

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.02.007

人类胚胎三叉神经运动核的定位研究*

凯赛尔江·多来提¹ 古丽美热·艾买如拉² 吐尔逊江·达地汗¹ 迪力夏提·艾尼³廖礼彬⁴ 迪力木拉提·艾尼⁵ 李 杰⁵ 陈胜国¹ 古丽尼沙·克力木^{1Δ}

(1 新疆医科大学基础医学院人体解剖学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011;

2 新疆医科大学第六附属医院检验科 新疆 乌鲁木齐 830002;

3 新疆医科大学第五附属医院药剂科 新疆 乌鲁木齐 830011;

4 新疆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011;

5 新疆医科大学临床医学本硕 2014-4 班 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的:探讨人类胚胎三叉神经运动核的位置及细胞分布特征。**方法:**选用非疾病死亡的引产胚胎标本 4 例,胎龄 20-26 周(根据胎儿 B 超检测和孕妇末次月经日期来计算并获得胎龄),在获取标本 1-4 小时内,对标本进行灌流固定。其中,2 例标本在手术显微镜下开颅取出脑干,石蜡包埋、冰冻切片、HE 染色、光学显微镜下观察、照相,其余 2 例标本在手术显微镜下开颅、分离三叉神经根,注入 DiI 结晶体、在 37℃ 恒温箱内保存 3 个月,取出脑干、明胶包埋、冰冻切片,在荧光显微镜下观察、照相。**结果:**① 胚胎三叉神经运动核位于脑桥三叉神经根连脑水平;② 三叉神经运动核为多级细胞、胞体较大、位于三叉神经根入脑桥的一束纤维的腹内侧;③ 三叉神经运动核呈椭圆形,神经核细胞呈大小不等,体积较大,胞体呈多角形。**结论:**人类胚胎三叉神经运动核为大型的多级细胞成群所形成的核团,位于脑桥三叉神经根连脑水平。

关键词:三叉神经运动核;DiI;胚胎**中图分类号:**R-33; R322 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)02-226-04

A Study on the Location of Trigeminal Motor Nucleus in the Human Fetus*

Kaisaijiang·Duolaiti¹, Gulimeire·Aimairula², Tuerxunjiang·dadihan¹, Dilxat·Gheni³,LIAO Li-bin⁴, Dilmurat·Gheni⁵, LI Jie⁵, CHEN Sheng-guo¹, Gulnisa·Kerem^{1Δ}

(1 Human Anatomy Department of Preclinical College of Xinjiang Medical University Urumqi, Xinjiang, 830011, China;

2 Department of Clinical Laboratory of Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830002, China;

3 Department of pharmacy, Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China;

4 Histoembryology Department of Preclinical College of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China;

5 Clinical Medicine Class 2014-4 Licenciatura Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objective: To observe the location of trigeminal motor nucleus in human fetus. **Methods:** 4 cases of human embryonic specimens which non-disease deaths of the fetus induced labor, gestational age 20 -26weeks (The age of gestational age was obtained by based on the date of the last menstrual period of the pregnant woman, and the ultrasound examination and the measurement of the specimen), obtaining the specimen within 1 to 4 hours. The specimens were fixed. 2 specimens, take out the brain stem under the operation microscope, and the paraffin embedding, frozen section, HE staining, and observe and take photos under optical microscope. In the rest 2 specimens, under operation microscope, separate root of the trigeminal nerve and inject with DiI, keep 3 months in incubator at 37℃, and take out the brain stem, gelatin embedding, frozen section, observe and take photos under the fluorescence microscope. **Results:** ① The trigeminal motor nucleus is located in level of pons connect with the root of trigeminal nerve. ② The trigeminal motor nucleus is a multistage cell, cell body is larger and located in the ventromedial part of the pons connect with root of the trigeminal nerve. ③ The trigeminal motor nucleus is oval shape, nerve cells are unequal size, the cell is larger, cell body is polygon shape. **Conclusion:** The trigeminal motor nucleus in human fetus is a large nucleus formed by multistage cells, and located in level of pons connect with the root of trigeminal nerve.

Key words: Trigeminal motor nucleus; DiI; Human fetus**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R322 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2018)02-226-04

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31360284)

作者简介:凯赛尔江·多来提(1978-),硕士,副教授,主要研究方向:神经解剖学,电话:18999151124, E-mail: kaisaijiang1978@163.com

Δ 通讯作者:古丽尼沙·克力木(1961-),硕士研究生导师,教授,主要研究方向:神经解剖学, E-mail: 709926917@qq.com

(收稿日期:2017-07-22 接受日期:2017-08-17)

前言

1,1' - 双十八烷 -3,3,3' 3' - 四甲基吡啶花青 - 高氯酸盐 (DiI-C18-(3), 简称 DiI) 是毒性极小、不溶于水的紫红色晶体, 是一种具有高度亲脂性的花青染料之一, 易嵌入细胞膜脂质双层内, 不但不影响被标记细胞的存活和生长, 而且不向胞体外扩散和在标记细胞内消灭较慢。DiI 在神经生物学、组织细胞学和胚胎学研究方面已成为中常用的分子探针之一。随着神经解剖学研究方法的进一步发展, DiI 也在神经解剖研究领域也被广泛应用^[1-3]。1986 年, Honig 等^[4]首次将 DiI 应用于神经系统的研究, 成功地显示了 DiI 特异性地标记神经元的突起与胞体, 并在神经纤维中进行逆行与顺行扩散。目前, 对人类胚胎三叉神经运动核的定位研究方面尚未见文献报道。因此, 本研究应用 DiI 染色技术对人类胚胎三叉神经运动核进行形态学定位研究。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究选用非疾病死亡的引产胚胎标本 4 例, 胎龄为 20-26 周, 性别不限(根据胎儿 B 超检测和孕妇末次月经日期来计算并获得胎龄), 在获取胚胎标本 1-4 小时内, 对胚胎标本进行灌流固定。DiI 染色晶体由上海浩然生物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 标本固定 选择 1-4 小时内获取的新鲜胚胎标本, 先打开胚胎胸腔暴露心包区, 然后切开胚胎心包完全暴露心脏及其连接的大血管, 将输液针头插入胚胎升主动脉处, 在胚胎右心房处, 用剪刀切开一个小切口。使用 50 mL 注射器连续推注 0.9% 生理盐水 500 mL 左右, 然后再用 1500 mL 左右的新鲜配制的 10% 福尔马林溶液灌注固定胚胎标本。灌注完福尔马林溶液后, 将胚胎标本继续放在新鲜配制的 10% 福尔马林溶液中进行固定并室温下避光保存。

1.2.2 取材切片 2 例 20 周至 26 周胚胎标本待完全固定后, 切取胚胎头部, 用 PBS 缓冲液冲洗干净后, 沿胚胎头部耳廓上方约 1 cm 处环形去除头部皮肤及颅盖骨, 然后切开硬脑膜, 暴露大脑, 摘取左右大脑半球和间脑。在外科手术显微镜下充分暴露胚胎脑干部分、找出三叉神经根、切断跟脑干所连接的大脑神经根处、取出脑干, 在新鲜配置的 10% 福尔马林溶液中浸泡并进行固定后, 干燥处避光保存, 用于脑干形态学观察和制作 HE 染色切片。另外 2 例胚胎标本用上述同样方法完全暴露脑干, 应用外科手术显微镜完全暴露三叉神经根, 然后在三叉神经根下方垫一小块长条形封口膜, 先用 7% 明胶封闭周围神经组织, 等明胶凝固好后, 离脑干约 5 mm 处, 切开三叉神经外膜, 用插入针取 DiI 染色晶体, 植入神经外膜内并复位好神经外膜, 再用小镊子钳夹神经纤维束, 使 DiI 染色晶体能在神经纤维束内均匀扩散, 最后将目标神经根下方的封口膜抱住目标神经, 然后用 7% 明胶封闭, 防止 DiI 染色晶体向周围神经组织扩散。然后用锡箔纸包裹植入 DiI 染色晶体的胚胎标本放入 10% 福尔马林溶液中, 将标本在 37℃ 恒温箱中避光保存, 等待 DiI 染色晶体在胚胎标本内完全扩散。3 个月, 取出脑干, 明胶包埋、并使用恒冷切片机按 6 μm 厚度做连续切片, 最后用荧

光显微镜(Motic BA-400)观察 DiI 染色晶体在胚胎标本中的扩散情况并照相采集图片及作出分析。

2 结果

2.1 人胚胎脑干的外形, 三叉神经的连脑部位及注入标记物部位

人胚胎 20 周以上的脑干外形基本具备成人脑干外形特点, 肉眼观察时中脑、脑桥、延髓的结构都能观察到(图 1A-B)。观察脑干所连接的脑神经并明确三叉神经的连脑部位及三叉神经感觉根和运动根后注入 DiI 荧光标记物(图 1C-D)。

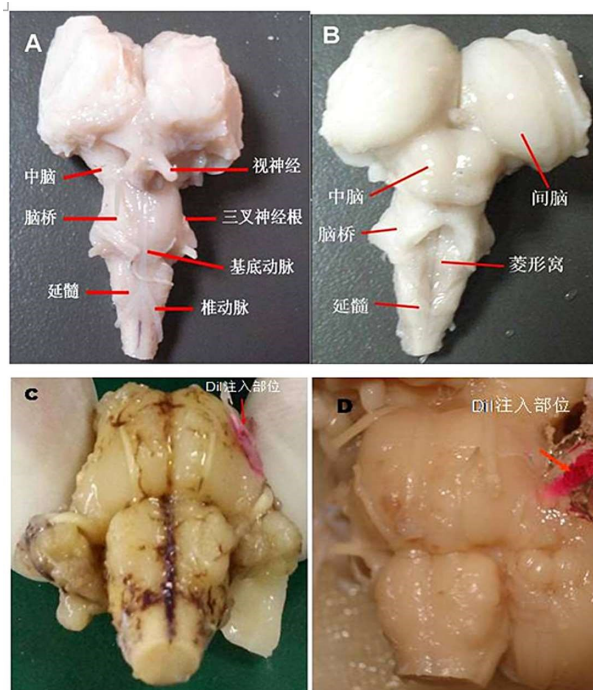


图 1 人胚胎脑干的外形, 三叉神经的连脑部位及注入标记物部位

Fig.1 The shape of brain stem of human fetus, the place of connect with brain and injected marker of trigeminal nerve

注: A. 脑干的腹侧面观; B. 脑干的背侧面观; C. 三叉神经运动根注入 DiI 部位; D. 三叉神经感觉根注入 DiI 部位 Note: A. The ventral view of the brain stem; B. The dorsal view of the brain stem; C. The motor root of the trigeminal nerve injected with DiI; D. The sensory root of the trigeminal nerve injected with DiI

2.2 三叉神经运动核的位置及形态

用自动成像技术组成每张切片的原图后, 在低倍镜下观察并拍照结果显示有一群细胞呈椭圆形配布(图 2 A-B)。此群细胞出现于一束较粗纤维的内侧, 为大小不、体积较大、胞体呈多角形的一群细胞(图 2 C-D)。经过 HE 染色和荧光标记图片结果进行融合来确定这组细胞群为三叉神经运动核。在三叉神经根连脑高度的脑桥水平切面上可以看到一束从腹外侧向背内侧走行的神经纤维(图 2 F-G)。

3 讨论

三叉神经(trigeminal nerve)为十二对脑神经之中的第五对脑神经, 是混合性脑神经之一, 由两种纤维成分所组成。一种是一般躯体感觉纤维, 其神经元胞体位于颅中窝颞骨岩部三叉神

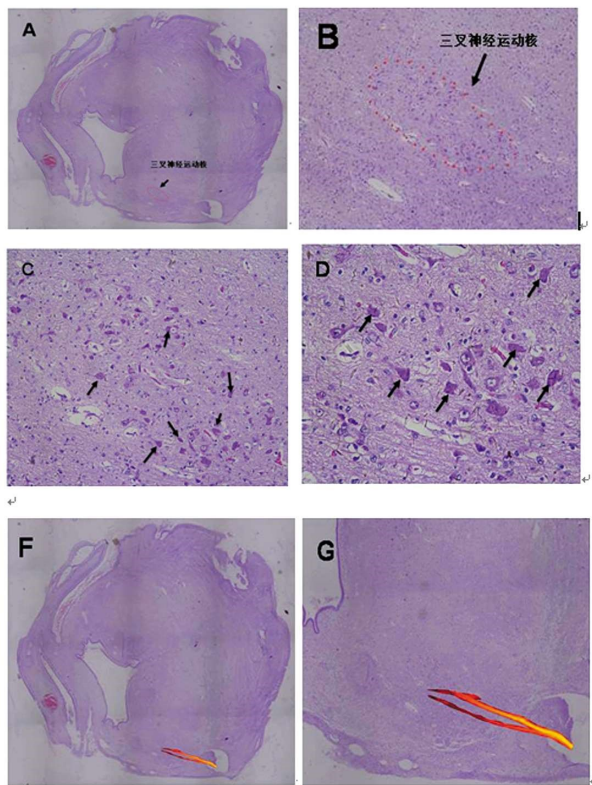


图2 人胚胎三叉神经运动核、运动纤维的位置及形态

Fig. 2 The location and morphology of trigeminal motor nucleus and motor fibers in human fetus

注: A 和 B 三叉神经运动核 C 和 D 三叉神经运动核细胞
F 和 G 三叉神经运动纤维

Note: A and B trigeminal motor nucleus;

C and D trigeminal motor nucleus cells; F and G trigeminal motor fibers

经压迹处、由假单极神经元组成的三叉神经节(Trigeminal ganglion)内。三叉神经节的中枢突组成三叉神经感觉根,在脑干脑桥臂和脑桥基部交界处入脑,传到头面部触觉的神经纤维终止于三叉神经脑桥核,传到温觉、痛觉的神经纤维终止于三叉神经脊束核。三叉神经节的周围突分别组成三叉神经三大分支眼神经(Ophthalmic nerve)、上颌神经(Maxillary nerve)、下颌神经(Mandibular nerve)。另一种纤维是特殊内脏运动纤维,起源于特殊内脏运动核之中的三叉神经运动核,三叉神经运动核发出来的特殊内脏运动纤维成分组成三叉神经运动根,从脑桥臂和基部交界处出脑,纤维成分加入到三叉神经第三大分支下颌神经内支配咀嚼肌等肌肉的运动^[5]。三叉神经运动核是三叉神经四个核的其中之一,是三叉神经运动核(Trigeminal motor nucleus)位于三叉神经脑桥核的腹内侧,脑桥中部网状结构背外侧,两者之间以三叉神经纤维分隔。三叉神经运动核接受同侧和对侧皮质脑干束(皮质核束)传入神经的支配^[6]。

DiI 染色晶体是一种属于羰花青染料的紫红色荧光染色晶体,脂溶性较高,不溶于水,能沿神经纤维进行逆行和顺行扩散,还能与神经元树突和轴突膜上的脂质膜容易结合^[7,8]。DiI 与神经元轴突和树突膜上的脂质的结合处于稳定状态,DiI 染色晶体也可以适用于甲醛固定后的标本,以能获得较长稳定的染色效果。DiI 染色晶体在神经系统标本内扩散 2 年时间后,也不能越过神经突触, DiI 染色晶体在固定脑组织中沿神经细胞质

膜扩散速度比较慢^[9,10]。Godement 等^[11]报道 DiI 染色晶体扩散速度大约 400 $\mu\text{m}/\text{d}$,扩散距离也有限,一般最大距离 10-12 mm 左右, DiI 在本内扩散所需时间大约在 3 个月左右,对标本储存时间再延长,但对 DiI 在标本内扩散变化也未见到任何改变。因此,本次实验研究确定 DiI 染色晶体在胎儿标本中的扩散时间定为 3 个月。研究表明目前 DiI 主要应用于鱼类视觉传导路^[12]、小鼠三叉神经节^[13]、小鸡^[14]、大鼠^[15-18]、人类胚胎三叉神经^[19-21]等脑神经核和脑神经的位置及其细胞形态分布研究。

目前,对鱼类、大鼠^[22-24]等动物的三叉神经运动核有不少的研究,结果表明鱼类三叉神经运动核分为腹侧和背侧两组细胞群,三叉神经根注入列中两组细胞群都能观察到被标记的细胞,下颌神经注入列中被标记的细胞以背侧群为主,上颌神经及眼神经注入列中两组细胞都没有发现被标记细胞,但上颌神经组中能观察到神经终末及突触联系。三叉神经运动核发出的纤维走行于下颌神经内^[25]。本实验结果显示在三叉神经根连脑高度的脑桥水平切面上可以看到一束从腹外侧向背内侧走行的神经纤维,此纤维的内侧出现大小不等,体积较大,胞体呈多角形的一群细胞。在低倍镜下观察并拍照结果显示这群细胞呈椭圆形配布。经过 HE 染色和荧光标记图片结果进行融合来确定这组细胞群为三叉神经运动核。以上结果表明人类胚胎三叉神经运动核为大型的多级细胞成群所形成的核团,位于脑桥三叉神经根连脑水平。

参考文献(References)

- [1] Kiszler Gabor, Varhalmi Eszter, Berta Gergely, et al. Organization of the sensory system of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida, Clitellata) visualized by DiI [J]. *Journal of Morphology*, 2012, 273(7): 737-745
- [2] Ayadi Sofiene, Daghsous Amine, Makni Amine, et al. Prognostic factors in gastric carcinoma after R0 resection with DiI lymph node dissection. Tunisian experience [J]. *La Tunisie medicale*, 2012, 90(11): 812-8155
- [3] Majkowski Michal, Poda Pawel, Kulbacka Julita, et al. Alternation of Fluorescent Spectra of Membrane Markers DiI C18(3) and DiI C18(5) Evoked by Laser Illumination [J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2012, 60(10): 789-791
- [4] Honig M G, Hume R I. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures [J]. *J Cell Biol*, 1986, 103(1): 171-187
- [5] Wu Kai-yun, Xu Fei. *Systematic Anatomy* [M]. World Publishing Corporation, 2011, 11: 287-377
- [6] 白树令, 应大君. 系统解剖学 [M]. 人民卫生出版社, 2013, 3: 298
- [7] Bai Shu-ling, Ying Da-jun. *Systematic Anatomy* [M]. People's Medical Publishing House, 2013, 3: 298
- [8] D'A Biagio, L Luciano, R Rakesh K, et al. Tract-Tracing Study of the Extrabulbar Olfactory Projections in the Brain of Some Teleosts [J]. *Microscopy research and technique*, 2015, 78(4): 268-276
- [9] Green. Stephen A, Uy Benjamin R, Bronner. Marianne E. Ancient evolutionary origin of vertebrate enteric neurons from trunk-derived neural crest [J]. *Nature*, 2017, 544(7648): 88-91
- [10] Froelich K A, Steussloff G, Schmidt K B, et al. DiI Labeling of Human Adipose-Derived Stem Cells: Evaluation of DNA Damage, Toxicity

- and Functional Impairment [J]. Cells Tissues Organs, 2013, 197(5): 384-398
- [10] L Michelle, T Mary, L Jodie, et al. Tracing Cranial Nerve Pathways (Glossopharyngeal, Vagus and Hypoglossal) in SIDS and Control Infants: A DiI Study [J]. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2000, 59(9): 822-829
- [11] Godement P, Vanselow J, Thanos S, et al. A study in development visual system with a new method of staining neurons and their processes in fixed tissue[J]. Development, 1987, 101(4): 696-713
- [12] 凯赛尔江·多来提, 古丽美热·艾买入拉, 古丽尼沙·克力木, 等. DiI 对鱼类视觉传导路的形态学研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(26): 5012-5015
- Kaisaierjiang · Duolaiti, Gulimeire · Aimairula, Gulnisa · Kerem, et al. A study on the morphology of Visual Pathway in Tilapia by DiI[J]. Progress in modern biomedicine, 2013, 13(26): 5012-5015
- [13] 凯赛尔江·多来提, 古丽美热·艾买入拉, 古丽尼沙·克力木, 等. 小鼠眼神经注入 DiI 后三叉神经节的形态学研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(24): 4608-4614
- Kaisaierjiang · Duolaiti, Gulimeire · Aimairula, Gulnisa · Kerem, et al. A study on the morphology of Trigeminal Ganglion in Mice by Ophthalmic Nerve Injected with DiI [J]. Progress in modern biomedicine, 2013, 13(24): 4608-4614
- [14] Natio J, Chen Y. Morphotogic analysis and classification of ganglion Cells of the chick retina By intracellular injection of lucifer yellow and retrograde labelling with DiI [J]. J Comp Neurol, 2004, 469 (3): 360-376
- [15] Man&do M, Molist P, Anad6n R, et al. A DiI-tracing study of the neural connections of the pineal organ in two elasmobranchs (Scyliorhinus canicula and Raia montagui)suggests a pineal projection to the midbrain GnRH immunoreactive nucleus [J]. Cell Tissue Res, 2001, 303(3): 391-401
- [16] 常丽荣, 高秀来, 陈亚亮, 等. DiI 逆行追踪大鼠皮质脊髓束[J]. 解剖学报, 2007, 38(3): 376-378
- Chang Li-rong, Gao Xiu-lai, Chen Ya-lian, et al. DiI Anterograde-tracing The Corticospinal Tract of The Rat [J]. Acta Anatomica Sinica, 2007, 38(3): 376-378
- [17] 宋起滨, 刘晓燕, 曹惠鹏, 等. CM-DiI 标记大鼠脂肪干细胞的效力 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(23): 4222-4226
- Song Qi-bin, Liu Xiao-yan, Cao Hui-juan, et al. Fluorescent dye CM-DiI labeled rat adipose derived stem cells [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2012, 16(23): 4222-4226
- [18] 穆小云, 梁爽, 付苏, 等. DiI 示踪标记固定脑组织内神经元及其突起的方法[J]. 解剖学杂志, 2015, 38(2): 212-213
- Mu Xiaoyun, Liang Shuang, Fu Su, et al. DiI tracing method to label neurons and their processes in the fixed mouse brain [J]. Chinese Journal of anatomy, 2015, 38(2): 212-213
- [19] 吐尔逊江·达地汗, 穆叶沙尔·吾拉木, 古丽尼沙·克力木, 等. DiI 在已固定人胚胎周围神经的示踪研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(10): 1234-1236
- Tuerxunjiang · Dadihan, Muyeshaer · Wulamu, Gulnisa · Kerem, et al. The Tracing Study of DiI in The Peripheral Nervese of Fixed Human Embryo [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2015, 38(10): 1234-1236
- [20] 吐尔逊江·达地汗, 穆叶沙尔·吾拉木, 古丽尼沙·克力木, 等. 人胚胎三叉神经连续切片的三维重建 [J]. 解剖学杂志, 2016, 39(3): 308-310
- Tuerxunjiang · Dadihan, Muyeshaer · Wulamu, Gulnisa · Kerem, et al. Reconstruction of the trigeminal nerve of human embryo based on serial sections[J]. Chinese Journal of anatomy, 2016, 39(3): 308-310
- [21] 吐尔逊江·达地汗, 陈胜国, 古丽尼沙·克力木, 等. 人胚胎三叉神经感觉纤维及运动纤维的形态学研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(3): 289-292
- Tuerxunjiang · Dadihan, Chen Sheng-guo, Gulnisa · Kerem, et al. The morphological study of sensory fibers and motor fibers of the human bryonic trigeminal nerve [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2016, 39(3): 289-292
- [22] 庞有旺, 张富兴, 李金莲. 大鼠三叉神经中脑核到三叉神经运动核的间接投射通路研究[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(6): 717-721
- Pang You-wang, Zhang Fu-xing, Li Jin-lian. The study of indirect projection pathways from the mesencephalic trigeminal nucleus to the trigeminal motor nucleus of rats [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2016, 32(6): 717-721
- [23] 陶发胜, 张建林, 梅冠庭, 等. 5-羟色胺能神经元向三叉神经运动核和感觉核的投射[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(11): 1321-1324
- Tao Fa-sheng, Zhang Jian-long, Mei Guan-ting, et al. Projection of serotonergic neurons to the trigeminal motor nucleus and sensory nucleus[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2000, 21(11): 1321-1324
- [24] 庞有旺, 郑季南, 洪庆南, 等. I 型囊泡膜谷氨酸转运体在生后发育大鼠三叉神经运动核中的表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21(5): 476-478
- Pang You-wang, Zheng Jin-an, Hong Qing-nan, et al. Expression of vesicular glutamate transporter I in the trigeminal motor nucleus of developing rats [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2012, 21(5): 476-478
- [25] 凯赛尔江·多来提, 古丽美热·艾买入拉, 古丽尼沙·克力木, 等. 鱼类三叉神经运动核的形态学研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(21): 4023-4026
- Kaisaierjiang · Duolaiti, Gulimeire · Aimairula, Gulnisa · Kerem, et al. A study on the morphology of trigeminal motor nucleus in tilapia[J]. Progress in modern biomedicine, 2013, 13(21): 4023-4026