

髓前角受损神经元胞体发挥营养支持作用,减缓受损神经逆行性变性,使轴突再生开始的部位更接近于手术修复处,从而使再生速度加快,并且减少轴突数的损失和其直径的缩小。同时,这些因素还可导致迅速的轴突—雪旺氏细胞间的相互作用及再鞘过程,促进再生神经纤维的成熟^[7]。

(本文图 1~8 见插页第 1 页)

参考文献

- [1] Richardson PM. Ciliary neurotrophic factors. *Pharmacol Ther*, 1994, 63(2):187.
- [2] 许家军,何成.睫状神经营养因子神经生长因子对周围神经再生的作用. *中华手外科杂志*, 1997, 13(1):16.
- [3] 何成,陈江野,陆长林,等.人睫状神经营养因子基因在大肠杆菌

中的表达. *生物化学与生物物理学报*, 1995, 27(6):675.

- [4] 顾晓松,严志强,范明,等. CNTF 和 NGF 在损伤后变性神经组织中的表达与分布. *中华显微外科*, 1998, 21(2):121.
- [5] Hare CMT, Evans PJ, Mackinnon SE, et al. Walking track analysis: a long term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg*, 1992, 89(2):251.
- [6] Badalamente MA, Hurst LC, Paul SB, et al. Enhancement of neuromuscular recovery after nerve repair in primates. *J Hand Surg*, 1987, 12B(2):211.
- [7] Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Winslow JW, et al. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron*, 1993, 10(3):359.

(收稿:1998-11-06 修回:1999-04-19 编辑:房世源)

实验室技术

不脱钙骨超薄切片的制备

常超英 刘恩

(中国中医研究院骨伤科研究所,北京 100700)

对于骨折和骨病的深入研究,要求建立不脱钙骨超薄切片技术。在超微结构水平观察骨组织内钙盐的沉积、构筑及其变化,有助于阐明骨病、骨吸收和骨修复过程中,钙盐的代谢活动;运用脱钙骨制备的标本,不能提供相应的资料。

1 材料和方法

1.1 动物和取材 试验用成年雄性 Wistar 大鼠,在戊巴比妥钠腹腔麻醉下,迅速取出股骨头、股骨颈和腰椎椎体。

1.2 依次按以下步骤制备超薄切片:(1)立即投入 2%多聚甲醛-3%戊二醛溶液内固定 2 小时;(2)4.0.1M 磷酸缓冲液冲洗 2 小时;(3)4.1%锇酸溶液后固定 2 小时;(4)梯度丙酮脱水;(5)浸渗 Spurr:用丙酮-Spurr 混合液分 3 步浸渗,每步 2 小时。丙酮:Spurr 的比例依次为 3:1,1:1 和 1:3;(6)Spurr 包埋液包埋;(7)LKB-V 超薄切片机和钻石刀切片,厚度 500 埃;(8)醋酸铀-枸橼酸铅双重复染。

1.3 日本 JEM1200EX 透射电镜观察和拍照。

2 电镜观察结果

2.1 骨细胞与骨基质 骨细胞陷窝的周围有大量钙盐沉积。可见处于不同钙化时期的骨细胞(图 1),早期埋入钙化基质内的骨细胞,含有比较多的细胞器。在骨基质中,可见到聚集成团的针形羟基磷灰石结晶(图 2)。羟基磷灰石结晶的长轴与胶原的长轴一致,并且沿胶原的长轴分布。大量钙盐沉积在胶原上,可以掩盖胶原的周期性横纹。

2.2 软骨细胞和软骨基质 一些软骨细胞的周围有钙盐沉积,形成类骨质。类骨质内的软骨细胞出现固缩和变形,其周围看见基质小泡(图 3)。

3 讨论

制备不脱钙骨超薄切片,需要活体取材或灌注取材,并且迅速投入固定液内固定。取材样本的体积以 1mm×1mm×1mm 为宜;更需要避免机械性损伤。这样可以最大限度地保

持骨组织,特别是骨内钙盐的原形。

样本的体积为 1mm³ 时可以被固定液迅速浸透^[1],所以可以不采用灌注固定。由于 Karnovsky 氏多聚甲醛-戊二醛混合液有比较强的穿透力,对细胞又有良好的固定作用^[2,3],所以比较适宜不脱钙骨样本的固定。早年,多采用二甲砷酸钠缓冲液配制骨标本的固定液;而 Palumbo 等^[4]推荐使用磷酸缓冲液,因为它对细胞结构的保存更好,我们的经验和体会与 Palumbo 的观点一致。

浸透与包埋是制备不脱钙骨超薄切片的关键步骤。不脱钙骨密度高,给包埋剂的浸透造成困难;由于骨质脆硬,如果包埋剂浸透不充分,势必无法获得完整的超薄切片。根据 Dickson, Bancraft 和郑若玄等对于包埋剂粘度与浸透时间和效果关系的观点^[1,3,5],我们采用低粘度的 Spurr 包埋剂,而且从低浓度开始,逐级增加,取得比较满意的结果。为了克服 Spurr 包埋剂造成的样本“嗜染性”下降,我们采用了醋酸铀染色。此外,Spurr 包埋液的毒性比较大,在操作过程中必须十分小心。万一皮肤被 Spurr 包埋液污染,须立即用清水和肥皂冲洗干净,切不可使用有机溶剂^[3]。

(本文图 1~3 见插页第 1 页)

参考文献

- [1] Dickson GR. Methods of calcified tissue preparation. Elsevier Science Publishers B. V., 1984, 79~145.
- [2] Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol*, 1965, 27:137~138.
- [3] Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1977, 326~370.
- [4] Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, et al. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: An ultrastructural study of cytoplasmic processes. *Acta Anat*, 1990, 137(4):350~358.
- [5] 郑若玄. 实用细胞学技术. 北京: 科学出版社, 1980, 176~196.

(编辑:李为农)

睫状神经营养因子对周围神经损伤后再生的影响

(正文见 585 页)

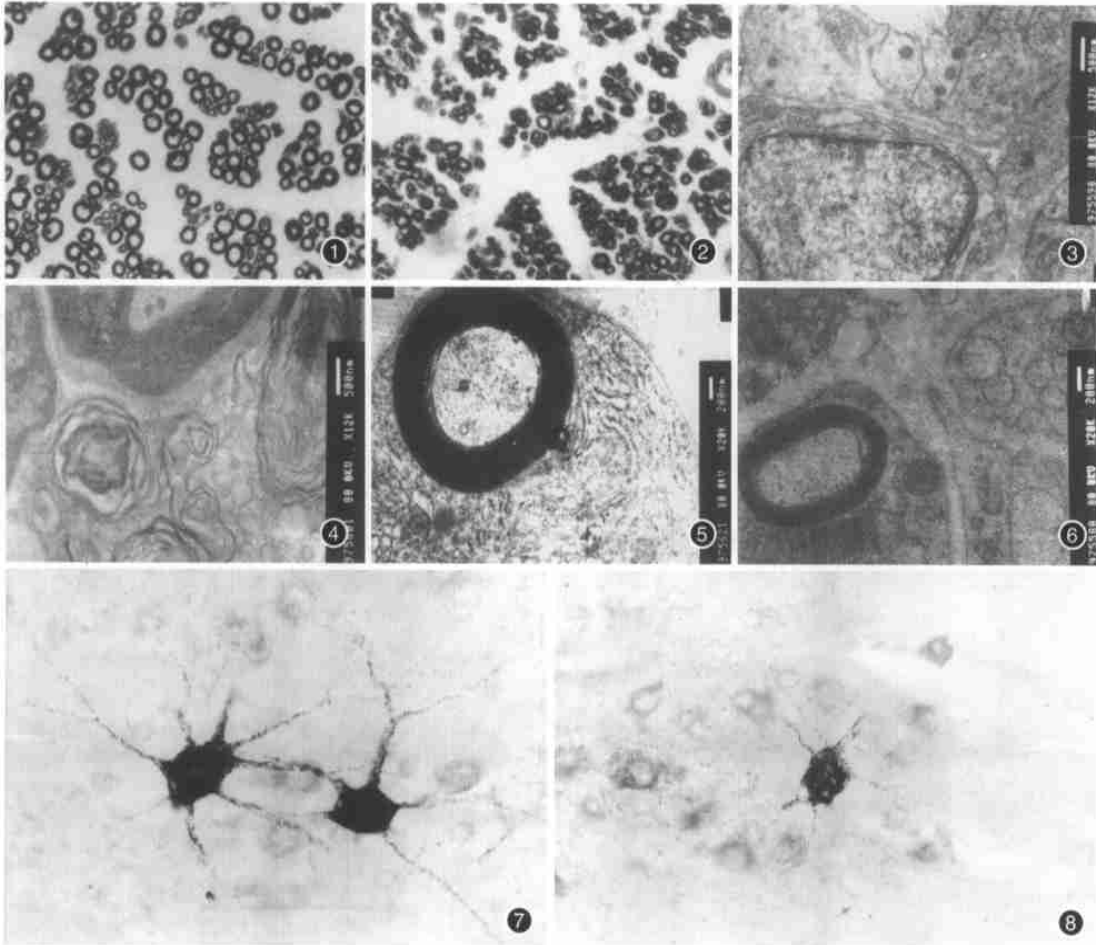


图 1 术后 60 天, 实验侧神经远段, 再生神经纤维直径粗大, 排列整齐, 四氧化钼髓鞘染色 $\times 400$ 图 2 术后 60 天, 对照侧神经远段, 再生神经纤维直径细小, 粗细不均, 四氧化钼髓鞘染色 $\times 400$ 图 3 术后 14 天, 实验侧神经近段, 可见新生轴芽及雪旺细胞。透射电镜 $\times 12000$ 图 4 术后 14 天, 对照侧神经近段, 可见松散旧鞘管, 未见新生轴芽。透射电镜 $\times 12000$ 图 5 术后 60 天, 实验侧神经中段, 髓鞘较厚, 明暗板层结构清晰。透射电镜 $\times 20000$ 图 6 术后 60 天, 对照侧神经中段, 髓鞘较薄。透射电镜 $\times 20000$ 图 7 实验侧 CB-HRP 标记的脊髓前角运动细胞, 突起多且长。 $\times 180$ 图 8 对照侧 CB-HRP 标记的脊髓前角运动细胞数少, 突起短。 $\times 180$

不脱钙骨超薄切片的制备

(正文见 587 页)

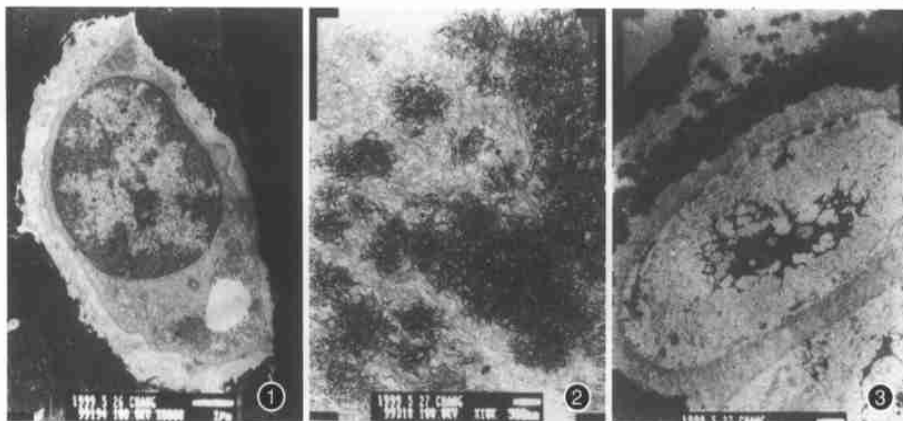


图 1 骨细胞和骨基质 透射电镜 $\times 8000$ 图 2 羟基磷灰石结晶聚集成团 透射电镜 $\times 10K$ 图 3 软骨细胞退变、坏死, 其周围为钙化区 透射电镜 $\times 2500$