DOI:10.16016/j.1000-5404.1982.01.021

技术与方法

在面神经干应用辣根过氧化物酶四种方法的比较

解剖教研室 张宗铭 许 健 徐敢熊

自 Kristensson[1] 开创应用辣根过氧化物酶（HRP）于神经系统的研究中并首先应用于周围神经系统以来，HRP在周围神经的应用，大多为将HRP注射于神经元的终末部位。例如 Kristensson 将 HRP 注射于舌肌；Brownson[2] 注射于交感神经节；李继硕[3] 注射于膀胱；山田[4]、陶之理[5]注射于胃等。在周围神经干中直接给以 HRP 的报告并不多见。

De Vito[6]、高桥杏三[7]、山本悌司[8]将切断的神经断端浸泡于橡皮小袋装的HRP 水溶液中；Light[9]将HRP挤入脊神经前根中；许鹿希[10]将HRP注射于舌下神经干中；Hutson[11]、江畑宪明[12]将 HRP 的干粉直接涂于神经断端，都得到了阳性结果。但究竟那一种方法效果最好，缺少比较资料。我们在面神经核的研究中，对在面神经干应用HRP的几种方法，进行了比较。

材料和方法

用成年大白鼠18只、成年小白鼠 4 只，其中有 6 只大白鼠两侧都做，共计28例。动物用戊巴比妥钠腹腔麻醉，在耳后处切开皮肤，找出面神经主干和耳后支。分成四组，用不同的方法给HRP。第一组10例。将面神经主干和耳后支在距茎乳孔 1 厘米处剪断，装入自制的乳胶小管中，注入30% HRP（Sigma Ⅵ型）10微升，再将末端扎紧。第二组 5 例。将剪断的面神经主干和耳后支的断端用线扎牢，装入自制的乳胶小管，将线固定在小管壁上，防止神经滑出，管内也注入 30%HRP（Sigma Ⅵ型）10微升，末端扎紧，并将神经用细血管钳夹三次。第三组作 3 例。将解剖出的面神经干，保留于原位，用 120 微米微玻管或 4 号皮试针头注入 30%HRP（Sigma Ⅵ型）7 微升，注射后用细血管钳夹三次。第四组10例（其中有小白鼠 4 例）。用 1 毫克 HRP（Sigma Ⅵ型）的干粉或配成糊状，直接涂在面神经主干和耳后支的近侧断端，每隔10分钟涂一次，共涂三次。操作中随时用棉球吸去手术区的组织液，并使神经断端离开周围组织，以免组织液将 HRP 稀释。

以上各例均存活2天。在麻醉下大白鼠经升主动脉插管、小白鼠经左心室插管，用0.1M磷酸盐缓冲液（pH7.4室温）冲洗；再用 0—4 ℃的 3 %多聚甲醛和 1.25%戊二醛的 0.1M磷酸盐缓冲液灌流固定。立即取出脑干和面神经再放入上述固定液中5—6小时，入 5 %蔗糖磷酸盐缓冲液中，在冰箱中留置 1—2 天。作冰冻连续切片，厚40微米。用 Mesulam(76)[13] 联苯胺蓝色反应成色。每隔一片取一片，铺成两套连续切片，其中一套用中性红复染。在光镜下用明、暗视野进行观察。

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

结　　果

四组材料中，面神经核的细胞被标上者，第一组有4例，占40%；第二组有2例，也占40%；第三组有2例，占66%；第四组有8例，占80%。标记到的细胞有浅标记细胞，细胞体和突起内标记颗粒清楚，核区清晰明亮。在明视野显微镜下见标记颗粒大小不等，呈蓝色；在暗视野显微镜下为一个个发光的亮点。标记细胞中也有中度标记细胞，在明视野镜下见颗粒粗大，显色较深、较重，且有部分颗粒重叠融合在一起，核区依稀可见；在暗视野镜下颗粒不易分辨。另一类标记细胞为深度标记细胞，在明视野镜下见标记细胞呈深蓝色，颗粒重叠融合在一起，充满整个胞体和突起，核区全被遮盖。在暗视野镜下，标记颗粒不能分辨，每一标记细胞，就是一个亮区。

在四组材料中，以第四组标记效果最好，在面神经核中部切片，一片约有标记细胞70—80个，最多者一片高达132个。且有半数为深度标记细胞（图1、图2），也有中度和浅标记细胞。其中有3例肉眼即可清楚地看到面神经核被标记的区域，呈深蓝色。有2例小白鼠材料，面神经髓内段被标记，其中1例髓内段全长都被标记。在明视野镜下见大部分纤维都有HRP颗粒，呈念珠状（图3），在暗视野镜下为一条条断续的亮线。

第三组标记的也不错，2例阳性材料中，1例标记的很好，肉眼即可看到面神经核被标记的区域，呈深蓝色。标记细胞计数，一片最多者也有130余个，和断端涂HRP者一样，也是以深度标记细胞为主（图4）。但在片中未见到标记的面神经髓内段纤维。1例标记稍差，一片约有标记细胞30余个，且以中度和浅标记细胞为主。

四组材料中标记较差的是第一组（图5）和第二组（图6），这二组标记的情况差不多。在面神经核中部切片，一片有标记细胞30个左右，最多者一片有80余个。标记细胞半数为浅标记细胞，也有中度标记和深度标记细胞。

讨　　论

四组材料中出现的标记细胞有浅标记细胞、中度标记细胞和深度标记细胞。和Keefer[14]描述的颗粒型HRP神经元、颗粒弥散型HRP神经元和弥散型HRP神经元形态一致。Keefer还用其他牌号的HRP做出像高尔基法所显示的神经元那样的实体型HRP神经元，在我们的材料中没有看到。

在面神经断端直接涂HRP的材料中，有2例小白鼠材料还标出了面神经髓内段纤维。Hedreen及McGrath[15]认为HRP可进入注射区附近的正常或过路纤维，但大部分在24小时内消退。Hedreen还注意到有一部分着色很深的纤维保留了下来，并在同一区域用Fink-Heimer方法染出了溃变纤维，他认为着色很深的纤维可能是受伤的纤维。我们所标记的纤维可能也属于这种情况。我们[16]曾将HRP涂在死后动物的神经断端也标记出了神经纤维和神经细胞体，并且着色很深。为什么受伤纤维和死后纤维能被HRP标记，是否是因为受伤和死后的纤维，对异体蛋白排除机能受到影响或消失的缘故。

在四组材料中，以第四组神经断端直接涂HRP的方法最为简单，阳性率高，标记细胞也多，每1例动物仅用HRP 1毫克，较其他三种方法所使用的HRP都少，而且大支、小支都易

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

涂上，效果可靠。在神经干注射HRP，虽然标记的细胞也多，但小支不易成功，不若神经断端涂HRP手续简单，效果可靠。第一组神经断端浸泡HRP和第二组损伤神经浸泡HRP，效果较上述二种要差，而且操作不易掌握，乳胶管口大时容易漏HRP，口小时压迫神经；第一组材料，神经易从管中滑出；第二组材料由于神经外膜损伤较少或没有损伤，标记可能受到影响。Shathareerarappa[17]认为周围神经系统有它自己的“屏障”，此屏障由一层多形鳞状上皮层组成，包绕神经干并延至末梢。这种方法神经外膜仍存在，可能会阻挡HRP进入。Krishnan和Singer[18]认为在周围神经，经过较长时间浸泡，HRP可以进入神经纤维，在Ranvier氏结处更易进入。但我们浸泡的面神经蒂仅有1厘米长，可能不会起很大作用。

在手术区溢出的HRP会不会混染其他结构，而出现不应有的标记神经元。Light[9]将HRP挤入神经干后，要吸去周围多余的HRP，并用盐水将神经洗净，以防止混染其他结构。我们在死后动物神经的标记中曾见到混染附近脑组织和损伤的神经。这四组材料中也有溢出的HRP，考虑到附近没有其他神经，由肌肉和血管中进入的可能性也很小。在操作中没有用盐水冲洗手术区。在观察切片中，曾仔细检查过其他一些核群，都未发现有标记细胞。

在周围神经干的断端直接给HRP，标记的细胞多，此法也可应用于中枢神经系统。Griffin[19]曾将带HRP的缓释胶放在脊髓传导束的切断处，得到满意结果。在神经元的末梢部位注射HRP，标记细胞较少，许鹿希[10]将HRP注射于舌下神经干的材料和注射于舌肌的材料进行对比，认为注射于神经干者较注射于舌肌者易于成功，且标记的细胞也多。我们曾将HRP注射于上颌鼠须处的皮下组织中，仅在面神经核和三叉神经节处见得少量标记细胞。看来在周围神经干使用HRP具有效果好，用量省的优点。在周围神经的研究中，如能解剖出神经干或分支，而将其切断涂HRP，效果当较注射于肌肉或器官者为好，而且操作简单，使用HRP的量也少。

小　结

在面神经干应用HRP的研究中，将28例动物分成4组，在同样的实验条件下，使用4种不同的应用HRP的方法，希望找出最佳的效果和最简便的方法。

第一组材料是将面神经剪断浸泡在HRP水溶液中；第二组材料是将面神经用血管钳夹伤，浸泡于HRP水溶液中；第三组材料是将HRP水溶液注射于面神经干中；第四组材料是将HRP的干粉或浓溶液直接涂在面神经干的断端。

四组材料中，以第四组效果最好，成功率高，大、小支神经均可使用，而且操作简单，HRP的用量也省。

（糜建红同志参加全部技术工作）

参 考 文 献

1. Kristensson K, et al, Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve. Brain Res 32:399,1971

2. Brownson RH, et al, Intraxonal transport of herseradish peroxidase in the sympathetic nervous system. Brain Res 120:407,1977

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

3. 李继硕等：家兔膀胱传入神经的节段性分布——辣根过氧化物酶（HRP）法研究。解剖学报 11:378,1980

4. 山田功：内脏を支配する知觉神经细胞と交感神经细胞の所在について，HRP法にする研究 解剖学杂志 53:386,1978

5. 陶之理等：胃交感传入神经元的节段性（HRP法的研究） 四川解剖学杂志 2:21,1981

6. De Vito JL, et al: Uptake and transport of horseradish peroxidase by cut end of vagus nerve. Brain Res 82:269,1974

7. 高桥杏三等：ネコの颈髓における nucleus phrenicusの HRP 法による 同定. 解剖学杂志 54:61,1979

8. 山本悌司等：脊髓后根に远心性运动性线维は存在するガ？ 脑と神经 30:929,1978

9. Light AR and Metz CB: The morphology of the spinal cord efferent and afferent neurons contributing to the ventral roots of the cat. J Comp Neur 179:501,1978

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

11. Hutson KA, et al: Accessory abducens nucleus and its relationship to the accessory facial and posterior trigeminal nuclei in cat. J Comp Neur 188:1,1980

12. 河畑宪明：うツトとアヒルにあける 三叉神经节の区分について 解剖学杂志 55:278 1980

13. Mesulam MM: The blue reaction product in HRP neurohistochemistry: incubation parameters and visiblity. J Histochem cytochem 24:1273,1976

14. Keefer DA: Horseradish peroxidase as a retrogradely trasported detailed dendritic maker. Brain Res 140:15,1977

15. Hedreen JC and McGrath S: Observation on labeling of neuronal cell bodies, axons and terminals after injection of horseradish peroxidase into rat brain. J Comp Neur 176: 225,1977

16. 许 健等：辣根过氧化物酶在动物死后神经组织中之传播。第三军医大学学报 4:26,1981

17. 引自 5

18. Krishnan N and Singer M: Penetration of peroxidase into peripheral nerve fibers. Am J Anat 136:1,1973

19. Griffin G, et al: HRP pellets and slowrelease gels: two new techniques for greater localization and sensitivity. Brain Res 168:595,1979

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

在面神经干应用辣根过氧化物酸四种方法的比较（正文见第83页）

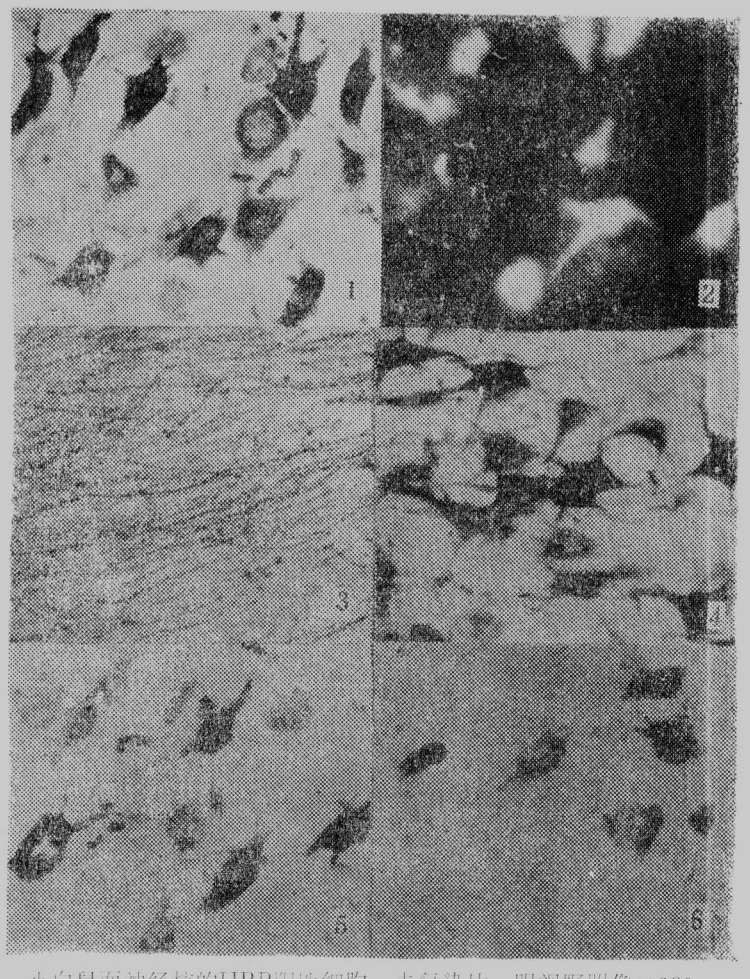


图1。 小白鼠面神经核的HRP阳性细胞，未复染片。明视野照像×320

图2。 大白鼠面神经核的HRP阳性细胞，未复染片。暗视野照像×360

图3。 小白鼠面神经髓内段纤维，未复染片。明野视照像×320
（图1—3均为神经断端直接涂HRP法）。

图4。 大白鼠面神经核的HRP阳性细胞，神经干注射HRP法，未复染片，明视野照像×320

图5。 大白鼠面神经核的HRP阳性细胞，神经断端浸泡HRP法。未复杂片，明视野照像×320

图6。 大白鼠面神经核的HRP阳性细胞，损伤神经浸泡HRP法。未复杂片，明视野照像×320

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