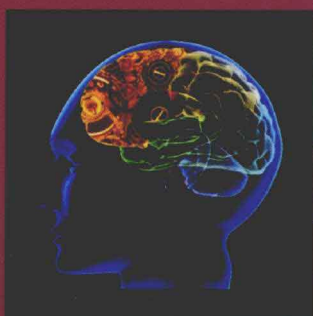


高等医药院校教材
供基础、预防、临床、口腔医学专业用

神经科学基础 实验指南



SHENJING KEXUE JICHU SHIYAN ZHINAN

主编 李云庆



第四军医大学出版社

高等医药院校教材

供基础、预防、临床、口腔医学专业用

神经科学基础实验指南

主 编 李云庆

编 者 (按姓氏笔画排序)

王亚云 王智明 冯宇鹏 李 辉

黄 静 董玉琳 魏燕燕

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目 (CIP) 数据

神经科学基础实验指南 / 李云庆主编. —西安: 第四军医大学出版社, 2012. 7

ISBN 978 - 7 - 5662 - 0239 - 0

I. ①神… II. ①李… III. ①神经科学 - 实验 - 指南
IV. ①R74 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 152413 号

Shenjing Kexue Jichu Shiyan Zhinan

神经科学基础实验指南

主 编 李云庆

责任编辑 汪 英

出版发行 第四军医大学出版社

地 址 西安市长乐西路 17 号 (邮编: 710032)

电 话 029 - 84776765

传 真 029 - 84776764

网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>

印 刷 陕西金德佳印务有限公司

版 次 2012 年 7 月第 1 版 2012 年 7 月第 1 次印刷

开 本 787 × 1092 1/16

印 张 12.5

字 数 280 千字

书 号 ISBN 978 - 7 - 5662 - 0239 - 0/R · 1058

定 价 30.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

内容提要

本书是国家教育部“面向 21 世纪课程教材”和普通高等教育“十一五”国家级规划教材《神经科学基础》的匹配教材，编排顺序基本上与《神经科学基础》一致，遵循由浅入深、循序渐进的原则，由 33 个实习操作指导组成。内容主要包括：神经系统基础知识实习，神经系统的基本形态实习，神经形态学常用的研究方法实习，神经解剖学实习以及神经电生理学、分子神经生物学、动物行为学常用实验方法和技术，神经影像学基础知识。此外，在部分实习内容之后添附了作业图，供练习使用。

本书是编者长期从事教学和科研工作的结晶，具有重点突出、条理清晰、内容丰富、图文并茂、可操作性强等特点，可供高等医药院校基础、预防、临床、口腔医学专业以及高等院校生命科学领域相关专业的学生使用，亦可供有关专业的研究生以及从事神经科学研究的人员参考。

前 言

虽然神经科学作为一门独立和统一学科的历史仅仅 40 多年，却取得了突飞猛进、令人瞩目的发展。特别是 20 世纪后期，分子生物学技术方法日趋成熟并向神经科学领域渗透，这不但促进了研究神经系统结构和功能的不同学科相互融合，而且促使神经系统的研究深入到了分子水平。神经科学的问世，为最终揭示“智慧”如何产生这个最大的谜团提供了可靠的保证，对生命科学的发展具有划时代的意义。在 21 世纪，生命科学已成为主导学科，神经科学又处在生命科学发展的最前沿，具有无限的生命力和发展潜力。为了适应世界科技发展的形势，强化素质教育，在培养高级科学人才的高等医药院校和高等生命科学院校开设神经科学课程，是一项具有战略意义的措施。

第四军医大学人体解剖教研室早在 1989 年就将神经解剖学的教学内容从人体解剖学中分离出来，开设了 60 个学时的神经解剖学课程并编写了专门的教材。1996 年，教研室承担了教育部“高等教育面向 21 世纪教学内容和课程体系改革计划”中的“神经科学课程设置及内容改革”研究课题，根据研究课题的要求，我们又于 1997 年开设了 80 个学时的神经科学课程（2003 年增加到 100 个学时）；并受教育部委托，于 2002 年出版了李继硕教授主编的“面向 21 世纪课程教材”《神经科学基础》。经过 8 年的使用，该书得到了广大学生、教师和科技工作者的认可，为了进一步更新知识内容，跟上神经科学发展的前沿，由李云庆教授牵头，组织国内 11 所知名高等医学院校长期从事神经科学教学和研究的专家、学者于 2010 年对教材进行了修订并出版了该教材的第 2 版。本实验指南属于《神经科学基础》（第 2 版）的辅助教材。

本教材由 33 个相互独立又相互联系的实习（实验）操作组成，编排顺序与《神经科学基础》（第 2 版）一致，打破了以往的学科界限，遵循由浅入深、循序渐进、综合应用的原则。介绍的实习内容涉及神经科学的基本实验操作（如取脑和脊髓，观察其被膜、血管和外形，神经元和神经胶质细胞，传统神经解剖学研究方法），神经形态学研究的基本方法（如神经束路追踪方法、免疫组织化学技术、电子显微镜技术和原位分子杂交组织化学技术），神经解剖学的主要学习内容（如脑切片观察、传导路、脑解剖）以及神经电生理学、分子神经生物学、动物行为学等常用的实验方法。神经影像学是近年研究神经系统的最新进展，尽管在本科生学习阶段不太接触该领域，但为了保持神经科学知识体系的完整性，特别增加了第七篇，介绍神经影像学的基础理论和基本应用。

为了复习、巩固课堂上学到的理论知识，本教材还在有关实习内容之后附上了许多作业图，便于学生练习使用。本书的全部内容均是编者长期从事教学和科研工作的结晶，具有与教学内容紧密结合、重点突出、条理清晰、图文并茂等特点；相关的实习部分的示例及其操作步骤，基本上来自编者及其同事的科研工作，使用者只要根据具体学习、研究工

作的目的和要求适当改动、举一反三，就能得到预期的结果，可操作性、实用性强。需要指出的是，本实验指南所包含的实习内容较多，故对研究生的学习也比较适用，因为在本科生学习阶段不可能完成全部的操作。我们如此编排的目的是为了增加学生们的感性知识，在经过系统的理论学习之后，即使没有进行相应的实习（实验），但通过阅读有关的实习操作指导，观察相应染色的图片、电生理记录结果、电泳结果、动物行为检测结果等，也会对巩固课堂上学到的理论知识大有裨益，本书尤其适用于一些实验条件尚不能完全达到要求的高等院校。

本书的编写工作得到了本教研室全体人员的大力支持。施际武教授承担了全书的审阅工作；李金莲、武胜昔、丁玉强、贾宏阁教授，陈涛讲师为本书提供了珍贵的照片。在此，一并致以衷心的感谢。

由于我们的知识水平有限，本书中难免存在疏漏和错误之处，恳请各位前辈、同行和读者提出宝贵的意见和建议。

编 者

第四军医大学人体解剖与组织胚胎学

教研室暨梁铨璐脑研究中心

2012 年 4 月于西安

目 录

第一篇 神经系统基础知识

实习一 取脑和脊髓	(1)
实习二 脑和脊髓的被膜、血管	(4)
实习三 中枢神经系统的外形 (一) ——脊髓、脑干和小脑的外形	(11)
实习四 中枢神经系统的外形 (二) ——间脑、端脑的外形和脑室系统	(19)
实习五 神经元和神经胶质细胞	(26)
一、神经元和神经胶质细胞的分类	(26)
二、神经元的形态特征	(28)
三、感受器和神经 - 肌肉接头	(30)
四、神经纤维及髓鞘	(32)
五、突触	(34)

第二篇 神经形态学研究方法

实习六 传统神经解剖学研究方法	(39)
一、Golgi 法	(39)
二、Cajal 法	(40)
三、Nissl 法	(40)
四、Weigert 法	(42)
五、Marchi 法	(43)
六、Nauta 法	(44)
七、Fink - Heimer 法	(45)
八、H - E 法	(45)
实习七 神经束路追踪方法	(47)
一、辣根过氧化物酶法	(47)
二、菜豆凝集素法	(49)
三、生物素化葡聚糖胺法	(49)
四、荧光金法	(50)
五、荧光素双标记法	(50)
附表	(51)
表 2 - 7 - 1 常用示踪剂的特点	(51)
表 2 - 7 - 2 常用荧光素的特点	(51)

2 神经科学基础实验指南

实习八 免疫组织化学技术	(52)
一、酶免疫法	(52)
(一) PAP 法	(52)
(二) ABC 法	(52)
二、免疫荧光组织化学法	(54)
(一) 直接法	(54)
(二) 间接法	(54)
三、免疫(荧光)组织化学技术操作步骤	(55)
实习九 神经束路追踪与免疫组织化学技术相结合的双标记方法	(57)
一、HRP 逆行追踪与免疫组织化学反应相结合的双标记法	(57)
二、荧光金逆行追踪与免疫荧光组织化学反应相结合的双标记法	(58)
三、四甲基罗达明逆行追踪与免疫荧光组织化学反应相结合的双标记法——激光 扫描共聚焦显微镜观察	(59)
实习十 透射电子显微镜和免疫电子显微镜技术	(62)
实习十一 原位分子杂交组织化学技术	(65)
一、原位分子杂交组织化学技术的基本原理	(65)
二、原位分子杂交组织化学技术的操作步骤	(65)
(一) 放射性核素标记的原位分子杂交组织化学法	(65)
(二) 地高辛标记的原位分子杂交组织化学法	(67)

第三篇 神经解剖学

实习十二 脊髓切片观察	(69)
实习十三 延髓切片观察	(75)
实习十四 脑桥切片观察	(80)
实习十五 中脑切片观察	(84)
实习十六 传导路	(88)
实习十七 脑解剖	(103)

第四篇 神经电生理学方法

实习十八 神经元放电的细胞外记录方法	(107)
实习十九 神经元放电的细胞内记录方法	(111)
实习二十 神经元细胞内记录和标记方法	(113)
实习二十一 单个神经元穿孔膜片钳记录方法	(118)
实习二十二 脑(脊髓)薄片的膜片钳记录方法	(122)

第五篇 分子神经生物学方法

实习二十三 总 RNA 提取及 cDNA 的制备	(128)
--------------------------------	---------

实习二十四	PCR	(132)
实习二十五	单细胞 RT-PCR	(135)
实习二十六	凝胶回收 DNA 片段	(138)
实习二十七	DNA 亚克隆	(140)
实习二十八	质粒制备及限制性酶切分析	(143)
实习二十九	Western 印迹检测	(146)
实习三十	荧光原位杂交	(150)
实习三十一	荧光实时定量 PCR	(154)

第六篇 动物行为学方法

实习三十二	腰五脊神经结扎所致神经病理性痛模型的建立及其机械性痛敏和热痛敏的检测方法	(159)
实习三十三	高级脑功能检测方法	(163)
一、Morris 水迷宫	(163)	
二、高架十字迷宫检测	(164)	
三、旷场实验	(165)	

第七篇 神经影像学基础知识

一、计算机辅助体层摄影	(167)
二、磁共振成像	(171)
三、放射性核素断层成像	(176)
四、超声成像	(179)

第一篇 神经系统基础知识

实习一

取脑和脊髓

目的

1. 了解移取脑和脊髓的技术方法和技巧。
2. 熟悉移取脑和脊髓的一般过程。
3. 了解移取后的脑和脊髓的保存方法。

内容

脑和脊髓的移取是神经解剖学的基本操作,也是制作脑和脊髓标本的前提。移取脑和脊髓,除用一般的解剖器械外,必须备有专门的开颅工具。

一、脑的移取

(一) 固定尸体脑的移取

1. 剥离颅顶部软组织

(1) 矢状切口 自眉间向上经颅顶正中线延续到枕外隆凸,纵行切开头皮和帽状腱膜。用丁字形骨凿沿矢状切口在骨膜下向两侧钝性剥离颅顶部软组织和额肌的起点,将头皮向下翻到两侧耳根上方为止。

(2) 冠状切口 自两侧耳根上方,冠状切开颅顶部软组织,将皮瓣翻向前后。

(3) 环状切口 自眉弓及枕外隆凸上1cm处(颅顶周长最大环形线)环形切除颅顶部软组织。

2. 锯切颅骨

用锯绕颅骨于眉弓及枕外隆凸上1cm处环形锯开颅骨外板及板障,当见到锯口有染血迹的锯末出现时,立刻停锯。由于两侧颞部骨质较薄,所以不宜锯得太深。用丁字形骨凿轻轻凿开内板并将丁字形骨凿插入锯口,两手握住丁字形骨凿把手,用力扭动,揭开颅盖,此时可见覆盖脑表面的硬脑膜。

3. 暴露脑

在距颅骨锯口缘上 0.5cm 处剪开硬脑膜,并水平向后达枕部。枕部的硬脑膜应保留 1.5cm 长,防止取脑向后推压脑时,枕骨锯口缘损坏枕叶脑组织。在颅骨鸡冠处切断突入两大脑半球之间的大脑镰附着部,然后向后方轻轻揭起硬脑膜及大脑镰,此时要注意剪断注入上矢状窦的静脉和蛛网膜颗粒,避免拉坏脑组织。

4. 移取脑

自额骨后方将手指伸入颅前窝,轻轻向上抬起大脑额叶,直至见到筛板上的嗅球为止。从筛板上切断嗅丝,将嗅球和嗅束与脑一并抬起,见到视神经和视交叉时立刻停止。在视交叉的两侧可见颈内动脉,在脑底附近依次切断颈内动脉、视神经,再将脑向后托起,可见垂体及漏斗,用长柄圆刃刀,由垂体窝前方下刀切开鞍隔,挖取垂体。继续向后托起两侧的颞叶前端,暴露出大脑枕叶和小脑之间的小脑幕,沿颞骨岩部上缘切断两侧的三叉神经、展神经、面神经、位听神经及小脑幕。将头复正,项部垫一木枕,使头自然后仰,用手托住脑背面,容其向后脱出少许,用长柄刀深入脑底,依次切断舌咽神经、迷走神经、副神经、舌下神经、椎动脉等;再从脑干腹侧面将刀伸入枕骨大孔,切断脊髓上段,即可将脑取出,用流水冲洗干净备用。在取脑时,因脑髓固定硬化,切不可用力牵拉或翻动,否则极易撕断延髓与脑桥连续处和拉断脑神经根。在使用刀剪等器械时应细心准确,以免损坏脑实质,影响脑的完整性。

(二) 未固定尸体脑的移取

将新鲜尸体流水冲洗消毒后,仰卧在解剖台上,项部垫木枕,自左右耳根部向上额状切开头皮,钝性剥离颅顶部软组织并向前后翻开,其余操作步骤同上述固定尸体脑的移取。应特别注意的是新鲜脑很软,易变形和挫伤,操作过程中必须用手托扶,取出脑后应立刻用纱布包裹,悬浮在固定液中保存,以免变形。取完脑后应将颅骨复位,并缝合头皮。

二、脊髓的移取

1. 利用经过取脑、未取脑或解剖过的尸体,使其俯卧于解剖台上,然后沿背正中线上自枕骨、下至骶尾骨结合处纵行切开皮肤,将皮肤翻向两侧,分别距正中线 10cm。

2. 切除枕部、项部和背部正中线左右各 10cm 宽范围内的深层肌肉、项韧带、肋横突后韧带和横突间韧带,再用骨膜剥离器或骨凿沿棘突将骨膜向外剥离达横突和肋骨的后端。

3. 调整双刃弓锯(脊柱锯)的宽度,视椎板的宽度自上而下锯断棘突两侧的全部椎弓和骶骨的椎弓板。亦可用骨钳逐个剪断椎弓。去除棘突与椎弓,暴露出椎管内的硬脊膜和脊髓。

4. 于枕骨大孔处切断椎动脉和脊髓(已取过脑者,不需此项操作)。

5. 逐一修剪椎间孔,暴露脊神经前根和后根、脊神经节和脊神经,于脊神经节远端逐个游离和切断脊神经(根据标本所需要的内容和标本造型设计保留脊神经的适当长度)。将脊髓被膜、脊髓和脊神经一并轻轻提起,即可取出完整的脊髓及被膜。将脊髓及被膜用流水冲洗干净,保存备用。

三、脑和脊髓的保存

1. 从已经过防腐固定尸体取出的脑和脊髓,应用流水洗净凝血块和其他组织碎屑,然后放在 10% 的福尔马林内继续固定。为保证脑外形完整,在标本缸或瓶底应衬垫棉花,每瓶只能装一个脑和一条脊髓,以免互相挤压变形。另一种方法是用线穿过基底动脉,将脑悬吊在固定液内。

2. 从未经防腐固定尸体取出的新鲜脑,须用纱布包裹,瓶底衬垫棉花,然后放入 10% 的福尔马林液内固定。1 个月以上才能充分固定硬化。在此期间,根据季节气温的高低,需更换新固定液两次以上。

3. 脊髓的固定和保存,应注意将它伸展理直,如带脊神经者,也应同时加以整理修洁,一同固定在玻璃板或塑料板上,然后放在 10% 的福尔马林内固定保存。

思考题

1. 脑的移取中,需要在什么部位做哪些切口?
2. 为了避免损坏脑或脊髓,移取脑或脊髓时应注意哪些主要问题?

(王智明 李云庆)

实习二

脑和脊髓的被膜、血管

目的

1. 观察并掌握脑和脊髓被膜的构造、分布特点及其形成物。
2. 观察并掌握脑和脊髓的血管配布及其规律。

内容

脑和脊髓的表面均包有3层由结缔组织构成的被膜。脑和脊髓的血液供应非常丰富,脑由颈内动脉和椎动脉两个系统供血,脊髓的血液供应来自脊髓前、后动脉和节段性动脉。

一、脑和脊髓的被膜

脑和脊髓外覆3层被膜,由外向内依次为硬膜、蛛网膜和软膜(图1-2-1~1-2-4)。

(一) 硬膜

被覆脑和脊髓表面的部分分别称作硬脑膜和硬脊膜。质地坚韧,主要由胶原纤维组成,还含少量弹力纤维。

1. 硬脑膜

分两层:外层(骨膜层)和内层(脑膜层)。

硬脑膜的内层在一些部位折叠成板状,插在脑的一些裂隙内,形成一些间隔。如大脑镰、小脑幕、小脑镰、鞍隔等。

在硬脑膜的骨膜层和脑膜层之间,有一种特殊的静脉形式,属颅内静脉系,称作硬脑膜静脉窦,如上矢状窦、下矢状窦、直窦、横窦、枕窦、乙状窦、海绵窦等;上矢状窦与直窦、横窦或枕窦汇合形成窦汇;硬脑膜窦常通过一些导血管与颅外静脉交通。

2. 硬脊膜

只有一层,相当于硬脑膜的内层经过枕骨大孔向下的延续。硬脑膜的外层与椎骨的骨膜相当。

硬脊膜包被脊髓、前根、后根和脊神经节,向外出椎间孔后延续为神经的外膜。上端附着于枕骨大孔边缘,下端至第2骶椎平面闭合,包裹终丝形成尾韧带附着于尾骨。

硬脊膜与椎管之间的腔叫做硬膜外腔,不与颅腔相通;硬脊膜与蛛网膜之间有一潜在的窄腔,称硬膜下腔。

(二) 蛛网膜

为一层不含血管的半透明薄膜,主要由纤维结缔组织构成。其向深面伸出许多蛛网膜

小梁,连接软膜。平铺在脑和脊髓表面的部分,分别称为脑蛛网膜和脊髓蛛网膜。蛛网膜与软膜之间的腔隙较大,称为蛛网膜下腔,腔内充满脑脊液。在脑和脊髓,蛛网膜下腔较为宽阔的部位称为蛛网膜下池。

1. 脑蛛网膜

在硬脑膜窦附近,脑蛛网膜形成许多突起突入硬脑膜窦内或窦旁的外侧陷窝内,称为蛛网膜(颗)粒,这些颗粒与脑脊液回流入静脉有关。

脑蛛网膜与软脑膜之间的蛛网膜下池有:小脑延髓池(枕大池)、桥池、脚间池、(视)交叉池、四叠体池和环池等,其中(视)交叉池、脚间池和桥池又合称基底池。

2. 脊髓蛛网膜

包围在脊髓和神经根的周围,并续为脊神经外膜。

位于脊髓下端至第2骶椎平面之间的蛛网膜下池叫做终池,或称为腰池,内有马尾和终丝。

脊髓与脑的蛛网膜下腔在枕骨大孔处相通。

(三)软膜

为贴附于脑和脊髓实质表面的被膜,分别称为软脑膜和软脊膜。与脑和脊髓的实质紧密结合,并发出许多小梁伸入实质。软膜内有丰富的血管。

1. 软脑膜

与脑蛛网膜相贴,但在沟、裂处,软脑膜离开蛛网膜,伸入沟、裂深部。软脑膜包裹进入脑的血管,与血管壁之间有血管周隙。

在脑室的一些区域,脑室壁仅为一层室管膜,软膜覆盖在室管膜的表面,软膜内丰富的血管分支与上述两层膜一起凸入室腔,形成脉络丛。

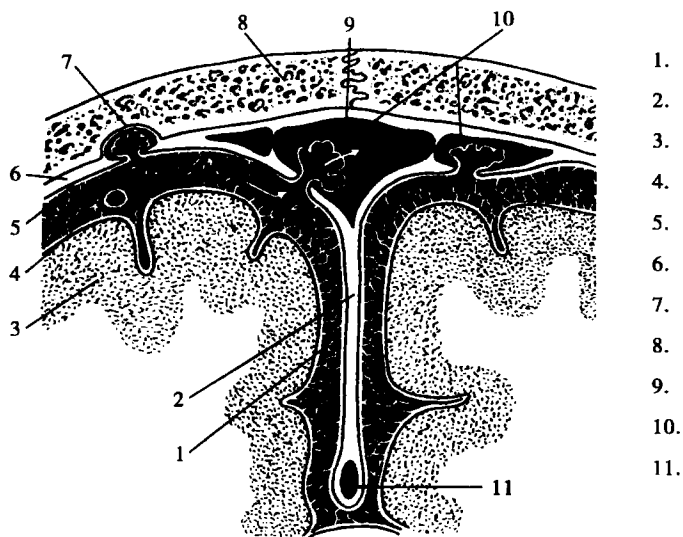


图 1-2-1 脑的被膜额状断面

箭头示脑脊液的流动方向

2. 软脊膜

在脊髓侧面前、后根之间,软脊膜形成齿状韧带。在打开硬脊膜的标本上,第1腰神经以上各节段脊神经之间,均可观察到纤细的齿状韧带。

软脊膜在脊髓末端以下参与构成终丝,浸于脑脊液内。

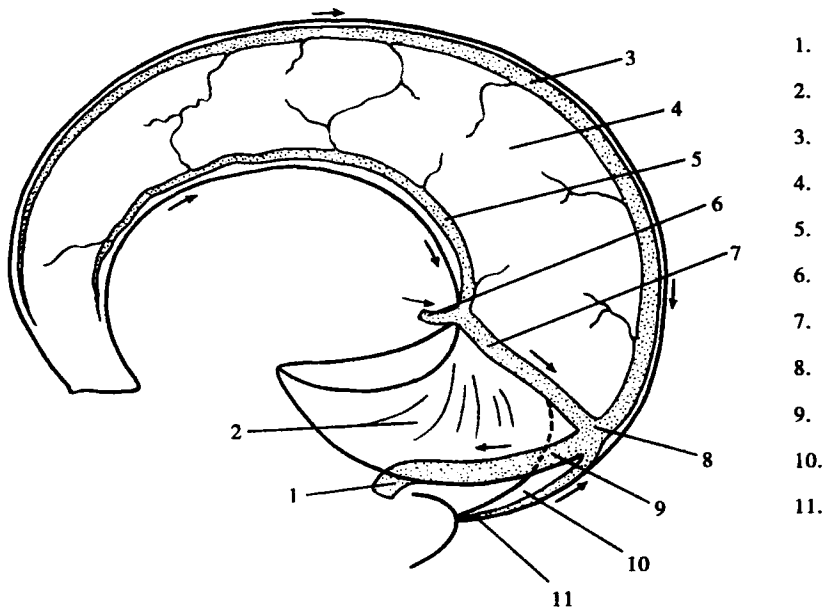


图 1-2-2 硬脑膜及硬脑膜窦示意图
箭头示静脉血的流动方向

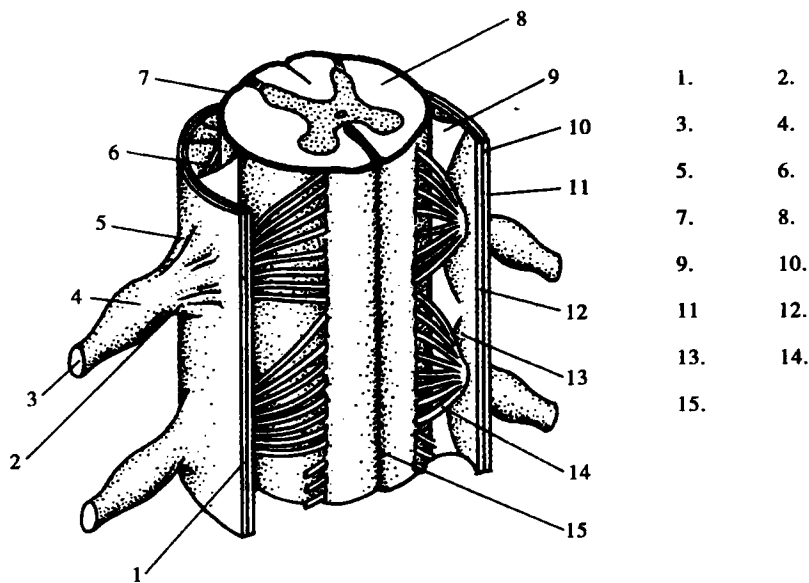


图 1-2-3 脊髓的被膜及空隙

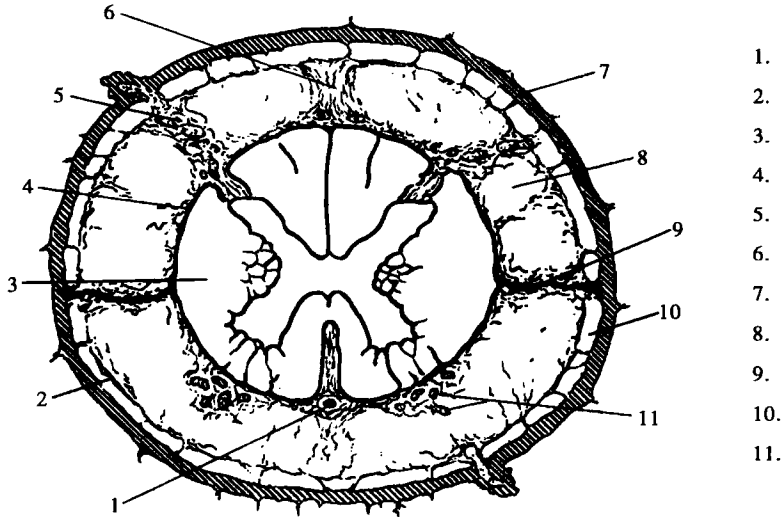


图 1-2-4 脊髓及其周围被膜的横断面

二、脑和脊髓的血管

(一) 脑的动脉

脑由两对动脉干供血:颈内动脉和椎动脉。

1. 颈内动脉

发自颈总动脉,按其行程分为颈部、岩部、海绵窦部和大脑部。颈部为颅外部,其余三部分属颅内部。颈内动脉大的分支有:

- 眼动脉
- 后交通动脉
- 大脑前动脉
- 大脑中动脉

2. 椎动脉

复习左、右椎动脉的来源、走行(联系颈部解剖),观察颅内段在脑桥下缘合成基底动脉,终支为左右大脑后动脉。椎动脉的主要分支有:

- 脊髓后动脉
- 脊髓前动脉
- 小脑下后动脉

3. 基底动脉

沿脑桥基底沟前行,其主要分支有:

- 脑桥动脉
- 内耳(迷路)动脉
- 小脑下前动脉
- 小脑上动脉

• 大脑后动脉

4. 大脑动脉环

也叫做 Willis 环。由大脑前、后动脉的近段,颈内动脉和前、后交通动脉围成(图 1-2-5)。动脉环的组成使颈内动脉与椎-基底动脉之间、两侧颈内动脉之间形成吻合。

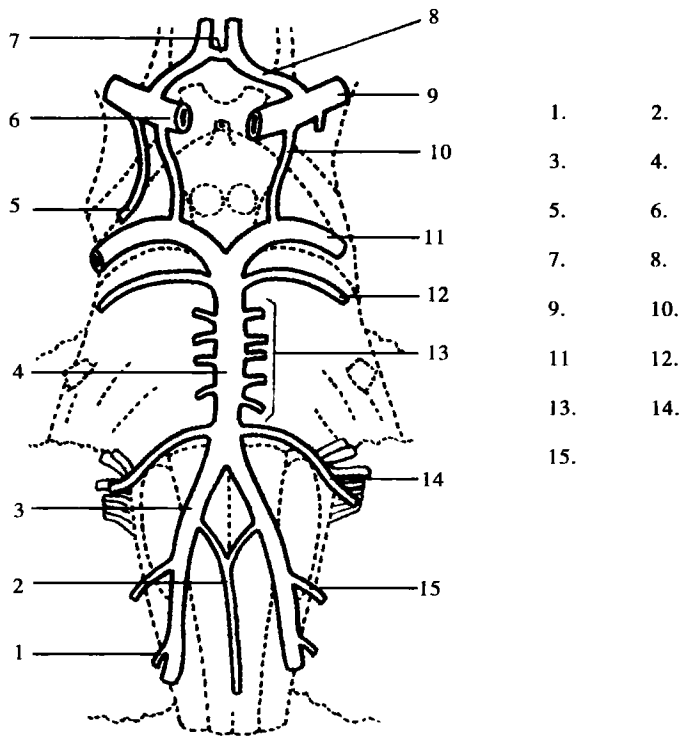


图 1-2-5 脑底大脑动脉环示意图

5. 中央动脉

在大脑动脉环以及附近的动脉段朝向脑底的动脉壁上,可见许多直角分出的细小分支,它们统称中央动脉。

(二) 脑的静脉

不与动脉同行,大的静脉由软膜内的静脉网逐级汇合,注入硬脑膜窦,然后导入颈内静脉(图 1-2-2)。

脑的静脉分为浅、深两组。

1. 大脑浅静脉

主要引流皮质和髓质浅部的血液。其主要属支有:

- 大脑上静脉
- 大脑下静脉
- 大脑中浅静脉(又称 Sylvius 浅静脉)