

# 大鼠牙髓神经胞体在三叉神经节内分布特点

肖芳莉<sup>1</sup>, 李国超<sup>1</sup>, 马腾飞<sup>1</sup>, 黄姗姗<sup>1</sup>, 徐文华<sup>1</sup>, 王烈成<sup>2</sup>, 王元银<sup>1</sup>

**摘要** 目的 了解正常及三叉神经痛(TN)模型大鼠的牙髓神经胞体在三叉神经节(TG)内分布情况及其投射关系,为临床通过TG治疗TN提供解剖学依据。方法 本实验分为模型组和假手术组,在两组大鼠不同牙髓腔内注入逆行荧光探针,用荧光显微镜观察TG中荧光标记神经元的分布情况。结果 两组大鼠分别在右下及左上中切牙髓腔内注入绿色荧光探针 Fast DiO 72 h 后,分别在右侧 TG 后外侧区、左侧 TG 中段区观察到数个、成簇分布带有绿色荧光标记神经元;将两组大鼠右下及左上中切牙髓腔内分别注入 Fast DiO、Fast DiI 两种荧光探针,72 h 后在其同侧 TG 的后外侧区和中间区分别观察到成簇分布的带有绿色和红色荧光的神经元;两组大鼠左侧上中切牙及下颌第一磨牙髓腔内分别注入荧光探针 Fast DiI 和 Fast DiO,72 h 后在同侧 TG 的后外侧区和中段区分别观察到成簇分布带有绿色和红色荧光的神经元。经统计学比较,两组之间相应牙髓神经胞体在 TG 内分布区域、数量及荧光强度没有明显区别。结论 三叉神经上、下颌支神经胞体投射于同侧 TG,并有一定区域性;TN 产生不改变 TG 内神经元数量及投射联系,其可能与三叉神经功能活动改变有关。

**关键词** 三叉神经节;三叉神经痛;逆行荧光标记;神经束路追踪法

中图分类号 R 745.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0064-05

三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)是指三叉神经分布区域阵发性剧烈疼痛,其发病机制及诊治国内外学者仍在探索中,是神经系统一大顽疾。对于神经系统疾病,目前普遍采用神经束路追踪法来研究其内在联系及机制。关于三叉神经各分支胞体在三叉神经节(trigeminal ganglia, TG)内投射,早在1978年,Charles et al<sup>[1]</sup>对猫采用辣根过氧化物酶

(horseradish peroxidase, HRP)追踪法,角膜注射于TG内侧发现被标记细胞。1981年,Marfurt<sup>[2]</sup>也成功用 HRP 追踪法发现猫三叉神经各分支在 TG 内对应区域,国内也有学者采用此法对家兔三叉神经进行了逆向追踪<sup>[3]</sup>。然而不同动物、相同部位神经元分布可能存在种属差异。该研究通过神经元逆行荧光标记法对假手术组及模型组大鼠不同牙髓注入荧光探针,随后分析 TG 中标记神经元数量及分布,来了解各分支神经胞体在 TG 内投射情况,进而探讨三叉神经系统信号传导及相互关系,为临床治疗提供理论指导。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 普通级健康成年雄性 SD 大鼠 60 只,150~250 g(安徽医科大学实验动物中心),预先毛刷刺激训练,形成适应性;亲脂性染料:Fast DiI(D-3899,激发波长 568 nm,发射波长 564 nm)、Fast DiO(D-3898,激发波长 488 nm,发射波长 499 nm),荧光探针(美国 Sigma 公司);避光 4℃保存,实验前用生理盐水配置成浓度为 5 mg/ml。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 TN 模型制备** 通过眶下神经慢性缩窄环方法制备动物模型 40 只,造模 2 周后行 TN 诱发实验,采用 Vos et al<sup>[4]</sup>动物行为学反应积分系统评价,筛选 20 只。

**1.2.2 假手术组动物制备** 手术方法与模型组相同,暴露眶下神经,但对其不予结扎,再分层缝合,准备 20 只。

**1.2.3 荧光探针注射** 模型组与假手术期大鼠均分 4 组,分别采取 4 种部位注射。第一组荧光探针(Fast DiO)注射于右侧下中切牙;第二组荧光探针(Fast DiO)注射于左侧上中切牙;第三组荧光探针双标记右侧下中切牙(Fast DiO)及左侧上中切牙(Fast DiI);第四组荧光探针双标记左侧上中切牙(Fast DiI)及左侧下颌第一磨牙(Fast DiO);均在麻醉状态下采用微量注射器于髓腔内缓慢注入荧光探针 2 μl。

**1.2.4 TG 标本制备** 大鼠荧光探针注入标记 72

2015-10-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271162);安徽省自然科学基金(编号:11040606M204);安徽省高等学校省级优秀青年人才基金(编号:2012SQRL070)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:肖芳莉,女,硕士研究生;

王元银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com

h 心脏灌注处死、固定、断头,取 TG 4% 多聚甲醛固定至少 2 h。

**1.2.5 荧光检测** 取 TG 包埋固定,置于载玻片上,荧光显微镜观察并拍照,分析并记录荧光分布、数量及强度。

**1.3 统计学处理** Leica 图像处理软件对荧光强度行半定量测量分析,取平均值;采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,组间取单因素方差分析,后行 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 模型组鉴定** 40 只行眶下神经慢性缩窄环手术大鼠中,32 只造模成功,成功率达 80%。随机筛选 20 只。

### 2.2 假手术组荧光标记神经元在 TG 内分布

**2.2.1 右侧下中切牙牙髓荧光标记神经元在 TG 内分布** 荧光探针 Fast DiO 标记 72 h 后,于其右侧 TG 局部区域检测到绿色标记神经元(图 1A),经明视野(可见光)鉴定,该神经元位于 TG 后外侧区域(图 1B),成簇聚集,数量约 3~5 个。左侧 TG 未检测到标记神经元(图 1C)。

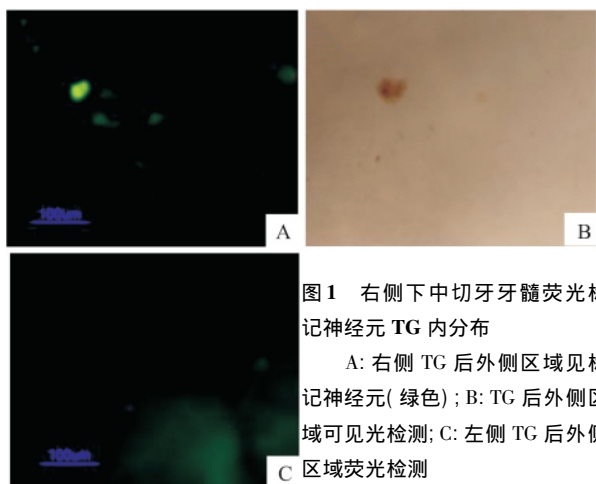


图 1 右侧下中切牙牙髓荧光标记神经元 TG 内分布

A: 右侧 TG 后外侧区域见标记神经元(绿色); B: TG 后外侧区域可见光检测; C: 左侧 TG 后外侧区域荧光检测

**2.2.2 左侧上中切牙牙髓荧光标记神经元在 TG 内分布** 荧光探针 Fast DiO 标记 72 h 后,于其左侧 TG 检测到绿色标记神经元(图 2A),经明视野鉴定位于 TG 中段区域(图 2B),成簇局限分布。右侧 TG 未检测到标记神经元(图 2C)。

**2.2.3 右侧下中切牙及左侧上中切牙牙髓荧光标记神经元在 TG 内分布** 分别对右下及左上中切牙髓腔内分别注入 Fast DiO(绿色)、Fast DiI(红色)两种荧光探针,标记 72 h,于右侧 TG 后外侧区域检测到绿色荧光标记神经元(图 3A),于左侧 TG 中段区

检测到红色荧光标记神经元(图 3C),均呈局限性分布,其它区域无。

**2.2.4 左侧上中切牙和左侧下第一磨牙牙髓荧光标记神经元在 TG 内分布** 左侧上中切牙及下颌第一磨牙髓腔内分别注入荧光探针 Fast DiI(红色)和 Fast DiO(绿色),72 h 后于左侧 TG 后外侧区域检测到绿色标记神经元(图 4A),左侧 TG 中段区域检测到红色标记神经元(图 4C),均呈局限性分布,其它区域无。

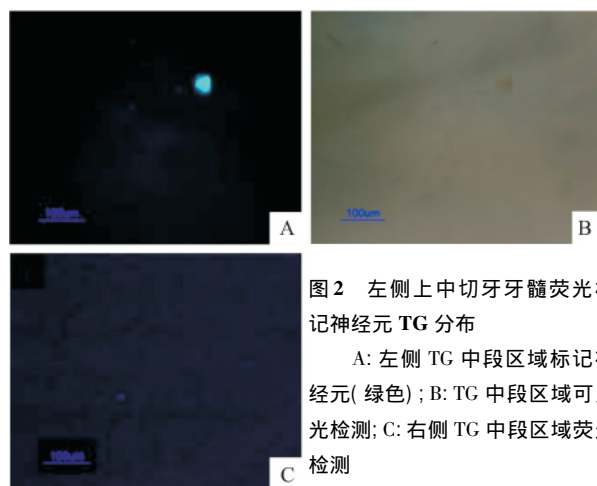


图 2 左侧上中切牙牙髓荧光标记神经元 TG 分布

A: 左侧 TG 中段区域标记神经元(绿色); B: TG 中段区域可见光检测; C: 右侧 TG 中段区域荧光检测

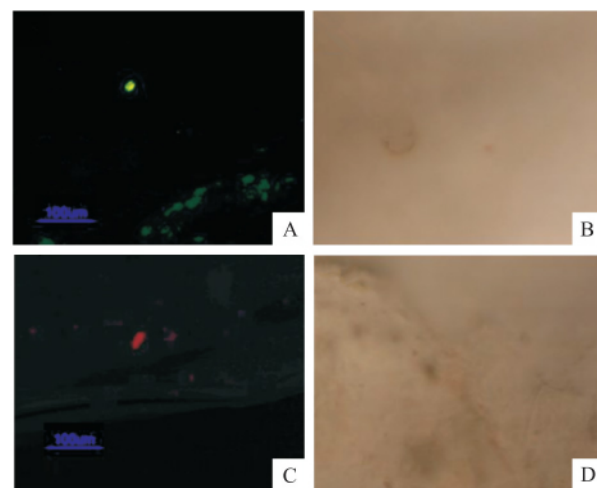


图 3 右侧下中切牙及左侧上中切牙双标记牙髓神经元 TG 分布

A: 右侧 TG 后外侧区荧光标记神经元(绿色); B: 右侧 TG 后外侧可见光检测; C: 左侧 TG 中段区荧光标记神经元(红色); D: 左侧 TG 中段可见光检测

**2.3 模型组牙髓荧光标记神经元在 TG 内分布** 与假手术组对比,模型组标记神经元在 TG 投射区域基本相似,所观察到标记神经元数量差别不大,组间荧光强度经统计学分析差异也无统计学意义,见表 1。

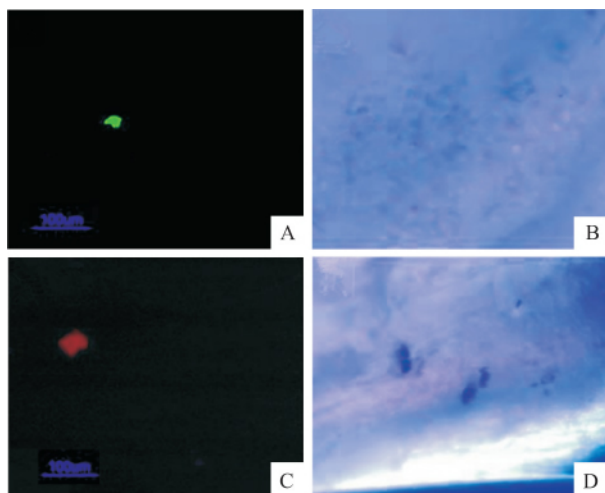


图4 左侧上中切牙和左侧下颌第一磨牙牙髓荧光标记神经元 TG 分布  
A: 左侧 TG 后外侧区荧光标记神经元(绿色); B: 左侧 TG 后外侧区可见光检测; C: 左侧 TG 中段区荧光标记神经元(红色); D: 左侧 TG 中段区可见光检测

表1 假手术组与模型组 TG 4 组荧光标记  
神经元平均荧光强度统计( $n=5$ )

组别	位置	假手术组	TN 模型组
第一组	右侧后外侧	0.65	0.72
第二组	左侧中段区	0.70	0.66
第三组	右侧后外侧	0.72	0.79
	左侧中段区	0.81	0.65
第四组	左侧后外侧	0.86	0.79
	左侧中段区	0.73	0.81

### 3 讨论

TN 疼痛剧烈,严重影响到患者生活,对于其病因有多种观点,其中以中枢神经病变学说和周围神经病变学说被大家广泛接受。早期 Duhner et al<sup>[5]</sup>认为 TN 系中枢异常导致,如脊束核癫痫样放电。然而,TN 发作范围常为单侧甚至局限于某一支,以及很多患者病情与脑干内病变并无相关性,这些现象无法用中枢病变学说解释。周围神经病变学说则认为 TN 由三叉神经根受压迫致神经脱髓鞘病变导致,目前广大学者也认同这一点,临床结果也证实 80%~90% TN 系血管压迫导致,血管减压术的成功也证实这一点<sup>[6]</sup>。但临床病例也存在很多用神经压迫学说无法解释的。故而有研究者开始将研究方向转向病毒感染方面<sup>[7]</sup>,也有研究者认为一些神经介质、神经肽类物质参与 TN 发作<sup>[8-9]</sup>。

正因 TN 病因不明,以及三叉神经系统及其病理生理机制复杂,所以治疗存在很多缺陷。其中针

对 TG 水平的疗法,如射频温控热凝术、放疗等,治疗有效率达 82.8%~96.3%,但是均会带来过度感觉丧失<sup>[10]</sup>,因此本文采用神经元逆行荧光标记法来研究 TG 内神经元分布与分支(牙髓)对应关系,以及随 TN 病变发生是否存在改变,来为临床治疗提供更详细依据。

逆行荧光素标记法是指将荧光物质注入神经元末梢区域,荧光素被末梢神经摄取,后经轴浆运输至胞体内。此法是一种追踪神经系统联系的方法,敏感度高、简便,即可作双标记又可做三标记,是目前研究神经侧支投射、神经核团定位联系及神经元化学通路的理想工具之一。在神经束路追踪法研究中,以 HRP 法应用最为广泛,其能较灵敏、准确地反映出追踪细胞的定位。Charles et al<sup>[11]</sup>于 1978 年开始用 HRP 追踪法对 TG 投射定位进行研究。随后国内外学者开始采用此法来了解三叉神经各分支在 TG 内投射,发现存在一定规律,其上、下颌支分布区与本实验结果类似<sup>[2,11-12]</sup>。国内学者柴盈等<sup>[12]</sup>甚至采用 HRP 结合 3D 重建技术更直观地再现了下颌神经在 TG 后外侧的分布。然而 HRP 显色方法复杂,又参与细胞代谢不能长期存留,并易扩散到邻近组织造成神经元误染。与之相比,荧光探针法不需染色,同时因荧光多样性,可对神经各分支行多重标记。谭波涛等<sup>[13]</sup>发现 Fast DiI 可针对一些内源性神经细胞胞质进行标记。

本研究选择的荧光探针是 Fast DiO、Fast DiI,均是亲脂性羧花青细胞膜荧光探针,能对细胞膜染色,着色稳定性高。注射后 72 h 取材,既保证染料能达 TG 区神经元,又保证探针不因代谢而使强度降低影响观察。本实验做荧光强度测量和分析时,因影响荧光强度因素很多,为形成一定标准,本实验采取目标区域内平均荧光强度值与背景荧光值之差,做为目标区域内相对荧光强度值。

本实验中用 Fast DiO、Fast DiI 分别对右侧下中切牙、左侧上中切牙髓腔行注射。结果在对应同侧 TG 后外侧、中段区观察到荧光标记。考虑为右下、左上中切牙髓腔分别注入荧光素 Fast DiO、Fast DiI,经轴浆逆行运输到同侧 TG 后外侧、中间区。由此推测,三叉神经上、下颌支神经元分别投射于同侧 TG 后外侧、中间区。因此三叉神经各分支神经元在 TG 中投射有特定区域,为 TN 治疗(如 TG 射频温控热凝术位点和范围)提供一定参考。本研究结果与相关研究<sup>[2,14]</sup>结果基本相符,与三叉神经各分支受特定神经元支配预测大致符合。相关研究者在猫、

兔等动物研究中提出神经节神经元分布说法,本研究于大鼠实验中进一步证实。但是对于 TN 病因研究仍是下一步研究方向。

通过神经元逆行荧光标记法,发现三叉神经上、下颌支神经元投射于同侧 TG 特定区域,且 TN 产生后并不影响 TG 内神经元数量及投射关系,其产生可能与三叉神经元功能活动改变有关,如异常兴奋。这些 TN 治疗提供重要指导意义。接下来可通过研究 TN 病理生理机制,进一步探索病因及更佳治疗方法。

### 参考文献

- [1] Charles W, Morgan M A, Irving N, et al. Anatomical localization of corneal afferent cells in the trigeminal ganglion [J]. *Neurosurgery*, 1978, 2(3): 252–8.
- [2] Marfurt C F. The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique [J]. *Anat Rec*, 1981, 201(1): 105–18.
- [3] 柴 盈. 神经束路追踪法在三叉神经节分区研究中的研究现状 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2012, 28(9): 563–5.
- [4] Vos B P, Strassman A M, Maciewicz R J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve [J]. *J Neurosci*, 1994, 14(5 Pt 1): 2708–23.
- [5] Duhner R, Sharav Y, Gracely R H, et al. Idiopathic trigeminal neuralgia sensory features and pain mechanisms [J]. *Pain*, 1987, 31(1): 23–33.
- [6] 孙晶晶, 李建卫, 郑晓辉, 等. 三叉神经痛的临床治疗进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 26(14): 5189–93.
- [7] 孙彦春. 三叉神经痛病毒病因学及其发病机制研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(2): 140–2.
- [8] Wang Y, Li X, Cao L, et al. Analgesic effect of diprospan in rats with trigeminal neuralgia [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2011, 31(3): 395–9.
- [9] 雷 洁, 王元银, 刘安东, 等. ATP 对大鼠三叉神经节小直径神经元胞内钙浓度的调制作用及其机制 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(11): 1450–4.
- [10] Zhang W C, Zhong W X, Li S T, et al. Neuronavigator-guided percutaneous radiofrequency thermocoagulation in the treatment of trigeminal neuralgia [J]. *Ir J Med Sci*, 2012, 181(1): 7–13.
- [11] 陈 勇, 刘 静. 大鼠咬肌内 P2X3 受体阳性神经纤维来自三叉神经节神经元 [J]. *神经解剖学杂志*, 2010, 26(4): 423–6.
- [12] 柴 盈, 陈敏洁, 张伟杰, 等. 家兔三叉神经节的形态观察及下颌神经投射模型的建立 [J]. *口腔医学研究*, 2013, 29(11): 999–1001.
- [13] 谭波涛, 虞 璟, 刘 媛, 等. 两种荧光标记物对中枢神经系统内源性神经干细胞的标记效果比较 [J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(9): 843–8.
- [14] 吴 励, 古丽尼沙·克力木. 人胚胎三叉神经节神经元的躯体定位 [J]. *解剖学杂志*, 2009, 32(5): 663–5.

## The neuronal soma trait of trigeminal nerve branch projecting to dental pulp in rat trigeminal ganglia

Xiao Fangli, Li Guochao, Ma Tengfei, et al

(College of Stomatology, Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To observe the position relationship of neuronal somas in trigeminal ganglia (TG), which projects from different dental pulps in the normal and trigeminal neuralgia (TN) model rats, and provides anatomical theoretical guidance for the clinical treatment of TN. **Methods** Those experiments were divided into model group and control group. The retrograde fluorescent probes were injected into the different dental pulp cavities of rats in the two groups, and fluorescent microscope was used to observe distribution of fluorescence labeled neurons in TG. **Results** Green fluorescent probes Fast DiO were injected into right lower and left upper central incisor of rats in the two groups respectively, a few fluorescence labeled neuronal somas after 72 h could be detected in the posterolateral and the middle area of the ipsilateral TG, which distributed in clusters. Two different fluorescent probes Fast DiO and Fast DiI were injected respectively into right lower and left upper central incisor of rats in the two groups, green fluorescence labeled neuronal somas and red fluorescence labeled neuronal somas in cluster could be detected after 72 h in the posterolateral and the middle area of the ipsilateral TG of the two groups correspondingly. Fast DiI and Fast DiO were injected respectively into left upper central incisor and first molar in lower mandibular of rats in the two groups at the same time, green fluorescence labeled neuronal somas and red fluorescence labeled neuronal somas in cluster could be detected after 72 h in the middle area and the postermiddle area of left TG.

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.032.html>

◇ 药学研究 ◇

## 栀子柏皮汤不同配伍对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的治疗作用

钱正月<sup>1 2 3</sup> 李俊<sup>1 2 3</sup> 黄成<sup>1 2 3</sup> 孟晓明<sup>1 2 3</sup> 马陶陶<sup>1 2 3</sup> 陈昭琳<sup>1 2 3</sup>

**摘要** 目的 研究栀子柏皮汤不同配伍组合的抗肝纤维化药理作用。方法 采用四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )引起的肝纤维化小鼠模型观察栀子柏皮汤各配伍组的抗肝纤维化作用,同时给予不同配伍的栀子柏皮汤进行灌胃治疗。生化检测相关肝纤维化及炎症指标,运用 Masson 染色和 HE 染色检测肝纤维化的变化,Western blot 法检测 I 型胶原及  $\alpha$ -横纹肌肌节肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达水平。结果 栀子柏皮汤及各配伍组均可不同程度的降低小鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、羟脯氨酸(Hyp)及透明质酸(HA)水平,改善肝脏的病理变化,其中栀子黄柏甘草配伍组抑制  $\text{CCl}_4$  诱导的小鼠肝纤维化效果最佳( $P < 0.01$ ),并能显著抑制肝组织中 I 型胶原和  $\alpha$ -SMA 的蛋白表达( $P < 0.01$ )。实验结果表明栀子柏皮汤亦可明显降低血清中转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )的表达水平。结论 栀子柏皮汤不同配伍组能不同程度改善小鼠肝纤维化,但栀子黄柏甘草配伍,即全汤组抗肝纤维化作用最明显,并且栀子柏皮汤的抗肝纤维化作用可能与降低 TGF- $\beta$  水平有关。

**关键词** 栀子柏皮汤;配伍;肝纤维化; $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白  
中图分类号 R 285

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0068-05

肝纤维化是因多种原因诱导所引起的慢性肝脏

类疾病,若不积极治疗,将发展为肝硬化甚至肝癌。此类疾病已引起越来越广泛的重视,但在临床工作中尚无有效的药物治疗方法,因而越来越多的人把目光转向了中药治疗。栀子柏皮汤源自汉代名医张仲景著的《伤寒论》,由栀子、黄柏和甘草按照君臣佐使的配伍原则以 10:6:3 的比例煎煮而成,主要用于治疗湿热黄疸、抗炎解热等<sup>[1]</sup>。栀子柏皮汤在肝脏疾病治疗方面已见一些报道<sup>[2-3]</sup>,但其在肝纤维化小鼠模型的配伍方面研究较少。并且该研究采取的四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导的小鼠肝纤维化模型用作抗肝纤维化药物的筛选和评价已见诸多报道<sup>[4]</sup>。该研究探讨了栀子柏皮汤不同成分配伍对  $\text{CCl}_4$  诱导的肝纤维化小鼠的保护作用及其可能机制。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康 ICR 小鼠 90 只,普通级,雄性,  $(20 \pm 2)$  g,由安徽医科大学实验动物中心提供。小鼠饲养在笼中,隔天更换饲料饮水,自由饮水和摄食,保持室温  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,相对湿度 40%~60%,常规饲养观察 1 周后用于实验。

**1.2 药品与试剂** 栀子柏皮汤的主要成分栀子、黄柏和甘草均购自安徽医科大学第一附属医院药剂科,由安徽医科大学药学院金涌教授鉴定为正品。谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)测定试剂盒、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)测定试剂盒、羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;透明质酸(hyaluronic acid, HA)测定试剂盒、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )购自上海源叶

2015-10-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81473526、81202978);高等学校博士学科点专项基金(编号:20123420120001);安徽省科技攻关计划(编号:1301042212);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH145)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学药学院、<sup>2</sup>安徽天然药物活性研究省级实验室、<sup>3</sup>安徽创新药物产业共性研究院,合肥 230032

作者简介:钱正月,女,硕士研究生;

李俊,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

correspondingly. There was no statistically significant difference of labeled neuronal somas distribution, quantity and fluorescence intensity in TG between the two groups. **Conclusion** The neuronal somas of trigeminal nerve branches regional distributions on the ipsilateral side TG. The TN does not affect the number of neurons in TG and the projection. It may be associated with the change of trigeminal nerve function.

**Key words** trigeminal ganglia; trigeminal neuralgia; retrograde fluorescent tags; nerve bundle road tracking method