

神经递质的组织化学方法介绍

李俊凤, 吴奇久

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

神经信息的传递主要是通过突触释放神经递质来完成的, 因此神经递质的研究一直是科学家重视的研究课题之一。1904年 Elliott 发现交感神经末梢分泌肾上腺素, 1921年 Loewi 证明迷走神经释放生理活性物质-神经交感素, 这一事实大大地促进了该领域研究的进展。随着化学及分子生物学新研究技术的开发, 为神经递质的研究提供了不少新的组织化学技术。近一二十年来, 不仅发现了更多的神经递质类型, 而且对于与神经递质代谢有关的物质也进行了广泛地探讨。目前已发现的神经递质, 包括其前体和代谢物在内已达数十种之多。

构成神经组织的细胞有神经细胞和胶质细胞两种。神经细胞是构成神经组织的基本成分

没有分裂能力, 它们通过突触彼此互连接形成庞大的神经网络, 接受外界信息并进行加工。胶质细胞是神经系统的辅助成分, 在构成神经髓鞘、供给营养和吞噬功能方面起作用。这两种细胞除按形态分类外, 还可根据它们产生和释放的生理活性物质(包括神经递质)及与这些物质代谢相关的物质或者受体的不同分为若干类型。

运用新的组织化学法可以通过定性定量地分析神经系统中某些物质及其存在部位, 从而阐明神经元和胶质细胞的活体状态下进行的代谢活动的组织化学法有好多种(见表1)。这些方法均为单一法, 操作比较简单, 只能用于单一物质的检查。将单一法结合起来检查多种物质

表1 生物活性物质及其证明法

编号	神经递质及其有关的物质	常用的研究方法
1	细胞骨骼物质	免疫组织化学
2	神经递质	免疫组织化学
3	生理活性物质合成酶	免疫组织化学、酶组织化学如 HRP 法等
4	与神经递质代谢有关的酶	免疫组织化学、酶组织化学如 HRP 法等
5	与神经递质分解有关的酶	免疫组织化学、酶组织化学
6	神经生理活性物质的前体或代谢产物	免疫组化、荧光免疫组化
7	以生理活性物质为材料的物质	免疫组化、放射自显影
8	作为能源被摄取的物质	放射自显影
9	生理活性物质的受体	免疫组化、放射自显影
10	合成神经递质的 DNA 与 RNA	原位杂交法
11	为鉴别神经元而给予的标记物质	免疫组化法、酶组化法、荧光免疫组化法、放射自显影、细胞间标记物研究

的方法称为重复检查法。这种方法不仅可以提高效率, 而且可以同时了解不同物质在神经系统中的分布及其共存关系等。

一、组织化学重复检查法的分类及特征

(一) 重复检查法的基本做法 重复检查

法有三种基本做法,第一种是在同一张切片上进行重复染色,同时观察该切片上各种不同物质。此种操作的优点在于用一张切片可以获得多种物质的信息。其缺点是有时各种物质的信息互相干扰,致使细胞的微细部位难于用普通光镜观察。另外,对于显示不同颜色的物质,必须使用彩色照相;第二种基本做法是将同一张组织切片相继进行多次染色,分别观察各种物质。如在染色观察了一种物质之后,将其染色消去再进行染色、观察第二种物质,或者在用一般光镜检查之后,再换用荧光显微镜观察具有荧光的物质。在作两种具有不同荧光的物质检查时,可换用不同滤光片进行显示,此种操作的缺点在于所观察的各种物质的定位比较困难,同时此种操作不适于作电镜观察;第三种是利用不同的染色法处理相邻的两张切片,检查不同物质的存在,这是组织化学中常用的方法。其优点是可以比较各种物质的整体和局部存在。

(二) 重复检查法的种类

1. 二次免疫染色法:这是证明两种物质共存的有效方法。除了使用荧光抗体法外,目前常用的是酶标抗体法(PAP和ABC法)。酶标抗体法中使用的酶一般是过氧化物酶,如辣根过氧化物酶,偶尔也使用碱性磷酸酶、半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶等。近年来,有人用金银等金属标记抗体作双重免疫染色同样取得了良好结果,因为这种方法可根据金属粒子的大小区别两种抗原,故特别适应于免疫电镜研究。双重免疫染色法的缺点是:用于显示第一种物质所使用的酶在作第二次染色时会引起再反应。另外,两次染色使用的第二抗体之间可能产生交叉反应。

2. 放射自显影结合法:放射自显影法分体内和体外给予同位素两种方式。在利用作为能源被摄取的物质,追踪机能组织的方法和细胞内标记法以及观察活性物质如何被利用的方法中,均采用第一种方式。在免疫组化和原位杂交中常用第二种方式。在观察与受体结合的实验中采用那种方式应视情况而定。放射自显影

电镜操作比较简单,但将放射自显影结合起来同时检查多种物质,则比较困难。一般都是将放射自显影法与其它组织化学法结合使用。其做法是首先通过放射自显影证明了细胞内标记物、被摄取的递质前体物之后,再用免疫组化法证明生理活性物质。

3. 酶组织化学结合法:酶组织化学法包括给予细胞内标记物的顺行性和逆行性追踪法(主要包括HRP和与HRP结合的植物凝集素法),以及证明生理活性物质的合成、代谢及分解酶的方法。近年来,由于出现了许多生理活性物质的抗体,为酶组织化学法开辟了一条新路,一些酶组织化学法逐渐被迅速有效的免疫组化法替代。但是由于纯净的抗体难于制备等原因,使得免疫组化法受到了一定限制,所以某些酶组织化学法至今仍不失为有效的方法。该法常与免疫荧光组织化学法结合作重复染色。

4. 荧光组织化学结合法:因为荧光组织化学法必须用荧光镜观察,故不能应用于电镜研究。此法除了与酶组织化学法结合使用外,一般是将两种不同的荧光组织化学法进行结合或与免疫荧光法结合检查不同物质。在追踪神经通路或观察电生理实验后的细胞定位色素和以甲醛处理的生物胺时,经常使用这种重复检查法。

二、组织化学重复检查法的几种实际操作

(一) PAP和ABC法的重复染色(以脑组织为例)

1. 用多聚甲醛或Zamboni氏液从左心室灌注固定动物,灌注完毕立即剥出脑,放在与灌流液相同的溶液中后固定24—48小时,经20—30%的蔗糖溶液浸泡24小时后,用恒冷切片机切成20—50 μm 的切片,放在 H_2O_2 溶液中反应30—60分钟,以阻断组织中内因性氧化酶的活性。

2. 将切片相继浸于第一抗体(为兔抗血清)的低浓度溶液中,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应12—72小时;抗兔IgG溶液中,室温下反应2—3小时;兔

PAP 复合体 (Peroxidase Anti-peroxidase Rabbit Antibody Complex) 溶液中, 室温下反应 1.5-2 小时。

以上各步操作之后, 切片都要经过充分漂洗, 漂洗和溶液的制备均用 pH 7.4 的 PBS (磷酸盐缓冲液)。

3. 切片经 PBS 和 pH 7.6 的 Tris 缓冲液漂洗之后, 利用 DAB 液发色 10—15 分钟。其发色液组成为: 3,3-二氨基联苯胺(3,3-diaminobenzidine) 30mg; 0.05mol/L pH7.6 的 Tris 盐酸缓冲液 100ml 30% H₂O₂ 溶液 20 μ l。

4. 用含 0.1% NaN₃ 的 PBS(磷酸盐缓冲液) 洗净之后, 将切片浸入第二种物质的一抗(例如鼠抗血清), 4 $^{\circ}$ C 下反应 12—72 小时。反应终了用 PBS 洗净, 加入生物素化的抗鼠 IgG, 室温下反应 2.5 小时。

5. 切片经 PBS 洗净以后, 在浸入 ABC 复合体 (avidin biotin peroxidase complex) 溶液, 室温下反应 1.5 小时。

6. 切片用 PBS 洗净, 放于 4Cl-1-naphtol(4 氯-1-萘酚) 溶液中发色 15—20 分钟。4Cl-1-naphtol 的配方是: 将 25mg 4Cl-1-naphtol 溶于 1ml 无水乙醇, 完全溶解后, 加入 100ml 0.05 mol/L, pH7.6 的 Tris 缓冲液, 充分搅拌过滤后, 再加 30% 的 H₂O₂ 20 μ l。

7. 将切片铺在涂有明胶的载玻片上, 干燥后再加水, 不经酒精二甲苯, 直接用甘油封片, 最好立即照相。

(二) IGS(immunogold-silver)和 ABC 法重复染色

1. 从动物组织的固定到完成组织切片的过程与 PAP 和 ABC 重复染色法相同。

2. 切片浸于低浓度的第一抗体 (例如兔抗血清) 中, 4 $^{\circ}$ C 下反应 12—72 小时。

3. 用含 0.05% BSA (牛血清蛋白) 和 0.9% NaCl 的 Tris 缓冲液 (5.5mol/L, pH8.2) 洗净切片, 然后放入用直径为 0.5mm 的金标记的抗兔 IgG 溶液中, (当用兔抗血清作一抗时), 4 $^{\circ}$ C 下孵育 12 小时。金标记抗兔 IgG 用冲洗液稀释。

4. 用 0.2% 的枸缘酸缓冲液洗净切片。

5. 在黑暗环境下, 将切片用溶有 5.5mol/L 乳酸银和 77mol/L 靛氢的枸缘酸缓冲液 (0.2 mol/L, pH3.85) 浸泡 10—30 分钟。

6. 切片经定色液定色后, 放入含有 0.5% 曲拉通 (Triton)X-100 的 PBS 中充分洗涤, 加入第二种物质的抗体。

7. 分别如 PAP 法和 ABC 法重复染色的 4、5 和 6 那样进行 ABC 法的操作和显色。

8. 脱水、透明、封固、观察。

运用本法时有几点需要注意: (1) 因为金标记的二抗结合物较大, 很难进入细胞内, 故对证明细胞内活性物质不太理想。(2) 在此法中的 IGS 和 ABC 两种方法的先后顺序不能颠倒。(3) IGS 和 ABC 两种方法中所使用的一抗最好取自兔, 而 ABC 法中取自鼠, 以免发生交叉反应。

(三) 免疫电镜组织化学重复染色法 此方法含包埋前、后两种染色操作程序

1. 包埋前染色 根据自己的检查目的, 选择灌流固定液处理动物组织。首先用振动切片机制成 30—100 μ m 的组织切片, 然后用第一种物质的抗体进行 ABC 反应, DAB 显色。将 DAB 的反应产物镀银涂金后, 再用第二种物质的抗体重复 ABC 反应, DAB 显色。最后按普通电镜程序, 对已染好的组织切片包埋制作超薄切片进行观察。

2. 包埋后染色 首先按普通电镜程序将组织块制成超薄切片, 然后在不锈钢网上对超薄切片进行 ABC 法重复染色, 两次染色中所用的二抗选用不同直径的金粒子进行标记, 在电镜下可根据金粒子的大小区别两种物质。其优点为: 只要超薄切片染色充分, 即使两种被检物质的一抗取自同种动物也不会影响观察结果。

(四) 逆行性荧光色素法和荧光组化法的结合

1. 将荧光物质碘化丙啶 (propidium iodid, PI) 和核黄素或 4-6-双胺基-2-苯基吲哚-2 HCL (DAPI) 注入脑的一定部位, 使动物存活

1—3 天后,麻醉断头取脑。

2. 脑组织块用液氮急速冰冻, 常规冰冻干燥后, 用多聚甲醛蒸汽在 80℃ 下反应 1 小时。石蜡包埋, 制成厚约 8 μm 的切片, 用落射荧光显微镜观察。PI、DAPI、NY 分别用 U 激发系统, 生物胺(单胺)用 V 激发系统观察。运用此种方法不仅可以分析向脑不同部位投射的神经元, 而且可以证明这些神经元是否含有单胺类物质。

(五) 细胞内给予荧光色素法和 PAP 法的结合 在电生理实验中经常给被记录细胞注入核黄, 在追踪神经通路的实验中经常在神经纤维投射部位注入 DAPI 等荧光物质进行标记。为证明吸收了上述物质的细胞中含有哪些活性物质, 研究者开发了此种方法, 其步骤如下:

(1) 将注入核黄或 DAPI 的动物作心脏灌流固定, 制成厚约 20—30 μm 的组织切片, 以被检物质的抗体作为一抗进行 PAP 染色。

(2) 在 DAB 显色以前将切片贴到载玻片上, 不需干燥, 直接用甘油封片, 用荧光显微镜观察照相。而后, 将切片进行 DAB 显色, 用普通光镜观察照相。将两次照相结果组合在一起(可以是黑白的)。

(六) 逆行性传导酶 (tractase) 和免疫组织化学结合法

1. 将生物氧化的 WGA (麦芽凝集素) 或 HRP 注入组织内。

2. 动物存活 1—3 天后, 作心脏灌流固定, 将组织制成 15 μm 的切片。

3. 将切片与 Texas red (荧光物质, 红色) 标记的卵白素(avidine)反应。然后, 用被检物质的抗体和以 FITC 标记的二抗进行免疫荧光染色。用荧光显微镜的 G 激发系统观察 FITC。照相时, 最好用一张彩色胶片作二次曝光, 也可以将两张黑白照相组合在一起。在这一方法中, 投射到特定部位的神经元产生红色荧光, 具有特定物质的神经元产生绿色荧光。

(七) 放射自显影和免疫组织化学结合法

1. 给生物体注射用放射性同位素标记的活

性物质。

2. 使动物存活一定时间后, 摘出脏器, 立即用液氮进行冰冻。用恒冷切片机将组织块制成 20—40 μm 的切片立即贴到涂有感光乳剂的载玻片上(在暗室操作)。

3. 切片用 4% 的甲醛溶液固定后, 用蒸馏水洗净, 在黑暗条件下曝光 4—16 周。曝光后, 经显影定影, 然后进行 PAP 或 ABC 法染色。

4. 脱水、透明、封固、观察 因为这种方法是将放射性物质注射到动物体内, 所以不仅可以观察生理活性物质的摄取状况, 而且可以做受体检查。

三、结 语

本文所述的各种重复检查法是目前研究神经递质和其它生理活性物质的基本组织学方法。每种方法中给出的程序指的是一般情况, 有些程序不是一成不变的。例如在 PAP 和 ABC 重复检查法中, 可根据情况将两种方法的顺序颠倒使用。

组织化学方法是以化学和生物化学为基础的, 因此对反应物的浓度、溶液的 pH 以及缓冲液的离子强度等要求比较严格, 否则得不到好的结果。如在进行免疫染色时, 抗体的浓度太稀, 被检物质染不出来, 浓度太高则染色背景往往太深, 而且容易引起交叉反应。因此在做正式实验之前, 最好首先做一下预备性实验, 筛选出最佳实验条件。

参 考 文 献

- [1] 大黑成夫 1986 组织细胞化学, 学际企画 51.
- [2] Gase J-M. et al. 1986 Combined Technique of Immunohistochemistry and Autoradiography for the Simultaneous Detection of Steroid Hormone Receptors and Their Ligand, *J. Histochem. Cytochem.* 34: 1505—1508.
- [3] Holgate, C. S. et al. 1983 Immunogold-silver Staining New Method of Immunostaining with Enhanced Sensitivity, *J. Histochem. Cytochem.* 31: 938—944.
- [4] Kawata M. et al. 1983 Immunohistochemical Identification of Lucifer Yellow-Labeled Neurons in the Rat Supraoptic Nucleus, *Histochemistry*, 78: 21—26.
- [5] Kojima M. et al. 1983 Motoneurons Innervating the Cremaster Muscle of the Rat are Characteristically Densely Innervated by Serotonergic Fibers as Revealed by Combined Immunohistochemistry and Retrograde

- Fluorescence DAPI-Labeling, *Anat. Embryol.* **168**: 41—49.
- [6] Maegawa M. et al. 1987 Differential Immunolabelling for Electron Microscopy of Diverse Peptidergic Neurons, *J. Histochem. Cytochem.* **35**: 251—255.
- [7] Nakane P. K. 1968 Simultaneous Localization of Multiple Tissue Antigens Using the Peroxisase-Labeled Antibody Method: A Study on pituitary Glands of the Rat, *J. Histochem. Cytochem.* **16**: 557—560.
- [8] Pickel, V. M. et al. 1984 Serotonergic Terminals: Ultrastructure and Synaptic Interaction with Catecholamine-Containing Neurons in the Medial Nuclei of the Solitary Tracts, *J. Comp. Neurol.* **225**: 291—301.
- [9] Sano H. et al. 1986 Simultaneous Detection of B-cell and T-cells by a Double Immunohistochemical Technique Using Immunogold-Silver Staining and the Avidin-Biotin-Peroxidase Complex Method, *Histochemistry* **86**: 1.
- [10] Shiosaka S. and M. Tohyama 1986. Immunohistochemical technique, *Progress in Brain Research* **66**: 3, 3—32.
- [11] Sternberger L. A. and S. A. Joseph, 1979. Unlabeled Antibody Method: Contrasting Color Staining of paired Pituitary Hormones without Antibody Removal, *J. Histochem. Cytochem.* **27**: 1424—1429.