

神经解剖研究

张可仁 任嘉民 编译 技术

(研究组)

译

THE RESEARCH

TECHNIQUES

OF EUROPEAN

西安医学院人体解剖学 322.8
Z2

神经解剖研究技术

(西安医学院人体解剖教研组)

张可仁 任惠民 编译

序 言

神经解剖学在人体解剖学中居很重要的地位，但是从对神经系统的认识来说却是很不够的。决定对神经系统认识的主要问题是研究方法问题。已往研究神经系统除用断面及剥制的方法以外，就是切片染色，或是用实验的方法，切断或损毁神经系统某一个局部来染色观察神经细胞和神经纤维的变性。目前大部分神经解剖学的认识都是这样得来的。

除上述传统的研究技术以外，近数十年在神经系统的研究方面又出现了荧光技术、放射性自显影技术及辣根过氧化物酶技术等，特别是电子显微镜技术的出现，对神经系统研究的发展如虎添翼，带来了新的飞跃。

我们教研室因工作需要由张可仁、任惠民二位同志收集国外资料编译了这本神经解剖学研究技术，供教师、研究生及技术人员学习使用。这些资料是各该作者的经验结晶，可以参考但也不一定全面。事物的发展是无穷尽的，从不同角度看来，各种方法均有利弊，只有经过实践的检验才能有深刻的体会。

因工作需要促其尽快复印，如有不足之处待今后继续修正，也希同志们多多帮助。

西安医学院解剖学教研室 张怀瑀

目 录

序言

神经组织的一般认识和技术.....	(1)
神经系统的变性.....	(1)
灌注、取脑和眼球摘出.....	(3)
固定技术.....	(6)
固定液和灌注液.....	(6)
显微镜玻片和粘片液.....	(8)
冰冻切片.....	(9)
包埋技术.....	(10)
蛋白明胶包埋.....	(10)
火棉胶和低粘度硝化纤维素的制备.....	(11)
火棉胶包埋.....	(13)
热火棉胶技术.....	(15)
低粘度消化纤维素 (LVN) 包埋.....	(15)
火棉胶和硝化纤维素组织切片.....	(17)
石蜡包埋、切片与裱片.....	(18)
染色技术.....	(20)
脑大体标本染色.....	(20)
普通切片染色方法.....	(21)
苏木素范吉逊染色.....	(22)
马洛里磷钨酸苏木素 (PTAH) 染色.....	(24)
焦油坚牢紫染色.....	(26)
perls铁反应中性红染色.....	(27)

Baggquist染色	(30)
Luxol坚牢兰“G”染色	(33)
Weil染色法	(36)
显示神经组织的银染改良法	(39)
使用亚铁氰化钾的神经组织浸银法	(40)
四氧化钼周围神经染色法	(41)
高尔基法	(42)
高尔基——考克斯法	(43)
高尔基——考克斯法的钨酸盐改良法	(44)
视网膜染色法	(48)
对视网膜色素的漂白	(51)
用焦油坚牢紫进行整体视网膜染色	(51)
变性纤维的银染色法	(52)
Nauta银染法	(53)
改良 Nauta-Gygax 法	(57)
增强原始Nauta法在终末轴突变性浸银中的 可靠性	(58)
石蜡切片中溃变纤维选择性镀银法	(60)
变性轴突及扣结银染法	(61)
猴中枢神经系统内变性轴突和轴突终末的 选择性银染法	(63)
简化Nauta法	(65)
Nauta—Gygax 镀银切片焦油紫复染法	(66)
正常神经组织和变性神经组织的改良 Glees 浸银法	(67)

追踪溃变神经纤维及其终末的冰冻切片	
改良浸银法	(69)
变性神经纤维的新镀银法	(72)
荧光组织化学技术	(75)
甲醛蒸气诱发荧光组织化学技术	(75)
单侧横断法追踪去甲肾上腺素细胞投射道	(76)
追踪去甲肾上腺素细胞投射道的 6-羟基多巴胺注射法	(76)
用高镁离子低酸硷度改进的FA, GA荧光组织法	(77)
含儿茶酚胺感觉神经元的组织荧光的诱发和鉴别	(80)
逆行荧光双标记法	(81)
关于甲醛和乙醛酸荧光组织化学方法对单胺类敏感性因素的新观点	(83)
放射性自显影技术	(84)
放射性自显影的组织切片法	(84)
³ H脯氨酸和 ³ H亮氨酸放射性自显影	(92)
放射性自显影的冰冻干燥切片法	(93)
中枢神经系内放射性物质在神经元之间的传递	(98)
辣根过氧化物酶技术	(99)
辣根过氧化物酶追踪法(兰色反应)	(99)
辣根过氧化物酶追踪法(棕色反应)	(101)
HRP通过神经断端的吸收和传递	(102)
HRP在自主神经周围部的逆行轴突传递	(103)

HRP 和 ARG联合追踪法.....	(106)
HRP 神经组织化学中兰色反应的孵育参数	(108)
DAB加强法.....	(110)
辣根过氧化物酶的慢速传递.....	(111)
不经固定的辣根过氧化物酶改良法.....	(112)
辣根过氧化物酶追踪法 (绿色反应)	(114)
HRP 绿色反应改良法	(117)
辣根过氧化物酶四甲基联苯胺法 (TMB法)	(118)
示踪物质离子透入法.....	(120)
缓冲液的配制.....	(120)
醋酸缓冲液.....	(123)
磷酸缓冲液.....	(124)
二甲胂酸盐缓冲液.....	(125)
枸橼酸盐缓冲液.....	(125)
TRIS—盐酸缓冲液	(126)
参考文献.....	(128)

神经组织的一般认识和技术

神经系统的变性

(Mitchell Glickstein)

神经元具有长的突起，各种各样的因素，例如病毒、缺氧或外伤都可能影响到神经细胞体及其突起，引起变性。典型的是在横断神经突起之后进行变性的研究。

I. 周围神经Waller氏变性

当周围神经纤维被切断之后，其远侧段发生Waller氏变性，其特点是：

1. 髓鞘断裂，
2. 轴突本身破碎，
3. Schwann氏细胞增殖，
4. 吞噬细胞侵入神经。

切断处的近侧，神经纤维至少变性到第一个Ranvier氏结。在神经切断端之间有Schwann氏细胞增殖。这些细胞可以很快地在中枢端及周围端之间的裂隙中搭桥。

II. 神经元胞体内的退行性变化

染色质溶解的特点：

1. 尼氏体（粗面内质网）溶解。尼氏体裂解成许多细小而染色浅的颗粒。
2. 细胞核移至细胞周围，典型的是远离轴突。

3. 随着周围神经成功的再生可能恢复尼氏体正常的染色特性。

III. 中枢神经内的变性

中枢通路切断之后发生同样的一系列的变性。但不像周围神经那样，其突起甚至在细胞染色质溶解后还能再生，而哺乳类的中枢神经系统，神经元的主突起切断之后变性经常是完全的，不可逆的。

A. Waller氏变性：

1. 如果一个传导束包着髓鞘，而且在行程中纤维很集中，就能简单地用传统的髓鞘染色法，例如Weigert, Weil Nissl染色法。根据这种变性纤维不能深染的特点来研究它，在这些变性传导束的区域有致密的胶质细胞增生。髓鞘消失的最好的例子为中央前回或内囊陈旧性损伤的锥体束。

2. 中枢神经系统内Waller氏变性的解剖学重要性：神经系统内的大多数连系不能用粗糙的剥离解剖方法去追踪。因此需要用在神经系统进行小的损伤的实验性解剖技术，观察神经系统内的变性以证实其连系。March氏法染髓鞘的变性产物并用以追溯中枢传导束的主要起源和终末。然而无髓纤维染不出来。Nauta技术及其许多改良法应用后，可以染出较细的变性轴突。

B. 中枢神经系统退行性变性的解剖学重要性：

破坏一个系统的主要传出纤维，然后观察其起源核团的退行性变化（染色质溶解、胶质细胞增殖）来研究核群之间的联系，这是常用的较简单的方法。最有效的是用于中枢神经系统追踪丘脑——皮质的联系。例如损毁了视觉皮质，在

外侧膝状体就出现变性。

C. 特殊情况的超神经元萎缩:

例如视神经束损伤后外侧膝状体核内细胞发生皱缩。从解剖学方面来说,这对建立一侧视网膜到外侧膝状体的板层和局部的联系有用处。

灌注、取脑和眼球摘出

(Mitchell Glickstein)

灌注的目的是从血管里除去血液而代之以固定液。这种固定液可以在一瞬间杀死动物并固定组织。用同一种液体既杀死了动物又固定了组织,良好地保存了组织使之能得到最清晰的组织学图象。

在血管系统置换液体方面有两个主要有关的变量要考虑:

1. 液体的渗透压。

2. 灌注的压力。

对哺乳类来说第一种液体一般是0.9%的盐水,这基本上与血液的渗透压相当。第二种接着是固定液。流体静力压不应与动物本身血压差别太大。可以用简单的改变液柱的高度的办法来调整,使其稍高于动物的血压。

液柱太低时,则压力低,结果通过血管的流量少;液柱过高时,压力太高结果组织出现假象。大约高出心脏上方75 cm对大多数实验动物是合适的。

对常规的灌注来说,最容易的方法是打开心室中较大的左心室,通过右心房回流。这样循环的液体通过体循环而不

经过肺脏。如果液体不多，可以在中胸部夹住降主动脉。

操 作 步 骤

动物首先是用过量的戊巴比妥(Pentobarbital)麻醉，每公斤体重40mg，腹腔内注射。在几分钟之内动物呈深麻醉状态。这时还可以给动物1ml肝素(Heparin)溶液。把动物放在水槽里，摆好适当的体位，然后在胸部沿中线切开。胸部从颈往下到膈以下用骨剪广泛打开，并把牵开器放到切口的边缘。用剪子剪开心包，暴露心脏，用镊子紧紧钳住。在心尖处用锋利剪刀剪开心肌，但不要剪开心室腔。把套管通过心肌切口插入心室内，轻轻地通过半月瓣伸入主动脉起始部，然后在主动脉处或心脏处结扎，也可用血管钳夹住，以防灌注液溢出。灌注开始切开右心房放出静脉血。在灌注盐水前，排出管道中全部气体是很重要的。灌注前还要冲净管中残留的福尔马林，因管中福尔马林会过早凝血和减低灌注液流速。

当右心房流出的液体变为清亮时，灌注液可由盐水换为福尔马林(Formalin)，对一般组织处理以中性福尔马林最好。Nauta溃变法酸性福尔马林是更可取的。福尔马林灌注1—2秒钟后，将引起明显和广泛的肌肉收缩当足够量的福尔马林流经血管后，停止灌注并取脑。可先把头和脊柱断离，取脑时先切掉颅周围的软组织和肌肉，用咬骨钳小心地咬去颅骨暴露整个大脑背侧半、小脑和脑干。在猫，颅骨延伸到枕叶和小脑之间的深裂缝中此即小脑幕。此时可见硬脑膜包着整个脑，不管是硬脑膜还是枕叶和小脑之间的膜性小脑幕和两半球之间的大脑镰都必须切掉，去除硬脑膜以后，

脑即暴露清楚，逐个切断脊神经和脑神经之后，即可取出。从脊髓终端开始取出更好。当你切断脑神经时，试着鉴别它们是很有用的。对于想保存完整的脑来说必须特别注意颅骨最前部，此部包着嗅球，不然嗅球将被破坏，甚至也要特别注意保存完整的垂体，在大多数灌注和取脑过程中，脑垂体在垂体柄处被切断。然而，如果颅骨在腹侧面首先用咬骨钳去掉，并且在解剖显微镜下咬去蝶鞍，保存完整的垂体是可能的。同样地，其他的附属部分给以足够的注意，也可能得到保存。例如，通过视神经孔解剖出视神经和保存眼与脑的连接也是可能的。为了保藏，浸泡组织块的固定液容量至少为组织块的四倍。

眼的摘除

当动物在深度麻醉情况下，灌注盐水福尔马林以前把眼球剝出。为了随后在包埋时迅速定位，首先在眼球的顶部，用细手术针在巩膜角膜边缘处穿过巩膜做一个无创伤的丝线缝合以标出垂直子午线的位置。近上、下睑缘处作一与之平行的切口，用钝解剖法延伸这二个切口，小心保留围绕眼球的结合膜，用镊子或大的夹子夹住眼睑。把眼球外拉看清眼外肌并切断。如果结合膜被小心地保留下来，随后切断眼球和视神经的连接处并切断眼动脉。仅通过眼睑切缘夹住眼球，并立即放入固定液内。假如取下的眼球比鼠眼球大，在摘出眼球后立即注射固定液是可取的。沿水平子午线在巩膜角膜缘处，用一个小的解剖刀刺入玻璃体，在眼球的另一侧用注射器和18号注射针头缓慢注入20—50ml Heidenhain氏液加苦味酸(Picric acid)固定液(见后)。这种方法对于保

持视网膜的连续附着是最成功的。然后把眼球置入一瓶固定液内。根据眼球大小固定8—24小时，为了好拿，很小的眼球可放到组织包埋器内直到角膜、晶状体和玻璃体被取出时为止。

固 定 技 术

(Eileen laboastere)

固 定 液 和 灌 注 液

生 理 盐 水

氯化钠溶于蒸馏水

哺乳动物	0.9%	9 gm/1000ml
鸟	0.75%	7.5gm/1000ml
蝶螈	0.8%	8 gm/1000ml
蛙	0.64%	6.4gm/1000ml

10%福尔马林

甲醛 (Formaldehyde)	100ml
蒸馏水	900ml

10%盐水福尔马林

甲醛	100ml
生理盐水	900ml

10%缓冲中性福尔马林 (Lillie氏)

磷酸二氢钠(Sodium phosphate, monobasic)	4 gm
磷酸氢二钠(Sodium phosphate, dibasic)	6.4gm
甲醛	100ml
蒸馏水	900ml

Baker氏福尔马林——钙

10%氯化钙 (Calcium chloride) (无水)	100ml
(10gm/100cc蒸馏水)	
甲醛	100ml
蒸馏水	800ml

糖 福 尔 马 林

(Fink, R. P. L. Heimer, 1967)

蔗糖 (Sucrose)	} 先溶解	300gm
蒸馏水		725ml
甲醛		100ml

普鲁士兰标记液

(Marsball, W. H.)

电流通过金属电极 (钢丝或镀铁的钨丝) 后灌注此液以显示细胞外铁粒子的沉着。

甲醛	100ml
生理盐水	900ml
铁氰化钾 (Potassium ferricyanide)	10gm

先灌注生理盐水，然后灌入新制备的上述液体。液体应为黄色，如果颜色变暗几乎成棕色则不可用（重新配制）。取出组织修成作快速固定所需大小并置入10%盐水福尔马林内，固定的时间根据组织的大小而定，尽可能短。冰冻切片后，立即裱贴于玻片上，以免铁反应物被洗掉。与一般冷冻切片一样处理，用中性红染色以清晰对比或用焦油坚牢紫淡染色对比。

Heidenhain液加苦味酸（用于视网膜）

氯水汞 (Mercuric chloraide) 38gm饱和于0.6%氯化钠500ml内

三氯醋酸 (Trichloroacetic acid)	20gm
醋酸 (Acetic acid)	40ml
甲醛	200ml
蒸馏水	300ml
苦味酸 (Picric acid)	5 gm

固定（大眼球）8到12小时足以浸透。时间过长可致组织变脆。当组织入70%酒精时除去角膜、晶状体和玻璃体。

显微镜玻片的粘片液

用热水和洗涤剂清洗载玻片，以去除油脂等，再用热流水彻底漂洗，然后置于蒸馏水内10分钟。用玻片架将载玻片整个浸入以下溶液内（室温），然后在恒温箱内干燥几小时或过夜（60℃）

粘 片 液

明胶 (Gelatin)	5 gm
硫酸铬钾 (Chromiun potassium sulfate)	0.5gm
蒸馏水	1000ml

在恒温箱内(37°—50℃)将明胶溶解于少量蒸馏水里，然后放硫酸铬钾，加水至1000ml，用前过沪。

用涂有粘片液的载玻片来裱冷冻切片和石蜡切片（避免切片从玻片上脱掉）

Mayer氏蛋白粘片剂

用蛋搅拌器搅拌一个蛋的蛋白(充分搅散而不粘稠)，倒入高量筒内，静放直到气泡带着悬浮物质浮到表面(过夜)，从筒底倒出液体加入等量的甘油。放置1克水杨酸钠(Sodium salicylate)或麝香草酚(Thymol)以防发霉，贮存于冰箱内。

冰 冻 切 片

1. 组织存放于10%福尔马林液内，冰冻前用小镊子剥掉脑的软膜。因为切片时软脑膜可引起组织表面切的不匀，特别是脑干和脊髓的表面。

2. 在铜和铝冻台的槽内，将冻台装在滑动切片机上，一定要将多余的酒精从冻台上擦净。

3. 用一滴管滴几滴蒸馏水在冻台中心，使之冻成冰。

4. 将组织放到冰上，在组织周围形成薄冰使组织埋于冰内，组织周围的冰过多易使切片碎裂。

5. 当组织冻结实时，摸之有硬感而且表面有霜，用锐利刀切，切时用鸵毛刷蘸70%酒精，涂于组织表面和刀上，这样可有助于使组织达到适当硬度。切片厚30—50 μm ，为了标记玻片上切片的正确方位，可用一个分离针或皮下注射针在组织块一侧搞一个作为标记的孔洞，如果标定的洞位于白质内更易见到。

6. 切片储于含5%福尔马林的有盖并分格的聚乙烯盒子里。

7. 用一个细鸵毛笔，将蒸馏水中的切片裱在涂过蛋白甘油的载玻片上，充分干燥。首先将切片放在45 $^{\circ}\text{C}$ 的热贴片台上1—2小时，然后放在同样温度的恒温箱内过夜，假如切片厚，裱片时先用两层沪纸轻压切片，这样有助于防止染色时切片脱落。

包埋技术

蛋白明胶包埋

(Nnuta, W. J. H. and B. O. E. Ebbesson., 1970)

这种方法适用于切片时倾向散开的组织。它仅包埋组织但不渗入组织内，可用于冷冻切片的各种染色。

明胶 18gm
蒸馏水 600ml 先溶解

蛋白 180gm

置烧杯于热水中用蒸馏水溶解明胶，用玻棒搅拌，加速溶解。逐渐加蛋白于溶液内并搅拌均匀。烧杯于热水中留置