

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2024.05.003

• 论 著 •

神经示踪染料 DiI 影响溃疡性结肠炎小鼠背根神经节
神经元电学特性 *雒 炜^{1,2} 刘永斌¹ 刘 坤² 刘 允^{2△} 高昕妍^{2△} 乔海法¹(¹ 陕西中医药大学针灸推拿学院, 咸阳 712046; ² 中国中医科学院针灸研究所机能研究室, 北京 100700)

摘 要 目的: 探究在神经示踪结合膜片钳全细胞记录的实验中, 示踪染料 DiI 是否会对小鼠背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元兴奋性产生影响。**方法:** 采用 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 经 5% 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 模型, 在 T₁₂~L₂ 皮节多点注射 DiI 逆向示踪躯体感觉神经元, 分离全组织 DRG 并进行全细胞膜片钳记录。**结果:** HE 染色结果显示模型诱导成功。膜片钳记录未经标记的小鼠 DRG 神经元, 模型组小鼠膜电位兴奋性高于正常组小鼠。两组小鼠示踪后, 正常示踪组和模型示踪组 DiI⁺ 神经元兴奋性均低于本组 DiI⁻ 神经元; 与两未示踪组的神经元相比较, 两示踪组的 DiI⁻ 神经元兴奋性分别升高。**结论:** 本实验结果明确了示踪剂 DiI 会降低 DRG 神经元的兴奋性, 提示相关实验设计中应注意示踪剂的应用对神经元兴奋性的影响, 以保证实验结果的可靠性。

关键词 神经示踪; 背根神经节; 兴奋性; DiI; 膜片钳

Tracing dye DiI affects the electrical properties of dorsal root ganglion neurons in ulcerative colitis mice *

LUO Wei^{1,2}, LIU Yong-bin¹, LIU Kun², LIU Yun^{2△}, GAO Xin-yan^{2△}, QIAO Hai-fa¹(¹ College of Acupuncture and Massage, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;² Department of Physiology, Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To investigate whether the tracer dye DiI affects the excitability of dorsal root ganglion (DRG) neurons in mice in an experiment applying neural tracing combined with patch clamp technique. **Methods:** Using SPF-grade male C57BL/6J mice, the ulcerative colitis (UC) model was induced by 5% dextran sulfate sodium (DSS). DiI was injected at multiple points in T₁₂-L₂ dermatomes to retrogradely label somatosensory neurons. Whole mount DRG were isolated and subjected to whole-cell patch clamp recording. **Results:** In the HE staining, the structure of colonic mucous glands of model group were destroyed, indicating successful induction of the model. Patch clamp recording of unlabeled animal DRG neurons showed that the excitability of the cell membrane from the mice in DSS group was higher than that from the Con group. In the groups treated with DiI, excitability of DiI⁺ neurons in both the Con + DiI and DSS + DiI groups was lower than that of DiI⁻ neurons in the same group. The excitability of DiI⁺ neurons and DiI⁻ neurons in the DSS + DiI group was lower than that of the corresponding neurons in the Con + DiI group, respectively. Compared with DRG neurons in two untracked groups, the excitability of DiI⁻ neurons in the two tracking groups was increased, respectively. **Conclusion:** Our results demonstrated that the tracing dye DiI mainly reduces the excitability of dorsal root ganglion neurons, suggesting that the influence of tracer should be avoided in the design of relevant experiments for the reason that it may mask the changes in neuronal excitability caused by animal models.

Keywords neural tracing; dorsal root ganglion; excitability; DiI; patch clamp

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973963、82074557); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (ZZ-YQ2023002)

△ 通信作者 刘允 rowone268@126.com; 高昕妍 gaoxy@mail.cintcm.ac.cn



随着神经科学的日益发展,神经示踪技术与电生理学常被联合应用^[1]。神经示踪是在神经科学领域常用的一种形态学研究方法^[1],被用来验证和评估不同神经元群或核团之间的纤维联系^[2]。通过微量注射器将荧光染料或含有荧光基团的嗜神经病毒注射至活体动物组织器官局部,荧光基团被神经末梢摄取并与细胞膜表面结合,示踪物质可以通过轴浆运输,沿着神经纤维走向逆行或顺行传导或扩散至目标区域,从而标记目标细胞、细胞器、膜蛋白等^[3]。膜片钳技术作为电生理学的主要技术手段,可以记录细胞和亚细胞水平(离子通道)的生物电信号^[4]。在感觉生理学的研究中,常与神经示踪技术相结合,以记录支配特定部位的神经元活动,获取兴奋性等功能活动信息^[5]。

虽然示踪技术与电生理技术的联合应用日益广泛^[6,7],但示踪染料对神经元活动的影响却缺乏报道。当前常用的示踪剂可以分为生物标记和化学标记^[8],生物标记多为嗜神经类病毒^[9],包括腺病毒相关病毒(AAV)、狂犬病毒(RV)、霍乱毒素B(CTB)、水疱性口炎病毒(VSV)等。化学标记包括辣根过氧化物酶(HRP)、菜豆凝集素(PHA)、荧光金(FG)、固蓝(FB)、羧花菁类染料(DiI、DiO、DiR、DiA)等。生物标记具有信号强且不衰减的优势,可以搭配不同的荧光标记物(荧光蛋白)高效的标记特定神经元,并且可以进行跨突触标记,实现神经通路的可视化。但生物标记存在细胞毒性^[10]和价格昂贵的问题,因此在电生理实验中多采用化学标记染料^[11-13]。其中DiI(1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, DiI C18)是一种常见的亲脂示踪染料^[14],可被用于顺向或逆向示踪,可以标记活体神经元或固定组织的神经元,因其使用方便且易于获得被广泛使用。

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是临床常见病种,腹痛和牵涉痛是其常见症状,来自结肠组织和牵涉痛部位局部皮肤的伤害性传入通过T₁₂~L₂节段背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)到达中枢^[15],因而DRG是研究躯体和内脏痛的关键部位^[16]。既往虽有研究采用化学染料标记和电生理结合的方法^[17],探索了内脏痛模型动物中DRG神经元的特性,但示踪染料对神经元兴奋性的影响未见报道。这无疑是一个值得重视的问题,因为忽视了示踪剂对神经元的影响因素可能会造成对实验结果解读的偏差。因此,本研究基于急性UC模型小鼠,通过DiI逆向示踪支配结肠的DRG神经元,并对被标记的神经元进行全细胞膜片钳记录,探究示踪

剂本身对神经元是否存在影响。实验结果显示,示踪染料DiI会对DRG神经元兴奋性产生以下降为主的影响。

由于技术等各方面的限制,在本研究中仍存在一些尚未解决的问题,如羧花菁基类染料并非只有DiI,未对其他种类染料进行探索,因此,不能明确对DRG神经元兴奋性的影响是羧花菁基类染料共同特征还是DiI所特有的;此外,没有基于遗传学的手段区分DiI对于不同类型神经元的作用。这些需要在后续的研究中去进行探索。但本研究结果依旧可以为后续相关工作中选择和使用示踪染料提供一定的参考价值。

方 法

1. 实验动物及分组

本实验中使用SPF级,雄性C57BL/6J小鼠,均为4~5周龄,购回时体重约为15~20 g,共40只。小鼠购回后适应性饲养1周。C57BL/6J小鼠购自斯贝福(北京)生物科技有限公司[SCXK(京)2019-0010],饲养于中国中医科学院基础研究所动物房,室温22~24℃,饲养期间动物房12 h明暗循环,自由获得水和食物。在饲养和实验过程中遵照3R原则,充分保障实验动物福利。本研究涉及所有实验均已通过中国中医科学院针灸研究所伦理委员会批准[中科针伦(D2023-10-18-1)]。

小鼠购回后编号,依照随机数字表法分组,其中正常组(Con)10只,不予任何处理;正常示踪组(Con + DiI)10只,进行逆向示踪;模型组(DSS)10只,诱导急性UC;模型示踪组(DSS + DiI)10只,在结肠炎基础上进行逆向示踪。正常示踪组和模型示踪组的神经元根据示踪结果,分为示踪阳性神经元(DiI⁺)和示踪阴性神经元(DiI⁻)。

2. 主要试剂与仪器

DiI(C1036,上海碧云天生物技术有限公司); DSS(9011-18-1, MP Biomedicals, Santa Ana, USA); 1.25%阿佛丁溶液(M2920,南京爱贝生物科技有限公司);其余试剂均购自Sigma。MultiClamp放大器(700B, Molecular Devices, Carlsbad, USA); Digidata数模转换器(1550B, Molecular Devices, Carlsbad, USA); 微电极拉制仪(P-1000, Sutter Instruments, San Francisco, USA); Clampex信号记录软件(11.0.3, Axon, Sunnyvale, USA); Clampfit数据分析软件(10.7, Axon, Sunnyvale, USA); 正置光学显微镜(BX51WI, Olympus, Tokyo, Japan); 荧光光源(U-RFL-T, Olympus, To-

kyo, Japan); 正置荧光显微镜 (DM2500, Leica, Wetzlar, Germany)。

3. 实验方法

(1) UC 模型小鼠制备

模型组与模型示踪组小鼠使用异氟烷吸入麻醉后称重。配置 5% DSS 溶液, 供两组小鼠自由饮用。造模第 7 天, 麻醉后再次称重, 计算其体重下降百分比, 观察小鼠粪便性状, 使用便隐血试纸测试小鼠隐血。以疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分表^[18]为评分标准 (见表 1), 粪便性状部分, 正常粪便记为 0 分, 粪便粘滞于笼壁记为 2 分, 粪便不成形记为 4 分; 隐血或血便情况, 无隐血或血便记为 0 分, 隐血阳性记为 2 分, 肉眼血便记为 4 分。三项得分相加计算模型得分, 7~9 分认为造模成功, 分数越高则提示炎症严重。空白对照组和空白示踪组小鼠正常喂养。

(2) 逆向示踪

将 DiI 溶于二甲基亚砷 (DMSO) 配置 0.5% 浓度 DiI 染料。模型示踪组小鼠于造模第 3 天使用异氟烷麻醉后小鼠剃毛, 暴露背部皮肤。使用 10 μ l 微量注射器于小鼠背部 T₁₂~L₂ 皮节选取 4 个点皮下注射 DiI, 每点 1 μ l, 标记躯体感觉 DRG 神经元。空白示踪组在同样时间节点进行示踪。

(3) 急性分离背根神经节

小鼠造模第 8 天取材。制备离体全组织 DRG 的过程在既往文献中有所描述^[19]。腹腔注射 1.25% 阿佛丁 (0.1 ml/10 g 体重), 小鼠脱颈处死, 分离 T₁₂~L₂ 双侧 DRG, 置于持续充氧的人工脑脊液中, 在体视显微镜下剥除 DRG 组织残留神经根及结缔组织膜, 随后将 DRG 转移至含有 0.4 mg/ml Trypsin Trck Treated from Bovine 和 1 mg/ml Collagenase Type-A 的离心管中在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 5~10 min, 随后在室温人工脑脊液中孵育 1 h。人工脑脊液中含有 (mM): 125 NaCl、3.8 KCl、1.2 NaH₂PO₄、1 MgCl₂、2 CaCl₂、26 NaHCO₃、10 Glucose。用 KOH 调 pH 值至 7.42 $\pm$ 0.1, 用蔗糖调渗透压至 316 $\pm$ 2 mOsm。

(4) 全细胞电流钳记录

将孵育后的 DRG 转移至记录槽中, 以 2 ml/min 的速率灌注连续充氧 ACSF。使用含芯硼硅酸盐玻璃管控制记录电极 (4~8 M Ω)。电极内液中含有 (mM): 135 K-Gluconate、5 KCl、5 Mg-ATP、0.5 Na₂-GTP、5 HEPES、2 MgCl₂、5 EGTA、0.5 CaCl₂。用 KOH 调 pH 值至 7.41, 用蔗糖调渗透压至 300 mOsm。在正置光学显微镜下利用荧光光源对 DRG 进行识别, 根据实验需要分别选取膜电容 (C_m) 小于 25 pF 的荧光细胞 (DiI⁺) 和非荧光细胞 (DiI⁻) 进行记录。从 -50 pA 升至 425 pA 的步阶刺激, 共 20 次。数据通过 MultiClamp 700B 放大器、Digidata 1550B 数模转换器和 Clampex 11.0.3 进行采集, 通过 Clampfit 10.7 进行离线分析。采集频率为 10 kHz, 滤波为 5 kHz。分析指标为: 静息膜电位 (resting membrane potential, RMP); 基强度 (rheobase); 动作电位幅值 (amplitude, AP); 动作电位数量 (numbers of AP)。

(5) HE 染色

造模后第 8 天, 取空白对照组和模型组小鼠称重体重后深度麻醉, 使用 0.9% 氯化钠注射液和 4% 多聚甲醛心脏灌流。灌流后取材, 取远端结肠 (肛门向上 1.5 cm 段), 冰冻切片, 切片厚度 16 μ m, 随后进行苏木精-伊红染色。在正置荧光显微镜十倍镜视野下获取代表性图像。根据以下标准进行组织学评价: 炎症严重程度 (0~4 分, 从正常至严重), 炎症位置深浅 (0~4 分, 从正常至累及黏膜), 隐窝损伤 (0~4 分, 从正常至隐窝损伤 2/3 以上), 三项得分相加即为组织学评分^[20]。

4. 统计学分析

本研究所有数据使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。首先对数据进行正态性分析。同组数据不同时间点的比较采用配对 *t* 检验。两组间比较若服从正态性分布, 则采用两独立样本 *t* 检验。若不服从正态性分布, 则采用非参数检验。统计结果采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示, *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

表 1 疾病活动指数评分表

Table 1 Disease activity index score

体重下降 (%) Loss of weight (%)	粪便性状 Fecal character	隐血或血便情况 Occult blood or bloody stool	疾病活动指数评分 DAI scores
0	正常 Regular	无 None	0
1~5			1
5~10	粪便黏滞于笼壁 Sticky stool	隐血阳性 Occult blood	2
10~20			3
> 20	粪便不成形 Fecal deformity	肉眼血便 Bloody stool	4

结 果

1. DSS 诱导急性 UC 模型

正常组小鼠第 7 天体重增长，模型组小鼠第 7 天体重减轻（见图 1A）。在第 7 天观察时，模型组小鼠均发现粪便不成形，黏滞于笼壁，隐血测试呈紫色（阳性）（ $P < 0.001$ ，见图 1B），偶见血便或小鼠肛周有血，正常组小鼠粪便正常。模型组 DAI 评分为 10.0 ± 0.5 （ $P < 0.01$ ，见图 1C）。DAI 评分大于 7 分。小鼠灌流后取材切片进行 HE 染色，可见模型组小鼠结肠远端炎症严重，局部损伤累及黏膜层，隐窝损坏（见图 1D），结合组织学评分（见图 1E）提示造模成功。

2. 未示踪 DSS 组小鼠与 Con 组小鼠神经元放电特性

为了明确正常组小鼠和模型组小鼠的 DRG 神经元放电特性，对两组小鼠 DRG 进行全细胞电流

钳记录（见图 2A, 2B），根据诱发出的动作电位分析神经元，对比静息膜电位、动作电位数量、动作电位幅值、基强度四个指标。模型组小鼠神经元静息膜电位、基强度较低（见图 2C, 2F），动作电位数量、动作电位幅值高于正常组（见图 2D, 2E）。结果说明模型组小鼠 DRG 神经元的兴奋性高于正常组小鼠。神经元数量：正常组 $n = 35$ ，模型组 $n = 28$ 。

（1）Con + DiI 组和 DSS + DiI 组示踪神经元的放电特性

取材后将分离出的 DRG 在荧光镜下观察，根据是否被示踪，将神经元区分为 DiI⁺ 细胞和 DiI⁻ 细胞（见图 3A, 3B）。为了说明被示踪的 DRG 神经元兴奋性发生怎样的改变，分别记录了示踪后两组小鼠 DiI⁺ 和 DiI⁻ 神经元诱发的动作电位并分析其兴奋性。正常示踪组 DiI⁻ 神经元动作电位数量高于 DiI⁺ 神经元（见图 3D），动作电位幅值、基强度低于 DiI⁺ 神经元（见图 3E, 3F），两组神经元静息膜

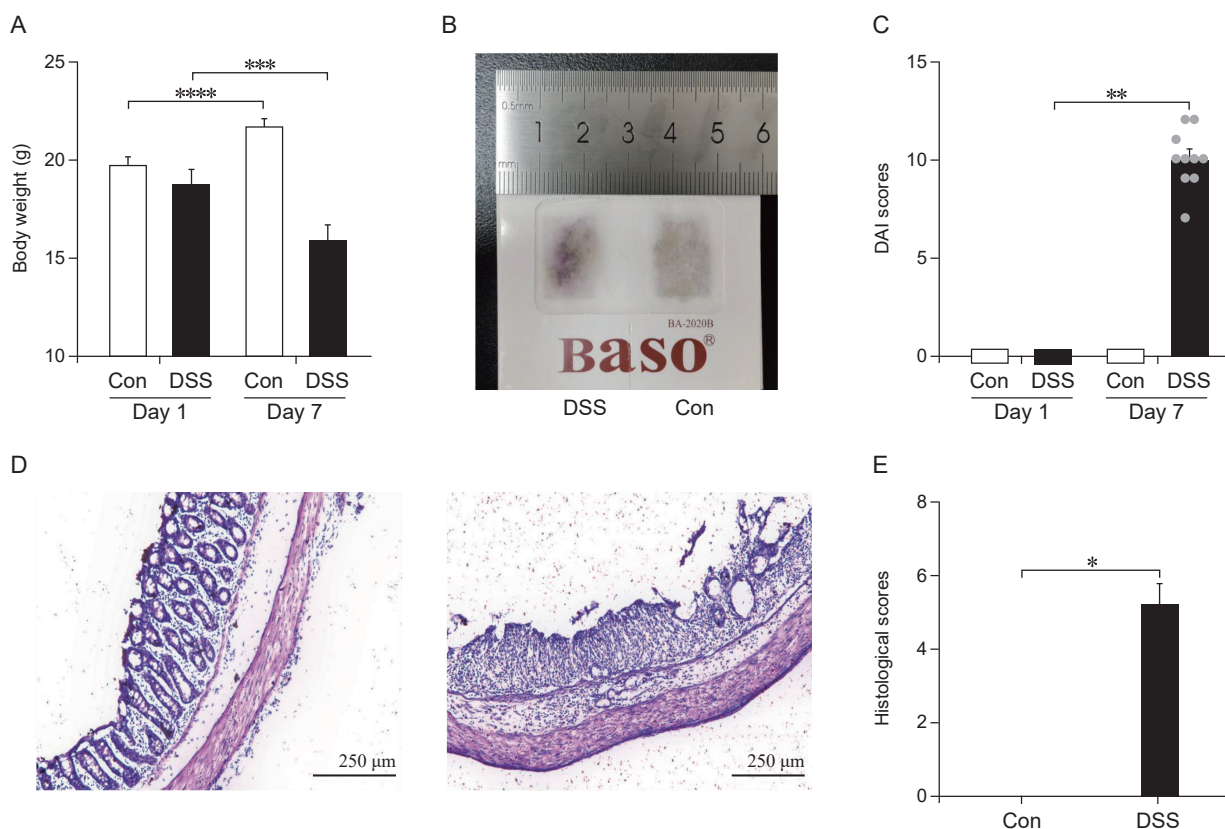


图 1 DSS 小鼠造模情况

(A-C) 造模第 7 天正常组小鼠体重增长（ $P < 0.0001$ ），模型组小鼠体重下降（ $P < 0.001$ ），隐血测试阳性，模型组 DAI 评分显著（ $P < 0.01$ ）；(D) HE 染色，左图为正常组，右图为模型组；(E) 组织学评分（ $*P < 0.05$ ，与 Con 组相比）

Fig. 1 DSS induced UC model

(A-C) The body weight of mice in Con group increased on Day 7（ $P < 0.0001$, vs Day 1），while the weight of mice in DSS group decreased on Day 7（ $P < 0.001$, vs Day 1），the occult blood test was positive and DAI scores of the DSS group was significant（ $P < 0.01$, vs Day 1）；(D) HE staining, left from Con group and right from DSS group；(E) Histological scores（ $*P < 0.05$, compared with Con group）. A-C（ $n = 10$ ），E（ $n = 4$ ）.

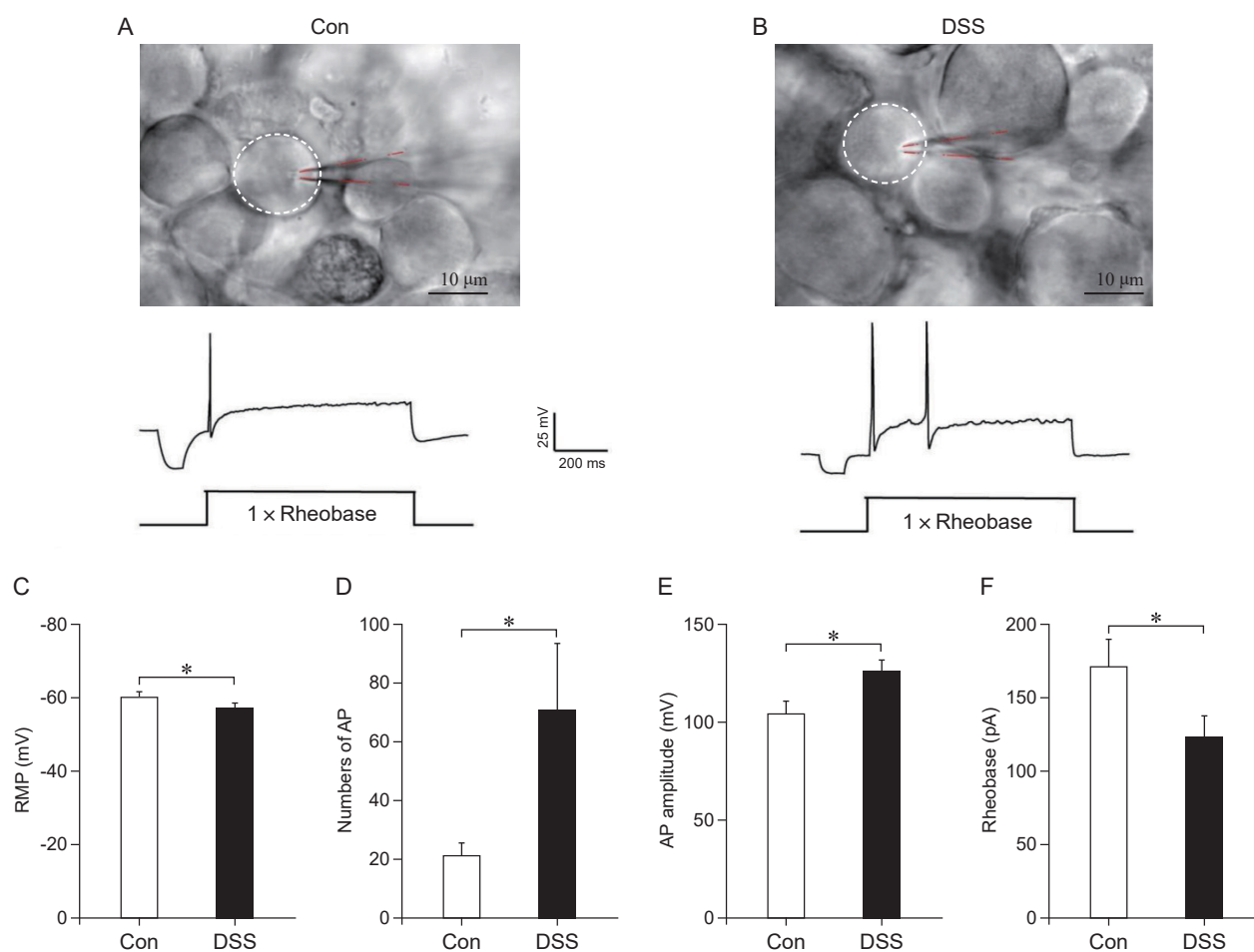


图2 正常组小鼠与模型组小鼠兴奋性比较, 模型组兴奋性较高

(A, B) 正常组与模型组 DRG 神经元明场下图像 (白色虚线为神经元, 红色虚线为记录电极), 各组神经元在 1 倍基强度刺激下诱发动作电位的代表轨迹; (C-F) 模型组小鼠 DRG 神经元静息膜电位、基强度低于正常组小鼠, 动作电位数量、动作电位幅值高于正常组 (* $P < 0.05$, 与 Con 组相比)

Fig. 2 Comparison of excitability between DSS group and Con group shows that the DSS group has higher excitability

(A, B) The views of DRG neurons were recorded under bright field and representative traces of action potentials induced by 1 $\times$ rheobase from each group; (C-F) The RMP and rheobase of DSS group were lower than those in the Con group, and numbers of AP and AP amplitude were higher than those in Con group (* $P < 0.05$, compared with Con group). Con group ($n = 35$); DSS group ($n = 28$).

电位差异无统计学意义 (见图 3C)。模型示踪组具有相同的趋势, 即 DiI⁻ 神经元动作电位数量高于 DiI⁺ 神经元 (见图 3H), 动作电位幅值、基强度低于 DiI⁺ 神经元 (见图 3I, 3J), 两组神经元静息膜电位差异无统计学意义 (见图 3G)。这一结果说明两组小鼠 DiI⁺ 神经元兴奋性均低于 DiI⁻ 神经元。可以认为示踪染料 DiI 对神经元产生了不利影响, 使其兴奋性降低。神经元数量: 正常示踪组 DiI⁺ $n = 15$, DiI⁻ $n = 8$; 模型示踪组 DiI⁺ $n = 26$, DiI⁻ $n = 7$ 。

(2) Con + DiI 组和 DSS + DiI 组小鼠两类神经元的放电特性

两组小鼠均被示踪染料 DiI 标记了躯体感觉神

经元, 为了明确兴奋性的改变来自于示踪剂而非神经元本身的改变, 重新对比了两组小鼠经过示踪后的同类神经元, 即两组 DiI⁻ 神经元相比, 两组 DiI⁺ 神经元相比。模型示踪组 DiI⁺ 神经元静息膜电位高于正常示踪组 (见图 4A), 动作电位幅值低于正常示踪组 (见图 4C), 两组神经元动作电位数量、基强度差异无统计学意义 (见图 4B, 4D)。模型示踪组 DiI⁻ 神经元静息膜电位高于正常示踪组 (见图 4E), 两组神经元动作电位数量、动作电位幅值、基强度差异无统计学意义 (见图 4F-H)。结果说明, 注射示踪剂后, 模型示踪组神经元无论是否被标记上, 兴奋性均低于正常示踪组。因此, 认为示踪剂

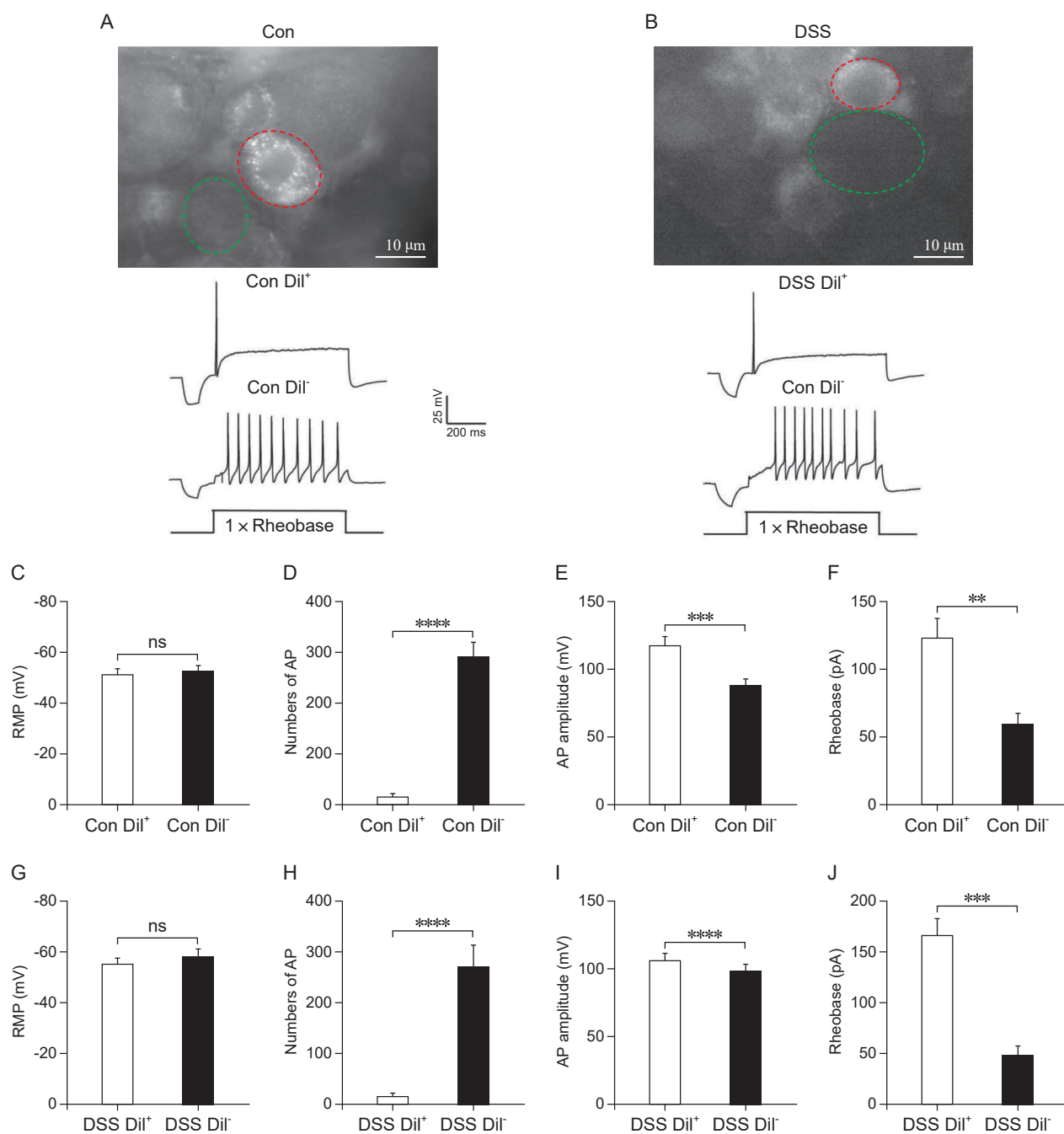


图 3 示踪后两组小鼠的 DiI⁺ 神经元与 DiI⁻ 神经元相比, 兴奋性降低

(A, B) 正常示踪组与模型示踪组示踪后 DRG 荧光镜下图像 (红圈为 DiI⁺ 神经元, 绿圈为 DiI⁻ 神经元), 各组神经元在 1 倍基强度刺激下诱发动作电位的代表性轨迹; (C-F) 正常示踪组 DiI⁺ 神经元动作电位数量高于 DiI⁻ 神经元 ($P < 0.0001$), 动作电位幅值、基强度低于 DiI⁺ 神经元 ($P < 0.01-0.001$); (G-J) 模型示踪组 DiI⁺ 神经元动作电位数量高于 DiI⁻ 神经元 ($P < 0.0001$), 动作电位幅值、基强度低于 DiI⁺ 神经元 ($P < 0.001-0.0001$)

Fig. 3 The excitability of DiI⁺ neurons in both groups decreased compared with DiI⁻ neurons after retrograde traced

(A, B) The views of DRG neurons were recorded under fluorescence microscope and representative traces of action potentials induced by 1×rheobase from each group (The red circle represents DiI⁺ neurons, while the green circle represents DiI⁻ neurons); (C-F) The numbers of AP of Con DiI⁺ was higher than Con DiI⁻ ($P < 0.0001$), and AP amplitude and rheobase were lower than those in Con DiI⁺ ($P < 0.01-0.001$); (G-J) The numbers of AP of DSS DiI⁺ was higher than DSS DiI⁻ ($P < 0.0001$), and AP amplitude and rheobase were lower than those in DSS DiI⁺ ($P < 0.001-0.0001$).

Con DiI⁺: DiI⁺ neurons in the Con + DiI group ($n = 15$); Con DiI⁻: DiI⁻ neurons in the Con + DiI group ($n = 8$); DSS DiI⁺: DiI⁺ neurons in the DSS + DiI group ($n = 26$); DSS DiI⁻: DiI⁻ neurons in the DSS + DiI group ($n = 7$).

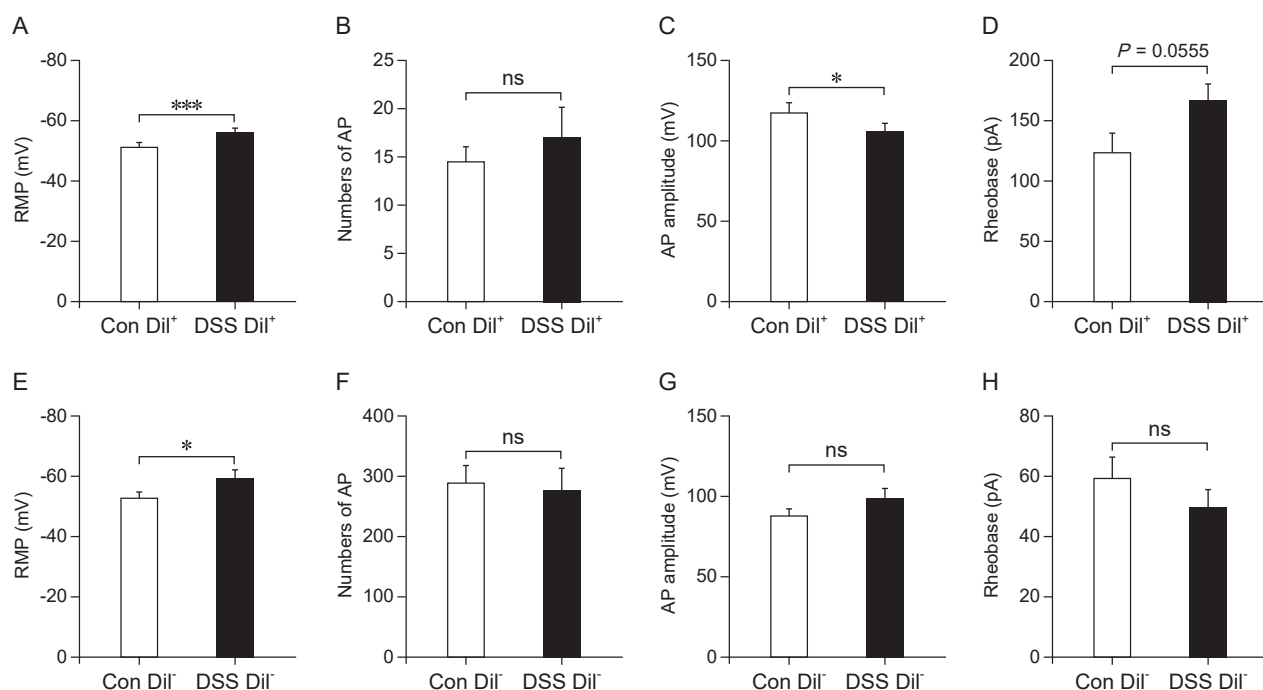


图4 模型示踪组小鼠两类神经元兴奋性均低于空白示踪组

(A-D) 模型示踪组 DiI^+ 神经元静息膜电位高于正常示踪组 ($P < 0.001$), 动作电位幅值低于正常示踪组 ($P < 0.05$); (E-H) 模型示踪组 DiI^- 神经元静息膜电位高于正常示踪组 ($P < 0.05$)

Fig. 4 The excitability of both types of neurons in DSS + DiI group was lower than those in Con + DiI group

(A-D) RMP of DSS DiI^+ was higher than Con DiI^+ ($P < 0.001$), and AP amplitude was lower than Con DiI^+ ($P < 0.05$); (E-H) RMP of DSS DiI^- was higher than Con DiI^- ($P < 0.05$).

Con DiI^+ : DiI^+ neurons in the Con + DiI group ($n = 15$); Con DiI^- : DiI^- neurons in the Con + DiI group ($n = 8$); DSS DiI^+ : DiI^+ neurons in the DSS + DiI group ($n = 26$); DSS DiI^- : DiI^- neurons in the DSS + DiI group ($n = 7$).

DiI 对 DRG 神经元的影响掩盖了模型的影响。

(3) 未示踪与示踪小鼠 DiI^- 神经元的放电特性

示踪鼠的 DiI^- 神经元即注射示踪剂后未被染料标记到的神经元。为了说明示踪染料 DiI 对整体 DRG 的影响, 对比了未示踪鼠与示踪鼠 DRG 的 DiI^- 神经元的兴奋性。正常组神经元静息膜电位、动作电位幅值、基强度高于正常示踪组 DiI^- 神经元 (见图 5A, 5C, 5D), 正常组神经元动作电位数量低于正常示踪组 DiI^- 神经元 (见图 5B)。模型组神经元动作电位数量低于模型示踪组 DiI^- 神经元 (见图 5F), 而动作电位幅值、基强度高于模型示踪组 DiI^- 神经元 (见图 5G, 5H), 两组神经元静息膜电位差异无统计学意义 (见图 5E)。结果说明无论是正常组动物或是 DSS 结肠炎模型动物, 在注射示踪剂的动物, 尽管是 DiI^- 神经元, 其兴奋性较相应未示踪动物增加。

讨论

随着神经科学的发展, 示踪剂的应用越发广泛,

这种新式的工具给科学研究带来了便利。例如, 在感觉生理和病理研究领域, 可以采用逆向示踪的手段将示踪染料注射至感觉纤维支配的外周区域标记感觉神经元, 或利用跨突触的示踪病毒点亮神经冲动传递的路径或神经环路。已有研究证实, 小鼠的急性 UC 模型可以使 DRG 神经元兴奋性升高, 产生内脏痛^[21]或相应躯体部位的牵涉性感觉过敏^[22]。在本研究中, 通过全细胞电流钳记录正常及结肠炎模型小鼠 DRG 神经元静息膜电位、动作电位数量、动作电位幅值和基强度等指标, 验证了小鼠 DRG 神经元在急性 UC 模型下出现兴奋性上升的改变。

为了进一步说明这些被致敏的神经元末梢支配, 本研究采用了最常用的化学染料 DiI, 对直结肠牵涉部位的皮肤进行示踪并记录 DRG 中膜电容值小于 25 pF 的小直径神经元, 却发现示踪剂对神经元电生理特性产生影响, 干扰了对模型导致神经元兴奋的判断, 这在既往研究也有报道。Sun 等^[23]在一项针对跨突触示踪病毒的研究中提到, 单纯疱疹病毒和狂犬病毒可以使被示踪神经元产生细胞毒性, 出现电生理特性的改变, 表现为小胶质细胞的

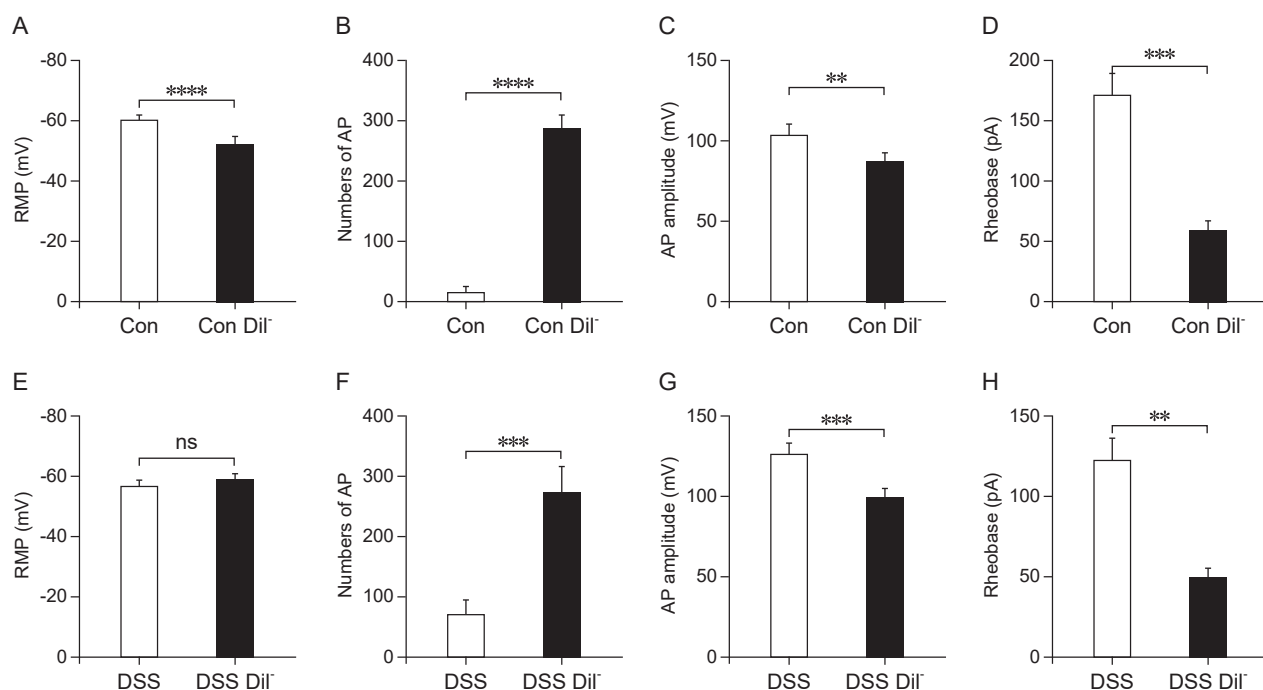


图 5 在正常组或 DSS 结肠炎模型动物，示踪剂引起 DRG DiI⁺ 神经元兴奋性升高 (A-D) 正常组神经元静息膜电位、动作电位幅值和基强度高于正常示踪组 DiI⁺ 神经元 ($P < 0.0001$)，动作电位数量低于正常示踪组 DiI⁺ 神经元 ($P < 0.01-0.001$)；(E-H) 模型组神经动作电位数量低于模型示踪组 DiI⁺ 神经元 ($P < 0.001$)，动作电位幅值、基强度高于模型示踪组 DiI⁺ 神经元 ($P < 0.01-0.001$)

Fig. 5 Tracing dye caused increased excitability of DRG DiI⁺ neurons in Con + DiI and DSS + DiI groups, compared with Con and DSS groups, respectively

(A-D) RMP and AP amplitude and rheobase in Con group were higher than those in Con DiI⁺ ($P < 0.01-0.0001$), and numbers of AP were lower than that in Con DiI⁺ ($P < 0.0001$); (E-H) Numbers of AP in DSS was lower than that in DSS DiI⁺ ($P < 0.001$), and AP amplitude and rheobase were higher than those in DSS DiI⁺ ($P < 0.01-0.001$).

Con DiI⁺: DiI⁺ neurons in the Con + DiI group ($n = 8$); DSS DiI⁺: DiI⁺ neurons in the DSS + DiI group ($n = 7$); DRG neurons in Con group ($n = 35$); DRG neurons in DSS group ($n = 28$).

异常和神经元膜蛋白的变化。但对化学类染料的影响报道不多。在本研究中观察到化学染料 DiI 对小鼠 DRG 神经元兴奋性存在抑制作用。

本研究对 DiI 标记的正常和模型小鼠 DRG 神经元分别记录 (见图 3)，组内比较结果表明 DiI⁺ 神经元与 DiI⁻ 神经元兴奋性变化趋势与结果 2 中未示踪的正常和模型动物结果并不一致，DiI⁺ 神经元均较 DiI⁻ 神经元兴奋性下降。而既往报道显示，DiI 示踪标记的阳性 DRG 神经元表现出兴奋性上升的趋势^[24]，与本研究结果不符。这可能与 DRG 处理方式的差异有关。通常在进行 DRG 的膜片钳实验中，多采用分离 DRG 后打散再进行细胞培养的方式，而本研究急性分离小鼠 DRG，在短暂的孵育恢复和胰酶消化表面膜性包裹后，以全组织的形式进行膜片钳记录。这两种组织和细胞制备的区别可能在于，打散培养只需要保留神经元，损毁神经胶质细胞等组织结构；而全组织形式则是在保留完整 DRG 的

基础上，对表面可见的形态完整的神经元进行钳制和记录。神经胶质细胞是神经元外膜的骨架，其表面的嘌呤能 P2 受体和缝隙连接蛋白 (Gap junction) 充当了神经元之间传递信息的媒介^[25]。同时本研究观察到，两组 DiI⁺ 神经元动作电位数量均增多，其本质是神经元 firing pattern 的改变，这可能是 DiI 对神经元的钠通道和钾通道产生了影响^[26]。

如前所述，本研究记录的均是小直径的传导伤害感受的 C 类纤维来源的 DRG 神经元，类型不同的神经元其兴奋性可能不同，随后在接受 DiI 示踪的正常和模型小鼠两组间比较 DiI⁺ 神经元与 DiI⁻ 神经元兴奋性变化)，结果表明模型示踪组 DiI⁺ 神经元和 DiI⁻ 神经元均表现出低于正常示踪组的趋势。这与结果 2 相反，结合既往的文献报道，可以明确的是，结肠炎模型可以引起 DRG 神经元兴奋性增加，而 DiI 示踪剂导致神经元兴奋性下降，尤其是模型组未被示踪标记的神经元兴奋性也下降，可以明确

这种影响来自示踪剂, 干扰我们对正常和模型动物神经元兴奋性的解读。在此基础上, 后续的相关研究可以将 DRG 神经元根据不同特征进行分类 (如神经元大小、神经元来源、肽能非肽能等角度), 深入探索不同类神经元之间兴奋性本身是否存在差异, 以及示踪染料对其影响是否一致。

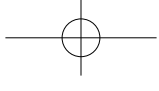
此外, 本研究还对比了未示踪小鼠和示踪小鼠的 DiI⁺ 神经元的兴奋性。假设示踪剂 DiI 对神经元兴奋性没有影响, 那么无论正常还是模型小鼠, 未示踪小鼠与示踪小鼠的 DiI⁺ 神经元兴奋性之间应没有差异。而实际结果显示示踪鼠的 DiI⁺ 神经元相较于未经示踪鼠的神经元兴奋性均升高。在本研究中, 示踪阳性神经元可以明确说明是来自皮肤的躯体感觉神经元, 而未被示踪到的神经元不能确定其来自皮肤或是结肠, 因为存在示踪剂量、注射位点等原因, 以及膜片钳仅能记录到 DRG 表层神经元等因素影响, 因而存在 DiI⁺ 神经元与 DiI⁺ 神经元定义不够准确的问题。另外, 小鼠 DRG 中的卫星胶质细胞与神经元之间存在缝隙连接, 因而也是示踪染料传递的路径之一^[27], 这些都是本研究技术方面的限制性, 可能通过其他示踪或基因标记技术得以改善。此外我们注意到, 在图 5 中两组示踪小鼠 DiI⁺ 神经元动作电位幅值的趋势与其余指标并不一致, 其原因需要后续深入研究。

综上所述, DiI 是一种被广泛应用的神化化学示踪剂, 其对神经元兴奋性的影响不容忽视, 在不同的实验设计中应予以排除或提供更完备的代替方法。尚并不清楚这仅仅是 DiI 的特性, 还是羧花菁类示踪染料广泛存在的问题。为避免示踪剂的影响对实验结果产生错误的解读, 在后续的研究中, 需要尝试对比不同种类的示踪剂。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Liu Q, Wu Y, Wang H, *et al.* Viral tools for neural circuit tracing[J]. *Neurosci Bull*, 2022, 38(12):1508-1518.
- [2] Xu X, Holmes TC, Luo MH, *et al.* Viral vectors for neural circuit mapping and recent advances in trans-synaptic anterograde tracers[J]. *Neuron*, 2020, 107(6):1029-1047.
- [3] Nectow AR, Nestler EJ. Viral tools for neuroscience[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21(12):669-681.
- [4] 蔡捷, 方东, 李松, 等. 膜片钳技术在慢性痛大鼠背根神经节神经元电生理学特性改变中的应用 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2017, 23(1):25-28.
- [5] Li W, Liu J, Chen A, *et al.* Shared nociceptive dorsal root ganglion neurons participating in acupoint sensitization[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15:974007.
- [6] Dodds KN, Kyloh MA, Travis L, *et al.* Morphological identification of thoracolumbar spinal afferent nerve endings in mouse uterus[J]. *J Comp Neurol*, 2021, 529(8):2029-2041.
- [7] Yu YQ, Chen XF, Yang Y, *et al.* Electrophysiological identification of tonic and phasic neurons in sensory dorsal root ganglion and their distinct implications in inflammatory pain[J]. *Physiol Res*, 2014, 63(6):793-799.
- [8] Qiu L, Zhang B, Gao Z. Lighting up neural circuits by viral tracing[J]. *Neurosci Bull*, 2022, 38(11):1383-1396.
- [9] Li J, Liu T, Dong Y, *et al.* Trans-synaptic neural circuit-tracing with neurotropic viruses[J]. *Neurosci Bull*, 2019, 35(5):909-920.
- [10] Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(3):462-500.
- [11] Chen L, Leng C, Ru Q, *et al.* retrograde labeling of different distribution features of DRG P2X2 and P2X3 receptors in a neuropathic pain rat model[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:9861459.
- [12] Guerrero-Alba R, Valdez-Morales EE, Jiménez-Vargas NN, *et al.* Co-expression of μ and δ opioid receptors by mouse colonic nociceptors[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(13):2622-2634.
- [13] Solorzano C, Villafuerte D, Meda K, *et al.* Primary afferent and spinal cord expression of gastrin-releasing peptide: message, protein, and antibody concerns[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(2):648-657.
- [14] Li Y, Song Y, Zhao L, *et al.* Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye DiI[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(11):1703-1708.
- [15] Gao XY. 刘风雨 (译). 在体背根神经节钙成像方法解析内脏痛及牵涉痛的新机制 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2021, 27(10):763.
- [16] 李笑雪, 韩数, 方焯红, 等. 背根神经节在电生理记录技术在针灸研究中的应用概述 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2019, 25(6):404-408.
- [17] Lv MD, Wei YX, Chen JP, *et al.* Melatonin attenuated chronic visceral pain by reducing Nav1.8 expression and nociceptive neuronal sensitization[J]. *Mol Pain*, 2023, 19:17448069231170072.
- [18] Fan H, Chen W, Zhu J, *et al.* Toosendanin alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by inhibiting M1 macrophage polarization and regulating NLRP3 inflammasome and Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76:105909.
- [19] Zhang L, Xie R, Yang J, *et al.* Chronic pain induces nociceptive neurogenesis in dorsal root ganglia from



- Sox2-positive satellite cells[J]. *Glia*, 2019, 67(6):1062-1075.
- [20] Wang J, Zhang C, Guo C, *et al.* chitosan ameliorates dss-induced ulcerative colitis mice by enhancing intestinal barrier function and improving microflora[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22):5751.
- [21] Abdrakhmanova GR, AlSharari S, Kang M, *et al.* {alpha}7-nAChR-mediated suppression of hyperexcitability of colonic dorsal root ganglia neurons in experimental colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 299(3):G761-G768.
- [22] Gao X, Han S, Huang Q, *et al.* Calcium imaging in population of dorsal root ganglion neurons unravels novel mechanisms of visceral pain sensitization and referred somatic hypersensitivity[J]. *Pain*, 2021, 162(4):1068-1081.
- [23] Sun L, Tang Y, Yan K, *et al.* Differences in neurotrophism and neurotoxicity among retrograde viral tracers[J]. *Mol Neurodegener*, 2019, 14(1):8.
- [24] Hu S, Xiao Y, Zhu L, *et al.* Neonatal maternal deprivation sensitizes voltage-gated sodium channel currents in colon-specific dorsal root ganglion neurons in rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 304(4):G311-G321.
- [25] Chen Z, Huang Q, Song X, *et al.* Purinergic signaling between neurons and satellite glial cells of mouse dorsal root ganglia modulates neuronal excitability in vivo[J]. *Pain*, 2022, 163(8):1636-1647.
- [26] 韩济生. 神经科学 [M]. 第四版. 北京: 北京大学医学出版社, 2022:223-230.
- [27] Huang TY, Cherkas PS, Rosenthal DW, *et al.* Dye coupling among satellite glial cells in mammalian dorsal root ganglia[J]. *Brain Res*, 2005, 1036(1-2):42-49.

· 消 息 ·

中国中西医结合学会疼痛学专业委员会第九次学术年会胜利召开

2024年4月26~28日,由中国中西医结合学会主办,中国中西医结合学会疼痛学专业委员会承办,苏州市中西医结合医院协办的中国中西医结合学会疼痛学专业委员会第九次学术年会在江苏省苏州市召开。

国家中西医结合医学中心主任、中国科学院院士仝小林教授;中国中西医结合学会副会长、秘书长吕文良教授;中国中西医结合学会疼痛学专业委员会主任委员熊东林教授;中国医师协会疼痛科医师分会会长樊碧发教授;中华医学会疼痛学分会主任委员张达颖教授;中国医药教育协会疼痛医学专业委员会主任委员李水清教授;中国老年保健医学研究会老年疼痛疾病分会主任委员林建教授;中华医学会疼痛学分会副主任委员傅志俭教授;中国医师协会疼痛科医师分会副会长刘慧教授、夏令杰教授;中华中医药学会疼痛学分会副主任委员陈建军教授、李娟红教授、刘垒教授、丁永国教授;国内疼痛学界宋文阁教授、卢振和教授;中国中西医结合学会疼痛学专业委员会副主任委员尚鸿生教授、修忠标教授、张金华教授、吴大胜教授、赵序利教授等嘉宾出席本次开幕式。

开幕式由中国中西医结合学会疼痛专业委员会秘书长李顺主持。中国中西医结合学会疼痛学专业委员会主任委员熊东林教授致开幕辞。熊东林教授在致辞中提到,近年来,中西医结合疼痛医学的发展进入快车道,慢性疼痛诊疗在国家卫生健康工作高质量发展的进程中发挥重大作用,重大事件包括国家卫生健康委员会、国家中医药管理局联合决定在全国开展疼痛综合管理试点工作,在全国遴选了试点工作的综合医院和中医医院;国家中西医结合医学中心中日友好医院获批国家中医药管理局中西医结合临床(疼痛学)高水平中医药重点学科建设项目等。希望通过这次年会,为中西医结合疼痛医学事业的发展注入崭新的活力。

本次年会开设了1个主会场,1个青年论坛,6个分会场共19个主题板块,包括脊柱内镜、神经调控、腰背痛、银质针、软组织疼痛、风湿疼痛、红外热像、神经病理性疼痛、心率变异分析、中医外治、运动康复、肌骨超声、疼痛护理、颈肩痛、中医微创、微创介入、胶原酶、癌痛、针刺镇痛等主题。每个分会场邀请了国内知名疼痛学专家就中西医结合疼痛治疗的新理念、新技术和新方法进行深入解读和分享,为参会者带来了一场知识的盛宴。

(黄佳彬 供稿)