

出生前山羊小脑皮质神经元超微结构的观察*

徐永平, 郑月茂, 赵慧英, 张 涌, 蒲 鹏, 卿素珠

(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] 应用超薄切片技术研究了第 6 周到出生前山羊小脑皮质神经元超微结构发育的变化。结果表明: (1) 出生前山羊小脑皮质内颗粒层细胞在第 10 周龄以前一直处于未分化状态, 第 10 周龄以后开始分化, 但直到出生前山羊小脑皮质内颗粒层细胞内细胞器的种类和数量都增加缓慢。(2) 小脑浦肯野氏细胞在第 7 周龄以前处于未分化状态; 在第 7 周龄开始分化, 第 7~14 周龄处于不成熟期; 第 15~18 周龄浦肯野氏细胞处于发育成熟期, 细胞内各种细胞器均出现并充满整个胞体, 细胞核膜趋于成熟, 核内常染色质发达, 中央核仁发育成熟; 浦肯野氏细胞自第 19 周龄开始进入成熟期, 细胞内尼氏小体开始形成并发育, 但其体积较小, 界限不明显, 这表明浦肯野氏细胞在出生前尚未完全成熟, 出生后仍存在一个较长生后发育过程。

[关键词] 超微结构; 发育; 神经元; 小脑皮质; 生前山羊

[中图分类号] S852.16

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)11-0001-05

小脑是一个重要的运动调节中枢, 其功能在于分析、综合处理身体各部分的位置、运动状态等感觉信息, 并不产生意识, 整合活动的结果通过 Purkinje 细胞传出, 一小部分从小脑直接传出, 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^[1~9], 体内及离体培养神经细胞生长发育的超微结构变化的研究亦十分丰富^[8~12]。但未见山羊小脑皮质神经元发育超微结构方面的报道, 为此, 本研究观察了出生前山羊小脑皮质神经元超微结构的变化, 以补充小脑发育的形态学资料, 探讨神经元发生发育规律。

1 材料与方法

1.1 试验动物

自屠宰场从妊娠山羊腹中取第 6~21 周龄的胚胎, 每周龄最少 2 只, 共取山羊胚胎 60 只。经心脏依次灌注生理盐水冲洗, 用含 40 g/L 中性甲醛和 1.25 mL/L 戊二醛, pH 7.2~7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液固定, 将胚胎于 40 g/L 中性甲醛溶液中整体后固定保存。

1.2 超薄切片的制备

取小脑皮质顶叶组织, 切割成横截面积小于 1 mm² 的长条, 在含有 40 g/L 中性甲醛和 1.25 mL/L 戊二醛, pH 7.2~7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓

冲液中保存; 经 PBS 洗 3 次后, 放入 10 g/L 锇酸固定 1.5~2 h, 丙酮逐级脱水, 经不同比例的丙酮包埋剂过渡, Epon 812 纯包埋剂浸透, 40℃ 温箱聚合 36 h, 60℃ 聚合 48 h。半薄切片定位, 做电镜超薄切片观察和拍照。

2 结果与分析

2.1 出生前山羊小脑皮质外生发层细胞超微结构的发育变化

山羊小脑皮质的外生发层出现于第 6 周龄末, 并一直持续到出生前。小脑发育过程中, 此层细胞的核质比大, 细胞器较少, 以核糖体为主, 核内异染色质较多, 多与核膜相连(图版 I-1)。外生发层细胞之间的突起逐渐增加, 但其超微结构的特征变化不大。在外生发层中一直都有分裂相细胞存在, 一直到第 16 周龄时都可见到核分裂相, 或正在分裂的细胞(图版 I-2)。

2.2 出生前山羊小脑皮质内颗粒层细胞超微结构的发育变化

第 6 周龄末, 小脑皮质外生发层形成以后, 其深层细胞之间有少量突起, 连接疏松。细胞的核质比大, 细胞器种类单一, 以核糖体为主, 核内的异染色质斑块多而小, 双层核膜间隙较小, 与外生发层细胞相似。第 7 周龄, 小脑皮质内颗粒层细胞间突起增

* [收稿日期] 2003-10-13

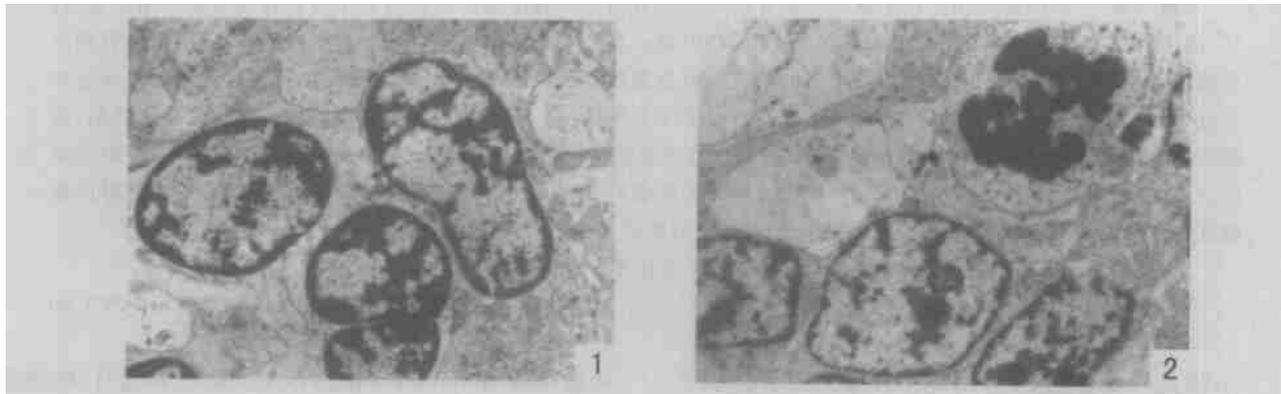
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39830280)

[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, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。

多,连接较紧密。第 8 周龄,内颗粒层细胞间突起增多,多数细胞核质比未变,到第 10 周龄,内颗粒层有些细胞内出现一些小囊泡,核内异染色质开始减少。第 10 周龄以后,小脑皮质内颗粒层神经细胞的胞体核质比逐渐降低,膜性细胞器种类增加,线粒体变大增多、小囊泡和少量的泡状粗面内质网逐渐增加,多分布在核的一侧,或核周围,与核膜联系密切。胞质

内的核糖体较多,散布在细胞质中,到第 14 周龄,有少量核糖体聚集成团。这一时期,细胞核内异染色质颗粒逐渐降低,细胞核双层膜之间的间隙较大,在细胞器较少的一侧,核膜向外突出形成较大的泡状结构,如第 13 周龄(图版 II-1)。小脑皮质内颗粒层细胞的细胞器增加缓慢,一直到出生前细胞内细胞器以及细胞核的变化都不是很大(图版 II-2,3)。



图版 I 出生前山羊小脑皮质外生发层细胞超微结构的发育变化

1. 第 11 周龄小脑皮质外生发层细胞, $\times 5\ 000$; 2. 第 16 周龄小脑皮质外生发层细胞, $\times 5\ 000$

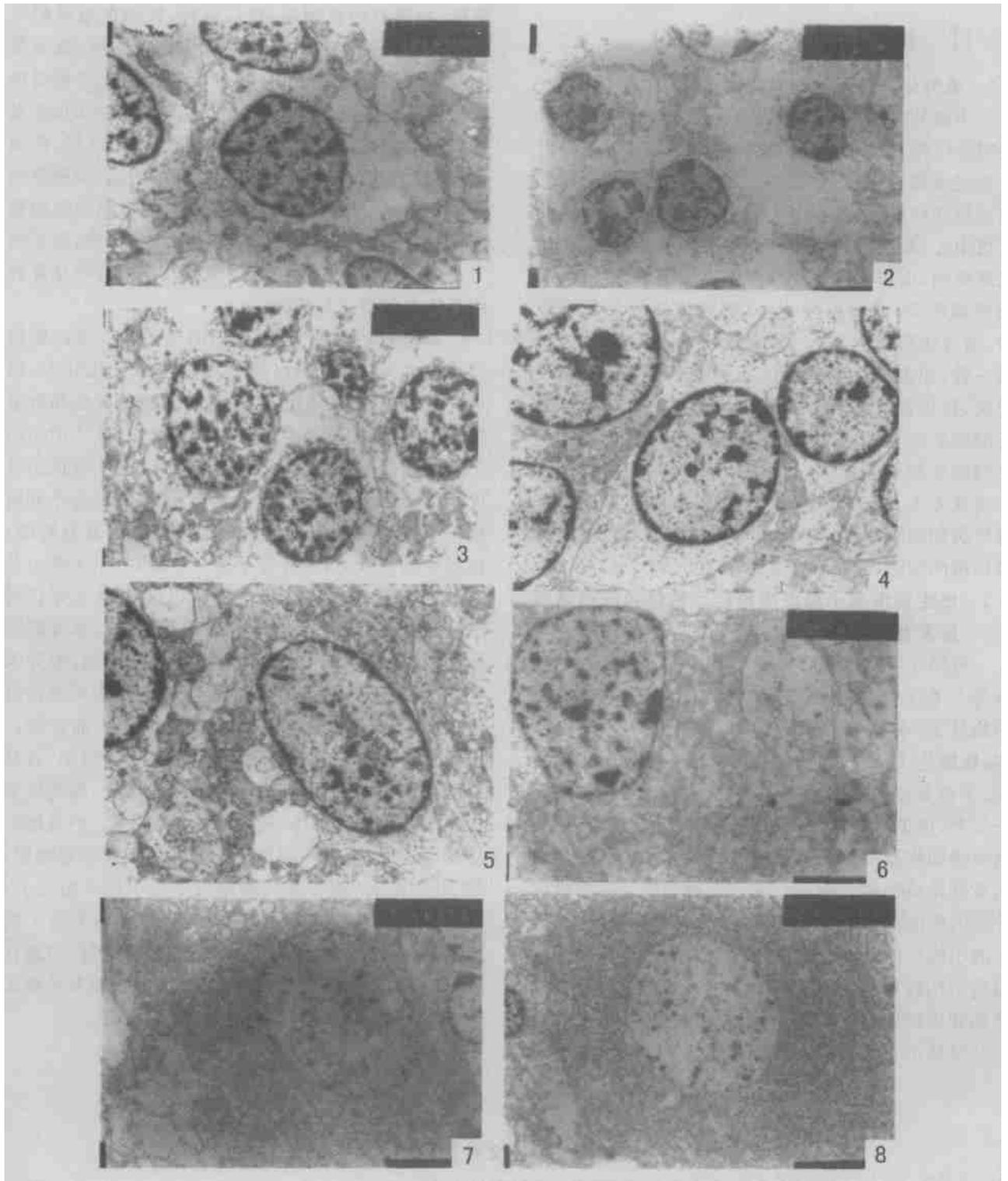
Plate I Ultrastructural development change of perikaryons in external granular layer of cerebellar of prenatal goat

1. The 11th weekend, the perikaryons in external granular layer of cerebellar, $\times 5\ 000$; 2. The 16th weekend, the perikaryons in external granular layer of cerebellar, $\times 5\ 000$

2.3 出生前山羊小脑皮质浦肯野氏细胞超微结构的发育变化

在第 7 周龄以前从超微结构上很难把浦肯野氏细胞和内颗粒层细胞区分开来。到第 7 周龄内颗粒层浅层有少量细胞核质比变小,胞质内出现少量线粒体及低密度的小囊泡,核膜间隙变大,有的呈泡状,核内异染色质减少,趋边分布,与核膜相连(图版 II-4)。到第 8 周龄,位于内颗粒层浅层的浦肯野氏细胞内核糖体增多,除线粒体、小囊泡外,还出现少量泡状粗面内质网,双层核膜内的间隙较小,核内异染色质颗粒减少。第 9 周龄,浦肯野氏细胞增大,呈梨形,胞质内嵴不明显的线粒体较多,核糖体和小囊泡及内质网增多,多位于核的一侧,核内异染色质减少,核仁发达,其纤维区较疏松,颗粒区散布在周围(图版 II-5)。以后,浦肯野氏细胞内的细胞器逐渐增多,线粒体和电子密度低的小囊泡不断增多,细胞核双层膜内间隙较大,在细胞器较少的一侧核膜向外凸出,呈泡状,核内异染色质颗粒减少。到第 14 周龄,浦肯野氏细胞胞体较大,易于辨认,胞体内细胞器较多,线粒体丰富,嵴明显,大小不等,电子密度不同的泡状结构很多,如泡状滑面内质网和粗面内质网较多,核糖体多散在分布于其他细胞器之间,细胞核增大,双层核膜的间隙变小,核内异染色质少,常

染色质发达,核仁数个(图版 II-6)。第 15 周龄,浦肯野氏细胞内各种细胞器进一步增多,在主树突一侧分布较多,出现高尔基体和少量溶酶体,电子密度不同的小囊泡丰富,核糖体散布于其他细胞器之间,细胞核双层膜的间隙仍明显,核内常染色质发达,核仁数个,中央核仁的纤维区疏松,较发达,颗粒区散在。第 16 周龄以后,浦肯野氏细胞内细胞器进一步增多,充满整个胞体,线粒体增多,嵴明显,出现长杆状线粒体。第 17 周龄浦肯野氏细胞内泡状粗面内质网变大,数量减少,扁平囊状和线状内质网增多,电子密度不同的小囊泡丰富,核糖体增多,散布于其他细胞器之间,在胞体边缘有少量核糖体聚集,高尔基体较多,结构趋于成熟,溶酶体较少(图版 II-7)。随着细胞核变大,核膜结构渐趋成熟,核膜间隙较小,核内常染色质发达,中央核仁纤维区和颗粒区交织在一起,电子密度较大,与发育成熟的神经元细胞核核仁结构相似,其余核仁仅纤维区发达,颗粒区小或无。在这一时期随着内质网的发育,核糖体与其关系越来越密切。到第 19 周龄,尼氏小体开始形成,但不明显。第 20 周龄,随着聚集的核糖体增多,较小的尼氏小体已可辨认,但界限不明显。到第 21 周龄,尼氏小体数量增加,但体积较小者界限不明显(图版 II-8)。



图版 II 出生前山羊小脑皮质内颗粒层细胞及小脑浦肯野氏细胞超微结构的变化

1. 第 13 周龄内颗粒层细胞, $\times 5\ 800$; 2. 第 17 周龄内颗粒层细胞, $\times 3\ 600$; 3. 第 21 周龄小脑内颗粒层细胞, $\times 2\ 900$; 4. 第 7 周龄小脑浦肯野氏细胞, $\times 5\ 000$; 5. 第 9 周龄小脑浦肯野氏细胞, $\times 5\ 000$; 6. 第 14 周龄小脑浦肯野氏细胞, $\times 4\ 800$; 7. 第 17 周龄小脑浦肯野氏细胞, $\times 3\ 600$; 8. 第 21 周龄小脑浦肯野氏细胞, $\times 2\ 900$

Plate II Ultrastructural development change of the perikaryons of inner granular layer, Purkinje cell of cerebellum of prenatal goat
1. The 13th weekend, the perikaryons of inner granular layer of cerebellum, $\times 5\ 800$; 2. The 17th weekend, the perikaryons of inner granular layer of cerebellum, $\times 3\ 600$; 3. The 21th weekend, the perikaryons of inner granular layer of cerebellum, $\times 2\ 900$; 4. The 7th weekend, the perikaryons of Purkinje cell of cerebellum, $\times 5\ 000$; 5. The 9th weekend, the perikaryons of Purkinje cell of cerebellum, $\times 5\ 000$; 6. The 14th weekend, the perikaryons of Purkinje cell of cerebellum, $\times 4\ 800$; 7. The 17th weekend, the perikaryons of Purkinje cell of cerebellum, $\times 3\ 600$; 8. The 21th weekend, the perikaryons of Purkinje cell of cerebellum, $\times 2\ 900$;

3 讨 论

3.1 未分化神经元的超微结构特征

小脑外生发层是小脑皮质在发育过程中的一个暂时性结构,位于小脑最表层,多数学者认为这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,具有增生能力,是小脑皮质发生的次级中心,此层内的细胞一直处于未分化状态。本研究观察到,山羊小脑皮质外生发层细胞的核质比大,细胞器较少,以核糖体为主,细胞核内异染色质较多,多与核膜相连。这一结果与 Caley 等^[8]的研究结果一致:即未分化细胞的核染色质在核周边聚集成团块,核周仅见很薄的胞浆边缘,含少量细胞器,缺乏细胞突起。在羊小脑发育过程中,外生发层细胞之间的突起逐渐增加,外颗粒层细胞超微结构的特征变化不大,较为恒定,此外,在外颗粒层中一直都有分裂相细胞存在,如第 16 周龄时观察到的具有分裂相核的细胞,或正在分裂的细胞。

3.2 出生前山羊小脑皮质神经元胞体内超微结构的发育变化

神经元细胞的发育要经历若干发育阶段。纳冬梅等^[10]在人胚胎视皮质观察到,在 12 周时神经元的胞体大,细胞核一般为圆形或椭圆形,边缘不规则,核染色浅,核内均匀分布大量散在的常染色质颗粒,少量异染色质成簇聚集在核内和核膜下,核仁 1~2 个,可见个别核仁由核膜表面向胞质内突出,细胞质内细胞器可见数量较多的线粒体和少量的粗面内质网及核糖体。Meller 等^[11]在鸡脊髓发现初级成神经细胞内存在大量核糖体,缺乏内质网,有少量散在的小线粒体。闫素云等^[12]根据人胎蓝斑神经元的超微结构特征将其发育阶段分为不成熟期、发育成熟期和成熟期 3 个时期。人胎蓝斑神经元在胎龄 4 个月时显示不成熟的特征:胞核大,呈卵圆形或不规

则形,核膜有内折现象,核仁偏移,核染色质呈粗颗粒状,分布不均匀,多在核周边聚集成团块,细胞浆中可见大量游离核蛋白体,少量的小线粒体和短棒状的粗面内质网。胎龄 6 个月时,蓝斑神经元具有发育成熟期细胞的特征:细胞近圆形,核仁内移,核染色质颗粒变细、变小,疏松分散,胞浆增多,细胞器增多。胎龄 8 个月时,蓝斑神经元已具有成熟细胞的特征:神经元有一个明显的核仁居细胞核中央,核质均匀,胞浆中含有大量线粒体,发育较好的高尔基复合体及散在的游离核糖体。

本研究结果表明,出生前山羊小脑皮质内颗粒层细胞在第 10 周龄以前一直处于未分化状态,第 10 周龄以后开始分化,细胞质内细胞器种类和数量较少,以后细胞器种类和数量增加缓慢。成年动物的小脑皮质内颗粒层细胞的胞质成分很少,而且无尼氏小体。因此,根据闫素云等^[12]对神经元发育分期依据来判定出生前小脑内颗粒层细胞的发育阶段,证据缺乏说服力,还有待于进一步研究。出生前山羊小脑浦肯野氏细胞在第 7 周龄以前处于未分化状态,在第 7 周龄开始分化,第 7~14 周龄,浦肯野氏细胞内的细胞器种类和数量都在逐渐增加,但并未充满整个胞体,细胞器的种类也不齐全,表明浦肯野氏细胞处于不成熟期;到第 15~18 周龄,浦肯野氏细胞内各种细胞器都已出现,数量也不断增加,各种细胞器充满整个胞体,尼氏小体尚未形成,细胞核双层膜的间隙逐渐减小,核内常染色质发达,中央核仁结构渐趋成熟,表明浦肯野氏细胞处于发育成熟期;第 19 周龄时,浦肯野氏细胞内尼氏小体开始形成,以后尼氏小体的数量不断增加,但直到出生前 1 周时其体积较小,界限不明显,这表明浦肯野氏细胞自第 19 周龄开始进入成熟期,但在出生前尚未完全成熟,出生后仍存在一个较长生后发育过程。

[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] Bertossi M, Roneasli L, Mancini L, et al. Process of differentiation of cerebellar Purkinje neurons in the chick embryo[J]. *A nat Embryo* (Berl), 1986, 175(1): 25-32.
- [3] Walsh C, Cepk C L. Cell lineage and cell migration in the developing cerebral cortex[J]. *Experientia*, 1990, 46: 940-947.
- [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] 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.
- [7] 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.
- [8] Caley D W, Marxwell D S. An electron microscopic studies of neurons during postnatal development of the rat cerebral cortex[J]. *J Comp*

NeuroI, 1968, 8: 17- 34

[9] 何 真 人小脑皮质颗粒细胞的发育——扫描电镜研究[J]. 神经解剖学杂志, 1986, 2(2): 239- 244

[10] 纳冬梅, 王荣华, 孙 强, 等 人胚胎视皮质神经元发育的体视学分析[J]. 解剖学杂志, 1999, 22(6): 529- 532

[11] M eller X, Eschuer J, Glees P. The differentiation of endoplasm ic reticulum in developing neurons of the chick spinal cord[J]. Z Cell-forsch, 1996, 69: 189- 197.

[12] 闫素云, 曲跃华. 人胎蓝斑神经元的电镜观察[J]. 神经解剖学杂志, 2000, 16(2): 151- 153

U ltrastructural study of developing cerebellar cortex neurons of prenatal goat

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

(Institute of Bio-Engineering, College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This paper observes the ultrastructure of the neurons in cerebellar cortex of prenatal goat. The results are as the following: (1) The inner granule cells of cerebellar cortex of prenatal goat were undifferentiated till the tenth week, then they begin to develop and differentiate. But the variety and quantity of cell organ in it increased very slowly before birth. (2) The Purkinje cells of cerebellar cortex were undifferentiated before the seventh week, and then began to differentiate and develop at the seventh week. The Purkinje cells were in immature stage from the seventh week to the fourteenth week. The Purkinje cells were youthful neurons from the fifteenth week to the eighteenth week. In this stage all kinds of cell organs appeared and were full of the cell body of the Purkinje cell, the karyon membrane went mature, the euchromatin was well developed, the nucleolus was matured as well. The Purkinje cells went into the ripe stage at the nineteenth week. The Nissl bodies come into being and develop, but it was small and its confines was unclear. This indicate that the Purkinje cells were immature in prenatal goat, and will take a development course in postnatal stage.

Key words: ultrastructure; development; neuron; cerebellar cortex; prenatal goat