论著

文章编号:1000-5404(2009)01-0056-04

运用新的体视学方法研究大鼠胼胝体及胼胝体额区有髓神经纤维

徐 瑢[1],李 琛[1,2],杨 姝[1,2],张 伟[1],卢 伟[1],唐 勇[1,2] (重庆医科大学:[1]组织胚胎学教研室,[2]附属第一医院神经内科,重庆 400016)

摘 要:目的 建立定量研究胼胝体体积及胼胝体额区有髓神经纤维的体视学方法。**方法** 运用卡瓦列里原理计算胼胝体和胼胝体额区体积。采用随机抽样原则在胼胝体额区切取组织块,用"球切法"保证满足三维空间内各向同性抽样原则后,用超薄切片机切取60 nm厚的超薄切片,在透射电子显微镜下从每张切片随机拍摄4个视野。使用无偏计数框计算胼胝体额区有髓神经纤维长度密度,使用等距测试点计算胼胝体额区有髓神经纤维体积密度。胼胝体额区内有髓神经纤维的长度密度和体积密度分别乘以胼胝体额区的体积就得到了胼胝体额区内有髓神经纤维的总长度和总体积。测量所有被无偏计数框计数的有髓神经纤维的直径。与纤维断面的最长轴相垂直的所有横轴中最长的1条横径为其直径。**结果** 大鼠胼胝体的体积为(70.67±5.64) mm^3,胼胝体额区体积为(15.29±1.62) mm^3,胼胝体额区有髓神经纤维的总长度为(16.01±2.28) km,胼胝体额区有髓神经纤维的总体积为(9.11±0.44) mm^3,胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘的总体积为(3.91±0.40) mm^3。胼胝体额区有髓神经纤维的直径为(0.58±0.05) μm。**结论** 本研究建立了定量研究胼胝体体积和胼胝体额区内有髓神经纤维总长度、总体积和有髓神经纤维直径的研究方法。

关键词: 胼胝体;有髓神经纤维;大鼠;体视学

中图法分类号: R311; R322.81; R329 **文献标识码:** A

Rat corpus callosum and myelinated nerve fibers in its frontal region by a new stereological method

XU Qiang[1], LI Chen[1,2], YANG Shu[1,2], ZHANG Wei[1], LU Wei[1], TANG Yong[1,2] ([1]Department of Histology and Embryology, Faculty of Basic Medical Sciences, [2]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To establish a stereological method for the quantitative study on corpus callosum and the myelinated nerve fibers in its callosal frontal region. **Methods** The volume of corpus callosum and the volume of its frontal region were estimated using the Cavalieri's principle. The tissue blocks were obtained from the frontal region of corpus callosum in an uniform random fashion. Isotropic, uniform and random (IUR) sections were ensured by using isector technique. Sections with the thickness of 60 nm were cut from each epon block by using an ultramicrotome. From each section, 4 fields of vision were randomly photographed using electron microscopy. The length density of the myelinated fibers in the frontal region of rat corpus callosum was estimated using an unbiased counting frame. The volume density of the fibers was estimated using point counting. The total length and total volume of the myelinated fibers in the region were estimated by multiplying the length density and volume density of these fibers by the volume of the frontal region, respectively. **Results** The volume of rat corpus callosum was (70.67±5.64) mm^3, and the volume of its frontal region was (15.29±1.62) mm^3. The total length of these myelinated fibers was (16.01±2.28) km, and their total volume was (9.11±0.44) mm^3. The total volume of the myelin sheaths in the frontal region of rat corpus callosum was (3.91±

基金项目: 国家自然科学基金(30440082,30572075);国家人事部2005年度高层次留学人才回国工作资助经费;教育部2006年留学回国人员科研启动基金;教育部2006年重点项目;重庆市自然科学基金(CSTC2005BB5034)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30440082, 30572075), the Grant for High-level Talents Returning from Overseas of Ministry of Personnel in 2005, the Starting Foundation for Talents Returning from Overseas of Ministry of Education, the Key Project of Ministry of Education in 2006 and the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5034)

作者简介: 徐 瑢,男,陕西省西安市人,硕士研究生,主要从事神经生物学方面的研究。E-mail:xlunasea@yahoo.com.cn

通信作者: 唐 勇,E-mail:ytang062@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-28;**修回日期:** 2008-07-24

0.40) mm^3. The diameter of these myelinated fibers was (0.58 ± 0.05) μm. **Conclusion** We describe a stereological method that can be used to quantitatively investigate the volume of corpus callosum and the myelinated nerve fibers in the frontal region of corpus callosum. The method will be as a useful tool for the future studies of the changes of corpus callosum in normal aging and in various neurodegenerative diseases.

Key words: corpus callosum; myelinated nerve fibers; rats; stereology

随着影像学技术的进步,利用 MRI、DTI 图像,研究人员能够在活体状态下对胼胝体形态进行研究[1]。遗憾的是这些研究手段仅能够在大体形态上对胼胝体进行观察,并不能在细胞水平和超微结构上对胼胝体进行更为细致的研究。一些研究人员利用电子显微镜技术进行了胼胝体内重要组成成分神经纤维的定量研究[2]。但这类定量研究一方面没有运用随机抽样方法,另一方面多数报道仅限于对于二维切片进行观察所得到的密度的定量信息。基于对以往研究不足之处的总结,本研究以新的体视学方法原理为基础,将新的体视学方法和电子显微镜技术相结合研究大鼠胼胝体有髓神经纤维的改变,以期为将来定量研究正常老年和各种神经系统退行性疾病状态下,胼胝体内有髓神经纤维的改变提供更为理想的研究手段。

1　材料与方法

1.1　标本固定与取材

7 月龄的 Long-Evans 雌鼠 5 只,由第三军医大学实验动物中心提供。首先,利用水合氯醛对大鼠进行腹腔麻醉,给予 4% 水合氯醛腹膜内注射(10 ml/kg)。待大鼠被麻醉后进行灌注固定。打开被麻醉大鼠胸腔暴露心脏,将灌注针头插入左心室,同时剪开右心耳,打开灌注泵进行灌注。采用 DHL-3 型灌注泵,先以 20 ml/min 的速度用 80 ml 生理盐水冲洗,再以 20 ml/min 的速度用 2% 多聚甲醛与 2.5% 戊二醛混合液(pH 7.4)灌注 300 ml,以颈部僵硬为灌注良好的标志。

取出脑组织,去除小脑,并将大脑左右半球分开,以 6% 琼脂分别包埋左右大脑半球。冷却后切取 1 mm 厚的连续脑组织切片,由 0 ~ 1 mm 选择的随机数字决定切取第 1 片的位置。每侧大脑半球切取 14 ~ 16 片(CV = 0.05)。其中出现胼胝体的切片约 12 片。在出现胼胝体的组织块上随机叠加等距计数点以计数胼胝体体积。将出现胼胝体的前 3 片切片(头端)取出。在取出的 3 片切片(即额区)上随机叠放测点,遵循随机抽样原则,在测点击中胼胝体的地方取组织块送电镜标本(图 1),平均每只动物抽取电镜标本 3 块。

1.2　电镜照片的制备

将组织块在 4 ℃冰箱中用 4% 的戊二醛浸泡固定 2 h,经 0.1 mol/L PBS (pH 7.2) 冲洗 3 次后用锇酸(OsO_4)在 4 ℃条件下染色 2 h。经 50%、70%、90% 的乙醇,90% 乙醇与 90% 丙酮混合物及 100% 丙酮溶液中逐渐脱水浸透后在 100% 树脂中孵育。将孵育好的组织块先用“球切法”(isector)[3] 包埋成直径 5 mm 的小球,再按常规电镜包埋方法用树脂包埋小球。每一组织块随机切取 1 张 60 nm 厚的超薄切片。在透射电镜下每张切片放大 6 000 倍后随机抽取 4 个视野拍照。每只大鼠共拍摄 12 张照片。

1.3　体视学分析

1.3.1　胼胝体体积计算　　在抽取电镜标本前,解剖显微镜下,在每一片出现胼胝体的切片上叠放计数测点,记录击中胼胝体的测点个数(图 2),每只动物击中胼胝体的总测点数为 ∑Pcc。利用体积计算公式[4,5],即卡瓦列里原理(Cavalieri)计算胼胝体体积。

$$Vcc = t \times a(p) \times \sum Pcc \quad (1)$$

式(1)中 Vcc 代表胼胝体体积;a(p)为每一测点所对应的面积(0.39 mm^2);t 为切片厚度。通过计数落于胼胝体额区的测点总数,用上面同样的方法可以计算出胼胝体额区的体积(Vfc)。

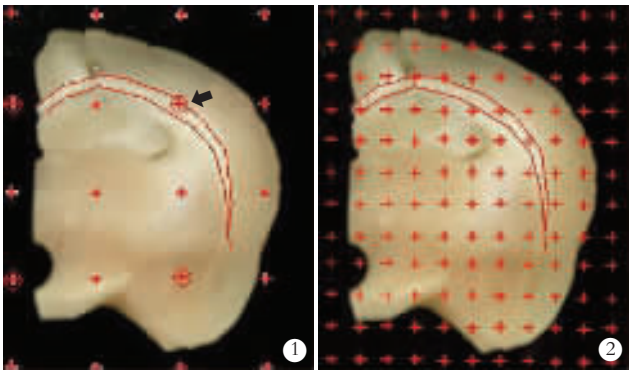


图 1　随机电镜组织块的方法　在 1 mm 厚的脑片组织上,随机叠加印有等距测点的透明胶片,当测点击中胼胝体(红线范围内),在箭头所示处切取电镜组织块

图 2　计数落在胼胝体上测点数的方法　在切取的脑组织片上随机叠加等距测点,计数落在胼胝体内的测点数

1.3.2　胼胝体额区内有髓神经纤维的长度密度与总长度　在电镜照片上随机叠加无偏计数框[6],计数完全落在计数框内和只与计数线(虚线)相交的有髓神经纤维断面,任何与禁止线(实线)相交的断面均不计数(图 3)。

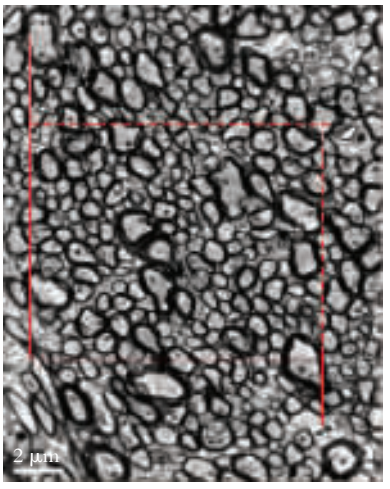
胼胝体额区内有髓神经纤维的长度密度[Lv(nf/fc)],按公式计算[4,5]。

$$Lv(nf/fc) = 2 \times \sum Qnf / \sum A \quad (2)$$

其中 ∑Qnf 为所有无偏计数框内计数的有髓神经纤维断面数的总数,∑A 为所使用的无偏计数框的总面积。胼胝体体额区内有髓神经纤维总长度的计算公式[4,5]为:

$$L(nf,fc) = Lv(nf/fc) \times Vfc \quad (3)$$

式中 L(nf,fc)代表有髓神经纤维总长度,Lv(nf/fc)代表有髓神经纤维的长度密度,Vfc 代表胼胝体额区的体积。



在随机拍摄的照片上叠加无偏计数框,根据无偏计数框的计数原则计数有髓神经纤维断面数

图3 计数胼胝体内有髓神经纤维断面数的方法 (×6 000)

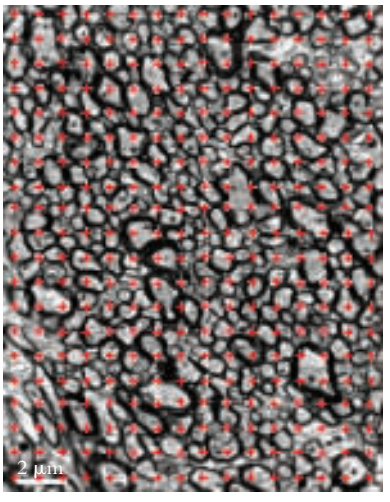
1.3.3 胼胝体额区内有髓神经纤维的体积密度与总体积 在电镜照片上随机叠加计数点,计数落在有髓神经纤维上的测点数(Pnf),以及落在整个照片内的胼胝体的测点数(∑Pfc)(图4)。有髓神经纤维的体积密度 Vv(nf/fc)按公式计算[4,5]。

$$Vv(nf/fc) = \sum Pnf / \sum Pfc \quad (4)$$

有髓神经纤维的总体积的计算式为:

$$V(nf,fc) = Vv(nf/fc) \times Vfc \quad (5)$$

式中 V(nf,fc)代表有髓神经纤维总体积,Vv(nf/fc)代表有髓神经纤维的体积密度,Vfc 代表胼胝体额区的体积。



在随机拍摄的照片上叠加等距测点框,分别计数落在胼胝体、胼胝体内有髓神经纤维及有髓神经纤维髓鞘上的测点数

图4 计数落在胼胝体内有髓神经纤维断面上测点数的方法 (×6 000)

1.3.4 胼胝体额区内有髓神经纤维的髓鞘体积密度与总体积 在电镜照片上随机叠加计数点,计数落在有髓神经纤维髓鞘上的计数点数(Pms),以及落在整个照片内的胼胝体的计数点数(Pfc),有髓神经纤维的髓鞘体积密度 Vv(ms/fc)按下面公式计算[4,5]。

$$Vv(ms/fc) = \sum Pms / \sum Pfc \quad (6)$$

有髓神经纤维髓鞘的总体积的计算式为:

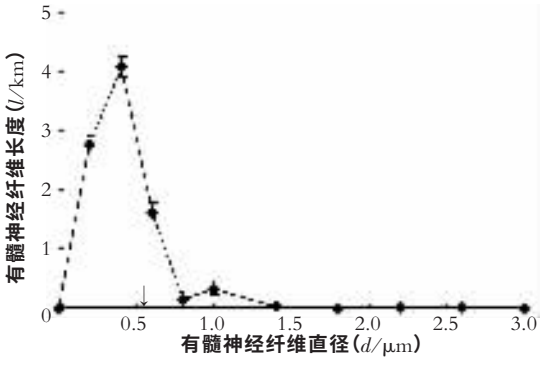
$$V(ms,fc) = Vv(ms/fc) \times Vfc \quad (7)$$

式中 V(ms,fc)代表有髓神经纤维髓鞘总体积,Vv(ms/fc)代表有髓神经纤维髓鞘的体积密度,Vfc 代表胼胝体额区体积。

1.3.5 胼胝体额区内有髓神经纤维的直径 测量所有被无偏计数框计数的有髓神经纤维断面的直径。首先确定有髓神经纤维断面的最长轴,与这个最长轴相垂直的所有横轴中最长的一条横径为其直径。测量所有被无偏计数框计数的有髓神经纤维断面的直径,并将直径按0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、3.0 μm 及 3.0 μm 以上计数不同直径等级下的纤维断面数,然后除以总纤维断面数,得出每一纤维直径等级的纤维在总纤维中所占的比例,再乘以有髓神经纤维总长度,就得出了每一纤维直径等级的纤维长度的分布状况。

2 结果

在年轻 Long-Evans 大鼠,胼胝体的体积为(70.67 ± 5.64) mm^3,胼胝体额区体积为(15.29 ± 1.62) mm^3,胼胝体额区有髓神经纤维长度密度为(1.08 ± 0.19) km/mm^3,胼胝体额区有髓神经纤维的总长度为(16.01 ± 2.28) km,胼胝体额区有髓神经纤维体积密度(0.60 ± 0.06) km/mm^3,胼胝体额区有髓神经纤维的总体积为(9.11 ± 0.44) mm^3,胼胝体额区髓鞘体积密度为(0.26 ± 0.02),胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘的总体积为(3.91 ± 0.40) mm^3。胼胝体额区内有髓神经纤维的直径为(0.58 ± 0.05) μm。胼胝体额区内有髓神经纤维直径分布见图5。



↑:胼胝体额区有髓神经纤维平均直径

图5 胼胝体额区有髓神经纤维平均直径与纤维长度分布

3 讨论

本研究介绍了定量研究胼胝体体积和胼胝体额区有髓神经纤维总长度、总体积及髓鞘总体积的体视学方法。这为以后对正常老年和各种神经系统退行性疾病状态下胼胝体改变的相关研究提供了非常有用的研究手段。在方法学上,本研究所描述的方法与以往的相关研究所使用的方法相比较,具有以下优势。

3.1 均匀系统随机抽样

在以往进行的关于胼胝体内神经纤维改变的各项研究中,研究人员往往仅选择了自己感兴趣的区域进行研究。Yates 等[2]将从鼠脑中确定好边界范围的胼胝体膝部和压部的组织块用环氧树脂包埋后用超薄切片机切成1~2 μm 厚的切片。在整个组织学处理过

程中,并没有考虑如何随机抽取组织块,更没有考虑如何保证使组织块的每个方向走行的神经纤维都有相同的概率被切取。体视学的基本抽样原则就是要让所研究的整个区域内的各个部分有均等的机会被抽取。本研究中严格采取均匀随机抽样原则。将随机选取的一侧半球按照冠状面切取 1 mm 厚的连续等距脑组织切片,第 1 片切取的位置从额极开始随机选取,然后在定义的额区脑组织薄片上随机叠放等距测点,在测点击中胼胝体的地方取组织块送电镜标本。

3.2　三维空间内均匀抽样

在三维空间内均匀抽样原则的应用保证了胼胝体内有髓神经纤维总长度被无偏估计。走行于胼胝体中的长管状的有髓神经纤维被一个平面截断时,在这个横截面上有髓神经纤维断面的多少便反映出有髓神经纤维的总长度。然而,当通过在 1 张二维切片上计数纤维断面数以计算三维空间内纤维长度时有一个必须存在的先决条件,即每 1 个断面必须在 1 张各向同性切片上被计数或者神经纤维自身是各向同性。在本研究中各向同性、均匀随机切片的取得用“球切法”予以保证[3]。将抽取的组织块放在一个 5 mm 球形腔内,注入树脂进行包埋,待树脂干燥后将包裹有组织块的树脂小球取出,任意滚动小球后再将小球进行常规电镜包埋,然后进行电镜超薄切片的切取。以这种方式得到的各向同性、均匀随机切片保证了神经纤维在三维空间内的各个方向上有均等的机会被抽取。

3.3　计算总量而非密度值

以往对胼胝体神经纤维的定量研究多是基于对二维切片观察获得的密度信息,以密度值来反映总量信息[7],但密度值是无法准确反映总量变化趋势的。本研究运用卡瓦列里原理计算出了整个胼胝体额区的体积,用胼胝体额区的体积乘以胼胝体额区内有髓神经纤维长度密度和体积密度便得到胼胝体额区内有髓神经纤维的总长度和总体积。

参考文献:

[1] Ota M, Obata T, Akine Y, *et al*. Age-related degeneration of corpus callosum measured with diffusion tensor imaging [J]. Neuroimage, 2006,31(4):1445 - 1452.

[2] Yates M A, Juraska J M. Increases in size and myelination of the rat corpus callosum during adulthood are maintained into old age[J]. Brain Res, 2007,1142:13 - 18.

[3] Nyengaard J R, Gundersen H J. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections form small specimens[J]. J Microsc, 1992, 165(Pt 3): 427 - 431.

[4] Gundersen H J, Bendtsen T F, Korbo L, *et al*. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis[J]. APMIS,1988,96(5): 379 - 394.

[5] Tang Y, Nyengaard J R. A stereological method for estimating the total length and size of myelin fibers in human brain white matter[J]. J Neurosci Methods,1997,73(2):193 - 200.

[6] Gundersen H J G. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: The edge effect[J]. J Microsc, 1977, 111(2):219 - 223.

[7] Rabi S, Madhavi C, Antonisamy, *et al*. Quantitative analysis of the human corpus callosum under light microscopy[J]. Eur J Anat, 2007, 11(2): 95 - 100.

（编辑　龙　亮）

《第三军医大学学报》访问用户来源统计表

（总报表:2005 - 2008 年）

地域名称	下载频次	浏览数	访问量
亚　洲	301 305	304 551	605 856
欧　洲	3 450	8 088	11 538
北美洲	208	1 123	1 331
大洋洲	32	79	111
南美洲	2	3	5
非　洲	1	0	1

数据来源: www. cnki. net　　数据统计截止时间:2008 - 07 - 31

说明:

· 下载频次:该期刊发表的所有文献自 2005 年 1 月 1 日以来,在各地域,原文在网络上被下载的总次数。

· 浏览数:该期刊发表的所有文献自 2005 年 1 月 1 日以来,在各地域,题录摘要在网络上被浏览的总次数。

· 访问量:该期刊发表的所有文献自 2005 年 1 月 1 日以来,在各地域,下载频次与浏览数之和。

（本刊编辑部）