

钳夹损伤后轴突再生对脊髓前角神经元脂褐素含量的影响

李欣, 袁群芳, 汪华侨, 姚志彬

(中山大学中山医学院人体解剖学教研室脑研究室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究神经元轴突损伤后再生过程中对神经元胞体内脂褐素生成和累积的变化,了解神经再生对衰老进程的影响。【方法】钳夹法损伤 Wistar 大鼠右侧 C₅~T₁ 神经根,按钳夹次数和存活时间分为 6 组,观察损伤侧脊髓前角神经元内脂褐素变化,用图像分析系统进行定量分析。【结果】12 月龄大鼠脊髓前角神经元胞浆内已有脂褐素分布,自发出黄或黄绿色荧光,呈散在细小颗粒,含量呈随增龄而增加,且呈团块状堆积在核周围。钳夹侧的脂褐素含量较正常侧的脂褐素含量均有明显减少 ($P < 0.05$);二次钳夹后脂褐素含量较一次钳夹更为减少,但二者之间无明显差异 ($P > 0.05$)。直线相关回归分析显示正常侧、一次钳夹侧和二次钳夹侧脂褐素累积均随存活时间而增加,呈正相关关系 (r 分别为 0.967、0.994 和 0.995, $P < 0.05$),回归系数分别为 0.0783、0.0548 和 0.0377。钳夹侧小于正常侧,表明损伤后再生使胞体内脂褐素累积速度减慢。【结论】轴突损伤后再生可以使神经元内脂褐素的累积较正常情况下减少,提示轴突再生可减缓神经元衰老进程。

关键词: 脂褐素; 轴突再生; 钳夹; 脊髓

中图分类号: R322.81 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2003)01-0016-02

Effect of Axonal Regeneration After Crush Lesion on the Amount of Lipofuscin in the Spinal Cord Anterior Horn Neurons

LI Xin, YUAN Qun-fang, WANG Hua-qiao, YAO Zhi-bin

(Department of Anatomy, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To observe the changes in the formation and deposit of lipofuscin during axonal regeneration after axonal lesion and study the effect of regeneration on aging. 【Methods】 C₅~T₁ nerve roots of right brachial plexus of Wistar rats were crushed, and all animal models were divided into 6 groups by crush times and surviveal time. The amount changes of lipofuscin in the injured anterior horn neurons were observed by image analysis system. 【Results】 Lipofuscin existed in the plasm of the spinal cord anterior horn neurons of rats aged 12 months, which appeared as micro-granules. The autofluorescence was yellow and chryso-green. The amount of lipofuscin increased with aging, accumulating as a mass in the perinuclear region, but decreased remarkably after the crushes ($P < 0.05$). However the difference was no significant between the first and the second crush. The relation and regression analysis showed that the deposit of lipofuscin increased gradually as a function of survival time on either the normal side, one crush side or two crushes side, which showed a positive correlation (The values of r were 0.967, 0.994 and 0.995, respectively $P < 0.05$). The regression coefficients were 0.0783, 0.0548 and 0.0377, respectively. 【Conclusion】 The axonal regeneration can decrease the deposit of lipofuscin and make it less than that of normal condition, which suggests the axonal regeneration can delay the process of neuron aging.

Key words: lipofuscin; axonal regeneration; crush; spinal cord

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):16~18,34]

收稿日期:2002-09-02

基金项目:“211工程”重点学科建设基金资助项目(98123)

作者简介:李欣(1976-),女,天津人,硕士,现在美国 University of Illinois at Chicago 攻读博士学位;姚志彬,教授,博士生导师,课题负责人, E-mail: anatomy@gzsums.edu.cn.

脂褐素作为衰老的指标之一,广泛存在于神经细胞、心肌细胞和肝细胞等多种细胞内,其含量随增龄而明显增加。它可自发呈黄、黄绿或橘红色的荧光。外周神经组织损伤后,神经元的核周体发生“胞体反应”。其特点为细胞体肿胀、核偏位和尼氏体消失(染色体溶解)。在生物化学方面表现为RNA和蛋白质合成水平增加,具体表现为与神经递质有关的蛋白质合成减少,与再生有关的结构蛋白和膜成分的合成增加^[1]。业已证实钳夹离断轴突,而不破坏神经内膜的纵向连续性,轴突可成功再生,完全恢复功能。有理论认为神经再生重复神经发育过程。那么神经再生是否对神经元的衰老进程发挥影响,尚不清楚。本研究以胞体内脂褐素累积为指标,观察轴突损伤后再生对神经元衰老的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和钳夹手术

本实验选用12月龄健康雌性Wistar大鼠30只,由中山大学动物中心提供,随机分为对照组和实验组。对照组5只于实验开始时(存活0d)处死,同时实验组25只行钳夹手术,术后分别存活40、70和120d,在存活70d组和存活120d组中各自随机抽取5只,在第一次钳夹术后40d再行二次钳夹。

钳夹手术:戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉,暴露和分离C₅~T₁神经根,以长12.5 cm直止血钳尖、第一格为力度标准钳夹C₅~T₁神经根,时间1 min。手术后在钳夹处以神经外膜缝线作为标记。行二次钳夹时,在第一次钳夹处的近侧端约0.5 cm处以同样方法钳夹C₅~T₁神经根。

1.2 抓握钢丝试验

在钳夹术后5、10、15、20、25、30和40d时,分别对大鼠右前肢功能恢复情况进行观察。若大鼠右前肢功能恢复,则在向上提起的过程中,其双侧前肢可用力抓握住钢丝,前肢肌肉紧张,呈拉伸状态,并产生抵抗力,阻止上提,结果为阳性;若右前肢功能尚未恢复,则只有左侧前肢可抓握住钢丝,右侧前肢无肌力,呈自然下垂状态,结果为阴性。

1.3 组织切片的制备

各实验大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg),麻醉后快速开胸,灌注4℃预冷的40 mL/L多聚甲醛(0.1 mol/L PB配制,pH7.4)。灌注固定

后,以上、下神经根之间中点为标志,取C₆₋₈节段脊髓,并在正常侧侧索内以微量注射器针头扎孔作为标记。取材后置于相同固定液内后固定4 h。常规石蜡切片(5 μm),脱蜡后甘油封片。

1.4 显微拍照、图像分析及数据统计学分析

用Leica荧光显微镜,激发光源400~446 nm,40倍物镜下,在脊髓前角内观察并选取核仁清晰的大角神经元进行观察拍照,并记录其位置坐标值。每只实验大鼠随机选取钳夹侧和正常侧各10个细胞进行拍照;对照组大鼠随机选取左侧与右侧各10个细胞进行拍照。拍照后的切片经1%的中性红复染胞浆后,根据坐标值确定细胞位置再次对其拍照。照片输入Leica图像分析系统(广东省昆虫研究所图像分析室),测定神经元内脂褐素自发荧光的灰度值并计算出细胞在该层面脂褐素面积占胞浆面积的比例。用SPSS10.0统计分析软件进行数据统计学分析,α=0.05为显著性水准。

2 结果

2.1 钳夹后对大鼠前肢功能恢复的观察

在一次钳夹20d左右,大鼠右前肢功能逐渐开始恢复,可以右前肢着地起支撑作用;在术后30d时,约80%的大鼠右前肢抓握钢丝试验阳性,并能以双侧前肢抱食物;至40d时,所有实验大鼠右前肢均达到恢复功能。在二次钳夹术后,以同样方法和标准进行观察发现,大鼠右前肢功能在15d左右便开始恢复,至30d时,所有实验大鼠右前肢功能基本恢复。

2.2 脂褐素的观察

40倍物镜的荧光显微镜下,12月龄大鼠脊髓前角的神经元内已有脂褐素分布,自发出黄或黄绿色荧光。它们主要分布在神经元的核周质内,呈散在的细小颗粒,集结程度小;随存活时间延长,脂褐素集结程度较高,甚至呈块状堆积在核周围(图1)。定量分析结果显示,各实验组大鼠神经元内脂褐素含量呈随增龄而增加的趋势。各组与对照组(存活0d组)之间比较,差异均有显著性($P < 0.05$)(表1)。在术后不同存活时间各组中,一次钳夹侧的脂褐素含量较正常侧的脂褐素含量均有明显减少,且差异均有显著性($P < 0.05$)。二次钳夹后脂褐素含量较一次钳夹更为减少,但二次钳夹后钳夹侧脂褐素含量与一次钳夹后钳夹侧脂褐素含量之间的差异无显著性($P > 0.05$)。

表1 轴突损伤再生后脊髓前角神经元脂褐素含量变化
Table 1 The amount changes of lipofusion in the spinal cord anterior horn neurons after regeneration from axonal lesion (%)

Survival time (d)	Times of crush	Normal side	Crush side
0	-	6.11 ± 2.94	6.00 ± 3.10
40	1	11.66 ± 6.04 ¹⁾	7.95 ± 4.67 ^{1),2)}
70	1	11.55 ± 4.68 ¹⁾	9.23 ± 3.80 ^{1),2)}
70	2	12.74 ± 9.11 ¹⁾	8.27 ± 5.74 ^{1),2)}
120	1	15.75 ± 7.65 ¹⁾	12.63 ± 6.00 ^{1),2)}
120	2	16.71 ± 7.43 ¹⁾	10.57 ± 4.35 ^{1),2)}

1) Compared with group of survival 0 day, $P < 0.05$; 2) Compared with normal side, $P < 0.05$

表2 存活时间与脂褐素含量之间的直线相关和回归

Table 2 Relation and regression between surviving time and amount of lipofuscin

	Relation coefficient	P	Regression equation	P
Normal side	0.967	< 0.05	$Y = 6.959 + 0.0783X$	< 0.05
The first crush	0.994	< 0.05	$Y = 5.801 + 0.0548X$	< 0.05
The second crush	0.995	< 0.05	$Y = 5.891 + 0.0377X$	< 0.05

要的变化。但它本身是否直接损害神经元的功能,尚无证据说明。本实验结果显示,对轴突钳夹后导致的再生可以减慢神经元内脂褐素的累积速度。在神经再生过程中,与神经递质有关的蛋白质开始减少,而与再生有关的结构蛋白和膜成分的合成代谢更为活跃。研究已经发现,细胞的氧化代谢活动越旺盛,脂褐素的沉积越多^[2]。而上述神经细胞的再生过程中,高分子量的神经递质合成明显减少,主要合成以低分子量的结构蛋白为主,这就好比给神经细胞一个“休息”的机会,使其总体氧化代谢量降低,从而减少了脂褐素的形成。

此外,形态学研究发现生长中的轴突几乎都是由微管、滑面内质网和小泡构成的^[1]。再生时从每一根轴突发出多数轴突芽,这就需要包括微管和膜成分的原料。在细胞除了通过加大这些物质的合成来满足需要,还可能通过另一个更为经济有效的途径:降低这些物质正常分解。而脂褐素的形成就是来源于这些膜性物质分解后的残留物,形成脂褐素原料的减少必然导致脂褐素累积量的减少。因此,我们推测在轴突再生过程中,膜性物质正常分解的减少也是脂褐素累积速度减缓的可能机制之一。有研究已经证实,在胚胎神经系统的轴突

2.3 轴突再生对脂褐素累积速度的影响

将各组正常侧脂褐素含量、一次钳夹侧脂褐素含量和二次钳夹侧脂褐素含量与手术后存活时间分别进行直线相关和回归分析(表2)。结果显示,在3种条件下,脂褐素含量与手术后存活时间呈高度正相关关系,即脂褐素含量随存活时间的增加而直线增加。而且3个方程回归系数(回归直线的斜率)逐渐减小,其中正常侧回归系数最大,一次钳夹侧次之,二次钳夹侧最小,即正常侧、一次钳夹侧、二次钳夹侧脂褐素累积速度逐渐减小(图2)。

3 讨论

在神经细胞老化过程中,脂褐素沉积是一种重

中,细胞骨架几乎都是由微管组成,只含有相当少的神经微丝^[3],而在再生的轴突芽中情况也是如此^[4]。在出生后的成熟阶段中,轴突中神经微丝的量以一个比微管快得多的速度增加。这种在神经微丝数量上不成比例的增加可能是出生后神经系统的某些区域可塑性降低的因素之一。因此,有人认为在对损伤的再生反应中,神经元可能通过减少轴突内的神经微丝的量使整个神经元处于一个更具有可塑性的状态^[5]。根据文献和本实验结果,我们推论再生是神经元发育过程的重复,轴突损伤作为一个启动因子,启动了神经元发育有关的代谢过程,使神经元回到了更“年轻”的状态。这种神经元的再年轻化也可能是脂褐素累积速度减慢的原因。

本实验的结果还显示二次钳夹后,大鼠右前肢功能开始恢复的时间较一次钳夹提早,而且恢复所需的时间缩短。根据由于胞体反应与靶组织神经支配的恢复有关系,且神经远侧端的非神经元细胞数量能够影响轴突再生的速度的观点^[6]。本实验两次钳夹的间隔时间是40 d,此时实验大鼠均能恢复神经支配,且远侧端的 Schwann 细胞和非神经性细胞正处于增生状态。从以上的观点可知,本实

(下转第34页 to page 34)

- pression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart[J]. *Circulation*, 1998, 98(17): 1728.
- [4] Spinale F G, Coker M L, Thomas C V, *et al.* Time dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure; relation to ventricular and myocyte function[J]. *Circ Res*, 1998, 82(4): 482.
- [5] Coker M L, Thomas C V, Clari M J, *et al.* Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure[J]. *Am J Physiol*, 1998, 43(5): H1516.
- [6] Li Y Y, Feng Y Q, Kadokami T, *et al.* Modulation of matrix metalloproteinase activities remodels myocardial extracellular matrix in TNF α transgenic mice[J]. *Circulation*, 1999, 100(Suppl 1): I-752.
- [7] 申 洪. 免疫组织化学染色定量方法研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4(1): 89.
- [8] Mujumdar V S, Smiley L M, Tyagi S C. Activation of matrix metalloproteinase dilates and decreases cardiac tensile strength[J]. *Int J Cardiol*, 2001, 79(2-3): 277.
- [9] Brenner D A, O'Hara M, Angel P, *et al.* Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α [J]. *Nature*, 1989, 337(6208):661.
- [10] Duivenvoorden W C, Hirte H W, Singh G. Transforming growth factor beta 1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells[J]. *Clin Exp Metastasis*, 1999, 17(1): 27.
- [11] Coker M L, Jolly J R, Joffs C. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neuro-hormonal stimulation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(2): H543.

(编辑 刘清海)

(上接第18页 from page 18)

验二次钳夹时,胞体反应对加快再生速度的影响作用不占主导地位,从而推断远侧端的 Schwann 细胞和非神经元性细胞对神经再生速度的影响可能解释本实验的结果。同时,二次钳夹后脂褐素累积速度较一次钳夹更为减小。在二次钳夹时,神经元仍处于一次损伤后的再生、修复的状态中,结构蛋白合成较正常多,此时对再次钳夹的胞体反应敏感度下降,于是细胞轴突的再生便可以利用由条件性损伤导致的已经增多的微管蛋白及其它细胞骨架蛋白。那么总体上说,细胞在二次再生时蛋白合成的增加较第一次少,而且主要以结构蛋白合成的减少为主。由于细胞总体的氧耗代谢较一次再生时减少,因而二次再生对脂褐素累积速度减慢的影响应该较一次再生时更大;但是,细胞对膜性成分的原料需求的减少,缓解了其合成的压力,使其依靠另一途径—减少对正常膜性成分的分解获得原料的程度减轻,那么通过这一途径使脂褐素累积速度减慢的程度较一次再生时变小。由于这两个因素同时作用,就表现为二次钳夹再生后脂褐素累积速度较一次钳夹再生更为减慢,但减慢的程度并不是两次钳夹效应的单纯叠加。总之,本实验显示轴突损伤后再生可以使神经元内脂褐素的累积较正

常情况下减少,即减慢了神经元内脂褐素的累积速度,这提示了轴突损伤后再生可减缓神经元的衰老进程。

(本文图 1, 2 见插页 2. Fig. 1, 2 shown in back coloured page 2)

参考文献:

- [1] 刘湘梅. 神经生长的生物学与病理学[M]. 北京: 科学出版社, 1985. 167~236.
- [2] 李 澈. 老年生物学[M]. 北京: 中国人口出版社, 1995. 194~211.
- [3] Peters A, Vaughn J E. Microtubules and filaments in the axons and astrocytes of early post natal optic nerves[J]. *J Cell Biol*, 1967, 32(1): 113.
- [4] Murray M. Regeneration of retinal axons in the goldfish optic tectum[J]. *J Comp Neurol*, 1976, 168(2): 175.
- [5] Heacock A M, Agranoff B W. Reutilization of precursor following axonal transport of [3 H] proline-labeled protein [J]. *Brain Res*, 1997, 122(3): 243.
- [6] Bedi K S, Winter J, Berry M, *et al.* Adult rat dorsal root ganglion neurons extend neuritis on predegenerated but not on normal peripheral nerves in vitro[J]. *Eur J Neurosci*, 1992, 4(3): 193.

(编辑 张恩健)

钳夹损伤后轴突再生对脊髓前角神经元脂褐素含量的影响 (正文见第 16 页)
Effect of Axonal Regeneration After Crush Lesion on the Amount of Lipofuscin in the Spinal Cord Anterior Horn Neurons (Text in page 16)

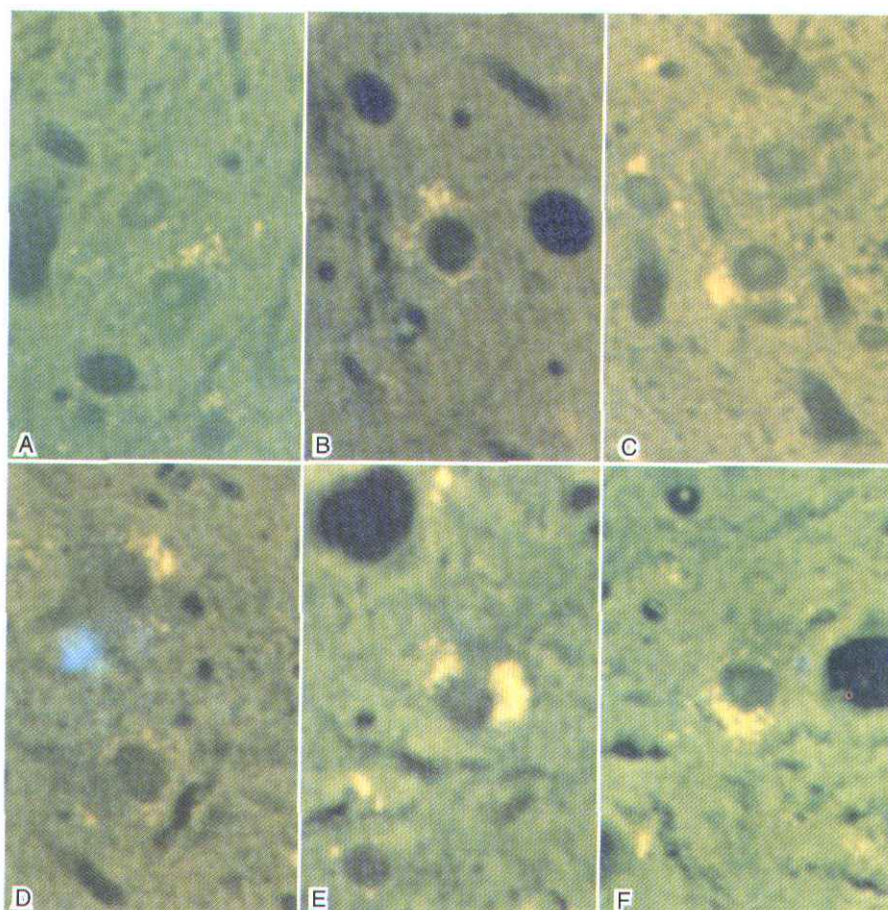


图 1 钳夹后不同存活时间大鼠的脊髓前角神经元胞浆内脂褐素的变化(荧光显微镜 × 40)
Fig. 1 Changes of lipofuscin in the spinal cord anterior horn neurons of rats with different surviving time
 A: Group surviving 40 days (normal side); B: Group surviving 40 days (crushing side);
 C: Group surviving 70 days (normal side); D: Group surviving 70 days (crushing side);
 E: Group surviving 70 days (normal side); F: Group surviving 70 days (crushing side)

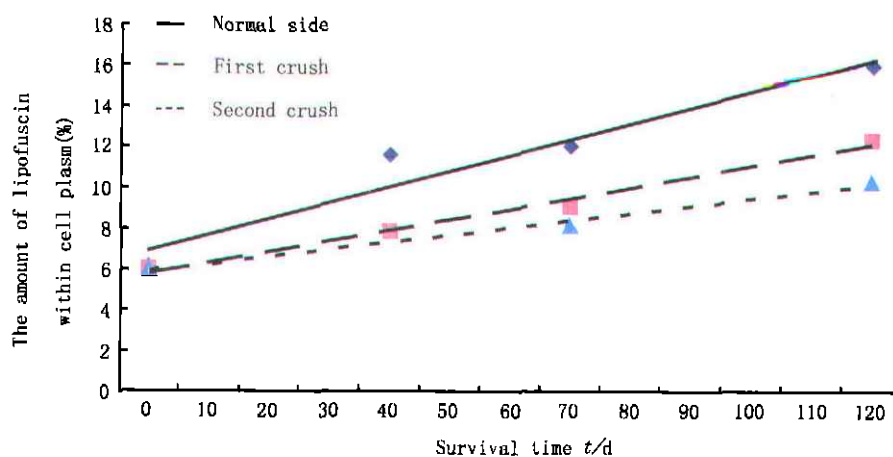


图 2 脂褐素含量与存活时间之间的回归趋势线示意图
Fig. 2 The regression lines between amount of lipofuscin and surviving time