

神经解剖学基础

曾小鲁 主编

高等教育出版社

(京)112号

内 容 提 要

本书简要地介绍了神经解剖学基本理论、基础知识,注重反映学科的新进展、新概念,侧重阐述了神经解剖学的研究方法、神经系统的种系发生和个体发生、神经元、神经胶质、突触、中枢神经系统、网状结构、边缘系统、传导通路及自主神经系统等内容。

本书适用于高等院校生物学系、心理学系、教育学系以及医药院校本科生及研究生使用,也可供有关专业工作者参考。

神经解剖学基础

主编 曾小鲁

*

高等教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

国防工业出版社印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/16 印张 15 字数 370 000

1994 年 10 月第 1 版 1994 年 10 月第 1 次印刷

印数 0001—1 165

ISBN7-04-004991-0/Q·227

定价 7.45 元

前 言

神经生物学是当前的前沿科学,本世纪的最后10年被命名为“脑的十年”,而神经解剖学正是神经生物学的重要组成部分。许多综合性大学和师范院校生物系、心理系、教育系等开设该课已有多数,但都苦于没有适用性、针对性强的教材。国内虽已出版几本神经解剖学,读者对象多为医学院校师生,而且内容较多,不适于生物学等系师生使用。

1988年11月在南昌江西大学召开了神经解剖学及神经生理学教学、教材研讨会。参加研讨会的有:北京大学、北京师大、南京大学、华南师大、华东师大、江西大学、江西医学院及高等教育出版社等单位的有关教授和专家。与会者对国内师范院校和综合性大学开设神经解剖学课程的情况进行了分析与研究,认为应尽早编写出版适合于生物学等系开设该课使用的教材,并对编写大纲进行了讨论,明确了教学目的和教学要求。

1992年9月,经过编者4年多的工作完成了本书初稿,在曲阜师大召开了审稿会。参加审稿会的除编者外还有:北京师大、河南师大、华南师大、曲阜师大、北京中医学院及高等教育出版社的有关专家和教授。他们对初稿进行了认真、细致的审阅,提出了许多宝贵意见和建议。在此谨向参加两次会议的专家教授致以由衷的谢忱。会后,各章编者根据审稿意见进行了修改和补充,最后由南昌大学曾小鲁进行统稿和整理。

由于本教材是为已学过人体组织解剖学的生物学等系本科生和研究生使用的,为避免重复,对有些内容作了适当删节。在内容和章节安排上,也没有按传统的体系编排,而是采用神经解剖学中一些较为重要的内容进行专章阐述的形式编排,如对突触、神经胶质、脑干网状结构、边缘系统等都作专章介绍。考虑到生物学系学生的学习特点和需要,用了较大篇幅介绍神经解剖学的研究方法及其发展,特别对70年代以来的新技术新方法作了较全面的介绍,对神经系统的种系发生及比较神经解剖学的有关内容也作了适当介绍。在附录中还对常见的神经解剖学名词进行简明扼要的归纳。

本教材中专业名词以1991年全国自然科学名词审定委员会公布的《人体解剖学名词》(科学出版社)为准。外文名词采用英文,无英文的则用拉丁文标注。

南昌大学辜清副教授参与名词词条的撰写和归纳工作,并对全书书稿进行了校对,谨此致谢。

由于学科发展很快,知识更新日新月异,使编者很难跟上形势,加上我们水平有限,书中一定还存在不少缺点和不足之处,恳请读者提出宝贵意见寄有关章节编者,供日后修正用。

编者

1993.4

目 录

第一章 神经解剖学的研究方法	(1)
一、大体解剖学方法	(1)
二、组织学方法	(2)
三、神经径路追踪法	(6)
四、神经细胞、组织和器官培养	(11)
五、电子显微镜技术	(11)
六、各种结合法研究	(13)
七、新技术对神经科学的影响	(16)
第二章 神经系统的种系发生和个体发生	(19)
第一节 神经系统的种系发生	(19)
一、无脊椎动物的神经系统	(19)
二、脊索动物的神经系统	(22)
三、头化、脑化与皮质化	(27)
第二节 神经系统的个体发生	(28)
一、神经管的形成	(28)
二、脊髓的发育	(31)
三、脑的发育	(32)
四、神经嵴的发育	(36)
第三章 神经元	(39)
一、概述	(39)
二、神经元的超微结构	(40)
(一) 质膜	(40)
(二) 细胞核	(40)
(三) 细胞质(或胞浆)	(41)
(四) 神经元的突起	(44)
第四章 神经胶质	(50)
一、概述	(50)
二、星形胶质细胞	(51)
三、少突胶质细胞	(52)
四、小胶质细胞	(53)
第五章 突触	(54)
第一节 概述	(54)
第二节 突触的超微结构	(55)
一、突触的基本形态	(55)
二、突触的微细结构	(56)
第三节 突触的类型	(62)
一、突触的分型	(62)
二、突触连接的类型	(63)
三、兴奋性突触与抑制性突触	(67)
四、其他几种类型的突触	(67)
第四节 突触的变性	(69)
第六章 脊髓	(71)
一、脊髓的外形	(71)
二、脊髓的内部结构	(73)
(一) 灰质	(73)
(二) 白质	(75)
(三) 脊髓内部结构的比较解剖	(76)
第七章 脑干	(78)
第一节 脑干的外形	(78)
一、延髓的外形	(78)
二、脑桥的外形	(80)
三、第四脑室	(80)
四、中脑的外形	(82)
第二节 脑干的内部结构	(82)
一、脑神经核	(82)
二、非脑神经核	(85)
三、网状结构	(85)
四、延髓的内部结构	(86)
五、脑桥的内部结构	(90)
六、中脑的内部结构	(97)
第八章 脑干网状结构	(103)
第一节 位置、分部和细胞构筑的一般特点	(103)
一、位置和分部	(103)
二、细胞构筑的一般特点	(104)
第二节 特异性网状核	(106)
一、延髓特异网状核	(106)
二、脑桥特异网状核	(107)
三、中脑特异网状核	(107)

第三节 网状结构的纤维联系	(108)	(三) 大脑皮质	(157)
一、网状传入纤维	(108)	(四) 大脑半球的髓质	(165)
二、网状传出纤维	(110)	第十二章 边缘系统	(167)
第四节 中缝核	(111)	一、嗅脑的概述	(167)
一、中缝核团	(112)	二、边缘叶和边缘系统	(168)
二、中缝核的纤维联系	(114)	三、隔区和隔核	(171)
第九章 间脑	(116)	四、海马结构	(172)
一、背侧丘脑	(116)	五、杏仁体	(175)
(一) 背侧丘脑的分部	(118)	六、扣带回	(177)
(二) 背侧丘脑的主要核团及其 纤维联系	(118)	第十三章 传导通路	(178)
(三) 背侧丘脑核团的分类	(123)	第一节 感觉传导通路	(178)
二、后丘脑	(123)	一、本体感觉传导通路	(178)
(一) 内侧膝状体	(124)	二、痛觉、温觉、粗略触觉和压觉 (浅部感觉)传导通路	(181)
(二) 外侧膝状体	(124)	三、视觉传导通路	(182)
三、上丘脑	(125)	四、听觉传导通路	(184)
(一) 松果体	(126)	五、平衡觉传导通路	(185)
(二) 后连合	(126)	六、味觉传导通路	(186)
(三) 缰核	(126)	七、嗅觉传导通路	(187)
(四) 丘脑髓纹	(127)	八、(一般)内脏感觉传导通路	(187)
四、下丘脑	(127)	第二节 运动传导通路	(187)
(一) 下丘脑分区及其核团	(127)	一、躯体运动传导通路	(187)
(二) 下丘脑的主要纤维束	(131)	二、(一般)内脏运动传导通路	(193)
(三) 下丘脑和垂体的联系	(133)	第十四章 自主神经系	(194)
五、底丘脑	(135)	一、概述	(194)
(一) 底丘脑的主要核团	(135)	二、自主神经系与躯体运动神经 系的比较	(194)
(二) 底丘脑的主要纤维束	(137)	三、交感神经	(196)
第十章 小脑	(138)	(一) 交感神经的中枢部	(197)
一、小脑的外形和分部	(138)	(二) 交感神经的周围部	(197)
二、小脑的内部结构	(142)	四、副交感神经	(200)
(一) 小脑皮质的分层及结构	(142)	五、交感神经和副交感神经的比较	(202)
(二) 小脑皮质的传入纤维	(144)	六、自主神经丛(内脏神经丛)	(202)
(三) 小脑皮质传入纤维及小脑 皮质内神经元间的联系	(145)	七、脊髓副交感神经	(202)
(四) 小脑核	(146)	八、自主神经的中枢	(203)
(五) 小脑的传入和传出纤维	(147)	第十五章 脑和脊髓的被膜、血 管、脑脊液及脑屏障	(204)
第十一章 大脑	(152)	一、脑和脊髓的被膜	(204)
一、大脑的外形	(152)	二、脑和脊髓的血管	(206)
二、大脑的内部结构	(154)	三、脑脊液及其循环	(208)
(一) 侧脑室	(154)	四、脑屏障	(209)
(二) 基底核	(155)		

附录	常见神经解剖学名词	
	解释	 (213)

参考书	 (233)
------------	-------------

第一章 神经解剖学的研究方法

神经解剖学(neuroanatomy)是研究神经系统形态和结构的学科,包括神经系统的研究方法,神经系统的种系和个体发生,神经系统的区分,神经组织的结构,神经系统各部分的外形、内部构造和联系以及它们的功能。它作为神经生物学的重要组成部分,是神经生理学、神经生物化学、神经病理学、神经药理学和临床神经精神病学的基础,所以是一门重要的基础学科。

由于神经解剖学是一门形态学学科,所以要根据形态学本身的规律去学习和掌握神经系统的基本结构(即观察和记忆形态结构、核团定位和纤维联系);又要根据神经系统是生物机体内高度分化的主导系统,具有结构复杂、联系广泛的特点,分析和思考神经系统内部及其与其他系统的关系,才能将结构与功能相结合,全面地了解神经系统。

神经解剖学的发展经历了 100 多年的历史。在 19 世纪中叶,由于化学工业的发展,人们可以用染色的方法显示神经组织的结构,使神经解剖学逐渐从解剖学中分离出来,形成一门独立的学科。至 19 世纪后期,由于一些优秀的神经解剖学家(Golgi、Cajal、Nissl 等)的杰出贡献,使神经解剖学的知识得到进一步充实和发展,奠定了现代神经解剖学的基础。例如,Golgi 法用硝酸银镀染显示完整的神经元轮廓及突起的走向和分布;Cajal 法可以镀染神经元内的神经原纤维;Nissl 法可以显示神经细胞中的尼氏体,从而开辟了研究神经系统细胞构筑(cytoarchitectonis)的途径;Weigert 法能对有髓神经纤维的髓鞘进行染色,Marchi 法则能选择性地显示变性髓鞘,从而为束路追踪研究提供了有力的手段。20 世纪以来,由于科学技术的进步,大大促进了神经解剖学的纵深发展。50 年代以后,各种新的研究方法相继问世,开拓性的研究成果层出不穷。除了对传统的研究方法加以改进、提高外,又发展了多种多样的标记法(如放射自显影法、荧光组化法等),70 年代以来诞生的 HRP 法、荧光素标记法、2-DG 法、免疫组化和原位杂交组化法等使传统神经解剖学的面目为之一新。它不仅已由大体解剖进入组织和细胞水平,而且进入了亚细胞和分子水平,现在,神经解剖学的研究已超出了单纯形态学研究的范畴,而从化学本质上研究神经系统的结构和功能,并提出“化学神经解剖学”(chemical neuroanatomy)的新概念。现代神经解剖学的主要研究方法如下:

一、大体解剖学方法

(一) 一般的大体解剖法

用解剖器械进行解剖,作巨视形态学观察,可对神经系统进行初步的形态学研究,如中枢和周围神经系的位置、外形、灰白质的区分,神经节的纤维联系、脑室系统的组成和交通等。

(二) 冰冻脑的解剖剥离法

利用脑内细胞群与纤维束所含水分不同的特点,将脑进行冰冻处理,由于膨胀系数的差别可将纤维束分离显示出来。方法是用固定的脑标本冲洗后在 -15°C 下放置 10~20 天,再取出冲洗,用钝器刮离,显示纤维束。

(三) 脑、脊髓厚片染色法

利用灰质与白质髓磷脂的含量不同,用水溶性染料使含髓磷脂少的灰质着色,而含髓磷脂多的白质则不着色,这样就可明显的区分出灰质和白质的界限。

二、组织学方法

(一) 经典的染色法

1. Golgi 法 Camello Golgi(1843~1926),意大利人,1873 年创建此法,即用硝酸银镀染整个神经元的胞体和突起,对研究神经组织的内部构筑具有很大的优越性。Golgi 法只能显示切片中一小部分神经元,其染色机理至今不明。缺点是不易掌握,极不稳定。

2. Cajal 法 Ramon Y Cajal(1852~1934),西班牙人,1903 年创立此法,也是镀银法,是利用神经组织对硝酸银的反应,然后被还原剂还原成金属银,使神经原纤维染成黄棕色或黑色,而髓鞘则不被染色。

3. Nissl 法 Franz Nissl(1860~1919),德国人,1892 年创立此法,并以发现神经元内的尼氏体而闻名。此法为研究神经系统的细胞构筑开辟了先河。此法是用碱性染料,如焦油紫、硫堇、甲苯胺蓝或美蓝等对神经组织进行染色,故能显示胞体内存在于尼氏体中的核酸。

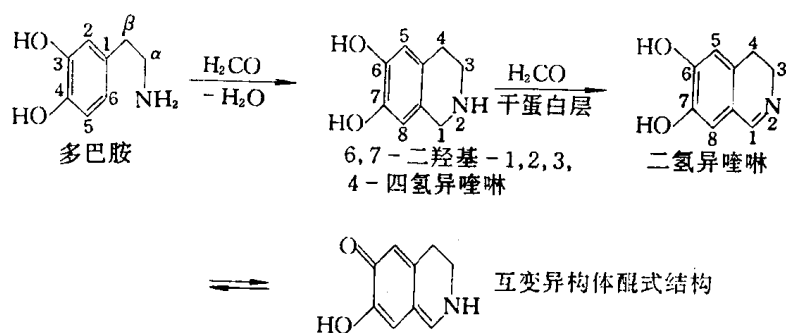
4. Weigert 法 Karl Weigert(1843~1904),德国人,1884 年创建此法,是用金属化合物(重铬酸钾)先将神经组织进行媒染,然后再染苏木素,使髓鞘被染成深蓝色,神经元胞体和其他组织仍为无色,是显示有髓神经纤维的好方法。以后,出现了不少改良法,其中以 Pal 的改良法应用最为普遍。

(二) 组织化学方法

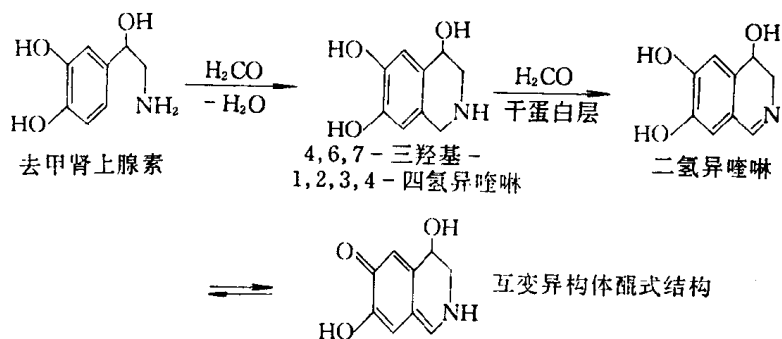
1. 荧光组化法 神经解剖学中的荧光组化法(fluorescence histochemical method)是用荧光显微镜观察组织中的荧光化合物来研究神经元的递质和纤维联系的方法。荧光组化中的荧光是一种光致光的现象,当组织中的荧光化合物受到高能量的紫外光或蓝紫光(激发光)照射时,原子核外围的低能量电子(内层电子)就被激发(吸收光量子)而成激发电子进入高能量的外层,由于这种激发电子是不稳定的,很容易释放能量(发射光量子)而回到基态(内层),这种释放能量的光量子就是荧光显微镜下所看到的荧光。荧光显微镜的光源(高压汞灯)能提供激发光,激发滤片使激发光通过,吸收滤片阻断激发光,只让发射光通过。由于激发电子在释放能量过程中有部分能量损耗,故激发光能量大于发射光能量,激发光波长总比发射光波长短(波长与能量成反比)。

醛类物质能将单胺类化合物转变为荧光化合物。1951 年,Eränko 首次用甲醛诱发荧光进行神经元内单胺递质(儿茶酚胺和 5-羟色胺)的细胞定位。1962 年,瑞典学者 Falck 和 Hillarp 创建了甲醛(formaldehyde)诱发荧光组化技术(FA 法)。1972 年,Björklund 等又建立了乙醛酸(glyoxylic acid)法,简称 GA 法。此后,荧光组化技术在神经系统研究中得到广泛的应用,并产生了许多改良技术。

(1) 基本原理 FA 法中的甲醛与儿茶酚胺(catecholamine,CA)的多巴胺(DA)或去甲肾上腺素(NA)缩合产生闭环的 6,7-二羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉或 4,6,7-三羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉,后者在干蛋白层的催化下脱氢为强荧光化合物二氢异喹啉,并与其互变异构体醌式结构处于依赖 pH 的动态平衡。在 410nm 波长的激发光激发下,最大发射波长为 480nm,发绿色荧光。

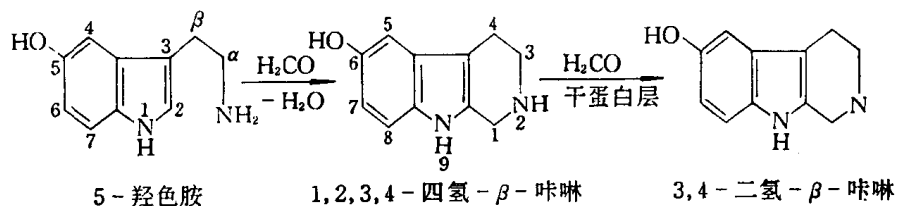


多巴胺与甲醛的组织化学反应



去甲肾上腺素与甲醛的组织化学反应

甲醛与 5-羟色胺(5-HT)缩合,产生闭环的 1,2,3,4-四氢- β -咔啉,后者在干蛋白层的催化下脱氢为荧光化合物 3,4-二氢- β -咔啉,在 410nm 的激发波长激发下,最大发射波长为 525nm,发黄色荧光。



5-羟色胺与甲醛的组织化学反应

GA 法中乙醛酸诱发单胺荧光的组织化学反应与 FA 法相似,也通过两个步骤:第一步,CA 与 GA 缩合环化形成 6,7-二羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉-1-羧基酸(多巴胺者)或 4,6,7-三羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉-1-羧基酸(去甲肾上腺素者)。第二步,四氢衍生物再和 GA 发生反应,产生强荧光的 2-羧甲基-6,7-二羟基-3,4-二氢异喹啉(多巴胺者)或 2-羧甲基-4,6,7-三羟基-3,4-二氢异喹啉(去甲肾上腺素者)。

GA 与 5-HT 的反应第一步形成 1,2,3,4-四氢- β -咔啉-1-羧基酸,第二步有两种方式:一是

经自动氧化脱羧产生 3,4-二氢- β -咔啉;另一是通过与 GA 继续作用形成 2-羧甲基-3,4-二氢- β -咔啉,后者又进一步脱羧,形成 2-甲基-3,4-二氢- β -咔啉。

(2) 主要步骤 冰冻干燥法(FA 法):取材(不经灌注固定)→骤冷(低于 -80°C)→冰冻干燥→甲醛蒸气处理 80°C 1 小时→真空石蜡包埋→切片→封片→荧光显微镜观察。

恒冷箱切片法(GA 法):取材(不经灌注固定)→恒冷箱切片→室温下将切片浸入 SPG 液(蔗糖 2.04g,磷酸二氢钾 0.96g,乙醛酸 0.30g,蒸馏水加至 30ml,pH7.4)→空气干燥→入 80°C 烘箱 5 分钟→封片→荧光显微镜观察。

2. 免疫组化法 免疫组化法(immunohistochemical method)是用细胞化学的方法将组织中的抗原-抗体免疫反应显示出来的技术,它包括免疫荧光法、酶标抗体法、PAP 法、A 蛋白法、ABC 法等。

(1) 基本原理 免疫学的基本原理是抗原-抗体反应,免疫细胞化学的关键就是用特异性抗体与组织中的抗原相结合。

抗体(antibody)是免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig),可分为 5 类,即 IgG、IgA、IgM、IgD 及 IgE。1963 年,Porter 对 IgG 的化学结构提出了一个模式图,后经许多学者证实,其他几类 Ig 具有与 IgG 相似的基本结构(图 1-1)。所有 Ig 的基本结构由 4 条肽链对称排列组成,即 2 条相同的重链(由 440 个氨基酸组成)和 2 条相同的轻链(由 214 个氨基酸组成)。在多肽链的 N 端(氨基

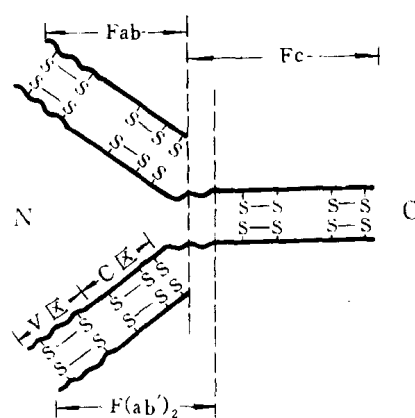


图 1-1 免疫球蛋白基本结构示意图

端),轻链的 1/2 与重链的 1/4 这一区域氨基酸链排列顺序随抗体特异性不同而有所变化,故称可变区,它赋予抗体以特异性。用木瓜酶可将 IgG 重链于 219 位氨基酸处断裂,得到 3 个片段:2 个相同的称 Fab 段(抗原结合片段);另一片段为 Fc 段。

抗原(antigen)是能刺激机体产生免疫反应的物质,在神经生物学中可作为抗原的物质有酶类(如多巴胺- β -羟化酶)、神经肽、经典神经递质、膜性结构成分(如受体蛋白)、类固醇等。

由于抗原-抗体反应形成的免疫复合物一般不能被肉眼和光镜所分辨和看到,故需将抗体或免疫复合物用可以分辨的物质加以标记,因此就产生和发展了免疫细胞化学方法。它对现代神经解剖学的发展起了巨大的推动作用。

(2) 免疫荧光法(immunofluorescence method) 免疫荧光法是将荧光素 FITC (fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素)或 TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate, 四甲基异硫氰酸罗达明)与抗体相结合以进行标记,再用这种标记的抗体(荧光抗体)与抗原

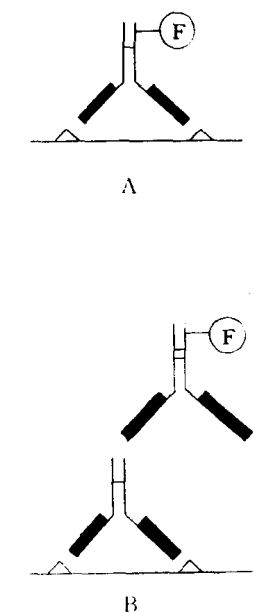


图 1-2 直接(A)和间接(B)发生反应,就可在荧光显微镜下借免疫荧光(FITC 为黄绿色,TRITC 为橙红色)的出现确定组织中抗原物质的存在(图 1-2),此为直接免疫荧光法。也可先用第一级抗体(如兔抗血清)与抗原发生反应,然后用荧光素标记的第二级抗体

(如羊抗兔血清)与第一级抗体发生反应,通过荧光的出现确定抗原的存在,此即间接免疫荧光法。间接法的灵敏度比直接法高。

由于可以用不同的荧光素标记不同的第一级抗体,故可同时证实组织中不同抗原的存在,此即免疫荧光双重标记法。

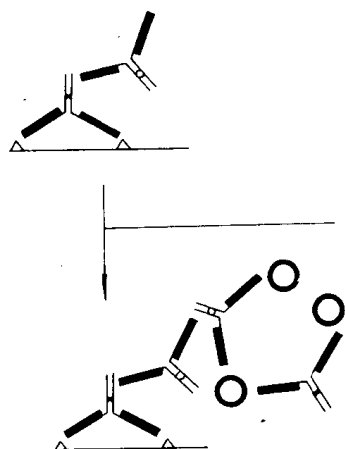
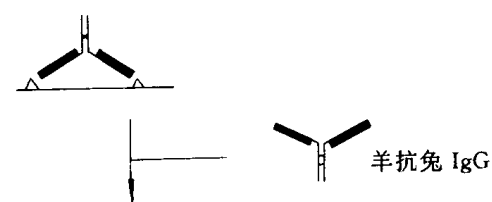
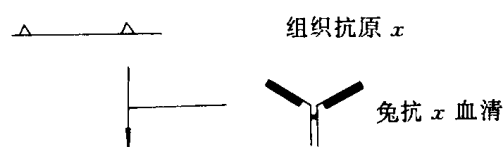
直接免疫荧光法和免疫荧光双重标记法的步骤如下:

- 1)组织经灌注固定→恒冷箱切片→PBS 洗涤。
- 2)TRITC 结合的抗甲种抗原第一级抗体→洗涤。
- 3)FITC 结合的抗乙种抗原第一级抗体→洗涤。
- 4)封片、荧光显微镜观察。

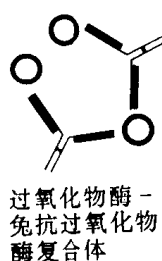
(3) 非标记抗体过氧化物酶-抗过氧化物酶法(unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase method,简称 PAP 法)

PAP 法是由 Sternberger 等学者在 70 年代初期发展起来的一种比较灵敏而稳定的方法,由四步反应完成(图 1-3)。

第一步 用第一级抗体,该抗体来自 A 种动物(如兔),对组织中的抗原具有特异性。



$H_2O_2 + DAB$
棕色沉淀



第二步 用第二级抗体,该抗体来自 B 种动物(如羊),以其一个 Fab 段与 A 种动物 IgG 的 Fc 段结合,另一个 Fab 段游离。

第三步 用过氧化物酶-A 种动物抗过氧化物酶复合体与第二级抗体的游离 Fab 段结合。

第四步 呈色反应,加 H_2O_2 和 DAB (二氨基联苯胺),产生褐色沉淀。在此过程中,DAB 为电子捐献者, H_2O_2 为底物,过氧化物酶为催化剂,所产生的褐色沉淀为 DAB 通过氧化聚合作用所形成的吲达胺多聚体。

以上各步骤中没有任何抗体被共价结合所标记,故称非标记抗体法。

3. 原位杂交组化法 原位杂交组织化学(in-situ hybridization histochemistry, ISHH)法是用核苷酸探针来检测细胞或组织切片中的特异性核苷酸序列并将其显示出来的一种技术。探针是 cDNA (complemental DNA, 互补 DNA),靶是组织细胞中的 mRNA。

利用蛋白质合成过程中的反转录原理,先提取细胞内已知核苷酸顺序的总

图 1-3 PAP 法反应步骤示意图

mRNA, 逆转录成 cDNA, 然后在限制性内切酶的作用下将 cDNA 插入载体-细菌质粒的环状 DNA (重组 DNA), 再将重组的 DNA 环感染大肠杆菌, 使 cDNA 增殖 (分子克隆)。将 cDNA 克隆经过纯化和同位素标记后与未知细胞中的 mRNA 杂交 (克隆杂交)。由于探针是放射性同位素标记的, 故可用放射自显影术 (后述) 显示。无放射性的物质不显影, 从而可对靶组织内的核苷酸序列进行定位。

ISHH 可用来检测蛋白质合成的状况及动态变化, 并可与其他技术相结合, 研究投射径路或递质共存。

三、神经径路追踪法

(一) 损毁法和神经变性研究

早期用物理方法 (如切断、电灼等) 破坏核团或纤维, 导致神经变性来研究神经径路。因定位不够准确、选择性不强而被化学性损毁法所代替。本世纪 60 年代, Tranzer 和 Thoenen 发现去甲

肾上腺素的同系物 6-羟多巴胺 (6-OHDA) 能引起肾上腺素能神经末梢的选择性变性, 其原因是: ① 6-OHDA 对轴膜上胺摄取机制中的载体有高度亲和力; ② 6-OHDA 很容易自我氧化形成有极大细胞毒性的分子 (如苯醌) 而引起神经变性。后来, 又发现 5, 6 和 5, 7-双羟色胺 (5, 6-HT, 5, 7-HT) 作为 5-HT 能神经元的化学切除剂。

神经毒作用于胞体, 导致神经元完全变性, 轴突逆行变性; 神经毒作用于轴突, 则导致远侧段轴突逆行变性, 近侧段轴突有递质积聚, 胞体可有逆行变性表现; 神经毒作用于神经末梢, 导致末梢迅速变性 (数小时), 伴有非末梢轴突内递质积聚 (图 1-4, 1-5)。

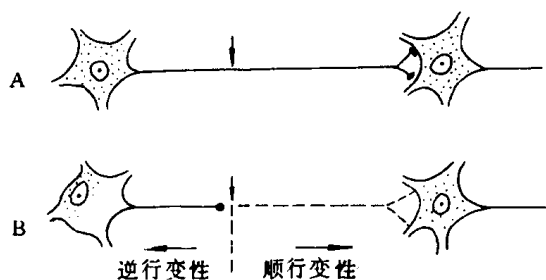


图 1-4 示神经变性

A. 正常情况; B. 示轴突切断后, 远侧段发生逆行变性; 近侧段可发生逆行变性和轴突反应 (染质溶解, 核偏心, 胞体膨胀)。↓. 示切断处

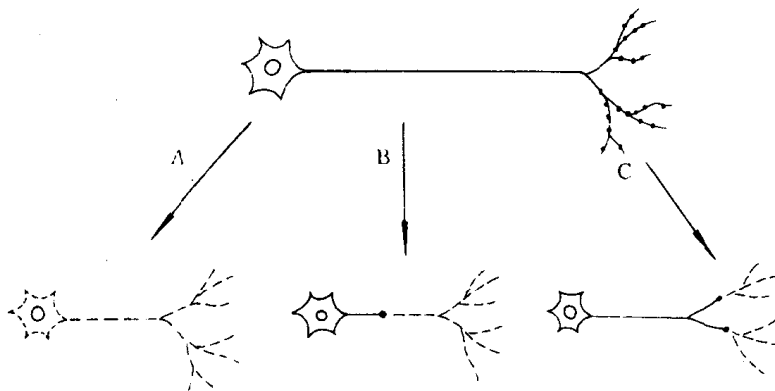


图 1-5 示神经毒作用于不同部位后单胺神经元的变性过程

A. 神经毒作用于胞体, 导致神经元完全变性; B. 神经毒作用于轴突, 则远侧段轴突逆行变性, 近侧段轴突有递质积聚; C. 神经毒作用于神经末梢, 导致末梢迅速变性

上述药物均不能通过血脑屏障,只能作直接脑内或脑室(池)内注射。

1850年,Waller发现当神经组织病变或损毁后出现变性(degeneration),称为Waller变性。胞体变性表现为尼氏体解体或消失[这种现象称染质溶解(chromatolysis)],以及核移位(偏心)。神经纤维变性则表现为微管断裂,轴突肿胀、髓鞘崩解。电镜观察,可从变性末梢追踪到突触水平(见第五章)。

变性神经纤维的染色方法有:

1. Marchi法 Marchi为意大利人,1890年创立此法。此法可选择性地镀染变性髓鞘。先用重铬酸钾媒染,再用铁酸浸染,使变性髓鞘呈黑色点状或柱状颗粒,而正常有髓纤维则染成淡黄色,容易鉴别。本法的缺点是不能使变性的无髓纤维着色,不能追踪到终末。

2. Nauta法 Nauta,荷兰人,1954年改进了镀银法,用高锰酸钾进行前处理,利用正常纤维与变性纤维的还原能力不同,当正常纤维已被高锰酸钾氧化时,变性纤维还有还原能力,可使银被还原为黑色颗粒,沉着在变性纤维上。本法的主要优点是可追踪变性的有髓及无髓纤维,直至终末。但在稳定性方面仍有欠缺。故又加以改良,其中以Fink和Heimer使用硝酸铀的改良法较为理想。

在神经系统某些部位(如视觉系统),神经元的变性可跨越突触,引起下一个神经元变性,称跨神经元变性(transneuronal degeneration)。

(二) 辣根过氧化物酶法

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)法是根据神经元轴浆运输的原理设计的一种神经径路追踪法。1971年,Kristensson和Olsson首先报道HRP可逆行运输并用组织化学方法定位于神经元胞体。此后,HRP就被广泛应用于中枢和周围神经系的束路学研究。

此法是将HRP用微玻管压力注射或微电泳导入脊髓和脑组织。HRP遂被附近的神经元胞体、轴突末梢通过胞饮而摄取(损伤的过路纤维也可摄取),被摄取的HRP经逆行轴浆运输送至胞体(末梢摄入者)或被顺行轴浆运输送至末梢(胞体摄入者)(图1-6)。

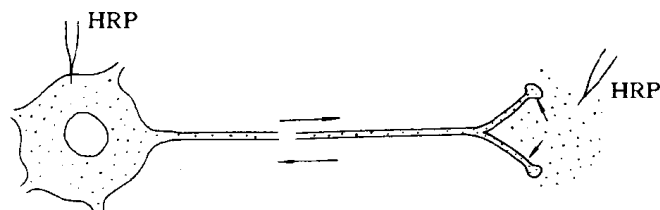


图1-6 示HRP逆行和顺行标记

长箭头示轴浆运输方向;短箭头示HRP被神经末梢摄取

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,制成酶标配体。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由胞饮而被摄取,这种由受体介导的胞饮比无受体介导的胞饮效率高得多,故提高了灵敏度。

显示组织中HRP的呈色剂是联苯胺的衍生物,如二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)、四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine, TMB)等。其原理是在HRP催化下使 H_2O_2 中的 O^{2-} 与呈

色剂中的 H^+ 结合生成水,而呈色剂则被氧化为不溶于水的有色沉淀(DAB 产生褐色沉淀,TMB 产生蓝色沉淀)。

(三) 放射自显影术

放射自显影术(autoradiography, ARG)是用照相胶片或感光乳胶显示组织中放射性的一种方法。它在本世纪初发展起来,60 年代理论、技术成熟,用来研究神经径路。

ARG 的原理也是根据轴浆运输的机制,即将放射性同位素,如 3H 或 ^{14}C 标记的氨基酸注入神经组织,被神经元胞体吸收后参与神经细胞的蛋白质合成(图 1-7)。然后,合成的物质随轴浆运输至末梢,借助放射性同位素发出的 β 射线使胶片或乳胶感光,经显影、定影后产生黑色银粒,故可确定神经元的纤维投射区。由于蛋白质是在胞体内合成,故 ARG 一般是顺行的追踪,也不存在过路纤维摄取干扰问题(图 1-8)。

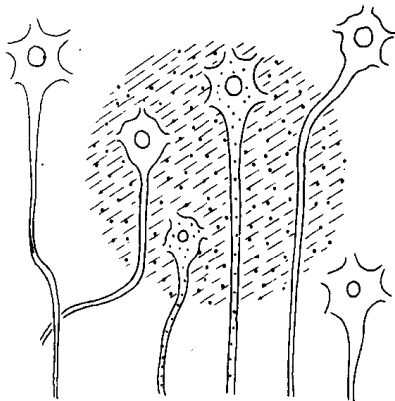


图 1-7 示 ARG 的原理

虚线条示氨基酸注射区,游离氨基酸被神经元胞体吸收后参与蛋白质合成,并被顺行运输至末梢

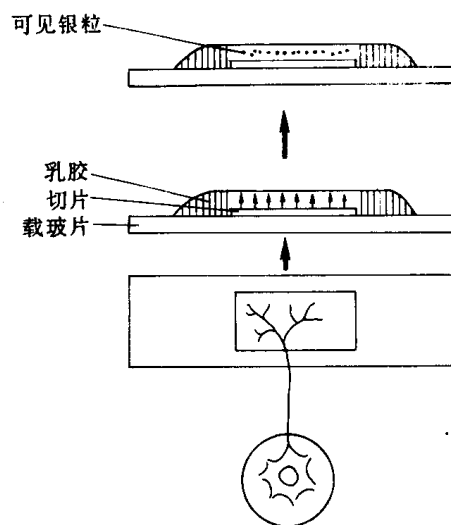


图 1-8 示 ARG 中的浸膜、曝光、显影和定影等过程

箭头示程序方向,圆圈内的神经细胞位于标记氨基酸注射区,其投射区制成切片进行观察

主要步骤:

1. 将 3H 标记的亮氨酸(浓度 25mCi/ml 以上,比放射性 54Ci/mM)用蒸馏水稀释后,以微量注射器注入组织。
2. 动物存活 1~7 天,10%福尔马林灌注固定、取材、切片、贴片、脱脂、水洗、晾干。
3. 涂布原子核乳胶,在暗室内,暗盒曝光 2~6 周。
4. 显影、定影、漂洗、干燥。
5. 甲苯胺蓝染色,脱水、透明、封片。

(四) 2-脱氧葡萄糖法

2-脱氧葡萄糖法(2-deoxyglucose method, 2-DG 法)是通过糖代谢显示神经组织功能状态的一种放射自显影术。由于机体某一部位受刺激后,在与其有关的传导径路上的神经核团的糖代谢将发生改变,故可证实该通路的存在及神经核团(或部位)的机能变化。此法 70 年代开始应用于神经解剖学研究。

葡萄糖是供能的重要物质,神经细胞的机能活动需要葡萄糖氧化提供能量。因此,脑内葡萄糖的含量应能反映神经细胞的机能状态。但是,由于葡萄糖在神经组织内不断进行代谢和氧化,脑中贮存的糖原极少;不可能检测其真正水平。2-DG 却可以达到这一要求。它是由葡萄糖第 2 位碳原子上的羟基被氢原子代替而来。这一简单的结构变化使 2-DG 与葡萄糖具有完全不同的性质。2-DG 可以和葡萄糖一样由血液进入脑组织,被神经细胞摄取,并在己糖激酶的作用下分别转变为 6-磷酸-2-DG 和 6-磷酸葡萄糖。以后的变化则不相同:6-磷酸葡萄糖在 6-磷酸己糖异构酶的作用下转变为 6-磷酸果糖而进入三羧酸循环和进行糖酵解;6-磷酸-2DG 则因第 2 位碳原子上无羟基而不能异构为 6-磷酸果糖,其代谢只能停留在此阶段而在脑组织中积聚(表 1-1)。

表 1-1 葡萄糖与 2-DG 的代谢途径比较

血液		脑 组 织	
		前 体	代谢产物
葡萄糖	血脑屏障	葡萄糖	6-磷酸葡萄糖
			$\downarrow$ $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
[^{14}C]-2-DG		[^{14}C]-2-DG	6-磷酸-[^{14}C]-2-DG

因此,若用放射性同位素 [^{14}C] 或 [^3H] 标记 2-DG,就可通过放射自显影术显示脑组织中 [^{14}C]-2-DG 或 [^3H]-2-DG 的积聚情况而间接反映神经细胞的活动状态(兴奋时增多,抑制时减少)和神经信息传导通路。

2-DG 法的基本步骤与一般的 ARG 相似,但又有其特点:

1. 示踪剂 [^{14}C]-2-DG 或 [^3H]-2-DG 不是直接注入脑组织,而是通过静脉插管注入血液。然后给动物以某种刺激,同时避免其他刺激,以免干扰结果分析。
2. 6-磷酸-2-DG 极易溶于水,不能被固定剂固定,故动物经灌注固定后应立即取材,放入液氮中冷冻,以免标记物扩散。
3. 由于葡萄糖代谢普遍存在于神经系统,故本法只能显示某一核团或某脑区的代谢率变化(银粒密度差别),而不能局限于显示单个神经细胞。

如果用放射性同位素 [^{18}F] 标记 2-DG,并用正电子发射断层摄影术(positron emission tomography, PET)显示,则能在体外测出用正电子的放射性同位素标记的 2-DG 的存在,通过电子计算机图象处理显示活动着的脑结构。

最近,在神经系统内神经元基因表达的调控中发现了一种复杂的与致癌基因 c-fos 有关的刺激-转录机制。当神经元受到某种兴奋性刺激时,其 c-fos 癌基因的表达急剧增加,合成的 Fos 癌蛋白堆积在细胞中,可用原位杂交组化或 Fos 抗体免疫组化法显示出来,故 c-fos 的诱导和显示作为一种神经元机能活动的标志物,是一种神经径路追踪的新方法。

(五) 跨神经元追踪(transneuronal tracing)

近年来还发现了跨神经元标记物,如破伤风毒素、麦芽凝集素等,它们与神经细胞膜上的受体结合而标记。但这些跨神经元标记都很弱,并且不恒定。最近,有人用活的疱疹病毒和杆形病

毒作跨神经元标记。这些病毒能被神经细胞摄取,在细胞核内复制、运输和释放。再被下一个神经细胞摄取、运输、释放。由于复制,导致追踪信号的强力放大,然后通过免疫细胞化学方法显示病毒的抗原而证实神经通路的存在。这些是其优点。缺点是此法只能在动物身上进行。而且,由于病毒对神经胶质细胞也有强的亲和力,从而导致标记物的扩散而造成非特异性结果。因此,需要确定最佳存活时间,尽可能避免因存活时间过长导致神经胶质细胞摄取。

(六) 荧光素标记法(fluorescein labeling method)

70年代初期,Kristensson发现将荧光染料 Evans 蓝(与白蛋白结合)注入神经末梢区后,荧光染料能被轴突摄取而逆行运输至神经元胞体,并可用荧光显微镜观察。后来,Kuypers等不用与白蛋白结合的 Evans 蓝和其他荧光染料也得到了满意的效果,于是建立了荧光素标记法。

1. 各种荧光物逆行标记的特征 目前已知可用于逆行标记的荧光物很多,表 1-2 列出 11 种,并归纳比较它们在标记应用上的特征。

表 1-2 各种荧光物在标记应用上的特点

荧光化合物	注射浓度(%)	注射量(μ l)	存活时间	最大激发波长(nm)	最大发射波长(nm)	荧光颜色	标记部位	
							核	胞浆
Evans blue(Eb)伊文思蓝	10	0.025~0.1	2~3天	540	735	红	+	+
DAPI*	2.5	0.025~0.1	2~3天	360	490~500	绿-蓝	+	+
primuline(Pr)樱草黄	10	0.025~0.1	2~3天	400	465	黄		+
propidium iodide(PI)碘化丙啉	3~5	0.5~1.0	2~3天	340	600~610	桔红	核仁	+
				500				
true blue(Tb)真蓝	3~5	0.5~0.8	7~8天	365	420~430	蓝	+	+
				390				
fast blue(Fb)固蓝	3	0.6	3~4天	385	460	蓝		+
nuclear yellow(Ny)核黄	1	0.4~1.0	12~24小时	370	520	金黄	+	
bisbenzimidazole(Bb)双苯甲亚胺	1	0.1~0.6	6小时	360	500	绿-蓝	+	
granular blue(Gb)粒蓝	3	0.3	7~8天	355	425	蓝		+
diamidino yellow(Dy)二脒基黄	2			385	510	黄	+	
SITS**	5~20			365	430	蓝	+	+

* DAPI 4'-6-diamidino-2-phenylindol. 2HCl(4'-6-二脒基-2-苯基吲哚盐酸盐)

** SITS 4-acetamido,4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid(4-乙酰胺基,4'-异硫氰基芪-2,2'-二磺酸)

荧光物逆行标记的原理与 HRP 逆行标记相似,也是通过胞饮被轴突末梢摄取,然后借轴浆逆行运输至胞体。在顺行运输中,由于荧光素容易自末梢扩散,使标记不清晰,故顺行标记多不被采用。

2. 主要步骤 配制荧光标记物溶液→微量注射器注入标记物→存活→10%福尔马林经心脏灌注→取材→恒冷箱切片→晾干→荧光显微镜观察。

3. 荧光素双重标记法 由于不同的荧光物具有各自的标记特征(激发波长、发射波长、荧光颜色、存活期等均不完全相同),使荧光素在逆行标记神经元投射方面具有 HRP 所不可能拥有的优越性,即可用荧光素双重标记法来研究神经元的分支投射(divergent projection)(图 1-9)。具体方法是将两种不同的荧光素(其中一种标记核,另一种标记胞浆)分别注入神经元的两个侧支,然后经存活、灌注、取材、切片、晾干等步骤后,在荧光显微镜下观察。若能在同一个神经元见到核和胞浆被不同的荧光素所标记,则证实此神经元的两个侧支投射到不同的靶区(注射部位)。

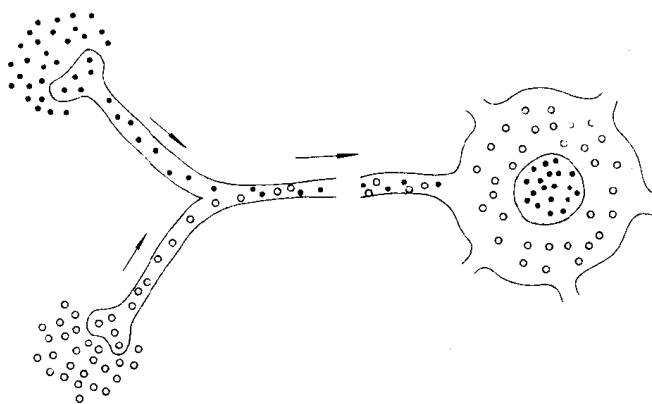


图 1-9 示荧光素双重标记法原理,两种荧光素分别标记核(●)和胞浆(○)

在进行荧光素双重标记时,原则上应采用两种发不同荧光(发射波长峰值相差越大越好)的荧光素来标记核和胞浆,以达到颜色分明、定位准确的双标目的。据双标记原理,也可进行荧光素三重标记研究。

四、神经细胞、组织和器官培养

自 80 年前 Harrison 在体外存活的神经细胞并观察神经纤维的形成以来,神经组织培养越来越受到学者们的重视。现在,它已成为神经生物学不可缺少的实验手段,并对许多神经科学领域的新进展(如神经分化的调节,突触传递,神经递质的作用,神经连接的作用机制,神经元和神经胶质特异性蛋白,神经突变疾病以及脑组织移植等)发挥了巨大的作用。

神经细胞和组织培养的方法要点如下:

1. 取材应使其体积不超过 1mm^3 ,以利于细胞扩散。常用胚胎组织(自动物妊娠子宫内取出),应注意消毒和避免损伤。
2. 放入盛有营养介质的培养皿中。培养介质种类很多,主要含有葡萄糖、血清、平衡盐溶液等。需要时加入抗生素以防细菌污染。
3. 用酶(如胰蛋白酶)或机械方法(虹膜剪)使细胞分离。
4. 放入培养箱培养一定时期。
5. 细胞计数,形态观察及生活力鉴定:用细胞计数器计算细胞增殖情况,在显微镜下观察细胞的分化和成熟,用与神经活性物质有关的酶(如乙酰胆碱酯酶、单胺氧化酶)或显示神经活性物质的组织化学方法检测培养细胞的生活力(如荧光组化法等)。

目前,能对肾上腺髓质、交感和副交感神经节、胚胎脊髓、小脑、脑干、新皮质和海马、下丘脑、松果体、视网膜及周围神经节进行培养。

五、电子显微镜技术

300 年前,荷兰学者 Leeuwenhoek 创制成功世界上第一台光学显微镜,对医学生物学的发展作出了划时代的贡献。把人们对生命科学的研究由宏观世界推向微观世界,能在细胞水平观察有机体的构造。但由于光波波长的限制,光镜的分辨距离不能小于 $0.2\mu\text{m}$ 。随着电子光学的发展,电子显微镜术应运而生。1932 年,Knoll 和 Ruska 首次发表了关于电子显微镜的实验和理论