

颈深肌肌梭密度及背根节 NT-3 和 Trk C 表达与退变性颈椎失稳关系

武敏, 刘志财, 夏玉军

(青岛大学医学院解剖学教研室, 山东 青岛 266021)

[摘要] 目的 研究人颈深肌肌梭密度及神经营养因子 3(NT-3)、酪氨酸激酶 C(Trk C)在相应背根神经节中的表达随年龄变化的规律,探讨它们在颈椎失稳中的作用。方法 经甲醛固定 1 年以内的尸体 12 具,按年龄分为婴儿组 5 具,青少年组 3 具,老年组 4 具,测定其颈深肌群中的颈长肌及头夹肌肌梭密度,应用免疫组化的方法观察 NT-3、Trk C 在相应背根节神经元的表达。结果 婴儿组颈长肌、头夹肌肌梭密度均高于青少年组及老年组($F=19.28, 93.47, q=7.11 \sim 16.58, P<0.01$),青少年组及老年组颈长肌、头夹肌肌梭密度无明显差异($q=0.112, 0.597, P$ 均 >0.05)。与婴儿组比较,青少年组 NT-3、Trk C 免疫组化染色强,老年组染色弱,差异有显著性($F=53.32, 141.99, q=3.507 \sim 23.663, P<0.01$)。结论 肌梭密度变化对退变性颈椎失稳发生发展无太大的意义,NT-3、Trk C 的分泌减少可能与退行性颈椎失稳有关。

[关键词] 颈椎;肌梭;神经营养因子 3;蛋白质酪氨酸激酶;神经节,脊

[中图分类号] R324 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-4488(2009)04-0339-04

DENSITY OF MUSCLE SPINDLES IN HUMAN CERVICAL DEEP MUSCLES AND IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF NEUTROPHIN-3 AND TYROSINE KINASE C IN HUMAN DORSAL ROOT GANGLION AND THEIR RELATION TO DEGENERATED CERVICAL SPINAL INSTABILITY WU MIN, LIU ZHI-CAI, XIA YU-JUN (Department of Anatomy, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, China)

[ABSTRACT] **Objective** To study the spindle density in human cervical deep muscles and immunohistochemical localization of Neutrophin-3 and tyrosine kinase C in human dorsal root ganglion, and find their relation with degenerated cervical spinal instability. **Methods** Twelve cadavers fixed with formalin within one year were used and divided into infant group (5 cadavers), teenager group (4) and senior group (4) based on their age. The spindle density of collilongus and splenius of head was determined and the expressions of the NT-3 and Trk C in dorsal root ganglions were observed immunohistologically. **Results** In infant group, the spindle density was the highest among the three groups ($F=19.28, 93.47; q=7.11-16.58; P<0.01$), no significant difference was found between teenager and senior groups ($P>0.05$). Compared with infant group, the immunohistochemical dyeing of NT-3 and Trk C in the teenager group was stronger and weaker in senior group, the differences were significant ($F=53.32, 141.99; q=3.507-23.663; P<0.01$). **Conclusion** The changes of spindle density does not show any great significance on the occurrence and development of degenerated cervical destabilization, decreased excretion of NT-3 and Trk C probably associate with this condition.

[KEY WORDS] Cervical vertebrae; Muscle spindle; Neurotrophic factor 3; Protein-tyrosine kinase; Ganglia, spinal

退变性颈椎失稳是指在颈椎退变过程中,椎骨及其周围结构不能维持颈段脊柱的生理平衡而导致椎体位移超过生理限度,并由此引起的一种临床综合征。关于其病因和发病机制,目前多侧重于椎骨、椎间盘、韧带和椎间关节等方面的研究。而正常颈部脊柱运动初始阶段最佳生理状态的维持有赖于颈深肌群的静力作用^[1],该最佳生理状态保证了有关运动单位运动顺畅从而避免失稳的发生。运动与姿势的调节并不只是由单一的因素决定的,需要感受器、神经传导、神经元、效应器共同参与^[2,3]。某些

神经营养因子则对该反射环路发育与功能维持起着至关重要的作用^[4,5]。本文以经典环路为基础,联合研究肌梭(感受器)、神经营养因子 3(NT-3)、酪氨酸激酶 C(Trk C)(背根神经节中本体感觉神经元表达的营养因子及其受体)在颈椎失稳中的作用,以为颈椎失稳的研究提供实验资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

以经甲醛固定 1 年以内的尸体 12 具为研究对象,按年龄分为婴儿组 5 具,其中 0 月 2 具,1、3、5

[收稿日期] 2008-12-13; [修订日期] 2009-06-01

[作者简介] 武敏(1982-),女,在读硕士研究生。

[通讯作者] 夏玉军(1962-),男,硕士,教授,硕士生导师。

月各 1 具;青少年组 3 具,12、22、25 岁各 1 具;老年组 4 具,63、72、73、81 岁各 1 具。性别不限。标本均取自青岛大学医学院解剖学教研室标本室,生前均无神经肌肉病变。选取颈深肌群中的颈长肌及头夹肌为研究对象,并根据颈椎失稳好发于 C5~C7 节段的特点^[6],在该节段从肌肉附着点开始沿肌束走行方向锐性分离取下 1.5 cm×2.0 cm 的组织块(共 24 个组织块),去除其表面的筋膜及脂肪,进行脱水、透明、浸蜡和包埋;根据神经支配区域性的特点,取标本的 C3~C4 神经节(共 48 个神经节),去除表面的筋膜和脂肪,同样进行脱水、透明、浸蜡和包埋。左右两侧的组织均选入实验中。

1.2 实验方法

1.2.1 肌梭的密度测定 将颈长肌、头夹肌组织块分别进行连续性横切片,切片厚度为 10 μm,根据 BOYD-CLARK 等^[7]的实验结果(人的肌梭的长度范围约在 1.5~4.0 mm),每隔 1.5 mm 取 1 张切片,以避免重复计数肌梭密度。共取 240 张切片,其中婴幼儿组 100 张,青少年组 60 张,老年组 80 张,分别行苏木精-伊红(HE)染色,采用 Olympus 显微镜(200 倍)和图像分析仪计数肌梭的个数,同时利用 Sample-PCI 软件测量切片截面积,按以下公式计算该组肌肉的肌梭密度:肌梭密度=肌梭个数/切片面积(mm²)^[8]。

1.2.2 NT-3 及 Trk C 表达的检测 采用免疫组化染色方法。将各组背根神经节组织块连续横切,切片厚度为 5 μm,用 NT-3 及 Trk C 兔抗血清(滴度均为 1:100)在同一条件下对各组切片行 ABC 免疫组织化学染色,DAB 显色,然后脱水、封片,在 Olympus 显微镜下观察 NT-3、Trk C 在背根神经节的分布。NT-3、Trk C 阳性表达细胞均呈棕黄色染色,100 倍视野下随机取 100 个阳性细胞,用 Sample-PCI 软件对染色结果进行定量分析。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 12.0 统计软件进行数据处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据间比较采用 *F* 检验及 *t* 检验。

2 结 果

2.1 不同年龄标本肌梭形态观察及密度的比较

HE 染色切片上,肌纤维及肌梭均呈淡红色,肌梭位于肌束之间,大多呈单个的散在分布,附近有小血管,也见肌梭以联合体形式存在。随着年龄的增长,肌梭形态结构发生了一定的变化,主要表现为肌

梭体积增大、囊腔扩大及肌梭纤维结缔组织囊增厚。不同年龄组颈长肌及头夹肌肌梭的密度不同,婴幼儿组高于青少年组及老年组($F=19.28, 93.47, q=7.11 \sim 16.58, P<0.01$),青少年组与老年组无明显差异($q=0.112, 0.597, P>0.05$)。各年龄组颈长肌肌梭密度均高于头夹肌,差异均有显著意义($t=8.221 \sim 12.523, P<0.01$)。见表 1。

表 1 各年龄组标本颈深肌肌梭密度比较(mm⁻², $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	颈长肌	头夹肌
婴 儿 组	100	0.746±0.168	0.585±0.102 [#]
青少年组	60	0.625±0.129 [*]	0.382±0.130 ^{*#}
老 年 组	80	0.627±0.132 [*]	0.390±0.106 ^{*#}

与婴儿组比较,^{*} $F=19.28, 93.47, q=7.11 \sim 16.58, P<0.01$;与颈长肌比较,[#] $t=8.221 \sim 12.523, P<0.01$

2.2 不同年龄标本神经节细胞 NT-3、Trk C 表达比较

显微镜下各年龄组神经节细胞均可见 NT-3、Trk C 阳性表达,阳性颗粒沉积于胞浆,细胞核无着色。与婴儿组比较,青少年组染色强度高,老年组染色强度低,差异有显著意义($F=53.32, 141.99, q=3.507 \sim 23.663, P<0.01$)。见表 2。各组 NT-3、Trk C 表达特点:婴儿组内可见 NT-3、Trk C 广泛阳性表达,神经节细胞无论大小均可见阳性表达,表达强度较强,表达范围广;青少年组中可见 NT-3、Trk C 阳性表达集中于大中型节细胞,表达强度增强;老年组中可见 NT-3、Trk C 阳性表达位于大中型节细胞,阳性表达较弱。

表 2 各组 NT-3、Trk C 阳性表达比较(A, $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	NT-3	Trk C
婴 儿 组	100	0.133±0.025	0.161±0.020
青少年组	100	0.181±0.024 [*]	0.182±0.024 [*]
老 年 组	100	0.117±0.071 [*]	0.129±0.023 [*]

与婴儿组相比较, $F=53.32, 141.99, ^*q=3.507 \sim 23.663, P<0.01$

3 讨 论

正常人体颈椎的平衡稳定由静力平衡和动力平衡两大部分来维持。静力状态下,肌肉恰当的肌张力和肌紧张维持着静力平衡装置的稳定,从而为脊柱运动单位提供最佳初始状态,保证了运动的有效发动和实施,并避免了在生理负荷下即出现脊柱运动节段的异常活动,即脊柱失稳。可见颈肌是维持颈椎静力稳定和运动协调的重要组成部分。肌张

力和肌紧张适应性变化是一个神经反射调节的过程,其中肌梭是骨骼肌内的本体感觉特定感受装置,能主动监测肌肉状态。肌梭不断向中枢传入冲动,一方面产生相应的本体感觉,另一方面反射性地产生和维持肌紧张,并参与对随意运动的精细调节^[2],故肌梭密度常被用来表明一块肌肉的感觉反馈能力。颈部某些椎旁肌如受损或其传入神经被阻滞,会导致共济失调的产生,揭示了颈部这些椎旁肌起着向中枢神经系统传递信息的作用。国内外亦有学者认为,肌梭数目的减少可能是脊柱侧弯的原因^[9];本文研究结果显示,颈肌肌梭的数量、密度并没有随着年龄的增长而减少,这与 BOYD-CLARK 等^[7]的研究结果相一致。肌梭是肌肉发生适应性运动的始动环节,作为感受器,是神经冲动传导通路的头站。尽管在婴幼儿阶段,姿势与运动的调节显然不如青少年,但婴儿组的肌梭密度最大,其原因可能为:在人体内存在着许多类细胞,例如神经元、肌纤维,在胚胎发育成熟后,其数量就不再随年龄的改变而再生,有的只可能是体积、形态或者功能的改变,而肌梭很可能也是具有这种特质的细胞系,在个体的发育过程中,肌纤维经锻炼后体积的增加远远大于肌梭的增长幅度。另外,本文结果显示,颈长肌的肌梭密度要高于头夹肌,从生物力学的角度来说,大的表浅的肌肉倾向于控制大幅度的动作,而细小的深层的肌肉更主要是控制精细的细小的姿势调节。因此,那些主要控制细小的姿势调节的深层肌肉拥有更高的肌梭密度。这也正好解释了颈长肌为什么会比头夹肌拥有更高的肌梭密度。

NT-3、Trk C 是对本体感觉神经系统发育和生理功能维持起重要作用的神经因子及其受体,NT-3 是神经营养因子的一种,同其他一些神经营养因子相比较,NT-3 对本体感觉神经元的发育、本体感觉投射弧的形成及本体感觉正常功能的维护起着至关重要的作用^[10]。已有实验证实,在胚胎发育期,肢芽骨骼肌内的 NT-3 水平决定了本体感觉神经元数目^[3],NT-3 是本体感觉神经纤维投射的关键性信号诱导因子^[11]。在病理状态下,NT-3 发挥着保护和挽救本体感觉神经、促进其生理功能恢复的重要作用。NT-3 基因敲除小鼠,本体感觉神经元 Trk C 阳性细胞因缺乏 NT-3 而发生凋亡,如果此时将凋亡途径阻断,则可以使本体感觉神经元继续存活。Trk C 是 NT-3 在本体感觉神经元中功能性受体,只有当 NT-3 与 Trk C 结合才能维持本体感觉神经

元的存活,并维持其正常功能^[12]。

NT-3 和 Trk C 对本体感觉功能的维护起着至关重要的作用。在本文实验中,我们观察到 NT-3、Trk C 的阳性表达具有以下特性:婴儿组内可见二者广泛的阳性表达,神经节细胞无论大小均可见二者阳性表达,表达强度较强,表达范围广;青少年组中可见二者阳性表达集中于大中型节细胞,表达强度增强;老年组中可见二者阳性表达位于大中型节细胞,阳性表达较弱。青少年组的染色强度高于婴儿组及老年组,婴儿组的染色强度高于老年组,提示随着年龄的增长,背根神经节中 NT-3、Trk C 的合成表达经历了一个增加-高峰-降低的过程,这与机体发育过程相一致,其变化规律也与颈椎的稳定性及功能运动的状态相一致。婴儿时期组织的各项发育还不完全,功能也正处在一个完善的阶段,细胞功能的分化也在发展中,具体于姿势的调节及本体感觉的发展来说,婴儿时期还要经过典型的趴、坐、爬、立、行的过程才能逐步发育成熟形成人类所特有的颈曲、胸曲、腰曲、骶曲,因此需要相当的营养因子的营养支持;而成年人各项发育已经成熟,各种高分化的细胞系也已经建立,且细胞功能活跃,能维持正常生理功能的实现;老年人的各项功能由于自由基的堆积或其他一些原因等发生退化。因此,我们可以认为,尽管各年龄组颈深肌群肌梭数量没有明显改变,但对本体感觉功能的维护起着至关重要作用的 NT-3 和 Trk C 则随年龄改变而发生变化,致使维持静力平衡装置的肌肉肌张力和肌紧张失衡,从而不能为脊柱运动单位提供最佳初始状态,出现在了生理负荷下即出现脊柱运动节段的异常活动。至于早期应用 NT-3、Trk C 等相关营养因子是否可以干预退变性颈椎失稳的发生发展,仍有待于进一步的实验证实。

[参考文献]

- [1] 马学晓,张高孟,于腾波,等. CT-1 对神经再支配骨骼肌功能恢复的促进作用[J]. 青岛大学医学院学报, 2008,44(6):505-508.
- [2] 吴苏娣,樊小力. 肌梭结构和功能的研究进展[J]. 生理科学进展, 2002,33(2):121-125.
- [3] 刘金钊,陈晓亮,胡有谷. 人椎旁肌褪黑素受体的表达[J]. 青岛大学医学院学报, 2009,45(1):7-9.
- [4] 李维平,王廷华,冯忠堂,等. 部分背根切断对备用背根节 Trk C 表达的影响[J]. 华西医科大学学报, 2000,31(3):328-329.
- [5] 王廷华,柯青,吴林艳,等. 针刺对备用背根节神经元 Trk C 表达的影响[J]. 四川大学学报:医学版, 2003,34(1):40-42.

- [6] BOHLMAN H H, EMERY S E. The pathophysiology of cervical spondylosis and myelopathy[J]. *Spine*, 1988,13(7):843-846.
- [7] BOYD-CLARK L C, BRIGGS C A, GALEA M P. Muscle spindle distribution, morphology, and density in longus colli and multifidus muscles of the cervical spine[J]. *Spine*, 2002, 27(7):694-701.
- [8] AMONOO-KUOFI H S. The density of muscle spindles in the medial, intermediate and lateral columns of human intrinsic postvertebral muscles[J]. *J Anat*, 1983,136(Pt 3):509-519.
- [9] 吴亮,邱勇,王斌,等. 特发性脊柱侧凸患者两侧椎旁肌中肌梭与运动终板病理学变化的对比研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2008,18(3):222-226.
- [10] LYKISSAS M G, BATISTATOU A K, CHARALABOPOULOS K A, et al. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2007,4(2):143-151.
- [11] CHEN H H, HIPPENMEYER S, ARBER S, et al. Development of the monosynaptic stretch reflex circuit[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2003,13(1):96-102.
- [12] GENC B, OZDINLER P H, MENDOZA A E, et al. A chemoattractant role for NT-3 in proprioceptive axon guidance[J]. *PLoS Biol*, 2004,2(12):403.

(本文编辑 黄建乡)

(上接第 338 页)促进 T 细胞的激活。二者缺乏时单一激发 T 细胞受体不能有效地刺激 T 细胞的增殖,甚至导致 T 细胞无能^[14,15]。DC 与 T 细胞结合后可分泌大量的 IL-12,诱导 T 细胞、自然杀伤细胞、淋巴因子激活杀伤细胞产生大量 TNF- γ 、穿孔素和颗粒酶,增强对靶细胞的溶解作用^[16]。实验结果说明,MCF-7 细胞分泌的 VEGF 抑制了 DC 的正常发育成熟,导致向 T 细胞内传递信号的分子间稳固连接不能形成,从而不能有效地刺激 T 细胞的增殖,对靶细胞不能发挥有效的杀伤作用。这可能是高表达 VEGF 实体瘤荷瘤宿主机体抗肿瘤免疫功能受损的机制之一。

本研究结果显示,VEGF 作为一种关键的促血管生成因子,不仅参与肿瘤血管新生,而且还能显著影响宿主免疫系统中 DC 的免疫功能。这可能是瘤细胞在肿瘤微环境中逃避 T 细胞的攻击,造成肿瘤免疫抑制的机制之一。同时我们的研究结果还表明,甲基化修饰的 siRNA 能够在体外有效降解内源性基因 VEGF 的表达,抑制肿瘤源性的细胞因子的负调控,提高正常的抗肿瘤免疫功能。因此,安全有效的靶向 siRNA 干扰实体瘤 VEGF 的表达,将为肿瘤的治疗提供一条新的有效途径。

【参考文献】

- [1] COMMEREN D L, VAN SOEST P L, KARIMI K, et al. Paradoxical effects of interleukin-10 on the maturation of murine myeloid dendritic cells [J]. *Immunology*, 2003,110:188-196.
- [2] OHM J E, CARBONE D P. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency[J]. *Immunol Res*, 2001,23:263-272.
- [3] LAXMANAN S, ROBERTSON S W, WANG E, et al. Vascular endothelial cell growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005,334(1):193-198.
- [4] ALMAND B, RESSER J R, LINDMAN B, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2000,6(5):1755-1766.
- [5] ORINI E, GUARINI A, CHIARETTI S, et al. The circulating dendritic cell compartment in patients with chronic lymphocytic leukemia is severely defective and unable to stimulate an effective T-cell response[J]. *Cancer Res*, 2003,63(15):4497-4506.
- [6] SCHULER C, SCHULER-THUMER B, STEINMAN R M. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2003,15:138-147.
- [7] 周晓彬,纪新强,徐莉. 医用统计学软件 PPMS 1.5 的组成和应用特点[J]. *齐鲁医学杂志*, 2009,24(1):91-93.
- [8] NISHIOKAY, HUAW, NISHMUN N, et al. Genetic modification of dendritic cells and its application for cancer immunotherapy[J]. *Med Invest*, 2002,49(2):7-17.
- [9] WRIGHT BROWNIV, MCCLAIN K L, TALPAZM, et al. Physiology and pathophysiology of dendritic cells[J]. *J Hum pathol*, 1997,28:563-569.
- [10] ARDAVIN C, I ARTINEZ DELHOYO G, IARTIN P, et al. Origin an differentiation of dendritic cells[J]. *Trends Immunol*, 2001,2(2):691-700.
- [11] CHUNG J, YOON S, DATTA K, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor transcription and protection from apoptosis are dependent on alphabeta1 integrin in breast carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2004,64(14):4711-4716.
- [12] FOLKMAN J. Clinical application of research on angiogenesis [J]. *N Engl J Med*, 1995,333(26):1757-1763.
- [13] 张淑华,葛银林. 小干扰 RNA 靶向 VEGF 基因在体内外抑制乳腺癌细胞的增殖[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007,23(1):68-73.
- [14] BOUSSIOTIS V A, FREEMAN G J, GRAY G, et al. B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance[J]. *J Exp Med*, 1993,178(5):1753-1763.
- [15] 杨惠祥,王新生,董胜国. 树突状细胞基础研究进展[J]. *齐鲁医学杂志*, 2004,19(1):83-87
- [16] BANCHEREAU J, SCHUCER-THURNER B, PALUCKA A K. Dendritic cell as vectors for therapy[J]. *Cell*, 2001,106(3):271-274.

(本文编辑 厉建强)