参考文献：

[1] Zanini F, Suarez C, Perez H, *et al*. Epidemiological surveillance of cystic echinococcosis in rural population of Tierra del Fuego, Argentina, 1997－2006[J]. Parasitol Int, 2009, 58(1):69－71.

[2] Barnes T S, Goldizen A W, Morton J M, *et al*. Cystic echinococcosis in a wild population of the brush-tailed rock-wallaby (Petrogale penicillata), a threatened macropodid[J]. Parasitology, 2008, 135(6):715－723.

[3] 中华人民共和国卫生部. 2006－2015年全国重点寄生虫病防治规划[R]. 2006.

[4] Hemphill A, Stadelmann B, Scholl S, *et al*. Echinococcus metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes[J]. Parasitology, 2010, 137(3):569－587.

[5] 袁丽英，张壮志，石保新，等. 细粒棘球蚴-原头蚴体外培养成囊模型的建立[J]. 畜牧与兽医，2009，41(7)：29－31.

[6] 陆家海，郭中敏，余新炳，等. 细粒棘球蚴细胞系培育及其免疫研究[J]. 中山医科大学学报，2001，22(2)：81－84.

[7] Fiori P L, Monaco G, Scappaticci S, *et al*. Establishment of cell cultures from hydatid cysts of Echinococcus granulosus[J]. Int J Parasitol, 1988, 18(3):297－305.

[8] 单骄宇，康金凤，伊滕亮. 细粒棘球蚴原头蚴体细胞的分离及其细胞形态特点[J]. 新疆医科大学学报，2005，28(4)：360－363.

[9] 刘金明，顾惠明，王爱华，等. 细粒棘球蚴生发层细胞系的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，1998，16(5)：353－356.

[10] 陆家海，程维兴，郭中敏，等. 细粒棘球蚴生发细胞体外培养的实验观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，1997，15(6)：392－394.

（收稿：2009-12-10 修回：2010-01-25）

（编辑　汪勤俭）

技术方法

文章编号：1000-5404(2010)14-1584-02

DiI染色方法观察视网膜神经节细胞形态

王凌妍，刘　康，王　一，阴正勤　（400038 重庆，第三军医大学西南医院全军眼科中心）

[摘要] 目的　寻求一种简单易行的观察视网膜神经节细胞形态学的染色方法。方法　取30 d(P30) Long Even's大鼠6只，雌雄不限，麻醉处死，取眼球后剥离完整视网膜，置于4%多聚甲醛溶液中固定12 h，取固定好的视网膜行全视网膜铺片后DiI荧光染色，将视网膜再次置于4%多聚甲醛溶液中避光37 ℃固定，6 d后观察神经节细胞形态。结果　染色可见神经节细胞胞体清晰，树突及轴突均匀着色，形态清晰。结论　视网膜铺片行DiI染色可以较好的观察神经节细胞形态。

[关键词] 神经节细胞；视网膜铺片；DiI染色

[中图法分类号] R322.91；R446　　**[文献标志码]** B

视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGCs)是视网膜中的第三级神经元，其轴突是构成视神经的重要组成部分。RGCs是视网膜中唯一一个向高级视觉中枢投射信息的神经元。因此，其形态学特点是研究正常及病理状态下RGCs改变的重要指标[1]。目前对于研究神经节细胞形态学的染色方法有很多种，包括神经逆行染色、单细胞染色等，但这些方法步骤繁琐、实验周期长[2,3]。为了得到一种简单易行，重复性高的染色方法，我们采用荧光染料DiI(1,1-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)行全视网膜铺片染色观察神经节细胞形态，从而寻求一种更好的形态学研究方法。

1　材料与方法

1.1　实验动物

选用30 d(P30) Long Even's大鼠6只，体质量150～200 g，雌雄不限，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2　方法

1.2.1　取材与固定　大鼠经腹腔注射过量20%乌拉坦处死后，立即取出完整眼球，置于4%多聚甲醛溶液中室温固定30 min。取固定后的眼球，剪去角膜并除去晶状体、玻璃体后，仔细分离出完整的视网膜。按图1所示，将视网膜按4个象限剪开，将剪好的视网膜放入4%多聚甲醛溶液中，4 ℃固定12 h。

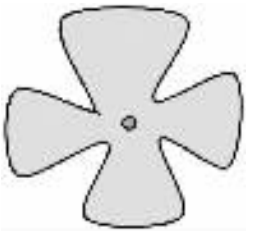


图1　视网膜剪开示意图

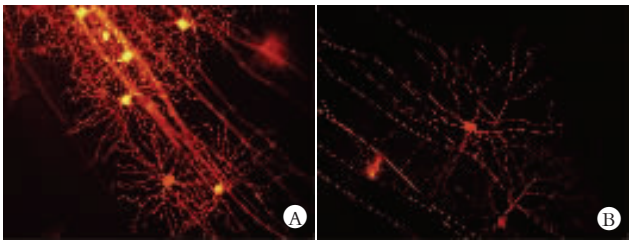
1.2.2　视网膜平铺片DiI染色　将固定好的视网膜平铺于干净的载玻片上，并使神经节细胞层向上。用滤纸吸去视网膜周边多余水分后，用干净的注射器针头在4个象限距视乳头3 mm处各划一小口并埋入一颗直径约为50 μm DiI颗粒。将视网膜浸泡于4%多聚甲醛溶液中，避光37 ℃固定6 d后取出，封片后荧光显微镜观察结果，激光共聚焦显微镜拍照分析。

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划，2007CB512203)

[通信作者] 王　一，E-mail：wangyieye@yahoo.com.cn

2 结果

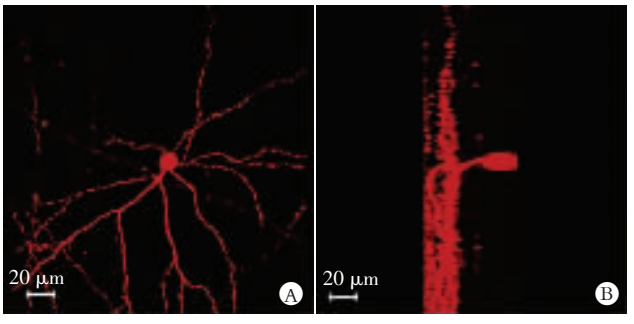
在 DiI 染色的视网膜平铺片标本上可见神经节细胞层神经节细胞胞体及突触染色清晰，细胞内荧光明亮，细胞突起着色清晰。图 2A 为荧光显微镜下神经节细胞形态，可见神经节细胞排列紧密，树突分支交织成网，图 2B 为单个神经节细胞形态，可见神经节细胞胞体及树突着色清晰，其轴突延伸为条索状神经纤维。



A 神经节细胞；B 单个神经节细胞

图 2 LE 大鼠视网膜神经节细胞 DiI 染色荧光显微镜下观察结果（×200）

图 3 为激光共聚焦显微镜扫描单个 RGC 后进行三维重构的细胞图像，图 3A 为神经节细胞水平面形态，可见 RGC 胞体及突触形态，分枝清晰可数，可以通过计算机软件对 RGC 胞体面积及树突分支进行测量计数；图 3B 为对该细胞进行立体旋转的垂直面形态，可见 RGC 树突从胞体向外伸展呈伞状。



A 神经节细胞水平面形态；B 神经节细胞立体旋转的垂直面形态

图 3 LE 大鼠视网膜神经节细胞 DiI 染色后激光共聚焦观察

3 讨论

DiI 是最常用的细胞膜荧光探针之一，呈现橙红色荧光。DiI 是一种亲脂性膜染料，进入细胞膜后可以侧向扩散逐渐使整个细胞的细胞膜被染色。DiI 被广泛用于正向或逆向的、活的或固定的神经等细胞或组织的示踪剂或长期示踪剂[4,5]。神经节细胞是视网膜内的三级神经元，位于视网膜最终段的神经细胞，其树突主要与双极细胞联系，也可通过无长突细胞横向联系；其轴突延伸至视神经乳头处，穿过筛板，形成视神经，是视觉传输系统的重要组成部分。本实验采用全视网膜铺片 DiI 染色观察神经节细胞形态，将 DiI 染料埋入组织中，将组织置于 37 ℃ 中加快荧光染料的扩散速度，缩短了染色时间，且方法简单易行，可重复性高。但在染色时染料自身的强荧光会遮挡部分神经节细胞，因此不适用于神经节细胞计数。

既往报道研究视网膜神经节细胞形态学多采用免疫组织化学染色、单细胞注射或神经逆行染色后观察神经节细胞形态[2,3]。但免疫组织化学染色不能观察到神经节细胞树突分支的完整形态；单细胞染色需要借助膜片钳，操作方法繁琐且耗时长；神经逆行染方法为开颅后将染料注射至上丘或外侧膝状体处，定位较难，且多用于神经节细胞计数研究，固定后组织行神经逆行染色需 4～6 个月[6-9]。

本实验通过对视网膜神经节细胞 DiI 染色的方法进行改进，采用视网膜铺片后对神经节细胞染色，通过神经纤维的顺行扩散，可以观察到包括神经节细胞胞体，树突及轴突的完整形态。对染色后的细胞行激光共聚焦显微镜扫描形态，可将图形进行三维重构，对研究神经节细胞形态特点及其细胞分型有重要意义，本实验为研究神经节细胞形态学提供了一种简单易行的方法。

参考文献：

[1] 张辰星，阴正勤，许红霞，等. RCS 大鼠病变发育过程中视网膜神经节细胞形态学变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(8)：749－752.

[2] 徐西彬，陈耀星，王子旭，等. 应用视网膜铺片和神经元逆行标记技术测定神经节细胞密度分布[J]. 国际眼科杂志，2007，7(3)：654－657.

[3] Meyer-Rusenberg B，Pavlidis M，Stupp T，*et al*. Pathological changes in human retinal ganglion cells associated with diabetic and hypertensive retinopathy [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol，2007，245(7)：1009－1018.

[4] 尹小磊，叶剑. DiI 在人体神经解剖学中的应用[J]. 标记免疫分析与临床，2005，12(4)：244－246.

[5] Pavlidis M，Stupp T，Naskar R，*et al*. Retinal ganglion cells resistant to advanced glaucoma：a postmortem study of human retinas with the carbocyanine dye DiI[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2003，44(12)：5196－5205.

[6] 徐西彬，陈耀星，王子旭，等. 山羊视网膜节细胞的形态学类型及其分布特点[J]. 神经解剖学杂志，2007，23(4)：395－399.

[7] 黄厚斌，张卯年，马志中. 改良大鼠视网膜节细胞逆行标记方法的建立[J]. 眼科新进展，2004，24(5)：341－344.

[8] Salinas-Navarro M，Mayor-Torroglosa S，Jimenez-Lopez M，*et al*. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats[J]. Vision Res，2009，49(1)：115－126.

[9] Behrend M R，Ahuja A K，Humayun M S，*et al*. Selective labeling of retinal ganglion cells with calcium indicators by retrograde loading *in vitro*[J]. J Neurosci Methods，2009，179(2)：166－172.

（收稿 2009-12-30 修回 2010-01-13）

（编辑 张 维）