

大鼠肉毒杆菌毒素中毒肌肉内辣根过氧化物酶的轴突摄取和逆行传送

田文皓 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

提要 用生化的偶合氧化反应法测定坐骨神经和 L₄₋₆ 节段的背、腹根的 HRP 含量。在正常大鼠神经中很少内源性过氧化物酶, 腓肠肌注射 HRP 后, 不只在坐骨神经和腹根, 尚可在背根测出 HRP 含量。组织化学证实 HRP 的逆行传送主要是由轴突进行的。上述神经组织中的 HRP 含量在肉毒杆菌毒素中毒和正常大鼠之间无明显差别, 刺激神经可使上述两组神经组织中的 HRP 含量均明显增加。以上结果提示, 肌肉内注射 HRP, 在神经肌肉接头摄取和逆行传送 HRP 并不限于轴突末梢, 而主要是在末梢顶端以上的一些前末梢部分。

关键词 肉毒杆菌毒素; 辣根过氧化物酶; 轴突的摄取和逆行传送; 酶标

神经肌肉接头的轴突末梢可以摄取和逆行传送辣根过氧化物酶 (HRP) 到它们的神经细胞体。将离体蛙的神经肌肉标本, 置于高 K、高渗溶液或对神经施加刺激, 都可使轴突末梢摄取和逆行传送 HRP 的含量增加⁽¹⁾。在培养的哺乳类脊髓运动神经元的研究表明, 土的宁可增加轴突末梢摄取和逆行传送 HRP 的含量, 而 Mg⁺⁺ 可抑制轴突末梢摄取和逆行传送 HRP 的含量⁽²⁾。这些离体或培养标本的工作证实轴突末梢摄取和逆行传送 HRP 的含量与它们递质释放量之间密切相关。本工作目的, 是在整体大鼠局部肌肉使用胆碱能神经递质释放抑制剂⁽³⁾——肉毒杆菌毒素(以下简称肉毒)中毒后, 观察抑制递质释放, 是否随之抑制肌肉内轴突摄取和逆行传送 HRP 的实验结果。

材料和方 法

体重 213±(SD)24 g 成年大鼠。HRP (中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂, R.Z. = 2.5-3), 溶解于 0.9% 生理盐水, 浓度为 50 mg/ml。所用的 A 型肉毒的毒力为 1×10⁸ LD₅₀(小白鼠 ip)/ml, 用前用 pH 6.4

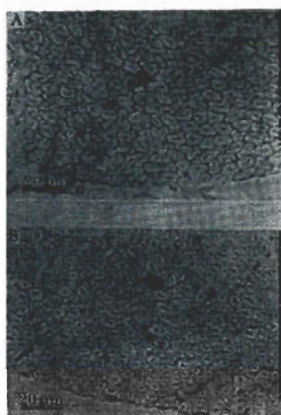


Fig 1. Histochemical section of rat (24 h after im HRP) A) sciatic nerve; B) dorsal root.

的磷酸缓冲液稀释。分别将 0.1 ml 的肉毒或生理盐水 im 于实验组或对照组大鼠的一侧腓肠肌内, 次日(此时在实验组大鼠用单刺激或强直刺激坐骨神经, 都已不能引起肌肉收缩)再向两组大鼠腓肠肌 im 0.1 ml HRP。24 h 后放血处死大鼠, 取近腓肠肌侧坐骨神经、支配腓肠肌的 L₄₋₆ 节段的背、腹根各一段, 分别称重, 按比例加入 0.3 M 的蔗糖溶液, 然后制成匀浆, 每样品取 0.2 ml 以测定神经组织中的 HRP 含量⁽⁴⁾。坐骨神经和背根的组织化学切片按 Straus 法⁽⁵⁾进行。

刺激坐骨神经是在 im HRP 后 6 h 及 23 h (杀鼠前)进行的, 每次刺激 1 h, 都是在戊巴比妥钠浅麻醉下, 切开腿部皮肤、分离肌肉, 并用距离为 2 mm 的银丝保护电极置于神经上刺激。脉冲波宽为 0.2 ms, 强度为 5 V, 6 串刺激/min, 每串刺激的持续时间为 2 s, 频率

1981年8月15日收稿 1981年9月7日修回
1980年4月8日在上海生理科学会论文报告会上宣读

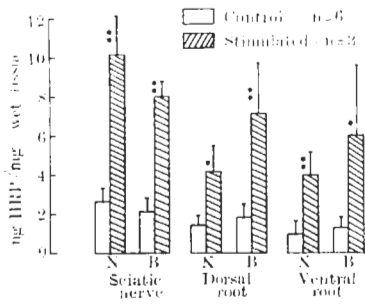


Fig 2. Effect of nerve stimulation on HRP quantity of normal (N) and botulin-poisoned (B) rats. $\bar{x} \pm SD$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

为 12 c/s, 刺激器为我所自制 MF-81 晶体管刺激器。

结 果

大鼠神经组织中内源性过氧化物酶含量的测定 取 3 鼠的坐骨神经和 L_{4-6} 节段的背、腹根, 用测 HRP 方法测定其内源性过氧化物酶的含量, 结果表明除 1 鼠的坐骨神经的内源性过氧化物酶含量相当于 0.1 ng HRP/mg 湿重组织外, 其余 2 鼠的坐骨神经以及 3 鼠的背、腹根均未测出内源性过氧化物酶。

大鼠 im HRP 后神经组织中 HRP 含量的测定 6 只正常大鼠 im HRP 后 24 h, 坐骨神经、 L_{4-6} 背、腹根的 HRP 含量分别为 $2.8 \pm (SD) 0.8$, 1.3 ± 0.8 , 0.9 ± 0.8 ng/mg 湿重组织。结果表明, 在坐骨神经和腹根测出 HRP 含量的同时, 尚可在背根测出 HRP 含量。

大鼠 im HRP 后神经组织中 HRP 组织化学的观察 为了弥补生化测定法在定位上的不足, 我们在给大鼠一侧腓肠肌 im 5 mg HRP 后 24 h, 用组织化学方法检查了坐骨神经和背根内的 HRP 反应。

切片中可观察到轴突内部出现 HRP 呈色反应产物, 由此证实 HRP 的逆行传送主要是由轴突进行的。

大鼠肉毒中毒肌肉 im HRP 后神经组织中 HRP 含量的测定 6 只大鼠的肉毒中毒腓肠

肌 im HRP 后 24 h, 坐骨神经和 L_{4-6} 节段的背、腹根的 HRP 含量分别为 2.1 ± 0.7 , 1.9 ± 0.9 , 1.5 ± 1.0 ng/mg 湿重组织。这些数值分别和前组大鼠相比较, 其中由于肉毒对感觉神经无作用、背根应差别不显著 ($P > 0.05$) 外, 坐骨神经和腹根差别亦均不显著 ($P > 0.05$)。结果表明, 坐骨神经和腹根组织中的 HRP 含量, 并不因为轴突末梢递质释放受阻而减少。

im HRP 后刺激坐骨神经对神经组织中 HRP 含量的作用 我们在 3 只大鼠和 3 只肉毒中毒大鼠 im HRP 后, 对坐骨神经施加电刺激, 同样在 im 后 24 h 对上述两组神经组织中的 HRP 含量进行测定, 结果见图 2。

由图 2 表明, 刺激神经无论对正常大鼠神经组织或肉毒中毒大鼠神经组织中的 HRP 含量, 均有明显的增强作用。

讨 论

肉毒中毒大鼠神经组织中的 HRP 含量与正常大鼠比较无显著差别的结果表明: 整体大鼠肌肉内轴突末梢释放递质的多寡和神经组织中 HRP 的含量无相互关系。从本工作结果可论: im 的 HRP 可由两种方式摄取和逆行传送: 一种是通过突触前末梢或末梢胞饮 (endocytosis) 摄取, 这种摄取方式与轴突末梢递质释放量密切相关; 另一种方式是由末梢上端的前末梢 (preterminal) 部分渗入摄取, 摄取和逆行传送 HRP 的量和轴突末梢递质的释放量无相互关系。哪一种为主要摄取方式呢? 这可能取决于 HRP 的浓度以及神经组织和 HRP 作用的时间。如果 HRP 的浓度较高或与神经组织作用的时间较长 (例如本工作的实验条件), 为后种摄取方式。反之, 为前种摄取方式^(1,2)。已有资料表明, 离体或在体标本, 随着 HRP 浓度的增高或作用时间的延长, HRP 可由轴突上 Schmidt-Lantermann 切迹或者由轴近的 (adaxonal) 和轴周的 (periaxonal) 空间渗入到轴突内^(6,7)。

肉毒使递质释放受阻的机制, 有人认为是

在递质释放过程的本身,可能是阻断递质在释放点的外排⁽⁸⁾。亦有人认为是由于降低了对钙的敏感性,同时相应升高了细胞内钙的激活水平⁽⁹⁾。由于我们的实验条件可能主要是由前末梢摄取和逆行传送 HRP。因此,即使肉毒中毒大鼠轴突末梢递质释放的机能受阻,也不会影响其神经组织中 HRP 的含量。

此外,im HRP 可在坐骨神经和腹根测出 HRP 含量的同时,我们系首次用生物化学和组织化学方法测出背根的 HRP。已有资料报道初级感觉神经元摄取 HRP 并不是在它们的感觉末梢,而是由轴突上 S-L 切迹渗入摄取^(10,11)。这点可能亦是上述两组动物中背根的 HRP 平均含量略高于腹根的原因,但两者差异都不显著($P>0.05$)。对于我们推论最直接的证据,有待于用定量酶标电镜组织化学方法进一步研究阐明之。

致谢 本工作在冯德培教授指导下完成,朱德行同志

参加组织化学工作

参 考 文 献

- 1 Litchy WJ. *Brain Res* 1973 Jun 29; 56:377
- 2 Teichberg S, Holtzman E, Crain SM, Peterson ER. *J Cell Biol* 1975 Oct; 67 (1):215
- 3 田文皓,夏宏器. 中华医学杂志 1981年2月; 61 (2):117
- 4 Lundquist I, Josefsson J. *Anal Biochem* 1971 Jun; 41 (2):567
- 5 Straus W. *J Histochem Cytochem* 1964 Jun; 12 (6):462
- 6 Krishnan N, Singer M. *Am J Anat* 1973 Jan; 136 (1):1
- 7 Nishino H, Ono T, Sasaki K, Nishino A, Muramoto K. *Neurosci Lett* 1979 Sep; 14 (1):1
- 8 Kao I, Drachman DB. *Science* 1976 Sep 24; 193 (4259):1256
- 9 Leander S, Thesleff S. *Acta Physiol Scand* 1980 Feb; 108 (2):195
- 10 Furstman L, Saporta S, Kruger L. *Brain Res* 1975 Feb 9; 84 (2):320
- 11 Arvidsson J. *ibid* 1975 Nov 28; 99 (1):135

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Jun; 3 (2): 94—96

UPTAKE AND RETROGRADE AXONAL TRANSPORT OF HORSE RADISH PEROXIDASE (HRP) INJECTED INTO BOTULIN-POISONED MUSCLE IN RATS

TIAN Wen-hao (Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT The quantity of HRP in sciatic nerve and both ventral and dorsal roots of L₄₋₆ spinal segments of rats was determined by coupled oxidation reaction method.

Little endogenous peroxidase was found in normal nerve tissue.

After HRP was injected into gastrocnemius muscle, HRP was detected not only in the sciatic nerve, but also in the ventral and dorsal roots.

Histochemical study confirmed that retrograde axonal transport of HRP proceeded mainly in the axon.

No significant difference in the HRP

quantities was found between poisoned and normal rats.

The HRP quantities in the nerve tissues of both groups of rats were increased by stimulating the nerve.

These results suggest that the uptake and retrograde transport of HRP in neuromuscular junctions are not restricted to axonal terminals but occurred mainly at some preterminal portions up to the tips of the terminals.

KEY WORDS botulin; horseradish peroxidase; uptake and retrograde axonal transport; enzymatic mark