论著

文章编号:1000-5404(2011)23-2476-04

胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘超微结构老年改变的体视学研究

卢 芳,张 蕾,卢 伟,徐 琼,姜 蓉,龚 霞,闵琦埕,唐 勇 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室,干细胞与组织工程研究室)

[摘要] **目的** 探讨大鼠胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘超微结构的老年性改变。**方法** 运用电子显微镜和三维体视学方法分别对年轻组(6月龄)、中老年组(18月龄)和老年组(27月龄)雌性Long-Evans大鼠大脑胼胝体额区有髓神经纤维超微结构进行定量研究。**结果** 年轻组、中老年组和老年组的有髓神经纤维轴突平均直径(内径)、有髓神经纤维平均直径(外径)、平均内周长、平均外周长、髓鞘平均厚度均未见显著性改变。将有髓神经纤维髓鞘厚度按<0.2 μm、0.2~0.4 μm(不含0.4,以下类推)、0.4~0.6 μm、0.6~0.8 μm、0.8~1.0 μm、≥1.0 μm 6个段分别进行统计分析,结果显示,在0.2~0.4 μm直径段内,中老年组和老年组髓鞘厚度较年轻组均存在显著降低($P<0.05$);在0.4~0.6 μm直径段内,老年组髓鞘厚度较年轻组存在显著性降低($P<0.05$);在0.6~0.8 μm直径段内,老年组髓鞘厚度较中老年组显著性降低($P<0.05$)。**结论** 胼胝体额区有髓神经纤维尤其是小直径的有髓神经纤维髓鞘厚度存在显著老年性降低。

[关键词] 有髓神经纤维;髓鞘;胼胝体额区;体视学
[中图法分类号] R322.81; R329.27; R339.34 [文献标志码] A

Stereological study of age-related changes of myelin sheath microstructure in frontal region of corpus callosum in rats

Lu Fang, Zhang Lei, Lu Wei, Xu Qiang, Jiang Rong, Gong Xia, Min Qicheng, Tang Yong (Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the age-related changes of myelin sheath microstructure in the frontal region of corpus callosum. **Methods** Myelin sheath microstructure in the frontal region of corpus callosum of young (6 months old), middle-aged (18 months old) and old-aged female (27 months old) Long-Evans rats were studied by electron microscope and unbiased stereological techniques. **Results** There was no significant change in mean diameter of axons (inner diameter), mean diameter of myelinated fibers (external diameter), mean inner perimeter, mean outer perimeter and mean thickness of myelin sheathes of myelinated nerve fibers in the frontal region of corpus callosum among the young, middle-aged and old-aged rats. The thicknesses of myelin sheaths of myelinated nerve fibers were divided into six intervals according to diameter of myelinated fibers (<0.2 μm, 0.2-0.4 μm, 0.4-0.6 μm, 0.6-0.8 μm, 0.8-1.0 μm and ≥1.0 μm), and the mean thickness of myelinated fibers in each interval was calculated. Within diameter from 0.2 μm to 0.4 μm, the mean thickness of myelin sheaths of the middle-aged and old-aged rats significantly decreased compared with that of the young rats. Within the diameter from 0.4 μm to 0.6 μm, the mean thickness of myelin sheaths of the old-aged rats significantly decreased compared with that of the young rats. Within the diameter from 0.6 μm to 0.8 μm, the mean thickness of myelin sheaths of the old-aged rats significantly decreased compared with that of the middle-aged rats. **Conclusion** There is a significant age-related decrease in myelin sheath thickness of myelinated fibers in the frontal region of corpus callosum, especially myelinated fibers with small diameters.

[**Key words**] myelinated nerve fibers; myelin sheaths; frontal region of corpus callosum; stereology

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973155), the Foundation of Doctoral Training Program of Ministry of Education (200806310007), the Key Project of Chongqing Medical University (XB2D200801) and the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5035). Corresponding author: Tang Yong, Tel: 86-23-68485633, E-mail: ytang062@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30973155);教育部博士点基金(200806310007);重庆医科大学重点项目(XB2D200801);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2009BA5035)
[通信作者] 唐 勇,电话:(023)68485633,E-mail: ytang062@yahoo.com.cn

大脑衰老主要表现为学习认知能力下降,即大脑功能的衰退,以往的研究将其归因于老年大脑神经元的丢失[1]。近年来,越来越多的研究者开始注意到大脑白质的重要性,认为大脑白质的老年改变是老年大脑功能降低的重要原因之一[2]。胼胝体是哺乳动物所特有的连接于两侧大脑半球之间的纤维束,在两侧大脑半球间神经信息的整合及学习记忆方面有重要作用[3],其中胼胝体额区是与学习记忆功能联系最为紧密的区域。Sullivan等[4]的研究发现胼胝体额区纤维的老年改变具有明显的易损性。因此本课题组成员徐璿等[5]在电子显微镜(放大6 000倍)下对胼胝体额区体积及额区内有髓神经纤维进行了一系列研究,发现胼胝体额区体积和胼胝体额区内有髓神经纤维体积均存在显著性老年降低。而神经纤维的主要功能是传导神经冲动,有髓神经纤维是由轴突和髓鞘组成。髓鞘在组织液与轴膜间起绝缘作用,使有髓神经纤维的神经冲动呈跳跃式传导,传导速度加快;而且髓鞘厚度越厚,结间体越长,神经冲动跳跃的距离越大,传导速度也越快,因此,有髓神经纤维的髓鞘在神经冲动的传导中起重要作用。为进一步弄清胼胝体额区内有髓神经纤维髓鞘超微结构是否存在老年性改变,本实验在高倍电子显微镜(25 000倍)下运用无偏体视学技术对老年大鼠胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘超微结构的老年改变进行研究,以期进一步认识胼胝体额区髓鞘超微结构的老年性改变。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验采用15只雌性Long-Evans大鼠,均由第三军医大学实验动物中心提供。根据动物年龄分为3组:年轻组[6月龄,体质量(250±20)g]、中老年组[18月龄,体质量(350±25)g]和老年组[27月龄,体质量(380±40)g],每组各5只。

1.2 标本固定与取材

用4%的水合氯醛对大鼠进行腹腔麻醉后将其灌注固定,用0.9%生理盐水以20 ml/min的速度冲洗80 ml,再用多聚甲醛(2%)与戊二醛(2.5%)的混合液进行灌注,速度20 ml/min,灌注约300 ml直到大鼠颈部僵硬。固定后取出大鼠完整大脑,去掉小脑和嗅球部分,随机选取一侧大脑半球,以6%的琼脂包埋后将其切成1 mm厚的连续切片。在组织切片上定义胼胝体额区并随机叠加测点,在测点击中的地方取组织块送电镜标本,平均每只动物送3个电镜标本。

1.3 电镜切片的制备

用4%的戊二醛溶液将待送电镜标本在4 ℃冰箱中浸泡固定2 h后,用0.1 mol PBS(pH 7.2)冲洗3次,再在4 ℃下用锇酸(OsO_4)染色2 h,然后用50%、70%、90%乙醇,90%乙醇与90%丙酮混合物及100%丙酮溶液逐渐脱水,最后在环氧树脂中浸泡。根据各向同性原理,将浸泡好的标本按"球切法"[6-8]包埋成直径5 mm的小球,从包埋好的每个标本中随机切取一张60 nm厚的超薄切片,在25 000倍的透射电子显微镜下,从每张超薄切片随机选8个视野进行拍照,每个动物拍24张胼胝体额区有髓神经纤维的高倍电镜照片。

1.4 体视学分析

1.4.1 胼胝体额区有髓神经纤维直径及有髓神经纤维轴突的直径 在高倍电镜照片上随机叠加无偏计数框,根据禁线法则确定待测有髓神经纤维断面并测量其直径。首先确定有髓神经纤维断面的最长轴,与这个最长轴相垂直的断面的横径中最长的便是这一有髓神经纤维的直径[9]。用同样的方法可以测量有髓神经纤维轴突的直径。

1.4.2 胼胝体额区神经纤维髓鞘断面周长 在高倍电镜照片上随机叠加无偏计数框,根据禁线法则确定待测有髓神经纤维断面,再随机叠加等距测试线,计数测试线与每个待测有髓神经纤维断面外边界的交点数$\sum I$,有髓神经纤维髓鞘外周长b,按下面公式[8]计算:$b = \pi/2 \times d \times \sum I$,式中d为测试线间距。同理我们可以计数测试线与每个待测有髓神经纤维断面内边界的交点数,并计算得到髓鞘内周长。

1.4.3 胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘厚度 在高倍电镜照片上随机叠加无偏计数框,根据禁线法确定待测有髓神经纤维断面,再随机叠加等距测试线,计数内边界与测试线的交点并按顺序编号,总数为I,从前I/4个号码中随机选取一个作为第1个测试髓鞘厚度的点,第2个为1号点位置+I/4,第3个为2号点位置+I/4,第4个为3号点位置+I/4,在这4个点处分别测量从髓鞘的内边界到外边界最短的距离,这4个值的平均值即为髓鞘的厚度[9]。

1.5 统计学处理

应用SPSS 15.0统计软件进行单因素方差分析,有髓神经纤维按<0.2 μm、0.2~0.4 μm(不含0.4,以下类推)、0.4~0.6 μm、0.6~0.8 μm、0.8~1.0 μm、≥1.0 μm不同直径范围进行分段和统计比较。

2 结果

2.1 胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘超微结构的老年性改变

3组大鼠胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘超微结构的体视学研究结果见表1,年轻组、中老年组和老年组的有髓神经纤维内径、外径、内周长、外周长、髓鞘厚度均未见显著性改变。

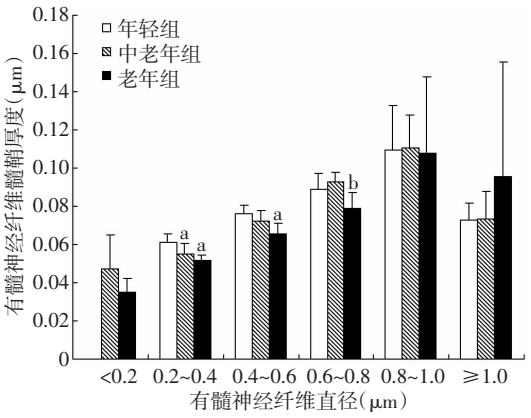
表1 3组大鼠胼胝体额区内有髓神经纤维髓鞘超微结构的老年性改变($\mu m, \bar{x} \pm s$)

组别	有髓神经纤维轴索直径	有髓神经纤维直径	有髓神经纤维髓鞘内周长	有髓神经纤维髓鞘外周长	有髓神经纤维髓鞘平均厚度
年轻组	0.38±0.02	0.54±0.03	2.54±0.40	3.04±0.50	0.082±0.004
中老年组	0.36±0.05	0.54±0.10	2.38±0.27	2.83±0.26	0.078±0.013
老年组	0.39±0.08	0.55±0.11	2.63±0.59	3.09±0.69	0.074±0.009

2.2 胼胝体额区不同直径段有髓神经纤维髓鞘厚度的老年性改变

将有髓神经纤维按不同直径范围进行分段并进行统计分析后发现,不同直径段的有髓神经纤维髓鞘厚度的差异具有统

计学意义。0.2~0.4 μm段:中老年组较年轻组降低11.8%,老年组较年轻组降低16.0%,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。0.4~0.6 μm段:中老年组较年轻组降低5.4%,但差异无统计学意义($P>0.05$);老年组较年轻组降低16.0%,差异有统计学意义($P<0.05$)。0.6~0.8 μm段:老年组较中老年组降低14.6%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图1。



a: $P<0.05$,与同直径段年轻组大鼠比较;b: $P<0.05$,与同直径段中老年组大鼠比较

图1 3组大鼠不同直径段有髓神经纤维髓鞘厚度老年性改变

2.3 胼胝体额区不同直径段有髓神经纤维内、外周长的老年性改变

不同直径段的有髓神经纤维内、外周长的差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图2、3。

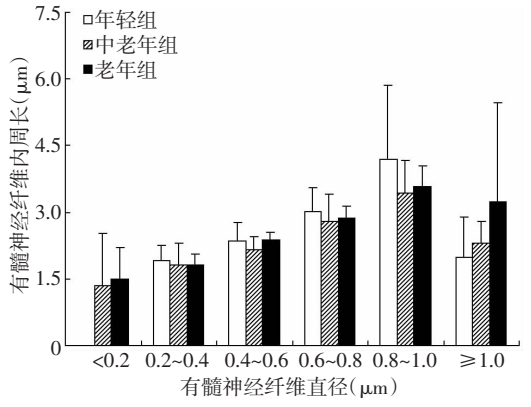


图2 3组大鼠不同直径段有髓神经纤维内周长老年性改变

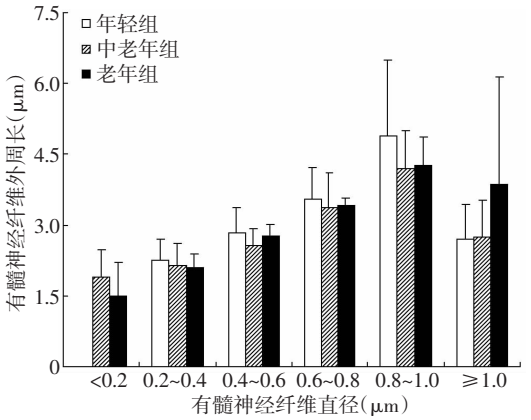


图3 3组大鼠不同直径段有髓神经纤维外周长老年性改变

3 讨论

鉴于髓鞘在神经冲动传导中的重要作用,那么有髓神经纤维的髓鞘是否存在老年性改变,老年脑功能的衰退是否由髓鞘的改变导致呢? Lintl等[10]最早的研究发现大脑视皮质詹纳里氏条纹(Gennari's line)处染色的髓鞘强度随着年龄增加而降低。然而这些通过强度来判断的间接研究并不能确定白质染色强度的下降到底是因为神经纤维的改变还是因为髓鞘的改变。Peters等[11-13]对大脑不同区域的有髓神经纤维髓鞘超微结构进行半定量研究,发现均存在显著性的老年性改变,且老年性改变和老年认知功能障碍程度成正比。但是之前关于髓鞘老年性改变的研究,大多只是定性或半定量观察,国内外尚未见关于胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘超微结构老年性改变的定量研究。Gundersen等[7,14]科学家首次创立了新的体视学方法,即在三维空间内对形态结构进行准确定量研究的方法。本课题组成员李琛等[9]运用这种新的体视学方法建立了对大脑白质有髓神经纤维超微结构进行定量研究的方法,为神经纤维的定量研究提供了有效的研究手段,并运用该方法成功进行了多项研究。因此本实验采用该方法对大鼠胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘超微结构进行了定量研究。

本课题组成员徐璿等[5]在电子显微镜下对胼胝体额区体积及额区内有髓神经纤维进行的研究发现,胼胝体额区体积和胼胝体额区内有髓神经纤维体积存在显著性老年降低。本研究结果显示年轻组、中老年组和老年组的胼胝体额区内有髓神经纤维内径、外径、内周长、外周长、髓鞘厚度均未见显著性老年改变,由于不同直径段的神经纤维功能不同,我们进一步对不同直径段有髓神经纤维髓鞘厚度的老年改变进行研究,将每组有髓神经纤维分为不同直径段进行统计,发现不同直径段的有髓神经纤维髓鞘厚度存在显著性老年改变。主要表现为:在0.2~0.4 μm直径段内,中老年组和老年组髓鞘厚度较年轻组均存在显著性降低;在0.4~0.6 μm直径段内,老年组髓鞘厚度较年轻组存在显著性降低;在0.6~0.8 μm直径段内,老年组髓鞘厚度较中老年组存在显著性降低;0.8~1.0 μm直径段内,组间髓鞘厚度未见显著性改变,而不同直径段的有髓神经纤维内、外周长的差异均无统计学意义。由上可推测胼胝体额区的体积改变可能是由有髓神经纤维髓鞘厚度老年性降低导致,尤其是较小直径的有髓神经纤维。为什么分段后的髓鞘厚度存在显著性改变,而分段前的髓鞘厚度无明显改变呢? 我们推测可

能是因为大直径有髓神经纤维的髓鞘厚度掩盖了小直径有髓神经纤维的髓鞘厚度的改变。

本课题组成员卢伟等[15]在海马的研究发现,有髓神经纤维总长度的老年性改变与细小直径的有髓神经纤维长度老年性改变存在关系。杨姝等[16]在大脑白质的研究发现直径 1 μm 以下的有髓神经纤维长度在老年组有显著性的下降。本研究结果与本课题组以前的研究结果一起表明:大脑白质内细小直径的有髓神经纤维及有髓神经纤维的髓鞘结构更易发生老年性改变,而导致这些老年改变的机制尚需将来进一步研究。

本研究在徐璿等[5]的研究基础上在高倍电子显微镜(放大 25 000 倍)下进一步研究了胼胝体额区内有髓神经纤维髓鞘超微结构老年性改变。本研究结果将提供胼胝体额区有髓神经纤维超微结构老年改变的基本数据,为将来研究胼胝体其他区域有髓神经纤维髓鞘超微结构老年改变提供重要的参考数据,这些研究结果一起将为进一步认识大脑额叶功能最易出现老年改变的机制提供科学依据。

参考文献:

[1] Brody H. Organization of the cerebral cortex. Ⅲ. A study of aging in the human cerebral cortex [J]. J Comp Neurol, 1955, 102(2): 511 – 516.

[2] Tang Y, Nyengaard J R, Pakkenberg B, *et al*. Age-induced white matter changes in the human brain: a stereological investigation [J]. Neurobiol Aging, 1997, 18(6): 609 – 615.

[3] 郑德枢, 丁松林. 大脑皮质局部回路神经元及胼胝体的形态学研究进展[J]. 广东解剖学通报, 1991, 13(1): 56 – 59.

[4] Sullivan E V, Adalsteinsson E, Pfefferbaum A. Selective age-related degradation of anterior callosal fiber bundles quantified in vivo with fiber tracking [J]. Cereb Cortex, 2006, 16(7): 1030 – 1039.

[5] 徐璿, 杨姝, 李琛, 等. 大鼠胼胝体体积和胼胝体额区有髓神经纤维老年改变[J]. 解剖学杂志, 2009, 32(2): 135 – 139, 173.

[6] Tang Y, Nyengaard J R. A stereological method for estimating the total length and size of myelin fibers in human brain white matter [J]. J Neurosci Methods, 1997, 73(2): 193 – 200.

[7] Gundersen H J, Bendtsen T F, Korbo L, *et al*. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis [J]. APMIS, 1988, 96(5): 379 – 394.

[8] Larsen J O. Stereology of nerve cross sections [J]. J Neurosci Methods, 1998, 85(1): 107 – 118.

[9] 李琛, 杨姝, 张伟, 等. 大脑白质有髓神经纤维髓鞘超微结构定量研究的体视学方法[J]. 解剖学杂志, 2009, 32(5): 588 – 594.

[10] Lintl P, Braak H. Loss of intracortical myelinated fibers: a distinctive age-related alteration in the human striate area [J]. Acta Neuropathol, 1983, 61(3/4): 178 – 182.

[11] Peters A, Moss M B, Sethares C. Effects of aging on myelinated nerve fibers in monkey primary visual cortex [J]. J Comp Neurol, 2000, 419(3): 364 – 376.

[12] 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.

[13] Peters A, Rosene D L. In aging, is it gray or white? [J]. J Comp Neurol, 2003, 462(2): 139 – 143.

[14] Gundersen H J, Bagger P, Bendtsen T F, *et al*. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis [J]. APMIS, 1988, 96(10): 857 – 881.

[15] 卢伟, 杨姝, 李琛, 等. 大鼠海马结构内有髓神经纤维老年性改变的体视学研究[J]. 解剖学报, 2009, 40(6): 851 – 856.

[16] 杨姝, 李琛, 张伟, 等. 大鼠大脑白质及白质内有髓神经纤维老年性改变的体视学研究[J]. 解剖学报, 2007, 38(6): 651 – 656.

(**收稿**:2011-07-05;**修回**:2011-09-10)

(编辑 王小宴)

(上接 2475 页)

胞,否则受血者体内的抗 A_1-抗体可与献血者红细胞上的 A_1 抗原发生溶血反应。但在某些手术需要体外循环输血时,如果输注 O 型洗涤红细胞,红细胞脆性增加,易破碎,有一定的溶血风险。因此,输注相同 A_2 或 A_2B 亚型血为首选。国内报道 A_2 亚型表现型频率为 0.4% ~1.01%,A_2B 亚型为 2% ~3.29%[7-8],属于较为稀少的血型。我们认为,各地中心血站或血液中心应建立 A 亚型献血者数据库,为某些特殊择期手术者及时招募稀有血型献血者,保证临床用血安全和有效。

参考文献:

[1] Fujii Y, Shibata Y, Miyata S, *et al*. Consecutive national surveys of ABO-incompatible blood transfusion in Japan[J]. Vox Sang, 2009, 97(3): 240 – 246.

[2] 杨青成. ABO 血型不合导致的输血不良反应的原因分析[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(4): 298.

[3] Melve G K, Hervig T, Seghatchian J. Self-treatment of an ABO-incompatible blood transfusion [J]. Transfus Apher Sci, 2010, 42(2): 215 – 216.

[4] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 246 – 249.

[5] 李勇, 杨贵贞. 人类红细胞血型学实用理论与实验技术[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1999: 37.

[6] 向东, 刘曦, 郭忠慧, 等. 上海地区中国人群中 ABO 亚型的研究[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(1): 25 – 26.

[7] 何永勋, 张利华, 李国美, 等. 洱海沿岸白族人群 A_2 及 A_2B 亚型的调查[J]. 江西医学检验, 2007, 25(6): 656.

[8] 李永乾, 孟趁乔, 王毅, 等. 石家庄地区 A_2 血型分布调查[J]. 河北医药, 2007, 29(2): 162.

(**收稿**:2011-07-06;**修回**:2011-09-23)

(编辑 邓强庭)