基础研究 文章编号：0253-3626（2011）04-0440-04

老年大鼠胼胝体额区有髓神经纤维与髓鞘改变的研究

徐 瑾[1]，兰 欢[2]，卢 伟[3]，唐 勇[3]

（1. 泸州医学院组织胚胎学教研室，泸州 646000；2. 泸州医学院心肌电生理学研究室，泸州 646000；
3. 重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨老年大鼠胼胝体额区有髓神经纤维、髓鞘的结构变化和髓鞘碱性蛋白（Myelin basic protein，MBP）的表达变化，以及二者间的关系。方法：运用透射电子显微镜和新的体视学方法分别对年轻组和老年组雌性 Long-Evans 大鼠胼胝体额区有髓神经纤维和髓鞘进行定量研究，运用 Western blot 对年轻组和老年组大鼠胼胝体额区 MBP 表达进行定量研究。结果：与年轻组相比，老年组胼胝体额区体积存在显著性降低，有髓神经纤维总体积显著性下降，21.5 kD MBP 表达量显著性降低。21.5 kD MBP 的表达降低与有髓神经纤维总体积、髓鞘总体积的降低之间呈正相关。结论：胼胝体存在显著性老年萎缩，胼胝体额区有髓神经纤维和 MBP 的老年改变可能与老年大脑额叶功能下降有关。

【关键词】胼胝体额区；髓鞘碱性蛋白；有髓神经纤维；体视学；老年改变

【中国图书分类法分类号】R322.81；R329.54 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-11

Myelin in the frontal region of corpus callosum in old rats

XU Qiang, et al

(*Department of Histology and Embryology, Luzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To explore the age-related changes of the myelinated fibers, myelin sheath and the expression of myelin basic protein in the frontal region of the corpus callosum in old rats, and their relationship. *Methods*: The myelinated fibers and sheathes in the frontal region of corpus callosum of young and old-aged female Long-Evans rats were quantitatively studied using electron microscope and unbiased stereological techniques. Myelin basic proteins in the frontal region of corpus callosum of young and

作者介绍：徐 瑾（1978-），男，硕士，助教，研究方向：神经生物学，老年衰老。

通信作者：唐 勇，男，教授，Email：ytang062@yahoo.com.cn。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30572075）；重庆市自然科学基金资助项目（编号：2005BB5034）；泸州医学院青年基金资助项目（编号：201017）。

的表达呈正相关（$P<0.05$），说明在 PTC 组织中 FEZ1 蛋白的低表达可能是由于在 mRNA 水平的转录活性降低所致，但由于本实验中无其它组织类型，因此 FEZ1 的表达在其他类型的 PTC 中是否存在组织类型特异性还有待于增加其它组织类型的样本进一步观察。

目前为止，FEZ1 基因表达减少或缺失的原因还不清楚，Ishii 等[8]在对前列腺癌，食管癌和乳腺癌等多种上皮肿瘤进行分析时发现 2 个食管癌以及 1 个前列腺癌细胞株中该基因存在点突变，同时他们还发现在乳腺癌细胞株中有单一重排和等位基因的缺失，因此该基因的失活可能包括基因的缺失或突变，但其失活的确切机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Hegedus L. Clinical practice: The thyroid nodule[J]. N Engl J Med, 2004, 351 (17): 1764-1771.

[2] Nonaka D, Fabbri A, Roz L, et al. Reduced FEZ1/LZTS1 expression and outcome prediction in lung cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65 (4): 1207-1212.

[3] 许良中，杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志，1996，4（6）：229-231.

[4] 尹 磊，张功员，刘 键，等. 食管鳞状细胞癌组织中 EGF 蛋白和 mRNA 的表达[J]. 郑州大学学报，2007，42（6）：1099-1101.

[5] 许 敬，葛明华，凌志强，等. 甲状腺乳头状癌中 TSHR 基因启动子区 5'-CpG 岛甲基化研究[J]. 肿瘤，2010，30（8）：696-699.

[6] Vecchione A, Galetti T P, Gardiman M, et al. Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical study of 11 cases[J]. Bmc Urol, 2004, 9 (4): 11.

[7] Hosseini H A, Ahani A, Galehdari H, et al. Frequent loss of heterozygosity at 8p22 chromosomal region in diffuse type of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13 (24): 3354-3358.

[8] Ishii H, Vecchione A, Murakumo Y, et al. FEZ1/LZTS1 gene at 8p22 suppresses cancer cell growth and regulates mitosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (18): 10374-10379.

[9] Vecchione A, Croce C M, Baldassarre G, et al. Fez1/Lzts1 a new mitotic regulator implicated in cancer development[J]. Cell Div, 2007, 24 (2): 24.

[10] Vecchione A, Ishii H, Baldassarre G, et al. Fez1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells[J]. Am J Pathol, 2002, 160 (4): 1345-1352.

（责任编辑：关蕴良）

old-aged female rats were quantitatively studied using Western blot. *Results*: When compared with young female rats, the total volume of the frontal region of the corpus callosum and the total volume of the myelinated fibers in the frontal region of old corpus callosum were significantly degraded. The expression of 21.5 kD MBP was significantly decreased in old rats. The reduction of the expression of 21.5 kD MBP, the reduction of the total volume of the myelinated fibers and the total volume of the myelin sheathes were positively correlated. *Conclusion*: There is age-related atrophy of the frontal region of corpus callosum. The age-related changes of the myelinated fibers and MBP in the frontal region of corpus callosum may be related to the decline of frontal lobe functions with aging.

【Key words】frontal region of corpus callosum; myelin basic protein; myelinated fibers; stereology; age-related change

胼胝体是大脑半球之间联络清晰的、解剖和功能相对较为清楚的连合纤维束，不论运动、感觉，还是学习、记忆等功能，都有赖于通过胼胝体的交换整合[1,2]。因此当胼胝体发生改变时，必然会影响到两大脑半球功能的完整性[3]。老年胼胝体存在萎缩[4,5]，尤其是与学习记忆功能最为密切的额区。Sullivan[6]进一步发现在胼胝体不同区域有着不同程度的萎缩，正常老年时胼胝体前部纤维具有选择易损性。胼胝体前部（即额区）主要联系两大脑额叶[1]，大脑额叶皮质是与学习和记忆功能最为密切的区域[7,8]。因此，认识大脑胼胝体额区神经纤维的老年改变对于认识老年大脑额叶功能改变具有重要意义。本研究采用体视学和分子生物学方法定量研究胼胝体额区有髓神经纤维及髓鞘成分的老年改变。

1 材料与方法

1.1 实验动物

大鼠是 1 种终身不会患老年痴呆的动物[9]。本实验采用年轻组（7 月龄）和老年组（27 月龄）雌性 Long-Evans 大鼠各 10 只，随机分配为 2 组（体视学实验组和分子生物学实验组）。所有动物均由第三军医大学动物中心提供。

1.2 标本取材与电镜照片的制备

Long-Evans 大鼠 4 %水合氯醛（10 ml/kg 体重）腹腔麻醉，心脏灌流固定。取大脑，6 %琼脂分别包埋左右半球，冠状方向切 1 mm 厚连续脑组织切片。每侧大脑半球平均切取 14~16 片，其中出现胼胝体的切片约 12 片。在出现胼胝体的组织块中，定义胼胝体额区[10,11]，在其上随机叠加等距计数点解剖显微镜下计数胼胝体额区体积。再随机叠放测点，在测点击中胼胝体额区处取组织块送电镜标本，平均每只动物抽取标本 3 块。

常规电镜组织块方法处理后，将“球切法”（Isector）[12]包埋成直径 5 mm 的小球，再树脂包埋。每一组织块随机切取 1 张 60 nm 超薄切片。透射电镜下放大 6 000 倍后随机抽取 4 个视野拍照。每只大鼠共拍摄 12 张照片。

1.3.1 胼胝体额区体积计算 抽取电镜标本前，解剖显微镜下每一胼胝体额区切片上叠放等距计数点，记录击中胼胝体额区的测点个数，每只动物击中胼胝体额区的总测点数为 $\sum Pfc$。利用体积计算公式[13,14]，即卡瓦列里原理（Cavalieri' principle）计算胼胝体额区体积：

$$Vfc = t \times a(p) \times \sum Pfc \quad (1)$$

式中 Vfc 代表胼胝体额区体积；a（p）为每一测点所对应的面积（0.39 mm^2）；t 为切片厚度。

1.3.2 胝体额区内有髓神经纤维的体积密度与总体积、髓鞘的体积密度与总体积 在电镜照片上叠加等距计数点，计数落在有髓神经纤维上的测点数（$\sum Pnf$），以及落在整个照片内的胼胝体额区测点数（$\sum Pfc$）（图 1）。胼胝体额区内有髓神经纤维的体积密度，Vv（nf/fc），按下面公式[13,14]计算：

$$Vv(nf/fc) = \sum Pnf / \sum Pfc \quad (2)$$

有髓神经纤维总体积的计算公式为：

$$V(nf,fc) = Vv(nf/fc) \times Vfc \quad (3)$$

式中 Vv（nf/fc）代表有髓神经纤维体积密度，V（nf，fc）代表有髓神经纤维总体积。运用同样的方法，计数落在有髓神经纤维髓鞘上的测点数（$\sum Pms$），得到胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘体积密度[Vv（ms/fc）]，进而得到有髓神经纤维髓鞘总体积[V（ms，fc）]。



在得到的照片上叠加等距计数点。计数落在胼胝体额区有髓神经纤维及髓鞘上的测点数（×6 000）

图 1 随机叠加等距计数点的电镜照片

1.4 Western blot 检测蛋白表达

Long-Evans 大鼠 4%水合氯醛（10 ml/kg 体重）腹腔麻醉后，0.9%生理盐水 20 ml/min 冲洗 80 ml 后解剖取脑。随机抽取一侧大脑半球，OCT 包埋剂冰冻包埋后，以冠状方向切取 1 mm 厚的连续脑组织切片。把包含胼胝体额区的脑组织切片取出，沿胼胝体边界切取胼胝体后 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min，冰上超声处理进一步破碎细胞核 DNA。4℃ 20 000 g离心 30 min，收集上清液作为细胞裂解液，-70℃ 保存。考马斯亮蓝 G250 法检测蛋白浓度，年轻组为 39.573 mg/ml，老年组为 47.538 mg/ml。取细胞裂解液年轻组 40 μl、老年组 32 μl，10% SDS-PAGE 分离样品中各蛋白质。髓鞘碱性蛋白（Myelin basic protein，MBP）抗体来源于 CHEMICON 公司（1:1 000），二抗为辣根酶标记的山羊抗大鼠 IgG（1:500）。ECL 显影[15]。

Quantity One 4.4.0 图像分析软件分析蛋白条带光密度值，以各蛋白条带与 β-actin 的光密度值之比表示该蛋白的表达量。实验至少重复 5 次。

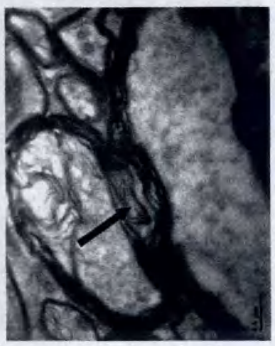
1.5 统计学处理

本研究数据均以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，应用SPSS15.0软件包进行单因素方差分析及 Spearman 相关分析，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 定性研究

老年组大鼠胼胝体额区的有髓神经纤维存在明显的脱髓鞘的改变，可见髓鞘板层分离、破坏（图 2）。



箭头指示处显示髓鞘分离、破坏

图 2　老年组大鼠胼胝体额区内有髓神经纤维断面

2.2 胼胝体额区有髓神经纤维的老年性改变

与年轻组相比，老年组大鼠胼胝体额区体积显著性下降 28.6%（$P<0.01$），有髓神经纤维总体积显著性下降 17.4%（$P<0.05$）。与年轻组相比，老年组大鼠胼胝体额区有髓神经纤维髓鞘总体积下降 13.8%，但是差异并不具有统计学意义（$P>0.05$）（表 1）。

表 1　大鼠胼胝体额区体积及有髓神经纤维老年改变的体视学研究结果（$\bar{x}\pm s$）

	年轻组（n=5）	老年组（n=5）	差异（%）	F	P
Vfc	15.3 ± 1.62	10.9 ± 1.74	−28.6	16.90	0.003 4
Vv（nf/fc）	0.60 ± 0.06	0.69 ± 0.04	14.5	7.36	0.026 5
V（nf,fc）	9.11 ± 0.44	7.53 ± 1.42	−17.4	5.71	0.043 9
Vv（ms,fc）	0.26 ± 0.02	0.31 ± 0.04	19.4	5.87	0.041 7
V（ms,fc）	3.91 ± 0.40	3.37 ± 0.85	−13.8	1.63	0.237 2

2.3 胼胝体额区 MBP 的老年性改变

Quantity One 4.4.0 图像分析软件分析蛋白条带光密度值时，由于 MBP 的几种亚型分子量很接近，所以先使用软件检测各条带分子量（以 β-actin 为准），结果显示所得条带就是目标蛋白。与年轻组相比，老年胼胝体额区的 MBP 的光密度值都有降低，但是只有21.5 kD MBP降低具有显著性（$P<0.05$）。（图 3，表 2）。所以，只有 21.5 kD MBP 的表达降低具有显著性。

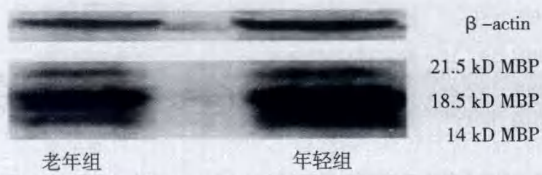


图 3　MBP 的 Western blot 显示年轻组和老年组的 MBP 表达

表 2　大鼠胼胝体额区 MBP 的老年性改变（$\bar{x}\pm s$）

	年轻组（n=5）	老年组（n=5）	F	P
21.5 kD MBP	0.60 ± 0.09	0.39 ± 0.11	8.35	0.020 2
18.5 kD MBP	0.64 ± 0.26	0.58 ± 0.25	0.10	0.765 5
17 kD MBP	0.86 ± 0.41	0.58 ± 0.22	1.43	0.266 2
14 kD MBP	0.52 ± 0.08	0.42 ± 0.11	2.11	0.184 8

通过对 21.5 kD MBP 与胼胝体有髓神经纤维总体积，有髓神经纤维髓鞘体积作 Spearman 相关分析发现，老年大鼠 21.5 kD MBP 的降低和有髓神经纤维总体积的降低存在正相关（r=0.794；P=0.006），21.5 kD MBP 的降低与有髓神经纤维髓鞘的总体积的降低存在正相关（r=0.742；P=0.014）。

3 讨 论

本研究运用本课题组建立的胼胝体额区有髓神经纤维的体视学方法，对胼胝体额区体积、有髓神经纤维体积和髓鞘体积进行了准确的三维定量研究。需要强调的是，本课题研究的是有髓神经纤维的总量而非密度。这是因为存在所谓的“参照空间陷阱”，密度并不能准确的反映总量信息[16]，所以，根据密度很难得出准确的生物学结论。例如，在本研究中老年组胼胝体额区有髓神经纤维体积密度较年轻组显著性增加，但由于胼胝体额区体积（有髓神经纤维的参照空间）的显著性降低，从而使有髓神经纤维总体积显著性降低，因此，根据密度结果只会得出相反结论。

本研究发现，老年大鼠胼胝体额区体积显著下降 28.6%。虽然并不能把本研究的结果与对人类胼胝体进行研究而获得的结果进行直接比较，但本课题组目前的三维定量研究发现进一步表明，老年胼胝体额区存在显著性萎缩。

胼胝体额区有髓神经纤维总体积较年轻大鼠显著下降 17.4%，但髓鞘体积非显著性下降了 13.8%。一方面，Peters 等[17]发现在恒河猴胼胝体显示有髓神经纤维的髓鞘存在年龄相关的结构变化，主要是髓鞘主致密线的分裂、周期内线的分裂、多余髓鞘的髓鞘发生和双层髓鞘。老年大脑白质中具有 10 层以上的髓鞘普遍增多[18]。而 Sargon[19]认为变化只有髓鞘结构的分离。本研究中，老年组电镜照片中发现了大量的髓鞘分层、分离（如图 2）。髓鞘的这些变性会降低纤维的功能，这种现象却在一定程度上弥补了一小部分髓鞘体积的下降，从而使得纤维和髓鞘体积变化不一致。实际上这种变厚的髓鞘的功能却是降低的[20]。另一方面，这从定性的角度说明了，在老年胼胝体额区中，有髓神经纤维超微结构也存在老年性改变，这些改变破坏了有髓神经的完整性，造成通过胼胝体

额区联系的两额叶神经回路受损，从而导致与大脑额叶相关的认知和记忆功能出现老年性下降。

MBP是神经组织特有的蛋白质，表达在髓鞘的主致密线[2]，在髓鞘发生与髓鞘形成过程中具有重要的生理作用[21]。MBP在大鼠至少有 21.5、18.5、17 kD 和 14 kD 共 4 种结构和抗原性相关的亚型[22]。Sugiyama[21]发现 21.5 kD MBP 很少在 31 月龄鼠表达，其它的髓鞘蛋白的表达在年轻和老年大鼠则没有显著改变。在本研究中，我们发现 MBP 的表达降低在老年大鼠已经出现，21.5 kD MBP 的表达更是显著性降低，这说明 MBP 表达的降低可能始于更早的月龄。Sugiyama[21]认为，21.5 kD MBP 表达与髓鞘脂质双分子层膜上的组分蛋白与髓鞘的锚定有关。在我们的研究中，也发现了类似的结果，我们猜测髓鞘的体积降低伴随着髓鞘的分离破坏，而 MBP 的表达降低可能是造成这一现象的一个重要原因。当对有髓神经纤维总体积、髓鞘总体积与 21.5 kD MBP 的表达做相关分析时，体积的降低与蛋白表达的降低呈正相关。因此，我们推测在老年大鼠胼胝体额区 21.5 kD MBP 的表达降低引起了有髓神经纤维的脱髓鞘变化，即只有 21.5 kD MBP 的表达降低，才会使得髓鞘分离破坏，继而髓鞘体积、有髓神经纤维体积降低。这造成了有髓神经纤维的结构和功能的受损，从而影响了两大脑半球间的信息传递和额叶功能的完整。由于髓鞘体积降低不具有显著性，这样，与 21.5 kD MBP 表达降低做相关分析时，髓鞘体积不如有髓神经纤维体积更有意义。我们推测之所以会这样的情况可能是由于异常变厚的髓鞘形成和非 21.5 kD MBP 的表达改变所造成的，即非 21.5 kD MBP 的表达改变影响到了功能低下的变厚髓鞘的大量出现。

参 考 文 献

[1] 蒋文华.神经解剖学[M].上海：复旦大学出版社，2004.348-349.

[2] 李继硕.神经科学基础[M].北京：高等教育出社，2003.69，227.

[3] Bellis T J，Wilber L A.Effects of aging and gender on interhemispheric function[J].Speech Language Hearing Res，2001，44（2）：246-263.

[4] Jokinen H，Ryberg C，Kalska H，et al.Corpus callosum atrophy is associated with mental slowing and executive deficits in subjects with age-related white matter hyperintensities：the LADIS Study[J].Neurol Neurosurg Psychiatry，2007，78（5）：491-496.

[5] Ballmaier M，Kumae A，Elderkin-Thompson V，et al.Mapping callosal morphology in early-and late-onset elderly depression：an index of distinct changes in cortical connectivity[J].Neuropsychopharmacology，2008，33(7)：1528-1536.

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

[7] Costello M C，Madden D J，Shepler A M，et al.Age-related preservation of top-down control over distraction in visual search[J].Exp Aging Res，2010，36（3）：249-272.

[8] Budson A，Price B.Memory dysfunction[J].N Engl J Med，2005，2（7）：692-699.

[9] Liddell B，Paul R，Arns M，et al.Rates of decline distinguish Alzheimer's disease and mild cognitive impairment relative to normal aging：integrating cognition and brain function[J].Integr Neurosci，2007，6（1）：141-174.

[10] Hofer S，Frahm J.Topography of the human corpus callosum revisited- comprehensive tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging[J].Neuroimage，2006，32（3）：989-994.

[11] Yates M，Juraska J.Increases in size and myelination of the rat corpus callosum during adulthood are maintained into old age[J].Brain Res，2007，1142（3）：13-18.

[12] Zhang W，Li C，Yang S，et al.A stereological method for estimating the total length and size of militated fibers in rat cerebral cortex[J].Neurosci Meth，2008，172（1）：21-26.

[13] 徐 璋，李 琛，杨 姝，等.运用新的体视学方法研究大鼠胼胝体及胼胝体额区有髓神经纤维[J].第三军医大学学报，2009，31(1)：56-60.

[14] 徐 璋，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.

[15] 温进坤，韩 梅.医学分子生物学理论与研究技术（第 2 版）[M].北京：科学出版社，2002.228-236.

[16] Shu Yang，Chen Li，Wei Lu，et al.The myelinated fiber changes in the white matter of aged female Long-Evans rats[J].Neurosci Res，2009，87（7）：1582-1590.

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

[18] Sandell J，Paters A.Effect of age on the glial cells in the rhesus monkey optic nerve[J].Comp Neurol，2002，445（1）：13-28.

[19] Sargon M，denk C，Surucu H，et al.Electron microscopic examination of the myelinated axons of corpus callosum in perfused young and old rats[J].Int Neurosci，2007，117（7）：999-1010.

[20] Zahr N，Rohlfing T，Pfefferbaum A，et al.Problem solving，working memory，and motor correlates of association and commissural fiber bundles in normal aging：a quantitative fiber tracking study[J].Neuroimage，2009，44（3）：1050-1062.

[21] Sugiyama I，Tanaka K，Akita M，et al.Ultrastructural analysis of the paranodal junction of myelinated fibers in 31-month-old-rats[J].Neurosci Res，2002，70（3）：309-317.

[22] Ferra F，Engh H，Hudson L，et al.Alternative splicing account for the four forms of myelin basic protein[J].Cell，1985，43（3）：721-727.

（责任编辑：关蕴良）