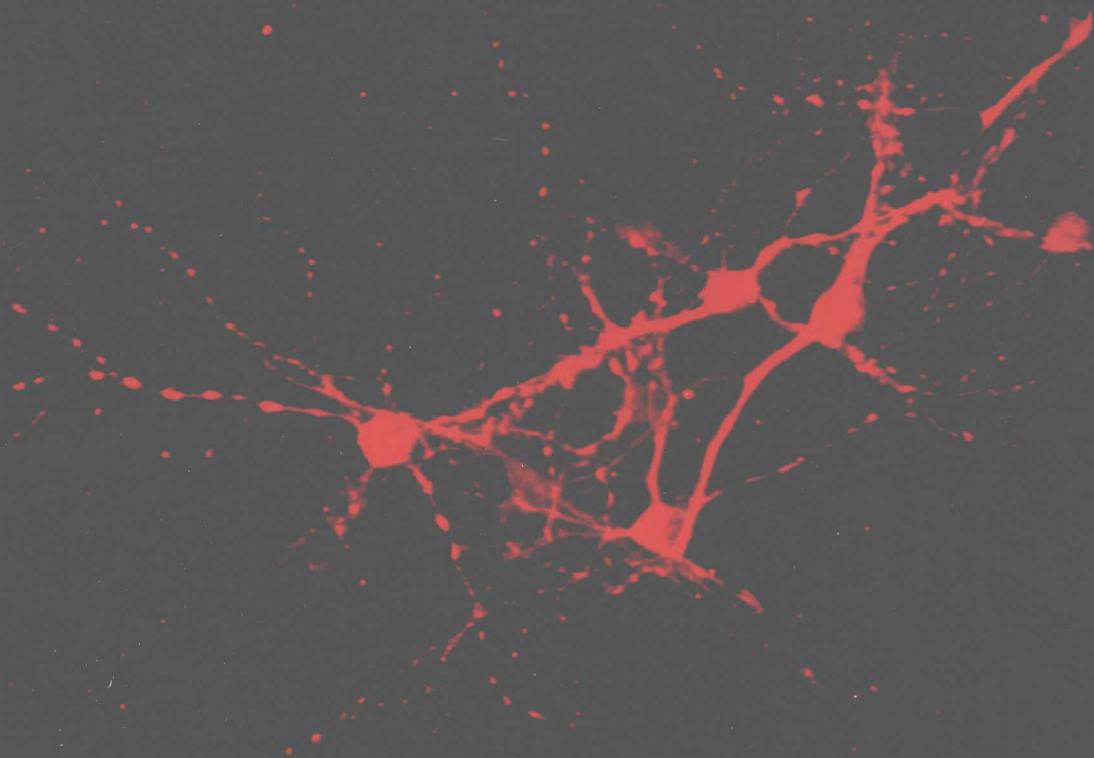


# 神经生物学

Neurobiology

主编 徐慧君



苏州大学出版社

R338  
X722:1

高等医学院校研究生、本科生教材

# 神经生物学

## Neurobiology

主 编 徐慧君

副主编 (以姓氏笔画为序)

肖德生 金国华 夏春林 顾晓松

徐铁军 曾水林 蒋星红

编 委 (以姓氏笔画为序)

王阿明 朱建宝 朱 俐 邱一华

张凤真 张励才 李 涛 沈爱国

肖德生 金国华 周嘉伟 晋光荣

夏春林 顾晓松 徐铁军 徐慧君

曾水林 彭聿平 蒋星红

苏州大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

神经生物学 = Neurobiology/徐慧君主编. —苏州:  
苏州大学出版社, 2004. 3  
面向 21 世纪高等医学院校研究生、本科生教材  
ISBN 7-81090-237-7

I. 神… II. 徐… 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(2004)第 009742 号

## 内 容 简 介

神经生物学是神经科学中的基础学科,国际、国内已出版的神经生物学专著很多,各有特色。本书主要的特色是介绍神经科学常用的研究方法,突出介绍了分子神经生物学的研究方法 with 原理,神经元、神经胶质的结构功能,神经元信号传导,中枢和周围神经系统的发育、再生、老化、凋亡(以机制为主),高级神经活动,神经内分泌及神经免疫调节,痛觉调节,神经递质、神经营养因子和与神经相关的细胞因子等;并专门介绍了海马的结构和功能,脑铁代谢、糖及糖复合物在神经生物学中的作用,PD 和 AD 的研究进展及神经网络。

全书分 17 章共 60 万字。

本书可供从事神经科学研究的研究生与从事临床及基础医学研究的科技工作者参考,也可供其他相关学科的研究生及本科生必修课、选修课使用。

## 神经生物学

徐慧君 主编

责任编辑 陈林华

---

苏州大学出版社出版发行  
(地址:苏州市干将东路 200 号 邮编:215021)  
丹阳兴华印刷厂印装  
(地址:丹阳市胡桥镇 邮编:212313)

---

开本 787×1092 1/16 印张 24 字数 600 千  
2004 年 3 月第 1 版 2004 年 3 月第 1 次印刷  
印数 1-5000 册

ISBN 7-81090-237-7/R·4(课) 定价:38.00 元

---

苏州大学版图书若有印装错误,本社负责调换  
苏州大学出版社营销部 电话:0512-67258835

## 参编人员

(以姓氏笔画为序)

- |     |                          |
|-----|--------------------------|
| 王阿明 | 徐州医学院数学物理学教研室            |
| 朱建宝 | 东南大学医学院解剖学教研室            |
| 朱俐  | 南通医学院生物化学教研室             |
| 许蕾  | 中国科学院细胞生物化学研究所           |
| 邱一华 | 南通医学院生理学教研室              |
| 张凤真 | 徐州医学院解剖学教研室暨神经生物学教研室     |
| 张励才 | 徐州医学院麻醉学系                |
| 李涛  | 东南大学医学院解剖学教研室            |
| 沈爱国 | 南通医学院神经科学研究所             |
| 肖德生 | 江苏大学医学院生理学教研室            |
| 武义鸣 | 南通医学院解剖学教研室暨神经生物学研究室     |
| 金国华 | 南通医学院解剖学教研室暨神经生物学研究室     |
| 周嘉伟 | 中国科学院细胞生物化学研究所           |
| 晋光荣 | 东南大学医学院解剖学教研室            |
| 夏春林 | 苏州大学医学院解剖学教研室暨神经细胞生物学研究室 |
| 顾晓松 | 南通医学院神经科学研究所             |
| 徐铁军 | 徐州医学院解剖学教研室暨神经生物学教研室     |
| 徐慧君 | 南通医学院解剖学教研室暨神经生物学研究室     |
| 曾水林 | 东南大学医学院解剖学教研室            |
| 彭聿平 | 南通医学院生理学教研室              |
| 蒋星红 | 苏州大学医学院神经生物学教研室          |

# 前 言

21 世纪是高科技的时代,科学技术以雷霆万钧之势,日新月异地迅猛发展。神经科学是新世纪生命科学发展的前沿。诺贝尔奖获得者、DNA 分子双螺旋结构发现者 J. D. Watson 说,21 世纪是脑的世纪。这就是说,人类认识脑、保护脑、创造脑的时代已经来临。

近 40 年来科学技术获得了令人瞩目的进展,新发现不断涌现,新成果接踵而至。人类用自己的智慧创造了世界,改造了世界,但人类对脑是如何产生智慧的知之不多,需要人们去探索。

随着科学的发展,教育必须改革。1966 年美国哈佛大学率先设立了神经生物学课程,之后世界各国大学均先后开设了神经生物学课程。近年来我国一些大学和医学院亦开设了这门课程,但多数是选修课,内容自选自编,各不相同。

著名的神经生理学家、诺贝尔医学奖获得者 Eccles 预言,在 30 年内世界上大多数伟大的科学家都将研究脑;另一位诺贝尔奖获得者、生物化学家 Crick 指出,没有一种科学研究比研究人脑更重要。我们江苏省年轻的神经生物科学工作者一致认为,有必要在江苏省医学院校中开设神经生物学课程,并编写出适合各院校校况的教材和参考书,这是科学发展的需要,亦是时代前进的必然。

神经生物学内容广泛,包括临床与基础,而且跨多门学科,诸如神经解剖、生理、药理、生物化学、病理及分子神经生物学等。因此不可能在有限的篇幅内对神经生物学各个方面进行详细而深入的介绍。本书在编写中既注重神经生物学的理论基础,又注重神经生物学的研究前沿;既重视内容的创新性,又重视神经生物学的完整性;既重视理论的介绍,亦重视神经科学研究方法的介绍;另外在内容选择上突出了结合江苏省各院校研究工作的领域,具有自身的特色。

本书参编的单位有南通医学院、苏州大学医学院、东南大学医学院、徐州医学院、江苏大学医学院、中国科学院细胞生物化学研究所。编写作者中既有从事神经生物学研究工作多年的老专家,又有在神经生物学教学工作中崭露头角的中青年科技工作者,其中绝大多数是博士和教授,在他们从事的研究领域中都有相当的造诣。知识犹如浩瀚的海洋,一个人的知识再博亦仅是沧海一粟,因此书中不足和不当之处在所难免,敬请读者批评指正。

本书可供从事神经科学研究的研究生及从事相关的临床和基础研究的科技工作者参考,也可供本科生必修课、选修课使用。希望本书的出版能够为我国神经生物学发展作出一点贡献。最后对江苏省各院校领导的支持表示衷心的感谢。

徐慧君

2003 年 10 月

# 目 录

## 第一章 绪 论

- 第一节 神经科学与神经生物学的概念及任务 ..... (1)
- 第二节 常用的神经生物学现代研究方法 ..... (3)

## 第二章 常用的分子生物学基本方法简介

- 第一节 核酸分子杂交 ..... (21)
- 第二节 聚合酶链反应 ..... (22)
- 第三节 差异显示技术 ..... (23)
- 第四节 DNA 突变技术 ..... (24)
- 第五节 外源基因导入哺乳动物细胞中的技术方法 ..... (26)
- 第六节 报告基因的表达及检测 ..... (29)
- 第七节 稳定转化细胞系的常用选择标记 ..... (31)
- 第八节 DNA 与蛋白质相互作用的研究方法 ..... (32)
- 第九节 蛋白质相互作用的研究方法 ..... (34)
- 第十节 生物芯片 ..... (36)
- 第十一节 基因表达干扰技术 ..... (38)

## 第三章 神经元及神经胶质细胞

- 第一节 神经元 ..... (42)
- 第二节 神经胶质 ..... (59)

## 第四章 神经元膜的结构与神经元信号转导

- 第一节 神经元膜的组成与结构 ..... (74)
- 第二节 神经元膜的物质转运和信息传递 ..... (77)
- 第三节 神经系统信号转导 ..... (84)
- 第四节 神经系统原癌基因的产物和功能 ..... (97)

## 第五章 中枢神经系统的发育、脑的老化及凋亡

- 第一节 中枢神经系统的发育 ..... (100)

# 目录

|     |                   |       |
|-----|-------------------|-------|
| 第二节 | 中枢神经系统发育的机制 ..... | (102) |
| 第三节 | 脑老化及老年性痴呆症 .....  | (115) |
| 第四节 | 神经细胞凋亡 .....      | (121) |

## 第六章 海马结构

|     |                  |       |
|-----|------------------|-------|
| 第一节 | 结构概况 .....       | (143) |
| 第二节 | 细胞构筑 .....       | (147) |
| 第三节 | 海马结构的纤维联系 .....  | (151) |
| 第四节 | 海马的功能及临床意义 ..... | (154) |

## 第七章 神经系统的高级整合功能

|     |               |       |
|-----|---------------|-------|
| 第一节 | 学习与记忆 .....   | (159) |
| 第二节 | 语言和思维 .....   | (166) |
| 第三节 | 睡眠与昼夜节律 ..... | (170) |

## 第八章 神经系统与免疫系统之间的相互作用

|     |                      |       |
|-----|----------------------|-------|
| 第一节 | 神经系统对免疫功能的调节作用 ..... | (177) |
| 第二节 | 免疫系统对神经系统的调节作用 ..... | (186) |

## 第九章 疼痛与痛觉调制

|     |             |       |
|-----|-------------|-------|
| 第一节 | 痛的概念 .....  | (193) |
| 第二节 | 痛觉的传递 ..... | (197) |
| 第三节 | 痛觉的调制 ..... | (205) |
| 第四节 | 镇痛 .....    | (212) |

## 第十章 化学神经解剖学及神经递质

|     |                 |       |
|-----|-----------------|-------|
| 第一节 | 化学神经解剖学概论 ..... | (216) |
| 第二节 | 神经递质和神经调质 ..... | (231) |

## 第十一章 神经系统再生、修复和神经组织移植

|     |                     |       |
|-----|---------------------|-------|
| 第一节 | 周围神经再生与修复 .....     | (241) |
| 第二节 | 中枢神经的损伤、修复和再生 ..... | (251) |
| 第三节 | 神经干细胞 .....         | (263) |

目  
录

## 第十二章 神经营养因子与细胞因子

- 第一节 神经营养因子 ..... (278)
- 第二节 与神经系统相关的细胞因子 ..... (289)
- 第三节 巨噬细胞与神经系统 ..... (297)

## 第十三章 脑铁代谢及其调控

- 第一节 脑铁分布 ..... (304)
- 第二节 脑内铁转运蛋白的分布 ..... (305)
- 第三节 脑内铁蛋白和神经黑素 ..... (307)
- 第四节 脑铁转运 ..... (309)
- 第五节 脑铁代谢的调节 ..... (313)
- 第六节 脑铁的生理功能 ..... (316)
- 第七节 铁状态异常对脑功能的影响 ..... (318)
- 第八节 几种退行性疾病与铁代谢的关系 ..... (319)

## 第十四章 糖及糖复合物在神经系统中的作用

- 第一节 糖及糖复合物的概况 ..... (324)
- 第二节 糖脂的结构、功能及其在神经生物学中的研究 ..... (328)
- 第三节 蛋白聚糖在神经系统中的作用 ..... (335)
- 第四节 糖代谢与神经系统疾病 ..... (336)

## 第十五章 中枢神经系统疾病基因治疗简介

- 第一节 基因修饰细胞在脑内移植中的应用 ..... (340)
- 第二节 脑肿瘤的基因治疗 ..... (346)

## 第十六章 帕金森病和老年性痴呆基础研究若干进展

- 第一节 帕金森病 ..... (350)
- 第二节 老年性痴呆 ..... (354)

# 目 录

## 第十七章 神经网络简介

- 第一节 神经网络的研究内容与方法 ..... (360)
- 第二节 神经网络的研究历史与发展趋势 ..... (361)
- 第三节 神经网络的生物学基础 ..... (364)
- 第四节 神经网络模型 ..... (366)
- 第五节 Hopfield 模型 ..... (367)
- 第六节 BP 网络及其应用 ..... (369)
- 第七节 突触超微结构与高阶神经网络模型 ..... (371)

## 第十八章 神经系统的发育

- 第一节 神经系统的发育 ..... (374)
- 第二节 神经系统的发育 ..... (378)
- 第三节 神经系统的发育 ..... (382)
- 第四节 神经系统的发育 ..... (386)

## 第十九章 神经系统的功能

- 第一节 神经系统的功能 ..... (390)
- 第二节 神经系统的功能 ..... (394)

## 第二十章 神经系统的疾病

- 第一节 神经系统的疾病 ..... (398)
- 第二节 神经系统的疾病 ..... (402)

# 第一章 绪 论

## 第一节 神经科学与神经生物学的概念及任务

### 一、神经科学的概念及其在生命科学中的地位

在当代的生命科学中,神经科学的发展已达到令人瞩目的地步。曾有人预测,21 世纪将是神经科学的时代。诺贝尔奖获得者、DNA 分子双螺旋结构发现者 J. D. Watson 说,21 世纪是脑的世纪。

这种推测并不是无稽的臆断。人类智慧对自然的征服,在 20 世纪已达到登峰造极的地步,但对于产生智慧的人脑的认识,还远未完结。迄今为止,对于人脑产生的很多行为,都不能从功能学和形态学上加以全面解释;对于人类智慧的集中表现——人的思想的产生过程和机制,也都还是“未解之谜”。因而,在今后一个相当长的时期,人类对脑的研究始终处于科学前沿的地位。另一方面,中枢神经的疾病及脑的老年性变化等,一直是医学中未能解决的难题。美国第 101 届国会通过了一项从 1990 年 1 月 1 日起为“脑的十年”(the decade of the brain)的决议。国际脑研究组织(IBRO)号召所有国家都来支持这一卓越的创举。人们正对脑研究的前途拭目以待。

“脑的十年”决议中写道:“鉴于研究涉及众多学科科学家的共同努力,包括生理学、生物化学、心理学、精神病学、分子生物学、解剖学、医学、遗传学和其他许多学科,以达到一个共同的目标,即更好地了解脑的结构和脑如何影响人类的发育、健康和行为……”这说明对脑的研究是多学科的共同工作。各个学科互相渗透但每个学科又有相对独立的分野。

在过去 100 多年神经学发展的历史过程中,已逐渐形成神经解剖学、神经生理学、神经化学、神经药理学等相对独立的分野。但 20 世纪 70 年代初期分子生物学的发展及其向各个学科领域的渗透,导致这些分野之间又失去了互相独立的界限,于是产生了神经科学(neuroscience)和神经生物学(neurobiology)等新学科名称。神经科学的研究目标是认识脑、保护脑和创造脑,所以也把神经科学称为脑科学。

神经科学是继分子生物学之后生命科学发展的又一高峰,是一门从生物医学、化学、物理学、心理学、数学和计算机科学等多学科的角度研究脑的构筑、演化和工作的边缘学科和综合学科。

神经科学可以分为基础神经科学和临床神经科学。前者侧重基础理论,后者以研究神经系统有关的病症为主。

### 二、神经生物学概况

神经生物学(neurobiology)是基础神经科学的主干。基础神经科学中还包括计算神经

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相关的化学物质。它着重研究神经系统内各种分子结构和功能,并研究神经系统各组分的基因表达和分子遗传学,如神经系统遗传性疾病的基因定位和变异的研究。

神经细胞生物学(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,线粒体的结构功能,细胞水平的信号调控,神经递质、调质,神经营养因子及细胞因子在神经系统的分布、作用机制,神经细胞凋亡的发生机制及基因调控等。

行为神经生物学 (behavioural neurobiology) 是指用行为学或心理学方法研究动物神经系统的学习记忆、情感、睡眠与觉醒的机制, 各种内、外环境对动物行为的影响等。

以上分支是从研究角度和研究方法上进行分类的,但作为一个研究课题往往是多层次、多分支的研究。

著名的神经生理学家、诺贝尔医学生理学奖获得者 Eccles 预言,在 30 年内世界上大多数伟大的科学家都将研究脑;另一位诺贝尔奖获得者生物化学家 Crick 指出,没有一种科学研究比研究人脑更重要。

我国神经科学及神经生物学的研究起步较晚,但也取得了一些重大成果。1995 年成立了神经科学协会,近年来研究神经科学的队伍也在不断壮大,但离世界水平还有相当大的差距。许多高等学校尚未开设这门课程,为了赶上世界形势,我们必须有紧迫感。

21 世纪是生命科学的世纪,是脑的世纪,神经生物学有着辉煌的发展前景。我们期望所有有志于探索脑的奥秘的年轻人才不失时机地加入到神经科学研究行列中去。通过艰苦的奋斗,把我国神经科学的研究推向新的高度,这是历史赋予的责任,任重而道远。

## 第二节 常用的神经生物学现代研究方法

神经系统现代研究方法大致有6个方面,即形态学方法、生理学方法、电生理学方法、生物化学方法、分子生物学方法及脑成像。研究方法众多,本节不可能涉及每种方法的细节,只能介绍一个粗略的概貌。但可以说神经科学的每一次飞跃几乎都与某种新研究方法的出现有关。

### 一、形态学研究方法

神经解剖学是神经科学中历史最为悠久的一门科学。任何一门自然科学的发展都是无穷尽的。但是,新的发展又都是在原有基础上起步的,到了用原有技术方法不能再使研究内容有所突破的地步,出现的问题不能解决时,则必然又促使人们引进新的科学技术,使方法学发生新的变革。神经解剖学也是如此,每发生一次方法学的革新,都使人们对脑的结构的认识前进一步。

现代神经解剖学的发展,应追溯到19世纪末以Golgi和Cajal为代表的时代。这两位大师以他们在神经解剖学上的划时代的成就而共同获得了1906年的诺贝尔奖。

Golgi (Camello Golgi, 1843—1926)是意大利人,1873年创建了Golgi法,即用镀银技术显示整个神经元形态,但轴突过细过长不能全部染出。用Golgi法可鉴别中枢神经不同部位的神经元形态特征及其与邻接神经元的相互关系,在研究中枢神经灰质的构成模式上仍是其他方法不能完全取代的有效手段。

Cajal (Ramony Cajal, 1852—1934)是西班牙人,他用Golgi法工作,自己又创造了Cajal法,也是一种镀银法,能显示神经元的胞体和轴突。

与Golgi、Cajal同时代的德国病理组织学家Franz Nissl (1860—1919)于1892年建立了Nissl法,即用美蓝、克紫等碱性染料染出神经元胞体和树突基部内的块状物质(一般称之为Nissl小体),藉以区别神经元胞体的轮廓。当神经元损伤或轴突离断时,该神经元内的Nissl小体发生变化(染色质溶解,Chromatolysis)。利用此现象,实验性切断轴突造成神经元胞体Nissl小体溶解,藉以寻找该轴突起源细胞的所在,也是Nissl的一大贡献。直到20世纪60年代末,这种实验方法一直是逆行追踪神经纤维束路起源的惟一方法。

由于Nissl法可以有选择地染出神经元胞体,所以迄今仍是研究灰质构筑的最有效的方法。著名的Brodmann大脑皮质功能分区、Rexed的脊髓灰质分层,都是根据Nissl法而建立的。

在这一历史时期,又出现了专染正常神经纤维髓鞘的Weigert法(Karl Weigert, 1843—1904,德国病理学家,1884年创建Weigert法)。Weigert法是首先用金属化合物对髓鞘进行媒染,然后再使之与氧化的苏木精结合成沉淀色素,经氧化、还原,分别脱色,将附于髓鞘以外组织的色素除去的方法。此时又出现了专染变性髓鞘的Marchi法(Vittorio Marchi, 1851—1908,意大利人,1890年创建Marchi法),用钼酸有选择地染出变性的有髓纤维的髓鞘,藉以追踪实验破坏后的变性有髓纤维的行径。

这些大师以及其他一些杰出的神经解剖学家们的划时代创造,创建了现代神经解剖学的基础。他们的名字和他们所创建的方法在神经解剖学中保持着不朽的地位。

20 世纪初期到中期,神经解剖学发展成为一门实验科学。人们借助于脑立体定位装置和定位图谱,对动物脑内某一结构进行定位破坏后再对溃变的纤维束或胞体进行染色观察,藉以达到判断某一功能系统各个环节联系的目的,形成束路学(chordology)。

20 世纪 50 年代,电子显微镜引入神经形态学研究中来,人们可以在突触水平观察到神经元的衔接,形成突触学(synaptology)。由于以往的镀银法不能镀染神经元的终末部分,不能准确判断所镀染的神经元的终止处。50 年代中期以 Nauta 为代表的改良的镀银法问世,可以镀染溃变的神经终末前部分,把神经元联系的研究向前推进了一大步,丰富了束路学知识。

20 世纪 70 年代,随着分子生物学的兴起,神经科学在研究方法上又发生了划时代的变革。现介绍神经科学目前常用的几种形态学研究方法。

### (一) 束路追踪法

#### 1. 轴浆运输法

神经元间的联系是神经科学的一个基本问题,显示神经元是神经科学研究的基础。目前应用最广的研究方法是利用神经元轴浆运输现象的追踪法。

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枝以维持其代谢;在神经末梢释放的神经肽及合成的经典递质的酶也需在胞体合成;在末梢也有影响细胞代谢的物质,如神经营养因子,逆向传送至胞体。这种运输现象称为轴浆运输(axoplasmic transport),其机制尚不完全清楚。

(1) 辣根过氧化物酶法 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)是从辣根中提取的一组同功酶的混合物,其中只有几种能被用做神经系统的追踪剂。1971 年 Kristenson 等及 1972 年 La Vail 等先后将 HRP 用于追踪周围神经及中枢神经系统的纤维联系,创造了 HRP 追踪技术。HRP 可被神经末梢摄入,逆向运至胞体,也可以被神经元的胞体摄入,顺向运送至末梢部位,即既可用做逆向追踪亦可用做顺向追踪。HRP 和麦芽凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)共价偶联后(WGA-HRP)或与霍乱毒素结合(CP-HRP)可大大提高其作为追踪剂的灵敏度。HRP 法的基本步骤是将 HRP 注射至中枢神经系或周围器官、神经的一定部位,经过一定时间后,灌注固定动物,取材做冰冻切片,然后用过氧化氢及呈色剂来显示 HRP。显示 HRP 的方法有多种,常用二氨基联苯胺(DAB)或更敏感的四甲基联苯胺(TMB)。冰冻切片在  $H_2O_2$  及 DAB 或 TMB 溶液中孵育,组织中的 HRP 与  $H_2O_2$  结合成  $[HRP-H_2O_2]$ ,可氧化供氢的 DAB 或 TMB,使之分别形成棕色或蓝色的颗粒沉淀物,堆聚在 HRP 周围(图 1-1)。

(2) 荧光染料追踪法 此类方法首先由 Kuypers 于 1977 年介绍于世。其后陆续发现了一些可供束路追踪的荧光染料,主要用做逆向追踪。按其标记部位可分为两类:一类主要标记细胞核,如核黄(nuclear yellow, diamino yellow, bisbenzimidazole);另一类主要标记细胞质,如固蓝(fast blue)及荧光金(fluorogold)。不同的染料有不同的激发波长及发射波长,产生不同颜色的荧光,因此可以用做双标或多标记。即某一核团或某些细胞,其轴突投射到一个以上部位,如在其不同的投射部位注射不同的荧光染料,则在其起源部可以见到含一种以上荧光染料的细胞。也可根据标记核或细胞质的不同用做双标记研究。褪色是荧光染料的一大缺点,在激发光照射下较快褪色,因此允许的观察时间短。弥补办法是将切片浸泡在 DAB 溶液中,在激发光照射下荧光染料可氧化 DAB,使之产生棕色沉淀。经此处理后切片

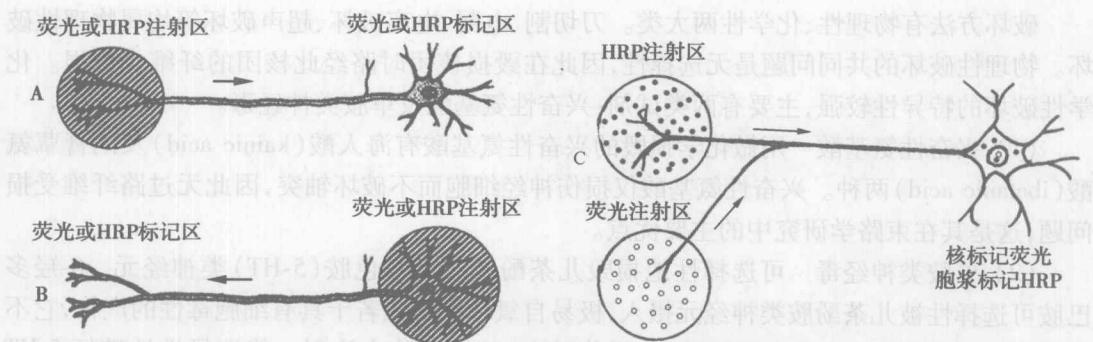


图 1-1 HRP 及荧光的几种标记方式

(A:逆行标记; B:顺行标记; C:双逆行标记)

可在普通光照明下观察并可长期保存。

(3) 植物凝集素及细菌毒素 植物凝集素及细菌毒素都是通过细胞膜上不同受体的介导而被胞饮入神经元内的。

用做束路追踪的植物凝集素有麦芽凝集素 (WGA) 及菜豆凝集素 (phaseolus vulgaris agglutinin, PHA) 两种。WGA 通常与 HRP 交联成 WGA-HRP (见辣根过氧化物酶法), 或单独使用, 标记部位用抗体免疫组织化学方法显示。WGA 可作顺、逆向传送。PHA 在作束路追踪时, 仅 L 亚单位有效, 故应使用 PHA-L。PHA-L 主要用做顺向追踪, 通常用正极电泳 PHA-L 入脑内, 可用抗 PHA-L 抗体免疫组织化学方法显示之。此法之主要优点为其所显示的纤维末梢形态非常细致。PHA-L 法还可与其他神经组织化学方法结合应用 (图 1-2)。

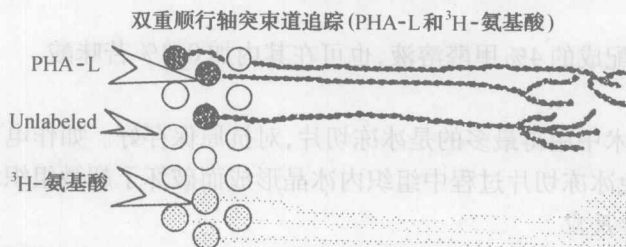


图 1-2 PHA-L 双轴突束路追踪

细菌毒素中目前较常用的为霍乱毒素。霍乱毒素有 A、B 两亚单位, A 亚单位为毒素的毒性单位; B 亚单位无毒性, 为与细胞受体结合的单位。因此用其 B 亚单位作追踪剂效果更佳。可以将其与 HRP 交联, 也可单独使用。单独使用时用抗霍乱毒素抗体免疫组织化学方法显示之。霍乱毒素是一种很灵敏的顺、逆向追踪剂, 但成本比 HRP 法高而且步骤多。

(4) 病毒 活的神经病毒也可用做束路追踪剂, 有利于跨突触的多级神经元追踪, 这是活病毒用做追踪剂所独有的特点。病毒用免疫组织化学方法显示之。目前用的有两种疱疹病毒 (单纯疱疹病毒 I 型及猪疱疹病毒, 或称为狂犬病毒) 及弹状病毒, 可用做顺向及逆向追踪。

## 2. 变性法

变性法是利用神经元胞体受损或神经轴突离断后远侧轴突的变性或轴突切断后的细胞反应, 来研究纤维联系。

破坏方法有物理性、化学性两大类。刀切割、电凝、电离破坏、超声破坏等均属物理性破坏。物理性破坏的共同问题是无选择性,因此在毁损核团时路经此核团的纤维也被损。化学性破坏的特异性较强,主要有两类试剂:兴奋性氨基酸及单胺类神经毒。

(1) 兴奋性氨基酸 用做化学损毁的兴奋性氨基酸有海人酸(kainic acid)及鹅膏蕈氨酸(ibotanic acid)两种。兴奋性氨基酸仅损伤神经细胞而不破坏轴突,因此无过路纤维受损问题,这是其在束路学研究中的主要优点。

(2) 单胺类神经毒 可选择性地损毁儿茶酚胺或5-羟色胺(5-HT)类神经元。6-羟多巴胺可选择性被儿茶酚胺类神经元摄入,极易自氧化而形成若干具有细胞毒性的产物,它不易通过血-脑屏障,欲造成中枢性破坏,需作脑室、脑池或脑内注射。能选择性地破坏5-HT类神经元的神经毒有5,6-及6,7-双羟色胺(5,6-HT及6,7-HT),其作用途径与6-羟多巴胺相似。

## (二) 免疫组织化学法

免疫组织化学法是用特异性抗体显示组织化学成分的一种方法。抗原通常是一种肽或蛋白,有数量不等的抗原决定簇,抗原决定簇由暴露于表面的空间相邻的3~8个氨基酸组成。一个抗原上可以有多个抗原决定簇。因此,由此而产生的抗血清中可能有针对不同决定簇的抗体,这一类抗体称为多克隆(polyclonal)抗体。用杂交瘤技术可以制成针对单个决定簇的抗体,称为单克隆(monoclonal)抗体。因为抗体仅识别特定的抗原决定簇,而不识别抗原本身,因此不同物质只要有相同的抗原决定簇,均可被同一抗体识别,在免疫组织化学中就产生了抗体的非特异性及交叉反应问题。

免疫组织化学法的基本过程有固定、制片、反应等3步。

### 1. 固定

最常用多聚甲醛配成的4%甲醛溶液,也可在其内加0.3%苦味酸。

### 2. 制片

免疫组织化学技术中用得最多的是冰冻切片,对抗原保存好。如作电子显微镜样品,必须用振动切片,以避免冰冻切片过程中组织内冰晶形成而破坏了超微组织结构。

### 3. 免疫组织化学反应

进行免疫组织化学反应时,组织切片可铺贴在载玻片上反应,也可将切片漂浸于反应液中,两者无实质性差别,但漂片法敏感性较佳。间接法是在第一抗体与组织中的抗原结合后,用各种方法来显示第一抗体,经过两次甚至多次反应,标记强度得到放大,而且同一种显示系统可以显示各种第一抗体。有多种间接免疫组织化学反应方法,最常用的有间接荧光法、PAP法及ABC法等3种。

(1) 间接荧光法 用做免疫组织化学法的抗体主要为IgG。根据产生抗体的动物种属不同(多克隆抗体通常用兔,也有用羊;单克隆抗体则用小鼠或大鼠,特异性高,敏感性差),用抗不同动物IgG的抗体作为第二抗体,标以荧光物。最常用的荧光物为异硫氰荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC, 激发波长490nm, 发射波长530nm)、罗丹明(rhodamine, TRITC, 激发波长580nm, 发射波长610nm)及得克萨斯红(Texas red, TR, 激发波长550nm, 发射波长615nm)。在特异的第一抗体与组织中的抗原结合后,用荧光物标记的第二抗体显示第一抗体。

(2) PAP法 PAP是过氧化物酶-抗过氧化物酶( Peroxidase-antiperoxidase)的简称,为

用针对 HRP 的抗体和 HRP 结合而成的一种复合物,每一 PAP 复合物含 2 个抗 HRP 的 IgG 分子及 3 个 HRP 分子,PAP 法需用三层抗体。首先用特异的第一抗体孵育组织切片,其次用抗第一抗体(IgG)的抗体(如羊抗兔 IgG)作桥接(故第二抗体又称桥抗),然后用 PAP 与桥抗结合,桥抗 IgG 分子的两个 Fab 段,一个与第一抗体结合,另一个与 PAP 结合。桥抗两个 Fab 段是相同的,故第一抗体及 PAP 中的 HRP 抗体必须来自同一种动物。最后,用 HRP 的底物来显示 PAP,有若干种底物可供选择,产生不同的颜色反应。最常用的是二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB),形成棕色沉淀。显色可随时终止,反应至显色满意。

(3) ABC 法 ABC 是卵白素-生物素结合的 HRP 复合物(avidin biotinylated horseradish peroxidase complex)的简称。生物素(biotin)为一小分子维生素,易于与很多生物分子交联。卵白素(avidin)是存在于卵清中的一种糖蛋白,每一分子可以结合 4 个生物素。ABC 复合物是先将 HRP 与生物素结合,然后按一定比例将此结合物与卵白素反应,使每一个卵白素分子上结合 3 个带 HRP 的生物素,留出一个能与其它生物素结合的空位来。

ABC 法是在第一抗体反应后,用已结合生物素的抗 IgG 抗体(biotinylated IgG)桥接。然后用 ABC 孵育,使桥接上的生物素与 ABC 中卵白素上的空位结合。最后仍用 HRP 的底物成色。由于生物素和卵白素间的亲和力极强,ABC 法比 PAP 法更灵敏。在 ABC 法中,ABC 和桥抗是通过生物素结合的,因此 ABC 复合物没有种属特异性,可适用于任何种类的第一抗体。当然,生物素结合的第二抗体必须是针对第一抗体种属的(图 1-3)。

(4) 免疫组织化学法的对照 对照在免疫组织化学法中十分重要。对照实验有两大类:一类是方法特异性对照,用正常羊血清或缓冲液代替第一抗体,其他步骤同实验切片,这种对照在于检查显示系统本身能否使组织染色;第二类为抗血清特异性对照,这种对照更为重要,将抗血清与过量的特异性抗原(常用浓度为  $10^{-6}$  mol/L)一起孵育一段时间,待抗体与抗原充分结合,用此混合液作免疫组织化学染色,如血清中无其他可以和组织结合的抗体,应得到阴性染色结果,证明免疫组织化学染色所示确系特异抗体的作用。对照必须用与实验相同的组织。

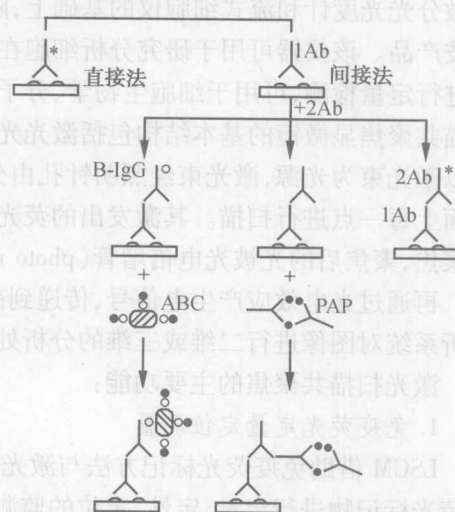


图 1-3 免疫细胞化学染色方法原理

(\* 荧光标记物; • HRP; ○ 生物素;  
● 卵白素; B-IgG: 生物素标记的 IgG)

(三) 原位杂交法 原位杂交法(in situ hybridization)创于 1969 年,此方法是用探针互补技术使脑内一些活性物质或受体的 mRNA 可视化的方法。在神经形态学研究中,主要用于显示细胞内的 mRNA。原位杂交组织化学方法的应用标志着对脑的形态学研究已从细胞水平向分子水平转变。原位杂交法用一标记的单链核酸探针与组织切片反应,探针可以是 DNA 或 RNA,分别与组织内互补的 mRNA 结合,形成 DNA-RNA 或 RNA-RNA。不同的原位杂交方法,均包括固定剂的选择、探针的选择、杂交前处理、杂交、杂交后处理、杂交显示等方面。

### 1. 固定剂的选择

固定的目的有三:防止核酸逸失;保存组织结构;有利于探针透入。甲醛可以三者兼顾,故广为应用。

### 2. 探针的选择

包括探针本身及探针的标记两个方面。用于原位杂交的探针有 cDNA 探针、RNA 探针、寡核苷酸 (oligonucleotide) 探针等 3 种,各有优缺点。

cDNA 指与 mRNA 互补的 (complementary) DNA 链,作原位杂交特异性强,比 RNA 探针简便,因此应用较广。其主要缺点是 cDNA 探针为双链,必须在使用前加温,使之分离成两条单链,其中一条为 cDNA 链,能参与杂交,但无关 DNA 链可以和 cDNA 链重新结合 (退火, annealing),在杂交过程中与 mRNA 争夺 cDNA。

### (四) 激光扫描共聚焦显微镜技术

激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 是 20 世纪 80 年代在显微分光光度计和流式细胞仪的基础上,随着光学、视频、计算机等技术的发展而产生的高科技产品。该仪器可用于研究分析细胞在变化过程中的结构,特别是能对活细胞离子量变化进行定量检测,可用于细胞生物学、分子生物学、生物化学、神经生物学等研究领域。激光扫描共聚焦显微镜的基本结构包括激光光源、扫描器、显微镜和计算机四大部分。其基本原理以激光束为光源,激光束经照明针孔由分光镜反射至物镜,并聚焦于样品上,对标本内焦平面上每一点进行扫描。其激发出的荧光经原来入射光路直接反回到分光镜,通过探测针孔聚焦,聚焦后的光被光电倍增管 (photo multiple tube, PMT) 增强,被准确地接收到探测器内。再通过光电效应产生电信号,传递到高分辨率的彩色显示器上,同时还可连接微机图像分析系统对图像进行二维或三维的分析处理。

激光扫描共聚焦的主要功能:

#### 1. 免疫荧光定量定位测量

LSCM 借助免疫荧光标记方法与激光扫描、光学显微镜、计算机相结合的技术可对细胞内荧光标记物进行定量、定性、定位的监测,如需要检测细胞膜、细胞核、细胞质 3 种不同物质,可采用 3 种不同荧光标记的抗体标记样品,经激光扫描、共聚焦采集后数据成像,可在 3 个相应的部位观察到标记的阳性反应,获得重叠图像显示相互关系,并可测量细胞的面积、周长、平均荧光强度、积分荧光强度及细胞内颗粒的数目等,从而对细胞内的溶酶体、线粒体、内质网、细胞骨架结构性蛋白成分进行定性、定量分析等。LSCM 还可在图像处理的同时进行图像定量分析,因此可将细胞的某些形态学特征进行量化。

#### 2. 图像分析和三维重建

共聚焦的成像利用照明点与探测点共轭这一独特性能,能有效抑制同一焦平面上非测量点的散射光的干扰及来自样品中非焦平面的荧光,不仅可获得高分辨率并具有深度识别的能力及纵向分辨率,可对样品进行无损伤化学切片,即所谓的“细胞 CT”。这一技术可克服人工切片的不足,并可将多层形象进行叠加,经计算机三维重建后得到样品的三维立体数据。如将重组的图像旋转,可以从各个角度观察细胞,也可研究细胞内各种结构的变化及其空间位置的变化。

#### 3. 细胞内离子的测定及分析

LSCM 可准确地测定细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等离子的含量。用得较多的是对  $\text{Ca}^{2+}$