DOI:10.16016/j.1000-5404.1981.04.007

辣根过氧化物酶在动物死后神经组织中的传播

解剖教研室　许　健　张宗铭　徐敢熊

应用辣根过氧化物酶（HRP）研究神经系统是七十年代才开展起来的方法[1-3]。由于HRP能被轴突终末吸入，循神经纤维逆行传送，经成色反应后能清楚显示神经纤维起源的细胞胞体，因此近年来国内外应用这一方法研究神经联系者甚多，取得不少成绩。除了在中枢或周围神经的轴突终末处注射HRP外，也有人压榨或切断周围神经干，在压榨处注入或断端浸泡HRP[4][5]，或者从静脉注入HRP[6]，都能在一定区域得到HRP标记细胞。鞠躬、舒斯云证明HRP也可沿神经纤维长距离顺向传送到末梢[7]，并且已经应用到顺向追踪的研究中[8]。这些方法都是利用HRP在活体神经组织中的传送现象，动物在施行手术给以HRP后，必须存活一定时间（数十分钟到几天），才灌注取材，进行切片和成色反应。最近我们用HRP法研究脑神经时，发现动物灌注固定后，给以HRP仍可传播。这一现象有可能使我们找到一种比以前更方便的给HRP方法，也提示我们对HRP在神经纤维内的传送机制作进一步考虑，很值得探讨和利用，因此进行了一些实验观察。

材料和方法

用成年小白鼠23只和大白鼠12只，戊巴比妥钠腹腔麻醉，经左心室（小白鼠）或主动脉（大白鼠）插管，先灌注少量缓冲液（pH7.4的0.1M磷酸缓冲液）冲洗，接着灌注冷固定液（用同上缓冲液配制的3%多聚甲醛、1.25%戊二醛和5%蔗糖溶液）。随即取材在一定部位给HRP。灌注不够好的，取材后放入上述固定液中10—30分钟后，再取出给HRP。根据给HRP部位的不同，有的将脑干或脊髓取出，有的保存于原位，再放入上述固定液中进行后固定。6—8小时后放入5%蔗糖溶液（同上磷酸缓冲液），配制清洗浸泡，换3—5次。2—3天后取出需要部位冰冻切片，厚40μm，按Mesulam法[9]进行联苯胺蓝色反应（但稳定液中硝普钠仅用2%）。每两片取一片，铺成两套连续切片，一套用中性红复染。

给HRP（Sigma Ⅵ型）的部位和方法，分别为下列几种：（1）在Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ脑神经连脑处切断涂HRP（浓度为30%）；（2）在耳后面神经出茎乳孔处切断涂HRP；（3）在Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ脑神经穿眶上裂处切断或在眶下孔处切断眶下神经涂HRP；（4）脑干或脊髓横切面上涂HRP；（5）用蘸HRP的细针刺入一侧上丘或下丘；（6）在上颌鼠须处皮下注入HRP（10%，20μl）。（2）（6）两法有的还在活体进行，存活两天后，再如前灌注、取材、切片、成色，以便对照。部分例子中，曾在几个不同部位给HRP，以期得到较多的结果。

观察结果和讨论

切片在光镜明视野和暗视野下观察，除2例外，各例标本都见到有不同程度的HRP阳性反应颗粒，这些颗粒有的清楚地存在于神经细胞体和神经纤维中，有的弥散于脑干或脊髓

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

给HRP处附近和脑室旁中央灰质内，也有的分布在血管壁上。

标记到的神经细胞，有的含有分布均匀的标记颗粒，可以看到位于中央的核区；有的标记颗粒非常浓密，中间部分融合重叠，只在边缘部分看到颗粒；有的整个细胞都呈兰黑色（明视野下）而看不到颗粒；也有的细胞不仅整个胞体兰染，许多突起也都显出，同银染的相似（图一）。这些观察同Keefer[10]在活体标记所见的几种类型相同。同活体标记的比较，看来死体细胞标记浓密的较多。标记到的神经纤维有的清楚看到由许多排列成线的标记颗粒所形成（图一、C），有的则呈细线状而看不清颗粒。活体标记神经纤维显现的不多，但死体标记却比较容易显出。一般认为活体神经细胞摄入的HRP最后为溶酶体所灭活[11]，血管内皮有可能也参与排除过程[12]。死体标记颗粒较活体的多而密，可能是动物死后不存在排除异体蛋白机制之故。

在Ⅲ、Ⅳ、Ⅵ、Ⅶ脑神经根断端涂HRP，有关运动核有标记细胞，这表明有向细胞体的逆行传送。三叉神经根处涂HRP，三叉神经运动核和中脑核有标记细胞，这是向细胞体的逆行传送，但同时三叉神经脊束也清楚显示出来，并伸入脊束核部位显出纤维网络，这表明有离细胞体的顺行传送（图二）。一例脑干腹侧斜方体给HRP时受伤，同侧蜗腹核和交叉到对侧的斜方体纤维都有标记颗粒（图三），也说明同时存在着向细胞体和离细胞体的传送现象。眶上裂和眶下孔处神经切断涂HRP时，同侧三叉神经节内可看到标记细胞和纤维，但脑干内有关运动核却难找到标记细胞。耳后面神经干断端活体涂HRP时，面神经核标记很好（图二），但死后给HRP却未看到标记细胞，只见到一些面神经膝外段的根纤维中有标记颗粒。后面这两种情况，可能是死体HRP传送距离较短没有到达有关运动核之故。脑干或脊髓断面上涂HRP，可看到兰染的网状结构细胞，上、下行纤维和交叉纤维，其上、下行距离约有2—7毫米不等。上颌鼠须皮下活体注射HRP，同侧面神经核和三叉神经节内都找到标记细胞，但死后给HRP的却没有找到。这可能是路程较远，也可能是灌注固定后，轴突终末不能吸入HRP所致。一根脑神经断端给HRP，附近脑神经的断端也可能吸入，而在有关部位看到标记颗粒，存在着混染现象。第Ⅷ脑神经断端或其附近给HRP，有时可看到蜗核和前庭核有标记细胞，三叉神经脊束兰染时偶尔也看到脊束核处有几个标记细胞，这是否存在着跨神经元的传送现象，还是其它原因混染所致，尚待进一步证明。

同活体给HRP一样，死后给HRP也常在给HRP处附近的神经组织内，或脑室旁的中央灰质内，看到兰色HRP阳性颗粒。这种弥散性的阳性颗粒常存在于细胞外间隙，也见于弥散区域内的神经细胞胞体和突起之内（图三），看来神经细胞胞体和突起有可能从附近的细胞外间隙中直接得到HRP。有一例弥散范围较大，几达整个切片，在邻近给HRP处兰染较重，远处则较轻微。虽然较普遍的兰染，但有的神经细胞群和纤维兰染较重，有的较轻，可以看出不同细胞群和纤维的走向。Hedreen[13]在大鼠中注射HRP存活不同时间（2小时—8天）的观察指出，存活时间短，弥散范围大，存活时间长，则弥散区变淡而逐渐缩小。他的存活时间短的情况同我们死体给HRP的结果相似。Hedreen还提到，HRP的扩散各个方向不同，可以为白质片所阻，这也和我们在死体给HRP所见相同。

死后给HRP，常可看到部分血管壁上有兰染颗粒。有一例灌注后，脑干下份未显示任何血管，中脑部份取下在断面上给HRP后，差不多所有血管都兰染。在血管多的切片上（图二），可以看到有标记颗粒的神经细胞和纤维还是比较局限而有选择性的（这可能是从神经纤维断端进入的），细胞外间隙、其它许多神经细胞和纤维并未兰染。这说明HRP并不易从血

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

管壁跑出，活体血脑屏障的作用似乎还存在。在无血脑屏障的延髓最后区处，则常看到有HRP扩散到附近的神经组织中，细胞外间隙和神经细胞中可有HRP阳性颗粒，同 Broadwell[6] 的观察相同。

HRP在死体神经组织中之传播，如上所述有许多方面同在活体中传播的情况相似，但也有其不同之点。过去对于HRP的传送现象，有许多是从活体的基础上来考虑的，现在证明死体也可传播，死后生物机体有着重要的变化，看来过去有些看法现在必须重新加以认识。

关于HRP的传送机制，现在尚不完全清楚，活体神经细胞经胞饮作用摄入的HRP，存在于一些细胞器中[3][11][13]，可能靠神经微管的作用进行主动快速运送[11][11]。动物死后组织经过固定，这种主动运送看来是不存在的。联系到活体神经切断后，正常的轴浆流受到破坏，HRP仍能被运送到胞体，以及HRP能在神经组织中扩散并易循血管蔓延的情况，可以想像，HRP不单靠轴浆流主动运送，可能还存在着其它物理的或化学的传送机制。Perdran (1937) 描述过染料扩散入切断的周围神经，沿轴索逆行和顺行的现象[11]。Martin 等[10] 应用氯化钴于死体，得到循纤维传送的结果。Fidone 等[10]曾提到在神经纤维中注射〔^{3}H〕脯氨酸时，有毛细管作用的被动运动。看来死体内HRP 的传送，可以同这些情况相比。Hedreen等[13] 观察到HRP 在轴突内的早期大量运动，认为不是主动运送现象，可能是简单的轴突内扩散，他们所说的早期运动，可能就是我们在死体所见到的情况。

HRP在动物死后神经组织中的传送时间、距离和超微结构等尚待进一步观察，其传送机制更需从多方面深入探讨。但从我们这一初步实验的结果看来，如能较好地控制混染和扩散，把死体给HRP的方法应用到神经解剖研究中是有一定价值的。它比较方便，不受手术入路和动物存活的限制。它比较准确，可以直接在神经断端或脑干、脊髓的断面上的一定部位进行，免去从外部定位的麻烦。但它也有缺点，即死后HRP传送的距离较短（可以考虑用连续接力的方法来弥补）。相信在进一步研究的基础上，是可以得到较好的应用的。

小　　结

1．用大、小白鼠35只，灌注固定后，在脑神经断端或脑干断面上涂 HRP (Sigma Ⅵ型，30%)，用 Mesulam 法进行成色反应，光镜明视野和暗视野下观察HRP在死体神经组织中的传播现象。

2．动物灌注固定后，HRP仍可在神经纤维中传送，既可向细胞体逆行传送，也可离细胞体向末梢传送，传送距离一般较短，约2—7毫米。胞体内的HRP标记颗粒较浓密，有时可看到核区，有时则完全兰染而看不到颗粒，附近突起也可被标记。神经纤维特别比活体标记明显。

3．同活体一样，死后给 HRP 也可向附近神经组织中扩散和易循血管蔓延。弥散的HRP，可到细胞外间隙，也可进入神经细胞中。

4．根据HRP可在死体神经纤维中传送，以及活体切断周围神经，HRP 仍可传送等现象，可以想象，HRP不单靠轴浆流运送，可能还存在着其它物理的或化学的传送机制。

5．HRP在动物死后神经组织中的传送，一些问题尚待进一步实践探讨。但看来把死体给HRP的方法应用到神经解剖研究中是有一定意义的。

（糜建红同志参加全部技术工作。）

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

参 考 文 献

1. Kristensson K, Olsson Y and Sjöstrand J: Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve. Brain Res 32:399-406, 1971

2. Lavail JH and Lavail MM: Retrograde axonal transport in the central nervous system Science 176:1416—1417, 1972

3. 鞠躬：辣根过氧化物酶追踪神经联系法。第四军医大学科技资料，11:1—12,1978

4. De Vito JL, et al: Uptake and transport of horseradish pexoxidase by cut end of the vagus nerve. Brain Res. 82:269—271.1974

5. 许鹿希、杨宝林：辣根过氧化物酶注射舌下神经干与注射舌肌的比较。中国解剖学会 1980 年学术会议论文摘要汇编，305页

6. Broadwell RD and MW Brightman: Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. J Comp Neur 166:257—283, 1976

7. 鞠躬、舒斯云： HRP沿神经纤维顺向传送的电子显微镜证明。第四军医大学科技资料，11:28—32,1978

8. 鞠躬：脊髓灰质与后索核的联系Ⅱ、脊髓后索核投射及其与后索核脊髓投射细胞的关系。HRP顺、逆行联合研究。解剖学报12(2):134，1981

9. Mesulam MM: The blue reaction product in horseradish peroxidase neurohistochemistry: incubation parameters and visibility. J Histochem Cytoch 24:1273—1280, 1976

10. Keefer DA: Horseradish peroxidase as a retrogradely-transported detailed dendritic marker. Brain Res 140:15—32, 1978

11. 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 Neur, 157:303—358, 1974

12. Van Deurs B: Vesicular transport of horseradish peroxidase from brain to blood in segments of the cerebral microvasculature in adult mice. Brain Res 124: 1—8, 1977

13. Hedreen JC and McGrath S: Observations on labeling of neuronal cell bodies,axons and terminals after injection of HRP into rat brain. J Comp Neur, 176:225—246, 1977

14. 靳仕信主编：解剖学进展，人民卫生出版社，1981年

15. Martin MR and CA Mason: The seventh cranial nerve of the rat. Visulization of efferent and afferent pathways by cobalt precipitation. Brain Res 121:21—24, 1977

16. Fidone ST, et al: Axonal transport of labeled material into sensory nerve endings of cat carotid body. Brain Res 124: 9—28, 1977

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

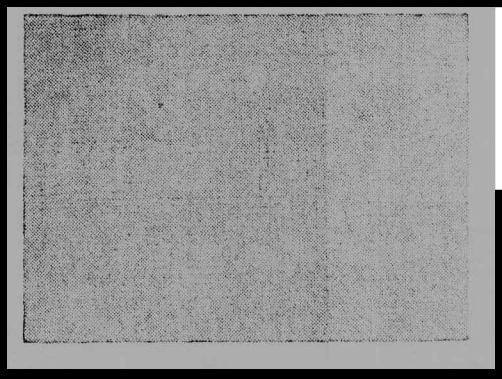
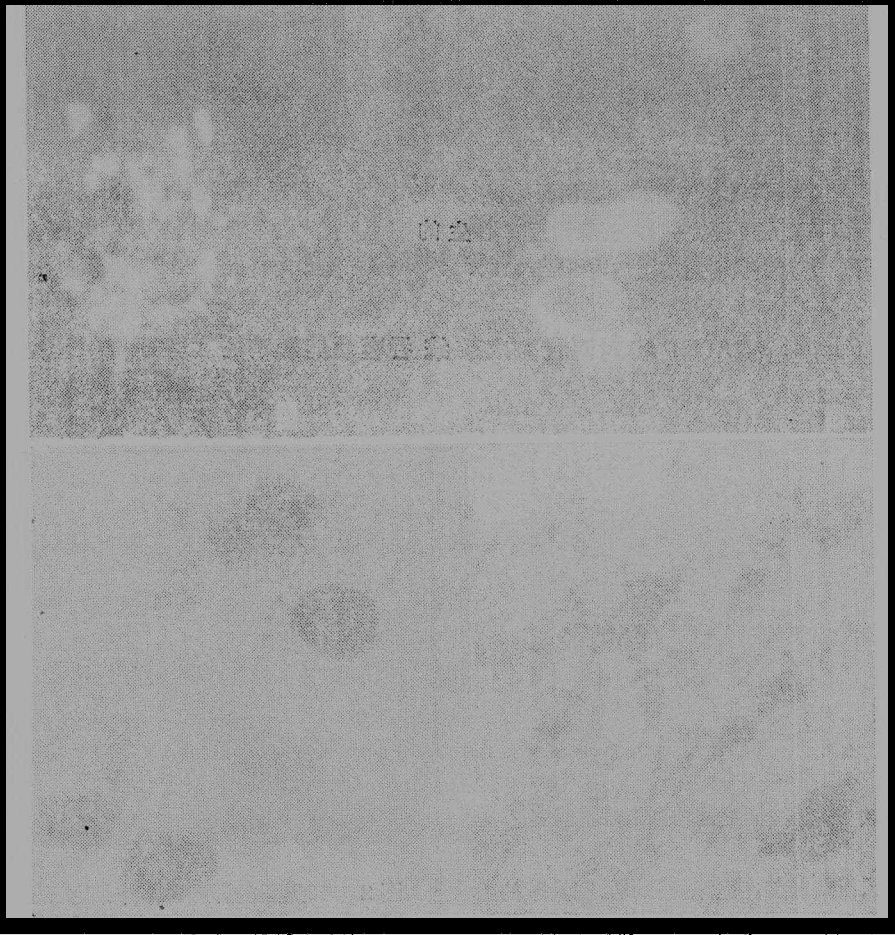
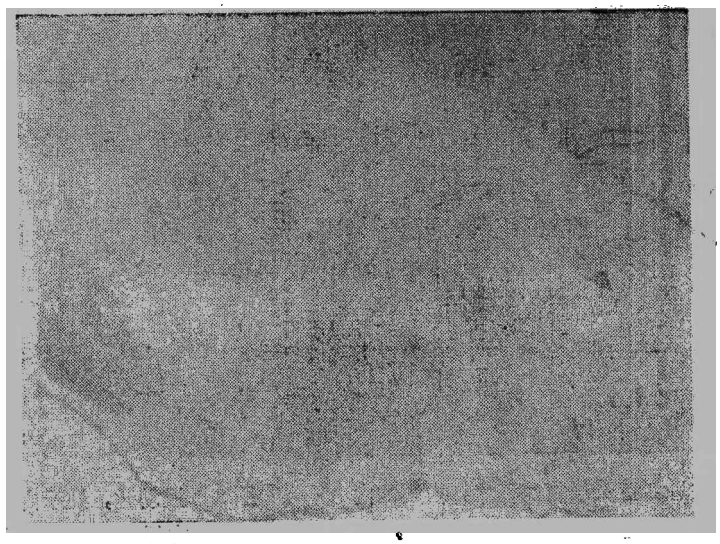


图 3　6天组的脾脏，脾窦内有成片的泡沫细胞，吞噬炭末较小，主要见于脾索中。HE×100

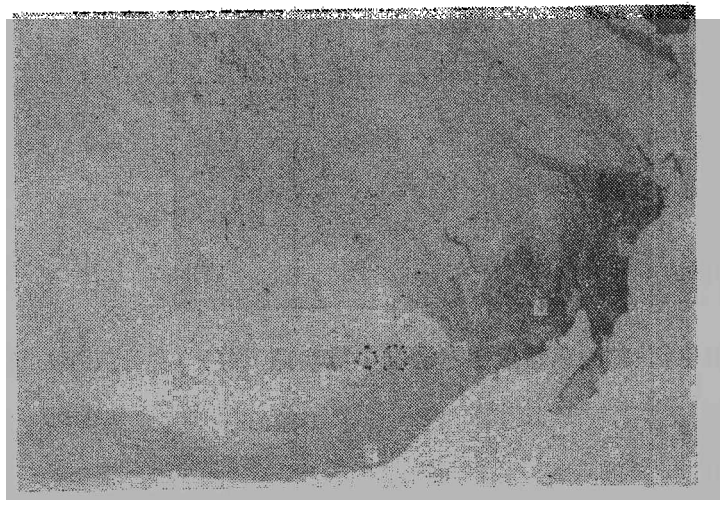


图一　小白鼠死后在脑神经连脑处断端涂HRP，标记到的有关脑神经核细胞。A.动眼神经核，暗视野，低倍；B.三叉神经中脑核，暗视野，高倍；C.三叉神经中脑核，明视野，450倍，可看到标记颗粒显示的中脑根纤维；D.面神经核，明视野，410倍，一些细胞的突起也显现出来。

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



图二、小白鼠右耳后面神经断端活体涂HRP，左三叉神经根死体涂HRP在脑干切面上所标记到的结构：1.三叉神经脊束和伸向脊末核中的网络；2.三叉神经中脑核；3.外展神经核及其发出的根纤维；4.右侧面神经核；5.右侧面神经膝及膝外段纤维；6.血管。



图三、小白鼠三叉神经根断端死后涂HRP，在脑干切面上所看到的标记的结构：1.位听神经根；2.蜗腹核；3.前庭神经纤维；4.三叉神经脊束；5.面神经根；6.外展神经核；7.斜方体，其上方有HRP的扩散，上橄榄核群一些细胞也有标记；8.交叉到对侧的斜方体纤维。

（此例在三叉神经根断端给药时，损伤了脑干表面的斜方体纤维）

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