DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.01.012

大鼠脑内细胞色素氧化酶区域分布的特征

朱 立 陈意生 (第三军医大学基础部病理学教研室) 630038

提 要 本文使用Leitz MPV-Ⅱ型显微分光光度计对细胞色素氧化酶在大鼠脑内不同区域的分布进行了组织化学研究和相对含量测定。结果表明,细胞色素氧化酶在脑内呈高活性和低活性两种分布区。高活性分布区包括大脑皮质、纹状体灰质、丘脑和小脑皮质(分子层)等部位;胼胝体、纹状体白质、海马和小脑白质等部位为低活性分布区;两种酶活性分布区间的细胞色素氧化酶分布有显著差异($P<0.01$)。此外,根据对细胞色素氧化酶染色的阳性反应程度,小脑皮质颗粒层也可分为细胞色素氧化酶富含区(CTORA)和细胞色素氧化酶贫含区(CTOPA),两种区域间细胞色素氧化酶含量差异显著($P<0.01$),前者显著高于后者。本文结合氰化物中毒讨论了脑组织不同部位CN^-的敏感性同脑内细胞色素氧化酶活性分布的关系。

关键词 显微分光光度计*;细胞色素氧化酶类;脑;组织化学;氰化物类
中图法分类号 Q554.9;R361.3

细胞色素氧化酶(CTO)是线粒体呼吸链电子传递系统的终末酶,在有氧氧化代谢中发挥着重要作用。氰化物中毒时,CN^-选择性地积聚于中枢神经系统,使该酶受到强烈抑制,是导致中枢神经系统功能紊乱和致死性的主要机制之一[1,2]。因此,了解该酶在脑内不同区域分布的特征,对于进一步研究生理条件下脑组织各部位的代谢特点,以及氰化物中毒时中枢神经系统机能、代谢和形态改变的机制,具有一定的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性Wistar品系大鼠9只,体重200~300 g,随机取6只和3只分作2组。6只组为细胞色素氧化酶测定组,3只组为苏木精一伊红(HE)染色对照组。动物于实验前1周在室温18~24℃条件下,给予一般饲料喂养,饮水自由。

1.2 方法

1.2.1 细胞色素氧化酶染色切片制备:动物用1%戊巴比妥钠(50 mg/kg,i.p)麻醉后,断头活杀取脑。在大脑前、中1/3交界处的冠状面上,切取0.5 cm厚脑片,迅速置入美国AO公司Cryo-cut Ⅱ型恒冷切片机的恒冷箱内(-20℃),切制5 μm厚冰冻切片,DAB法孵育[3],4%甲醛固定,所制切片置暗盒内保存备测。

1.2.2 HE常规染色切片制备:上述方法将动物麻醉平稳后,固定动物于实验台上,剪开左侧胸腔,从左心室插入灌注针头至主动脉处,右心房开口。先以生理盐水迅速冲洗血管内血液,再用3%戊二醛灌注固定脑组织20 min。断头取脑,10%中性福尔马林中固定3周,于恒冷切片的相应部位取材,石蜡包埋,HE染色,以供与细胞色素氧化酶染色切片结构比较对照。

1.2.3 Leitz MPV-Ⅱ型显微分光光度计测定

1.2.3.1 测量方法及条件:用波谱扫描法以大脑皮质(顶叶)为代表测定180个区域(6只动物×2张切片×15个区域),求出细胞色素氧化酶样本的最大吸收波长约为480 nm,这同文献记载一致[3]。以此波长作为吸光率测定时的单色光波长。

全部细胞色素氧化酶切片样本的吸光率测量均选用镜扫描的方式进行。测量照明电流8 A,光电倍增管电压1000 V,扫描光栅0.05档,照明光栅开至最大,扫描范围15 nm×15 nm,显微镜放大10×63倍。

1.2.3.2 样本测定及测定数量:在显微分光光度计的显微镜下,与HE染色切片结构相对照,就细胞色素氧化酶染色所能显示的结构进行区域扫描测定。每个部位测定的样本点为150个(6只动物×25个样本点×每1个部位)。

测定结果显示于与MPV-Ⅱ型显微分光光度计相连的微机终端显示器上,并存入磁盘待用。

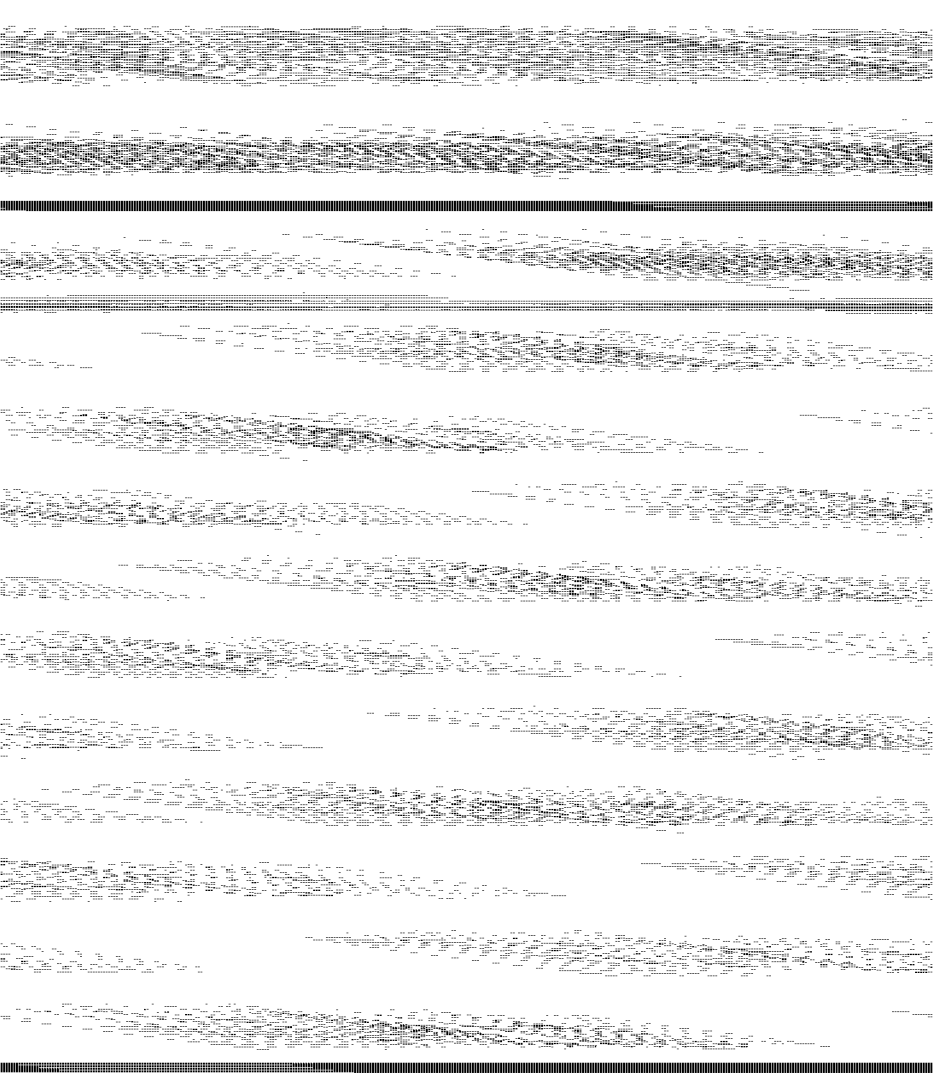
1.2.3.3 统计学处理:将测定数据在苹果Ⅱ型微机上,用单因素方差分析和t检验程序(PDA-2)进行统计学处理。

2 结果

2.1 光镜观察所见

于细胞色素氧化酶测定组切片中见该酶活性部位呈棕黄色颗粒沉淀状。活性部位的细胞之间界限不清,但在海马及小脑皮质颗粒层等部位,由于细胞色素氧化酶活性分布的差异悬殊,尚隐约可见部分细胞核轮廓存在(图1)。大脑皮质区、纹状体灰质、丘脑、小脑皮质(分子层)等部位酶活性较高,酶颗粒丰富;胼胝体、纹状体白质、海马及小脑白质等部位酶呈低活性分布(图2,3)。此外,在小脑皮质颗粒层,部分区域酶含量丰富,酶颗粒致密,我们称之为细胞色素氧化酶富含区(Cytochrome oxidase rich-contained area, CTORA);部分区域则酶颗粒稀疏、染色浅淡,我们称之为细胞色素氧化酶贫含区(Cytochrome oxidase poorly-contained area, CTOPA),如前所述,后者中可见到许多细胞核轮廓(图4)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

由表中平均总吸光率和平均吸光率两项指标所列的数据，可以明显看出：(1)脑内细胞色素氧化酶活性在不同区域具有不同的分布，酶活性由高到低依次为：小脑皮质颗粒层 CTORA、纹状体灰质、大脑皮质、小脑皮质分子层、丘脑、纹状体白质、小脑皮质颗粒层 CTOPA、海马、胼胝体、小脑白质。(2)大脑皮质、纹状体灰质、丘脑、小脑皮质分子层、小脑皮质颗粒层 CTORA 酶活性分布较高；胼胝体、纹状体白质、海马、小脑白质、小脑皮质颗粒层 CTOPA 酶活性分布较低。两群体间任意两部位的酶活性分布值和两总体间的平均酶活性分布值，差异非常显著（$P<0.01$）。这提示，细胞色素氧化酶在脑内可分为高活性和低活性两种分布区。以高活性分布区的平均酶活性值为 100%计算，低活性分布区的平均酶活性值仅为高活性分布区的 50.5%（表 2）。(3)显微分光光度计的测定结果，同光镜下的观察结果相一致。

表 2　脑内细胞色素氧化酶两种分布区的相对吸光率

Tab 2　Relative absorbance of 2 CTO distribution regions

Region of brain	Mean of total absorbance* ($\bar{x}\pm s$)	Relative absorbance
High activity region		
Cerebral cortex	62.87±1.05	96.0%
Gray matter of corpus striatum	65.53±1.32	100.0%
CTORA	76.47±1.40	116.8%
Molecular layer of cerebellar cortex	62.21±0.92	95.0%
Thalamus	60.38±0.99	92.2%
Mean	65.49	100.0%
Low activity region		
Corpus callosum	29.63±1.66	42.5%
Hippocampus	31.57±1.96	48.2%
White matter of corpus striatum	45.29±1.18	69.2%
CTOPA	34.42±1.81	52.6%
Cerebella white matter	24.49±1.16	37.4%
Mean	33.08	50.5%

*：A_{480nm}

3　讨论

本文采用酶组织化学技术与显微分光光度计相结合的方法，对细胞色素氧化酶在脑组织内各部位的分布进行了定量分析。本实验采用的 DAB 法染色，主要显示细胞色素氧化酶的活性部位，因此，除小脑颗粒细胞层及海马等处能显示部分细胞核轮廓外，大部分区域难以分清细胞界限。鉴于复染可能会影响测试结果，故在显微分光光度计测定时，采用了区域扫描的方法。一般认为，细胞色素氧化酶参与核酸磷酸化和氧化磷酸化，分布于细胞核和线粒体内，以线粒体分布最为丰富，其活性与组织内线粒体含量呈正相关[3]。由此推论，本实验所选用的测定扫描小区，实际上是包含了具有一定量线粒体分布的脑组织内细胞体及其突起的成份；由于脑内线粒体的分布在各个不同区域可能存在着不同，必然会导致酶活性的分布在各个区域间有高、低差异。我们的实验结果表明，在脑组织内确实存在着这种差异。大脑皮质、纹状体灰质、丘脑、小脑皮质分子层等部位，中枢神经系统的功能活动颇为活跃，线粒体含量丰富，细胞色素氧化酶呈高活性分布；而脑内白质部分，功能活动相对不活跃，线粒体含量相对较少，细胞色素氧化酶呈低活性分布。因此，根据实验结果，我们将细胞色素氧化酶在脑内的分布分为高活性和低活性两种分布区。这一分类以酶的亚细胞分布为基础，和中枢神经系统功能状态相吻合，对研究氰化物中毒时中枢神经系统机能、代谢、形态的改变及其发生机制，具有一定的理论和实际意义。

氰化物中毒后，脑内各种部位的病变程度有所不同。以往的大量研究表明，氰化物具有高度选择性地损伤白质的倾向[4,5]，胼胝体对其尤为敏感。不少作者认为，氰化物对大脑白质的选择性损伤作用，主要在于该部位细胞色素氧化酶含量低下。本实验结果与此种论点相一致。这样，细胞色素氧化酶就构成了白质部分有氧代谢的“狭颈”环节，较其他区域更容易被氰化物阻

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

断而造成损伤。我们认为，尽管影响氰化物损伤的发生和分布的原因是多方面的，上述推论具有一定道理。

一般认为，小脑皮质颗粒层主要由颗粒细胞、高尔基细胞和小脑小球组成，高尔基细胞分布于颗粒层浅部，数目较少；因而颗粒细胞和小脑小球构成了颗粒细胞层的优势成份[6]，这是基于HE染色下的观察结果。有关细胞色素氧化酶染色后颗粒层的形态表现，目前尚未见有人描述。本实验观察发现，根据对细胞色素氧化酶染色阳性反应的程度，颗粒细胞层可分为细胞色素氧化酶富含区(CTORA)和细胞色素氧化酶贫含区(CTOPA)，后者可见大量细胞核轮廓。鉴于细胞色素氧化酶的亚细胞分布特点和我们的观察结果，CTOPA可能为颗粒细胞所构成，这是因为该细胞胞浆较为贫乏所致；而小脑小球存在有丰富的线粒体，这可能是CTORA形成的主要原因。

参考文献

1 Ballantyne B, Boardman SP, Bright J, et al. Tissue cyanide concentrations and cytochrome oxidase activities in experimental cyanide poisoning. Brit J Pharmacol, 1972, 44: 382

2 欧阳子倩，王廷治，主编. 防化医学. 上海：上海科学技术出版社，1983. 346

3 朱逢春，主译. 新酶组织化学. 北京：人民卫生出版社，1983. 112

4 Way JL. Cyanide intoxication and its metabolism of antagonism. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1984, 24: 451

5 Levine S, Geib LW. Leukoencephalopathy in a cat due to accidental cyanide poisoning. Path Vet, 1966, 3: 190

6 上海第一医学院主编. 组织学. 北京：人民卫生出版社，1980. 343

(收稿：1993-04-14；修回：1993-12-11)

Characteristic regional distribution of cytochrome oxidase in the brain of rats

Zhu Li, Chen Yisheng (Department of Pathology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Histochemical study and measurement of the relative activity of cytochrome oxidase (CTO) of different regions of the brain of normal rats were carried out with a Leitz MPV-Ⅱ microspectrophotometer. 9 Wistar rats were divided into the enzyme activity determined group and the control group with HE staining. It was found that there were 2 kinds of areas according to the CTO activity, the high activity and low activity areas. The former included the cerebral cortex, corpus striatum (gray matter), thalamus, cerebellar cortex, etc, and the latter included the corpus callosum, corpus striatum (white matter), hippocampus, cerebellum (white matter), etc. The difference of CTO activity between the 2 kinds of areas was statistically significant ($P<0.01$). In addition, the granular layer of the cerebellum could be further divided into CTO rich-contained area and CTO poorly-contained area according to the intensity of the response to CTO detecting staining, and the CTO activity of the former was significantly higher than that of the latter ($P<0.01$).

Besides, the relationship of the sensitivity to cyanide of different regions of the brain with their respective CTO activity during cyanide toxication was discussed.

Key words microspectrophotometery ; cytochrome oxidase; brain; histocytochemistry; cyanides

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net