

关于辣根过氧化物酶法的试验

鞠躬 舒斯云 王喜莲

(中国人民解放军第四军医大学)

辣根过氧化物酶(HRP)追踪神经系的束路联系法已有近十年的历史。近几年来在国内逐渐得到推广。四年来在应用 HRP 法进行研究的同时也对此方法本身作了一些试验,介绍如下:

一、二甲基亚砷(DMSO)的应用

注射于神经系内的 HRP 溶液一般是生理盐水或蒸馏水配制的。基费 (Keefer)^[1] 提出在 HRP 溶液中加入 2% 的 DMSO 可增加细胞膜的通透性,似也可增加 HRP 的摄入。其后,有

人将含 DMSO 的 HRP 液注射入内囊视放射、或敷在大脑表面、或用于浸泡周围神经等,以期增加 HRP 的透入。据谓都得到了较好的结果。

我们在脊髓灰质与后索核联系的研究中,在注入猫脊髓的 HRP 液中加入 2% 的 DMSO。经过 5 次试验,每次的结果都比不加 DMSO 的单纯 HRP 液的结果差。本来,HRP 法的缺点之一就是其注射范围难控制及有效摄入范围难确定。加 DMSO 后 HRP 扩散得更广泛,注射部位消失得更快。加 DMSO 后非但没

有加强后索核内的标记,反而大大削弱了标记。

DMSO 是一种加强膜通透性,有助于扩散的试剂。将之用于注射纤维束、贴敷于脑表、或浸泡周围神经等,似乎是合理的。但若用于注射神经核团就未必有什么好处了。首先,HRP 之被神经元的摄入是一种胞饮过程而不是透膜过程。其次,是使 HRP 较长时间地局限在一个局部有利于酶的摄入呢?还是使之很快地扩散更为有利呢?格里芬(Griffin)等^[2]认为,在注射 HRP 后,局部的损伤使神经元的摄入能力在一段时间内受到损害,待其摄入能力恢复时,按一般方法注入 HRP 却已大部扩散。所以他们创造了一种“缓释胶”的方法,使 HRP 从聚丙烯酰胺胶中缓慢地释放出来,较长时间地与神经元接触,取得了很好的结果。所以,DMSO 用于核团时的不利因素似超过了可能的有利作用。

二、多聚甲醛作为 HRP 法之固定剂

在 HRP 法中,目前多用多聚甲醛及戊二醛的混合液。有人认为多聚甲醛对 HRP 的保存不利,因而在 HRP 法中宜单独使用戊二醛作为固定剂^[3],这是一种误解。多聚甲醛能够较好地固定组织,同时保存 HRP 相当一部分活性。

曾单纯用多聚甲醛作为 HRP 法之固定剂。用高达 8% 的多聚甲醛,同时加 10% 蔗糖作为渗透压保护剂,取得了较好的效果。标记细胞出现较多,HRP 颗粒显示甚好,而且即使将冰冻切片在缓冲液中保存一周后再作成色反应,其 HRP 颗粒仍无明显减少,证明固定是良好的。

三、灌注固定法

在作中枢神经系研究时,所取材料较大,故一般采用经心脏或经主动脉灌注的方法(经主动脉灌注较为合理)。在灌注固定液前先用缓冲液或生理盐水冲洗血管,以防血液直接和固定剂接触,形成血凝块,堵塞血管,致灌注不良。

按一般组织学技术的经验,冲洗一只猫需用 200—250 毫升。按此数进行冲洗,结果虽然血管冲洗得很干净,但脑子的硬度不如直接用固定液灌注的例子。

单纯固定液灌注不良是因为形成血凝块之故。只要设法避免固定剂与血液的直接接触,就能获得良好的灌注效果。据此,我们设计了一种在固定液前用少量冲洗液开路快速灌注的方法,取得了较为满意的结果。具体如下。

用输液吊桶以一长约 2 米的橡皮管接玻璃主动脉套管,套管末端直径应恰能较松地插入主动脉。橡皮管内充适量的冲洗液,如灌注一只成年猫,可充满 2 米长的橡皮管(约 50 毫升),较小的动物则可相应地减量。吊桶内盛固定液。动物麻醉后沿胸骨两旁剪开胸前壁,翻起胸骨,纵行剪开心包,经心包横窦在主动脉及肺动脉之间引过一根丝线。先剪开右心,随即剪开左心室,插入套管至主动脉内,用引过心包横窦的丝线捆住套管。吊桶的高度应使液压大致与动物的血压相等。先快速灌注一段时间,待从右心流出清液后,可适当夹住橡皮管,减慢流速维持灌注一段时间(例如半小时)。

四、几种成色反应的比较

显示 HRP 的成色剂有若干种,目前国内较常用的为 3, 3' 二氨基联苯胺(DAB)及联苯胺。曾试验过 DAB、联苯胺、甲苯酚-DAB、 CoCl_2 -DAB、及邻联茴香胺等法,并对其灵敏度加以比较。DAB 法基本根据格雷厄姆(Graham)及卡诺维斯科(Karnovsky)^[4],冰冻切片经 0.05% DAB 液预浸 20 分钟后,转入每 100 毫升含 4 毫升 0.3% 双氧水的 DAB 液中保温 25 分钟。反应后 HRP 颗粒呈棕色。甲苯酚-DAB 法为斯特赖特(Streit)及鲁比(Reubi)^[5]所介绍,在每 100 毫升的 0.01% DAB 中加 0.07 毫升的甲苯酚,可增强棕色反应,所显示的 HRP 颗粒色较深。 CoCl_2 -DAB 法为亚当斯(Adams)^[6]提出,在 DAB 液处理以前切片先经 0.5% CoCl_2 液浸泡 10 分钟。其最终反应产物为深蓝色至黑色。所用联苯胺法按穆塞拉姆(Meuslam)第

8法^[6]，唯反应后稳定液中硝普钠的浓度改为2%，其反应产物呈蓝色。用一块组织同时进行上述四种反应以比较其灵敏度，结果以联苯胺反应最为灵敏， CoCl_2 -DAB法次之，甲苯酚-DAB法再次之，单纯DAB法最不灵敏。此外，还按爱德华兹(Edwards)等^[7]的方法作邻联茴香胺反应，呈绿色反应。此法似较联苯胺法更为灵敏。

辣根过氧化物酶法最初是作为逆行追踪神经纤维联系(从末梢到胞体)的方法介绍于世的。近年来也有用作短程顺行追踪的(从神经细胞到末梢)。最近作者发现HRP可被神经元长途顺行运输(见图1)。作顺行追踪法研究要求成色反应比较灵敏，上述联苯胺及邻联茴香胺法均适用于此。据文献介绍，目前最灵敏的方法是四甲基联苯胺法。

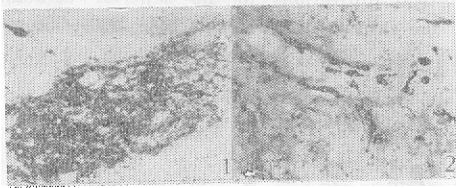


图1. 兔脊髓注射HRP后,距该部位26厘米处下橄榄核中的标记终末(邻联茴香胺法); 2. 中间脑之间埋“缓释胶”后延髓血管内皮细胞被标记。

五、二氨基联苯胺的浸透力

关于DAB法,有人主张先将切片在DAB液中预浸20分钟,然后置DAB-H₂O₂液中成色,有人则主张不经预浸直接将切片置DAB-H₂O₂液中。赫佐格(Herzog)及米勒(Miller)曾提到DAB浸透组织的能力很弱,老鼠泪腺

在DAB-H₂O₂液中,室温下浸泡2小时后,其内源性过氧化物酶反应仅见于距组织表面20微米深的范围内。通常HRP神经纤维联系研究时的DAB浸泡时间(见四。)不足以让DAB透入30—40微米厚的冰冻切片的中心。为此用猫脊髓进行了DAB浸透力的试验。

取经10%福尔马林固定的同一猫的脊髓7段,分别在同样条件下置0.1% DAB、0.05% DAB、0.5% 盐酸联苯胺、0.5% 甲基蓝、1% 中性红、1% 克紫及1% 三氯化铁溶液中一小时。然后作冰冻脊髓纵切片,测量上述各溶液浸入脊髓的深度。浸入的DAB及联苯胺用辣根过氧化物酶-H₂O₂液显示之;浸泡三氯化铁的脊髓段预先在1% 赤血盐中浸一周,使浸入的三氯化铁与之成蓝色反应。结果,二种浓度的DAB及联苯胺浸入灰质的深度均为60—80微米,浸入白质达80—100微米。中性红的浸透力与之近似,甲基蓝及克紫的浸透力弱,三氯化铁则浸入灰质的能力大大强于DAB,但浸入白质的能力似较DAB弱。曾作过二次试验,结果基本相同。故DAB的浸透力并不比所用的染料低,甚至浸泡一小时后,大大超过Herzog及Miller提出的数字,而脊髓组织还较泪腺致密。本试验不支持Herzog及Miller的关于DAB浸透力低的看法。

六、血管假象

HRP注射于中枢神经系后,在注射部位附近的血管内皮细胞或周细胞可能被HRP标记,形成与神经细胞混淆的假象,文献上已有记载。在将“缓释胶”(含HRP的聚丙烯酰胺)^[2]埋在

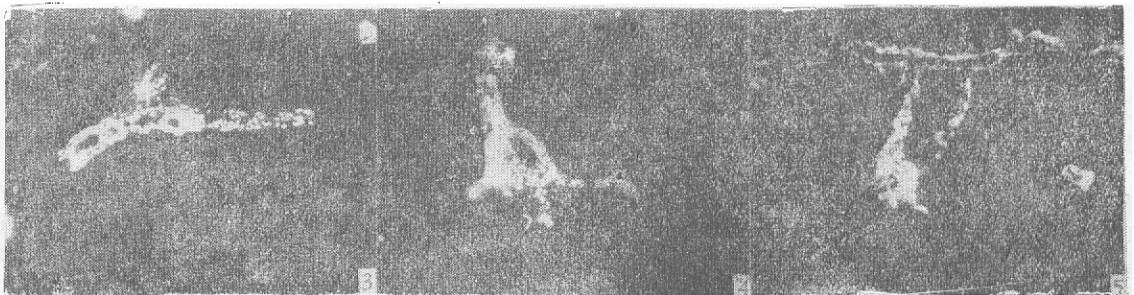


图3. 血管壁上的沉积,血管轮廓清晰(暗视野); 4. 血管假象(暗视野); 5. 血管假象,可见其“突起”与血管腔相通(暗视野)

大白鼠中脑间脑交界部的实验中,发现远隔手术部位的脑组织中也可能出现上述血管假象(见图2)。

另外在联苯胺蓝色反应中,发现还有一类假象,在成色反应过程中,反应物沉积在某些组织结构上而造成的。有一类沉积物颗粒细小,圆形或椭圆形或短杆状,其大小及形状与标记神经元的颗粒近似,常附着在血管壁上。如所附的血管比较粗大,或轮廓较清,不致与神经元混淆(见图3)。但有时仅部分管壁或细血管枝,网上的沉积也可以形成神经元的形状,或竟可乱真(见图4)。一般说来,用明、暗视野对照观察,或用较高放大倍数,调节焦距,多少能看出圆筒状管壁形状,以及假象细胞和血管腔的直接连续。

参 考 文 献

[1] Keefer, D. A. 1977. Horseradish peroxidase as

a retrogradely transported detailed dendritic marker. *Brain Res.* 140: 15—32.

- [2] Griffin, G. et al. 1979. HRP pellets and slow-release gels: two new techniques for greater localization and sensitivity. *Brain Res.* 168: 595—601.
- [3] Adams, J. C. 1977. Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker. *Neuroscience* 2: 141—145.
- [4] Graham, R. C., Jr. & M. Karnovsky, 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 291—302.
- [5] Streit, P. & Reubi, J. C. 1977. A new and sensitive staining method for axonally transported horseradish peroxidase in the pigeon visual system. *Brain Res.* 126: 530—537.
- [6] Mesulam, M. M. 1976. The blue reaction product in horseradish peroxidase neurochemistry: incubation parameters and visibility. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 1273—1280.
- [7] Edwards, S. B. et al. 1979. Sources of subcortical projections to the superior colliculus in the cat. *J. Comp. Neur.* 184: 309—330.