

神经解剖学方法

鞠躬 万选才 董新文 编著

SHENJING
JIEPOUXUE
FANGFA

人民卫生出版社

神经解剖学方法

鞠 躬
万选才 编著
董新文

人民卫生出版社

责任编辑 张之生

神经解剖学方法

鞠 躬 万锡才 董献文 编著

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里 10 号)

河北省遵化县印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 6 $\frac{3}{4}$ 印张 (插页 145千字)
1985年6月第1版 1985年6月第1版第1次印刷
印数: 00,001—10,400

统一书号: 14048·4953 定价: 2.10元

[科技新书目95—85]

序

最近十年来,神经解剖学进展很快。我国神经解剖学的发展也很迅速,从事神经解剖学研究的单位、人员不断增长,研究工作本身在深度及广度上有了显著的提高。为适应这种形势的需要,我们编写了《神经解剖学方法》一书。

这是一本实用的书,它与包罗万象的参考书不同,而是从大量的方法中选择一些目前较为常用的方法。对每一种方法作了比较详细的叙述,以便读者能用以指导操作。但它也不是一本单纯介绍操作的书。我们认为掌握一种方法,一方面需要了解具体步骤并有实际操作的经验;另一方面也必需有理论知识。因此,本书对每一种方法,尤其是七十年代以来的新技术,进行了一定的理论说明。

本书没有收入电子显微镜研究方法。因为它是一个独立的方法系统。要写成既能解决实际操作,又懂一些理论的程度,需要一本专著。免疫细胞化学方法与之类似,但考虑到此法目前应用广泛,是发展极迅速的一个方面,又经常与其他神经解剖学方法结合使用,对这种方法的基本了解似不可缺。因此,在最后一章作了免疫细胞化学法简介。

每一种方法都有各种 modifications,通常译作“改良法”。这个译名并不贴切。Modification 一词的原意中并无改“良”的意思,它仅仅说明为了某种目的对原法进行了一些改变,并不一定都比原法更“良”,常常是得之于此而失之于彼。因此本书均译为改变法。

本书的几位著者,尤其是我本人,不是技术专家,对某

些方法可能有一些经验，对另一些方法则可能经验不足。因此书中难免有不当之处，欢迎读者批评、指正。

在本书的编写过程中曾得到了宾夕法尼亚大学医学院刘占鳌教授，北京医学院许鹿希教授、刘鼎新教授及河南医学院范天生教授的许多帮助，谨致谢意。

鞠 躬

1983年7月，西安

目 录

第一章 切片的制备	1
一、固定	1
(一)固定剂溶液的配制	2
(二)固定方法	4
二、包埋	6
(一)石蜡包埋法	6
(二)火棉胶及低粘稠度硝化纤维包埋法	8
(三)明胶包埋法	12
(四)白蛋白-明胶包埋法	12
三、切片	14
(一)切片刀的选择	14
(二)刀的安置	15
(三)冰冻切片方法	16
(四)振动切片机	21
四、贴片	21
(一)粘附剂及其使用	21
(二)火棉胶及LVN ² 切片的贴片法	23
主要参考文献	24
第二章 一般染色方法	25
一、尼氏染色法	25
(一)焦油紫染色法	26
(二)硫堇染色法	29
(三)棉花青染色法	30
(四)中性红染色法	31

0036095 / 85-10-18 / 2.10元

二、髓鞘染色法	32
(一) Weigert 氏法	33
(二) Weil 氏法	34
(三) Kultschitsky 氏法	35
(四) Haggqvist 氏法	37
(五) Luxol固蓝法 (Klüver-Barrera氏法 Salthouse 改变法)	40
(六) Marchi 氏法 (Swank-Davenport 氏改变法)	42
(七) 油红染色法	44
主要参考文献	45
第三章 高尔基技术	46
一、快高尔基 (Golgi) 方法	47
二、成年动物Golgi 方法	50
1. 用福尔马林的改变法	50
2. 长期福尔马林固定的脑组织镀银法	51
3. Davenport 法	51
三、Golgi-Cox方法	52
主要参考文献	54
第四章 还原银染技术	55
一、Cajal 整块还原银染及其改变法	56
(一) Cajal 法	56
1. Cajal III 氢酒精法	56
2. Cajal III 吡啶法	57
3. Cajal VI 水化氯醛法	57
(二) Holmes 还原银染法	57
(三) Ranson 吡啶银染法	58
(四) de Castro 脱钙银染法	59
(五) Bodian (蛋白银镀染神经纤维) 法	60
(六) Rasmussen 突触前终末银染法	60

二、Bielschowsky 还原银方法	62
(一) Bielschowsky 原法	63
(二) Gros-Lawrentjew 改变法	63
(三) Marsland-Glees 方法	64
三、选择性溃变纤维银染法	66
(一) 选择性溃变银染法中的一般过程及试剂的配制	66
(二) 七种选择性溃变纤维或终末银染法的步骤	70
1. Nauta-Gygax 法	70
2. Nauta 法	70
3. Fink-Heimer I 法	70
4. Wiitanen 法	71
5. Eager 法	71
6. Kalaha-Brunst 等法	72
7. Ebbesson-Sebinson 双重镀银法	72
(三) 观察、解释 Nauta 等法溃变纤维染色的若干问题	73
主要参考文献	74
第五章 辣根过氧化物酶法	76
一、HRP 的引入	77
(一) HRP 的选择	77
(二) 酶标配体技术(受体介导吞饮“结合 HRP” 的标记技术)	79
(三) HRP 引入中枢神经系的方法	86
(四) HRP 引入周围神经系的方法	93
(五) 麻醉剂的应用	96
二、存活期	96
三、固定	97
(一) 固定剂的选择	97
(二) 灌注固定的方法	98
四、切片	99

五、组织化学反应	99
(一) 二氨基联苯胺 (DAB)法	102
1. Malmgren 及 Olsson法	103
2. Streit 及 Ruebi 法	104
3. 钴-葡萄糖氧化酶法	104
(二) 联苯胺 (BDHC)法	106
1. Mesulam法	106
2. Mesulam 及 Carson 法	107
3. 舒斯云的Riley-Marchand改变法	107
(三) 邻-联茴香胺 (OD) 法	108
(四) 四甲基联苯胺 (TMB) 法	109
(五) Hanker-Yates 氏法	112
六、结果的评定	113
(一) 有效注射范围的确定	114
(二) 过路纤维问题	115
(三) 顺行标记终枝的辨认	116
(四) 假象问题	117
(五) 阳性及阴性结果的分析	119
主要参考文献	121
第六章 逆行荧光物标记法	124
一、逆行荧光物的种类	124
二、各种荧光物标记神经细胞的特征	125
三、逆行荧光物标记神经元的实验步骤	129
四、逆行荧光标记和递质组织化学方法的结合	131
(一) 逆行荧光标记与冰冻干燥-甲醛诱发荧光组织 化学结合法	131
(二) 逆行荧光标记与 Faglu-sucrose 单胺荧光法 的结合	132
(三) 逆行荧光标记和乙酰胆碱酯酶结合法	133

(四) 逆行荧光标记和 AChE 药理学结合法	134
(五) 逆行荧光标记和免疫组织化学结合法	135
主要参考文献	136
第七章 放射自显影术	137
一、放射性示踪剂的引入	138
(一) 放射性示踪剂的选择	138
(二) 放射性示踪剂溶液的配制	143
(三) 放射性示踪剂的引入方法	144
二、存活期、固定、切片、贴片	145
(一) 存活期	145
(二) 固定	146
(三) 切片	146
(四) 贴片	147
三、涂布原子核乳胶	148
(一) 乳胶的选择	148
(二) 影响乳胶潜影形成的因素	149
(三) 涂敷液体原子核乳胶的方法	150
四、曝光	154
(一) 干燥	154
(二) 温度	155
(三) 曝光期	155
(四) 高速(闪烁)自显影	156
五、显影、定影、染色	157
(一) 显影、定影	157
(二) 染色	159
六、双标记法	160
(一) ^3H -apo-HRP 与 HRP 双标记法	160
(二) ^3H 及 ^{35}S 双标记法	161
七、结果的分析	163

(一) 有效注射范围	163
(二) 逆行标记及过路纤维问题	165
(三) 本底	165
(四) 化学显影	166
八、脱氧葡萄糖法	167
(一) ^{14}C -2DG 法	168
(二) ^3H -2DG 法	169
主要参考文献	173
第八章 荧光组织化学方法	175
一、Falck-Hillarp法(甲醛诱发荧光法, 简称 FA 法)	175
(一) 荧光反应的化学原理	176
(二) 冰冻干燥-石蜡切片法	179
(三) 震动切片-甲醛法	182
(四) 铺片法	184
(五) 涂片法	184
二、乙醛酸法 (GA法)	184
(一) 乙醛酸法的荧光反应原理	185
(二) 震动切片-乙醛酸法	185
(三) 冰冻切片-乙醛酸法	189
(四) 冰冻切片-甲醛-乙醛酸法	190
(五) 冰冻干燥甲醛-乙醛酸法	191
主要参考文献	192
第九章 免疫细胞化学法简介	194
主要参考文献	201
附录 缓冲液的配制	202
一、磷酸缓冲液	202
二、醋酸缓冲液	203
三、Tris 缓冲液	204
四、二甲胂酸盐缓冲液	205

第一章 切片的制备

一、固定

在大多数的神经解剖学技术中，需先用固定剂固定组织。理想的固定剂应能阻止组织自溶、保护组织免受微生物的侵袭，使之能承受制片过程中渗透压的改变而不造成组织像的破坏，能维持组织结构，使之正确地反映生活状态；它应能保存组织成分不被破坏或丢失，能将蛋白质、脂类及其他细胞成分聚成不溶性大分子网而又不影响其组织化学特性；它应能保存组织中酶的活性。实际上并无理想的固定剂。任何一种固定剂，都只能满足某些方面的要求，而对另一些方面不利。因此，为了不同目的就有不同的固定剂。神经解剖学技术中最常用的是醛类固定剂。醛类是一种聚合性固定剂，能交链蛋白质分子，也能在一定程度上保存脂类物质。其与蛋白质的反应受 pH 值的影响，在较高 pH 值时反应较快。作为固定剂，一般配成 pH6~8 的溶液。超出此范围时，则对细微结构，尤其是超微结构，有破坏作用。

甲醛 (formaldehyde) 是醛类中最常用者，能在许多方面满足理想固定剂的条件。通常供应的商品名称是福尔马林 (formalin)，约含 37% 的甲醛。作为固定剂，通常配成 10% 的福尔马林水溶液，也可用生理盐水或缓冲液配制，或在甲醛溶液中加入 7.5% 的蔗糖。渡边认为 10% 的福尔马林溶液太弱，20% 者较好。

多聚甲醛 (paraformaldehyde) 为甲醛的聚合物，

每一分子含 8~100 个甲醛分子，大多数含 12 个分子以上，呈白色粉末状，难溶于冷水，在热水中可解聚成甲醛单体而溶解，在接近水的沸点时溶解极快。也可溶于弱硷或弱酸中。多聚甲醛溶液实际上是新配制的甲醛溶液。

戊二醛 (glutaraldehyde) 也是一种常用的醛类固定剂，自 1963 年由 Sabotini 等人介绍用于组织固定后，普遍认为它是最好的固定剂之一，尤其多用于电子显微镜技术。它对蛋白质的交链作用较甲醛强，反应快，能较好地保存组织。虽然它对酶的破坏作用比甲醛大，但如处理恰当仍可保存相当程度的酶活性。它的缺点是对组织的穿透力弱，故常用戊二醛-甲醛（或多聚甲醛）混合液，以使穿透力较强的甲醛先渗入组织，将之初步固定，戊二醛逐渐渗入，加强固定。由于戊二醛每一个分子上有两个醛基，故常被用作在辣根过氧化物酶与抗体、麦芽凝集素等物质之间架桥的联接剂。

(一) 固定剂溶液的配制

1. 10% 福尔马林水溶液 (1,000 毫升)

福尔马林	100 毫升
蒸馏水	900 毫升

如需配制福尔马林的生理盐水溶液或缓冲液，以蒸馏水或所需 pH 及种类的缓冲液代替蒸馏水。10% 福尔马林相当于 4% 甲醛。

2. 10% 福尔马林-7.5% 蔗糖溶液 (1,000 毫升)

蔗糖	75 克
蒸馏水	900 毫升
福尔马林	100 毫升

3. Baker 福尔马林溶液 (1,000 毫升)

无水氯化钙	10 克
蒸馏水	900 毫升
福尔马林	100 毫升

4. 4%多聚甲醛溶液 (1,000 毫升)

方法一

多聚甲醛	40 克
蒸馏水 (或缓冲液)	500 毫升

在通风柜内加热使之解聚、溶解。在接近沸点时溶解极快。

蒸馏水 (或缓冲液) 加至 1,000 毫升

方法二

多聚甲醛	40 克
蒸馏水	500 毫升

在通风柜内加温至 60℃, 边搅拌边滴入 1N 的 NaOH, 直至多聚甲醛解聚溶解。

蒸馏水 加至 1,000 毫升

如需配制多聚甲醛缓冲液, 用所需 pH 值的二倍克分子浓度的 (例如欲配制 0.1M 溶液, 用 0.2M) 缓冲液来代替此步骤的蒸馏水。

⑤ 1%多聚甲醛-1.25%戊二醛 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.4, 1,000 毫升)

多聚甲醛	10 克
蒸馏水	500 毫升

在通风柜内加热溶解

25%戊二醛 50 毫升

0.2M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 加至 1,000 毫升

注意戊二醛原液之浓度。目前国内供应的多为 25% 溶液，每 10 毫升含 2.5 克戊二醛。

(二) 固定方法

人和动物死后，组织很快自溶。神经组织于死后 25 分钟，在光学显微镜下即可见有变化，因此应尽快进行组织固定。浸泡固定时，固定剂溶液的量，一般应为组织块体积的 15~20 倍以上。

如有可能，应采用灌注固定法。通常经主动脉或心脏进行灌注。经主动脉灌注更为合理，可避免回心血液与固定液的混杂。可用输液吊桶进行灌注（图 1-1）。吊桶下接橡皮管，如需观察流速可在橡皮管的中段接滴管，橡皮管的末端接套管。套管的管径随动物的大小而异，管径应尽量粗些以保证快速输入。其前端直径应较升主动脉稍细，以便较易插入升主动脉。

在吊桶内盛灌注液，排去管内的空气后夹住橡皮管（勿夹紧，容灌注液缓缓滴出，以防插入套管时气泡进入套管尖端）。

剪开已麻醉动物的左胸前壁，纵行剪开心包，充分暴露心脏。经心包横窦引过一丝线，绕主动脉及肺动脉的根部打

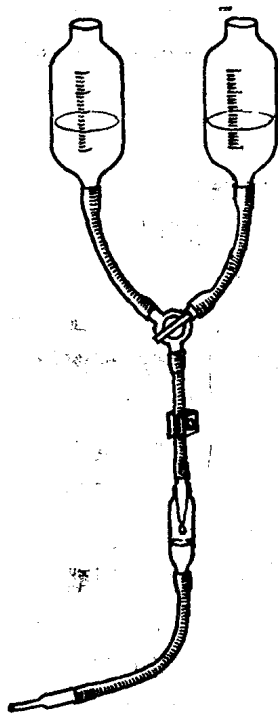


图 1-1 灌注装置

一松结。剪开左心室，将套管插入升主动脉中，但勿伸入主动脉太远。结扎固定套管并立即放松橡皮管夹子开始灌注，同时剪开右心放血。

为了减少开胸后缺氧可能造成的组织损坏，有人主张先作气管插管，行人工呼吸，然后开胸。一般情况下，如仅打开一侧胸腔且操作较迅速，多不必气管插管。

吊桶的高度应使液柱的压力与动物的正常血压相当。常用实验动物(猴、猫、兔、大鼠等)的收缩压为100~120毫米汞柱。

为了避免血凝块堵塞小血管，可在灌注固定剂之前，先用生理盐水或8.5%蔗糖溶液冲去血液。一般的原则是灌洗液的量宜少不宜多，灌洗的时间宜短不宜长。因为常用灌洗液的晶体渗透压在血管中维持不住，量多、时间长了可致组织水肿，反而冲淡其后渗入组织的固定液。因此，灌洗的流速宜大，灌洗液的量应为最小必需量。可根据从右心流出的液体的颜色来确定。如流出的液体已无色，或略带红色，即可终止灌洗而改用固定液灌注。通常灌洗一只兔需灌洗液150~200毫升，猫200~250毫升，猴300~500毫升。

灌注固定液的量至少约为动物血液量的2倍，即动物体重(克) $\times 7\% \times 2$ (毫升)。一般一只兔需300~500毫升，猫400~700毫升，猴1,000~1,500毫升。也有主张每公斤体重需多达1,000毫升者。

有人主张在开胸前5分钟按每公斤体重2,000单位(16.8毫克)静脉注射肝素以抗凝。

可在灌注前静脉注射1%亚硝酸钠或1%硝普钠(1只大鼠需1毫升)，或将之加在灌注液内，以扩张血管。如灌注液的温度及压力合适(40℃，约100~120毫米汞柱)，通常

即可保证血管充分扩张，无需注射血管扩张剂。

二、包埋

(一) 石蜡包埋法

石蜡包埋的优点是方法简便、细胞结构保存较好、可切较薄切片（一般为4~20微米）而利于分辨细微结构、适用于多种染色、易于作连续切片等。它已成为常用的包埋法之一。其缺点是：由于组织收缩较剧（约20%）、切片过程中的挤压作用、贴片时不同结构伸展不均等因素，皆可造成变形；不易作大块组织切片；由于经过脱水剂及中间剂等有机溶剂的处理，不适于显示某些组织成分及某些镀银方法等。

整个过程包括浸蜡及包埋两部分。

浸蜡

方法一

以约1cm³大小的组织块为例：

- (1) 固定后之组织块经流水充分漂洗（过夜）。
- (2) 70%酒精，4小时。
- (3) 90%酒精，4小时，可在90%酒精中留置过夜。
- (4) 95%酒精，2小时。
- (5) 100%酒精Ⅰ，2小时。
- (6) 100%酒精Ⅱ*，1小时。
- (7) 1:1的100%酒精-二甲苯，1小时。
- (8) 二甲苯，1~1½小时。

* 无水酒精中通常仍含有一定水份。100%酒精Ⅱ的含水量至少应<1%。可用无水硫酸铜吸去水分，用分子筛效果更好。每100毫升无水酒精中加12克4A型分子筛1小时以上即可。分子筛可供干再用。