

- 21 Sasson D, Lyons G, Wright WE *et al.* Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and Myo D1 during Mouse embryogenesis. *Nature*, 1989; **341**: 303
- 22 Thayer M J, Tapscott S J, Davis R L *et al.* Positive autoregulation of the myogenic determination gene Myo D1. *Cell*. 1989; **58**: 241
- 23 Benezra R, Davis R L, Lockshon D *et al.* The protein Id, A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*. 1990; **61**: 49
- 24 Rhodes S J, Konieczny S F. Identification of MRF4, A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev*. 1989; **3**: 2050
- 25 Pinney D F, Pearson-Write SH, konieczny S F *et al.* Myogenic lineage determination and differentiation, Evidence for a regulatory gene pathway. *Cell*, 1988; **53**: 781

神经递质—— γ -氨基丁酸的组织化学*

李俊凤 吴奇久

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

提 要

GABA 是一种分子量极小的氨基酸。GABA 及其合成酶 GAD 主要存在于中枢神经系统中, 是一种独特的抑制性神经递质, 在神经信息加工中起重要作用。近几年来, 对于 GABA 作用的研究越来越引起人们的重视, 分别在生理学药理学、生物化学和组织化学等领域中进行了广泛地探讨。文中介绍了 GABA 的三种组织化学研究途径及其研究结果。

关键词 神经递质, γ -氨基丁酸 (GABA), GABA 抗体, 中间神经元

γ -氨基丁酸 (GABA) 及其合成酶 L-谷氨酸脱羧酶 (GAD) 主要存在于中枢神经系统 (CNS), 在其它的脏器中尚未发现^[1]。GABA 的这种特异存在部位引起科学工作者的浓厚兴趣并进行了不懈的探索。大量地研究表明, GABA 主要由谷氨酸脱羧而来, 其脱羧酶是 GAD。

50 年代后期, Bazemore 和 Eliot 报道了甲壳动物的舒张肌感受器的脉冲因 GABA 的存在而受到抑制^[2]。这一报道给 GABA 的研究开辟了一条新路。后来许多研究者从各个角度对 GABA 的生理作用进行了更深入的探讨, 证明 GABA 的确是一种抑制性神经递质, 最近有人对 GABA 的作用机制作了进一步研究, 证明 GABA 的抑制作用主要是由于细胞体的膜电位超极化而产生的。同时, GABA 有时可通过抑制某些核团, 使某些受这些核团调控的部位解除抑制而促进信息的传递^[3-5]。GABA 的这

些特性及作用机制大部分是以生理学、药理学和生物化学方法证明的, 而 GABA 在 CNS 中的分布及 GABA 神经元纤维的投射关系主要是用³H-GABA 摄取试验法、合成酶放射免疫分析法 (RIA) 和免疫组织化学法证明的, 其中免疫组化法和酶组化法起了最重要的作用。本文重点介绍三种 GABA 检查法及其优缺点, 以及如何将它们互相搭配, 从而比较全面地对该种递质进行研究。近十年来, 由于 GABA 抗体的出现, 使 GABA 的研究取得了迅速发展, 做出了不少出色成果, 在此一并加以简略介绍。

1 GABA 的研究方法

1.1 GAD 免疫组织化学方法

神经递质是以其合成酶或水解酶作为指标

* 中国科学院“七五”重大项目。

收稿日期: 1992-01-23; 修回日期: 1992-12-14

来进行研究,如乙酰胆碱可以用乙酰胆碱脂酶或乙酰胆碱转移酶作为指标,对于GABA而言,在生物化学上一般用GABA活性作为指标,而在形态学上则常常用GAD免疫阳性作为指标.但是,这种检出法仅限于GAD特异地合成GABA时,获得的结果才是可靠的.因此在使用GAD间接检出法时,最重要的一点是要获得高纯度的GAD及其抗体. Roberts研究组是纯化GAD的先驱者,该组在GABA的研究中取得了不少成果^[6]. 该组成员Wu等人报道,目前的GAD虽说是标准样品,但仍有不少牛磺酸合成酶的活性,这可能是由于两种酶的分离纯化尚不完全,或者是因为基质特异性较低等因素造成的^[7,8]. 图1是纯化GAD的反应速度分析结果与牛磺酸的生物合成通路综合图. 从图1可见, GAD对谷氨酸(Glu)的米氏常数 $K_m=1.6$,而对半胱次磺酸(cysteine sulfenic acid CS)和亚牛磺酸(hypertaurine, HT)的米氏常数 $K_m=5.2$. 所以,用免疫组化法检出的GAD存在部位就是GABA产生的部位. 当然,如果某些部位对谷氨酸结合力很弱,而对牛磺酸的结合力却很强,而且它们都属于抑制性氨基酸,这时,免疫染色所显示的可能是牛磺酸存在部位. 这些情况不仅在进行免疫染色时应当注意,在生理学和药理学中也是必须考虑的重要因素.

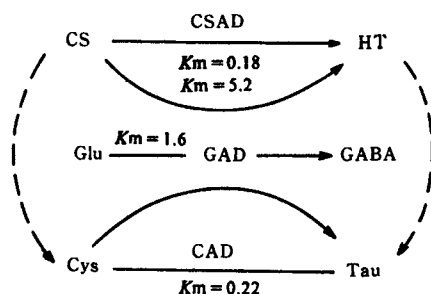


图1 GAD的反应速度分析结果及牛磺酸的生物合成通路

CS: 半胱次磺酸 HT: 亚牛磺酸 Glu: 谷氨酸
Cys: 半胱氨酸 Tau: 牛磺酸 CSAD: 半胱次磺酸脱氢酶
GAD: 谷氨酸脱羧酶
CAD: 半胱氨酸二加氧酶

1.2 GABA-T药理学酶组织化学法

这是利用GABA水解酶GABA-T(GABA转氨酶)和琥珀酸半醛脱氢酶的活性显示GABA存在部位的方法^[9],但是GABA-T不仅在神经细胞中大量存在,而且在胶质细胞甚至在末梢神经组织、脑下垂体以及不含GABA的肾脏和肝脏等处含量也不少.因此将GABA-T作为GABA的存在指标其可信度比较低. 1981年 Vincent等人给动物注射GABA-T的非可逆性阻断剂,使动物存活14—18 h,然后染色观察其存在部位,仅发现在神经细胞中有GABA-T物质^[10]. 这种现象说明,相对于胶质细胞而言,神经细胞中GABA-T的合成速度比较快. 有人用药理组织化学法,给予阻断剂研究了鼠脑内GABA-T的分布,结果与以往对GABA-T的研究相一致^[11]. 由于这种方法能清楚地显示用GAD法难于显示的神经细胞,因此大大地推动了GABA通路的研究. 但是这种方法的特异性较差,必须与其它方法如生物化学法等配合起来才能确切的证明GABA-T阳性细胞就是GABA能神经元.

1.3 利用GABA抗体的免疫组织化学法

此方法是研究GABA神经递质的近代方法. 其做法是:首先将分子量较小的GABA与其载体物质(牛血清蛋白,BSA)进行结合作为半抗原,然后给动物免疫制取GABA抗血清,或者用单克隆技术培养单克隆细胞株,制取单克隆抗体. 根据抗体与生物体内抗原结合的原理,用免疫组织化学法观察GABA的免疫阳性结构,具体步骤请参阅有关专著. 此法的优点是敏感度高,反应产物稳定,是目前最常用的也是最有效的方法之一. 其难点在于所制取的抗血清有时会产生交叉反应,即由于抗血清不纯,将某些非GABA物质也染了出来,使结果难以判断,因而在制取抗原和抗血清时必须慎重加以精制. 另外,在染色过程中,可以调节抗血清的稀释度,使某些起交叉反应的物质显示不出来或使其显现度降低到最低水平. 免疫组织化学法不仅用于光镜研究,也可用于电镜研究,以便观察GABA在细胞中更细微的结合

部位。

2 CNS 中的 GABA 通路及其神经元

运用前述的三种方法证明, CNS 中的 GABA 能神经元分布比较广泛, 在联络核、脚间核、杏仁核、纹状体、黑质、缰核、丘脑下部、丘脑腹核、上丘、下丘、大脑皮层、小脑和脊髓中都有分布。GABA 能神经元的胞体大部分都较小, 突起较短, 属于中间类型的神经元^[12,13]。只有少部分区域的神经元胞体较大, 突起较长, 如苍白球向黑质投射的神经元和丘脑下部向大脑皮层投射的神经元^[14]。过去一直认为, 在 CNS 中的 GABA 能神经元, 从形态上均属高尔基分类的非锥体型多极神经元 (图 2a, b) 和双极神经元 (图 2a, c)。但最近我们在研究视觉通道中 GABA 能神经元特性时发现, 虽然 GABA 能神经元绝大多数是非锥体型的^[15], 但仍有极少数是锥体型的, 如图 2d 所示。

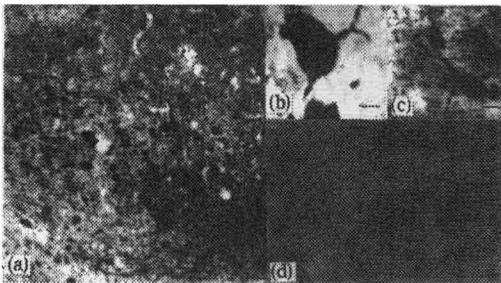


图 2 金黄地鼠视皮层中的 GABA 阳性神经元

(a) 金黄地鼠视皮层 17 区 GABA 阳性神经元, 标尺=35 μ m;

(b) (c) 金黄地鼠视皮层 17, 18 区 GABA 阳性多极神经元, 标尺=7 μ m;

(d) 金黄地鼠视皮层第 VI 层中的锥体神经元, 标尺=12 μ m ▲示胞体 →示轴突

免疫电镜证明, GABA 神经元的投射纤维可分两种类型: 一种纤维的终末跟其它神经元形成对称性突触, 其终末端含有各种形状的突触小泡, 这种纤维占纤维总量的 90% 以上; 另一种纤维的终末跟其它神经元形成对称性或非对称性突触, 终末端含有圆形突触小泡, 这种纤维所占比例很小^[16]。脑中 GABA 神经元胞

体及彼此间的投射关系见图 3 所示。

结 语

本文所叙述的三种方法各有其优缺点。用 GAD 免疫染色法虽然能显示出 GABA 能神经元, 但细胞体不容易染出。为了显示细胞体, 人们往往给动物注射秋水仙素, 以减慢或阻断 GAD 自胞体向突起的传输, 而结果也不很理想。用 GABA-T 染色法, 虽然细胞体和突起都能显示, 但有时会出现交叉反应。这三种方法中, GABA 免疫染色法是最好的一种, 细胞体及其末梢都能染出, 但有时象黑质和苍白球等脑内主要的 GABA 存在部位也不能充分显示。因此, 在研究 GABA 神经递质时, 最好是将三种方法搭配起来进行观察。

GABA 在各种递质中是一种很独特的物质。如去甲肾上腺素和乙酰胆碱等, 可根据所作用神经细胞的不同, 其功能可表现为兴奋性或抑制性。但迄今为止, 绝大部分实验都基本肯定, GABA 不论在什么情况下都显示抑制性。GABA 的这种独特的生理特点最初是用生理学方法证实的。后来通过免疫电镜发现, 几乎所有 GABA 类阳性神经末梢都具有 Gray I 型突触即抑制性突触的特征, 从形态学上进一步肯定了这一点。

在 GABA 神经通路的研究中, 常常采用损伤或破坏实验。如将纹状体的一半切断, 发现黑质中 GAD 含量降低, 证明纹状体和黑质的 GABA 通路; 用切除苍白球证明苍白球和黑质的 GABA 通路; 当给黑质中注入红藻氨酸 (kainic acid), 可发现脚桥核中 GAD 活性降低, 这说明黑质的部分 GABA 纤维投向脚桥核; 当给联络核注射红藻氨酸选择性破坏胞体时, 视上核中 GAD 的活性减少, 证明了联络核和视上核的通路。红藻氨酸是目前研究 GABA 能神经通路的有效阻断剂。

关于 GABA 更为微观的抑制结构是目前正在研究的课题。人们已发现, 轴体突触的 GABA 能神经元末梢作用在 A 受体, 而轴轴突触的 GABA 能神经元末梢作用在 B 受体, 它们

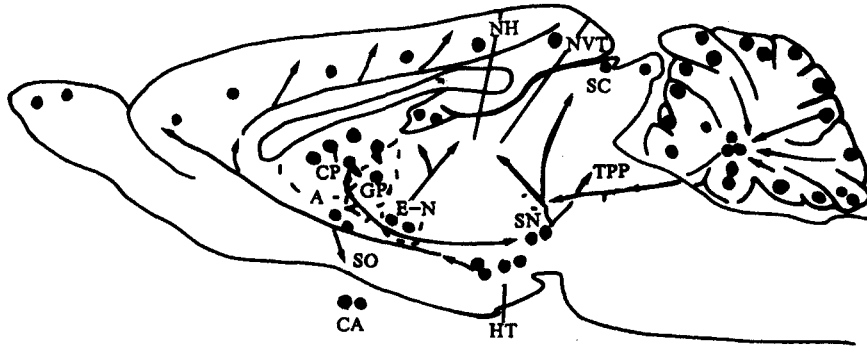


图3 大白鼠脑内 GABA 投射线路图

A: 联络核 CP: 纹状体 EN: 脚间核 GP: 苍白球 SN: 黑质 SO: 视上核
 TPP: 脚桥核 NH: 缰核 NVT: 丘脑复核 CA: 扁桃体核 HT: 丘脑下部
 SC: 上丘 ●: GABA 神经元分布 ↑: GABA 纤维投射

分别承担着多元和单一信息的控制作用，但其更详细的细胞学证据尚待进一步研究。

参 考 文 献

- Roberts E, Kuriyama K. Biochemical-physiological correlations in studies of the γ -aminobutyric acid-system. *Brain Res*, 1968; **8**: 1-35
- Bazemore A W, Eliot K A C. Isolation of factor. *J Neurochem*, 1957; **1**: 334-339
- Wakamori K M, Akaike N. GABA-induced chloride current in rat isolated purkinje cells. *AM J Physiol*, 1989; **256** (6 Part 1): C1153-C1159
- Asanuma C, Pott L L. Light and electron microscopic evidence for a GABAergic projection from the caudal basal forebrain to the thalamic reticular nucleus in rat. *J Comp Neurol*, 1990; **302** (1): 159-172
- Sorimach M, Yamagami K, Morita Y *et al.* GABA inhibits the rise in cytosolic free calcium concentration in depolarized immature cerebellar purkinje cells. *Neuroscience Letter*, 1991; **122**: 229-232
- Ribak C E, Vaughn J E. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat substantia nigra. *Brain Res*, 1977; **116**: 287-298
- Wu Jangyen. Purification and characterization of cysteine acid and cysteine sulfinic acid decarboxylase and L-glutamate decarboxylase from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; **79**: 4270-4274
- Spears R M, Mortin D L. Resolution and brain distribution of cysteine sulfinic acid decarboxylase isoenzymes from hog brain. *J Neurochem*, 1982; **38**: 985-991
- Van Gelder N M. The histochemical demonstration of γ -aminobutyric acid metabolism by reduction of a tetrazolium salt. *J Neurochem*, 1965; **12**: 231-237
- Vincent S R, Kimura H, Mcgeer E G. The histochemical localization of GABA-transaminase in the efferent of the striatum. *Brain Res*, 1981; **222**: 198-203
- Nagai T, Mcgeer P L, Mcgeer E G. Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J Comp Neurol*, 1983; **218**: 220-238
- 梁长林, 刁云程. 金黄地鼠视皮层 17 区、18 区和 17/18a 交界区含 GABA 神经元的免疫细胞化学研究, 神经解剖学杂志, 1990; **6** (1): 33-37
- Albus K, Wahle P, Luebke J. The Construction of GABAergic neurons to horizontal intrinsic connections in upper Layer of the cat's striate cortex. *Exp Brain Res*, 1992; **85** (1): 235-239
- Vincent S R, Hokfelt T, Wu Jangyen. Hypothalamic γ -aminobutyric acid neurons project to the neocortex. *Science*, 1983; **220**: 1309-1311
- 吴奇久, 李俊凤, 韩骥. 生物物理学报, 1990; **6** (4): 550-555
- Oliver D L, Beckius G E. Fine structure of GABA-labeled axonal ending in the inferior colliculus of the cat. *Neuroscience* 1992; **46** (2): 455-464