

骨骼肌失神经后再生的实验研究

唐休发, 鄧克谦, 黄元丁, 温玉明

(四川大学华西口腔医学院 颌面外科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨骨骼肌失神经的退变和再生。方法 以纯系 BALB/C 小白鼠为实验动物, 切断一侧坐骨神经, 术后 1, 2, 4, 8, 12, 16 周分别处死动物, 取腓肠肌分别进行光电镜观察和免疫组化研究。结果 骨骼肌失神经早期主要为肌纤维萎缩, 随后退变和再生, 较长时间失神经后再生的肌细胞再发生退变。失神经后 1~4 周肌动蛋白和肌红蛋白表达均降低, 8 周出现较小的细胞阳性染色, 肌纤维阳性染色主要位于核周, 12~16 周大片的细胞核周有较浅的阳性胞浆染色。这些细胞不具正常肌纤维形态。结论 骨骼肌失神经后退变和再生同时存在, 由于无神经支配, 再生的肌细胞不能分化发育为成熟的肌纤维, 而再发生退变; 较长时间失神经后再生的成肌细胞相互融合呈片状分布, 未能发育为成熟的肌纤维。

[关键词] 骨骼肌; 失神经; 再生; 免疫组织化学

[中图分类号] R 622⁺.3 [文献标识码] A

The Study on the Regeneration of Skeletal Muscles After Denervation TANG Xiu-fa, ZHI Ke-qian, HUANG Yuan-ding, WEN Yu-ming. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To study the degeneration and regeneration of skeletal muscle after denervation. **Methods** Denervation was carried out in gastrocnemius muscles in 30 adult BALB/C mice by cutting the sciatic nerve. The gastrocnemius muscles were removed at 1, 2, 4, 8, 12, 16 weeks after denervation, respectively. Specimens were processed for histological study and immunohistochemical technique. **Results** Muscle fiber atrophy followed by degeneration and regeneration was observed in the early period of denervation. Fusion of the regenerated muscle cells with each other followed by degeneration of the cells and growth of fibro connective tissue were observed in the later stage. The expression of myoglobin and actin decreased in 1~4 weeks after denervation. The positive expression of the proteins was observed in some 8 weeks cells and in many degenerated 12~14 weeks muscle cells. **Conclusion** Degeneration and regeneration may coexisted in the denervated muscles. The regenerated muscle cells can't fully develop due to the deficit of nerve regulation and degenerate again. The regenerated muscle cells will melt each other and can't develop to mature muscle fiber in the later stage.

[Key words] muscles; denervation; regeneration; immunohistochemical technique

骨骼肌的功能性重建决定于神经和肌肉两方面的因素, 有到达肌肉并与肌细胞接触的神经纤维和能接受神经的肌细胞。显微外科技术为游离移植和单纯神经损伤的肌肉提供了神经来源, 但无论立即吻合还是延期神经吻合, 或别的术式, 再生神经到达肌肉均需要一定时间, 不同术式所需时间长短不等, 即失神经肌肉总是不能立即与神经发生结构和功能性联系而发生萎缩, 使其最终功能受到影响。明确萎缩肌肉的形态结构、生理生化的变化, 对更好地防治肌肉萎缩具有重要意义。笔者选用 BALB/C 纯系雌性小白鼠, 建立失神经支配腓肠肌实验模型, 分期分批对

肌肉的组织形态学进行观察, 用免疫组化技术检测骨骼肌肌动蛋白和肌红蛋白的变化, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

四川大学华西实验动物中心提供健康成年 BALB/C 纯系雌性小白鼠 30 只, 体重约 20 g, 按观察时间 1, 2, 4, 8, 12, 16 周随机分为 6 组, 每组 5 只。每只动物随机选择一侧后肢为实验侧, 另一侧为正常对照侧, 腓肠肌为实验肌。

1.2 动物手术

按无菌操作原则将每只动物实验侧坐骨神经切断, 去掉 1 cm 长的一段, 断端结扎并埋入臀部的肌肉, 防止其自发再生吻合。对侧神经不作处理。术后动物不作特殊训练。

1.3 取材与切片制备

动物于手术后 1, 2, 4, 8, 12, 16 周处死, 立即取实验侧和对侧腓肠肌原长固定于 10 % 中性福尔马林液中 12 h, 常规脱水, 纵向石蜡包埋, 5 μ m 厚切片裱于涂有铬矾明胶的清洁玻片上, 置 80 $^{\circ}$ C 烤箱 1 h, 低温保存备用。

1.4 超薄切片的制备

取 1, 4 和 12 周组实验侧和正常侧腓肠肌中部肌肉, 低温下切成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小组织各 4 块, 立即固定于 30 g/L 戊二醛溶液 2 ~ 4 h, 10 g/L 磷酸后固定 1 ~ 2 h, 逐级丙酮脱水, Epon 812 包埋, NOVA 超薄切片机切片。JEM-2000EX 透射电镜观察。

1.5 实验主要试剂及设备

鼠抗骨骼肌肌动蛋白 (myoactin, MA) 单抗 (Dako 公司), 兔抗肌红蛋白 (myoglobin, MG) 多抗 (Dako 公司); ABC 试剂盒 (抗鼠, Dako 公司; 抗兔, 武汉博士德公司), 显色剂为 DAB。常规 HE 染色及透射电镜样品制备试剂。NOVA 超薄切片机 (LKB 公司)。JEM-2000Ex 透射电镜 (日本)。

1.6 免疫组织化学染色

石蜡切片 60 $^{\circ}$ C 烤箱加温 1 h, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 0.5 % 过氧化氢封闭 30 min; 滴加 1:20 的正常血清 (Dako 公司产品) 湿孵 30 min; 分别滴加第一抗体鼠抗 MA (1:20) 和兔抗 MG (1:300) 置湿盒内 4 $^{\circ}$ C 过夜。37 $^{\circ}$ C 烤箱 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加二抗, 抗鼠抗体 (1:300), 抗兔抗体 (1:100), 置湿盒 30 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 ABC 复合物 (1:300) 置湿盒 30 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 新鲜配制的 DAB-H₂O₂ 复合物, 光镜下控制显色, 自来水终止显色。苏木素复染, 脱水、透明、封片光镜下观察。以 PBS 代替一抗作阴性对照, 其余步骤相同。MA 和 MG 阳性均为胞浆内黄色颗粒。

2 结果

2.1 光镜下所见

正常肌组织肌纤维排列整齐, 肌束间间隙小, 有少量结缔组织, 纵切片上可见肌纤维横纹清晰, 肌核椭圆形, 沿肌纤维长轴方向排列。大多在肌纤维边缘。肌纤维间可见成纤维细胞, 肌核染色较成纤维细胞核染色淡, 肌浆均匀分布。横切片上肌核位于肌纤维边缘。

切断神经后 1 周组, 肌纤维大部分萎缩。纤维间间隙增大, 胞浆染色变淡, 肌核增加, 形成核堆, 核染色浓淡不均, 仍可见肌纤维横纹, 大部分肌核沿肌纤维长轴方向排列。2 周组, 部分肌纤维退变, 横纹模

糊或消失, 胞浆淡染或不均匀, 核增多, 分布紊乱, 形成核堆, 替代退变肌细胞。4 周组, 退变的肌纤维轮廓消失, 核排列紊乱, 部分核排列仍有方向性, 可见核固缩和肿胀以及位于肌纤维中央的核, 肌细胞胞浆少 (图 1)。8 周组, 肌细胞肿胀淡染的核增多, 成串沿肌纤维方向排列, 部分区域脂肪结缔组织浸润。12 周组, 肌纤维严重萎缩, 几乎不见胞浆, 各种形态的核成堆分布, 染色不均, 无正常形态的肌细胞。固缩核增多。脂肪组织浸润明显。

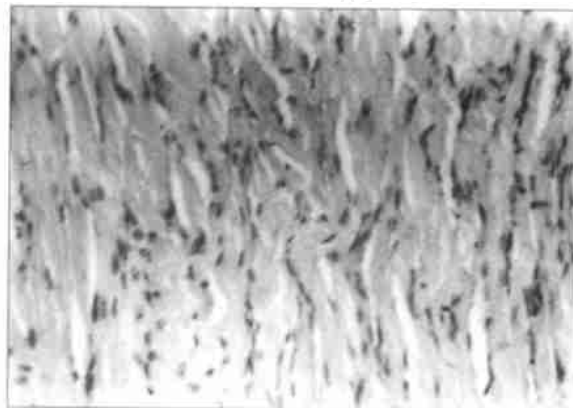


图 1 失神经 4 周部分核固缩, 肿胀成串珠状 HE \times 40

Fig 1 Partial nucleus was condensated and swollen as strings of beads after 4 weeks denervation HE \times 40

2.2 电镜下所见

正常肌肉肌原纤维排列整齐, Z 线清晰, 线粒体均匀分布在肌原纤维之间, 排列规则, 未见溶酶体。神经切断后 1 周肌原纤维排列基本整齐, 线粒体增多, 无明显肿胀。4 周组线粒体明显增多肿胀, 溶酶体增多, 可见含不成熟的肌原纤维的细胞。12 周有核位于细胞中央的细胞, 胞浆内有不成熟肌原纤维, 线粒体肿胀, 被认为是再生的肌细胞退变, 也可见未发生退变的再生肌细胞, 核位于细胞中央, 肌原纤维分布不规则 (图 2, 3)。



图 2 失神经 12 周, 核位于中央的不成熟的肌细胞 TEM \times 3 000

Fig 2 Nucleus was located in the center of unmaturred muscle cell after 12 weeks denervation TEM \times 3 000

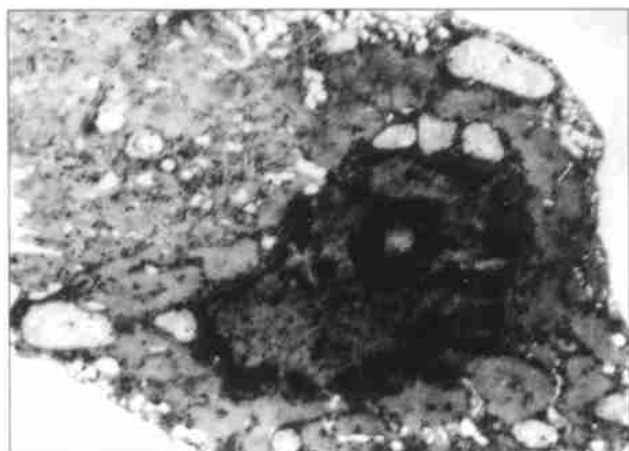


图 3 失神经 12 周不成熟的细胞再生退变 TEM $\times 10\,000$

Fig 3 Unmatured cells were degenerated and regenerated after 12 weeks denervation TEM $\times 10\,000$

正常腓肠肌 MA 阳性为胞浆内黄色颗粒,均匀分布,显横纹,所有肌纤维染色一致。MG 阳性亦为胞浆内黄色颗粒,沿横纹及肌纤维膜分布更明显。腓肠肌有两类纤维,一类 MG 染色深,另一类 MG 染色浅。

MA 染色:切断神经后 1 到 4 周,染色变浅,横纹模糊甚至消失;8 周组部分肌纤维胞浆染色较淡,阳性黄色颗粒细小,部分纤维阳性颗粒呈团块状分布,可见一些较小的细胞胞浆阳性染色。12 周已不见正常的肌细胞轮廓,胞浆阳性染色的细胞片状分布,胞浆少,集中在核周围。亦无横纹分布。16 周时大片的细胞核周围有较浅的阳性染色的胞浆(图 4)。

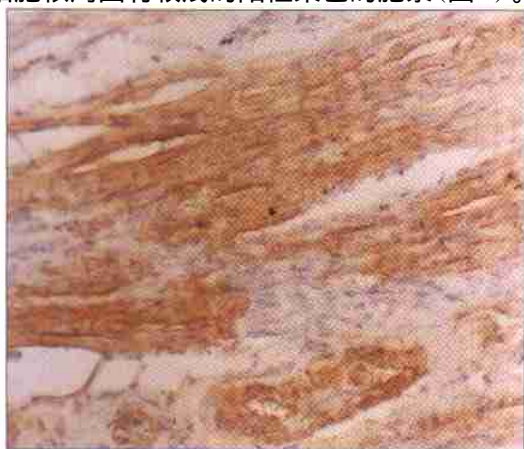


图 4 失神经后 16 周,MA 阳性细胞的胞浆相互融合 ABC $\times 20$

Fig 4 The positive cells of MA melt each other after 16 weeks denervation ABC $\times 20$

MG 染色:切断神经后 1~2 周染色深的肌纤维减少,阳性黄色颗粒仍呈横纹状分布,染色浅的肌纤维增多;4 周组肌纤维已失去两型差异,均呈阳性染色,但染色较正常浅,阳性颗粒大小不均匀;8 周组阳性染色的胞浆呈网状,分布不均匀,主要分布在胞核附近;12 周组在严重萎缩的肌纤维内可见有阳性染色

的胞浆,浓淡不均,胞核周围明显,有胞浆染色阳性的较小的细胞;16 周大量的细胞核周围有少量阳性染色的胞浆,细胞小,未见成熟的肌细胞形态(图 5)。



图 5 大量成堆的胞核周围有 MG 阳性染色的胞浆,细胞相互融合成片状 ABC $\times 20$

Fig 5 The positive cells of MG were found around the nucleus and melt each other ABC $\times 20$

3 讨论

3.1 形态学变化

本实验对失神经鼠腓肠肌动态观察发现,肌纤维早期发生萎缩,继之退变,退变的肌细胞被成肌细胞替代¹。在严重萎缩的肌纤维所在位置核增多,这些核排列仍有一定方向性,细胞核中有的肿胀,有的固缩,增多的核可能为相对性的,也可能因细胞增殖而形成绝对性的核增多。电镜下见失神经较长时间组(12 周)有细胞核位于细胞中央、胞浆中有不成熟的肌原纤维的细胞。因此失神经早期,由于退变肌纤维的基膜存在,由肌卫星细胞等成肌潜能的细胞增殖而来的细胞可能在基膜内融合为不成熟的肌细胞,而失神经时间较长的肌肉,基膜最终崩解,新形成的不成熟的肌细胞亦发生退变,即在没有神经支配的状况下,新形成的成肌细胞反复退变与再生。不断循环,最终导致肌源性细胞全部丧失²。但可能这个过程是相当长的。本实验中的观察时间内仍有再生的肌细胞。因此,促进失神经骨骼肌再生,促使神经与肌肉尽早发生形态和功能性联接可能会提高失神经肌肉功能恢复程度。

骨骼肌纤维的胚胎发育是由生肌节和各处的间充质细胞分化而成。肌卫星细胞具有增殖和分化能力,被认为是肌组织的干细胞,在静止时位于基底膜和肌纤维膜之间,出生后、肌肉损伤及锻炼后可被激活转化成为成肌细胞,在骨骼肌的生长及修复中发挥重要作用。研究表明,肌卫星细胞在没有神经支配的状况下,不能发育为成熟的肌纤维³。Billington 等⁴用骨骼肌移植的方法将骨骼肌再生和神经再支配结

合在一起,使长期失神经支配的骨骼肌在神经修复后的疗效提高;Irintchev 等⁵ 用培养的成肌细胞移植到冻伤的骨骼肌中,可改善该肌肉的功能。这些研究均提示,增加骨骼肌中的肌卫星细胞能够促进肌纤维的再生。肌卫星细胞变化的具体机理仍有待于进一步研究。

3.2 免疫组化研究

MA 和 MG 是正常骨骼肌的结构蛋白和功能蛋白,其分布具有一定的规律,常分布在横纹及肌膜处。当骨骼肌失去神经支配以后,随着肌细胞萎缩和退变,肌原纤维减少,这些蛋白质亦减少。同时这两种蛋白质出现于骨骼肌胚胎发育早期,是骨骼肌的特异性蛋白,作为肌源性细胞的标记。因此,在失神经 1 到 4 周,肌纤维染色变淡,阳性黄色颗粒细小,表明肌细胞发生退变。8 周以后可见一些较小的胞浆阳性显色的细胞,或是在萎缩的肌纤维内,胞核周围有少许阳性显色的胞浆。特别是 16 周组,HE 染色见到的成堆的细胞中,有大量的胞浆阳性染色的细胞,这些细胞被认为是再生的成肌细胞,有分化为肌细胞的潜力。这样的结果表明,失神经早期,再生的细胞仍位于原肌细胞的位置,而较长时间失神经以后,原基膜破坏,则再生的成肌细胞不规则排列,而呈片状分布。该结果证实,在失神经较长时间的肌肉内,类似大片纤维结缔组织的细胞中有大量的可能分化为肌细胞的细胞。

3.3 骨骼肌发育的有关分子机制

骨骼肌的分化发育受多种基因产物的调控,特别是肌肉转录调节基因家族,myf-5 和 MyoD 决定成肌细胞及发育^{6,7},Myogenin 与成肌细胞融合形成有功能的肌纤维有关⁸,MRF4 与肌管形成后的发育有关,在肌肉失神经后和肌肉再生中有重要作用⁹。新近研究表明,肌肉失神经后,MyoD 和 myf-5RNA 水平持续升高,而 Myogenin 和 MRF4RNA 仅短暂被诱导表达¹⁰,因此失神经后早期来源于肌卫星细胞或其他细胞的成肌细胞可能发育较晚期再生的成肌细胞更成熟。对长时间失神经的肌肉,如能改变其基因表达

模式,可能会促进再生的肌细胞发育成为肌纤维。

总之,通过本实验观察证明,肌肉失神经后,由于持续性细胞增殖,即使 16 周,仍有较多的具有成肌潜力的肌源性细胞,但这些细胞在接受神经支配的能力方面是否与正常发育期肌细胞有差异,尚值得进一步研究。肌肉失神经以后通过促进肌卫星细胞增殖分化,改变失神经肌肉的基因表达模式,一方面促进肌细胞发育成熟,另一方面促进其具有与神经连接的能力,有可能成为提高肌肉功能恢复的途径。

[参考文献]

- 1] Koshima I, Endo T. Experimental study of vascularized muscle: Multifactorial analysis of muscle regeneration following denervation J. J Reconstr Microbiol Surg, 1989, 5(3): 225-228.
- 2] Schmalbruch H, AL-Amood WS, Lewis DM, et al. Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation J. J Physiol, 1991, 441(9): 233-242.
- 3] 姜浩,徐建光. 失神经骨骼肌萎缩的研究现状 J. 国外医学骨科学分册, 2002, 23(1): 12-14.
- 4] Billington L, Carlson BM. The recovery of long-term denervated rat muscles after marcaine treatment and grafting J. J Neurol Sci, 1996, 144(1): 147-155.
- 5] Irintchev A, Langer M, Zweyer M, et al. Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts J. J Physiol, 1997, 500(3): 775-785.
- 6] Weis J, Kaussen M, Calvo S, et al. Denervation induces a rapid nuclear accumulation of MRF4 in mature myofibers J. Dev Dyn, 2000, 218(3): 438-451.
- 7] Rudnicki MA, Schnegelsberg PNJ, Stead RH, et al. MyoD or myf-5 is required for the formation of skeletal muscle J. Cell, 1993, 75(7): 1351-1359.
- 8] Hasty P, Bradley A, Morris JH, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in myogenin gene J. Nature, 1993, 364(6437): 501-506.
- 9] Weis J, Kaussen M, Calvo S, et al. Denervation induces a rapid nuclear accumulation of MRF4 in mature myofibers J. Dev Dyn, 2000, 218(3): 438-451.
- 10] Kostrominova TY, Macpherson PC, Carlson BM, et al. Regulation of myogenin protein expression in denervated muscles from young and old rats J. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 279(1): 179-188.

(本文编辑 王 晴)

《唇腭裂修复外科学》出版

由四川大学华西口腔医学院副院长、博士生导师、全国唇腭裂学组副组长石冰教授任主编,著名唇腭裂整复专家刘建华和李宁毅等教授任副主编的《唇腭裂修复外科学》已由四川大学出版社正式出版发行。这是一部融唇腭裂的基础与临床为一体,着重介绍临床治疗方案与新技术、新方法的唇腭裂专著。全书约 70 万字,插图近千幅。该书的特点为:一是紧密结合临床,便于临床应用;对各类唇腭裂畸形的治疗单独成章进行介绍,又按序列治疗的顺序相互联系,以保证读者对整个治疗过程的认识既具体又有连续性。二是对国内外有关的学术进展不泛泛而谈,而是深入浅出,细腻入微地介绍了笔者自身的经验和体会,力求做到不把不成功、不成熟的技术介绍给读者,不为求得形式的全面而背离本书的编写宗旨。三是突出以外科性治疗为主的序列治疗,这是唇腭裂综合序列治疗的重要基础和核心内容。

该书尤其适宜于临床第一线的口腔科、整复外科医师和从事唇腭裂基础与临床研究的科研工作者阅读。