向 炜^{1,2} 罗学港¹ 卢大华^{1△} 贺立新^{1,3}

(1中南大学基础医学院人体解剖学与神经生物学系 湖南 长沙 410013;2 常德职业技术学院解剖系 湖南 常德 415000;3 湘潭职业技术学院护理系解剖学教研室 湖南 湘潭 411102)

摘要 目的 :研究人体小脑神经元的发育过程。方法 :应用体视学方法 ,对 18 例不同时期人体小脑组织 Golgi 染色后进行观察 ,观 测小脑皮质分层出现的时间 ,观测并计算神经元的数密度、体密度和表面积密度。结果 6 月龄时 小脑皮质出现较明显的分子层、 蒲肯野细胞层和颗粒层 ;星形细胞、篮状细胞、蒲肯野细胞、颗粒细胞和高尔基细胞的的数密度随月龄 / 年龄的增长而减少 ,体密 度和表面积密度随月龄 / 年龄的增长而增加 ,但这些减小和增大是不等速的 ,6-8 月龄变化最明显。结论 :人体小脑神经元的发育 呈现快慢交替、不均速发展 ,6~8 月是小脑神经元发育的重要时期。

关键词:小脑:神经元:发育:体视学

中图分类号 :R322.81 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)10-1865-04

Quantitative Observation on Development of Human Cerebellar Neurons

XIANG Wei^{1,2}, LUO Xue-gang¹, LU Da-hua^{1,Δ}, HE Li-xin^{1,3}

(1 Dept. of Human Anatomy and Neurobiology of Basic Medince College of Central South University, 410013, Changsha, China; 2 Dept. of Human Anatomy of Changde Vocational Technical College, 415000, Changde, China;

3 Teaching and Research Section of Human Anatomy of Nursing Faculty of Xiangtan of Changde Vocational Technical College,

411102, Xiangtan, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the development progress of cerebellar neurons in human body. Methods: Eighteen differentperiods cerebellar neurons were observed after Golgi staining on layered appearance time of the cerebellar cortex and number density, bulk density & surface area density of neurons by stereology.Results:In the sixth moon's age, apparent molecular layer, Purkinje cell layer and granular layer were observed in cerebellar cortex. The number densities of stellate cells, basket cells, purkinje cells, granule cells and golgi cells decreased by the increment of month/age, while bulk densities and surface area densities increased. But these decrease and increase were not constant , with the most apparent changes from the sixth to the eighth moon's ages. Conclusion:The development of human cerebellar neurons shows fasting-slowing alternation and uneven speed.The moon's ages from the sixth to the eighth are the important periods of development of cerebellar neurons.

Key words: cerebellum; neuron; development; stereology

Chinese Library Classification(CLC): R322.81 Document code: A Article ID:1673-6273(2011)10-1865-04

小脑是中枢神经系统中与执行运动机能有关的较高级调 节中枢。学者对动物小脑形态、细胞构筑、纤维联系及神经递质 等方面做了大量工作,积累了丰富的动物学资料,但是关于人 体小脑形态学研究不论是胚胎期发育,还是成体结构均相对欠 缺^[15]。本研究应用体视学方法^[610],以二维结构推算出三维结 构,以观察人体小脑神经元在发育过程中的变化,探讨其发生 规律,为胚胎学神经系统的研究积累形态学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

取长沙地区引产胎儿(胎龄 16-40 周,以产妇末次月经计 算,每4周为1月龄组) 8-14岁龄非脑源性疾病死亡儿童和非 脑源性疾病死亡成人(≥18岁),共计18例,分为9组;4、5、6、

作者简介 :向炜(1982-) ,女 助教 ,主要研究方向 :神经系统发育 △通讯作者 :卢大华 ,Email :ludahua@yahoo.com (收稿日期 2011-03-03 接受日期 2011-03-28) 7、8、9、10月龄组、8-14岁儿童组(8岁、10岁)和成人组(20岁、 31岁),每组2例,每例做切片10片,相应分层区域随机观察 20个视野。

每例在同一部位取新鲜小脑组织两块 A 液、B 液固定 C 液包埋,冰冻快速切片后以长轴方向作厚 100um 的垂直切片,进行 Golgi 染色 透明封片。

1.2 方法

1.2.1 Golgi 染色

蒸馏水漂洗切片 2 次,每次 2min ;放在混合液(Solution D: Solution E:Distilled water=1:1:2)中浸至 10min ;蒸馏水漂洗切 片 2 次,每次 4min ;甲酚紫(或硫堇)复染切片;分别用 50%、 75%、95%酒精进行脱水,每次 4min ;无水酒精脱水 4 次,每次 4min ;用二甲苯(或二甲苯替代品)进行清洗 3 次,每次 4min ; 中性树脂封片。

1.2.2 定量观察

将 Golgi 染色后的切片置于 400 倍的显微镜下观察 相应

分层区域随机观察 20 个视野,用网形测试系统测其细胞点数 (Px)、细胞截面数(Nx)、细胞交点数(Ix)、细胞最长径及与其垂直 的宽径,按 Wall φe 等^[7]介绍的密度参数测算法计算各神经元细 胞的数密度、体密度和表面积密度。数密度公式 Nv=[1/(β × a^{32}]]×[($\sum Nx$)³²/($\sum Px$)¹²($\sum Pc$)],体密度公式 Vv=($\sum Px$)/($\sum Pc$), 表面积密度公式 Sv=2× (Pt/Lt)×[($\sum Ix$)/($\sum Pc$)]。式中 Pc :包 容空间的测试点数;Pt :视野中网格系统的测试点数;Lt :视野中 平行横线的长度 β 形态系数 a :1 个测试点相当的面积。 1.23 统计学分析

采用 SPSS15.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均 数±标准差(x±s)表示,应用 t 检验进行分析 ,a=0.05 P<0.05 认 为有统计学意义。

2.1 小脑皮质分层时间

4 月龄时 小脑皮质出现外颗粒层 细胞密集 ,大小基本一 致。5 月龄时 ,外颗粒层细胞逐渐减少 ,一部分向内迁移 ,出现 外颗粒层、中间层和内颗粒层 ,但仍未见典型的分子层、蒲肯野 细胞层和颗粒层。直到 6 月龄 ,外颗粒层细胞因大量迁出而逐 渐减少 ,分化为星形细胞和篮状细胞 ,外颗粒层形成了分子层 ; 中间层分化为蒲肯野细胞层 ;内颗粒层成为了颗粒层。

2.2 星形细胞和篮状细胞数密度、体密度、表面积密度的变化

星形细胞和篮状细胞的数密度随月龄/年龄的增长而减 少 6-9 月龄减少较明显,尤其是 6-7 月龄 (P<0.01),10 月龄 组、儿童组以及成人组变化不明显;体密度和表面积密度随月 龄/年龄的增长而增加 6-8 月龄变化较明显,其余变化不大 (表 1、2)。

2 结果

Groups \ Contents	Number density(/ mm ³)	Bulk density(%)	Surface area density(mm ² /mm ³)
6 moon's age	11098.23± 1008.61	0.39± 0.11	2.88± 0.19
7 moon's age	7910.33± 912.84* [#]	0.60± 0.13*	3.39± 0.22*
8 moon's age	6094.72± 934.80*	0.87± 0.20*	3.85± 0.13*
9 moon's age	4931.16± 876.93*	0.92± 0.33	4.11± 0.31
10 moon's age	4419.67± 905.68	0.97± 0.24	4.22± 0.28
Child group	4310.86± 932.78	1.02± 0.17	4.28± 0.27
Adult group	4287.34± 907.67	1.05± 0.26	4.29± 0.32

Note : $\beta = 1.38$; *P ≤ 0.05 compared with above group; #P ≤ 0.01 compared with above group.

表 2 不同时期小脑篮状细胞的数密度、体密度和表面积密度 $(x \pm s)$

Table2 Number density, bulk density and surface area density of cerebellar basket cells in different periods

Groups \ Contents	Number density(/ mm ³)	Bulk density(%)	Surface area density(mm ² /mm ³)
6 moon's age	11517.62± 1014.37	0.50± 0.17	3.56± 0.24
7 moon's age	8109.61± 976.33* [#]	0.89± 0.21*	4.32± 0.31*
8 moon's age	6376.82± 934.65*	1.38± 0.30*	5.24± 0.28*
9 moon's age	5281.76± 964.72*	1.44± 0.27	5.38± 0.19
10 moon's age	4899.37± 945.81	1.47± 0.37	5.41± 0.27
Child group	4745.83± 846.97	1.51± 0.29	5.47± 0.16
Adult group	4739.76± 921.30	1.53± 0.37	5.50± 0.33

Note : $\beta = 1.58$; *P ≤ 0.05 compared with above group; #P ≤ 0.01 compared with above group.

2.3 蒲肯野细胞数密度、体密度、表面积密度的变化

蒲肯野细胞的数密度随月龄/年龄的增长而减少 6-9月 龄减少较明显,尤其是 6-8月龄(P<0.01),10月龄组、儿童组 以及成人组变化不明显,体密度和表面积密度随月龄/年龄的 增长而增加,6-8月龄变化较明显,其余变化不大(表 3)。

2.4 颗粒细胞和高尔基细胞数密度、体密度、表面积密度的变化 颗粒细胞的数密度随月龄/年龄的增长而减少,6-9月龄 减少较明显,尤其是 6-8月龄(P<0.01),10月龄组、儿童组以</p> 及成人组变化不明显;体密度和表面积密度随月龄/年龄的增 长而增加 .6-8 月龄变化较明显 (体密度的增加尤其在 6-7 月 龄 .P<0.01) 其余变化不大(表 4)。

高尔基细胞的数密度随月龄/年龄的增长而减少 6-9月 龄减少较明显,尤其是 6-7月龄(P<0.01),10月龄组、儿童组 以及成人组变化不明显,体密度和表面积密度随月龄/年龄的 增长而增加,6-8月龄变化较明显,其余变化不大(表 5)。

表 3 不同时期小脑蒲肯野细胞的数密度、体密度和表面积密度(x± s)

Table3 Number density, bulk density and surface area density of cerebellar purkinje cells in different periods

Groups \ Contents	Number density(/ mm ³)	Bulk density(%)	Surface area density(mm ² /mm ³)
6 moon's age	36820.12± 2822.26	1.72± 0.49	9.55± 0.37
7 moon's age	29875.68± 2764.97*#	2.18± 0.52*	10.64± 0.71*
8 moon's age	23963.31± 2437.08*#	2.45± 0.39*	11.46± 0.46*
9 moon's age	20489.82± 2099.32*	2.49± 0.40	11.59± 0.29
10 moon's age	18734.37± 1861.58	2.52± 0.32	11.67± 0.59
Child group	17072.10± 1634.21	2.57± 0.42	11.76± 0.24
Adult group	16893.85± 1398.16	2.56± 0.72	11.83± 0.27

Note : $\beta = 1.38$; *P ≤ 0.05 compared with above group; #P ≤ 0.01 compared with above group.

表 4 不同时期颗粒细胞的数密度、体密度和表面积密度 $(x \pm s)$

Table4 Number density, bulk density and surface area density of cerebellar granule cells in different periods

Groups \ Contents	Number density(/ mm ³)	Bulk density(%)	Surface area density(mm ² /mm ³)
6 moon's age	58451.24± 3257.63	0.28± 0.11	2.02± 0.28
7 moon's age	51980.64± 3725.22*#	0.46± 0.13* [#]	2.50± 0.34*
8 moon's age	44782.36± 2986.71*#	0.62± 0.21*	2.98± 0.31*
9 moon's age	40354.92± 2468.83*	0.71± 0.20	3.11± 0.29
10 moon's age	38851.28± 2844.06	0.73± 0.19	3.14± 0.37
Child group	36257.07± 2106.77	0.75± 0.27	3.20± 0.22
Adult group	35934.25± 2362.28	0.75± 0.31	3.19± 0.42

Note : $\beta = 1.38$; *P< 0.05 compared with above group; #P< 0.01 compared with above group.

表 5 不同时期高尔基细胞的数密度、体密度和表面积密度 $(x \pm s)$

Table5 Number density, bulk density and surface area density of cerebellar golgi cells in different periods

Groups \ Contents	Number density(/ mm ³)	Bulk density(%)	Surface area density(mm ² /mm ³)
6 moon's age	12428.34± 1273.11	0.51± 0.13	3.97± 0.31
7 moon's age	9068.81± 1022.57* [#]	0.96± 0.24*	4.73± 0.42*
8 moon's age	7276.52± 987.44*	1.42± 0.31*	5.65± 0.39*
9 moon's age	6194.67± 1019.76*	1.47± 0.28	5.79± 0.21
10 moon's age	5998.92± 906.87	1.50± 0.19	5.82± 0.30
Child group	5712.75± 867.95	1.53± 0.34	5.88± 0.37
Adult group	5680.61± 976.94	1.55± 0.44	5.89± 0.41

Note : $\beta = 1.58$; *P ≤ 0.05 compared with above group; #P ≤ 0.01 compared with above group.

3 讨论

人体小脑皮质由外向内明显地分 3 层 :分子层 ,蒲肯野细 胞层和颗粒层^[11]。本研究结果显示 ,4 月龄时 ,小脑皮质出现外 颗粒层 :5 月龄时 ,外颗粒层细胞逐渐减少 ,出现外颗粒层、中 间层和内颗粒层 ;5 月龄时 ,外颗粒层细胞逐渐减少 ,外颗粒层 形成了分子层 ,主要有两种神经元 ,星形细胞和篮状细胞 ,中间 层分化为蒲肯野细胞层 ,主要有小脑皮层最大的神经元蒲肯野 细胞 ,内颗粒层成为了颗粒层 ,主要有两种神经元 ,颗粒细胞和 高尔基细胞。本研究结果与 Menghi 等¹⁵等研究结果基本一致。 程相树等¹¹²研究了小鼠小脑皮质的组织发生,发现约出生当日 (PO)出现外颗粒层、分子层、Purkinje 细胞层和内颗粒层,外颗 粒层 P6/7 达最厚,至 P20 消失, P0 至 P30 内颗粒层细胞逐步分 化发育成熟,Purkinje 细胞树突树逐渐形成,约 P7 时 Purkinje 细胞排列成单层。结果表明,E12 至 P0 片层化小脑主要经历了 细胞增殖、分化与迁移,P0 至 P30 片层化结构逐渐发育成熟, 外颗粒层消亡以细胞迁移和凋亡为主,其他各层细胞主要经历 了分化发育与凋亡。 人体小脑神经元有星形细胞、篮状细胞、蒲肯野细胞、颗粒 细胞和高尔基细胞。蒲肯野细胞是小脑唯一的传出神经元,是 最先分化的细胞,具有独特的形态和功能^[13-15]。星形细胞、篮状 细胞和高尔基细胞是小脑皮层中 r- 氨基丁酸(GABA)抑制性 中间神经元,抑制蒲肯野细胞的兴奋^[16-13]。颗粒细胞是谷氨酸能 的兴奋性神经元,使蒲肯野细胞兴奋。本研究结果显示,五种神 经元数密度随月龄/年龄的增长而减少,体密度和表面积密度 随月龄/年龄的增长而增加,但这些减小或增大是不等速的, 6-8 月龄变化最明显,表明其发育为不等速、快慢交替的出现。 这与宿宝贵等^[19]提出脑的发育有快慢交替的阶段性规律和 Shepherd^{120]}提出的脑的发育是一个不等速的观点一致。

综上,人体小脑神经元的发育呈现快慢交替、不均速发展, 6~8月是小脑神经元发育的重要时期。

参考文献(References)

- Muller A, Glattard E, Taleb O, et al. Endogenous morphine in SH-SY-5Y cells and the mouse cerebellum[J]. PLoS One, 2008,3(2):e1641
- [2] Hu H, Li J, Gagen CS, et al. Conditional knockout of protein O-mannosyltransferase 2 reveals tissue-specific roles of O-mannosyl glycosylation in brain development[J]. J Comp Neurol, 2011, 519(7):1320-1337
- [3] Klisch TJ, Xi Y, Flora A, et al. In vivo Atoh1 targetome reveals how a proneural transcription factor regulates cerebellar development[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2011,108(8):3288-3293
- [4] Yamashita N, Mosinger B, Roy A, et al.CRMP5 (collapsin response mediator protein 5) regulates dendritic development and synaptic plasticity in the cerebellar Purkinje cells[J]. J Neurosci, 2011, 31(5):1773-1779
- [5] Menghi F, Jacques TS, Barenco M, et al. Genome-wide analysis of alternative splicing in medulloblastoma identifies splicing patterns characteristic of normal cerebellar development[J]. Cancer Res, 2011,71 (6):2045-2055
- [6] Chand A, Legge M. Stereological assessment of developing mouse ovarian follicles in an in vitro culture system [J]. Anat Rec (Hoboken), 2011, 94(3):379-383
- [7] Walløe S, Nissen UV, Berg RW, et al. Stereological estimate of the total number of neurons in spinal segment D9 of the red-eared turtle [J]. J Neurosci, 2011, 31(7):2431-2435
- [8] Mohammed Sulaiman A, Denman N, Buchanan S, et al. Stereology and ultrastructure of chronic phase axonal and cell soma pathology in stretch-injured central nerve fibers [J].J Neurotrauma, 2011, 28 (3): 383-400
- [9] Mattfeldt T. A brief introduction to computer-intensive methods, with a view towards applications in spatial statistics and stereology [J],J

Microsc, 2011 ,242(1):1-9

- [10] Gunasekara RA, Cornillie P, Casteleyn C, et al. Stereology and computer assisted three-dimensional reconstruction as tools to study probiotic effects of Aeromonas hydrophila on the digestive tract of germ-free Artemia franciscana nauplii [J].J Appl Microbiol, 2011, 110(1):98-105
- [11] 高英茂,徐昌芬.组织学与胚胎学[M].北京:人民卫生出版社,
 2001:115-121
 GAO Mao-ying, XU Chao-fen. Histology and Embryology [M]. Beij-

ing: people health publishing house 2001 ;115-121

- [12] 程相树 蔣杞英 胡艳秋 ,等.小鼠小脑皮质的组织发生[J].解剖学 杂志,2007,30(5):576-581
 CHEN Xiang-shu, JIANG Qi-ying,HU Yan-qiu, et al. Histogenesis of mouse cerebellar cortex [J].J Anat, 2007, 30(5):576-581
- [13] Arce ME, Sánchez SI, Aguilera FL, et al. Purkinje cells express Angiotensin II AT(2) receptors at different developmental stages [J]. Neuropeptides, 2011, 45(1):69-76
- [14] Idrus NM, McGough NN, Riley EP, et al. Administration of memantine during ethanol withdrawal in neonatal rats: effects on long-term ethanol-induced motor incoordination and cerebellar purkinje cell loss[J].Alcohol Clin Exp Res, 2011,35(2):355-364
- [15] Myoga MH, Regehr WG.Calcium microdomains near R-type calcium channels control the induction of presynaptic long-term potentiation at parallel fiber to purkinje cell synapses[J].J Neurosci, 2011, 31(14): 5235-5243
- [16] Briatore F, Patrizi A, Viltono L, et al. Quantitative organization of GABAergic synapses in the molecular layer of the mouse cerebellar cortex[J]. PLoS One, 2010, 5(8):e12119
- [17] SuñolC, Babot Z, Cristò fol R, et al. A possible role of the non-GAT-1 GABA transporters in transfer of GABA from GABAergic to glutamatergic neurons in mouse cerebellar neuronal cultures[J].Neurochem Res, 2010, 35(9):1384-1390
- [18] Astori S, Luján R, Köhr G.et al.GABA release from cerebellar stellate cells is developmentally regulated by presynaptic GABA(B) receptors in a target-cell-specific manner[J].Eur J Neurosci, 2009, 30 (4):551-559
- [19] 宿宝贵,石世庆,覃盛麟.人胎海马发育的研究 1.光镜观察[J].解剖 学杂志,1992,15(4) 263-266
 SU Bao-gui,SHI Shi-qin,QIN Shen-lin. Development of human fetal hippocampus 1. observe by Light microscope [J].J Anat, 1992,15(4): 263-266
- [20] Shepherd GM.Neurobiology[M].New York: Oxford University Press, 1983:178