

神经介质及有关酶类的组织化学

艾民康等 编译

● 人 民 卫 生 出 版 社 ●

Q55
AMK

神经介质及有关酶类 的组织化学

艾民康 彭庆康 赵轶千 朱长庚
张祐曾 熊希凯 邓德忠 郑达人 编译
茹立强 黄汉明 陈桃香 殷光甫
常国清 武忠敬 罗秋云

人 民 卫 生 出 版 社

责任编辑 张之生

**神经介质及有关酶类
的组织化学**

艾民康等 编译

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

四川新华印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米16开本 24印张 4插页 548千字
1987年6月第1版 1987年6月第1版第1次印刷
印数: 00,091—2,620
统一书号: 14048·5143 定价: 5.70元
[科技新书目 138—84]

前 言

神经传递在六十年代以前,主要是神经生理学家及药理学家研究课题,待六十年代中期,即逐渐引起了组织化学工作者的兴趣,在组织化学领域中开展的工作,已证明某些神经介质及其合成或降解酶,可于细胞水平作出精确定位。1970年在芬兰赫尔辛基第一次召开国际神经传递组织化学会议,1971年由Eränkö教授主编,第一本神经传递的组织化学——Histochemistry of Nervous Transmission (论文集)问世。从此以后的十多年内,在有关杂志发表了不少与神经传递的组织化学有关的论文。1980年在英国及1984年在芬兰分别举办的第六届、第七届国际组织化学及细胞化学学术会议,会上虽然有一些关于神经介质的论文报告,但所占比例较小,尚不能反映出神经介质研究领域中的动向。

现代科学技术的发展,也带动神经传递组织化学研究的革新,如突触体的制备及醛诱发单胺荧光;放射自显术及超微组织化学。以后又把放射自显术及酶标的免疫组织化学应用到亚细胞水平上。非标记抗体酶法(PAP)的问世,进一步推动了免疫组织化学研究的进展,由于此技术具有较高的敏感性及特异性并适用于超微水平,使得七十年代末,较迅速地扩大了有关肽能神经的知识。与此同时,为数众多的肽类“介质”或神经调制物被揭示出来,这无疑又对神经传递及其功能的了解提出了新的课题。某些肽类介质(如P物质)及某些酶类(如多巴胺 β -羟化酶)即可用于免疫组织化学的定位;用放射自显影术可以探查一定介质或药物的受体在中枢的分布,如脑啡肽其中枢受体的分布已通过对鸦片受体的放射自显影有了较清楚的认识。快速放射自显影术的发展,已有可能解决电镜水平放射自显影实验周期过长的缺陷。

冷冻蚀刻(Freezing-etching)电镜技术,可用来研究突触膜结构,沿生物膜劈开的断裂面从不同深度、不同层次和不同角度暴露突触膜结构的各个面(如浆面及外面),突触囊泡,囊泡附着部位、孔,突触后膜膜内颗粒以及突触前膜的活性区,揭示出膜的表面结构。尽管此种技术还不能很好地反映出介质的组织化学特征,但它为突触传递机制的研究开辟了又一途径。

显微分光光度计及显微荧光分光光度计的应用使得组织化学由定位定性向定量发展。电子计算机与光度计等仪器的结合,不仅可以加速介质研究的进程,而且可以提高研究的质量,如把计算机控制的高分辨率扫描显微镜应用于显微荧光计去测定及分析醛诱发荧光,或应用三密度自动显微光度计去测定切片内的酶活性。实际上神经介质的组织化学与介质的生物化学很难截然分开,如脑匀浆超速离心,分级离心,能够分离出与介质密切相关具有形态结构的突触体或突触囊泡进行测定,或者以同位素标记药物处理的动物脑组织切片,先在显微镜下定位,并取出核团,然后进行微量测定。免疫组织化学更离不开生物化学手段,如层析分子筛才能提纯有关抗体和除去非特异性荧光。用辣根过氧化物酶、放射自显影术、荧光素标记法等,根据轴浆转运的原理,去探查神经元的投射及其间的联系。当然这种技术还要与其他组织化学方法结合起来(如乙酰胆碱酯酶的显示),才能更好地判断神经成分的组织化学性质。

此外，借助于实验的手段（如组织培养、前房移植、手术或化学切除、结扎神经等）来研究植物神经的再支配，介质或有关酶类的转运，介质的释放、摄取及贮存的组织化学。由于主题为神经介质，就难免要涉及一些有关的神经生理学、神经化学及神经药理学。总之，编译本书的目的就是向国内介绍有关神经介质的组织化学在七十年代前后的进展。

由于我们的业务水平有限，编写时间仓促，编译的内容既不全面，对国内外的有关进展反映得也不很及时，对一些问题的认识还难免有错误之处，尚请读者批评指正。

艾民康

1984年3月

目 录

前 言

第一章 神经介质概述	(1)
一、神经介质的种类.....	(1)
二、神经介质简介.....	(2)
(一) 乙酰胆碱 (ACh)	(3)
(二) 儿茶酚胺 (CA)	(5)
(三) 5-羟色胺 (5-HT)	(11)
(四) 肽能神经“介质”	(15)
参考文献.....	(21)
第二章 单胺能神经及其介质的荧光组织化学技术	(26)
一、甲醛蒸气诱发荧光技术.....	(26)
二、甲醛水溶液的荧光组织化学技术.....	(29)
三、乙醛酸(GA)荧光组织化学技术	(31)
四、甲醛-戊二醛水溶液荧光组织化学技术.....	(36)
五、镁铝离子与醛诱发荧光相结合的方法.....	(37)
六、荧光反应的化学原理及定性.....	(41)
七、小结.....	(45)
参考文献.....	(45)
第三章 突触及电子显微镜下的单胺介质	(48)
一、突触形态学.....	(48)
(一) 突触的一般结构	(48)
(二) 突触的类型	(49)
(三) 有关突触机能形态学的几个问题	(53)
二、电子显微镜下单胺介质的显示.....	(55)
(一) 单胺介质的超微结构定位	(55)
(二) 单胺类贮存囊泡的鉴别.....	(56)
(三) 颗粒囊泡的形成	(57)
(四) 有关单胺类介质超微定位的实验形态学研究	(58)
参考文献.....	(63)
第四章 儿茶酚胺(CA)合成酶的免疫组织化学	(66)
一、引言.....	(66)
二、CA的主要生物合成途径及其合成酶.....	(66)
三、CA合成酶的免疫组织化学技术.....	(68)
四、CA合成酶的免疫组织化学定位.....	(74)

五、免疫荧光技术对单胺类介质的定位与醛诱发荧光技术的比较	(79)
六、小结	(80)
参考文献	(81)
第五章 中枢单胺能神经元通路	(83)
一、CA在神经系统中的概况	(83)
二、中枢去甲肾上腺素 (NA) 能神经元通路	(84)
三、中枢多巴胺 (DA) 能神经元通路	(90)
四、中枢色胺能神经元通路	(95)
五、室周系统	(101)
参考文献	(104)
第六章 胆碱酯酶的组织化学及超微定位	(106)
一、胆碱酯酶的概况	(106)
二、显示乙酰胆碱酯酶的组织化学技术	(107)
(一) 硫胆碱法	(108)
(二) 铁黑法	(113)
(三) 半透膜技术	(115)
三、乙酰胆碱酯酶的超微定位	(117)
(一) Ka'sa氏铜-铅-硫胆碱法定位的技术	(118)
(二) Csillik氏放射自显影及电泳法	(118)
(三) Karnovsky-Roots氏硫胆碱直接显色法	(118)
(四) Koelle氏双(硫乙酰氧基)金酸盐改良法	(119)
四、胆碱酯酶组织化学技术中的几个问题	(121)
五、乙酰胆碱酯酶的组织化学定位	(125)
六、胆碱酯酶的释放及其生理意义	(129)
七、小结	(130)
参考文献	(131)
第七章 胆碱乙酰化酶的组织化学及超微定位	(134)
一、胆碱乙酰化酶 (ChAc) 的概况	(134)
二、ChAc的组织化学定位	(136)
三、ChAc的免疫组织化学	(142)
四、ChAc的超微定位	(145)
五、组织化学技术存在的问题	(149)
六、小结	(150)
参考文献	(150)
第八章 中枢胆碱能神经通路	(153)
一、研究进展	(153)
二、中枢胆碱能神经元及其联系	(154)
三、胆碱能通路在中枢活动中的地位	(159)
参考文献	(160)

第九章 与外周自主神经传递介质有关的组织化学	(162)
一、自主神经节的组织化学	(162)
二、自主神经突触联结的超微结构	(165)
三、自主神经-肌接点的结构	(166)
四、外周自主神经的传递	(169)
五、嘌呤能神经	(171)
六、小结	(176)
参考文献	(176)
第十章 关于自主神经支配的实验	(179)
一、眼前房移植技术	(179)
二、唾液腺的自主神经溃变及再生时的改变	(187)
三、交感神经内NA的转运	(190)
四、去神经支配后神经介质及其有关酶的改变	(191)
五、交感神经元在组织培养下的研究	(192)
参考文献	(193)
第十一章 γ-氨基丁酸(GABA)及谷氨酸脱羧酶(GAD)	(195)
一、引言	(195)
二、光学显微镜下GAD的免疫组织化学	(196)
三、电子显微镜下GAD的免疫细胞化学	(199)
四、GABA转氨酶的组织化学	(202)
五、GAD及GABA在中枢神经内的区域性分布	(203)
六、GABA的荧光组织化学显示	(205)
七、GABA的放射自显影技术	(205)
八、GABA能纤维的联系	(207)
九、GABA的功能	(209)
参考文献	(209)
第十二章 脑内的吗啡样肽类	(212)
一、引言	(212)
二、阿片受体	(212)
三、脑啡肽的免疫组织化学显示	(217)
四、内啡肽	(221)
参考文献	(223)
第十三章 P物质(SP)	(225)
一、免疫组织化学技术	(225)
二、中枢神经系统	(228)
三、外周神经系统	(234)
四、SP阳性纤维径路	(235)
五、与其他神经元系统间的关系	(237)
六、SP的功能及意义	(237)

七、小结	(241)
参考文献	(242)
第十四章 其他肽类神经“介质”	(245)
一、血管活性肠肽 (VIP)	(245)
二、胆囊收缩素 (CCK)	(252)
三、生长抑素 (SOM)	(256)
四、神经降压肽 (NT)	(260)
五、促甲状腺激素释放激素 (TRH)	(262)
六、后叶加压素 (VSP) 及催产素 (OT)	(265)
七、肽类“介质”间及其与经典介质间的关系	(269)
参考文献	(277)
第十五章 放射自显影术在神经介质研究中的应用	(281)
一、引言	(281)
二、光镜下的放射自显影术与荧光组织化学技术的联合应用	(281)
三、在放射自显影术中应用闪烁液, 缩短曝光时间	(283)
四、神经介质在光镜下的定位	(283)
五、电镜放射自显影术在神经介质定位方面的应用	(288)
六、放射自显影术对受体的显示	(290)
七、小结	(296)
参考文献	(297)
第十六章 分离突触-突触体	(299)
一、引言	(299)
二、突触体的分离方法	(299)
三、现状和展望	(305)
参考文献	(307)
附录 I 免疫组织化学技术的某些进展及有关抗体的制备	(309)
一、免疫组织化学技术的某些进展	(309)
(一) 有关制剂	(309)
(二) 半抗原标记抗体免疫酶组织化学技术	(311)
(三) 双重免疫组织化学技术	(312)
(四) 免疫金-银染色法 (IGSS)	(314)
二、有关抗体的制备	(316)
(一) DBH免疫荧光试剂的制备	(316)
(二) 5-HT抗血清的制备	(324)
(三) P物质 (SP) 抗血清的制备	(326)
(四) PAP的制备	(328)
参考文献	(331)
附录 II 一些与神经介质有关的组织化学技术	(334)
一、单胺氧化酶 (MAO) 显示技术	(334)

二、5-HT 的显示技术	(336)
三、CA 的显示技术	(338)
四、HRP 与 AChE 及醛诱发荧光联用法	(342)
五、连续显示技术	(343)
六、GABA-T 及 GAD 的显示技术	(345)
七、外周自主神经多肽在整封标本内的免疫组织化学定位	(346)
八、单胺的超微定位	(347)
九、突触结点的显示	(350)
附录Ⅱ 放射自显影技术	(351)
一、光镜的放射自显影术与荧光组织化学技术的联合应用	(351)
二、微观双标记放射自显影术	(352)
三、闪烁液在放射自显影术中的应用	(352)
四、电镜放射自显影术	(353)
附录Ⅳ 一些溶液的配制法	(360)
一、克分子 (M) 和当量 (N) 溶液	(360)
二、常用酸碱配制当量 (N) 溶液稀释表	(361)
三、柠檬酸缓冲液	(362)
四、Tris-HCl 缓冲液	(362)
五、磷酸缓冲盐液 PBS (0.01M) 的配制	(363)
六、Sørensen 磷酸盐缓冲液	(363)
七、25mM HEPES 缓冲液 (pH6.0)	(363)
八、巴比妥钠-盐酸缓冲液	(364)
九、二甲胍酸缓冲液 (pH6.0~7.4)	(364)
十、Ringer 氏液及 Krebs-Ringer-重碳酸盐液	(365)
十一、Tyrode 氏液	(365)
十二、Tris 缓冲液配制法	(365)
十三、醛固定液配制法	(366)
十四、二甲胍酸缓冲液配制戊二醛固定液	(366)
十五、柠檬酸铅染液配制法	(366)
十六、醋酸双氧铀染液配制法	(367)
附：电镜常用的生物材料包埋剂	(367)
附录Ⅴ 常用动物在实验中的一些注意事项	(369)
简字表	(372)

第一章 神经介质概述

组织学里很早就提出神经元是神经系统的基本构成单位，但是直到上世纪末，关于神经元之间的联系方式，究竟是吻合还是接触，仍有很多争论。到本世纪30年代，接触方式才从形态学上得以证实。这说明把突触研究置于严格的科学基础上，还只有半个世纪的历程。

神经介质的研究与人们对突触的认识是分不开的。突触前纤维的每一末梢有一膨大部分，称突触前袋（终扣），突触前袋与突触后神经元（胞体，树突、轴突）的膜面非常接近，并进行信息传递，这种接触点称为突触（synapse）。此外，外周神经末梢到达效应器官与效应细胞接触时，其结构与突触极为相似，通常称为接点，如神经肌接点等。突触是由突触前膜，突触间隙及突触后膜三部分构成，一个神经元可能形成几百至几千甚至更多的突触，有人估计大脑皮层每个神经元平均有30,000个突触。

突触前袋内有突触囊泡，囊泡内贮存有神经介质，介质可释放至突触间隙。在脊椎动物除少数一些突触（如金鱼延髓中的某些突触），其信息传递是电位传导外，其他都是依赖突触前神经末梢释放一种化学物质经过突触间隙作用于突触后神经元（或效应器）的受体，引起后膜对某种离子通透性改变，从而改变突触后神经元的兴奋性，使突触后神经元兴奋（兴奋性突触）或降低其兴奋性（抑制性突触），这种传递神经冲动的化学物质，称为神经递质或神经介质。

根据各种介质存在及释放部位的不同，可分为外周神经介质和中枢神经介质。

一、神经介质的种类

可作为中枢神经介质的种类很多，比较重要的有：

- 1.胆碱类：乙酰胆碱（acetylcholine, Ach）；
- 2.单胺类（monoamines）：
 - （1）儿茶酚胺（catecholamines, CA）
 - 1)多巴胺（dopamine, DA）
 - 2)去甲肾上腺素（noradrenaline, NA）
 - 3)肾上腺素（epinephrine, E）
 - （2）吲哚胺（indolalkylamine, IA）
 - 5-羟色胺（5-hydroxytryptamine, 5-HT）
- 3.氨基酸：谷氨酸（glutamic acid），甘氨酸（glycine）
 - γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid, GABA）
- 4.神经肽：
 - （1）P物质（substance P, SP）
 - （2）脑啡肽（enkephalin, ENK）
 - （3）血管活性肠肽（vasoactive intestinal polypeptide VIP）
 - （4）胆囊收缩素（cholecystokinin, CCK）

- (5) 生长抑素 (somatostatin, SOM)
- (6) 神经降压肽 (neurotensin, NT)
- (7) 促甲状腺激素释放激素 (thyrotropin releasing hormone, TRH)
- (8) 后叶加压素 (vasopressin, VSP)
- (9) 催产素 (oxytocin, OT)

5. 其他:

前列腺素 (prostaglandine PG)

组胺 (histamine)

外周神经介质主要是乙酰胆碱 (ACh), 去甲肾上腺素 (NA), 及多巴胺 (DA)。末梢释放ACh的神经 (胆碱能神经) 包括: 植物性神经节前纤维, 全部副交感神经节后纤维; 小部分交感神经节后纤维 (如汗腺的分泌神经及骨骼肌的血管舒张神经等) 及运动神经。肾上腺素能神经兴奋时末梢释放NA; 交感神经节后纤维除上述者外, 都属于肾上腺素能神经; 肾上腺髓质有一类细胞也产生NA (另一类产生肾上腺素)。在外周组织内发现DA受体, 交感神经节内的小强荧光细胞, 其末梢可释放介质DA。上述中枢内神经肽类“介质”也可在外周神经内见到, 如P物质(SP), 脑啡肽(ENK), 血管活性肠肽(VIP)等, 另有学者在70年代曾报道一种嘌呤能神经, 它既不是胆碱能又不是肾上腺素能神经, 嘌呤能神经的传递介质是三磷酸腺苷(ATP)。

突触囊泡含有成千个化学介质分子, 可作为一个单位进行释放的, 一个直径500 Å的突触囊泡有6,000个ACh分子, 这与引起一个微终板电位的ACh量是相符的, 囊泡中介质的释放是通过胞溢作用实现的, Ca^{2+} 是参与介质释放的重要因素。

突触的化学传递过程 (图1-1): 神经介质参与突触化学传递的全过程, 为了叙述方便, 将其分为:

- ①神经末梢发生去极化。
- ②去极化作用使介质从囊泡内胞溢释出。
- ③小部分介质亦可越过膜转移释放 (非囊泡释放)。
- ④释出的介质与突触后膜上相应受体结合。
- ⑤突触后膜发生去极化而兴奋, 使信息传递至突触后细胞 (可能还要通过第二信使的作用), 但也可可能使突触后膜发生超极化而产生抑制效应。
- ⑥继续发出电信号下传。
- ⑦释出的介质被突触前神经末梢重摄。或介质由酶破坏灭活:

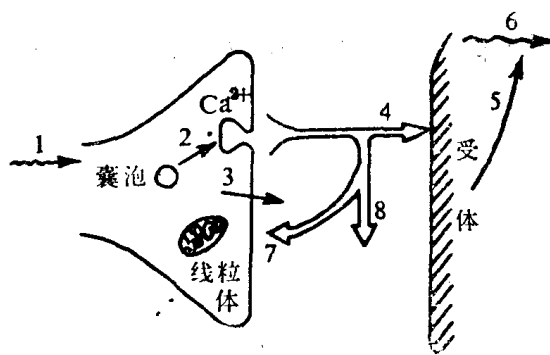


图1-1 突触的化学传递过程示意图

- | | | |
|---------------|-----------|------------|
| 1. 末梢去极化 (兴奋) | 2. 囊泡释放介质 | 3. 非囊泡释放介质 |
| 4. 介质与受体结合 | 5. 突触后膜兴奋 | 6. 兴奋下传 |
| 7. 介质重摄取 | 8. 酶灭活介质 | |

二、神经介质简介

ACh是最古老的神经介质, 当神经系刚刚发生时, 它就出现了, 在低等动物 (如水蛭科), 其运动肌的感觉和运动神经元都是胆碱能的, 但在高等脊椎动物中枢内ACh作

为介质的“特殊性”减弱了，而一系列新的介质又出现，以便执行复杂的功能。NA作为外周肾上腺素能神经突触的传递介质，早已为大家所公认，但对外周的5-HT来说，常常有所怀疑，因为5-HT的传递作用在脊椎动物的外周神经内并不清楚。然而这种外周传递作用在无脊椎动物是存在的。

在组织学上“单胺能”神经元的轴索一般是较细的无髓神经纤维，电生理学及解剖学的资料认为，含DA的纤维还要细些，有些有髓的神经纤维以ACh为介质，但大部分有髓纤维的介质仍待确定。

是否神经元系统要利用特殊的介质来起兴奋或抑制功能呢？这在某些情况容易回答，某些氨基酸，像GABA、甘氨酸和谷氨酸，除了其新陈代谢作用外，还可起到冲动的传递作用。GABA及甘氨酸可使细胞超极化将起到抑制作用，而谷氨酸可促使或诱发放电，只能是兴奋性介质。但是，对于以ACh或单胺类为介质的神经元，究竟是起抑制或兴奋功能？就不能象上面几种氨基酸那样简单地回答了，而是随情况而定。当局部离子透入这些介质时，抑制或兴奋神经细胞皆可出现。现仅介绍几个比较重要的神经传递介质如下：

(一) 乙酰胆碱 (ACh)

在中枢神经系统内，只有少数神经元通路系胆碱能的 (Hebb, 1970)，中枢胆碱能神经的确切生理学意义并不完全清楚。ACh的分布大致上是与胆碱乙酰化酶 (ChAc)、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的分布一致。脑内神经元内的ACh，从贮藏部位来说有三种：即游离的、胞浆内的及与囊泡结合的ACh，每一种可能都有其功能意义。①游离的ACh通常认为是脑组织匀浆时，由胆碱能神经轴突碎片释出。很早就知道胆碱能神经干的全长都含有ACh，至于轴ACh的功能，尚不完全清楚。ACh可沿胆碱能神经轴突向远侧迅速传送 (Schafer, 1973)，轴ACh也可能与小粒 (particle) 结合在一起，就像NA贮存于肾上腺素能颗粒那样。另外，轴ACh也可能游离于轴浆内，并无什么功能意义 (collier, 1977)。②胞浆内的及③与囊泡结合的ACh皆贮存于神经终末内，传统的概念是：与囊泡结合的ACh代表等待释放的ACh (量子释放)，而胞浆内的ACh代表新合成的ACh等待存放于突触囊泡内，但这种简单的概念并未被突触研究的学者所肯定，通过放射神经化学研究表明：在生理状态下，囊泡ACh的转换率要比非囊泡ACh的转换率迅速；在麻醉状态下，脑内ACh的释放减少，ACh含量增加，但所增加的含量，主要是非囊泡性ACh。

Shute和Lewis (1967) 及Krnjevic和Silver (1965、1966)，应用显示AChE的组织化学方法探讨脑内的胆碱能神经元。网状结构上行激活系统是胆碱能的，静脉注射抗胆碱酯酶药物或ACh，或者脑室注射适量的上述药物，均可引起觉醒 (arousal)，这种觉醒又可被阿托品所抑制。电刺激网状结构不仅可引起觉醒，同时皮层表面ACh的释放量也增加，因而人们得出一种结论，认为觉醒是网状结构内胆碱能神经元受刺激的结果，但是Desmedt (1956) 发现假性胆碱酯酶抑制剂，在引起觉醒中，要比乙酰胆碱抑制剂有效得多，以后，他们又发现移除全部网状结构后，抗胆碱酯酶药物仍可引起觉醒，也就是说，通过刺激皮层内的胆碱能神经也可获得脑电图的兴奋图像，但是，他强调像脑那样复杂的结构，所得到的证据不一定可靠。

已知纹状体的ACh，ChAc及AChE的含量较多，在这一部位，细胞体及神经终末

都可为AChE阳性,在去大脑的动物(猫,不麻醉)应用ACh作离子透入,可增强多数纹状体神经元的兴奋。

纹状体萎缩可引起舞蹈症,而其胆碱能神经元的过度活动似与某些帕金森氏病的体征有关。兴奋中枢神经系统内某些神经通路,可促使ACh释放增多,如刺激黑质或尾核,可使脑脊液中ACh增加。反之,睡眠或麻醉时,皮层ACh释放减少。但ACh从神经元释放增加时,通常很快也增加ACh的合成(Tuček, 1978)。Richter及Crossland (1949)的实验, Tuček曾把它作为ACh释放与合成相联系的典型例子,即:电刺激大鼠头部,鼠脑内ACh含量在1秒钟内下降50%,但刺激后,约10秒钟就回复到原有水平,电针刺大鼠30分钟,脑内ACh含量升高(王才源1979), ACh的转换率加强(Guan Xinmin等, 1983)。电子显微镜与电生理相结合研究表明,直接刺激神经组织,伴随着ACh含量降低,其突触囊泡数量减少(Model等, 1975, Zimmermann及Whittaker, 1974a), 突触囊泡变小。当恢复一段时间后,这种超微结构的改变可以恢复,电刺激的参数不同,其恢复的速度也不同(Zimmermann及Whittaker, 1974b)。

某些观察结果提示:ACh释放的增加可导致ACh的合成增加。交感神经节内ACh的含量,在节前纤维电刺激2小时(20Hz)后并无改变;当节前纤维电刺激(60Hz)时,刺激的头8分钟内,神经节内的ACh减少40%,但在以后的15分钟内,ACh又可恢复到原来的水平,尽管是连续刺激也是这样(Friesen及Khatter, 1971)。在强刺激结束以后,通常紧接着ACh的含量暂时性的升高,并超过安静状态ACh值的30~60%(Friesen及Khatter, 1971 Birks及Fitch, 1974; Bourdois等, 1975)。在电鳗的电器官内也曾发现,在刺激开始后ACh含量立即降低随后又再升高(Dunnant等, 1977)。上述交感神经节及电器官内ACh含量的改变提示:在电刺激的开始ACh的合成很弱,但在一定的时间后,或者在ACh含量降低至某一水平后,ACh合成开始增加。组织内ACh的含量是ACh合成与释放相平衡的结果。

然而大脑皮层内胆碱能突触介质释放的特征与外周神经系内胆碱能突触介质释放的特征并未证明相同,例如:大脑皮层的ACh释放的量子性质系推论而来,并未得到确证。大脑皮层内ACh的释放完全可能没有外周神经肌接点处突触释放机制(量子释放)那样精确,因为这两个部位对ACh的反应明显不同,在大脑皮层,接受胆碱能纤维的细胞对ACh反应慢,时间长,而骨骼肌终板处,反应快,时间短(Collier, 1977)。

现代技术的发展已使人们能从冰冻的或新鲜的脑切片中取出不同的核团和其他的部分,以对各种神经介质进行测定, Jacobowitz及Goldberg (1977)曾应用这种方法测定了大鼠脑内不同核团内的ACh,发现黑质緻密部内存在一定量的ACh,他们并认为DA能细胞体分布部位存在着胆碱能纤维,黑质緻密部所含的细胞体及其附近出现AChE,这将暗示此处可能是接受胆碱能纤维终末。ACh存在于黑质緻密部内也暗示胆碱能神经支配DA能神经细胞体。

目前,除放射自显影术外,还没有见到能够直接显示ACh的组织化学方法,因此,在ACh的定位方面,我们只准备介绍AChE及ChAc的组织化学技术(见第六、第七章)。

ACh受体的显示,由于发现了专一的并且几乎是不可逆的与受体结合的分子标记物而简化了,这种标记物来源于眼镜蛇科毒蛇的蛇毒,提纯的眼镜蛇毒素以高度专一的

途径与ACh受体结合。同时，毒素与AChE没有相互的作用，也不干扰正常神经肌肉活动的任何其他过程。此外，蛇毒可以很容易地用放射性碘和氢原子标记。所以它们已成为ACh受体理想的化学标记物，组织化学，就利用这一原则进行受体的放射自显影，以显示受体分布的位置和密度（第十五章）。

ACh受体以前有人认为就是胆碱酯酶AChE，因为在电鳗的电器官及小白鼠横膈每单位重量内其AChE占位数目与受体占位数目近于相等。但目前已确定ACh受体虽然是一种蛋白质，可是并非AChE。溶解状态的ACh受体蛋白质分子量为42,000，在体时以脂蛋白形式存在。据推算骨骼肌运动终板上平均有 $3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7$ 个受体，但受体所占的全部表面积还不到终板表面积的1%，在这些受体中只要有一小部分兴奋即可产生生理效应。一部分ACh受体可被毒蕈碱所激动，称为毒蕈碱样或M型受体。另一部分受体可被低浓度烟碱所激动，称烟碱样或N型受体。在外周，副交感神经节后纤维所支配的平滑肌和腺体上主要是M型受体。交感和副交感节前纤维对植物神经节的支配，以及运动神经对骨骼肌的支配，都属N型受体。但在中枢神经系统内，M、N两种ACh受体均存在，甚至同一细胞上可有两种受体而以一种占优势，例如大脑皮质锥体细胞上的ACh受体以M型为主，脊髓闰绍细胞（Renshaw cell）上的受体以N型为主，丘脑的神经元则为混合型。

（二）儿茶酚胺（CA）

NA在中枢神经系统中分布比较广泛，体内有三种细胞能合成NA，即：肾上腺髓质的嗜铬细胞、交感节后神经元和脑内肾上腺素能神经元，这是三个相对独立的系统，但其合成NA的过程大体相同，肾上腺素能神经元摄取血中的酪氨酸为原料，在胞浆内首先羟化（酪氨酸羟化酶，TH）生成多巴，再脱羧（多巴脱羧酶，DC）生成多巴胺，然后进入囊泡，经 β -羟化（多巴胺 β -羟化酶，D β H）而生成NA。胞浆内的NA再经苯乙醇胺氮位甲基移位酶（PNMT）的作用而生成肾上腺素（E）。

1. 去甲肾上腺素（NA）

在外周神经，NA由交感神经元产生，但没有神经支配的组织如胎盘及骨髓缺少NA，不同组织内NA的浓度可反映出该组织交感神经支配的密度，除去交感神经后，NA即消失。NA在肾上腺髓质及嗜铬组织内浓度也很高。在中枢神经系统中，NA的分布更为广泛，其中以丘脑下部及脑干浓度最高。

应用荧光组织化学，可以显示出含CA的细胞定位，最早系应用甲醛水溶液缩合CA形成荧光化合物，以后又应用冻干及醛蒸气诱发荧光，或振动切片机切片代替冰冻切片，如乙醛酸与振动切片结合，使显示NA及其他单胺物质更为精确，且操作技术大为简化，这些将在以后的章节中详细介绍。在肾上腺髓质，E及NA分别由不同的髓质细胞贮存，在很多种动物含E的细胞系靠近肾上腺皮质。有些动物，其皮质的静脉并不注入中央静脉，这种动物的髓质主要含贮存NA的细胞（Pohorecky及Wurtman, 1971）。肾上腺以外的嗜铬组织通常只含NA，但其所含的NA在出生前后最多，以后就逐步降低。出现在交感神经节及其他外周组织内的小强荧光细胞（small intensely fluorescent cell, SIF）可含有DA及NA，甚至在某些种属动物也可含肾上腺素（Björklund等1970；Van Orden等1970）。这些细胞的形态学特征介于嗜铬细胞及交感神经元之间，像交感神经元那样，它们受胆碱能神经支配（详见第九章）。

在哺乳动物, 交感神经的节后神经元内含有NA, 特别是在神经末梢的膨体内, NA浓度最高。沿着下腹动脉(靠近盆腔脏器或其壁内)分布的交感神经节细胞, 并不像椎前或椎旁交感神经节细胞那样, 其轴突非常短。在中枢神经系内, 曾用荧光组织化学绘制CA的传导径路。根据Dahlstrom及Fuxe (1964), 在中枢神经系约有12个CA能神经核团, NA能神经元的细胞体几乎都分布在脑桥及延脑内, 最明显及最大的核团为蓝斑(A6)。

曾应用很多电子显微镜、固定及染色技术来研究CA能神经末梢内突触囊泡内容物的性质(Bloom 1971), 锇酸及过锰酸钾作为联合的固定剂和电子密度染色剂, 以显示单胺囊泡的緻密中心, 大多数单胺类(包括5-HT)与上述化合物进行氧化-还原反应, 形成不溶解的聚合物, 并产生电子密度高的沉淀。但是, 因为此种金属氧化物并不能很好地保存细胞结构, 所以曾进行戊二醛的灌注作事先的固定。也有学者应用戊二醛固定, 接着以重铬酸钾处理(作为嗜铬反应)或以中性锇酸处理, 可使含NA的囊泡(但不能使含肾上腺素的囊泡)着色, 但这种反应仍然对NA不是特异性的, 因为它可使含DA及5-HT的囊泡也着色(Bloom, 1972)。通常所用的固定剂虽然有的可以较多的保存囊泡的緻密中心, 但是并不一定能较多的保存氚标记的NA(Descarries及Droz, 1970), 这可能是这些固定剂不仅能与CA起反应, 而且可能与囊泡的其他成份起反应之故, 若以不同固定方法, 所作的电镜放射自显影互相比, 发现: 虽然过锰酸钾可有效地显示囊泡的緻密中心, 但是它对切片内氚标记的NA的保存却无任何效果。为此目的, 可单独选用戊二醛作为固定剂, 或者戊二醛与重铬酸钾合用, 然后再以锇酸固定。亦有人应用丙烯醛与重铬酸钠合用。这样就有可能显示较高比率的颗粒囊泡。

CA能神经元轴终末有三种突触囊泡, 即: 小的无颗粒囊泡, 小的及大的颗粒囊泡。一般认为NA贮存于小颗粒囊泡。

在颗粒囊泡内, NA与ATP形成复合物。通常一分子ATP与四分子NA相结合, 共占囊泡重量的35%。囊泡内并含有多种嗜铬颗粒蛋白, 其中以嗜铬颗粒蛋白A最多。囊泡内的多巴胺 β -羟化酶(D β H)分为可溶性与不可溶性两种, 前者溶在囊泡内, 当囊泡释放时与NA, ATP等一起释出; 后者附着在囊泡膜上, 不能释出。囊泡膜含有大量溶血卵磷脂, 此外还有少量Ca²⁺, Mg²⁺离子以及Mg²⁺激活的ATP酶等。

在NA能神经膨体内的无颗粒囊泡的功能意义尚不清楚, 曾有两种看法, 一种认为这种囊泡内含ACh, 这可能像Burn及Rand (1959, 1965)所推测的, 它代表NA的传递与胆碱能间形态学的联系。

在全身的所有传出神经中, 除交感节后神经元是肾上腺素能的以外, 都属胆碱能, 即使是交感节后神经元也并非所有动物都是肾上腺素能。从种系发生来看, 于低等动物(如某些鱼类)的交感神经系胆碱能; 爬行类和鸟类的交感神经既释放ACh, 也释放NA, 哺乳类则以NA为主。这就提示, NA能神经膨体内所出现的无颗粒囊泡, 可能是在种系发生中所遗留下来的胆碱能成分。

从个体发生来看, 兔、狗等许多动物初生时交感神经是胆碱能的, 到二周后, 神经末梢才能摄取CA前体, 开始合成并释放NA, 但即使在成年狗的脾神经(主要由交感节后纤维组成)中还含有较多量的ACh(NA与ACh含量之比为100:40)。所以, NA能神经膨体内出现无颗粒囊泡, 可作为由胆碱能转变为肾上腺素能过程的形态学证

据。

但是在功能上,无颗粒囊泡出现于肾上腺素能神经膨体内,有学者认为这并不是发生过程中所遗留下的胆碱能痕迹,很可能它们是交感神经末梢释放NA必要的条件,因为一般认为无颗粒囊泡是ACh的贮存部位,正如Burn提出的,NA能神经末梢在释放NA的过程中必须有ACh参与,这就是NA释放的“胆碱能环节”假说,冲动达到肾上腺素能神经末梢时,先释放小量的ACh,然后再由ACh促使NA释放。

囊泡中嗜银物质的量,决定于NA的水平。无颗粒囊泡的存在也可能代表NA释放后或含NA较少的囊泡。

在交感神经元内的大颗粒囊泡是否含有NA,还有争论,它的数量较少,一般不到囊泡数的5%。但在某些部位,可达到20% (Bisby及Fillenz 1971)。在非肾上腺素能神经终末内尚发现有大颗粒囊泡。但是,并不能因此否认NA能神经终末内的大颗粒囊泡含有NA。在两栖类及爬行动物交感神经内只有一种颗粒囊泡,而且是大型的。

已知外周肾上腺素能受体有数种: α 受体主要引起平滑肌收缩(胃肠平滑肌例外), β 受体主要引起舒张反应(心肌例外)。而 β 受体又有不同种类:有些药物选择性地阻断心肌上的 β 受体(β_1),另一些药物选择性地阻断支气管上的 β 受体(β_2)。中枢肾上腺素能神经受体是否也能分为 α 、 β 等类型?近年来的工作倾向于中枢内也存在这两类受体。这方面的工作尚处在积累事实阶段,对其内在的规律还缺乏系统认识。

肾上腺素能神经终末除其突触后膜出现受体外,其突触前膜上也存在有多种受体,称为突触前受体,其中肾上腺素能 α -受体,DA受体和毒蕈碱型胆碱能(M型)受体兴奋,均能抑制CA的释放,烟碱能(N型)受体可促进CA的释放。胆碱能神经末梢也有肾上腺素能 α -受体存在,故CA也能够抑制ACh的释放,肾上腺素能神经系统与胆碱能神经系统互相限制神经介质的释放,具有互相制约的作用。

中枢交感活动加强的同时出现内源性NA更新率的增加。可是,假若通过某一途径将NA注入脑内,那么,就可引起全身性的抑制作用或引起睡眠。当脑室注射NA,作用于脑室附近结构时(Feldberg和Sherwood, 1954),或应用NA的前体二羟基苯丝氨酸作用于全脑(Havlicek及Sklenovsky, 1967),或将NA注入血脑屏障尚未发育的小鸡,都可出现抑制或者睡眠。可是,其作用的部位并不清楚,毁损肾上腺素能神经元集聚的蓝斑就可消除奇相睡眠现象。以上是通过脑室或血脑屏障而进行的。若将介质直接应用到脑进行实验,由于很多因素,使其复杂化了,细胞都可有作用它的介质相应的受体,而且细胞又可以不受释放某一种介质的末梢所支配,所以,注射外源性介质至脑,最关键的是要将介质微量注射至通过释放这种介质而起作用的神经末梢附近,才能获得效果。

关于中枢NA能神经元通路将于第五章内介绍。

2. 脑内肾上腺素(E) (Beant, 1979)

E在中枢神经系统内,其浓度不到NA浓度的5%。曾企图证实它为脑内一种神经介质,因其浓度极低而失败。合成E的酶,苯乙醇胺氮位甲基移位酶(PNMT)已在散在的神经元,特别是延脑中的神经元找到。近来有证据提示E参与血压的中枢调节。此种CA即将完全被证实为一种中枢神经系统的介质。

当神经科学的各个领域发表了大量有关NA和DA的文献时,却缺乏中枢E的资