

## · 基础研究 ·

免疫组化和乙醛酸诱发荧光法研究人颈椎  
关节囊交感神经纤维的分布张 燕 杨京平 杨金辉 俞庆生 孙 宇<sup>①</sup> 钟延丰

(北京大学医学部病理学系 北京 100083)

【摘要】 目的 应用神经肽 Y( neuropeptide Y , NPY )免疫组化标记法及乙醛酸激发荧光法 观察交感神经纤维在人颈椎关节囊的分布 比较 2 种方法的优劣 探讨染色方法的改进。 方法 17 例颈椎 C<sub>3-7</sub> 手术切除的颈椎间关节囊组织 分别进行石蜡包埋 NPY 免疫组化染色 冰冻切片乙醛酸诱发生物单胺递质荧光反应染色。以 1% KMnO<sub>4</sub> 预处理载玻片 采用 15 ~ 20 μm 的切片厚度 100 ℃ 5 min 然后 80 ℃ 2 min 染色时间和温度。大鼠肾上腺标本作为阳性对照。激发光范围 380 ~ 420 nm 高压汞灯为源的荧光显微镜观察。 结果 NPY 免疫组化法显示 关节囊的部分细小动脉壁和神经束上具有较粗大的阳性物质 乙醛酸激发荧光法诱发生物单胺递质产生黄绿色荧光 多存在于血管壁、滑膜基层、致密结缔组织中 多为呈网状或放射状分布的较细碎纤维。 NPY 免疫组化法各颈椎节段阳性率分别为 C<sub>3-4</sub> 70.6% ( 12/17 ) , C<sub>4-5</sub> 42.9% ( 6/14 ) , C<sub>5-6</sub> 57.1% ( 8/14 ) , C<sub>6-7</sub> 50.0% ( 5/10 ) 总阳性率 56.4% ( 31/55 ) ;乙醛酸荧光染色法各颈椎节段阳性率分别为 C<sub>3-4</sub> 70.6% ( 12/17 ) , C<sub>4-5</sub> 93.8% ( 15/16 ) , C<sub>5-6</sub> 66.7% ( 10/15 ) , C<sub>6-7</sub> 80.0% ( 8/10 ) 总阳性率 77.6% ( 45/58 ) 。乙醛酸荧光染色法颈椎节段染色阳性率明显高于 NPY 免疫组化法 统计学上具有显著性差异(  $\chi^2 = 5.774$  ,  $P = 0.016$  ) ,尤其在 C<sub>4-5</sub> 颈椎节段差异显著(  $P = 0.004$  ) 。 结论 2 种方法均可进行交感神经末梢的定位 提示人颈椎关节囊存在交感神经纤维末梢分布。经过改进的乙醛酸激发荧光法特异性更强。

【关键词】 交感神经； 神经肽 Y； 乙醛酸激发荧光法

中图分类号 R68

文献标识 A

文章编号 1009 - 6604( 2005 )08 - 0676 - 03

Use of immunohistochemical staining and ethylaldehyde acid - induced biomonamine fluorescence for determining the distribution of sympathetic nerve terminals in human cervical capsule tissues Zhang Yan , Yang Jingping , Yang Jinhui , et al. Department of Pathology , Peking University Health Science Center , Beijing 100083 , China

【Abstract】 Objective By using immunohistochemical staining of neuropeptide Y ( NPY ) and fluorescence of ethylaldehyde acid - induced biomonamine mediators , to observe the distribution of sympathetic nerve terminals in human cervical capsule tissues , and to compare the two methods for further improvement. Methods Surgically removed joint capsule tissues from C<sub>3-7</sub> vertebrae of 17 cases were treated by paraffin imbedding with NPY immunohistochemical staining and frozen - section with fluorescence staining of ethylaldehyde acid - induced biomonamine mediators. Slides were preconditioned by 1% KMnO<sub>4</sub> and sections 15 ~ 20 μm in thickness were made. The staining was conducted at 100 ℃ for 5 min firstly , and then at 80 ℃ for 2 min. We utilized adrenal glands of rats as positive control. The samples were observed under fluorescence microscope at 380 ~ 420 nm excitation wavelengths from a high - voltage mercury light source. Results NPY immunostaining findings indicated bulky positive materials in some arteriolar walls and nerve tracts of the joint capsules ; biomonamine mediators gave off fluorescence in green - yellow color under the induction of ethylaldehyde acid , which presented mostly as reticular or radial finely - broken fibers in vascular walls , basal laminae of the synovial membrane and dense connective tissues. The positive rates of NPY immunohistochemical staining were 70.6% ( 12/17 ) at C<sub>3-4</sub> intervertebral segment , 42.9% ( 6/14 ) at C<sub>4-5</sub> , 57.1% ( 8/14 ) at C<sub>5-6</sub> , and 50.0% ( 5/10 ) at C<sub>6-7</sub> , respectively , the total positive rate being 56.4% ( 31/55 ) . When using the ethylaldehyde acid - induced biomonamine fluorescence , the positive rates were 70.6% ( 12/17 ) at C<sub>3-4</sub> intervertebral segment , 93.8% ( 15/16 ) at C<sub>4-5</sub> , 66.7% ( 10/15 ) at C<sub>5-6</sub> , and 80.0% ( 8/10 ) at C<sub>6-7</sub> , respectively , the total positive rate being 77.6% ( 45/58 ) . The positive rate was remarkably higher in ethylaldehyde acid - induced biomonamine fluorescence than in NPY immunohistochemical staining , with statistically significant difference (  $\chi^2 = 5.774$  ,  $P = 0.016$  ) , especially at C<sub>4-5</sub> intervertebral segment (  $P = 0.004$  ) . Conclusions Both the two methods can demonstrate the distribution of sympathetic nerve terminals , suggesting the presence of the terminals in human cervical capsule tissues. Modified ethylaldehyde acid - induced biomonamine fluorescence offers a greater specificity.

【Key Words】 Sympathetic nerve； Neuropeptide Y； Ethylaldehyde acid - induced biomonamine fluorescence

<sup>①</sup> ( 北京大学第三医院骨科 , 北京 100083 )

检测交感神经在局部组织的定位,可以通过检测交感神经释放的递质而确定。交感神经属肾上腺素能神经,释放单胺类递质<sup>[1]</sup>,因此,可以用显示单胺类递质的方法来研究交感神经纤维的分布。神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 是交感神经的标志性神经肽<sup>[2,3]</sup>。我们分别用免疫组化显示神经肽和乙醛酸激发荧光法显示单胺类递质,并对乙醛酸激发荧光法进行了改进,以观察交感神经纤维在人颈椎关节囊的分布,比较 2 种方法的优劣。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

取自北京大学第三医院 2001 ~ 2002 年骨科颈椎病手术切除的颈椎 C<sub>3~7</sub> 椎间关节囊 17 例,以大白鼠肾上腺髓质标本做阳性对照。

### 1.2 方法

1.2.1 取材 新鲜手术标本 17 例,分为 2 部分:其一用 4% 甲醛固定后石蜡包埋,做免疫组化染色;其二放入 O. C. T (optimal cutting temperature) 胶中纵行包埋,暴露滑膜,液氮冷冻,做乙醛酸激发荧光法显色。

1.2.2 免疫组化染色 常规 ABC 法:切片,脱蜡至 80% 乙醇,甲醇-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中震荡 10 min,置于枸橼酸盐缓冲液中在微波炉中加热 13 min,温度 98 ℃ 左右,取出自然冷却(修复抗原)。一抗为单克隆抗 NPY 抗体(美国 Sigma 公司),湿盒中 4 ℃ 冰箱过夜,二抗 37 ℃ 30 min,三抗 37 ℃ 50 min(美国 DAKO 公司),DAB 液显色约 10 min。以大鼠肾上腺髓质做 NPY 的阳性对照,以 TBS 缓冲液为一抗做阴性对照。

### 1.2.3 乙醛酸激发荧光技术

1.2.3.1 反应液(SPG 液)配制 蔗糖 1.37 g,磷酸

二氢钾 0.642 g,结晶乙醛酸(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O) 0.4 g,蒸馏水 15 ml, 2N NaOH 2.4 ml,调 pH 值至 7.4,加蒸馏水至 20 ml。

1.2.3.2 乙醛酸染色 对陈啸梅报道的方法<sup>[4]</sup>进行改进:载玻片用 1% KMnO<sub>4</sub> 前处理(原法不处理载玻片)。切片厚度 15 ~ 20 μm(原法 50 μm),用吹风机冷风吹干后(原法自然晾干)滴加 SPG 反应液,连续 3 次,吹干,放入 100 ℃ 烤箱内加热 5 min,用石蜡油加盖片,80 ℃ 烤箱内加热 2 min。染色完成后可置于 4 ℃ 冰箱内保存。

1.2.3.4 使用激发光范围 380 ~ 420 nm 高压汞灯为源的荧光显微镜观察。

## 2 结果

### 2.1 交感神经介质 NPY 免疫组化标记法检测

交感神经介质 NPY 免疫组化阳性纤维多位于血管壁中层平滑肌细胞间和神经束中,在部分细小动脉壁可观察到较粗大的阳性纤维(图 1)。在 C<sub>3~4</sub>、C<sub>5~6</sub>、C<sub>6~7</sub> 颈椎节段,与乙醛酸激发荧光染色阳性率比较无显著性差异,尤其在 C<sub>3~4</sub> 颈椎节段 NPY 免疫反应阳性率较高,见表 1。

### 2.2 乙醛酸激发荧光法的检测

乙醛酸诱发生物单胺递质产生黄绿色荧光,荧光阳性纤维多存在于血管壁、滑膜基层、致密结缔组织中,其形态部分为粗大的纤维,但多为较细碎的纤维,呈网状或放射状分布(图 2、3)。如果切片不做预处理,或切片厚度 30 μm,则背景反应过强(图 4)。乙醛酸荧光染色法颈椎节段染色阳性率明显高于 NPY 免疫组化法,差异具有显著性(P < 0.05)。尤其在 C<sub>4~5</sub> 颈椎节段差异具有显著性(P < 0.01),见表 1。

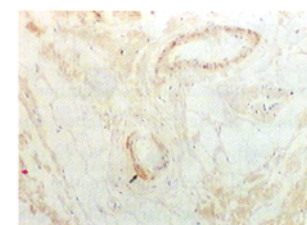


图 1 颈椎关节囊标本:小动脉壁可见 NPY 阳性纤维(箭头所示),呈棕黄色  
NPY 免疫组化染色

× 200

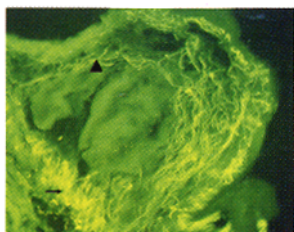


图 2 乙醛酸法:诱发生物单胺递质产生黄绿色荧光,阳性纤维存在于结缔组织中及血管壁,其形态为粗大的(箭头所示)或细碎的纤维(三角所示),在小动脉壁呈网状分布

× 400

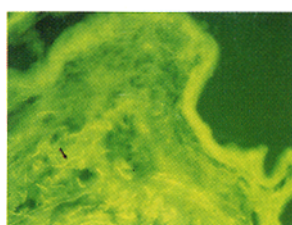


图 3 乙醛酸法:荧光阳性纤维(箭头所示)存在于滑膜基层呈放射状分布  
× 200

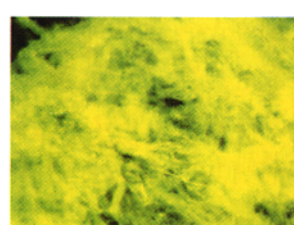


图 4 乙醛酸法:切片厚度 30 μm,荧光阳性纤维及非特异性染色反应同时呈现黄绿色,造成背景反应过强  
× 200

表 1 各颈椎节段 NPY 免疫组化法与乙醛酸激发荧光染色阳性率比较

颈椎节段	免疫组化法	阳性率( % )	乙醛酸	阳性率( % )	$\chi^2$ 值	P 值
C <sub>3-4</sub>	12/17	70.6	12/17	70.6		1.000 *
C <sub>4-5</sub>	6/14	42.9	15/16	93.8		0.004 *
C <sub>5-6</sub>	8/14	57.1	10/15	66.7		0.710 *
C <sub>6-7</sub>	5/10	50.0	8/10	80.0		0.350 *
合计	31/55	56.4	45/58	77.6	5.774	0.016

\* Fisher's 检验

2.3 阳性对照

大白鼠肾上腺髓质内散在的肾上腺素型细胞，呈黄绿色荧光。

3 讨论

单胺类递质是由交感神经分泌的<sup>[1]</sup>，NPY 是交感神经的标记性神经肽<sup>[2]</sup>。乙醛酸可以诱发单胺类递质产生自发荧光。通过免疫组化和乙醛酸诱发生物单胺递质荧光的方法，我们可以看出颈椎间关节囊滑膜组织及部分血管壁中存在 NPY 阳性物质和对乙醛酸起反应的纤维状物质，推测为交感神经末梢。

NPY 免疫组化法可以使用石蜡包埋的标本，为进行回顾性研究提供了很大方便。乙醛酸诱发生物单胺递质荧光法，只能用新鲜标本冰冻切片，更适用于特定课题研究或动物实验。NPY 免疫组化法显示阳性纤维较粗大，分布于血管壁上和神经束上；乙醛酸激发荧光法可以显示更细小的纤维，分布于滑膜表层、结缔组织及血管壁中。与免疫组化的方法比较，此法特异性更高。乙醛酸荧光染色法颈椎节段染色阳性率明显高于 NPY 免疫组化法，统计学上具有显著性差异( $\chi^2 = 5.774, P = 0.016$ )。尤其在 C<sub>4-5</sub> 颈椎节段差异显著( $P = 0.004$ )。因此，在观察交感神经纤维在颈椎关节囊的分布时，2 种方法均可，但应尽量选择乙醛酸诱发生物单胺递质法，尤其在研究 C<sub>4-5</sub> 颈椎节段时。尽管某些病例未出现阳性反应，但并不能因此而否认滑膜组织中存在感觉神经纤维，这可能是我们使用的方法敏感性不足所致。

乙醛酸诱发生物单胺递质荧光反应的方法简便易行，但在具体操作过程中，需要特别注意几个细节的掌握，方能得到良好的效果：①标本在液氮中骤冷后，移到冰冻切片机中进行切片，不能使标本化冻，否则会产生冰晶，破坏组织结构。②与原方法比较，载玻片改用 1% KMnO<sub>4</sub> 处理，可以减弱背景反应。③切片厚度太薄时单胺类物质太少，自发荧光不足以分辨，太厚时背景反应过强，影响观察，因此将原方法切片厚度 50  $\mu\text{m}$  改为 15 ~ 20  $\mu\text{m}$ ，背景反应明显减弱。④切片干燥时，温度不能过高，过高则会使荧光淬灭，因此，我们采用冷风机吹干，与原方法比较，不仅荧光效果好且缩短染色时间。⑤染色时，SPG 液最好新鲜配制，以免影响染色效果。⑥加热

及封固后保存时须避光，否则荧光强度会迅速减弱。

颈椎病分为 3 种类型，其中交感型主要出现交感神经功能障碍的表现，其发病机制目前还不清楚。Barre 和 Lieou 推测是颈椎骨关节炎刺激交感神经引起的，故亦称这种症状为 Barre - Lieou 征候群<sup>[5]</sup>。我们以往的研究证实，颈椎病滑膜的基本病理改变是滑膜细胞增生或脱落、滑膜组织脂肪化或纤维增生因而滑膜增厚、粘液变性、炎细胞浸润、纤维素渗出、血管增生、血管炎和滑膜周组织、特别是肌组织的变性<sup>[6]</sup>。通过免疫组化 NPY 和乙醛酸诱发生物单胺递质荧光 2 种显示交感神经分布的方法，我们可以看出颈椎关节囊滑膜组织中有交感神经末梢分布。临床上交感型颈椎病多由上颈段不稳定引起，因此，这 2 种方法可用于交感型颈椎病的研究。NPY 能神经纤维具有血管调节作用，其活动一方面可以使痛觉神经的表型改变，还可以使痛觉神经释放的 P 物质增加，以促进巨噬细胞释放炎症介质。我们推测，颈椎周围组织的变性加重了颈椎的不稳定性，使脊柱周围组织中的感受器、C - 神经和自由神经末梢更容易受到机械刺激，长期受到机械刺激及各种炎症因子的刺激，可使人体产生一系列交感神经系统异常的症状。

本研究为研究颈椎病的损伤机制提供了一定帮助。在技术方面，要特别注意技术细节的掌握，方能取得理想的效果。

参考文献

1 Tove P, Gronblad M, Virri J. Immunohistochemical demonstration of sensory and autonomic nerve terminals in herniated lumbar disc tissue. Spine ,1996 ,21( 11 ) :1301 - 1306.

2 Gronblad M, Korkala O, Konttin YT, et al. Silver impregnation and immunohistochemical study of nerves in lumbar facet joint plical tissue. Spine ,1991 ,16( 1 ) :34 - 38.

3 Imai S, Hukuda S, Maeda T. Dually innervating nociceptive networks in the rat lumbar posterior longitudinal ligaments. Spine , 1995 ,20 :2086 - 2092.

4 陈啸梅,主编.组织化学手册.北京:人民卫生出版社,1982. 281 - 282.

5 Pearce JM. Barre - Lieou " syndrome ". J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004 ,75( 2 ) :319.

6 俞庆声,钟延丰,孙宇,等.颈椎小关节滑膜的病理学与颈椎病发病的关系.中国颈腰痛杂志,2002 23( 3 ) :177.

( 收稿日期 2005 - 04 - 29 )

( 修回日期 2005 - 06 - 06 )