文章编号:1000-5404(2007)05-0387-03

论著

经股后肌群注射DiI逆行示踪标记神经元胞体的实验研究

文 灿[1],李淑蓉[2],王晗知[1],苏炳银[1,3] ([1]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;成都医学院:[2]病理学教研室,[3]组织胚胎与神经生物学教研室,成都 610081)

提 要:目的 探讨经股后肌群注射DiI行逆行示踪以精确显示支配神经元胞体在脊髓的时空分布情况。**方法** 新生昆明小鼠65只,经左后肢股后肌群注射DiI,在注射2、4、6、8、12、24 h和2、4、7、14、28 d及2、3个月后观测背根神经节和腰段脊髓示踪荧光的分布和强度。**结果** ①示踪细胞分布在左侧L_2~S_2脊髓段和相应的背根神经节,主要集中在L_4~L_6段;②注射DiI 6 h后,在背根神经节和脊髓前角可见发微弱红色荧光的神经元;③标记的神经元数量逐渐增多,4 d达到高峰;④6~24 h每个标记神经元荧光逐渐增强,24 h后达到高峰;⑤3个月后荧光强度无显著降低。**结论** 经股后肌群注射DiI作逆行示踪,可快速、准确、持久地标记背根神经节感觉神经元和脊髓运动神经元,且适当延长示踪时间可提高神经元的标记率。

关键词:DiI;感觉神经元;运动神经元;逆行示踪;荧光标记
中图法分类号:R322.8-33;R329.24;R817.1 **文献标识码**:A

Retrograde tracing study on neurons labeled by injecting rear-thigh muscles with DiI in mice

WEN Can[1], LI Shu-rong[2], WANG Han-zhi[1], SU Bing-yin[1,3] ([1]Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038;[2]Department of Pathology, [3]Department of Histology and Embryology and Neurobiology, Chengdu Medical College, Chengdu 610081, China)

Abstract: Objective To explore the fluorescent distribution, and the relation between fluorescent intensity and time after injecting rear-thigh muscles with DiI. **Methods** Sixty-five new born mice were equally and randomly divided into 13 groups. Fluorescent distribution and intensity were investigated at 2, 4, 6, 8, 12, 24 h, and 2, 4, 7, 14, 28 d and 2, 3 months after injecting the left posterior limb rear thigh muscles with 1.5 μl 4 mg/ml DiI for one mouse. **Results** The labeling neurons were scattered from L_2 level to S_2 level and associated dorsal root ganglion (DRG), but the most were located at L_4 to L_6 section. The faint red fluorescence neurons were observed at dorsal root ganglion and cornu anterius medullae spinalis 6 h post-injection. The labeling neurons increased up to the 4th day. The fluorescent intensity enhanced gradually from 6 h to 24 h, then kept the intensity for 3 months. **Conclusion** It is a quick, precise, persistent method to trance and label the dorsal root ganglions sensory neuron and spinal motoneuron by injecting rear-thigh muscles with DiI, and the rate of labeling neurons can be improved by prolonging the tracing time properly. It is also provide basic data for clinical or experimental neuron label and location.

Key words: DiI; sensory neuron; motoneuron; retrograde tracing

DiI(即1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-4甲基吲哚羰花青-高氯酸盐)是一种亲脂性羰花青染料,具有毒性小,不影响被标记细胞的存活、生长和在标记细胞内淬灭慢,不向胞体外扩散等特点,是细胞学、胚胎学研究中常用的分子探针。1986年,Honig等[1]首次将DiI用于神经系统的研究,成功地显示了体外培养神经元的胞体和突起。此后,DiI迅速发展成为神经科学研究领域中常用的荧光示踪剂,取得了一些新发现[2-5]。股后肌群的神经支配主要来自坐骨神经,其确切的神经定位、标记研究既有利于辅助定位判断,又能为实验研究提供资料。本研究以股后肌群注射DiI为模型,系统地观察了注射DiI后标记神经元出现的时间和荧

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2003CB515300);成都医学院科研专项基金(2006)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" project, 2003CB515300) and the Scientific Research Foundation of Chengdu Medical College (2006)

作者简介:文 灿(1971-),男,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事神经损伤与再生方面的研究。电话:(023)68753935,E-mail: wencan@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:苏炳银,电话:(028)68289158,E-mail: subingyin@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-09-10;修回日期:2006-12-01

光持续情况，力图为在体标记神经元提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 动物分组及实验方法

新生昆明小鼠65只（共来自6只母鼠），雌雄不拘，体质量1.9～2.1 g，购自本校实验动物中心。用二甲基甲酰胺（DMF）配制DiI溶液，浓度为4 mg/ml。在左后肢股后肌群中部，用微量进样器注射DiI溶液1.5 μl/只，注射完毕立即送回各自母鼠喂养。

分别在DiI注射2、4、6、8、12、24 h和2、4、7、14、28 d及2、3个月后按常规方法用4%多聚甲醛（PFA）灌注，然后在解剖显微镜下小心分离、剥取整个腰、骶段脊髓及其背根神经节（DRG），并在右侧脊神经发出处划痕定标。每个时相点取5只小鼠，置30%蔗糖（含4% PFA）4 ℃冰箱过夜后行冰冻切片，冠状纵切，边切边在荧光显微镜下观察，在发现第1张有DiI标记神经元的片子后，脊髓每隔40 μm，DRG每隔20 μm留取1张10 μm切片，各取3张，计数发红色荧光的细胞数量，以形态基本完整为1个计数神经元；用IPP软件系统测量其荧光强度，用灰度值表示，取平均值作该时相点的示踪细胞数量和荧光强度。

1.2 试剂与仪器

DiI购自美国Sigma公司，DMF购自上海生工生物工程有限公司；解剖显微镜型号为Olympus SZ40，荧光激发装置为Olympus MODEL BH2-RFL-T3，图像采集和分析系统为Olympus DP70；冰冻切片机型号为LEICA CM1800。

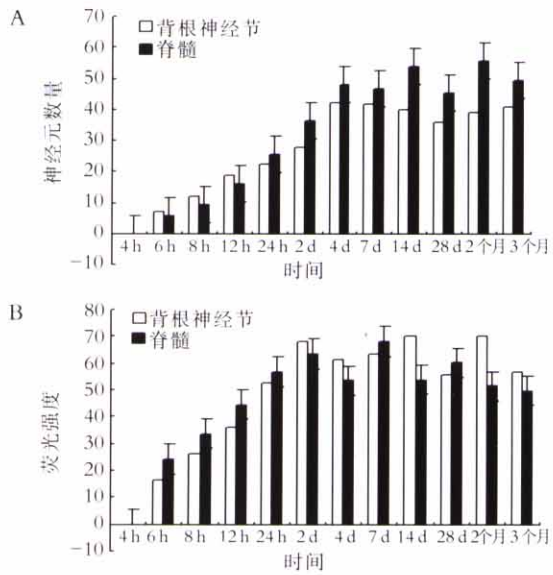
1.3 统计学分析

数据以 $x \pm s$ 表示，采用SPSS 10.0统计软件进行方差分析。

2 结果

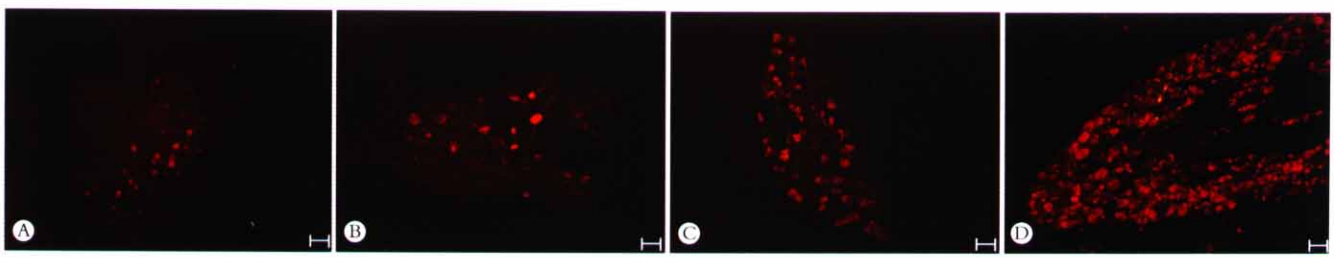
注射DiI 6 h后，在L_4～L_6脊髓和DRG可见少许发微弱红色荧光的神经元，荧光强度不均一，细胞形态不清；6～24 h单个细胞的荧光强度逐渐增强，24 h后达到高峰，胞质荧光强度均一，细胞形态清楚，突起清晰；同时，在注射后的前4 d，随着时间的增加，红色荧光标记的神经元数量增多（$P<0.05$）；3个月后荧光仍然存在，且强度不显著降低（图1、2）。

荧光标记神经元散布在左侧脊髓段和相应的DRG（图3），注射DiI 6 h后左侧脊髓中可见少量标记神经元，形态不清，荧光微弱；注射DiI 12 h后标记神经元数量较多，形态清楚，荧光增强；注射DiI 24 h后标记神经元进一步增多、荧光增强；其中，除3只在L_2、7只在L_3、6只在S_2、10只在S_1脊髓水平发现少量荧光标记细胞外，其余都集中分布在L_4～L_6段。所有小鼠右侧脊髓和DRG无荧光标记细胞。



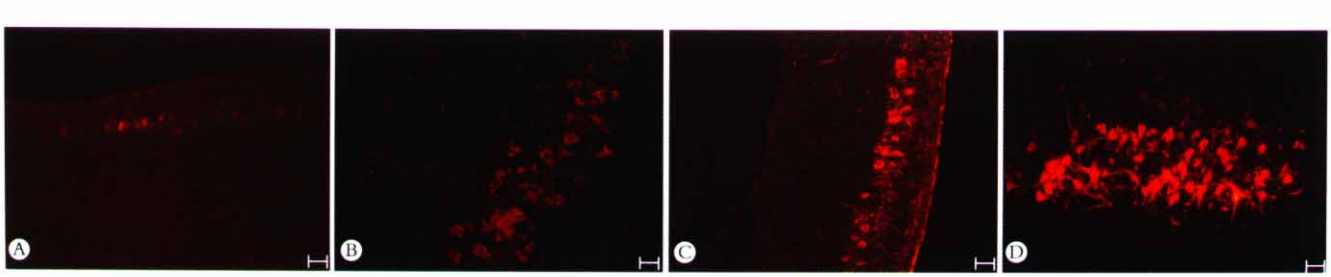
A：神经元数量变化；B：神经元荧光强度变化

图1 左侧脊髓、背根神经节的标记神经元数量和荧光强度变化



A：注射DiI 6 h后DRG；B：注射DiI 12 h后的标记神经元；C：注射DiI 24 h后标记神经元；D：注射DiI 3个月后的标记神经元

图2 不同时相点DRG内DiI标记神经元 （标尺：50 μm，荧光显微镜×200）



A：注射DiI 6 h的标记神经元；B：注射DiI 12 h后标记神经元；C：注射DiI 24 h后标记神经元；D：注射DiI 3个月后的标记神经元

图3 不同时相点左侧脊髓内DiI标记神经元 （标尺：50 μm，荧光显微镜×200）

3　讨论

逆行示踪是神经解剖学和神经生物学研究领域的常用方法之一，常用的示踪剂还有 HRP、WGA-HRP、CTB、EB 和 DAPI 等，其中，HRP 示踪必须要固定组织细胞后，通过组织化学染色才能观察，不能作活细胞显示，WGA-HRP 等荧光示踪剂虽可作活细胞显示，但荧光持续时间短。本研究所用 DiI 细胞毒性小，不影响被标记细胞的存活、生长和发育；在组织的液相中不扩散，能特异性的标记神经元的胞体和突起，可沿神经纤维进行顺行和逆行扩散，结合状态稳定，能获得持久的染色效果，神经元没有显著的毒性作用[6-9]。因此，DiI 越来越多地应用于神经科学研究领域[2-5]。

新生鼠是发育神经生物学研究和神经元原代培养的常用动物，3 个月后鼠性成熟，故本研究在小鼠出生后即注射 DiI，示踪荧光观测贯穿从出生到性成熟这一全过程，结果表明注射 DiI 后，示踪荧光持续存在，且未明显影响小鼠个体发育。而在常用的示踪剂中，HRP 5～6 d 即降解，WAG-HRP 也不过 12 d，而本观察持续 3 个月，荧光强度并没有显著降低。另外，神经损伤后的前 3 个月是修复的重要阶段，提示 DiI 可应用于神经损伤后的标记，以显示神经通路的恢复情况。

本研究提示虽然 6 h 后取材即可观测到示踪荧光，但在 12 h 后效果比较好，最好在 24 h 后取材，标记神经元数量要 4 d 达高峰，但因鼠出生后的前 3 d 发育很快，对神经元原代培养存活率影响大，可考虑在注射 12～24 h 后取材。DRG 和脊髓前角刚出现示踪荧光时，强度不均一，细胞形态不清，这是由 DiI 的示踪原理所决定的，DiI 经肌肉注射后被神经末梢摄取，并通过轴突逆行运输到相应的细胞体，再嵌进质膜内并在膜内作侧向扩散运动，进而使得整个参与吸收、运输的轴突和细胞体都因存在 DiI 而发出红色荧光。

DiI 的逆行示踪原理决定了荧光标记神经元的分布范围，股后肌群主要由坐骨神经的分支支配，而坐骨神经主要是 L_4～L_6 脊神经构成，故荧光标记细胞主要分布在该节段脊髓和 DRG。但本研究中，L_2、L_3、S_1 和 S_2 节段也有少量荧光标记神经元，分析原因如下：一方面，新生鼠后肢股部很小，使得 DiI 接触部位相对广泛，既可能直接伤及坐骨神经，也可能累及股内侧肌，L_2、L_3 节段出现荧光即可能由此而来；另一方面，坐骨神经中含有 S_1、S_2 的神经成分，在人体，坐骨神经由 L_4～S_3 组成最为多见，约占 82.7%。

目前，还没有特异性的感觉神经元和运动神经元的活细胞标记荧光，其鉴定都是通过相应的特异性抗体，通过固定组织、细胞，采用免疫组织化学的方法来予以鉴定，操作过程复杂，其准确性受抗体特异性和操作技术的影响，且无法对存活的感觉神经元和运动神经元予以特异性的标记、分选。而 DiI 作为一种分子探针，细胞毒性很小，对培养细胞的电生理和生化特征基本没有影响[1]，抵达神经元胞体后不再作跨细胞的运输，亦即不会越过突触[7]。即使在离体培养的细胞中，也不会在细胞间扩散、传递，因此，从理论上讲，经肌注 DiI 逆行示踪标记的神经元，只能为位于 DRG 的感觉神经元和脊髓前角的运动神经元，具有高度的精确性。因此，通过肌注 DiI 标记的感觉神经元和运动神经元可做原代培养，通过分选得以纯化。经神经干（如坐骨神经）和肌肉注射都可以逆行示踪、标记神经元，前者包括直接往神经干注射示踪剂、切断或破坏神经干后浸泡/包埋示踪剂等，标记效率高，但操作相对复杂，缺乏支配靶区与神经元对应的定位联系；后者操作简单，能反映支配区与神经元之间的联系。

本研究表明，经肌肉注射 DiI 可以快速、准确地标记、鉴定 DRG 感觉神经元和脊髓运动神经元，并对此作长时间标记，且适当延长示踪时间可提高神经元的标记率；同时，这也是一种确认肌肉中枢支配的简易定位方法，并可用于检测神经传导通路的完整性和神经发育学研究。总之，本研究可为临床或基础研究中的神经定位、标记提供基础资料。

参考文献：

[1] 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.

[2] Choi D, Li D, Raisman G. Fluorescent retrograde neuronal tracers that label the rat facial nucleus: a comparison of Fast Blue, Fluoro-ruby, Fluoro-emerald, Fluoro-Gold and DiI[J]. J Neurosci Methods, 2002, 117(2): 167－172.

[3] Zec N, Kinney H C. Anatomic relationships of the human nucleus of the solitary tract in the medulla oblongata: a DiI labeling study[J]. Auton Neurosci, 2003, 105(2): 131－144.

[4] Swift M J, Crago P E, Grill W M. Applied electric fields accelerate the diffusion rate and increase the diffusion distance of DiI in fixed tissue [J]. J Neurosci Methods, 2005, 141(1): 155－163.

[5] Makarenko I G, Ugrumov M V, Calas A. Axonal projections from the hypothalamus to the pituitary intermediate lobe in rats during ontogenesis: DiI tracing study[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2005, 155(2): 117－126.

[6] Godement P, Vanselow J, Thanos S, *et al*. A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue[J]. Development, 1987, 101(4): 697－713.

[7] von-Bartheld C S, Cunningham D E, Rubel E W. Neuronal tracing with DiI: decalcification, cryosectioning, and photoconversion for light and electron microscopic analysis[J]. J Histochem Cytochem, 1990, 38(5): 725－733.

[8] Ashwell K W, Zhang L I. Prenatal development of the vestibular ganglion and vestibulocerebellar fibres in the rat[J]. Anat Embryol (Berl), 1998, 198(2): 149－161.

[9] Zec N, Filiano J J, Kinney H C. Anatomic relationships of the human arcuate nucleus of the medulla: a DiI-labeling study[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1997, 56(5): 509－522.

（编辑　张大春）