论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0364-04

老化大鼠髓鞘蛋白脂蛋白表达变化及意义

成戎川[1],赵士福[1],王亚丽[2],刘 勇[1],周竹娟[1] (第三军医大学新桥医院:[1]神经内科,[2]病理科,重庆 400037)

提 要:目的 观察老化大鼠髓鞘蛋白PLP的改变、髓鞘结构、中枢传导功能变化及其关系。**方法** 采用免疫组化方法检测大鼠老化时髓鞘蛋白PLP表达变化,透射电镜观察脑白质区域的超微结构变化,电生理方法记录中枢神经传导功能。**结果** PLP免疫组化:2组于纹状体、胼胝体、前联合、皮层下区均可见阳性染色。但老年组大鼠各部位PLP表达量明显减少,其积分光密度值明显增大($P<0.01$)。白质区超微结构变化:老年大鼠轴突直径增加,轴突内含有巨大线粒体,轴突周围间隙扩大。髓鞘致密层分离,部分板层结构排列紊乱、破坏。中枢传导功能:2组间存在显著差别,老年大鼠中枢传导潜伏时较青年组显著延长($P<0.01$)。**结论** 髓鞘蛋白PLP表达减少,与髓鞘形态结构改变有关,髓鞘及轴突超微结构存在明显变化,是白质功能减退的重要原因,这种变化可能与大鼠老化时中枢神经传导功能降低有关。

关键词: 脑老化;蛋白脂蛋白;中枢神经传导潜伏时

中图法分类号: R329.4;R338.2;R749.16 **文献标识码:** A

Change and significance of myelin proteolipid protein expression in aged rats

CHENG Rong-chuan[1], ZHAO Shi-fu[1], WANG Ya-li[2], LIU Yong[1], ZHOU Zhu-juan[1] ([1]Department of Neurology, [2] Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate change of myelin proteolipid protein (PLP) expression, myelin structures, central conductive function and the relationship among them in aged rats. **Methods** Eighteen rats aging 18 – 24 months and 18 at 6 – 7 months were subjected. Immunohistochemistry was applied to detect the expressive changes of PLP. LEICA QWIN image analytical system was used to show integrated optical density (IOD) of PLP immunostaining. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the ultrastructural changes of white matter in rats, such as myelin sheath and axon. The conductive latency of perforant pathway was recorded by electrophysiological methods to evaluate central conductive function of forebrain regions in rats. **Results** Immunohistochemistry showed PLP was positive expressed in the striatum, callosum, anterior commissure, subcortex regions in 2 groups. But the PLP expression was significantly decreased in aged group than in young group ($P<0.01$). There were obvious differences in the ultrastructure of white matter. Aged rats had enlarged axons with megamitochondria in them and increased gaps among axon and myelin, separated compact layer, even confused, destructed in myelin sheath. The central conductive latency was increased significantly in aged group than young group ($P<0.01$). **Conclusion** Aged rats have decreased PLP expression, which might be relevant to the morphological and structural changes of myelin sheath, and have certain relation with the decline of conductive function during brain aging.

Key words: brain aging; proteolipid protein; central conductive latency

脑老化时常伴有注意力分散,认知、执行功能减退,社会适应能力下降,已成为影响老年人群生活质量的重要原因。而且老化时常伴有髓鞘病变,这种轴突及髓鞘变化参与老化时脑白质病变及老年相关疾病的发生,其机制尚不清楚。本研究从大鼠老化时髓鞘的特异蛋白改变、髓鞘结构变化、中枢神经传导功能等方面探讨髓鞘成分改变在神经传导功能改变中的作用。这种神经传导功能改变可能与老年大鼠认知、执行功能减退有关。

基金项目: 国家自然科学基金(30170311)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170311)

作者简介: 成戎川(1973 –),女,四川省合江县人,硕士研究生,主治医师,主要从事脑血管病及脑白质损害机制方面的研究。电话:(023)68774613

通讯作者: 赵士福,电话:(023)68774443

收稿日期: 2006-10-19;**修回日期:** 2006-12-21

1　材料与方法

1.1　实验动物与分组

Wistar 大鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供，共 36 只，雌雄不拘。青年组 18 只，6～7 月龄，体质量(180±20)g；老年组 18 只，18～24 月龄，体质量(290±40) g。

1.2　实验方法

1.2.1　蛋白脂蛋白(PLP)免疫组化　　免疫组化技术检测脑老化过程中髓鞘蛋白 PLP 表达变化，用免疫组化 S-P 法染色，苏木精复染细胞核。PLP 抗体为小鼠抗大鼠 PLP 多克隆抗体，来源于英国 Serotec 公司，稀释比例为 1∶200，Leica(德国)显微镜观察照相。并用 LEICA QWIN 图像分析系统对 PLP 免疫染色的积分光密度值进行分析。计算老年组与青年组 IOD 值差异。

1.2.2　髓鞘超微结构　　透射电镜观察大鼠脑白质区轴突、髓鞘、胶质细胞等超微改变。4% 多聚甲醛灌注后立即取脑，取前脑皮层下白质 3 块，于 3% 戊二醛后固定，漂洗后用 1% 锇酸作用 3 h，丙酮脱水，环氧树脂包埋，半薄及超薄切片，染色后透射电镜观察。

1.2.3　中枢传导功能测定　　采用丹迪公司 Keypoint 四导诱发电位仪记录。用于评定中枢神经传导功能。运用运动传导速度(motor conduction velocity，MCV)程序测定内嗅皮层至海马(穿通通路)潜伏时。刺激电极于内嗅皮层，记录电极在海马。刺激方式：单个脉冲方波，波宽：0.2 ms，刺激强度 10～20 mA。

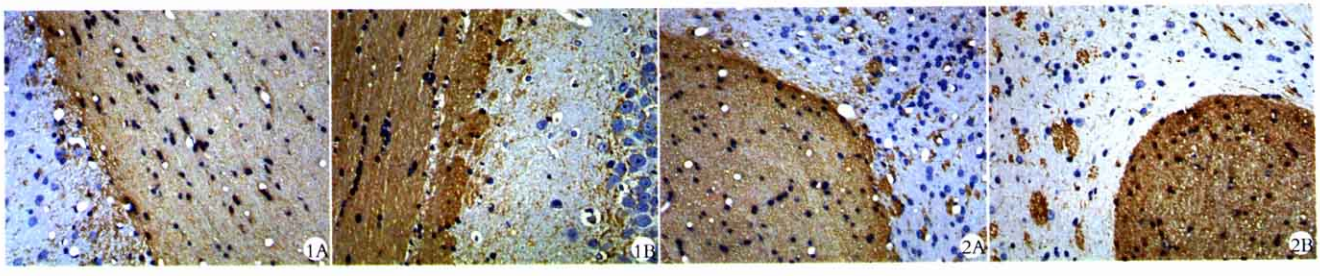
1.3　统计学分析

应用 SPSS 11.0 软件，实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　PLP 免疫组织化学

在青年组及老年组均可见到 PLP 染成褐色，主要于纤维束集中的区域染色较深，2 组于皮层下白质区、胼胝体、前联合、纹状体、外囊、外侧嗅束部位均有明显染色，在纤维的顺行切面上表现为丝状，在横切面上表现为点状。老年组免疫组织化学染色仍可见到清晰的染色，但强度显著低于青年组(图 1、2)，老年组积分光密度值明显增大($P<0.01$)。反映老年组的表达下降，老化会导致髓鞘蛋白表达下降，从而影响白质功能。2 组髓鞘蛋白 PLP 的积分光密度值测定见表 1。



A：老年组；B 青年组

图 1　2 组胼胝体 PLP 表达　(S-P×400)

图 2　2 组前联合 PLP 表达　(S-P×400)

表 1　2 组大鼠皮层下、胼胝体、前联合 PLP 免疫组化染色的平均 IOD 值($n=6$，$\bar{x}\pm s$)

组别	皮层下	胼胝体	前联合
青年组	174.73±11.55	155.85±5.71	155.98±7.96
老年组	194.81±9.14[a]	170.48±7.85[a]	167.83±6.91[a]

a：$P<0.01$，与青年组比较

2.2　透射电镜观察白质区超微结构变化

青年组大鼠髓鞘结构较完整，致密层排列紧密。老年组大鼠轴突肿胀直径增加，轴突内含有巨大线粒体，线粒体结构模糊不清，脊崩解，轴突周围间隙扩大。髓鞘致密层分离，部分板层结构分离、模糊、融合。胶质细胞细胞质内及细胞间隙电子密度增高，可见脂褐素沉积。见图 3。



A：髓鞘结构模糊，融合；B：髓鞘内囊泡；C：髓鞘致密层分离

图 3　老年组髓鞘电镜观察

2.3 中枢神经传导功能

前脑区神经传导功能测定。用运动传导速度(MCV)程序测定2组大鼠中枢神经传导潜伏时ms。发现老年组大鼠中枢神经传导平均潜伏时[(1.78±0.57)ms]较青年组[(0.76±0.14)ms]延长,提示老年组神经传导功能减退。

3 讨论

随着影像学发展,大量临床研究表明,人与动物老化时脑白质区在影像上更易表现异常,在脑老化时大脑皮层及皮层下白质均有明显萎缩,体积测定显示白质萎缩更明显。老化时常伴有白质变化及认知执行功能下降。Peters 等[1]对灵长类动物猕猴研究发现,老化过程中纤维数目明显减少,髓鞘成分也存在一定变化,并与其认知功能降低相关。

3.1 PLP 在白质变化的作用

中枢神经系统(CNS)髓鞘的主要组分是髓磷脂,其中以 PLP 和髓鞘碱性蛋白(MBP)居多,两者共占脂类干重的70%~80%。PLP 是 CNS 主要髓鞘膜蛋白,属整合 PLP,占中枢髓鞘的50%[2]。外周髓鞘几乎无 PLP。正常的 PLP 基因位于 Xq13-q22,包含7个外显子。PLP 是强的疏水转膜蛋白,氨基端和羧基端位于胞质。细胞质内单环结构含有特异的 PLP 片段[3]。于多核糖体合成并于小囊泡中转移到少突胶质细胞突起的末端。正常情况下 PLP 对髓鞘结构形成和维持具有重要作用。本实验显示,老年大鼠 PLP 免疫组化染色阳性表达明显下降(图1,2),在髓鞘纵行纤维上表现为条状,横截面上呈点状,PLP 以纹状体、前联合、胼胝体、皮层下明显,提示它主要分布于 CNS 白质,皮层神经元分布区域较少,主要在纤维束区域,是髓鞘的特异性蛋白。老年组 PLP 表达明显减少,影响髓鞘的基本结构,从而影响神经传导功能。老化时 PLP 的减少主要由于少突胶质细胞的减少和合成蛋白的能力减退。在胶质与髓鞘相互作用关系研究方面,本实验与 Yool 等[4]研究一致,如果缺乏 PLP,有髓鞘的神经纤维其髓鞘致密板层结构变得疏松;Yin 等[5]以髓鞘零蛋白(P0)代替 PLP,发现缺乏 PLP 时郎飞结的结间部分长度缩短,轴索变性,严重影响神经功能。研究显示老年大鼠少突胶质细胞结构改变,脂褐素沉积,线粒体、内质网明显空泡化,导致老化时少突胶质细胞能量代谢减退,髓鞘蛋白合成能力减弱,PLP 合成减少,参与老化时白质损害[6]。Sim 等[7]对少突胶质细胞的前体细胞(oligodendrocyte progenitors, OPs)进行研究,其主要来源于前脑的脑室下区(subventricular zone, SVZ),在老化时髓鞘维持能力不足与 OPs 数量补充不足及其分化成少突胶质细胞明显减少有关,参与髓鞘损害。脑老化过程中白质区域慢性缺血缺氧损伤少突胶质祖细胞,使少突胶质细胞总数减少,合成 PLP 能力减退,影响髓鞘结构的维持,进而导致白质损害。

3.2 老年大鼠白质结构的超微变化

脑老化过程中髓鞘成分变化、脑白质结构的改变对认知活动影响明显,有研究表明老化可引起有髓纤维的大量丢失,是白质变化的重要形式[8]。本实验结果显示,轴突和髓鞘存在超微病理结构变化,表现为轴突直径增加,轴突内含有巨大线粒体,线粒体肿胀空化(图3B),结构模糊,脊崩解,反映老年大鼠能量代谢不足。髓鞘致密层分离,模糊、融合、空化(图3A、C),轴突周围间隙扩大(图3B)。这些结构异常,可能是导致其功能障碍原因,可能引起传导功能降低或失传导。这样,各智能脑区联系障碍、甚至中断,参与了老化认知功能损害。胥维勇等[9]发现老年还导致神经元纤维变性,这种变性不是继发性神经细胞的退变和外伤性神经纤维断裂,而是由于神经纤维本身营养和代谢障碍所引起,出现髓鞘变性脱失和轴突变性。在神经纤维变性甚至成束神经纤维发生变性时,神经髓鞘发生形态上的改变,髓鞘肿胀,失去屈光性,以后断裂,形成脂质空泡,变性的神经纤维丧失正常神经纤维染色性质。本研究与 Peters[10]、李琳等[6]研究发现一致,老龄大鼠脑有特征性超微病理学改变,即广泛的空泡化,线粒体、粗面内质网等肿胀空化严重。脂褐素呈增龄性堆积,破坏磷脂膜结构,进一步损伤线粒体等细胞器,导致脑细胞能量代谢障碍,影响脑细胞功能[6]。老化时髓鞘结构破坏、能量代谢障碍可导致中枢神经跳跃式电传导功能减退,中枢神经传导减慢。

3.3 老化时中枢传导功能变化

与学习记忆有关的结构主要有齿状回、完整的海马 CA1-3 区、内嗅区皮层及隔核等,内嗅皮层是新皮层及其他脑区与海马的连接点,具有信息整合作用,其发出纤维至海马形成穿通通路。海马是学习记忆过程中的关键结构。测定海马主要传入(穿通通路)中枢传导潜伏时能反映动物的中枢传导功能。本实验测定2组动物中枢神经传导潜伏时,发现老年组较青年组明显延长,提示老化时中枢神经传导功能减退,推测其是思维活动减慢和记忆降低的重要原因之一。Sandell 等[11]研究恒河猴前联合的髓鞘及有髓纤维的改变发

现老年导致髓鞘的改变及轴突变性，影响神经功能并且与认知功能相关。Imai 等[12]对周围神经研究发现老年较中青年周围神经传导潜伏时延长，传导速度减慢，波幅逐渐降低，提示老年神经传导功能减退。本研究显示，老化时髓鞘蛋白 PLP 减少，髓鞘及脑白质结构功能改变，导致中枢传导减慢，信号的处理缓慢，学习记忆执行的处理缓慢，储存功能减退，对过去信息提取减慢，导致学习记忆能力减退。

本实验表明老化时髓鞘成分 PLP 变化是白质变化的基础，并影响神经传导功能，对白质变化的机制及预防老化时的白质损害，预防认知执行功能下降，提高老年人生活质量具有临床意义。

参考文献：

[1] Peters A, Sethares C. Aging and the myelinated fibers in prefrontal cortex and corpus callosum of the monkey[J]. J Comp Neurol, 2002, 442(3): 277 - 291.

[2] Lees M B, Brostoff S W. Proteins of myelin [M]//Morell P. Myelin. New York: Plenum Press, 1984: 197 - 224.

[3] Shy M E, Hobson G, Jain M, *et al*. Schwann cell expression of PLP1 but not DM20 is necessary to prevent neuropathy[J]. Ann Neurol, 2003, 53(3): 354 - 365.

[4] Yool D A, Klugmann M, McLaughlin M, *et al*. Myelin proteolipid proteins promote the interaction of oligodendrocytes and axons[J]. J Neurosci Res, 2001, 63(2): 151 - 164.

[5] Yin X, Baek R C, Kirschner D A, *et al*. Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin[J]. J Cell Biol, 2006, 172(3): 469 - 478.

[6] 李　琳，姜远虹. 老龄大鼠脑皮质超微病理学特征性变化[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(10): 1215 - 1216.

[7] Sim F J, Zhao C, Penderis J, *et al*. The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation[J]. J Neurosci, 2002, 22(7): 2451 - 2459.

[8] Marner L, Nyengaard J R, Tang Y, *et al*. Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age[J]. J Comp Neurol, 2003, 462(2): 144 - 152.

[9] 胥维勇，杨　群，范小莉. 神经髓鞘染色及其应用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2004, 13(4): 546 - 547.

[10] Peters A. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: a review[J]. J Neurocytol, 2002, 31(8 - 9): 581 - 593.

[11] Sandell J H, Peters A. Disrupted myelin and axon loss in the anterior commissure of the aged rhesus monkey[J]. J Comp Neurol, 2003, 466(1): 14 - 30.

[12] Imai T, Yuasa H, Kato Y, *et al*. Aging of phrenic nerve conduction in the elderly? [J]. Clin Neurophysiol, 2005, 116(11): 2560 - 2564.

（编辑　张大春）

（上接 363 页）

①病变输入动脉太细，畸形血管团在造影片上难以辨认；②病灶出血，水肿可能将畸形血管压迫、破坏、继而血栓形成；③病灶内血流呈高凝状态以及出血后血管痉挛；④畸形血管团不断扩大，出血后血管壁纤维化使血管腔闭塞；⑤急性出血形成脑内血肿压迫输入动脉使畸形血管不能显影；⑥造影剂在畸形血管内稀释及造影技术不当。我们认为血管腔内血栓形成、畸形血管痉挛、闭塞是 AOVM 的发生原因。

脑血管畸形据病理及光镜检查分为 4 类[2]。因中小型动静脉畸形（AVM）比大型 AVM 更易破裂出血[3]，所以 AOVM 出血以 AVM 多见，其次是海绵状血管瘤，静脉性畸形及毛细血管扩张症少见。MRI 对 AOVM 诊断优于 CT[4]；另外 MRA 可使病灶及其周围血管显影，并能全部或部分显示输入动脉和引流静脉。

AOVM 在 DSA 造影中没有明显的血管畸形征象，但仔细观察可以看到一些微小变化：①出现丛状小血管；②延迟出现的毛细血管，出现异常伸展、扭曲的小动脉；③出现早期充盈的扩张静脉或水母头状均髓质静脉。

对于 AOVM 的患者，只要无手术禁忌证，且临床症状明显，手术部位可及又不损伤重要神经功能部位，积极行显微手术切除。病变位于重要功能区且部位深在，有手术禁忌证或不同意手术的患者，先保守治疗，再行伽玛刀或 X 刀治疗。达到控制其扩展的目的。

关键词：隐匿性脑血管畸形；诊断；显微手术

中图法分类号：R743.4　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Lobato R D, Perez C, Rivas J J, *et al*. Clinical, radiological, and pathological spectrum of angiographically occult intracranial vascular malformations. Analysis of 21 cases and review of the literature[J]. J Neurosurg, 1988, 68(4): 518 - 531.

[2] Tomlinson F H, Houser O W, Scheithauer B W, *et al*. Angiographically occult vascular malformations: a correlative study of features on magnetic resonance imaging and histological examination[J]. Neurosurgery, 1994, 34(5): 792 - 799.

[3] 费　舟，易声禹，吴声伶，等. 脑动静脉畸形大小及引流静脉数与出血危险性相关性研究[J]. 中华神经外科杂志, 1993, 9(1): 7 - 9.

[4] 刘承基. 脑血管外科学[M]. 南京：江苏科学技术出版社, 2000: 219 - 220.

（编辑　陈聪连）