文章编号:1000-5404(2007)14-1429-03

论著

钙调神经磷酸酶活性与皮层神经元轴突生长的相关性研究

谭 浩,王正国,朱佩芳,尹志勇,刘大维,张 良 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,全军交通医学研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 研究钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)与皮层神经元轴突生长的相关性。**方法** 原代培养大鼠大脑皮层神经元。细胞分为正常对照组和环孢霉素A(Cyclosporin A, CsA)处理组。CsA处理组是在细胞更换无血清的NB培养基2 h后加入10 nmol/L CsA刺激。采用倒置相差显微镜和数码影像采集系统观察培养3、7、10 d的神经元,并用SPOT软件测量神经元轴突长度。CaN活性采用酶底物显色的方法进行检测。**结果** 10 nmol/L CsA刺激后3 d和7 d的神经元轴突均能较显著地增长($P<0.05$),而这种作用在10 d更为明显($P<0.01$);而所有时相点神经元CaN的活性均受到显著抑制($P<0.01$)。CsA处理组各时相点CaN活性与皮层神经元轴突的长度均呈显著负相关($r=-0.994$, -0.990, -0.998, $P<0.01$)。**结论** CaN活性与皮层神经元轴突的生长呈负相关。

关键词:钙调神经磷酸酶;轴突生长;大鼠
中图法分类号:R322.81;R329.24;R345 **文献标识码**:A

Cyclosporin A promotes axon growth of cortical neurons by inhibiting calcineurin activity

TAN Hao, WANG Zheng-guo, ZHU Pei-fang, YIN Zhi-yong, LIU Da-wei, ZHANG Liang (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Research Institute for Traffic Medicine, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the relationship between calcineurin (CaN) activity and axon growth. Methods The cerebral cortical neurons of rats were cultured, and grouped as control group and cyclosporin A (CsA) group in which 10 nmol/L CsA was given when serum-free NB culture media was adopted. Inverted phase contrast microscope and digital photo collection system were used to harvest the photos of neurons cultured for 3, 7, 10 d. The length of axons were measured by SPOT software. The CaN activities were measured by enzyme substrate colormetric methods. Results After CsA stimulation, the length of axons increased significantly at 3, 7 d ($P<0.05$) and more notably at 10 d ($P<0.01$), meanwhile the CaN activities were more significantly inhibited at all time points ($P<0.01$). Conclusion CaN activities have a negative relationship with axon growth.

Key words: calcineurin; axon growth; rat

神经元轴突的生长研究是中枢神经系统损伤后的再生和修复研究的重要方面。目前发现神经元细胞内和细胞外许多因素制约神经元突起的出芽、极化、生长和突触形成。钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)是脑内含量最高的蛋白酶之一,主要分布在神经元胞体和轴突、树突中,起脱磷酸化作用[1]。尽管目前认为CaN与神经元突起的出芽、极化有关系[2],但其在神经元轴突生长的作用尚不明了。因此,本研究就皮层神经元轴突的生长与CaN活性的相关性作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 神经元细胞培养

大脑皮层神经元的培养参考文献[3]方法。迅速切取2~3 d SD大鼠皮层,在0.8 mg trypsin (Sigma)/ml HBSS(Hyclone)孵育7 min,然后在含1 mg胰蛋白酶抑制剂(Sigma)/ml HBSS中处理5 min,再用10 ml HBSS漂洗3次,用窄口的吹打管反复吹打至细胞悬液,用200目滤网过滤,收集滤液,

作者简介:谭 浩(1975-),男,重庆市垫江县人,博士研究生,医师,主要从事神经创伤及修复方面的研究。电话:(023)68757241, E-mail: thao75@sohu.com

收稿日期:2006-06-26;修回日期:2006-12-08

600 r/min 4 ℃离心 10 min，计数后接种细胞在 35 mm、多聚赖氨酸(Signal)包被了的培养皿中，密度为 50 ~ 100/mm^2。培养基为 NB 培养基：1 ml Neurobasal Medium (Gibco)，2% B27 (Gibco)，2 mmol/L GlutaMax Ⅰ (Gibco)，1 μg/ml 庆大霉素，5% FBS(Hyclone)。细胞放入 37 ℃、5% CO_2/94% 空气的培养箱培养，24 h 后更换培养基为无血清的 NB 培养基，以后换液 1 次/2 d。细胞分为正常对照组和环孢霉素 A (Cyclosporin A，CsA)处理组。CsA 处理组是在更换无血清的 NB 培养基 2 h 后加入 CsA，使其终浓度为10 nmol/L，此浓度的选择参考文献[4]。

1.2 CaN 的活性检测

采用 CaN 活性检测试剂盒(Calbiochem)进行。由于 100 nmol/L 的冈田酸(okadaic acid，OA)能彻底抑制除了 CaN 之外的其他磷酸酶活性，而 OA 和依他酸(egtazic acid，EGTA)的反应缓冲液能彻底抑制包括 CaN 在内的磷酸酶活性。因此，该试剂盒通过分别监测 100 nmol/L 的 OA 作用存在或缺失情况下无机磷从磷酸化的底物肽中释放的量来测定 CaN 活性。所用的底物肽为 R Ⅱ (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala- Ala-Glu)。CaN 活性以每毫克蛋白样品磷酸根释放量(nmol/mg)表示。

1.3 细胞突起的长度计量

在神经元轴突的动态形态学观察研究中[5]，研究人员发现一旦某一神经突长度超过 40 μmol/L，它将非常可能发育为轴突；而且轴突建立的时间多在 20 h 以内。本研究选择培养 3、7、10 d 的神经元的突起进行测量，此时其轴突已经形成，并采用 SPOT(Diagnostic Instruments. Inc. Version3.5.2)软件对超过 40 μmol/L 的突起(认定为轴突)进行了测量。运行 SPOT 软件，打开 setup 下拉菜单中选择 calibration setup 命令，建立合适放大倍数的标尺文件：打开标尺图像(根据细胞图像的放大比例)进行定标。在 file 下拉菜单中选取 open 命令，找到倒置相差显微镜和数码影像采集系统采集的培养 3、7、10 d 的细胞图像，并在 edit 下拉菜单中选取 add measurment 命令，用鼠标描线对细胞突起进行测量(图 1、2)。

1.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和相关性分析。

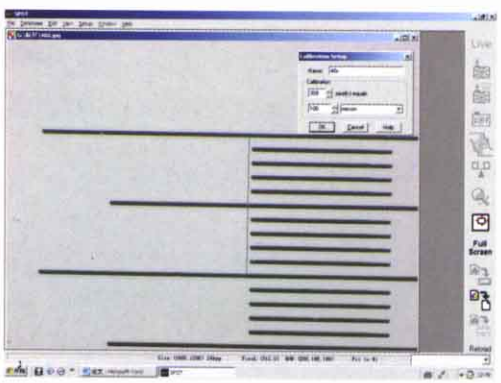


图 1 Spot 软件：定标，建立相应的标尺文件

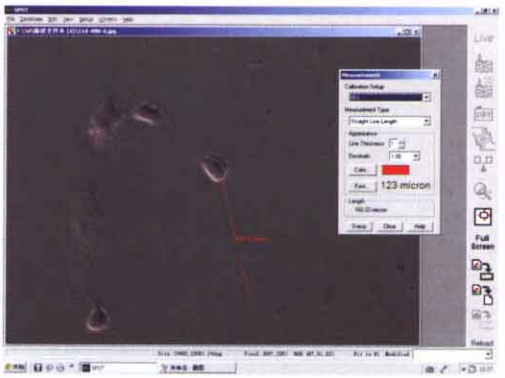


图 2 Spot 软件：用建立的标尺测量轴突长度

2 结果

2.1 培养神经元的 CaN 活性

正常培养 3、7 d 及 10 d 的神经元 CaN 的活性没有明显的变化；但 10 nmol/L CsA 刺激后所有时相点神经元 CaN 的活性均受到显著抑制($P<0.01$)，见表 1。

表 1 不同培养时间各组神经元 CaN 的活性比较(nmol/mg，$n=5$，$\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	10 d
对照组	20.05 ± 2.61	19.35 ± 2.22	20.21 ± 1.21
CsA 组	7.22 ± 1.09[a]	7.06 ± 1.01[a]	7.26 ± 0.89[a]

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.2 神经元轴突长度观察

神经元轴突的长度随着培养时间是逐渐增长。生长 7 ~ 10 d 的神经元轴突的长度显著长于生长 3 d 的神经元($P<0.01$)。而生长 7 ~ 10 d 的神经元轴突的长度变化不明显($P>0.05$)。CsA 刺激后，3 d 和 7 d 的神经元轴突均能较显著地增长($P<0.05$)，而这种作用在 10 d 更为明显($P<0.01$)，见表 2。

表 2 不同培养时间各组神经元轴突的长度比较(l/μm，$\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d	7 d	10 d
对照组	10	57.50 ± 7.46	148.84 ± 12.03	147.15 ± 9.21
CsA 组	10	66.80 ± 8.01[b]	158.21 ± 8.87[b]	160.32 ± 8.52[a]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与对照组比较

2.3 CaN 活性与神经元轴突长度的相关性分析

正常对照组在 3、7 d CaN 活性与神经元轴突的长度均呈显著的负相关($P<0.05$)，但在 10 d 差异不显著($P>0.05$)；CsA 组的各时相点 CaN 活性与神经元轴突的长度均呈非常显著的负相关($P<0.01$)，结果见表 3。

表 3　不同培养时间各组 CaN 活性与神经元轴突长度的相关性分析

组别	3 d		7 d		10 d	
	r	P	r	P	r	P
对照组	-0.918	0.028	-0.284	0.643	-0.891	0.096
CsA 组	-0.994	0.001	-0.990	0.001	-0.998	0.000

3　讨论

神经元轴突的形成、生长，乃至最终形成突触的过程，是神经元实现其特异功能的重要结构基础。轴突生长的机制非常复杂，涉及众多胞外和胞内因素。但细胞骨架成分的运动是轴突生长现象和导向的内在动力[6]，是各种影响轴突生长和导向的细胞内外分子的下游调节共同通路。tau 蛋白是一种重要的微管相关蛋白，它能影响细胞骨架的稳定和延伸[7]。而且，人们还发现主要分布于神经元生长锥和突触前膜终末的生长相关蛋白 GAP-43，能通过影响微管的组装而促进神经元的生长发育及突触的重构[8]。然而这两种分子均是 CaN 去磷酸化的底物[1]。Ferreira 等[2]的研究证实，CaN 通过对 tau 蛋白的去磷酸化作用参与调节神经细胞生长发育过程中细胞极性的形成。Kayyali 等[9]也发现，敲除 CaN Aα 基因的小鼠脑内可见大量磷酸化的 tau 蛋白在海马的苔状纤维堆积、苔状纤维的细胞骨架异常，神经细丝蛋白含量减少，神经细丝/微管的比例降低。这些实验均提示 CaN 与轴突的生长有一定联系。

如前述，我们选择培养 3、7、10 d 的神经元的突起进行测量，此时其轴突已经形成。因此本实验重点研究了 CaN 活性与轴突生长的相关性。CsA 是一种免疫抑制剂，许多体内外的实验表明它是 CaN 活性的有效抑制剂[10]。于是我们通过运用 CsA 干预的方法，间接证明 CaN 活性与轴突生长的相关性。实验结果提示 10 nmol/L CsA 刺激培养的神经元，胞内 CaN 的活性确实受到显著抑制，并且相对于空白对照组，这些神经元的轴突在观测的各时相点均显著生长。这提示在中枢神经系统，CaN 的活性与神经元轴突的生长呈负相关。由于目前尚无 CaN 活性的激动剂，因而 CaN 在神经元轴突的生长中的作用尚不能充分证明。如前所述，CaN 的活性与神经元轴突的生长呈负相关的机制可能与 tau 蛋白及 GAP-43 的去磷酸化有关，而其具体的调节机制尚有待进一步研究。

参考文献：

[1] Groth R D, Dunbar R L, Mermelstein P G. Calcineurin regulation of neuronal plasticity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311(4): 1159-1171.

[2] Ferreira A, Kincaid R, Kosik K S. Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity[J]. Mol Biol Cell, 1993, 4(12): 1225-1238.

[3] Velasco I, Velasco-Velazquez M A, Salazar P, *et al*. Influence of serum-free medium on the expression of glutamate transporters and the susceptibility to glutamate toxicity in cultured cortical neurons[J]. J Neurosci Res, 2003, 71(6): 811-818.

[4] Lautermilch N J, Spitzer N C. Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension[J]. J Neurosci, 2000, 20(1): 315-325.

[5] Lindsley T A, Kerlin, A M, Rising L J. Time-lapse analysis of ethanol's effects on axon growth *in vitro*[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2003, 147(1-2): 191-199.

[6] Bentley D, O'Connor T P. Cytoskeletal events in growth cone steering[J]. Curr Opin Neurobiol, 1994, 4(1): 43-48.

[7] Takahashi M, Tomizawa K, Ishiguro K. Distribution of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta, phosphatases 2A and 2B, and phosphorylated tau in the developing rat brain[J]. Brain Res, 2000, 857(1-2): 193-206.

[8] Udvadia A J, Koster R W, Skene J H. GAP-43 promoter elements in transgenic zebrafish reveal a difference in signals for axon growth during CNS development and regeneration[J]. Development, 2001, 128(7): 1175-1182.

[9] Kayyali U S, Zhang W, Yee A G, *et al*. Cytoskeletal changes in the brains of mice lacking calcineurin A alpha[J]. J Neurochem, 1997, 68(4): 1668-1678.

[10] Fukudo M, Yano I, Masuda S, *et al*. Distinct inhibitory effects of tacrolimus and cyclosporin a on calcineurin phosphatase activity[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312(2): 816-825.

（编辑　张大春）

（上接 1428 页）

可以帮助鉴别动脉和静脉。另外，若用临时阻断夹夹闭后，畸形血管团张力明显降低，可以确定是供血动脉，先切断供血动脉，再切除引流静脉。术后平稳醒转。术后 1 周监测血压，如果患者血压太高，仍然可能引起出血和脑灌注压突破，如果血压太低，可能引起脑供血不足、脑水肿，本例维持术前基础血压 1 周，没有出现出血和脑水肿，恢复良好。当然，条件许可的情况下，我们仍然主张术前分次栓塞后再切除，这样风险会更低，成功率也会更高。

关键词：脑血管畸形；Galen 静脉瘤

中图法分类号：R743.405　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 周　慧，高国栋，赵振伟，等. 血管内栓塞联合手术切除治疗巨大脑动静脉畸形[J]. 解放军医学杂志，2001，26(2)：134-135.

[2] 徐宏治，陈韵城，宋冬雷，等. 血管内栓塞联合手术切除治疗脑动静脉畸形[J]. 国外医学：脑血管疾病分册，2002，10(3)：214-216.

[3] Vinuela F, Dion J E, Duckwiler G, *et al*. Combined endovascular embolization and surgery in the management of cerebral arteriovenous malformations: experience with 101 cases[J]. J Neurosurg, 1991, 75(6): 856-864.

（编辑　陈聪连）