

# 慢性失神经后衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶在成年大鼠施万细胞的表达\*

肖霞, 陈泽卡, 丁有权, 李轩漾, 齐建国 $\Delta$

四川大学华西基础医学与法医学院 组织胚胎学与神经生物学教研室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨成年大鼠长时程轴突缺失对大鼠施万细胞中衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶(senescence-associated beta galactosidase, SA- $\beta$ -gal)表达的影响。方法 成年雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、1 周失神经组、2 周失神经组、4 周失神经组、5 周失神经组、6 周失神经组、7 周失神经组和 8 周失神经组。各组动物进行右侧坐骨神经永久性横断手术或者相应的假手术,根据各组设定的远侧段失神经时间分别获取损伤神经的 5 mm 近侧段和 10 mm 远侧段以及假手术组同侧神经和手术组对侧神经的对应节段,采用 SA- $\beta$ -gal 染色检测 SA- $\beta$ -gal 的表达,并对 8 周失神经组大鼠获取的损伤神经标本用 SA- $\beta$ -gal 和施万细胞特异性蛋白(S100 $\beta$ )双标染色分析远侧段神经中 SA- $\beta$ -gal 表达的细胞定位。结果 成年大鼠右侧坐骨神经永久横断后,近侧段神经的远端 SA- $\beta$ -gal 表达在 2 周一过性增加,而远侧段神经中 SA- $\beta$ -gal 表达在 2 周明显增加,并且在更长的失神经过程中保持这种高表达水平。而且,绝大部分 SA- $\beta$ -gal 的表达出现在 S100 $\beta$  免疫反应阳性的施万细胞中。结论 长时程轴突缺失增加成年大鼠施万细胞中 SA- $\beta$ -gal 表达。

**【关键词】** 慢性失神经 施万细胞 细胞衰老 衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶 坐骨神经横断

**Senescence-associated Beta Galactosidase Expression in Rat Schwann Cells after Chronic Denervation** XIAO Xia, CHEN Ze-ka, DING You-quan, LI Xuan-yang, QI Jian-guo $\Delta$ . Department of Histology, Embryology and Neurobiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

$\Delta$  Corresponding author, E-mail: jgqi@scu.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of prolonged axon depletion on senescence-associated beta galactosidase (SA- $\beta$ -gal) expression in Schwann cells (SCs) of adult rats. **Methods** Male adult Sprague-Dawley (SD) rats were randomized into sham-operated group and denervation groups for 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 5 weeks, 6 weeks, 7 weeks and 8 weeks. Rats were subjected to right sciatic nerve transection. After particular denervation duration for the distal stumps, animals were anesthetized and perfused. Proximal stumps of 5 mm and distal stumps of 10 mm from injured nerves, and the corresponding segments from the sham groups and contralateral nerves were harvested and prepared for SA- $\beta$ -gal staining to detect SA- $\beta$ -gal expression. Then, additional injured distal stumps denervated for 8 weeks were employed for determining cellular distribution of SA- $\beta$ -gal expression by co-labeling of SA- $\beta$ -gal and SC-specific protein (S100 $\beta$ ). **Results** SA- $\beta$ -gal expression transiently increased in distal tips of proximal stumps 2 weeks after adult rat sciatic nerve transection without suture. In contrast, in the distal stumps of transected adult rat sciatic nerves, axon depletion for 2 weeks increased SA- $\beta$ -gal expression, and the increased expression of SA- $\beta$ -gal remained constant after prolonged denervation durations. Furthermore, combination of SA- $\beta$ -gal staining with S100 $\beta$  immunofluorescence staining showed that SA- $\beta$ -gal expression was exclusively present in denervated SCs. **Conclusion** Prolonged axon depletion increased SA- $\beta$ -gal expression in adult rat SCs.

**【Key words】** Chronic denervation Schwann cell Cellular senescence Senescence-associated beta galactosidase Sciatic nerve transection

虽然轴突离断的外周神经元和损伤神经远侧段提供了强大的内源性和外源性轴突再生能力,但临

床上外周神经损伤的患者即使经过目前最合理的外科修复,也很少能获得满意的结构和功能性恢复<sup>[1]</sup>。损伤神经远侧段和靶器官肌组织慢性失神经(即轴突缺失)已经被证实是这种临床状况的根本原因<sup>[1-2]</sup>。如成年大鼠腓总神经横断后,远侧段经历

\* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2013SZ0069)资助

$\Delta$  通信作者, E-mail: jgqi@scu.edu.cn

了 6~7 周失神经,支持胫神经急性轴突离断外周神经元轴突再生的能力几乎降低了一半<sup>[2]</sup>。

急性失神经施万细胞通过增殖和功能活化,为急性失神经远侧段创造了强大的再生支持环境<sup>[3]</sup>。而慢性失神经的远侧段中,施万细胞的凋亡导致其数量减少<sup>[4]</sup>。然而,目前的研究发现,6 周失神经后的远侧段损伤神经中,仅约 20% 的施万细胞发生依赖 caspase 3 的细胞凋亡<sup>[4]</sup>。这说明施万细胞凋亡不是慢性失神经的损伤远侧段再生支持能力急剧下降的根本原因<sup>[2]</sup>,这些存活的施万细胞对轴突再生的支持能力减弱应该才是关键所在。一些研究表明这些施万细胞的增殖减慢,其活化状态被抑制,并逐步萎缩<sup>[5-6]</sup>。成年大鼠坐骨神经横断以长段无细胞同种异体神经移植进行外科修复后,远侧段中出现衰老的施万细胞<sup>[7]</sup>。为进一步探讨慢性失神经中施万细胞衰老,本研究检测了大鼠急性或慢性失神经(横断后成年大鼠坐骨神经)后,施万细胞中细胞衰老标志物衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶(senescence-associated beta galactosidase, SA- $\beta$ -gal)的动态表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

12 周龄成年雄性 SD 大鼠,体质量 300~350 g,购自四川大学实验动物中心,饲养在(22±1)℃的室温、12 h/12 h 明/暗的光照循环的空间中,能够自由获取水和粮食。所有的动物实验均严格按照四川大学动物保护和伦理委员会的要求和美国国立卫生研究院实验动物保护和指南执行。

大鼠随机分为假手术组、1 周失神经组、2 周失神经组、4 周失神经组、5 周失神经组、6 周失神经组、7 周失神经组和 8 周失神经组,前 7 组每组 7 只,8 周失神经组 10 只。各组动物进行右侧坐骨神经永久性横断手术或者相应的假手术。

### 1.2 动物手术及神经节段标本的获取

暴露大鼠右侧坐骨神经,小心游离神经周围的结缔组织。利用显微剪于闭孔外肌和股方肌交界处横断其坐骨神经,并将近、远侧段断端的位置错位以阻止自发性再生。逐层缝合肌肉和皮肤后,将大鼠置于 37℃ 热板上等待苏醒。实验过程中所有的动物独立饲养以便术后护理。根据各组设定的远侧段失神经时间,相应动物被麻醉和体积分数为 4% 的多聚甲醛经心脏灌注,获取损伤坐骨神经的 5 mm 近侧段〔包括近侧段近端(PP)、近侧段远端(PD)〕、

10 mm 远侧段〔包括远侧段近端(DP)和远侧段远端(DD)〕以及假手术组同侧神经和手术组对侧神经的对应节段(作为对照)。

### 1.3 SA- $\beta$ -gal 染色

获取各组( $n=7$ )的坐骨神经节段经过冰冻保护后进行 15  $\mu$ m 厚的纵行切片。根据 SA- $\beta$ -gal 染色试剂盒(碧云天,中国江苏海门)说明书提供的染色步骤进行神经切片 SA- $\beta$ -gal 染色。染色完毕后利用蒸馏水漂洗切片,乙醇和二甲苯梯度溶液脱水。明场光学显微镜下随机选取手术/假手术神经的 4 个视野和对侧神经的 1 个视野进行 100 倍放大倍率的成像。对于每个神经节段,取 3 张连续的切片用于染色和切片。每幅图 SA- $\beta$ -gal 染色的光密度(OD)值采用单盲法通过 ImageJ 软件手动测量。每根神经节段 3 张连续切片的 OD 值的均值作为该神经的 OD 值。

### 1.4 SA- $\beta$ -gal 染色和 S100 $\beta$ 免疫荧光染色

大鼠坐骨神经横断后获取 8 周失神经组剩余的 3 只大鼠远侧段神经,冰冻、包埋,进行 5  $\mu$ m 厚的纵行切片,并贴片于多聚赖氨酸溶液(PLL)包被玻片。如前所述进行 SA- $\beta$ -gal 染色,待目标蓝色成功显示后,利用 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(PBS)漂洗至少 3 次,然后进行施万细胞特异性蛋白(S100 $\beta$ )免疫荧光染色。经过穿透和室温 1 h 封闭(0.02 g/mL BSA, 0.05 g/mL 山羊血清, 0.05% Tween 20, 溶解于 0.01 mol/L PBS),神经切片被抗 S100 $\beta$  小鼠单克隆抗体(1:100; Abcam, 英国剑桥)浸润,于 4℃ 孵育 12 h。经过 3 次 0.01 mol/L PBS 漂洗(每次 5 min)后,加入 Alexa Fluor 568 标记的山羊抗小鼠 IgG 荧光二抗(1:1 000; Molecular Probes, 美国尤金),于室温孵育 1 h。经过 5 次 0.01 mol/L PBS 漂洗(每次 10 min)后,利用抗荧光淬灭剂进行封片。所有的切片利用奥林巴斯 IX83 显微镜和 DP80 双芯片电荷耦合元件(CCD)摄像头在 cellSens Dimension 软件的自动大图拼接模式下成像。SA- $\beta$ -gal 染色的彩色 CCD 图像通过 cellSens Dimension 软件转换成单色图像,同时加入绿色伪彩色。S100 $\beta$  免疫荧光染色的单色 CCD 图像直接加入红色伪彩色。将这两个通道的图像重叠用于分析施万细胞中 SA- $\beta$ -gal 的表达定位。

### 1.5 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用重复测量的多因素方差分析(2W-RM ANOVA)和 Dunn 检验分析不同失神经时程的假手术/损伤神经和对侧神经对

应部位的 SA- $\beta$ -gal 表达的差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成年大鼠坐骨神经失神经过程中 SA- $\beta$ -gal 的动态表达

由图 1 可见,假手术和失神经组大鼠中损伤对侧神经在任何的失神经时程组中均没有明显的 SA- $\beta$ -gal 阳性染色。假手术组右侧坐骨神经的四个位置中 SA- $\beta$ -gal 的表达与对应的左侧坐骨神经比较,没有明显的变化( $P > 0.05$ )。各个失神经时程中横断伤后神经 PP 区域与对应的左侧坐骨神经比较,

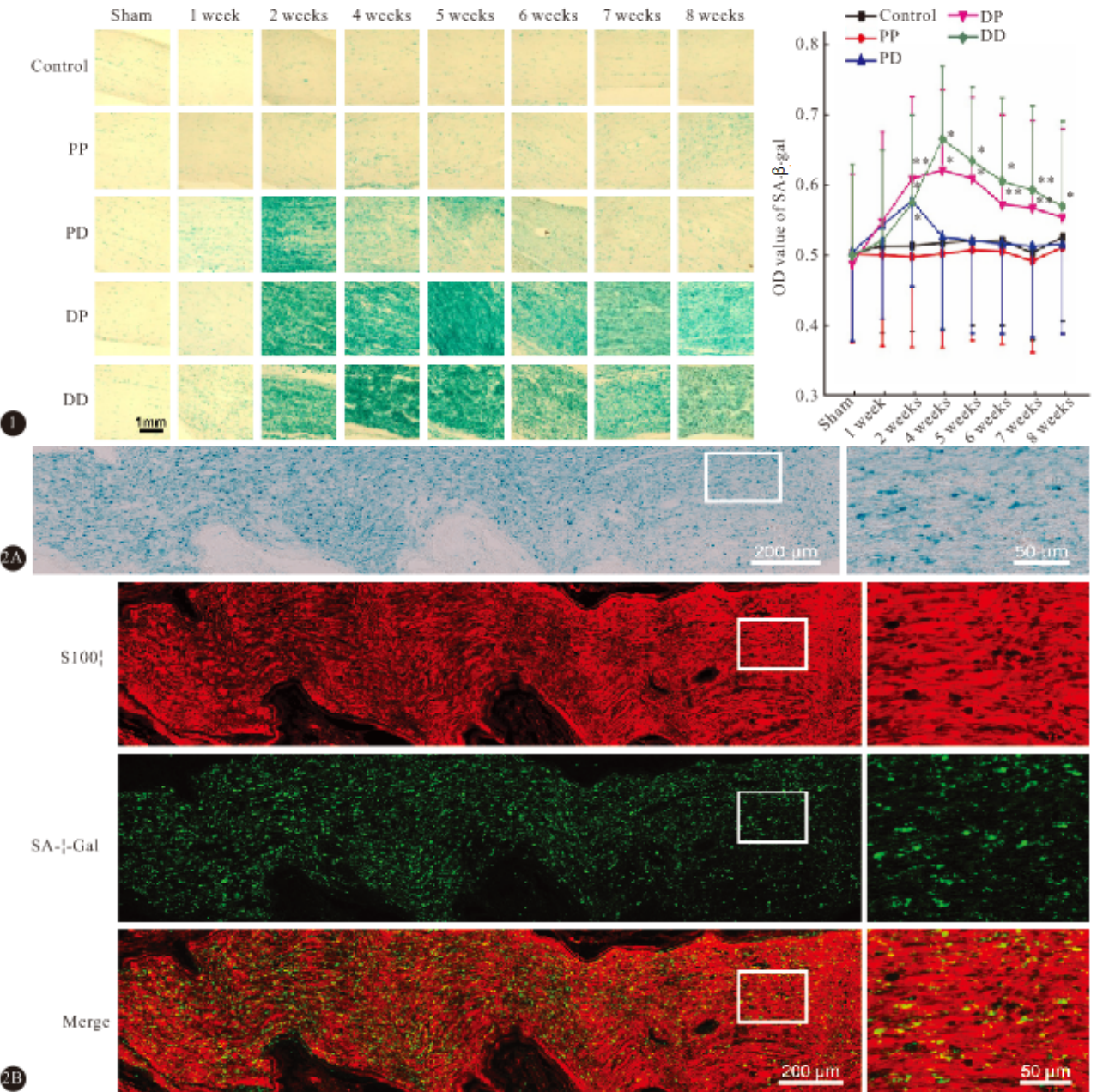


图 1 成年大鼠坐骨神经横断后近侧段和远侧段 SA- $\beta$ -gal 的动态表达

图 2 神经切片全视野自动拼接显示施万细胞 SA- $\beta$ -gal 的表达

Fig 1 Dynamic expression of SA- $\beta$ -gal in proximal and distal stumps after adult rat sciatic nerve transection

Fig 2 The expression of SA- $\beta$ -gal in SCs revealed by automated montage images for the entire nerve sections

Fig 1: The proximal stumps of transected adult rat sciatic nerves were subdivided into the proximal stems (PP) and the distal tips (PD) in relation to the injury sites. The distal stumps were also subdivided into the proximal portions near the injury sites (DP) and the distal portions away from the injury sites (DD). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. contralateral nerves. Fig 2, A: Representative images of nerve sections for the distal stumps denervated for 8 weeks, stained for the senescence marker SA- $\beta$ -gal; B: Representative images of nerve sections for the distal stumps denervated for 8 weeks, stained for the senescence marker SA- $\beta$ -gal (green) and the SC specific marker S100 $\beta$  (red). For A and B, right panel shows higher magnification images of the marked fields in the left panel

SA- $\beta$ -gal 表达的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。失神经 2 周后,横断伤后神经的 PD、DP 和 DD 区域出现 SA- $\beta$ -gal 表达增加( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。横断伤后神经的 DP 区域和 DD 区域在更长时间的失神经过程中仍然保持 SA- $\beta$ -gal 表达的增加( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。而经横断伤 2 周后神经的 PD 区域中 SA- $\beta$ -gal 表达与对应的左侧坐骨神经比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。失神经 8 周后横断伤后神经的 DP 区域中 SA- $\beta$ -gal 表达基本已经恢复至对侧坐骨神经水平( $P > 0.05$ ),而其 DD 区域中 SA- $\beta$ -gal 表达仍然增加( $P < 0.05$ )。

## 2.2 成年大鼠坐骨神经失神经过程中 SA- $\beta$ -gal 阳性表达的细胞分布

由图 2 可见,失神经 8 周后横断伤后神经的 DD 区域中 SA- $\beta$ -gal 染色阳性细胞处于神经实质组织中。双通道重叠数据表明绝大部分存活的 S100 $\beta$  染色阳性的施万细胞表达 SA- $\beta$ -gal,同时少量其他细胞也可能表达 SA- $\beta$ -gal。

## 3 讨论

研究表明,成年啮齿类动物坐骨神经损伤后 4 d,细胞衰老分子网络中抑制施万细胞细胞周期进展的成分,如 p16、p19、p53、p21 和 Jmjd3 即在刚开始增殖的施万细胞中表达<sup>[8-9]</sup>。然而,这些施万细胞衰老的稳定性尚不清楚。最新的研究表明,衰老细胞中自噬/溶酶体途径活动的增强<sup>[10]</sup>对于衰老相关的异染色质微灶和衰老相关的分泌表型的形成至关重要<sup>[11-12]</sup>,而此二者是稳定细胞衰老表型的关键环节。广泛使用的细胞衰老标志物 SA- $\beta$ -gal 是溶酶体活动增加的结果和标志<sup>[10,13-14]</sup>。因此,SA- $\beta$ -gal 是溶酶体活动增加和细胞衰老稳定性转化的标志。在本研究中,我们首次发现慢性失神经后,远侧段施万细胞 SA- $\beta$ -gal 的表达持续增加。由于所有时间点的对侧神经均没有明显的 SA- $\beta$ -gal 表达,我们观察到的损伤神经中 SA- $\beta$ -gal 表达不可能是实验过程中动物自身衰老引起的。另外,假手术动物损伤神经 SA- $\beta$ -gal 表达的缺乏,表明我们观察到的损伤神经中 SA- $\beta$ -gal 表达是损伤本身导致的特异性反应。本研究通过严密的实验对照设计排除自然衰老和假手术对结果的干扰。在我们的实验结果中,部分施万细胞中 S100 $\beta$  和 SA- $\beta$ -gal 部分重叠,可能的原因是这些慢性失神经施万细胞中 S100 $\beta$  表达呈现出条索状形态。这些慢性失神经施万细胞中 SA- $\beta$ -gal 表达的增加,提示这些细胞中可能正在形

成衰老相关的异染色质微灶和衰老相关的分泌表型,从而进行细胞衰老的稳定性转化。有研究报道 p16<sup>INK4a</sup> 可以通过 RB 抑癌基因蛋白依赖的途径增强自噬/溶酶体途径的活动<sup>[15]</sup>。成年啮齿类动物坐骨神经损伤后早期,刚刚开始增殖的施万细胞即表达 p16<sup>INK4a</sup> 并抑制施万细胞的增殖<sup>[8-9]</sup>。这提示 p16<sup>INK4a</sup> 的早期表达引发施万细胞衰老,同时通过活化自噬/溶酶体途径维持这种衰老状态。然而,慢性失神经施万细胞发生细胞萎缩,而衰老的细胞的体积增大。这可能是由于这些慢性失神经施万细胞正处于衰老晚期。因此,我们首次发现,虽然如文献报道的失神经 2 周后远侧段失神经施万细胞即发生衰老,但是在慢性失神经过程中这种衰老状态才得到进一步的稳定。

处于持续应激环境中的细胞可能发生衰老,此时其增殖受到不可逆的抑制,其基因表达和分泌成分发生明显的改变<sup>[16]</sup>。外周神经损伤后轴突与施万细胞之间的相互作用被打破,这对于远侧段施万细胞而言是一种应激原。慢性失神经过程中,这种应激持续存在时,失神经施万细胞可能发生衰老。这可以解释慢性失神经远侧段中,存活的施万细胞增殖减弱,活化状态被关闭<sup>[5-6]</sup>。慢性失神经后施万细胞活化的分子标志物 erbB2、erbB4 和 p75<sup>NTR</sup> 的表达明显降低,施万细胞分泌的生长因子和细胞因子也明显减少。而这些活化状态提供的神经营养物质对于支持轴突再生非常关键<sup>[3]</sup>。因此慢性失神经过程中,施万细胞表型的改变导致其轴突再生支持能力明显下降,而施万细胞衰老可能是慢性失神经远侧段支持轴突再生能力下降的关键原因。施万细胞衰老的引发和维持应该被当作人类外周神经损伤临床治疗的潜在细胞靶点。

由于细胞衰老的不可逆性<sup>[16]</sup>,早期调控施万细胞衰老似乎是克服慢性失神经对人类外周神经再生抑制的唯一途径。然而,在本研究中成年大鼠右侧坐骨神经永久横断后,近侧段神经的远端 SA- $\beta$ -gal 表达在 2 周一过性增加。而此时近侧段施万细胞经历大量迁移和增殖后,和再生的轴突重新建立接触。因此,我们的研究提示轴突接触后施万细胞衰老的可逆性。目前一些体内外数据也表明慢性失神经施万细胞抑制性表型可能在轴突再支配后被逆转<sup>[17-18]</sup>。尽管这种可逆性需要进一步证实,但也提示可以通过直接逆转慢性失神经施万细胞衰老从而促进人类外周神经再生。然而,施万细胞衰老已经被证实是抑制施万细胞过度增殖和肿瘤发生的生理

学机制之一<sup>[8]</sup>。因此,通过操纵施万细胞衰老解除慢性失神经对人类外周神经再生的抑制,必须精确调控,以保证不引发肿瘤形成。

### 参 考 文 献

- [1] HOKE A. Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(8): 448-454.
- [2] GORDON T, TYREMAN N, RAJI MA. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *J Neurosci*, 2011, 31(14): 5325-5334.
- [3] GAUDET AD, POPOVICH PG, RAMER MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*, 2011(8): 110. doi: 10.1186/1742-2094-8-110.
- [4] SAITO H, KANJE M, DAHLIN LB. Delayed nerve repair increases number of caspase 3 stained Schwann cells. *Neurosci Lett*, 2009, 456(1): 30-33.
- [5] HALL SM. The biology of chronically denervated Schwann cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1999(883): 215-233. 3. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08584.x.
- [6] JONSSON S, WIBERG R, MCGRATH AM, *et al.* Effect of delayed peripheral nerve repair on nerve regeneration, Schwann cell function and target muscle recovery. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56484. doi: 10.1371/journal.pone.0056484.
- [7] SAHEB-AL-ZAMANI M, YAN Y, FARBER SJ, *et al.* Limited regeneration in long acellular nerve allografts is associated with increased Schwann cell senescence. *Exp Neurol*, 2013(247): 165-177. 4. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.04.011.
- [8] GOMEZ-SANCHEZ JA, GOMIS-COLOMA C, MORENILLA-PALAO C, *et al.* Epigenetic induction of the *Ink4a/Arf* locus prevents Schwann cell overproliferation during nerve regeneration and after tumorigenic challenge. *Brain*, 2013, 136(Pt 7): 2262-2278.
- [9] ATANASOSKI S, BOLLER D, DE VENTURA L, *et al.* Cell cycle inhibitors p21 and p16 are required for the regulation of Schwann cell proliferation. *Glia*, 2006, 53(2): 147-157.
- [10] LEE BY, HAN JA, IM JS, *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 2006, 5(2): 187-195.
- [11] YOUNG AR, NARITA M, FERREIRA M, *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*, 2009, 23(7): 798-803.
- [12] IVANOV A, PAWLIKOWSKI J, MANOHARAN I, *et al.* Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol*, 2013, 202(1): 129-143.
- [13] KURZ DJ, DECARY S, HONG Y, *et al.* Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 2000, 113(Pt 20): 3613-3622.
- [14] DEBACQ-CHAINIAUX F, ERUSALIMSKY JD, CAMPISI J, *et al.* Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nat Protoc*, 2009, 4(12): 1798-1806.
- [15] JIANG H, MARTIN V, GOMEZ-MANZANO C, *et al.* The RB-E2F1 pathway regulates autophagy. *Cancer Res*, 2010, 70(20): 7882-7893.
- [16] RODIER F, CAMPISI J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 2001, 192(4): 547-556.
- [17] RUEGER MA, ARAS S, GUNTINAS-LICHIUS O, *et al.* Re-activation of atrophic motor Schwann cells after hypoglossal-facial nerve anastomosis. *Neurosci Lett*, 2008, 434(3): 253-259.
- [18] LI H, WIGLEY C, HALL SM. Chronically denervated rat Schwann cells respond to GGF *in vitro*. *Glia*, 1998, 24(3): 290-303.

(2015-12-02 收稿, 2016-03-11 修回)

编辑 沈进