

逆神经走行方向探寻并摘取大鼠背根神经节的改进方法

马理元¹, 姜劲挺^{1,2*}, 张伦广², 李祥雨¹, 郑吉元³, 徐欣¹, 王强强¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院, 兰州 730000; 3. 兰州大学第二医院, 兰州 730000)

【摘要】 目的 探寻一种快捷、便利、高效的摘取大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)新方法——逆神经走行方向探寻并摘取 DRG。**方法** 分别采用通过打开椎间孔的传统方法和新方法摘取 DRG, 比较两种取材方法所消耗的时间和摘取的完整 DRG 数量。**结果** 采用传统方法每只大鼠摘取 L₃₋₅ 节段完整背根神经节数量为(3.08 ± 1.31)个, 平均每个 DRG 耗时(5.58 ± 1.21) min; 采用新方法每只大鼠摘取 L₃₋₅ 节段完整背根神经节数量为(4.29 ± 1.08)个, 平均每个 DRG 耗时(1.69 ± 0.91) min, 与传统方法相比差异有显著性($P < 0.05$)。**结论** 逆神经走行方向探寻并摘取 DRG 这一新方法可更高效地摘取得完整的大鼠背根神经节, 为实验后期背根神经节细胞的培养和形态学研究提供了更为可靠的组织材料。

【关键词】 大鼠; 背根神经节; 取材方法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 03-0095-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.03.018

An improved method of exploring and extracting dorsal root ganglions in rats by reversely along the nerve traveling pathway

MA Liyuan¹, JIANG Jingting^{1,2*}, ZHANG Lunguang², LI Xiangyu¹, ZHENG Jiyuan³, XU Xin¹, WANG Qiangqiang¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000; 3. Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000)

【Abstract】 Objective To explore a new efficient extraction method of dorsal root ganglions (DRGs) of rats by exploring and extracting DRGs reversely along the nerve traveling pathway. **Methods** The DRGs were extracted by the traditional method of opening the intervertebral foramina and the new method, extracting DRGs reversely along the nerve traveling pathway, respectively. The time consuming and the number of intact DRGs obtained with these two method were compared. **Results** The number of intact DRGs (L₃₋₅ segments, both sides) extracted from each rat with the traditional method was (3.08 ± 1.31), and the average time consuming of each DRG was (5.58 ± 1.21) min. As for the new method, the number of intact DRGs extracted from each rat was (4.29 ± 1.08), and the average time consuming was (1.69 ± 0.91) min, significantly better than that of the traditional method ($P < 0.05$ for both). **Conclusions** The new method of exploring and extracting DRGs reversely along the nerve traveling pathway is more efficient for obtaining intact DRGs of rats, providing more useful tissue materials for subsequent culture and morphological studies of DRG cells.

【Key words】 rat; dorsal root ganglion; DRG; DRG extraction

[基金项目] 国家自然科学基金(编号:81660799); 甘肃省教育厅(编号:BH2010-039)。

[作者简介] 马理元(1991—), 男, 硕士研究生, 专业: 中医骨伤科学。E-mail: maliyuantt@163.com

[通信作者] 姜劲挺(1969—), 男, 医学博士, 研究方向: 中医脊柱相关疾病学。E-mail: jjt@gszy.edu.cn

背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 作为感觉传入的第一级换能神经元的集中位置^[1-2], 在外周信号的产生和传导过程中有着至关重要的作用, 是神经、疼痛、骨科等多领域的研究对象, 因此获取完好无损的 DRG 成为相关研究的必要前提, 但由于其特殊的解剖位置: 体积小、位置深、被脊椎椎间孔所嵌顿, 同时周围有大量结缔组织包绕^[3], 给相关研究人员获取 DRG 带来一定难度。为短时间获得完好 DRG, 本研究通过比较两种 DRG 的取材方法, 证明逆神经走行方向探寻并摘取 DRG 这一新方法的高效性和实用性, 期为背根神经节研究提供保障。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 30 只, 雌雄各半, 体重 (200 ± 10) g, 由甘肃中医药大学实验中心提供 [SCXK (甘) 2015 - 0002], [SYXK (甘) 2015 - 0005]。本实验福利伦理审批 IACUC 号: 2017 - 095。实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

水合氯醛, 4% 多聚甲醛; 剃毛器, 手术刀, 直头止血钳, 弯头止血钳, 手术剪, 咬骨钳, 眼科剪, 眼科镊。

1.3 实验方法

1.3.1 术前麻醉

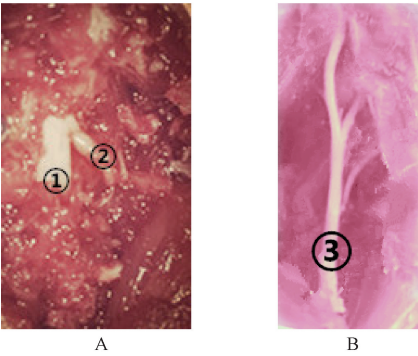
大鼠术前不限制食水, 10% 水合氯醛按 0.3 mL/kg 腹腔注射。

1.3.2 传统方法取材

待大鼠麻醉成功后, 将其俯卧位固定于平木板上, 剃毛器剔除腰部毛发, 用碘伏棉球擦拭手术区, 在腰部正中线和髂后上棘连线处作一纵行切口, 切口向上下方向各延长 2.5 ~ 3 cm, 逐层切开筋膜至肌肉层, 用止血钳轻提起棘突旁的肌肉, 用手术刀作一纵行小切口, 用弯钳钝性分离脊柱两旁的肌肉, 至棘突、乳状突、横突充分暴露, 暴露范围根据所需 DRG 决定, 剪掉棘突, 用咬骨钳自棘突根部蚕食性地向椎体两旁咬去椎板, 使脊髓后侧、外侧充分暴露后 (如图 1A), 用眼科镊将脊髓从上端缓慢、轻巧地提起后即可见到脊神经后根分支和其在椎体的出口, 咬开椎间孔后即可看到淡黄色、卵圆形的 DRG, 长约 1.5 mm, 充分暴露后, 用眼科剪剪断其两端的神经, 将其置于盛有 4% 多聚甲醛溶液的离心管中。记录每只大鼠从 L₃₋₅ 节段取出的完好 DRG 数目及其所消耗时间。

1.3.3 新方法取材

同上麻醉后切开皮肤、筋膜, 暴露肌肉, 分离脊柱两旁肌肉, 暴露脊柱乳状突、横突, 同时密切观察横突旁肌肉中走行的神经, 并将其分离出来 (如图 1B), 逆神经走行方向, 从下向上寻得神经从椎体的出口, 即横突后缘处, 用咬骨钳将出口上下的骨质咬去, 即可暴露 DRG, 用眼科镊将之前暴露的神经镊起, 轻缓地向后外方用力, 即可拉出 DRG, 减去其两端的神经, 将其置于盛有 4% 多聚甲醛溶液的离心管中。记录每只大鼠从 L₃₋₅ 节段取出的完好 DRG 数目及其所消耗时间。



注: A: 传统方法摘取大鼠背根神经节; B: 坐骨神经走行。① 脊髓; ② 背根神经节; ③ 坐骨神经。

图 1 大鼠神经解剖图

Note. A: DRG extracted with the traditional method. B: Sciatic nerve running direction. ① Spinal cord; ② DRG; ③ Sciatic nerve.

Fig. 1 Anatomy of the rat nerves

1.3.4 石蜡切片及 HE 染色步骤

(1) 取新鲜的 DRG 于 4% 多聚甲醛液固定 24 h 后, 流水冲 12 h。

(2) 依次用 75% ~ 100% 的乙醇连续脱水, 二甲苯透明 3 次, 浸入 60℃ 石蜡中进行包埋; 石蜡包埋的标本连续切片 4 张, 厚度为 4 μm, 室温干燥。背根神经节行苏木素-伊红染色 (HE 染色)。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 统计软件, 以 *t* 检验分析两组之间差异, 以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 DRG 数目和耗时差异

两种方法均可将 L₃₋₅ 的 DRG 取出, 逆神经走行方向探寻并摘取 DRG 这一新方法相对于传统方法更为高效, 且其取得的 DRG 形态更为完整, 数目也明显增多 (*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 传统方法和新方法摘取背根神经节比较($\bar{x} \pm s$)

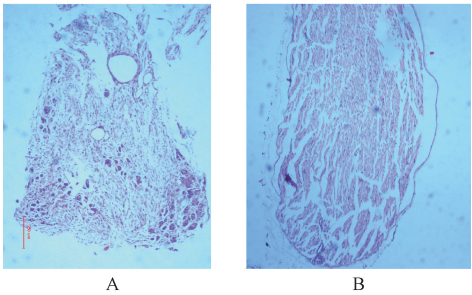
Tab.1 Comparison of the traditional method and the new method for DRG extracting

方法 Methods	大鼠数量 Number of rats	每只大鼠取得的完整 DRG 数量 Number of intact DRGs extracted from each rat	摘取每个 DRG 耗时(min) Time consumption for extraction of a DRG
传统方法 Traditional method	15	3. 08 ± 1. 31	5. 58 ± 1. 21
新方法 New method	15	4. 29 ± 1. 08 *	1. 69 ± 0. 91 *

注:与传统方法比较, * $P < 0. 05$ 。
Note. Compared with the traditional method, * $P < 0. 05$.

2.2 形态差异

正常大鼠经两种方法取得 DRG 经石蜡包埋、切片、HE 染色后如图 2:传统方法所取得的 DRG(图 2 A)边缘毛糙不清,着色不均,可能是由于取材时对 DRG 结缔组织分离不彻底和挤压性损伤所导致。新方法所取得的 DRG(图 2B)组织光滑、着色均匀、结构清晰。



注:A:传统方法所取得的 DRG;B:新方法所取得的 DRG。

图 2 正常大鼠背根神经节石蜡切片(HE, × 40)
Note. A: DRG obtained by the traditional method. B: DRG obtained by the new method.

Fig.2 Histology of normal rat DRGs. HE staining

3 讨论

位于外周神经系统的 DRG 作为感觉信息传导通路的第一站,位于其内的中、小型神经元与痛觉信息的感受和传递有着极为密切的关系,所以又将 DRG 形象地称为痛觉感受器或伤害性感受器^[4]。相关研究表明 DRG 在损伤或炎症条件下因阈值下降、适应性减弱而处于兴奋状态,这是其产生慢性疼痛的根本原因^[5]。长期积累的慢性疼痛信号则会通过中枢神经元形成中枢敏化,中枢敏化又会造成痛觉过敏,如此形成恶性循环^[6]。因此只有深入研究 DRG,才有望从根源上解决慢性疼痛。综上,高效的 DRG 取材方法的探寻是极为必要的。

目前背根神经节的取材方法有传统的单独摘取法^[7]、连同脊髓同时提取法^[7]、直接固定打开椎管取材法^[8],以上方法的操作中均需打开椎板、暴

露脊髓后才能分离神经根及背根神经节,但椎板质硬、脊髓易碎的特点导致采用传统方法摘取 DRG 具有难度大、耗时长、易挤压损伤 DRG 的弊病,而本文研究采用逆神经走行方向探寻并摘取 DRG 的新方法,先分离神经,然后沿神经从下向上寻得神经从椎体的出口,暴露并摘取 DRG,避开打开椎板、暴露脊髓的环节,相对传统取材方法不仅在取得的 DRG 数量上有所增加,且缩短了取材时间,同时弥补了传统取材方法取得的 DRG 结缔组织剔除不彻底、易挤压损伤 DRG 等不足之处,值得在相关实验中推广使用。

参考文献:

[1] 罗放, 毕好生. 神经病理性疼痛的背根神经节机制 [J]. 国外医学麻醉学与复苏分册, 2003, 24(2): 68 - 70.

[2] 芮海涛, 张庆国, 徐世元. 大鼠蛛网膜下腔置管及背根神经节分离方法的改进 [J]. 广东医学, 2007, 12(28): 1915 - 1917.

[3] 熊南翔, 赵洪洋, 张方成. 从大鼠活体取背根神经节及交感神经节的方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6): 367 - 368.

[4] 褚文广, 杜祎康, 王旭, 等. 外周伤害性感受神经元在体特异性表达 GCaMP6f 蛋白方法的构建及细胞内钙活动的监测 [J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(3): 323 - 328.

[5] Sun W, Miao B, Wang XC, et al. Reduced conduction failure of the main axon of polymodal nociceptive C-fibres contributes to painful diabetic neuropathy in rats [J]. Brain, 2012, 135 (Pt 2): 359 - 375.

[6] Kuner R. Central mechanisms of pathological pain [J]. Nat Med, 2010, 16(11): 1258 - 1266.

[7] 陈海亮, 黄飞, 张璐萍, 等. 背根神经节摘取方法的研究 [J]. 中外医疗, 2008, 28(20): 1, 3.

[8] 王士杰, 黄丽辉, 雷雳, 等. 胚胎大鼠背根神经节摘取方法的研究 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2010, 18(6): 596 - 597.