

军医科年报—006

基础医学—001

基础医学研究所

科研工作年报

——一九八一——

军事医学科学院基础医学研究所

1982年

基础医学研究所科研工作报告

—1981—

目 录

乙酰胆碱的放射免疫测定·····	鲍忠祈 凌世淦 刘芳妹 王光远 李 玲 (1)
神经元功能状态的改变对顺向转运的影响(摘要)·····	甘思德 范明明 和国平 (4)
切断大白鼠颈上交感节前纤维对节细胞超微结构的影响 ·····	汪家政 彭善云 汪宝珍 张德芳 (5)
切断节前纤维引起颈上节后神经元递质的转变·····	华仲慰 汪家政 (6)
蟾蜍脊髓运动神经元树突背丛突触的分布与功能 ·····	李文彬 蔡竖平 柏立嘉 张朝临 李凤维 (7)
蟾蜍脊髓诱发电位性质分析 ·····	李文彬 王福庄 张炳烈 张朝临 陈士英 柏立嘉 (8)
蟾蜍脊髓运动神经元突触的逆行识别 ·····	王福庄 李文彬 张炳烈 张朝临 柏立嘉 (9)
离体神经组织细胞外记录的微标记·····	王福庄 张炳烈 张朝临 (13)
新疆出血热病原体的电镜再鉴定·····	陈德蕙 冯崇慧 张德芳 张贺秋 (15)
大白鼠脑突触体的分离与电镜观察·····	陈德蕙 周建群 张德芳 张贺秋 (20)
罗氏环流培养仪的应用·····	傅生法 赵林普 (23)
理化等因素对培养神经细胞的影响·····	赵林普 肖定华 张朝山 (24)
照射小鼠抑制淋巴细胞活性后骨髓细胞染色体的观察·····	魏 文 唐佩弦 刘 永 (25)
造血干细胞发生学研究 I. 人胎肝造血干细胞 ·····	施斐曼 刘 永 王星荷 丁 颖 汪宝珍 杨 怡 (26)
梭曼对蚯蚓背肌中胆碱酯酶活力及乙酰胆碱, 谷氨酸、 γ -氨基丁酸含量的影响 ·····	任蕴芳 金道山 周廷冲 (29)
上颈交感神经节的药理学分析·····	余颂涛 顾明娟 (32)
梭曼对蚯蚓背肌的作用方式的研究·····	周建群 周廷冲 (33)
包聚载体两性电解质的合成及聚焦电泳方法的建立·····	蒋滋慧 陈 嘉 (34)
依赖 cGMP 蛋白激酶(GPK)的纯化及理化性质的研究(预试验部分小结) ·····	刘毓秀 (35)
γ -氨基丁酸受体激动剂 3-羟基-5-氨基异恶唑(Muscimol)新合成路线的研究 ·····	陈绳铨 耿荣良 (36)

分子几何学优化的程序设计·····	吴加金	傅俊昌	(38)
肿瘤相关抗原激活相应肿瘤病人活性 E-花环形成率与 SRBC 受体含量的关系 ·····	吴蔚	孙淑英	宋晓国 邱军 (42)
SRBC 受体中结合和不结合 ConA 部分·····	吴蔚	孙淑英	宋晓国 (43)
猪胸腺中免疫活性抑制因子的初步探讨·····	邬光惠	吴蔚	田跃 (45)
用 QHS 法测定抗体形成细胞并与 PFC 法进行比较 ·····	邬光惠	田跃	(49)
胸腺素对人造血组织中 T 淋巴细胞激活作用的初步探讨 ·····	李春海	刘静仪	牟小威 (53)
抗胸腺细胞血清及其免疫球蛋白对人造血组织中 T 淋巴细胞的抑制作用 ·····	李春海	刘静仪	牟小威 (55)
超速离心 S. D. 法测定牛血清白蛋白及肉毒毒素分子量 ·····	李文书	蔡亚力	李安丽 (57)
λ DNA 的体外包装技术 ·····	陈添弥	张兆山	周惠珍 (58)
BF-1 型部分收集器试制小结 ·····	胡惠宁	等	(61)
PBR ₃₂₅ 质粒 DNA 与克隆 HBVDNA 体外重组及环丝氨酸富集重组子的研究 ·····	俞炜源	韩素文	陈锦光 唐红娣 方继明 (63)
快速鉴定和大量纯化质粒 DNA 的方法 ·····	张林元	张兆山	(64)
用高产菌株制备 T ₄ -DNA 连接酶 ·····	于公义	王光荣	李秀珍 徐秀英 (65)
限制性核酸内切酶 Pst I 的分离纯化 ·····	李秀珍	徐秀英	(66)
限制性内切核酸酶 Bgl II 的分离纯化 ·····	谷志远	周刊	(65)
限制性内切核酸酶 EcsR ₁ 的分离纯化·····	于公义	王光荣	李淑琴 (69)
限制性内切核酸酶 BamH I 的分离纯化 ·····	谷志远	李秀珍	俞炜源 (70)
重组质粒微量快速筛选方法——硷变性分离质粒 DNA ·····	朱跃先	逯好英	马贤凯 (71)
乙型肝炎病毒基因在大肠杆菌中表达的探索 ·····	马贤凯	逯好英	韩凤连 安方 朱跃先 杜连英 (72)
党参化学成分的研究(简报) ·····	王英贞	蔡定国	贺启芬 李福涛 韩诚 赵伟伟 (76)
党参化学成分的研究(Ⅱ)(摘要) ·····	蔡定国	王英贞	贺启芬 韩诚 李福涛 赵伟伟 (79)
党参水煎剂及部位提取物对离体肠管的影响·····	陈国志	何冰	(80)
党参水煎剂及部位提取物对小鼠血浆皮质酮含量的影响 ·····	刘干中	王林秀	郭燕捷 (82)
人类外周血细胞和染色体 G 带图象的区域分割和特征提取·····	张学中		(85)
抗原抗体反应最适比·····	贾万钧	张建宗	(88)

乙酰胆碱的放射免疫测定

鲍忠祈 凌世淦 刘芳妹* 王光远 李 玲

国内主要采用生物测定法测定乙酰胆碱(ACh)，其灵敏度虽较高，但稳定性差。我们发展了比较简便的乙酰胆碱放射免疫测定法。

材 料 和 方 法

1. 免疫原的合成 按照 Spector 等⁽¹⁾的方法合成。

2. 抗血清的制备 免疫动物为体重 2.5kg 左右的青紫蓝种雄性兔。首次免疫以合成免疫原和福氏完全佐剂做成乳剂，背部皮内多点注射，每兔注射 1ml 乳剂(内含 2mg 合成免疫原)。以后每隔 2.5 个月加强一次，合成免疫原(用不完全佐剂)剂量逐渐减为 0.5mg。

3. 标记 ACh 及标准 ACh [³H]ACh 为英 Amersham 产品，放射性比度为 250mCi/mmol。分装后冰冻干燥，保存于 -15℃。临用前用 0.1M NaH₂PO₄ 稀释到约 1,500pmol/ml，4℃ 冰箱保存备用。

标准 ACh 为国产溴化乙酰胆碱纯品，标准液用 0.11M HClO₄，新鲜配制。

4. 动物脑组织提取液的制备 鼠脑组织称重后，迅速投入 9.3 倍量预冷的 0.11M HClO₄ 中，磨成匀浆，并在冰浴上放置 30 分钟，再离心，取上清液用于测定。

5. 放射免疫测定方法

(1) 反应混合液的组成 血清用 0.05M、pH7.4 的磷酸缓冲液(内含毒扁豆碱 2×10^{-4} M) 稀释，每反应管中含 1:1,000 抗血清稀释液 0.6ml，不同稀释度的标准 ACh 溶液(标准管)或组织提取液(测定管)0.01ml，[³H]ACh 稀释液 0.01ml(约为 15p mol)。每管总体积为 0.62 ml。非特异性结合对照管中不加抗血清和标准 ACh，但加入 1:1,000 正常兔血清 0.6ml。各管充分混合后置 4℃ 冰箱保温 18—24 小时。每个样品均重复做 2 或 3 管。

(2) 抗血清结合 [³H]ACh 和游离 [³H]ACh 的分离及测定 用国产微孔滤膜(直径 25mm，孔径 0.3μm)进行分离。滤膜于使用前日浸泡于 pH6.6、0.05M 的磷酸缓冲液中过夜。在抽滤反应混合液后，随即用缓冲液 1.5ml 冲洗，抽干，取下滤膜于 80℃ 烘箱烤干，待干透后放入甲苯-PPO 闪烁液中，用液体闪烁计数器进行测定。

实 验 结 果

1. 抗 ACh 血清的免疫学性质

(1) 滴度 获选的抗血清滴度为 1:1,000，是在基础免疫 12 个月后采血得到的，其质量较日本报道的为好，与美国相近(见表 1)。

* 放射医学研究所

表1 抗ACh血清的滴度及其 $[^3\text{H}]\text{ACh}$ 结合率

作者	抗血清滴度	$[^3\text{H}]\text{ACh}$ 结合率 (B/T%)
Spector等(美) ^[10]	1:1,000	40
Kawashima等(日) ^[11]	1:500	25
本文	1:1,000	38
	1:1,600	25

(2) 特异性 从产生相当于50%抑制的剂量(IC_{50})计算,胆碱及其他一些物质对抗ACh血清的交叉反应是很弱的(见表2)。

表2 几种物质对抗ACh血清的交叉反应

	IC_{50} (nmol)	交叉反应率 (%)
乙酰胆碱	0.02	100
胆碱	27.66	0.072
氨基乙酰胆碱	2.98	0.671
新斯的明	1.31	1.526
阿托品	175.36	0.011
毒扁豆碱	>600	<0.003
乙酰辅酶A	367.43	0.005
6-氨基己酸	>600	<0.003

2. 放射免疫分析方法的建立

(1) 缓冲液冲洗量对滤膜计数的影响 用微孔滤膜抽滤反应混合液后,如不用缓冲液冲洗时,游离 $[^3\text{H}]\text{ACh}$ 分离不完全。如增加缓冲液冲洗量,测定管计数虽有所下降,但正常血清对照管的计数下降更明显,因此二者的比值增高。在用1.5—2ml缓冲液冲洗时,比值达最高值,此时正常血清对照管的计数已接近本底水平,可以认为游离 $[^3\text{H}]\text{ACh}$ 已完全分离。

(2) 标准曲线 图1为5次测定的综合结果,直线范围为2.5—160pmol ACh。

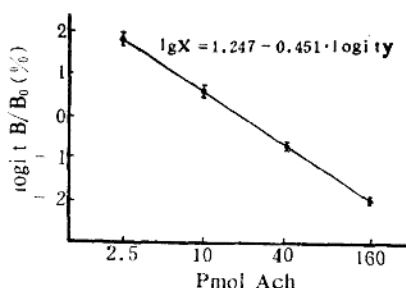


图1 ACh标准曲线

(3) 回收试验 表3结果说明本法的准确性符合要求。

(4) 批内及批间误差 对同一个样品在一次实验中作5次测定,计算批内误差,变异系数为6.8%。把脑组织提取液保存在4℃冰箱中,在不同天中作5次测定,计算批间误差,

表3 加入已知量 ACh 的测定

加入量 (pmol)	测定值 (pmol)	回收率 (%)
140	132.0	94.3
112	111.8	99.8
84	90.5	107.7
70	74.3	106.1
56	58.7	104.8
42	41.9	99.8
28	28.9	103.2
14	11.4	81.4
7	6.6	94.3

变异系数为 8.4%。说明本法的精密度与稳定性基本符合要求。

3. 脑组织中 ACh 的测定

(1) 正常小鼠与毒扁豆碱中毒小鼠的比较 正常小鼠(10只)的结果为 12.6 ± 1.59 (nmol/g), 毒扁豆碱中毒小鼠(10只)为 17.1 ± 2.43 (nmol/g), 统计表明二者差别非常显著。

(2) 不同处死方法对大鼠脑 ACh 测定的影响 结果见表4; 以微波照射组所得结果为最高, 说明微波使胆碱酯酶迅速灭活, ACh 不至受酶影响而水解。

表4 不同处死方法的大鼠脑组织 ACh 含量

	动物数	$\bar{x} \pm SD$ (nmol/g)
普通断头	9	10.0 ± 1.0
断头+液氮	10	11.0 ± 2.7
微波照射	10	21.5 ± 3.8

小 结

制得了滴度为 1:1,000 的抗 ACh 血清, 发展了一个简便可行的 ACh 放射免疫分析法。最低可测量为 2.5pmol ACh。批内误差变异系数为 6.8%, 批间误差为 8.4%。从准确性、精密度和稳定性来看, 本法可用于测定组织中 ACh 含量。

(致谢: 本工作是在蔡翹教授关怀和指导下去进行的)

参 考 文 献

- [1] Spector S. et al: *J. Neurochem.* 30:685, 1978.
- [2] Kawashima K. et al: *J. Pharmacol. Methods* 3:115, 1980.

神经元功能状态的改变对顺向转运的影响

甘思德 范明明 和国平

神经元借信息传递来实现它对靶细胞的调控作用。除已知沿神经传导的电信息外,最近还发现在神经元胞浆内转运化学分子信息,这种化学分子信息比电信息有更广泛和重要的生理意义⁽¹⁾。

我们用外源性蛋白辣根过氧化物酶(HRP)作为化学分子信息的指示剂,用改良的生化测定方法⁽²⁾,发现大鼠腓肠肌注射 HRP 后,12.5HZ 电刺激坐骨神经主要促进转运而 50HZ 主要抑制 HRP 的逆向转运⁽³⁾。为观察不同频率电刺激对内源性物质顺向转运的影响,我们又用微量操纵器在大鼠脊髓右侧 L₄及 L₅节段腹角各注射 ³H 亮氨酸 2 μ l,然后在股方肌下缘结扎右侧坐骨神经。6小时后用不同频率电刺激右侧 L₄₋₅腹根,刺激期记录右侧臀大肌复合动作电位,刺激1小时后休息10分钟,而后再以同样频率刺激2秒,观察电位的恢复情况。随即将动物断头活杀,由上而下自腹根至坐骨神经结扎处每5mm一段取样,每个样品加1N NaOH 0.4ml,100℃消化3小时后,再加乙二醇乙醚及 PPO-POPOP-甲苯闪烁液各5ml,暗适应12小时后用 LKB 液闪仪测定放射活性。左侧脊髓 L₄₋₅节段同样注射 ³H 亮氨酸,结扎坐骨神经并取样测定,以做为电刺激的对照。

试验结果发现,12.5HZ 主要促进 ³H 亮氨酸的顺向转运(7/8),50HZ 促进及抑制转运各半(4/8),而200HZ 主要抑制这种转运(6/8)。此外,肌肉复合动作电位的幅度也有相应的变化。抑制转运的,刺激期电位幅度多半降低明显,休息后不能恢复;促进转运的,刺激期多半降低不明显,休息后基本恢复。以上结果与不同频率电刺激对 HRP 逆向转运的影响相似。为进一步观察高频刺激对顺向转运的影响,我们又用300-500HZ 电刺激右侧腹根,发现它多数促进 ³H 亮氨酸的顺向转运。目前这一工作仍在进行中。

不同频率的电刺激造成神经元或靶细胞不同的兴奋或抑制状态,观察神经元及靶细胞不同功能状态对胞浆转运的影响有一定的理论及实际意义。

参 考 文 献

- [1] 甘思德:《神经元胞浆转运和分子信息传递》。即将印行
- [2] 甘思德等:辣根过氧化物酶的生化测定《军事医学科学院院刊》(2):223,1981
- [3] 甘思德等:《不同频率电刺激神经及其靶器官对轴浆转运的影响》
《军事医学科学院院刊》(4):441,1981

切断大白鼠颈上交感节前纤维 对节细胞超微结构的影响

汪家政 彭善云 汪宝珍* 张德芳

大白鼠颈上交感节(SCG)在切断节前纤维后,用荧光组化方法观察到节内儿茶酚胺荧光强度及分布发生了改变,主细胞核周质荧光减弱,靶器官虹膜内末梢荧光亦减弱,节内荧光纤维及膨体末梢普遍增多,荧光增强。究竟发生这些改变的形态学基础是什么?增生的膨体末梢来源何在?为了从形态学上说明这一系列问题,本实验采用了嗜铬反应的电镜观察。

实验动物为30天龄雄性大白鼠,在乌拉坦麻醉下,进行右侧SCG节前纤维切断手术,左侧为对照侧。术后分别于3天,1、2、3、6周及半年取材,经嗜铬固定后,制作超薄切片。在JEM-6C电镜上观察。实验动物总数为32例。

术后SCG超微结构发生了以下三方面的改变:

1. 节前神经末梢的退变

断节前纤维术后,引起其末梢变性的特点是:突触前透明囊泡消失,末梢变空,有的末梢内出现溶细胞小体(Cytolysome),有一层界膜包复,内部充满嗜铬物质;有的致密,有的松散。如果是突触所在,那么原突触特化区仍然保持不变。

术后3天,SCG内多数节前神经末梢已退变,并出现溶细胞小体,但还可见到少数活存的轴-树突触。术后一至三周,术侧SCG内节前神经末梢已完全变性,并且未见有新生的胆碱能神经末梢,溶细胞小体仍然出现在神经末梢内。术后六周及半年,术侧SCG内仍可见到变性的轴-树突触或轴-体突触,但同时也发现有少数新生的胆碱能突触。术后六周,除了在神经末梢中见到溶细胞小体外,在施旺氏细胞胞浆内也有发现。术后半年,则只在施旺氏细胞胞浆中见到溶细胞小体。

本实验观察到术后节前神经末梢的变化与文献报道一致。术后远期效果为节内有新生的胆碱能突触出现,这一变化是节前末梢的修复,还是节后神经元的胆碱能化改变,还有待其他工作配合求出结果。

2. 主神经节细胞的变化

在术后不同时期都观察到主细胞内去甲肾上腺素(NE)贮存颗粒明显减少甚至消失。某些神经元胞体出现退行性改变。术后3天,在不同动物SCG中可见到严重变性的主细胞,核仁分解,胞浆溃变,出现大空洞。术后一周,在不同动物中看到有的主细胞胞浆边缘水肿,崩解,与卫星细胞隔离,间隙中有细胞碎片。术后两周,有的主细胞的改变与术后一周相似。术后三周,有的变性主细胞表现为细胞萎缩,核质比增大,胞浆内各种细胞器减少。术后六周,术侧绝大多数主细胞形态接近正常,可看到修复过程中的细胞,胞浆内细胞器排列与对

* 院中心仪器室电镜组

照侧不同,胞浆分内外两带,内带粗面内质网致密,外带缺少粗面内质网,胞浆电子密度低,这种细胞在术后两周就已见到。术后半年有的主细胞胞浆内溶酶体明显增多。

切断节前纤维后,SCG内主细胞胞体的退变在文献中尚未提及。但本实验观察到术后主细胞胞体出现的一些退行性改变,与用荧光组化方法所见的核周质荧光减弱这一改变是一致的。

3. 节内交感神经膨体增生

切断节前纤维手术对SCG内的交感神经纤维和膨体(形成突触部位),不引起任何损伤。而且术后一至三周,术侧含小中心致密囊泡(NE贮存部位)的膨体及其形成的肾上腺能突触比其它组明显增多。

膨体中递质贮存囊泡有以下三个特点:第一,用常规固定方法不能显示小中心致密囊泡,必须用嗜铬反应才能显示;第二,用利血平处理的动物无论在术侧或对照侧都没有含小中心致密囊泡的膨体出现;第三,从囊泡大小来看,其直径为30—50nm,而节内小强荧光细胞中的小中心致密囊泡直径为100—150nm。因此,术后节内肾上腺能膨体增多,是由于节内主细胞树突与轴突的侧枝生成。

综上所述,通过采用嗜铬反应方法,观察到断节前纤维术后SCG内的某些超微结构改变与荧光组化观察所见是平行的。

切断节前纤维引起颈上节节后神经元递质的转变

华仲慰 汪家政

哺乳类动物交感节后神经元递质以去甲肾上腺素(NE)为主,其纤维常与副交感节后胆碱能纤维在一系列靶器官中形成一对功能相互拮抗的神经支配。然而,七十年代中期人们发现胚胎或新生大鼠的交感神经元离体培养时在某些特定条件下不仅能合成大量乙酰胆碱(ACh),而且能与某些靶细胞间形成胆碱能突触,具有与副交感神经同样的效应。这是发育成熟前的交感神经元递质具有可塑性的表现。为了研究在体交感神经元是否也可能在一定条件下发生递质的转变,本实验以切断节前纤维为条件对大鼠颈上节及其靶器官之一——虹膜进行了观察。大鼠交感神经节约在出生后3周发育成熟,实验乃选了3日、10日及30日三组动物,以对不同发育阶段的神经元进行比较。切断动物右侧颈上节节前纤维,手术后1周或3周取双侧节及虹膜分别制成冰冻切片及铺片。通过组织化学方法处理,观察两个指标:NE及乙酰胆碱酯酶(AChE)。NE以醛类诱发光的方法(Torre的SPG法)显示,在荧光显微镜下作定性与半定量观察;AChE作为ACh的水解酶,用来间接反映ACh存在的可能性。采用Karnovsky法显示,在光学显微镜下作定性与半定量观察。

实验结果见到:(1)术后含高活力AChE的神经末梢在节内基本消失;节后神经元核周质AChE活力普遍有所增加,表现为未成熟的神经元(3日及10日动物)术后3周时较1周时变化更有发展,其中以3日动物组变化为大,成熟的神经元(30日动物)变化与前者呈相反趋势,术后1周变化较大,3周反有一定程度的恢复。(2)虹膜扩瞳肌中神经末梢丛AChE活性

变化的趋势与上述神经元核周质 AChE 变化颇为一致。(3)节后神经元核周质荧光减弱,节内荧光纤维及膨体普遍增多。前者变化程度以未成熟神经元为明显;后者相反,成熟的神经元反应较大。(4)虹膜扩瞳肌中神经末梢丛密度与荧光强度变化以未成熟神经元为明显,术后神经末梢密度及荧光强度均减弱,成熟神经元仅表现荧光强度有些减弱。

上述结果提示断节前纤维后交感神经元递质数量与分布发生变化,同时递质性质也有转变的可能性,表现为作为正常交感神经递质的 NE 在胞体及靶器官内末梢的减少以及 AChE 在这些部位的相应增加;上述变化在组间的差别也反映了不同发育阶段交感神经元反应的差异。

由于整体条件的复杂性,参予交感神经元递质控制的决非节前纤维一个因素。近年国外有些人在研究发育中交感神经元递质转变的机制中分析到节前纤维、靶器官、血液循环、节内其他细胞或递质以及培养中人为条件诸因素都具有一定的直接作用;同时,也考虑到在有些条件下以 AChE 间接反映 ACh 的存在是不够准确的,因为 AChE 除存在于胆碱能神经元内,也可见于接受胆碱能神经支配的组织或神经元中;还有人发现 AChE 除具有水解 ACh 的作用外还可能具有其他生物效应。因此,本实验结果可以作为一个初步材料,说明:(1)交感神经元递质的数量与性质可能因失去节前纤维的控制而发生变化,或者说节前纤维对节后神经元递质具有一定的调节控制作用;(2)交感神经元递质数量与分布的可塑性,以性质的可塑性在神经元本身发育的不同阶段而有明显区别。

(本工作在蔡翹教授指导下进行,柳川、彭善云、单京瑞
同志共同完成)

蟾蜍脊髓运动神经元树突背丛突触的分布与功能

李文彬 蔡竖平 伯立嘉 张朝瀚 李凤雏
指导教师 蔡 翹

“蟾蜍脊髓诱发电位性质分析”报导的主要实验结果是,运动神经元树突背丛在后柱与肌肉向心神经形成单突触联系。该突触呈兴奋性效应(去极化)。但该实验没有详细地观察这类突触在脊髓内分布的范围。本实验着重观察运动神经元树突背丛突触的分布并探讨这类突触的功能。

一、背丛树突突触在脊髓内的分布

用方形波脉冲顺行刺激坐骨神经腓肠肌、胫前肌分枝,在脊髓腰膨大不同部位记录顺行诱发电位。甲基兰标定记录电极位置。突触后电位记出的部位标明该突触的分布。电位分布如图所示。树突背丛突触分布于背侧灰白质的斜行椭圆区。在此区内能够记出兴奋性突触后电位。

此外,在椭圆区也能记出正相突触电位,推论这类电位是距背丛树突梢区域的电穴反应;是兴奋性电位的续发反应。但也不排除它可能是抑制性突触电位。

二、背丛树突突触的功能

长期以来,运动神经元树突功能问题有不同的见解。一种意见认为它兴奋时只产生电紧张,引起易化效应,不能激活运动神经元产生动作电位。似乎支持此见解的实验根据较多。另一种意见认为它不仅产生电紧张,也能激活运动神经元产生动作电位。本实验的结果支持后一种见解,初步证明:背丛树突突触兴奋时可以激活运动神经元产生动作电位。得出这一判断的主要根据是,顺行刺激肌肉向心神经,在腹侧灰、白质可以记出双相动作电位,它分布在运动神经元轴突走行路径(腹根出口处及相邻的灰质部分)及前联合区。双相电位是运动神经元兴奋时产生的动作电位的传播。

此外,在前角运动神经元胞体占据的区域还能见到互相突触电位,甚至个别的实验中还能见到互相突触电位上重叠着峰形动作电位。互相电位是背丛树突兴奋时胞体上引起的电穴反应。

本实验结果的意义:第一,描述了树突背丛突触在蟾蜍脊髓的分布范围,为进一步研究该突触的功能提供了条件;第二,树突背丛突触对运动神经元的兴奋作用,产生动作电位,说明某些肌肉向心纤维(如肌梭感觉纤维),在牵张反射及运动神经元的功能调控中起着重要的作用(见图1)。

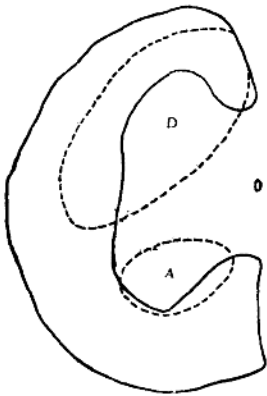


图1 蟾蜍脊髓诱发电位分布

D: 兴奋性突触后电位的分布范围,运动神经元树突背丛在此区内与肌肉向心神经形成突触联系。
A: 正相突触电位及峰电位分布区,说明树突背丛突触兴奋时可以激活运动神经元产生动作电位。

蟾蜍脊髓诱发电位性质分析

李文彬 王福庄 张炳烈 张朝临 陈士英 柏立嘉
指导教师 蔡 翹

本实验选用离体蟾蜍脊髓标本,在分离过程中保留了坐骨神经及其神经根。当用方形波脉冲刺激坐骨神经腓肠肌及胫前肌分支,可在腰膨大的不同部位上记录出诱发电位。电位用玻璃微电极(尖端约2μ,内充3MKCl或1M醋酸钾甲基兰饱和液),电极(电阻为10—30MΩ)引导,细胞外记录。用甲基兰电泳法标定电极尖端的位置。电位的幅度、相位及时程随记录的位置而异。实验的主要结果:

一、前角运动神经元树突向背侧延伸达后柱(角)

用电生理学方法,分析了逆行刺激诱发电位的分布,证明:运动神经元的树突向背侧延伸达后柱。逆行刺激是指切断8—11背根,刺激外周神经只兴奋前角细胞的轴突,诱发出胞体动作电位。由于兴奋传播与生理传导路径方向相反,故称为逆行刺激。这突电位的特征是,前角细胞胞体分布区的电位幅度大、潜伏期短,呈峰形电位;后柱记出的诱发电位潜伏期稍长于前角电位,幅度小,峰形特征不明显,波形平缓。此结果说明,后柱电位来自前角运动神经元,是它的树突向背侧延伸所致。Czekely, G. 在形态学的观察中曾经指出,蛙前角运动神经元的树突分为背丛、背内侧丛及外侧丛。后柱记出与前角区同步性逆行诱发电位,从生理学方法证明了前角细胞背丛向后柱的延伸。

二、肌肉的向心神经与运动神经元树突背丛在后柱形成突触。

当顺行刺激(切断8—11腹根)时,可以在后柱记出恒定的电反应。该电位的成分包括:突触前、突触后早期反应及突触后晚期反应。各成分的参数见表1。它们的基本性质:突触前电位是肌肉向心神经兴奋时的电反应;突触后早期反应为运动神经元树突背丛与肌向心神经形成突触的电反应;突触后晚期反应为多(或双)突触的兴奋效应。这些突触的神经环路有待进一步证明。

表1 顺行诱发电位诸参数

电 位	潜 伏 期		幅 度		上 升 时 间		下 降 1/2 时 间	
	(m, s.)	n*	(m, v.)	n	(m, s.)	n	(m, s.)	n
突触前.....	1.68 ± 0.11	32	1.26 ± 0.36	8	1.07 ± 0.11	10	0.76 ± 0.07	10
突触后: 早期反应.....	4.17 ± 0.38	19	0.76 ± 0.08	18	1.79 ± 0.21	19	1.64 ± 0.17	19
晚期反应.....	9.38 ± 0.68	18	0.55 ± 0.05	17	4.92 ± 0.29	18	5.10 ± 0.35	18

注: n 为例数

后柱区记录的恒定的电反应,具有突触电位的特征,它的意义有四个方面:

第一,揭示中枢神经元突触传递的基本过程;

第二,研究肌向心神经与运动神经元的功能联系,从细胞水平探讨牵张反射的生理基础;

第三,探讨背丛树突突触的神经递质,追索各种递质对运动神经元的功能调控;

第四,为阐明临床脊电图波形的生理意义提供实验依据。

蟾蜍脊髓运动神经元突触的逆行识别

王福庄 李文彬 张炳烈 张朝临 柏立嘉

指导教师 蔡 翹

神经元之间的突触及突触传递是神经系统的基本结构和功能。建立中枢突触和突触传递的实验模型,对了解中枢神经系统的基本功能和结构,研究中枢递质对中枢神经元与突触的效应和神经毒剂的防治均有重要意义。本实验采用逆行通路激活运动神经元,观察逆行诱发

电位从胞体至末端树突的移行分布,并用向心纤维的顺行刺激与之发生“冲撞”,逆行识别运动神经元的突触活动。

方 法

选用离体蟾蜍脊髓,保留坐骨神经腓肠肌支。切断双侧第8—9对脊神经腹根,其近心端及与背根相连的坐骨神经腓肠肌支分别置于一对银丝刺激电极上。刺激用10微秒波宽的方波、适宜刺激强度5—6伏作间隔5秒的单个刺激。实验时脊髓置于14—20℃的任氏液浴槽中,不断通以95% O₂和5% CO₂混合气泡。

用单管玻璃微电极,内充以1M醋酸钾饱和甲基兰溶液,电极阻抗10—20兆欧,尖端直径约2—3微米,在体视显微镜直视下用微操纵器将电极送入脊髓,作细胞外记录。按常规电生理法记得前角明显的运动神经元诱发电位并作组织学定位后,即退出电极,按微操纵器的读数向背柱方向移行,每次移行200微米。在各移行点分别记录逆行刺激、顺行诱发及两者的“冲撞”电位。

电位记录后,电极尖端用电泳甲基兰法标记定位。脊髓的有关部位作冰冻切片,伊红背景染色。标记点呈明显兰色,以×40及×100的放大倍数在显微镜下作组织学定位。

结 果 与 讨 论

— 一般情况 在脊髓前角与后柱共观察和记录了247个位点的诱发电位。其中114个为逆行诱发电位,61个为顺行诱发电位,可以产生“冲撞”反应的单位有72个,仅占全部观察位点的29%。图1为部分甲基兰标记位点的逆行电位。从电位分布趋势可见,前角的逆行的

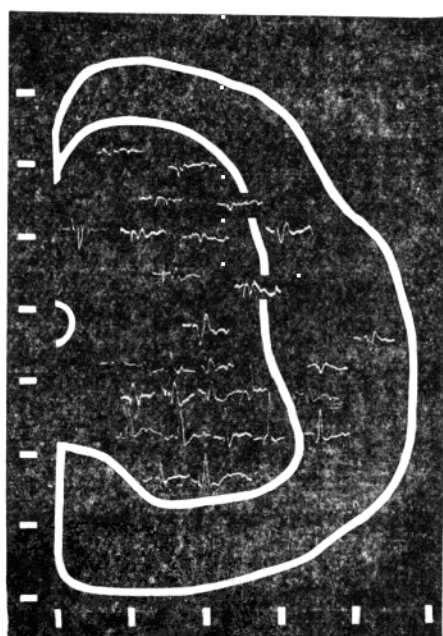


图1 半切脊髓逆行诱发电位分布

纵、横分度各为200μm

左边为内侧面

电位校正,1mV,5mS。向上

为负电位

电位主要集中于运动神经元胞体区，后角的逆行电位比较分散，中间部及外周白质只能记到少数分散的诱发电位。根据已有的形态学资料，运动神经元的树突有三束：外侧丛、背侧丛和内侧丛。这里我们可以看出逆行诱发电位的分布与神经结构有密切的关系。

二 逆行诱发电位的特征和移行分布 在运动神经元胞体所在的前角可记到典型的逆行诱发电位，其成分为负相峰电位、正相快波和负相慢波。它是刺激腹根后逆行兴奋运动神经元胞体而产生的动作电位，电位幅度大而潜伏时短。

随着电极自前角向后柱移行，每隔 200 微米观察一个位点，可以看到电位按一定途径分布，偏离此部位即测不到逆行电位。自前往后电位波形由负相峰电位经中间的双相波（先正后负）移行为后柱的低幅正相波（见图 2）；电位幅度逐渐降低，由平均 2.16 毫伏降为 0.65 毫伏；潜伏时则逐渐增加，前角平均为 0.50 毫秒，至后柱则平均为 0.80 毫秒。

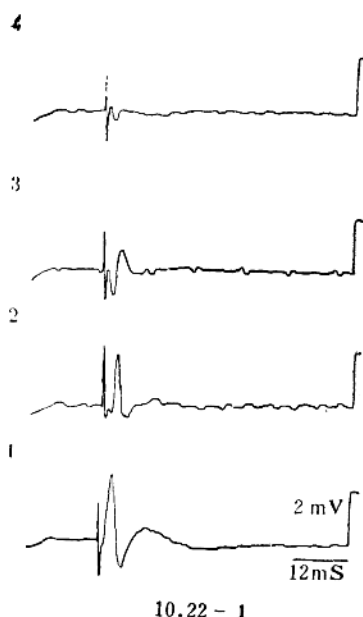


图 2 经 50 次迭加后的记录波形

1—4：自前角向后角移行，每隔 200 微米的位点记录的逆行诱发电位。可看到自前角向后角移行的波形、幅度和潜伏时的移行改变。

逆行诱发电位在移行分布中的变化是很有意义的。首先它有一定分布途径和部位，并非均匀分布于整个脊髓灰质。其次，波形的改变由前角负相峰电位移行为后柱的正相电位，可以认为前者为电穴，后者为电源。证明兴奋产生于前角运动神经元胞体，沿树突导向后柱末梢区。前、后角记录的电位潜伏时的差异正是说明树突主动传导的证据，潜伏时的变化可用作神经元树突主动扩布的指针，测定它传导的距离。此外，仍应考虑树突被动的电紧张性传播。

三 运动神经元的逆行识别 这是了解运动神经元突触活动很重要的一方面。

1. 兴奋阈值和高频刺激的测试

由于运动神经元的轴突较细，逆行兴奋去极化程度低于顺行刺激，故逆行兴奋的阈值较高，一般为 3 伏时方始出现诱发电位。随着刺激强度加大，电位幅度逐渐增加，潜伏时不变。适宜刺激为 6 伏，超过 10 伏即出现劣性反应。腹根能耐受从 0.1—100Hz 的高频刺激，电位

幅度不变, 而 100Hz 的背根顺行刺激, 电位却显见低平。

2. 逆行兴奋与顺行传入的“冲撞”效应

逆行识别运动神经元的又一个方法即使用“冲撞”技术。实验时采用一对刺激, 一个为顺行刺激坐骨神经腓肠肌支, 另一个为逆行刺激腹根。前者为条件性刺激; 后者为试验性刺激。当顺行诱发的峰电位和逆行刺激之间在一点相撞时, 即产生“冲撞”效应。我们用微电极在后柱的一点(图 3), 分别记录逆行和顺行刺激引起的诱发电位, 可以看到典型的后柱逆行电位和顺行突触电位(图 4-1, 2)。证明在这里肌向心传入纤维与运动神经元远端树突形成单突触

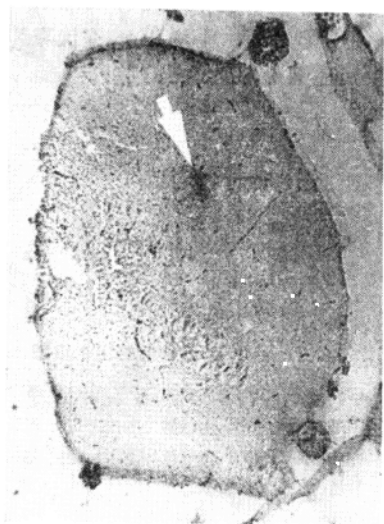


图 3 半切脊髓横切面

右侧为内侧面, 箭头标记点为微电极尖端位置

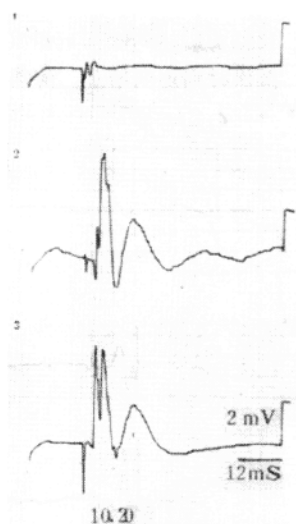


图 4 自图 3 标记点记录的诱发电位

1. 逆行诱发电位
2. 顺行诱发电位
3. 冲撞电位

联系, 因为在这里对逆行刺激有反应, 同时由顺行刺激产生的突触电位潜伏期较短, 说明是单突触联系。然而当采用“冲撞”技术后, 在该点则不能产生逆行电位, 仅能看到顺行突触电位(图 4-3)。这一结果正好说明这里产生的逆行电位来自运动神经元, 也就是说运动神经元的远端树突末梢确实到达后柱, 由腹根逆行刺激而产生的诱发电位在到达树突末梢时被顺行诱发电位冲撞而消失。

这样的“冲撞”效应不仅在后柱, 在前角运动神经元胞体所在区同样可以看到, 说明肌向心传入纤维的突触在运动神经元广为分布, 从胞体乃至远端树突。

小 结

本实验采用离体蟾蜍脊髓, 观察电刺激腰膨大第 8—9 腹根作逆行刺激以及同侧坐骨神经腓肠肌支作顺行刺激, 细胞外记录诱发电位。

根据主要实验结果: 逆行诱发电位的特征和移行分布及组织学定位观察、电位“冲撞”效应等可以证实运动神经元的树突向后柱延伸, 与兴奋性最强的肌传入纤维形成树突突触。对

于这种突触的生理意义目前认识不一, 尚待进一步研究。

离体神经组织细胞外记录的微标记

王福庄 张炳烈 张朝临
指导教师 蔡 翹

在微电极记录神经元电活动后, 必须对微电极尖端做精确定位。最好的方法是用微电泳技术在微电极尖端处沉积一些染料做标记, 然后再在组织切片上做鉴定。要求着色染料一定要在亲水环境中有很好的可溶性和电泳的迁移率, 并且还应与神经组织紧密粘合形成很明显的颜色点, 这种斑点在体外可维持几小时或几天以上。用于标记技术的微电极应具有与通常用于神经生理实验中同样的性质。目前, 在多数整体实验中常采用微电泳铁氰化钾和经动物灌注硫酸亚铁的呈色反应。为了适应离体神经组织微电极记录的微标记特点, 减小对神经元的损伤; 可较长时间记录不同部位的电位, 多次标记神经元, 我们采用了微电泳生物染料甲基蓝的微标记法。

实验用离体蟾蜍脊髓作细胞外记录单个刺激坐骨神经腓肠肌支时运动神经元的电活动。记录电极为单管玻璃微电极, 用 1 M 醋酸钾饱和甲基蓝溶液充灌电极。电极尖端为 2—3 微米, 电极电阻 10—20 兆欧。电极尖端接负极, 用一个可调的直流电源, 在通路中串联一个微安表控制所需要的电流。微标记后的神经组织经饱和钼酸铵和 10% 中性福尔马林固定后作连续冰冻切片, 厚度 20—30 微米, 伊红背景染色。微标记点呈明显蓝色, 在显微镜下测定此点, 以表示记录部位。

结果看到, 含有饱和甲基蓝的微电极所记录到的电位与单独用 3MKCl 充灌的微电极没有差别。细胞外记录的动作电位信噪比与通常用 3MKCl 玻璃微电极的记录相同, 神经细胞电活动保持同样长的时间。

进行电生理记录之后, 经过微电极用负电流标记的记录位置, 通以 1—2 微安的电流, 1—2 分钟即可得到明显的 50—100 微米直径的颜色斑点(见图 1)。通过的电流量和斑点的大小之间成正相关。由表 1 可见: (1)微标记范围随着电流强度的增加而明显增大; (2)随着电

表 1 不同时间、电流强度的微电泳范围(毫米)

电 流 强 度 (微安)		1	1.3	3.8	7.5
电泳时间 (分)	1	0.05	0.07	0.15	0.22
	2	0.10	0.15	0.20	0.25
	3	0.13	0.20	0.22	0.32
	4	0.15	0.20	0.29	0.37
	5	0.16	0.20	0.32	0.45
	10	0.17	0.21	0.35	0.59
	15	0.19	0.25	0.40	0.70
	20	0.20	0.28	0.45	0.77

泳时间的延长而电泳范围亦加大。经不同条件比较,用 1.5—2 微安的电流强度,微电泳 2—3 分钟的微标记效果较佳。若小于此电流和时间则不能显示蓝色,若电流太强或电泳时间过长,则染料沉积范围太大,起不到微标记的作用。

2 微安左右的电流通过电极 3 分钟,在组织切片上能找到标记点的可能性大于 90%。这仅对甲基蓝第一次从电极注出而言。当第二次或第三次电泳时,电极电阻急剧升高,并阻止微电极的电流通过。为了增加第二点标记的成功,通过电极的电流应该减到最小。对于成功的微电泳所必须的最小电流应为 1 微安通电 1 分钟(即 60 μ ASec)

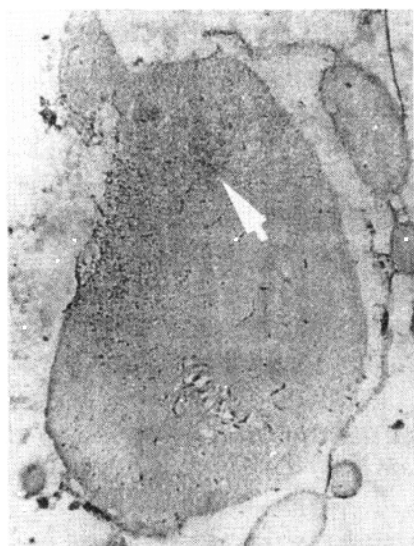


图 1 半切蟾蜍脊髓横切面($\times 40$)

箭头指示后角运动神经元胞体区附近可见明显蓝点

此外,玻璃微电极尖端直径的大小也影响微标记范围。用尖端 4 微米以上、电极电阻小于 10 兆欧的玻璃微电极,以同样的条件进行电泳时,则微标记范围明显增大,甚至产生自然扩散现象。

由于甲基蓝染料与神经组织具有较高的粘合力,所以其着色斑点停留在神经组织内一年以上不消失,组织切片可作长期保存。

为了获得明显的颜色斑点,甲基蓝的浓度应维持在饱和状态。溶液的 pH 不限制,可在一定范围内变动。

实验证明,甲基蓝有很好的可溶性和电泳迁移率,能和神经组织紧密粘合,颜色斑点久而不退。用甲基蓝做微电极尖端的微标记,无论在体内或体外均可适用,方法简便、宜行。这些都是其他细胞外标记染料,如亮绿(Fast Green)或普鲁士蓝反应所不及的。

但此法不足之处是不能耐受所有的组织学技术,如石蜡包埋和 Nissl 染色的影响,对此尚待以后继续研究改进。