

山羊胚胎小脑皮质的形成和发育^{*}

徐永平, 张 涌, 郑月茂, 卿素珠, 赵慧英, 蒲 鹏

(西北农林科技大学 动物科技学院 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对山羊胚胎小脑皮质形成及其神经元发育的形态学变化进行了研究。结果表明: (1) 山羊胚胎小脑形成于第6周末, 小脑皮质的外颗粒层、分子层首先形成。(2) 发育过程中, 山羊胚胎小脑的外颗粒层呈现出非常复杂的变化趋势: 第7~10周外颗粒层达到一定厚度, 第11~12周开始变薄, 此后外颗粒层又开始变厚, 直到第15~16周又变薄, 17~18周再次增厚, 此后再次变薄, 直到出生前1周外颗粒层已经较薄, 仅有4~5层细胞。(3) 山羊胚胎的蒲肯野氏细胞可能在第8周以前就已聚集定位, 第14周以后, 蒲肯野氏细胞内部结构逐渐发育成熟, 这说明蒲肯野氏细胞虽然发生较早, 但其开始发育的时间较晚。

[关键词] 小脑皮质; 山羊胚胎; 中枢神经; 形态学

[中图分类号] S852.16

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)02-0087-04

小脑是一个重要的运动调节中枢, 其功能在于分析、综合处理身体各部的位臵、运动状态等感觉信息, 并不产生意识, 整合活动的结果最后通过Purkinje细胞传出, 一小部分直接出小脑, 大部分经小脑核作用于中枢神经其他部分。关于哺乳动物小脑皮质个体发育方面的研究很多^[1~13], 但有关山羊小脑形成和发育的资料尚未见报道。本研究的目的在于阐明山羊胚胎小脑皮质的形成和发育的一般性规律, 补充小脑发育方面的形态学资料, 为进一步研究山羊中枢神经系统的发育机制提供形态学资料。

1 材料与方法

根据曹贵方的方法^[14], 按体长自屠宰场取6~21周龄的山羊胚胎, 每周龄最少3只, 共取得山羊胚胎50只。心脏经生理盐水冲洗后, 用50~1500 mL pH 7.2~7.4的4%甲醛-磷酸盐缓冲液心脏灌注固定, 于4%中性甲醛溶液中后固定保存。取出小脑, 流水冲洗12 h后, 经梯度酒精脱水, 常规石蜡包埋, 切片, 片厚6~8 μm , HE染色, 中性树胶封片, 光镜观察小脑皮质的形成和发育。

2 结 果

2.1 第六周的小脑

第6周初, 末脑背侧的菱形唇中间较薄, 两侧较厚。菱形唇内的细胞密集, 细胞核着色稍淡。第6周末, 小脑原基形成, 表面有隆起的嵴。室管膜层较厚,

内有大量细胞。在小脑原基表面有3~5层细胞组成的密集细胞带, 厚约18 μm , 细胞核深染, 为外生发层; 外生发层深层细胞少, 厚约10~15 μm , 为分子层, 有些区域内细胞较多; 分子层与室管膜之间有着大量的小细胞, 胞质不着色, 细胞核呈小圆形, 着色较深, 近分子层区域的细胞密度大于近室管膜区域的, 似颗粒层正在形成, 细胞核呈深染或稍大的淡染的小圆形(图版1, 2)。

2.2 小脑皮质的形成和发育

在山羊小脑皮质的外生发层形成后, 一直到出生都存在。外生发层内的细胞具有未分化细胞或分裂细胞的特征, 胞质少, 细胞核以3~5 μm 深染或淡染的圆形核为主, 有的呈分裂相。

第7周, 小脑表面的嵴和沟明显, 小脑的室管膜层变薄, 由6~8层细胞组成。外生发层由2~3层细胞组成, 分子层变宽。分子层深面细胞密集带变宽, 细胞核以淡染的圆形核为主, 夹有少量的深染圆形核; 近室管膜层的区域内细胞密度进一步降低, 细胞散在分布, 细胞核以深染的小圆形为主。第8周, 外生发层变厚, 其深层细胞数量略少, 细胞核多为淡染的长梭形和椭圆形核, 似正向外迁移出的细胞。分子层变宽, 细胞较多, 细胞核为淡染的圆形或椭圆形核。颗粒层细胞较多, 细胞核以淡染的圆形核、椭圆形核为主, 其间夹有一些深染的圆形核(图版3)。小

^{*} [收稿日期] 2003-02-25

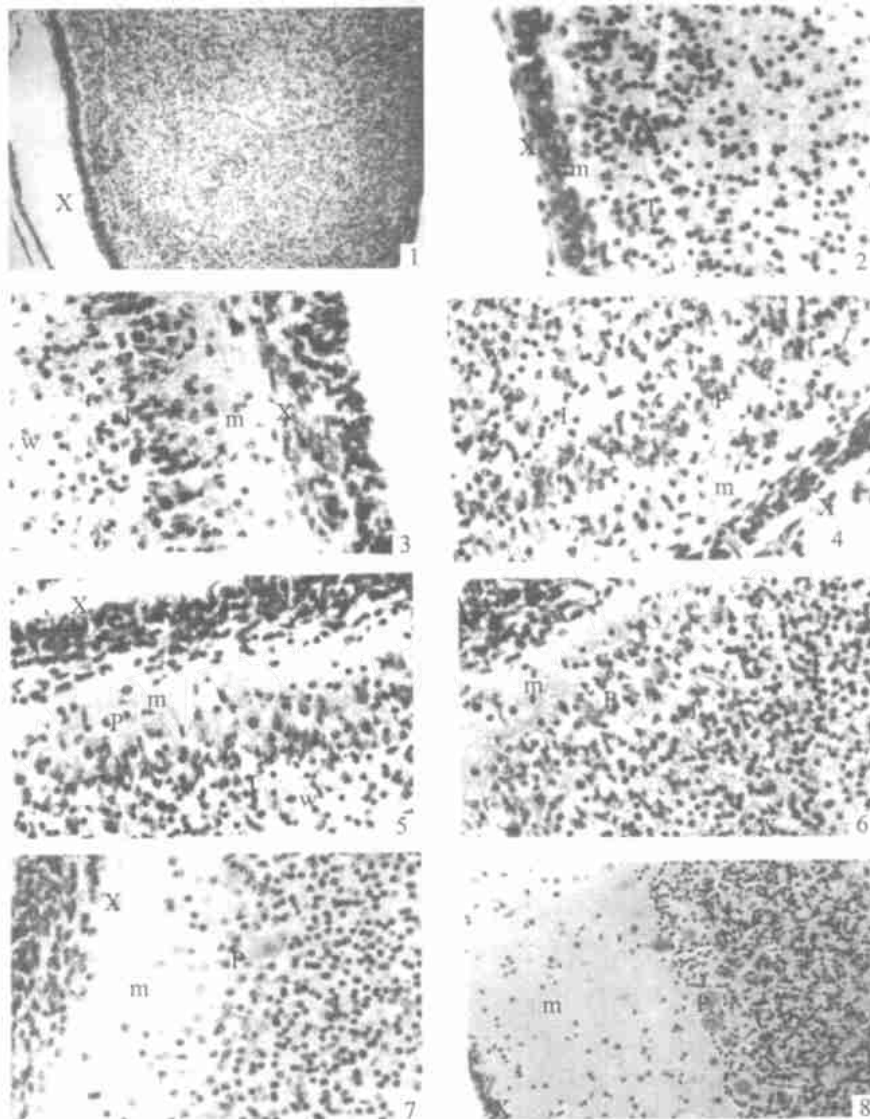
[基金项目] 国家自然科学基金项目(39830280)

[作者简介] 徐永平(1971-), 男, 陕西长安人, 讲师, 主要从事动物形态学和发育生物学研究。

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事胚胎学、胚胎工程研究。

脑皮质深层的细胞密度降低, 细胞核以深染或淡染

的小圆形核为主。



图版 1~8 山羊胚胎小脑皮质的形成和发育

1. 第 6 周末小脑原基 $\times 100$; 2. 第 6 周末小脑原基 $\times 400$; 3. 第 8 周小脑皮质 $\times 400$; 4. 第 13 周小脑皮质 $\times 400$; 5. 第 14 周小脑皮质 $\times 400$; 6. 第 16 周小脑皮质 $\times 400$; 7. 第 18 周小脑皮质 $\times 400$; 8. 第 21 周小脑皮质 $\times 400$

X. 外颗粒层; m. 分子层; P. 蒲肯野氏细胞层; I. 颗粒层; W. 髓质

Plate 1- 8 The histogenesis and development of cerebellar cortex in goat fetus

1. The 6th weekend, the primordial cerebellar $\times 100$; 2. The 6th weekend, the primordial cerebellar $\times 400$; 3. The 8th week, cerebellar cortex $\times 400$; 4. The 13th week, cerebellar cortex $\times 400$; 5. The 14th week, cerebellar cortex $\times 400$; 6. The 16th week, cerebellar cortex $\times 400$; 7. The 18th week, cerebellar cortex $\times 400$; 8. The 21th week, cerebellar cortex $\times 400$

X. External granular layer; m. Molecular layer; P. Purkinje cell layer; I. Granular layer; W. Medullary substance

第 9 周, 外生发层继续增厚。分子层内的细胞增多, 细胞核多为着色较淡的椭圆形和梭形核。颗粒层多数细胞的核为深染的圆形核。第 10 周时, 外生发层厚度可达 $27\ \mu\text{m}$ 左右。第 11 周, 外生发层开始变薄。因外生发层的细胞向内迁移, 分子层内出现许多较大的淡染的椭圆形细胞核。颗粒层内也有许多淡染的椭圆形核, 其间有较多的深染的小圆形核散在。

第 12 周, 小脑皮质外生发层继续变薄, 厚约 $8\sim 15\ \mu\text{m}$ 。分子层变宽, 细胞较多, 有深染的圆形和椭圆形细胞核以及淡染的圆形和椭圆形核。颗粒层与第 11 周相似。第 13 周, 外生发层又开始变厚; 分子层内细胞较多, 细胞核多为深染的圆形、椭圆形核。颗粒层浅层有些较大的细胞排列成层, 胞质不着色, 细胞核为 $4\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$ 左右的淡染的椭圆形核, 似蒲肯野

氏细胞层(图版4)。第14周,外生发层厚度可达20~27 μm 。分子层内细胞数量减少,细胞核多为深染的圆形、椭圆形核。蒲肯野氏细胞轮廓可辨,大小约5~10 μm ,在有些区域有2~3层细胞,其胞质着色淡,细胞核为着色稍淡的较大的圆形核,在蒲肯野氏细胞之间还有较多的淡染的椭圆形核分布。颗粒层较厚,细胞核以深染的小圆形核为主,在与蒲肯野氏细胞相邻处有较多的淡染的椭圆形核,其间有深染核散在分布(图版5)。颗粒层与小脑髓质已可区分,但界线不太明显。第15周,外生发层厚度可达40 μm 。蒲肯野氏细胞轮廓清楚,细胞核多为淡染的泡状核,有的为稍淡的椭圆形核,蒲肯野氏细胞之间仍有较多的淡染的椭圆形核。颗粒层与髓质界线较为明显。第16周,外生发层变薄,厚约27 μm 。分子层变宽,细胞数量减少,细胞核为深染或淡染的圆形核。蒲肯野氏细胞变大,在多数区域单层排列,细胞核为淡染的具核仁的泡状核,蒲肯野氏细胞之间的细胞减少。颗粒层细胞多为轮廓模糊的小细胞,细胞核以深染的小圆形核为主,其间有一些淡染的椭圆形核分布(图版6)。第17周,外生发层厚度又开始增加,可达32~40 μm 。分子层变宽,细胞较少,细胞核多为淡染的圆形核。蒲肯野氏细胞胞体大小可达13~20 μm ,泡状核的中央核仁明显,蒲肯野氏细胞之间的细胞减少。颗粒层的细胞核为深染或淡染的小圆形核。从第18周开始,外生发层变薄,一直持续到出生前,分子层的宽度增幅较大,而且蒲肯野氏细胞的直径也随胎龄增加逐渐变大。在第18周,分子层内细胞分布不均匀,靠近蒲肯野氏细胞处的细胞增多,似把蒲肯野氏细胞埋在深层,细胞核以淡染的圆形核为主。在蒲肯野氏细胞之间的细胞较多。颗粒层细胞的核多为深染或淡染的小圆形核(图版7)。第19周,分子层内的细胞散在分布,数量减少,细胞核为深染或淡染的小圆形核。蒲肯野氏细胞胞体边缘出现较多的尼氏颗粒。第20周,蒲肯野氏细胞内的细小尼氏颗粒丰富。蒲肯野氏细胞之间的细胞数量减少,蒲肯野氏细胞顶端直接与分子层相接,其间仅有少量小细胞。第21周,外生发层约为4~5层细胞,厚约12~16 μm 。分子层内的细胞稀疏,细胞核为深染或淡染的小圆形核。蒲肯野氏细胞大小约18 μm × 32 μm ,胞体内充满细小的尼氏颗粒,蒲肯野氏细胞之间的小细胞进一步减少。颗粒层的细胞为轮廓模糊的小细胞,细胞核为深染或淡染的小圆形核(图版8)。

3 讨论

由于发育早期的神经元胞体内胞质很少,细胞器也较少,当神经元胞体变大、细胞器增多后,在光镜下才可逐渐看到神经元胞体的轮廓。因此在HE染色的小脑切片中,发育早期只能观察到神经元细胞核的变化。胶质细胞也只能观察到细胞核的变化。

3.1 小脑的组织发生与形成

小脑起源于后脑的翼板,菱形唇是小脑的原基,菱唇在后脑分化时位于菱形窝上方的两侧缘,随着桥曲的加深,两菱形唇形成横列的小脑板。小脑皮质的组织发生与脊髓不同,在发生过程中首先形成一个次级生发中心,即外生发层。再由此生发中心形成小脑皮质各层^[1]。本研究结果表明,山羊的小脑原基形成于第6周末,其表面出现隆起的嵴,此时小脑的外生发中心开始出现,而且小脑皮质的外生发层、分子层已可辨别。颗粒层与室管膜层的界限不明显,小脑核还无法辨认。此时,小脑室管膜层仍较厚,有大量的细胞即为神经上皮细胞。

3.2 外颗粒层的形成与发育

外颗粒层位于小脑最表层,多数学者认为是由外套层细胞迁移所致,也有人认为是由神经上皮细胞直接迁移所致,并且具有增生能力。邢洪涛等^[4]在大鼠中观察到外颗粒层出现于第18天。丁建华等^[11]曾发现出生后大鼠小脑的外颗粒层出现由薄变厚再变薄的变化趋势。钱雪松等^[5]发现,4~8月的人胚胎小脑的外颗粒层的厚度绝对值增加,但相对值下降,外颗粒层细胞的密度也随胎龄增加。本研究发现在胚胎期,山羊小脑的外颗粒层自形成到出生前呈现非常复杂的变化趋势。在发育过程中,第7~10周外颗粒层达到一定厚度,第11~12周开始变薄,此后外颗粒层又开始变厚,直到第15~16周又变薄,第17~18周再次增厚,此后开始变薄,直到出生前1周外颗粒层已经较薄,但仍有4~5层细胞。外颗粒层胚胎期的这种变化还未见资料报道,笔者认为,这可能与外颗粒层内的细胞迁移的规律及小脑表面积增加等物理性因素有关,反映了小脑皮质各组份发育规律的复杂性。与外颗粒层厚度变化相对应的是分子层内的细胞的变化,这种变化的原因有待于进一步研究。

3.3 蒲氏层细胞的出现和变化

蒲肯野氏细胞(PC)是小脑重要的传出神经元,与许多细胞具有突触联系。来源于神经上皮细胞的PC在分子层深面停止迁移而形成蒲氏层。邢洪涛

等^[4]在大鼠胚胎 18 d 时清楚地看到该层,而在此前未见有明显的层状结构,推测可能在胚胎 16 d 晚期至胚胎 17 d 晚期这段时间内,PC 开始聚集,到胚胎 18 d 时才形成明显的层状结构。本研究发现,山羊胚胎小脑的颗粒层出现于第 8 周。第 14 周,蒲肯野氏细胞的轮廓已可辨认;在蒲肯野氏细胞周围有较多的淡染的椭圆形细胞核散在。此后,蒲肯野氏细胞的形态变化经历以下过程:第 15 周多数小脑蒲肯野氏细胞的核变为淡染的泡状核,中央核仁明显,有的蒲肯野氏细胞核为稍淡的椭圆形核;第 16 周以后蒲

肯野氏细胞增大,轮廓愈加清晰;第 19 周,蒲肯野氏细胞的边缘内出现较多的尼氏颗粒;到第 21 周,小脑蒲肯野氏细胞较大,胞体内的细小尼氏颗粒丰富。笔者认为,山羊胚胎的蒲肯野氏细胞可能在第 8 周以前就已聚集定位,到第 14 周时,蒲肯野氏细胞逐渐成熟,因而在 HE 染色中细胞质可以着色,蒲肯野氏细胞的轮廓才可以辨认。在这之后,蒲肯野氏细胞的形态变化则反映了其细胞内部结构的发育变化。这说明蒲肯野氏细胞虽然发生较早,但其开始发育的时间较晚。

[参考文献]

- [1] 丁建华,王蕙仁.大鼠小脑皮质的生长发育[J].解剖学杂志,1985,8(1):18-21.
- [2] 李盛芳,张汉琦.鸡和大鼠小脑发育的比较观察[J].山东医科大学学报,1989,27(3):34-38.
- [3] 符蛟荣,郑小桃,孙玉荣.人胎儿小脑皮质蒲肯野氏细胞发育的定量观察[J].海南大学学报(自然科学版),1995,13(1):48-51.
- [4] 邢洪涛,吕永利,张丽颖.大鼠胚胎小脑的发育学研究[J].中国医科大学学报,1997,26(4):345-347.
- [5] 钱雪松,李陈莉,仝宇红,等.人胚胎小脑皮质神经细胞的发育[J].解剖科学进展,2000,6(3):282-285.
- [6] Bertossi M, Roneasli L, Mancini L, et al. Process of differentiation of cerebellar Purkinje neurons in the chick embryo[J]. Anat Embryol (Berl), 1986, 175(1): 25-32.
- [7] 武胜昔,吕葆真,李继硕.含 GABA_A 受体 α_6 亚单位 mRNA 神经元在大鼠脑内的生后发育[J].神经解剖学杂志,1996,12(2):147-150.
- [8] 舒先涛,张纯清,陈运才.大鼠小脑皮质内突触素 P38 免疫反应产物的分布及年龄变化[J].解剖学杂志,1997,20(1):41-44.
- [9] 卢大华,雷德亮,罗学港,等.人胎小脑内 Calbindin 和 Parvalbumin 的免疫组织化学研究[J].神经解剖学杂志,1999,15(3):227-233.
- [10] 张国境,田向春,沈瑞莲,等.国人胎儿小脑皮质 Purkinje 细胞层突触的发育[J].解剖科学进展,2000,6(2):167-169.
- [11] Walsh C, Cepk C L. Cell lineage and cell migration in the developing cerebral cortex[J]. Experientia, 1990, 46: 940-947.
- [12] Altman J. Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms[J]. Exp Brain Res, 1982, 6: 38-49.
- [13] Annie L. Somatostatin receptors in the human cerebellum during development[J]. Brain Res, 1992, 573: 251-259.
- [14] 曹贵方.山羊体形和卵巢发生及卵泡组织化学的研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学生物工程研究所,1998.45-59.

The histogenesis and development of cerebellar cortex in goat fetus

XU Yong-ping, ZHANG Yong, ZHENG Yue-mao, QING Su-zhu, ZHAO Hui-ying, PU Peng

(College of Animal Science and Technology, Institute of Bioengineering, Northwest Sci-Tech University
of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The histogenesis and development of cerebellar cortex were observed in goats fetus by using HE staining. The results are as follows: (1) The cerebellum are formed in the sixth weekend in goats fetus. The external granular layer and the molecular layer could be distinguished. (2) The external granular layer presents very complicated variational current in developing of goats fetus. The width of external granular layer increased from the seventh week to the tenth week, and decreased during the 11th and the 12th week. Then the width increased again from the 13th week to the 15th week, and decreased again in the 16th week. In the 17th week the width increased and decreased in the 19th week. The external granular layer were formed by 4 to 5 layers cell in the 21th week. (3) The Purkinje cell were likely to migrate to place in the 8th week, and the Purkinje cell's outline could be identified in the 14th week. This indicated that the generation of Purkinje cell is early, but the organelle of the Purkinje cell developed later.

Key words: cerebellum; goat fetus; central nerves; morphology