

造成的。这四条线分成两对，每对的分裂为自由氮核频率的两倍，中心在 $a/2 \pm P$ ，在 3200G 时，自由氮核频率的两倍为 2MHz，所以四条线没有分开。但从谱上可以确定 $A_{\perp}/2$ 为 18MHz，因此得 $A_{\perp} = 36\text{MHz}$ 。22—24MHz 的峰也与微波频率无关，因而是属于氮的偶合，它是相应于平行取向的偶合，故得 $A_{\parallel} = 48\text{MHz}$ 。这与模型铜的复合物的研究结果是一致的^[1]。接近自由质子的 ENDOR 线不受 D_2O 代替 H_2O 的影响，这说明铜离子位置对于水是不可接近的，深深埋在蛋白结构之中。

参 考 文 献

[1] 裘祖文,《电子自旋共振波谱》,(1980)科学出版社。

- [2] Box, H. C. *Radiation Effects: ESR and ENDOR Analysis* Academic Press, 1977.
- [3] Eriksson, L. E. G. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **192**, 211, 1969.
- [4] Eriksson, L. E. G. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **17**, 539, 1970.
- [5] Scholes, C. P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 448, 1972.
- [6] Hoffman, B. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 6556, 1981.
- [7] Norris, J. R. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 1680, 1973.
- [8] Rist, G. H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **67**, 79, 1970
- [9] Rist, G. H. et al.: *J. Chem. Phys.*, **52**, 4033, 1970.

[本文于1982年5月11日收到]

可兴奋细胞的网格结构及其在兴奋过程中的作用*

罗 林 儿 顾 大 明

(北京大学生物物理教研室)

一般认为微管在诸如细胞运动、有丝分裂、细胞运输以及通过组成细胞骨骼维持细胞的形状方面都起着很大的作用。而神经组织含有大量的微管蛋白和微管，因此国际上很多人对可兴奋细胞的网格结构及其在兴奋过程中的作用普遍地发生兴趣。1981年8月31日—9月3日在美国海洋生物学实验所召开的“关于可兴奋细胞的结构和功能”的国际会议上，对这一问题作了广泛的探讨，本文试图对有关材料作一简单介绍。

一、神经胞质的网格结构

自1978年以来，美国神经生理学家 Alan J. Hodge 对神经细胞的网格结构作了大量的观察，并已证明在软体动物乌贼 (squid) 和海蛞蝓 (sea slug) 甲壳类动物龙虾 (lobster) 两栖类蟾蜍和哺乳类大鼠的神经轴突中，神经细丝和神经微管通过周期性分布的横桥相互连在一

起，组成了一种界限分明的三维栅格结构，这就是所谓的神经胞质网格 ('lattice')。这里用的术语是 '网格' ('lattice')，而不是使用网格 network 这个词。这就表明它含有周期性序列，类似于结晶学上的含义。而网络一般是指不含重复序列的联系结构。这就道出了网格的重复序列的性质。更应注意的是，神经细胞内的横桥也和具有各种膜结构的轴浆纤维状成分相连接，例如轴膜、内质网、囊泡和线粒体。

这种精细的横桥，直径为 $2-5\mu\text{m}$ ，长度不一。有人称之为微小索，也有人称之为细胞的骨骼成分。显然从它的结构特点可以设想，它是积极的而不是消极的连结成分，在轴突结构的发生和维持中起着重要作用。同样可以设想，神经细胞质的网格是支承能量偶联的高分子有序排列的结构，这些高分子对轴浆里的囊泡和

* 本文资料皆由美国休斯顿 Baylor 医学院张才教授提供。

其它成分的轴向移动即轴突运输具有重要作用。

轴浆里轴向成分的平均间隔一般大约是50nm,但是在那些通常与 Schmidt-Lenterman 裂隙有联系的轴突结构中,其间隔可能小得多。因此要观察这种十分分散的网格,所用的样品要用厚切片(0.1—0.5 μm)。这就必须用高分辨率的高压电镜才能观察到,或者利用 EM₄₀₀ 透射式电子显微镜(phillips EM₄₀₀),该电镜能够补偿由电子散射所造成的电子能量的损失,这种散射主要来自于样品和包埋介质中低原子序数的元素。Alan J. Hodge 等人已经利用 EM₄₀₀ 透射电镜观察了轴突的厚切片。他们利用立体观察技术和周期性图象增强技术来描述神经胞质的网格。由于样品材料的密度较大,这就限制了有效的立体观察,但在大多数轴突中,若样品材料厚度不超过 0.5 μm 时,仍能进行有效的立体观察。

神经胞质网格结构的一般形态以立体观察为最好,但是对有关重复结构的特征频率的定量计算还是应当利用各种周期性的相增强方法(例如单位移叠加法或 Gilev 滤波)或用扫描透射电镜(STEM)图象的计算机 Fourier 分析法。定量计算法直接证实了存在着与横桥分布有关的间隔频率。在 Alan J. Hodge 观察过的轴突中,每 40—45nm 的神经胞质的网格中存在着一个轴向周期。

用低浓度的 Ca^{++} 固定的样品,仍然存在着这种高度的有序状态,但这种有序状态的程度随着 Ca^{++} 浓度的增加而降低。我们已经知道,在肌肉细胞中,通过 X-衍射的方法,已经清楚地表明,僵直状态(被锁住的横桥——cross-bridges locked)比由 Ca^{++} 所诱发起的活动状态(运动中的横桥——bridges in motion)其有序程度更高。有趣的是在神经轴突中,大约每隔 43nm 处有一横桥,这种横桥间隔与肌蛋白、肌球蛋白和原肌球蛋白的轴向间隔十分接近,这些蛋白都是高度的 α -螺旋。特别是由 D. Gilbert 业已证实,在经酶轻微分解的环节动物 Myxicola 神经细丝凝胶所制得的纤维标本中,

在 43nm 处具有一个很锐的轴向小角度的 X-射线衍射图,并同时具有一个特征性的钝角 α -螺旋结构。这个结果显然表明了神经轴突中网格结构的蛋白质性质。

二、通过快速冰冻、低温蚀刻方法看到的轴突、突触处膜的分化和细胞网格成分

在这次国际会议上,华盛顿大学生理及生物物理系的 Nobutaka Airokawa 报告了他的最新研究成果。他证实了在轴突、突触前成分和突触后成分中可兴奋膜和细胞网格成分之间存在三维关系。其实验程序是液氮快速冰冻、冰冻切片、低温蚀刻和旋转式的喷涂。为了清楚地观察细胞网格的结构,必须把活细胞的细胞质的可溶性蛋白去掉。方法很简单,就是通过温和的匀浆或碱化处理,打碎细胞膜,再把它们冲洗掉。已观察的轴突材料有蛙、电鳗(Torpedo)的外周神经系统和小白鼠中枢神经系统。并且观察了电鳗的电板,小白鼠的小脑皮层的突触前成分,蛙、蛇和大鼠的神经肌肉接点,电鳗的电器官和小白鼠小脑皮层的突触后成分。通过这些观察,得到了如下的结果:

1. 轴膜里面的细丝状网格

在轴突中,微管和神经细丝是细胞网格的基本成分,它们相互之间横向连接,并通过很多微细的横向连接物与轴膜横向交连着。此外在轴膜里面分布着象细丝样的肌动蛋白(直径 8—9nm),并且在轴膜内部能经常看到无数小的凸状物。

2. 突触前成分的结构

与轴突不同,突触前成分的细胞网格的主要成分是肌动蛋白细丝,它不仅组成了突触前细胞质的网格结构而且与突触前膜紧密地联系着。这些肌动蛋白细丝对于突触囊泡与细胞质膜的融合可能起了引线(guide line)的作用,而同时对突触前端和突触后膜之间的靠近起亚膜性的支撑者的作用。

3. 突触后的受体和支持系统

首先将肌肉用胶原蛋白酶处理,去掉基础

薄层,以便更好地观察在神经肌肉接点处的 Ach 受体。通过观察发现,在突触后膜折折的尖端处存在着有规则排列的突起,这些突起其长度为 8—9nm,而这种突起在折折的深处或在肌肉表面的其它地方是看不到的。这些突起(大约 $1000/\mu\text{m}^2$)大概是 Ach 受体分子的头部,而且突起物是趋向排列成二个并行的平行横列。在切除神经后两个星期,受体的这种紧密有规则的排列也不改变。在突触后膜的下面,有一个亚膜性的网格结构。这种网格结构把膜和起支承作用的细胞骨骼细丝束连接起来。细胞骨骼细丝通过亚膜性的网格结构与突触后突起相连。这样的网格结构,在小脑突触的突触后膜的下面也发现了。在小脑突触后膜的网格结构里能看到大量的肌动蛋白细丝和微管。这些亚膜性的网格结构的厚度在数值上与通常在薄切片上看到的突触后的“致密层”相仿。这样的三维结构启发人们去思考,很可能它们把突触后的受体分子固定到起支承作用的细胞骨骼成分上,因而就把这些受体分子稳定在突触后膜的平面上,从而才使细胞的兴奋过程成为可能。

三、酪氨酸化的管蛋白或微管 对维持膜兴奋性是必要的

这一工作主要是几位日本科学家 G. Matsumoto、H. Murofushi、S. Endo、T. Kobayashi 和 H. Sakai 完成的。他们所用的实验材料是乌贼的巨大神经轴突。

我们已经知道在轴膜的下面有大量的微管($90/\mu\text{m}^2$),它们与轴突的长轴相平行,并且同与轴膜相连的细丝一起组成细胞骨骼的网格结构。他们用秋水仙素进行轴突内灌流,就会发现轴突外缘的微管大量减少,而留下完整的其它细丝。这是因为秋水仙素对微管有解聚作用,并能阻止微管蛋白聚合成微管。秋水仙素对微管的作用国外有许多专论,国内也有同志作过有关的报道。将灌流物通过反复改变温度的方法使微管蛋白反复重结晶,从而使微管蛋白得到提纯。卤化物离子能对微管的组合起

促进作用,其作用强度的顺序为 $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$,这和乌贼巨大轴突兴奋性的持续时间十分一致。如果用通过动作电位、静息电位和阈值作为判断兴奋性的标准,那么最佳浓度的 KF 和 K-谷氨酸对维持兴奋性来说也是最佳的。除秋水仙素能解聚微管外,微管抑制剂还有巯基试剂、鬼臼毒(podophyllotoxin)、文拉亭(vinblastine)或钙离子亦能使微管解聚,当用这些试剂进行轴突内灌流时,也都降低了膜的可兴奋性。

通过电压箝制技术可以看出秋水仙素使钠和钾的最大电导率降低了,但并不能使钠通道失活。

以上实验结果可以看出,含有微管的细胞骨骼的网格结构可能涉及到巨大轴突的兴奋性,下面的实验可以证明这一点。首先用微管抑制剂对轴突进行内灌流,使轴突的可兴奋性降低,然后再用兴奋性恢复介质对轴突进行内灌流,经过一段时间,该体系能满意地恢复动作电位的传导。此恢复介质含有纯化的微管蛋白、纯化的管蛋白-酪氨酸连结酶、酪氨酸、ATP、GTP、 Mg^{++} 、 K^+ 、cAMP 以及从无轴浆的轴突中提取出来的分子量 300,000 (37°C) 蛋白质分馏物。在兴奋性恢复的过程中,阈值明显地降低了,并且静息电位比无损伤的轴突的静息电位还要低。

在恢复兴奋性的试验中,在箝制电压的条件下,用 5mM 秋水仙素灌流,内向的钠电流和外向的钾电流都很快地降低,甚至用神经轴突的标准介质灌流,也不能阻止这些电流的降低。然后,用一种恢复介质灌流该轴突,经过一段时间后就能明显地观察到钠电流的恢复过程。这种恢复介质含有从乌贼视神经节得到的三种环状微管蛋白,通过 Con A-Sepharose 亲和层析提纯的分子量 300,000 的蛋白质、GTP、 Mg^{++} 和 K^+ 。在秋水仙素处理期间和处理以后,漏电流随时间而增加,把秋水仙素的灌流介质换成恢复介质时,漏电流降低,该过程与静息电位的逐步恢复相符。若恢复体系中不含 GTP,膜的可兴奋性就不能恢复。这就意味着没有 GTP,

就不能使酪氨酸化的管蛋白组合成微管,从而也就不能帮助兴奋性的恢复。这就说明,处在轴膜下面的酪氨酸化的微管蛋白在维持乌贼巨大轴突的可兴奋性中起重要作用。

综上所述,我们可以看到,在可兴奋细胞中确实存在着网格结构,这些网格结构是有序排列的。网格结构的重要成分之一是由微管蛋白所组成的微管,它在可兴奋细胞的兴奋过程中起着重要作用。这对可兴奋细胞的兴奋性机制的研究是一重要贡献。

参 考 文 献

- [1] Hodge, A. J.: International conference on Structure and function in excitable cells (1981).
- [2] Hirokawa, N.: International conference on structure and function in excitable cells (1981).
- [3] Matsumoto, G., et al.: International Conference on Structure and function in excitable cells (1981).
- [4] 何泽涌,《生物化学与生物物理进展》。1980年第二期。

[本文于1982年6月17日收到]

科技消息

膜 电 容 值 是 生 物 物 理 常 数

Hodgkin 和 Huxley 早年就发现神经细胞的功能主要表现为膜电位的变化和传导,并能用膜电容和电阻进行描述。几十年来人们对膜电容(C_m)值进行了大量的测量研究,发现 C_m 值可能是一个生物物理常数,大约为 $1.0\mu\text{m}/\text{cm}^2$ 。尽管仍有人认为 C_m 值在脊椎动物要大些,但这也许是由于错误地推测了或未能考虑到细胞的电紧张结构,进一步说, C_m 值不仅在

神经细胞,而且在肌肉细胞,红细胞、Nitella 细胞、卵细胞、白细胞以及细菌均接近 $1\mu\text{m}/\text{cm}^2$ 。生命活动总是伴随着电的变化,显然,这个常数将为生物膜研究的定量化,特别是计算膜电位变化并精确地描述神经元的电信号过程提供可靠依据。

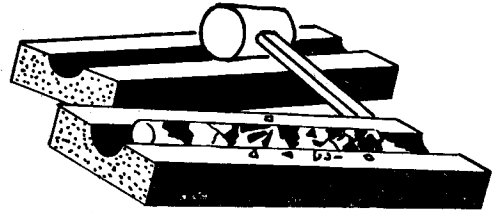
["J. Neurophysiol" 45: 13, 1981.

蚌埠医学院 曹杨编译]

圆 柱 凝 胶 管 破 碎 器

在使用高浓度丙烯酸凝胶时,凝胶特别容易粘在管壁上而难于取出。Bio Rad 公司提供一种圆柱凝胶管破碎器,可以解决这个问题。

破碎器是由二块中间有半圆型槽的金属块组成,把凝胶管放在一金属块的槽内,把另一块盖上,然后用槌子猛击上盖,就可以使玻璃管粉碎(见图)。用流水冲去玻璃屑后就可以得到完好的凝胶柱。破碎器结构简单,可以自己制造。



[中国科学院生物物理所杨振藩提供]

生 化 试 剂 产 品 信 息

生物物理所生化试剂厂最近提供如下产品:

核糖核酸酶(RNase I): 由牛胰提取,为冷冻干燥粉状,活力为 100Kunitz units/mg,质量完全相合于西德 Boehringer Mannheim 公司产品。

小牛胸腺 DNA: DNA 含量 90%,色洁白,纤维状,溶解度好,溶液清晰透明,质量超过英国 BDH 公

司。

组蛋白: 由小牛胸腺提取,本产品为冷冻干燥粉,与瑞士 Fluko 公司和英国 Kock-Light 公司产品比较,电泳纯度高,色洁白,溶解度好,其中碳性氨基酸含量均在 28—29 克分子%