞体的叫轴突—胞体 (axo-somatic) 突触,位于突触前末梢的叫轴突—轴突 (axo-axonic) 突触。电突触和化学突触在形态上有显著的不同。哺乳动物的神经系统中绝大部分为化学突触,其突触前及突触后结构不对称。位于神经末梢突触前膜和突触后膜之间的缝隙称为突触间隙,约为 20 nm。突触前末梢内可见突触囊泡 (synaptic vesicle),直径约 40 nm,是贮存递质的部位。还有 70 ~ 100 nm 的大囊泡。在突触前膜胞浆侧有致密突起和网格所组成的囊泡栏栅 (vesicular grid),其空隙正好容纳一个囊泡,因此设想这种结构与引导囊泡与突触前膜接触有关。突触前末梢有许多线粒体,说明代谢旺盛 (图 1-2、1-3)。

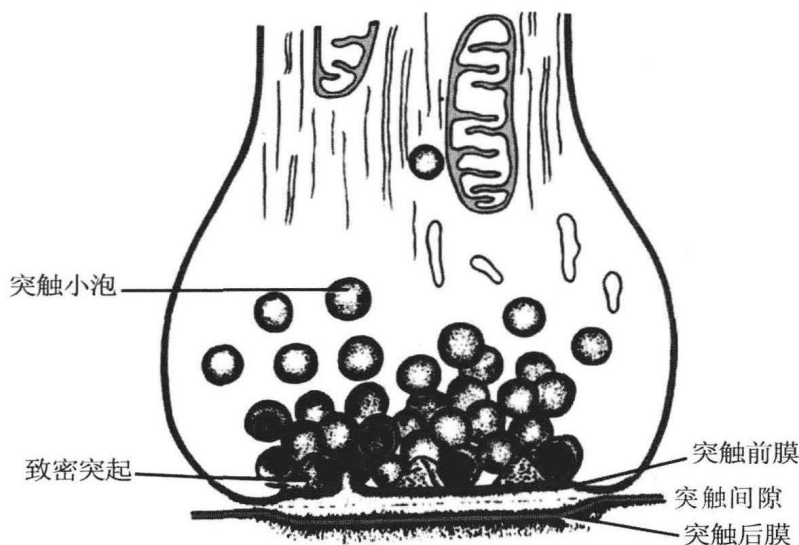


图 1-2 哺乳动物中枢突触示意图

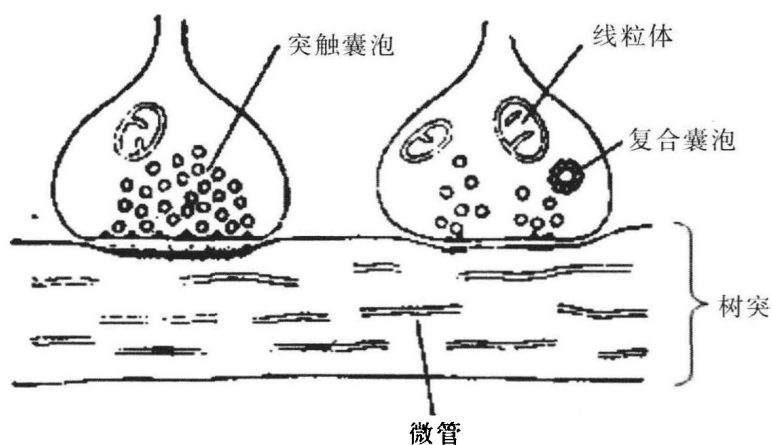


图 1-3 突触结构

左为不对称型，突触间隙大，有明显的突触致密区，两侧不对称；右为对称型，突触间隙窄，致密区小，两侧不对称。

若将脑组织用等渗溶液处理磨成匀浆，超速离心，在电镜下可见突触前末梢部分与轴突断裂，断裂处封闭形成一完整的突触体（synaptosome），它往往带上突触后膜。突触体保留呼吸、合成 ATP、摄取递质等功能，因此分离得到的突触体是神经药理学研究的常用标本，也是分离纯化受体的好材料。

2000 年 10 月 9 日，瑞典卡罗林斯卡医学院宣布，把 2000 年诺贝尔生理学或医学奖授予瑞典哥德堡大学 77 岁的阿维德·卡尔森（Arvid Carlsson）、美国洛克菲勒大学 74 岁的保罗·格林加德（Paul Greengard）以及出生于奥地利的美国哥伦比亚大学 70 岁的埃里克·坎德尔（Eric R Kandel）（图 1-4），以表彰他们发现了慢突触传递这样一种“神经细胞间的信号转导形式”。



图 1-4 卡尔森、格林加德和坎德尔（从左至右）

2. 轴浆转运 (axoplasmic transport)

神经元有很长的突起，它的代谢非常旺盛，因此需要不断地合成蛋白质，而合成蛋白质的粗面内质网位于胞体，新合成的蛋白质要运输到神经元的各部分。最简单的研究轴浆转运的方法是用线勒紧一段神经元突起，一段时间后发现束紧处两侧都有细胞器如线粒体和囊泡等堆积，以近端更为明显，说明轴浆流动的方向主要是由胞体到末梢，但也有逆行的。注射氘标记亮氨酸或脯氨酸于胞体附近，如注入背根神经节或眼球，这两种氨基酸即渗入背根神经节神经元或视网膜神经元的胞体粗面内质网新合成的蛋白质中，这样就可以研究蛋白质的轴浆转运速度。结果测得轴浆转运有两种速度，快速 $100 \sim 500 \text{ mm/d}$ 和慢速 $1 \sim 10 \text{ mm/d}$ 。氘标记脯氨酸主要显示快转运，而亮氨酸显示慢转运。快转运的物质有线粒体、滑面内质网、蛋白质、多肽、糖类、脂类和递质；慢转运的物质主要是微管蛋白、肌动蛋白、肌球蛋白。快转运的脯氨酸主要标记突触，而慢转运的亮氨酸主要标记轴突。秋水仙碱 (colchicine) 和长春碱 (vinblastine) 可以阻断快转运，它们与微管蛋白相结合并使之解聚，从而破坏微管，提示微管与快转运有关。在组织化学研究中，常用秋水仙碱阻断囊泡转运，使之在胞体堆积，进而使免疫组织化学染色更容易显示胞体含有哪一种递质。逆行转运是指从末梢将物质运输到胞体。一些毒素如破伤风毒以及辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 可以逆行运输到胞体，所以 HRP 常被用于跟踪末梢的神经元起源。神经递质也可以特异性地被释放这种递质的末梢所摄取，然后逆行转运到胞体。这种技术不仅可以显示神经元的起源，还可以揭示该神经元利用何种递质。逆行转运的药理性质与快速顺行转运相似，也可被秋水仙碱所阻断。

3. 神经胶质细胞 (neuroglia)

神经胶质细胞按形态可分为星形胶质细胞 (astrocyte)、少突胶质细胞 (oligodendrocyte) 和小胶质细胞 (microglia)，它们均起源于中胚层。中枢神经系统内神经元之间的空隙几乎被胶质细胞所填满，因此基本上不存在细胞间隙。包围在脑毛细血管周围的细胞和室管膜 (ependymal) 细胞也是胶质细胞。髓鞘由雪旺 (Schwann) 氏细胞包裹而成，这是一种少突胶质细胞。胶质细胞起支持、营养和绝缘作用，在中枢神经系统发育过程中起引导神经元迁移的作用。突触周围的胶质细胞能摄取递质并参与递质的灭活过程，

还可防止递质弥散并参与神经元修复。

4. 血脑屏障 (blood - brain barrier)

脑血流速度最快, 然而许多药物全身给药后进入脑组织的速度比进入其他组织要慢得多, 这是因为有血脑屏障的存在。脑内毛细血管内皮细胞之间没有空隙, 物质必须穿过内皮细胞的两层细胞膜才能进入脑组织 (图 1-5)。毛细血管周围包裹着胶质细胞, 再加上脑组织中基本不存在细胞间隙, 这些因素均不利于血液和脑组织之间的物质交换。但脑必需的物质, 如葡萄糖、某些必需氨基酸则有特殊的转运系统, 能有效而迅速地把它们转运到脑内。脑内有些部位缺乏血脑屏障, 物质可以自由交换, 这些部位包括松果体、垂体后叶、极后区第三脑室前端的血管器官 (organum vasculosum), 它们统称为室周器官 (circumventricular organs)。

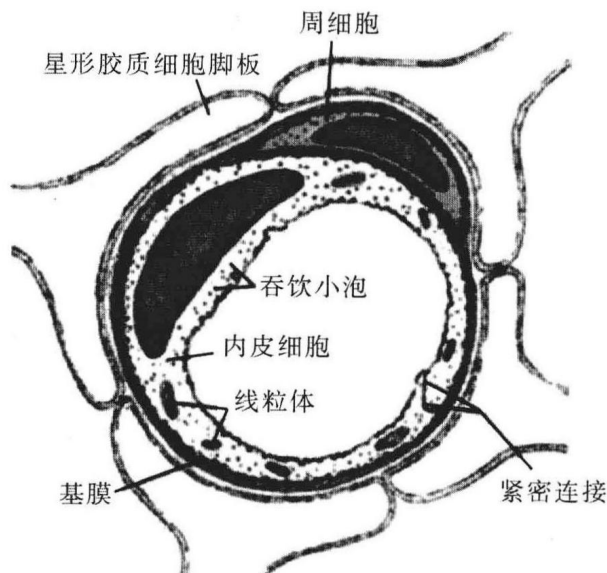


图 1-5 血脑屏障结构

药物进入脑组织的速度取决于三种因素: ①药物与血浆蛋白结合的比率, 结合多则进入脑组织的药物分子数就少; ②药物在体内 pH 环境下的解离度, 解离度大则带电荷的药物分子就多, 而细胞膜对带电荷分子的通透性很低, 故药物进入脑组织的量很少; ③药物的脂溶性, 细胞膜上的磷脂蛋白成分容易让脂溶性物质透过, 因此脂溶性大的药物容易进入脑组织内。

神经递质如乙酰胆碱 (ACh)、单胺类、 γ -氨基丁酸 (GABA)、谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸等在体液 pH 环境中几乎完全处于解离状态, 因此不易透过血脑屏障, 而它们的前体则易透过。

为了克服或绕过血脑屏障, 人们设计了鼻腔给药、脑室内给药、脑组织内注射和微电泳技术。有时也利用幼年动物血脑屏障未完善的特点, 或给予能透过血脑屏障的单胺类递质的前体氨基酸来开展相关研究。此外, 为了排除药物的中枢作用, 可以将药物季铵化使之带电荷而不易进入中枢。

五、神经细胞的生物电

1. 膜电位

细胞膜两侧离子分布不均,膜外钠离子浓度高于膜内,钾离子则相反,这是细胞膜钠—钾泵主动转运所致。在静息状态下,钾离子通透性相对来说最高,钾离子随电化学势由浓度高的膜内流向膜外,从而带出一小部分正电荷,造成膜外正、膜内负的电位差,这种电位差会阻止钾离子进一步向膜外弥散,两种趋势相等时的膜电位即钾离子的平衡电位。静息时的膜电位接近钾离子的平衡电位。

2. 动作电位

在静息状态下,当神经细胞膜受到一次短促的阈刺激或阈上刺激时,膜电位会降低,降低到一定程度就会使钠离子通道突然打开,膜外浓度高的钠离子即流入膜内,使膜外电位进一步降低,导致更多的钠通道开放,使去极化爆发性地发展,这就是动作电位的上升相。钠离子成为决定膜电位的主要因素,膜电位由原来静息时的外正内负变为外负内正。这一过程称为去极化,其中膜内电位由零变为正值的过程称为反极化或超射。随即钠通道关闭,钾通道开放,使膜电位回到静息水平。这就是全或无式的扩布性动作电位形成的过程。钠通道及钾通道的开放是由去极化电流所激活的,因此它们是电压门控性通道(voltage-gated channel)。

3. 突触后电位

神经末梢释放的递质作用于突触后膜引起的膜电位变化称为突触后电位。这种电位以递减方式扩布,并能总合。若某种递质引起的是非特异性离子通透性增加,则产生去极化,称为兴奋性突触后电位(EPSP);若某种递质引起的仅是氯离子通透性增加,则形成超极化,称为抑制性突触后电位(IPSP)。EPSP去极化达到阈值时,即膜的去极化程度达到可以激活钠通道时,可引起动作电位。IPSP则使膜电位更远离兴奋阈,起稳定膜的作用。

EPSP和IPSP的时程在20ms左右。近年来发现有些突触后电位出现得非常慢且持久,这种慢电位往往不是离子通道开放而是离子通透性降低。例如,在牛蛙交感神经节细胞上,刺激节前纤维可以在节后神经元上记录到慢的EPSP和迟慢EPSP(late slow EPSP),后者已被证明是钾离子通透性降低的结果。

离子通道可分为电压门控性(voltage-gated)和化学门控性(chemically-gated)两大类。如前所述,与动作电位形成有关的钠通道和钾通道属于电压门控性通道,因为它们只对电压变化敏感;与EPSP和IPSP形成有关的离子通道则属于化学门控性通道,因为它们只被递质或药物所激活。近年来又发现了许多新的离子通道,开放时产生各种离子流,如快钾、钙激活钾、钙离子流等。

六、神经药理学研究方法

药理学大师Gaddum曾经说过,药理学家是多面手(Jack of all trades),凡是可以阐明药物作用机理的技术都能用上。在神经药理学中更是如此,纯粹的神经生理或神经化

学技术都难以完全阐明药物作用的分子基础和分子机制,因此,神经药理学家要善于采用多学科的方法。研究可在整体、器官、组织、细胞以及亚细胞和分子水平进行。

1. 作用谱和量效关系

无论是药物还是内源性活性物质,最基本的是要先了解它有哪些作用,包括对整体和离体器官的作用,即作用谱。然后对一特定的作用用不同剂量作出剂量反应曲线。剂量通常以对数表示,效应可以是量反应或质反应。典型的剂量反应曲线呈S形,当中一段是直线。产生50%效应的剂量称为半数有效量(ED_{50})。若以死亡作为质反应指标,其半数有效量即半数致死量(LD_{50})。

剂量反应曲线可以比较不同药物的作用程度。假如不同的化合物通过同一原理起作用,如都作用于同一受体,则所得的应是一组平行的剂量反应曲线。特异性拮抗剂只能使某一化合物的剂量反应曲线平行右移,而不改变其斜率。

2. 生物检定

生物检定(bioassay)是神经药理学的基本功,当今高精尖的仪器越来越多,其重要性往往被忽略。实际上一些新仪器或技术是否可靠,也还要看结果是否与生物检定相一致。生物检定的最大优点是不需要贵重的仪器而灵敏度很高。例如,用水蛭背肌测定乙酰胆碱,灵敏度达 10^{-10} g。采用各种拮抗剂还可以鉴别被检定物质作用于哪一类受体。用不同标本来测定一系列化合物的效应,同时比较它们在各种标本上的作用强度次序(rank order),则有可能发现新的受体亚型。例如,各种内阿片肽在豚鼠回肠、小鼠、大鼠及金色田鼠、家兔的输精管上的作用强度次序不同,从而发现了 μ 、 δ 、 κ 、 σ 等阿片受体亚型。若将未知的组织提取物与已知化合物在不同标本上作平行生物检定(parallel assay),假如它们的作用性质和强度比例相同,即可证明系同一或同类化合物。早年组织中的乙酰胆碱就是这样确定的。

生物检定虽然是一种经典的实验方法,但它仍在不断革新。Vane创立的不同器官瀑布式表面灌流方法(cascade superfusion)可以一个样品多筛,并起到鉴别活性物质的效果,在前列腺素研究中发挥了重要作用。在他获得1982年诺贝尔医学或生理学奖的演讲中,他把生物检定称作“前列环素发现的基石”,可见生物检定在发现新的内源性活性物质中的重要性。

3. 生物化学方法

生物检定是根据活性来测定含量的,因此只能测定活性物质本身而不能测定活性物质的前体或代谢产物,化学或同位素方法则不受此限。这些方法涉及许多专门技术,在此列举几项:

(1) 荧光分光光度法(fluorespectrometry)。

这种方法需要两个单色仪,一个将光源分成一定波长的激发光射入样品,样品产生的荧光经另一个单色仪选出特定波长的发射光,由光电管记录。每一种物质的激发波长和荧光发射波长是特定的。本法主要用于单胺类的测定。单胺类要先衍生或结构转化为能够激发出荧光的化合物。

(2) 气相层析与质谱联用(gas chromatography/mass spectrometry)。

这种方法是利用气相层析对化合物进行分离,用质谱对化学结构进行辨认,主要用于乙酰胆碱的测定。但设备昂贵,非一般实验室能采用。

(3) 高效液相层析 (high performance liquid chromatography, HPLC)。

此法主要用于神经肽的分离纯化, 分离效果极佳。若与电化学检测器 (electrochemical detector) 相连, 也可以测定单胺类及其前体和代谢产物。

(4) 原位伏安法 (in situ voltammetry)。

它是一种可以在活体上测定脑内某一区域单胺含量动态变化的方法。原理是各种物质都有特定的氧化 (还原) 电位, 而氧化 (还原) 电流的大小又与该物质在溶液中的浓度成正比。通过包括一个埋藏在脑内某一区域的工作电极在内的三电极系统, 施加一个渐增的波形电压, 可以测量出氧化 (还原) 反应发生在什么电位及其大小, 从而得知是什么物质及其含量。目前多用于多巴胺及其代谢产物二羟苯乙酸、5-羟吲哚乙酸等的测定。

(5) 酶同位素衍生物法。

通过某种酶, 将用同位素标记的基团接到组织提取物的活性分子上, 根据放射强度测定该物质的含量。例如, 提取物中的去甲肾上腺素, 可通过苯乙醇胺 N-甲基转移酶接上来自 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine) 上的氚标甲基而变成 ^3H -肾上腺素。这种方法的灵敏度高, 无须进行整体的同位素实验。

(6) 放射受体分析法 (radioreceptor binding assay)。

根据活性物质与标记配体竞争同一受体的原理测定活性物质的含量, 属饱和分析法一类。这种方法不能鉴别体内同时存在对某一受体都具有亲和力的多种活性物质, 而只能测出总量。

(7) 放射免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA)。

这也是一种饱和分析法。这种方法将免疫学的特异性与同位素的灵敏性结合起来。根据活性物质与标记的活性物质竞争同一抗体的原理测定活性物质的含量, 特别适用于神经肽。但测得的是免疫活性, 不一定代表待测的神经肽本身, 仍需其他辅助方法, 如柱层析分子量测定等, 以确定测出物质的本质。放射免疫分析法现已扩大到对单胺和乙酰胆碱的测定。

(8) 更新率的研究。

神经元有很强的调节能力, 使神经递质含量稳定在一定水平。递质释放多了, 合成也就快了, 因此测得的绝对量变化不大并不代表更新率不高。所以神经元活动的指标应该是该递质的更新率, 即单位时间单位重量的组织中某种递质的更新数。目前有四种方法: ①用抑制递质代谢产物转运的药物, 以阻止它们离开中枢神经系统, 然后测定其含量, 凡是含量高的表示该类神经元活动增加。②用递质合成阻滞剂, 使递质得不到补充。若该类神经元活动增加, 则递质含量下降。③利用神经末梢具有摄取其递质的特点, 将标记递质注入脑室内再摄取到有关末梢内, 并与内源性递质混合。追踪标记递质的代谢率, 也可以说明该类神经元的活动程度。④用递质前体的标记化合物掺入内源性递质之中, 然后观察其代谢率。上述四种方法以第四种最符合生理状态。

(9) 微透析法 (microdialysis)。

微透析技术是以透析原理为基础的在体取样技术, 是在非平衡条件下, 膜外小分子物质通过扩散进入透析管内, 并被微透析管中连续流动的灌流液不断带出, 从而达到从活体组织取样的目的。微量透析法的基本原理与操作步骤是: ①用具具有一定截留分子质