心 理 学 报
第1期 ACTA PSYCHOLOGICA SINICA 1980 年

实验动物的处死方法与脑内单胺类神经介质变化的关系*

林文娟 汤慈美
中国科学院心理研究所

中枢神经介质的研究虽然只有短短二十多年的历史，但它与痛觉、情绪、睡眠与觉醒、学习和记忆有密切关系，特别是神经介质在精神活动中所起的作用引起了人们的浓厚兴趣[1-4]。这已成为心理学研究领域内不可忽视的重要课题，它为脑功能的深入研究开辟了新的前景。

无疑，建立一套中枢神经介质的微量测定法，对于生理心理的基础理论研究是必要的。而在行为的脑生化机制的研究中，处死动物的方法对获得真实情况又有着直接的关系。目前常用的方法是用刀或剪刀断头处死。但断头本身是一强烈刺激，它是否会因此引起脑内神经介质的改变而影响原来所要观察的实验结果？这问题不太清楚。为此，我们对用不同方法处死的动物脑内单胺类神经介质——去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和5-羟色胺(5-HT)的含量进行了比较，并观察了液氮冰冻的脑继续在－6°C 冰箱内保存二天和五天时，脑内单胺类神经介质含量的变化。

方 法

（一）动物的处死与取脑

实验动物为雌性大白鼠，体重 180—280 克，37只动物分成四组：剪刀断头组、液氮固定组、死后两天和死后五天组。

剪刀断头组：将处于安静状态下的正常大鼠，以左手缓缓按压住颈后身躯，右手用锋利剪刀快速断头，迅即取脑，用冰生理盐水洗去血液，以干净滤纸吸干，置－6°C 冰箱内一小时。

液氮固定组：将液氮倒入一特制的保温筒中，筒的内径为 22.5厘米，深度为23厘米。使液氮充满约 3/4。然后手持动物尾部，头朝下迅即投入筒中，立即加盖。动物于数秒内即刻死亡。约一分钟后取出。此时动物已冻硬。用刀、锤先将头从颈部砍下，然后于头颅正中处纵剖为二、再用解剖刀将脑从脑壳中轻轻剔出。

死后两天和死后五天组是将动物以液氮处死后将已砍下并纵剖为二的头颅放入

* 本工作受到北京市结核病研究所许敏缓同志的帮助和科学院动物研究所陈志辉同志的大力支持，特此感谢。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

−6°C 冰箱内保存，待测试日取脑。

各组动物取脑后，在四叠体下丘后缘和桥脑前缘间切断，弃去后段脑片，留下前段进行测定（包括端脑、间脑）。

（二）单胺类神经介质的提取

本工作采用 Miller 等人[5]的酸性正丁醇提取法，并稍作改进。取脑组织 300 毫克以上，用10倍体积的冰冷酸性正丁醇放于组织研磨器中进行匀浆。脑重不足300毫克的按所缺的80%补双蒸水。然后取 3 毫升匀浆液加入带塞玻璃试管内，振荡 5 分钟，以 3000 转/分离心10分钟。弃去沉渣。取上清液 2.5 毫升加正庚烷 5 毫升及 0.1IN 盐酸0.8毫升，再次振荡10分钟，离心10分钟。此时单胺类神经介质 NE、DA 和 5-HT 进入水相。取0.4毫升水相作NE和DA 测定用，另取 0.4 毫升作5-HT测定用。（见操作程序表）

脑匀浆液除用作样品测定外，同时取 3 毫升作组织空白，取 3 毫升作内标准（内加标准液 0.1 毫升，含 NE、DA 和 5-HT各100毫微克；其余各管加双蒸水 0.1 毫升）。与样品管同时提取。

（三）荧光分析

NE和DA的荧光测定：基本上按 Shellenberger 等人[6]的方法。将含有 0.4 毫升提取液的试管内加入 2.4 毫升 0.2N乙酸钠与0.4%乙二胺四乙酸二钠（EDTA）缓冲液，混匀后加 0.1 毫升无水乙醇，接着加 0.2 毫升碘液，摇匀并严格地间隔 4 分钟进行氧化。然后加 0.2 毫升新鲜配制的碱性亚硫酸钠，再次摇匀并间隔 4 分钟，让其分子重排，最后加 0.2 毫升5N 冰醋酸使之酸化稳定。并于 80°C 水浴中加热，5 分钟以后取出并用自来水冷却试管。在荧光分光光度计中以激发光波长 380 毫微米，荧光波长 480 毫微米测定 NE。

脑内NE、DA 和 5-HT含量测定的操作流程图

脑组织300毫克以上＋10倍体积酸性正丁醇匀浆
振荡 5 分↓离心10分3000转/分

↓上清液　2.5 毫升　　↑沉渣弃去
＋　正庚烷　5.0 毫升
＋0.1N盐酸　0.8 毫升
振荡10分↓离心10分3000转/分

↓水相 0.4 毫升
＋ 0.2N 乙酸钠 / 0.4%EDTA } 2.4 毫升
＋　无水乙醇 0.1 毫升
＋　碘　　液 0.2 毫升
↓间隔 4 分
＋　碱性亚硫酸钠 0.2 毫升
↓间隔 4 分
＋　5N冰醋酸 0.2 毫升
↓80°C水浴 5 分
冷却后380毫微米/480毫微米测NE
↓100°C水浴15分
冷却后325毫微米/370毫微米测 DA

↓水相 0.4 毫升
＋　0.5% 半胱氨酸 0.1 毫升
＋　6 毫克%OPT—10N盐酸2.5毫升
↓沸水浴10分
冷却后360毫微米/470毫微米测5-HT

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

在NE测试后将样品倒回试管，在沸水浴中加热15分钟发展DA荧光。冷却后测DA。激发光波长为 325 毫微米，荧光波长为 370 毫微米。

组织空白是先加碱性亚硫酸钠，然后加碘试剂。

5-HT的荧光测定：用 Curzon 的[7]邻苯二甲醛(OPT)聚合荧光法，并稍加改进。于 0.4 毫升水相中加 0.1 毫升 0.5% 半胱氨酸，2.5 毫升 6 毫克%邻苯二甲醛与 10N 盐酸溶液，置沸水浴中加热10分钟，冷却后以激发光波长 360 毫微米，荧光波长 470 毫微米进行测定。

组织空白是加热前不加邻苯二甲醛，只加10N 盐酸，加热冷却后补加邻苯二甲醛。

若测定回收率，需另加外标准管和试剂空白管，并与样品管及内标准管同时进行荧光分析。

外标准管内含NE、DA和 5-HT 标准液 0.1 毫升，含量均为 100 毫微克，另加0.1N盐酸 0.3 毫升。

试剂空白管内含 0.1N 盐酸 0.4毫升。

结 果 与 讨 论

（一）荧光定量分析的直线性及回收率

在 0 到 200 毫微克(ng)的浓度范围内，NE、DA和5-HT的荧光反应呈现出较好的线性关系。根据含量计算公式

$$\frac{\text{样品荧光}-\text{组织空白}}{\text{内标准}-\text{组织荧光}}\times\frac{100\text{ng(标准液含量)}}{0.3\text{g(组织含量)}}=\frac{\text{ng含量}}{\text{g脑组织}}$$

及回收率计算公式

$$\frac{\text{内标准}-\text{组织荧光}}{\text{外标准}-\text{试剂空白}}\times\frac{3\text{(匀浆量)}}{2.5\text{(上清液量)}}\times\frac{0.8\text{(水相量)}}{0.4\text{(测定量)}}$$

推算本工作中样品管及内标准管进行荧光分析的实际浓度是在200毫微克范围内，图 1 所示的线性关系能满足这一定量测定要求。该方法的回收率 NE 是 65—75%；DA 是 60—70%，5-HT是80—90%。

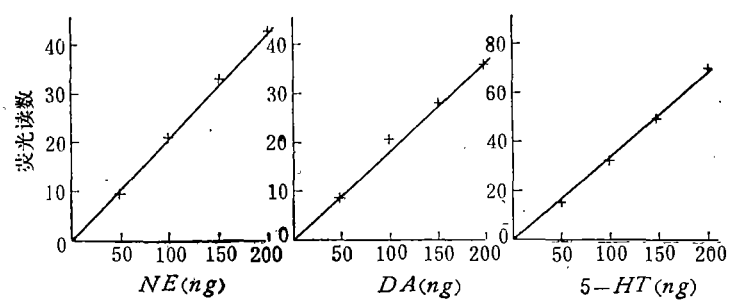

图 1 NE、DA和5-HT的外标准曲线

（二）不同处死法脑内单胺类神经介质的含量

由表 1 可见，剪刀断头组脑内NE、DA 和 5-HT 的含量较液氮固定组稍高，但统计学

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

考验无明显差异。这两种处死方法对脑内单胺类神经介质的含量影响不大。液氮的沸点为－196°C，动物投入液氮后，数秒内即死亡，并完全冰冻，使脑生化代谢在瞬间固定下来。剪刀断头对动物可能是一强烈刺激，但由于断头极为迅速，从断头到取出脑，这过程不超过两分钟，或许脑内单胺类神经介质还来不及变化，故对所测数据并无明显影响。

表 1　不同处死法和死后两天、五天鼠脑内单胺类神经介质的含量

组别	动物数	含量　毫微克/克组织湿重		
		NE	DA	5-HT
剪刀断头	10	358±11	1081±36	600±23
液氮固定	9	349±8	963±57	571±6
死后二天	10	250±19$^{\Delta\Delta}$**	855±37$^{\Delta}$	476±28$^{\Delta\Delta}$*
死后五天	8	189±14$^{\Delta\Delta}$**	659±40$^{\Delta\Delta}$**	270±39$^{\Delta\Delta}$**

注：（1）含量值为均值±标准误
（2）Δ 为与剪刀断头组比较：$\Delta P<0.05$；$\Delta\Delta P<0.01$
（3）* 为与液氮固定组比较 $*P<0.05$；$**P<0.01$

（三）动物死后脑内单胺类神经介质含量的变化

当动物以液氮处死后，被液氮固定的脑继续在－6°C 冰箱内保存二天和五天，发现脑内NE、DA和5-HT的含量均有明显降低，死后五天下降尤为显著（见表 1）。与液氮固定组的当日测定值相比，死后二天和死后五天NE含量分别下降了19%和46%；DA 含量分别下降了11%和31%；5-HT 含量分别下降了16%和52%（见图 2）。由此可见，动物死后脑内单胺类神经介质逐渐损失。时间越长，损失越大。这与 S. P. Bagchi 和 T. M. Swith[6] 在人和大鼠的脑颗粒从苯基丙氨酸中孵化DA 的工作中，发现动物死后，酶的活性随时间逐渐损失是一致的。显然，在－6°C 冰箱内较长时间保存脑组织是不可取的。

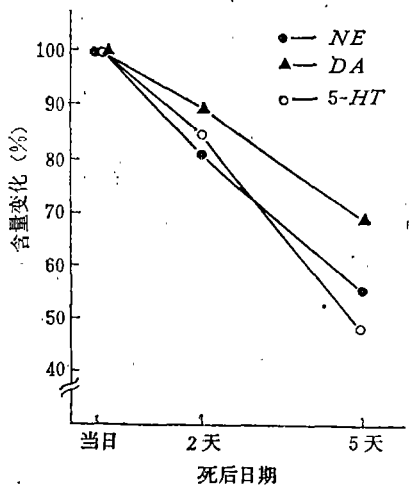

图 2　动物死后脑内单胺类神经介质的变化
注：液氮处死后当日测定的NE、DA和5-HT 的含量值定为100%

摘要：本文采用脑内单胺类神经介质的荧光测定，对不同方法处死的动物及死后二

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

天和死后五天脑内去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和 5-羟色胺(5-HT)的含量作了比较。发现剪刀断头与液氮处死所测结果无明显差异。而动物死后脑内单胺类神经介质逐渐损失,时间越长,损失越大。

参 考 文 献

〔1〕 北医针麻原理研究室生理组：中枢神经介质概论。科学出版社.北京,1977
〔2〕 Shildkraut J. J. and Kety S. S.:Science 156,21—30,1967
〔3〕 Aprison M. H. and Hingtgen J. N.:Fed. Proc, 31,121—129,1972
〔4〕 Seiden L. S. and Dykstra L. A.:Psychopharmacology:A Biochemical and Behavioral approach. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 1977
〔5〕 Miller F. P. et al.:Biochem pharmac 19,435—442,1970
〔6〕 Shellenberger M. K. and Gordon J. H. Analyt Biochem 39,356—372,1971
〔7〕 Curzon G. and Green A. R.:Brit. J. Pharmacol 39,653—,1970
〔8〕 Bagchi S. P. and Swith:T. M. Biochem pharmac 26,900—,1977

RELATIONSHIP BETWEEN DIFFERENT METHODS IN KILLING ANIMALS AND THE CHANGES OF MONOAMINE NEUROTRANSMITTERS IN THE BRAIN

Lin Wen-juan Tang Ci-mei

(Institute of Psychology, Academia Sinica)

In this paper the brain levels of NE, DA and 5-HT in rats killed by decapitation or by being frozen in liquid nitrogen were compared. Furthermore, the changes of these transmitters contents in the brain were determined after the brain was placed in a-6°C refrigerator for 2 and 5 days after being frozen in liquid nitrogen. It was found that no significant difference between decapitation and being frozen in liquid nitrogen was detected in neurotransmitter contents. But the longer the samples were placed in the refrigerator, the more loss in monoamine neurotransmitters was observed.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net