DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.04.010

在动物活体和死后神经断端使用 HRP 对神经细胞标记情况的比较——光镜和电镜观察

许 健 徐敢熊 汪泽厚 糜建红（解剖教研室）

提 要 用成年小鼠34只，生前剪断左眶下神经和左面神经支给 HRP，灌注固定后剪断右上颌神经和右面神经根给HRP。用BDHC、TMB或DAB呈色法制片。光镜下看到左三叉神经节和左面神经核中，标记细胞体多而标记纤维少，三种呈色法的反应物都是颗粒状。右三叉神经节和右面神经核中则标记纤维多而标记细胞体少，BDHC和TMB呈色反应物为颗粒而DAB呈色却为弥散性标记。电镜下标记细胞体内有电子密度大的阳性反应物，活体标记多为圆形或卵圆形含有反应物的次级溶酶体或多泡体；死后标记则有较多围绕于空泡一侧的不规则反应物，不见有膜围绕。死后标记的纤维，轴索内有大小不一的阳性颗粒，有的髓鞘中也散布着阳性微粒。

关键词 HRP法；神经切断术；轴突运输

现代常用辣根过氧化物酶（HRP）追综神经束路。我们发现在活体或死后神经断端使用HRP时，都可在神经细胞中得到相应的标记[1]。为进一步了解其异同，继续用光镜和电镜作一些观察和比较。

材料和方法

用成年纯种小鼠（C_3H）34只，戊巴比妥钠腹腔麻醉，找出左眼下穿出眶下孔的眶下神经和其下外侧的面神经支剪断，在连脑断端涂以结晶 HRP（东风，RZ=3.0）。少数小鼠在左耳后找出茎乳孔下方的面神经干剪断，也在连脑断端涂HRP。存活两天后灌注固定，取下头部，在解剖显微镜下暴露连在脑干处的右面神经根和在右上颌臼齿上方的右上颌神经，剪断后在连脑断端涂HRP液。然后放入蔗糖缓冲液中1—2天。取出脑干和左、右三叉神经节，切40μm厚的冰冻切片，作DAB、BDHC或TMB法呈色[2][3]。每个脑干隔一片裱成两套连续切片，一套复染。在一些 DAB 呈色的湿片中，光镜下找出面神经核或三叉神经节中标记细胞较多部分，另在冰冻切片时切取有关部位的较厚片（100～120μm）作DAB呈色，再放入锇酸中约30min，常规丙酮脱水，618树脂包埋，超薄切片，部分用醋酸铅和硝酸铀复染。

观察结果

一、光镜所见

在明、暗视野下，大多数活体标记的左三叉神经节和左面神经核中，都可看到含有反应物的标记细胞体，各例中多少不一。BDHC，TMB和DAB三种呈色法的反应物都是颗粒状。明视野下，BDHC的标记颗粒呈蓝色，较为均匀；TMB标记颗粒呈灰蓝色，较粗而浓重；DAB标记颗粒呈棕色或棕黑色，较为细小而分散（图1～4）。胞体中的标记颗粒多少不一。标记颗粒少时多位于核的周围，较多时可遍布胞质各处，但仍可见清楚的核区。当标记颗粒很多而浓重时，则充满整个胞质而不见核区，形成实体性标记（图1，2）。若是面神经核的多极细胞，很多树突也被充满而显出（图1）。TMB呈色的这种实体性标记较多。活体标记的神经纤维只在个别三叉神经节中由排列成线的标记颗粒显现出来。

死后标记的右三叉神经节，其前端靠近给HRP处整段都蓝染或棕染，神经纤维内外都充满深色反应物，离前端稍远才看到较为清楚的标记纤维和标记细胞体。纤维外的反应物一般到有节细胞处的前方或稍后，纤维内的反应物可到节后端。当用BDHC或TMB作呈色剂时，其反应物也都是蓝色或灰蓝色颗粒，同活体标记的相似（图6）。而用DAB作呈色剂时，则呈弥散性标记（图7），即整个胞质或

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

纤维都呈淡棕色均匀背景，看不到颗粒，胞体内可见未着色或着色较淡的核区。一些深染胞质内有时可见不均匀深色区域，有的似有颗粒但不清楚。死后标记时神经纤维被标记的较多（图6，7），三叉神经节中周围支和中央支都可被标记。一般周围支标记的较多，颗粒密集或呈深棕色；而中央支标记的较少，颗粒稀疏或呈淡棕色。DAB反应中，棕色的深浅可能与反应物的多少有关。

死后标记的右面神经核区，一般可清楚看到被标记的面神经根纤维，标记细胞体较少。标记较好的，面神经根膝后段、内膝和膝前段以及面神经核中的神经细胞体都清楚显出。有的从胞体发出的树突也被标记。这些显出标记的阳性反应物，当用BDHC或TMB呈色时也都是颗粒状（图5），而用DAB呈色时则为棕色均匀背景（图8），与右侧三叉神经节中所看到的完全一样。

二、电镜所见

在活体给HRP时，左三叉神经节或左面神经核中标记细胞体内，可看到许多电子密度大的DAB阳性反应物散布于胞质内，以近核周处为多，大小不一（图9）。含有反应物的结构大多为圆形或卵圆形的次级溶酶体，致密的居多。有的内有较浅区域，反应物呈环形、半环形或半圆形（图9）。有的看得出有膜围绕，有的看不清是否有膜(图10)。有时也可看到反应物附着在空泡一侧和含有反应物的较大多泡体。个别突起内看到有少量圆形阳性反应物存在。

死后给HRP得到标记的右三叉神经节内，可看到节细胞体和有髓纤维内有电子密度大的阳性反应物，有些阳性反应物也散布在胞体外和神经纤维之间。节细胞体内的阳性反应物散布于胞质各处（图11），大多数也为圆形或卵圆形，有的呈扁条形，有的附着在空泡一侧形状不大规则，都看不出有膜围绕（图12）。附着在空泡一侧外形不规则的阳性结构较活体标记的为多。右三叉神经节内被标记的神经纤维都是有髓纤维，可看到轴索中有许多阳性反应颗粒，不见有膜，这些阳性颗粒有的是细小而分散的微粒，有的系由一些微粒集结而成的较大颗粒。阳性微粒不仅轴索中有，也散在一些髓鞘板层之中，以紧靠轴索的髓鞘内面为多（图13）。但有的纤维其髓鞘上没有反应物。卫星细胞和雪旺细胞体内偶尔也见阳性颗粒（图13）。

死后标记的面神经核细胞，其阳性反应物同节细胞中相似，但数量较少而形态较大（图14）。

讨　论

自从发现大分子物质如HRP可进入神经细胞由轴突运送以来，不少人对此现象进行了观察研究[3-8]。一般认为HRP在轴突终末处通过胞吞（endocytosis）摄入，由管、泡状结构自轴突送入胞体，然后集结于Golgi器附近的核周处开始降解。胞体或树突也可摄入HRP运送到轴突终末[3][4]。关于运送的机制则有不同假说，一般认为与微管有关[9][10]。轴突受到机械损伤如被切断或压榨后，损伤处屏障瓦解，HRP扩散进入轴浆，附着于轴膜内面以及神经微管和神经微丝上，但向近端便被隔离于囊状或管状细胞器内，再向胞体运送，结果胞体内HRP的分布也是在有膜围绕的细胞器内[3]。弥散的HRP如何进入有膜细胞器内，其过程和机制则未见报导和阐明。灌注固定的神经组织中，HRP仍能从神经断端进入并延伸一段距离，这显然不是主动运送，而可能是物理性扩散现象。本文材料表明，HRP在上颌神经断端向中枢扩散时，神经纤维外的扩散距离短，神经纤维内的扩散距离长，在神经纤维内的扩散，不仅可到节细胞体，还可循其中枢突扩散一定距离，有越神经节扩散现象，这是否因轴索内纵行排列的微管和微丝有助于HRP循之扩散的缘故？有如地上的水易沿地上的树枝或绳索流得较快较远一样。

Bishop和King(1982)[11]指出，HRP直接注入胞体后，反应物无膜包被而散布于胞质和突起中，沿质膜、核模和各种细胞器膜积集，但不穿入膜内。我们实验中死后标记的反应物也未见有膜包被，标记的神经纤维，轴索和髓鞘中有许多细小分散的HRP阳性颗粒，但标记的胞体中却是较大阳性反应物，以附于空泡一侧不规则结构为多。这是否因HRP在轴索内向胞体扩散前进时，有可能由于分子内聚力等因素而逐渐积集之故？

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

我们经神经断端得到的活体标记，三种呈色法的反应物都是颗粒状；死后标记用BDHC和TMB呈色的反应物也是颗粒状，但用DAB呈色时却为弥散性的，有显著不同。Mesulam等指出，DAB反应得到弥散性标记可以肯定HRP是从损伤处进入，但得到颗粒状标记却不能说轴突一定是完整的。并认为若给HRP的断端距胞体近、存活时间短，胞浆内HRP未隔离入有膜细胞器时，DAB呈色可得到弥散性标记[3][5][7]。他们提到的弥散性标记同我们在动物死后得到的弥散性标记一样。但他们未意识到动物死后给HRP也可得到这种标记。他们指出的存活时间短、距胞体近等条件，同死后给HRP所遭遇的环境基本相同。但认为弥散性标记是HRP未隔离到有膜细胞器内的结果，则值得商讨。本文死后标记情况表明，同样实验条件下，BDHC或TMB呈色是颗粒状标记，而DAB呈色为弥散性标记。不能说前者HRP在有膜结构之内而后者却在有膜结构之外。有人报告即使HRP限制在囊泡内，当用O-tolidine呈色时其反应物常是弥散性的[3]。因此是否得到弥散性标记，既与HRP是否扩散进入有关，也与使用不同呈色剂有关。根据本文实验结果，可以说，DAB呈色得到弥散性标记为死后扩散性标记的特点。

同样从断端给HRP，活体标记细胞体多而纤维少，死后标记纤维多而细胞体少。这可能是动物存活时对HRP能作较长途的主动运送，进入胞体的多而留在纤维内的少；死后HRP只扩散入附近的纤维，难以到达较远的胞体之故。

（本文超薄切片等电镜技术系在本校电镜室帮助下进行，特此表示感谢）

参考文献

1. 许健，等。辣根过氧化物酶在动物死后神经组织中的传播。第三军医大学学报1981；3(4)：26～29
2. 刘大庸，等。用辣根过氧化物酶研究神经联系的方法及实验体会。广东解剖通报 1977；1:69～73
3. Mesulam MM. Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways-Axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. In "Tracing Neural Connections with Horseradish Peroxidase", Edited by Mesulam MM, John Wiley & Sons Ltd, New York, 1982
4. Lavail JH and Lavail MM. The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study. J Comp Neurol 1974; 157:303～358
5. Adams JC and Warr WB. Origins of axons in the cat's acoustic striae determined by injection of horseradish peroxidase into severed tracts. J Comp Neurol 1976; 170:107～122
6. Hedreen JC and Mcgrath S. Observations on labeling of neuronal cell bodies, axons, and terminals after injection of HRP into rat brain. J Comp Neurol 1977, 176: 225～246
7. Vanegas H, et al. Early stages of uptake and transport of horseradish peroxidase by cortical structures, and its use for the study of local neurons and their process. J Comp Neurol 1978; 177:193～212
8. 吴淑兰，等。HRP在神经纤维内及其相应神经节中运输及分布方式的光镜电镜对比观察。河北医学院学报 1983；4(2)：96～98
9. 刘湘梅著，周惠民、石珍荣译。神经生长的生物学与病理学。北京：科学出版社，1985
10. Brady ST. Basic properties of fast axonal transport and the role of fast transport in axonal growth. Advances in Neurochemistry 1984; 6:13～30
11. Bishop GA and King JS. Intracellular horseradish peroxidase injections for tracing neural connections. In "Tracing Neural Connections whih Horseradish Peroxidase", Edited by Mesulam MM, John Wiley & Sons Ltd, New York, 1982

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

Comparison of HRP-labeled Neurons in Living and Dead Mice with Light and Electron Microscopy

Xu Jian, et al (Department of Anatomy, Third Military Medical College)

Crystal HRP was applied to the cut ends of the left infraorbital nerve and branches of the facial nerve of 34 adult mice. Then the animals were killed and perfused, and HRP solution was applied to the cut ends of the root of the right facial nerve and the right maxillary nerve. Frozen sections of the brain stem and the trigerminal ganglia were made and reacted with BDHC, TMB or DAB method for light and electrom microscopic examination.

Under light microscopy, the neurons labeled when alive in the left trigerminal ganglion and the nucleus of the left facial nerve showed that more cell bodise but less nerve fibers were labeled. The reaction products with all the 3 methods in thess cells were granular. The neurons labeled after death in the right trigerminal ganglion and the nucleus of the right facial nerve showed that more fibers but less cell bodies were labeled. The reaction products in these cells were also granular with BDHC and TMB methods but diffuse with DAB method.

Under electron microscopy, there were electron-dense positive products in all the cells labeled either when alive or after death. In those cells labeled when alive, the products were found in the round or oval secondary lysosomes or multivesicular bodies, while in those labeled after death, they were mostly found on one side of vacuoles without membrane boundary. In the fibers labeled after death, many large or small positive granules were found in the axons and many minute positive granules in the myelin lamellae especially on their inner surface in contact with the axons.

Key words: HRP labelling; Neurotomy; Axonal transport

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

在动物活体和死后神经断端使用HRP对神经细胞标记情况的比较

——光镜和电镜观察 （正文见第381页）

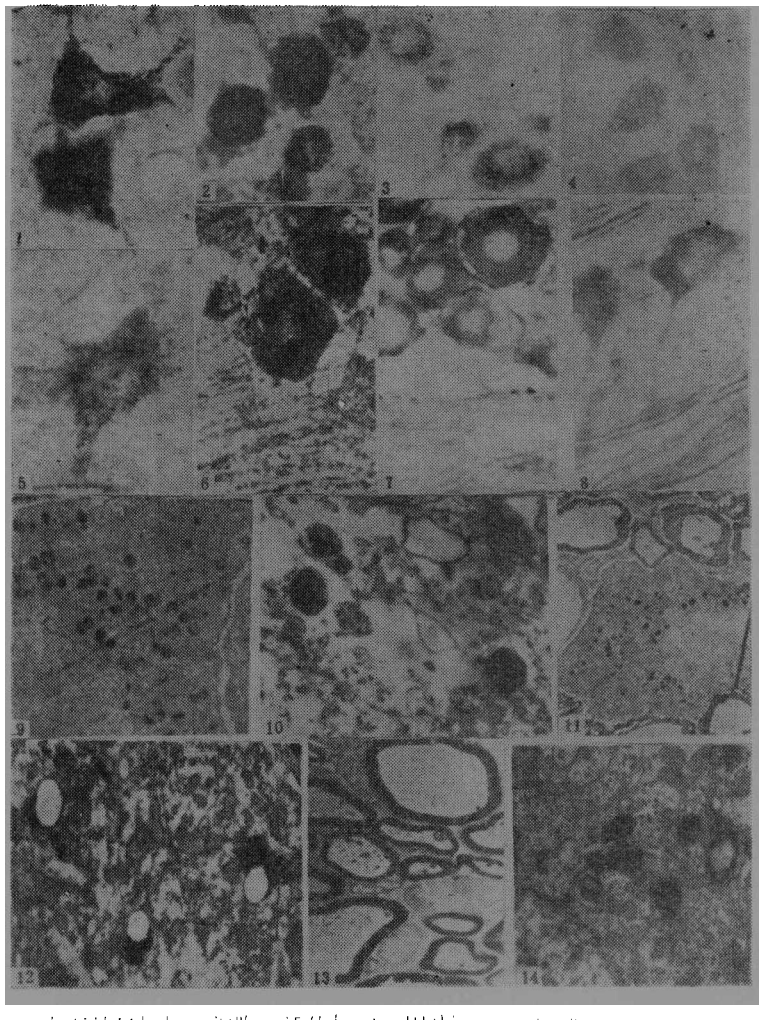


图1 左面神经核标记细胞，活体标记，BDHC，1030

图2 左三叉神经节标记细胞，活体标记，TMB，400×

图3 左三叉神经节标记细胞：活体标记，DAB，400×

图4 左面神经核标记细胞，活体标记，DAB，400×

图5 右面神经核标记细胞，死后标记，BDHC，1000×

图6 右三叉神经节标记细胞，下方为标记纤维，活体标记，BDHC，400×

图7 右三叉神经节标记细胞，下方为标记纤维，活体标记，DAB，400×

图8 右面神经核标记细胞，上、下方为标记纤维，死后标记，DAB，400×

图9 右三叉神经节标记细胞中的阳性反应物，N为胞核，死后标记，5 000×

图10 左面神经核标记细胞中的阳性反应物，N为胞核，核膜有缺损处，活体标记，55 000×

图11 右三叉神经节标记细胞中的阳性反应物，死后标记，2 000×

图12 右三叉神经节标记细胞中的阳性反应物，不规则的电密物质呈短杆状或条形，死后标记，15 000×

图13 右三叉神经节中的有髓纤维和雪旺细胞，可见HRP颗粒散在于轴浆、髓鞘和雪旺细胞质中，死后标记，4 000×

图14 右面神经核标记细胞中的阳性反应物，N为胞核，活体标记，15 000×

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