



神经元轴突生长的力生物学*

孙艳丽 赵虎成** 冯西桥

(清华大学航天航空学院工程力学系, 生物力学与医学工程研究所, 北京 100084)

摘要 神经系统作为一个复杂的体系, 在其发育过程中轴突需要延伸较长的距离才能与下一级神经元或靶细胞形成突触。在这个复杂的移动过程中, 神经元轴突在空间分布上形成了精确有序的结构。过去认为这种有序结构的形成主要由形态发生素的化学浓度梯度来指导, 而最近的研究发现力学因素对调控轴突的延伸速度与方向发挥着重要的作用。因此, 轴突的延伸本质上是一个力化学耦合过程。本文将结合自己过去的工作论述力学因素对轴突延伸的调控机制及相关的信号转导。这一领域的研究将为认识对神经系统疾病的发生以及神经再生提供重要的参考。

关键词 轴突生长, 力学调控, 力生物学

中图分类号 Q66, R318.01

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0303

神经元 (neuron) 是动物机体中结构最为复杂的一类细胞, 由胞体 (soma)、树突 (dendrite) 和轴突 (axon) 组成。在发育过程中, 胞体和轴突都会进行长距离的迁移并精确地延伸到所需的位置。正在延伸的轴突最前端是一个高度动态的结构, 用于引导和控制神经突 (neurite) 的前端生长, 命名为生长锥 (growth cone, GC)^[1]。轴突用GC来检测环境信号、调整其生长速度与方向, 进而寻找下一级神经元的树突或胞体。过去一直认为化学物质浓度梯度决定轴突的最终延伸方向^[2]。近期的研究发现, 非洲爪蟾的视神经发育过程中, 力学因素对轴突的延伸方向起到直接的调控作用^[3]。这种力学因素和化学信号的整合不仅对发育很重要, 而且对病理过程也很重要。许多神经退行性疾病伴随着中枢神经系统组织力学的变化, 如体内外实验均显示: 细胞外基质硬度可影响轴突的延伸方向与生长速度^[3-4]。神经元轴突生长是一个复杂的问题, 涉及许多细胞内和细胞外信号的相互协调, 如细胞骨架主动收缩力、外部载荷和细胞外基质刚度^[5-6]。高度动态的GC通过轴突杆 (axon shaft) 与胞体连接 (图1), GC与轴突杆中的力对轴突的正常生长发育至关重要。GC在轴向产生张力拉动神经突轴

延伸, 轴突杆亦对GC的前移有推动作用^[6]。因此, 轴突生长可认为是GC与神经轴突杆之间的相互协同作用的结果。本文将结合自己的工作综述内力与外部载荷对轴突生长调控的最新进展。

1 内力驱动神经元轴突生长

1.1 细胞骨架收缩与聚合产生的内力驱动GC前移

GC移动与轴突的生长依赖于细胞骨架。轴突内的细胞骨架由肌动蛋白、微管、神经细丝组成。为了深入理解轴突生长中力的平衡, 研究人员将轴突的GC与轴突杆看作是两个独立的部分 (图1)。GC由中心区域 (central domain)、片状伪足 (lamellipodium)、丝状伪足 (filopodia) 组成^[7]。GC的伪足与其他类型细胞的伪足在形状上相似, 丝状伪足与片状伪足中充满了致密的肌动蛋白。在靠近GC膜端的肌动蛋白丝聚合时可对细胞膜产生推动力^[8]。由于布朗运动以及肌动蛋白丝与GC膜

* 国家自然科学基金 (12072176, 12011530059, 12032014, 11620101001, 11772175) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62782771, E-mail: zhaohc@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2022-06-27, 接受日期: 2022-08-19

的振荡,为肌动蛋白单体的进入提供了足够的空间进而为丝状伪足中肌动蛋白的聚合提供物质基础^[9]。当聚合成弯曲的肌动蛋白丝变直时,肌动蛋白丝推动细胞膜使膜处于张力状态下,张力的大小为 $10\ \mu\text{N}/\text{m}$ ^[10]。肌动蛋白丝受到细胞膜同样大小的反作用力。位于生长锥中心的肌球蛋白马达可牵拉肌动蛋白丝产生收缩力,引起肌动蛋白向GC中心回流。但是在生长锥外周的肌动蛋白通过点黏附与细胞外基质耦联在一起。类似于其他类型细胞与细胞外基质间的点黏附,神经元与细胞外基质的点黏附由整合素(integrins)、踝蛋白(talin)、黏着斑蛋白(includin)、shootin1和皮层蛋白(cortactin)组成。通过这些分子将肌动蛋白与细胞外基质动态的连接在一起,形成局部点黏附。点黏附作用越强,肌动蛋白与细胞外基质的联系就越紧密,在GC中心产生的收缩力可以传递到细胞外基质上。因此,由丝状伪足边缘形成的局部黏附可以抑制肌动蛋白的回流,而GC边缘的肌动蛋白马达收缩将

中心部位向边缘拉伸^[11]。外周神经系统(peripheral nervous system)神经元的GC收缩力为 $40\ \text{Pa}$ 左右,中枢神经系统(central nervous system)神经元GC的收缩力在 $10\ \text{Pa}$ 左右^[12]。肌动蛋白聚合可推动细胞膜向前移动,导致GC前移。肌动蛋白聚合产生的推动力在 $100\ \text{pN}$ 左右^[13]。由于肌动蛋白聚合作用产生的推动力与GC周边的肌动蛋白马达收缩产生拉伸作用导致GC向前移动(图1)。GC的延伸与肌动蛋白回缩流的速率一般是相关联的,GC延伸快,肌动蛋白回缩慢。力的传递通过点黏附的形成、加强、解离的调控来实现。GC的移动最终取决于所有力的平衡(图1)。GC持续移动,依赖于纤维状肌动蛋白(F-actin)与点黏附的恒定转换。GC中心的肌动蛋白丝需要解聚,为周边的肌动蛋白聚合提供单体。点黏附要有足够的强度来产生引起GC前移的收缩力,同样需要点黏附动态的解聚与形成来拉动GC前移^[14]。

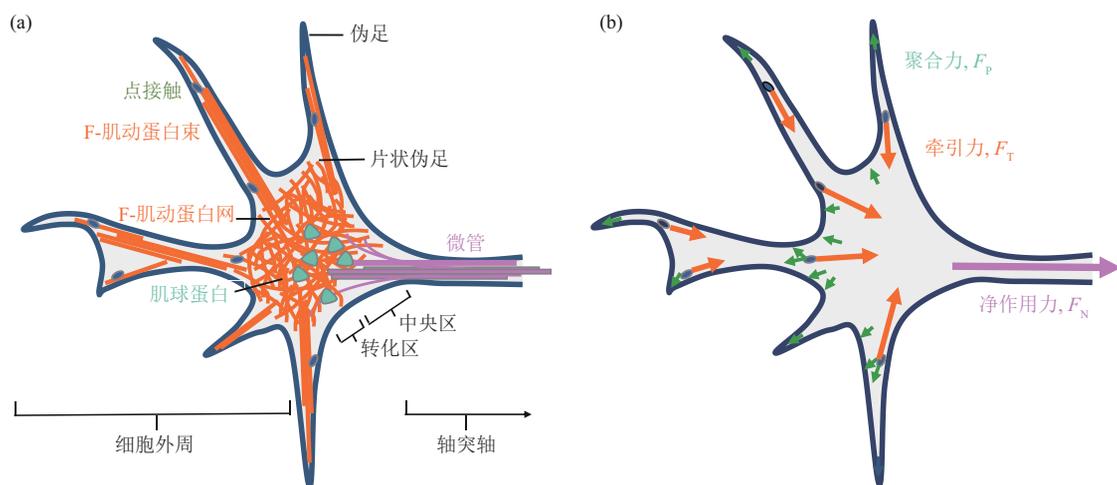


Fig. 1 Origin of force in neuronal growth cones

图1 神经元生长锥中力的分布

(a) 神经元生长锥与其中的细胞骨架示意图:丝状伪足中包含有成束的肌动蛋白,片状伪足中含有网状的肌动蛋白。肌动蛋白与基底形成点黏附(focal adhesion),点黏附主要分布在生长锥的边缘。轴突杆中主要分布有微管束。(b) 生长锥中的力分布图:肌动蛋白聚合产生推动力(F_p),肌动蛋白与肌球蛋白移动对基底产生收缩力(F_T),推动力与收缩力产生合力(F_N)。

总之,肌动蛋白在GC外周聚合,在中心解聚,而肌球蛋白马达向GC中心或者周边拉伸依赖于局部黏附的动力学。弱的局部黏附,肌动蛋白回流率高($10\ \mu\text{m}/\text{h}$),GC不再向前移动。随着丝状伪足周边局部黏附强度的增强,肌动蛋白回流速率将降低,GC外围的收缩力增加。周边由于大量肌

动蛋白收缩导致的黏附与解黏附引起的牵拉与肌动蛋白聚合推动细胞膜前移动,每小时GC迁移可以达到几十微米。局部黏附的动态调控来决定GC延伸或者停止以适应轴突外部的环境。

1.2 轴突杆中的力

成熟的轴突杆中细胞骨架的排列与GC中的细

胞骨架排列存在明显的差异。生长过程中的轴突杆中充满了微管, 轴突成熟后神经丝(neurofilament)再添加进去。在轴突中微管的伸长端朝向GC^[15]。微管一般长时间保持几百微米的长度, 可以看作是轴突中刚性的杆。类似于微丝聚合对细胞膜产生的推动力, 在轴突延伸时每根微管聚合端会对GC细胞骨架产生3~5 pN的推动力, 分子马达蛋白滑移引起的微管移动也可以对GC产生推动力^[16]。微管聚合与滑移对GC推动力的大小取决于轴突的横截面积、微管的长度、马达蛋白的密度, 总推动力为几百pN到几个nN。在轴突中, 肌动蛋白以被血影蛋白(spectrin)间隔的垂直于微管的环状排列形式存在(图2)。肌动蛋白环之间的距离在190 nm左右, 肌球蛋白丝长度约为

325 nm。因此, 肌动蛋白丝可以连接肌动蛋白环, 将它们牵拉而引起延轴突内产生张力。在轴突中, 肌球蛋白可以按照一定的角度排列, 镶嵌在相邻肌动蛋白环间隙内, 并施加轴向和周向张力, 因此收缩产生的力可在轴向与周向(图2)^[17]。血影蛋白是否起到力学作用, 目前尚不清楚。在红细胞膜下由于血影蛋白的存在, 使红细胞具有较好的弹性。最近的研究证实血影蛋白对维持轴突结构的完整性具有重要的作用。血影蛋白可能是一个被压缩的弹簧, 来抵抗肌球蛋白牵拉微丝产生的收缩力^[18]。总之, 微管的推动力被沿着微管的肌动蛋白与肌球蛋白收缩产生的张力来平衡。肌动蛋白产生的收缩力、微管聚合产生的推动力、血影蛋白的被动抵抗力共同形成了轴突总的合力, 推动GC向前延伸。

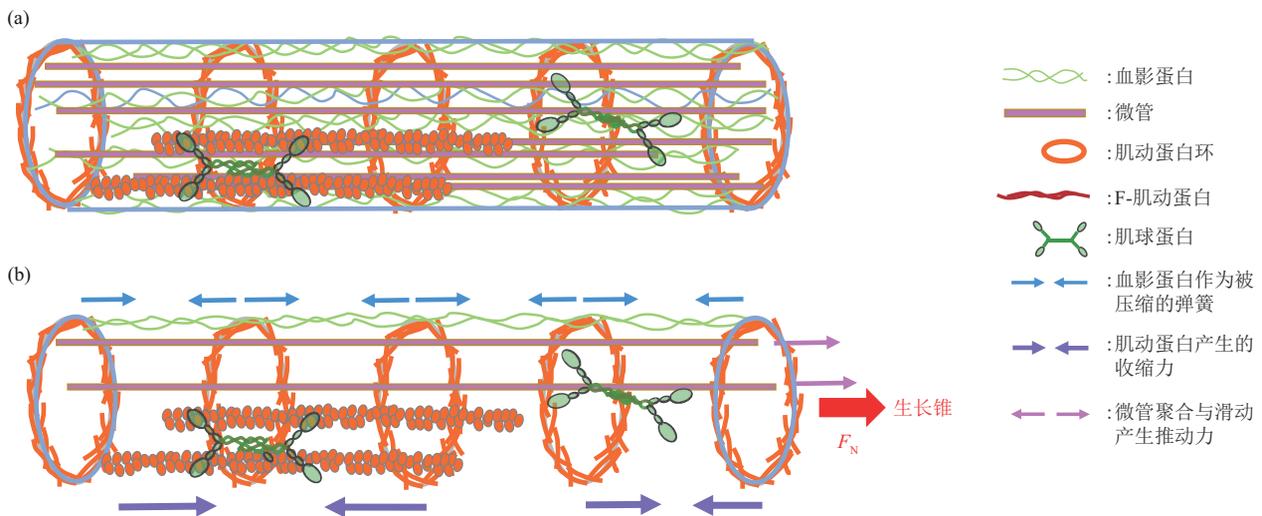


Fig. 2 The origin of force in neuronal axons

图2 神经元轴突中的力

(a) 轴突杆中细胞骨架分布示意图。微管沿轴突成束分布, 微丝呈垂直于轴突并被血影蛋白间隔的静态环状分布, 倾斜的肌球蛋白将肌动蛋白环连接。(b) 轴突杆中细胞骨架产生的力。微管聚合与滑动产生推动力(玫红色箭头), 肌动蛋白产生的收缩力(红色箭头)。血影蛋白可能作为一个被压缩的弹簧(蓝色箭头), 总的合力(F_N)推动生长锥(红色箭头)。

1.3 轴突中力的综合作用决定其生长

GC与轴突杆是如何协同调控轴突生长的? 轴突的生长需要增加微管、细胞膜、细胞器的量。轴突的生长率取决于微管聚合与延伸的快慢。那么, 是否轴突由微管的推动与GC的拉伸而驱动生长呢? 也有实验证据提出新的观点, 支持微管作为轴突生长的主要推动力, 去除微丝可引起轴突快速生长, 应用紫杉醇来促进微管的聚合可增加推动力引起轴突的延伸速度增加^[19]。这表明, 轴突杆中肌动蛋白的收缩抵抗生长, 微管聚合与滑移产生的推

动力促进轴突生长。Lamoureux等^[1]将神经元胞体从细胞外基质剥离而GC保持黏附状态, 可以观察到轴突继续生长。如果用微吸管沿着GC方向反向拉伸, 轴突依然保持生长。如何解释这些实验结果呢? 简单地说, 在收缩力存在时, 张力占主导, 微管聚合或滑移产生的挤压力可以忽略。例如, GC停止了前进, 微管继续前移会导致微管在GC的聚集大于推动GC前移。只有干扰肌动蛋白骨架降低收缩力后, 微管才转变成力平衡的主要贡献者。当不存在收缩力时, 肌动蛋白网可以忽略, 微

管聚合的挤压力占主导,可以推动生长锥,导致轴突快速生长。在这种情况下,微管前进是唯一限制轴突前进速度的因素,此时轴突前进速度是最大的。将未受扰动系统中的所有力分量加起来后,轴突杆中的总力和在生长锥中产生的净力综合作用决定轴突是否延伸。一个简单的图像是:GC中存在浓密的肌动蛋白骨架将阻碍微管从轴突进入,微管产生的推动力对抗轴突的张力与回缩。有时也有少量的微管伸入到GC,进而帮助和加强生长(图1)。如果GC边缘的收缩力较高,GC中心被向周边拉伸,为微管伸入产生了空间。GC越是对轴突拉伸,越为微管的伸入腾出空间,加速轴突的延伸^[20]。

目前描述轴突生长的快慢有两种模型,即物质扩散模型与力学模型。对于物质扩散模型,强调可溶性的微管蛋白通过扩散或主动运输到轴突末端来提供微管合成的物质基础。在早期的神经突中,胞体提供细胞的组分,如微管蛋白和其他骨架蛋白,然后沿轴扩散和主动运输,以到达轴突末端^[21]。因此,生长速率可用微管蛋白浓度的扩散方程来描述。扩散模型将轴突视为两个部分(胞体和GC),胞体中的微管蛋白浓度大于轴突杆与GC中的微管蛋白浓度。通过化学扩散或马达蛋白的主动转运来实现轴突生长^[21]。实际上,生长中的轴突内部不断发生力变化与平衡。为此,力学模型引入了微管蛋白和肌动蛋白的质量变化和动量平衡,建立了基于骨架成分的力学平衡模型^[22]。微管主要分布在神经轴突杆内部,而肌动蛋白皮质则分布于GC的外围。肌动蛋白网收缩产生的张力与微管聚合延伸产生的机械力决定轴突的生长速度与方向。可见,机械力和物质扩散分别代表了神经突生长的两个方面。在内力和外力作用下,为了维持轴突快速伸长和适应力学作用的变化,胞体可能主动地调节细胞成分的合成和运输,以支持生长所需的物质和避免物质匮乏造成的张力牵拉损伤。目前的研究证实,衰老与阿尔茨海默病患者脑组织的硬度明显降低,其轴突GC的主动收缩力明显降低。GC收缩力的变化与突触数量的形成、突触传递的效能密切相关^[4]。因此,调控轴突延伸的内力可能是治疗神经系统疾病的潜在靶点。

2 外力刺激对轴突生长的调控

轴突生长可大致分为突起形成、分化、延伸、成束与突触形成5个阶段,是建立神经网络的关键

过程。由于轴突具有感知和产生力的机制,因此人为施加力载荷可以影响轴突生长与发育的每个阶段(图3)^[23-24]。

2.1 外源性力诱导神经突生成

培养的神经元与基底接触并贴壁后先伸出几个短突起(神经突),这个过程称为神经突起始阶段^[25]。最早有研究证实,对10~12日龄鸡胚的背根神经节DRG神经元在弹性基底上进行培养,通过直径较小的玻璃管张力拉伸与神经元接触的基底导致神经突的产生^[26-27]。随后的实验也证实,对神经元细胞膜施加阈值以上的张力可以使贴壁后的神经元延伸出神经突,而与施加张力的方式无关,诱导神经突产生通常需要张力的范围在0.3~10 nN^[27]。在牵拉作用下,诱导产生的神经突可发育成正常的GC并能进行轴突延伸。Dominguez-Romero等^[28]证明了鸡胚前脑神经元神经突的形成是一个随机过程,延伸速度随外力作用的增加而增加。神经突的萌生过程必需有新的物质的补充。牵拉神经突的速度大于0.5 $\mu\text{m}/\text{min}$ 由于不能保证充分的物质供应而导致神经突破坏^[29-30]。

2.2 外力可诱导神经突分化为轴突

当神经突形成后,其经历着延伸与回缩的循环过程。在这一阶段,神经元显示出极化状态,但无论是形态上还是化学组分上这些神经突并没有明确的轴突与树突之分^[24]。大约24 h后,其中的一个神经突显示出较快的生长速度而且具有轴突的特征,这一过程称为轴突特化^[30]。Magdesian等^[31]发现小的外部拉伸力可诱导培养的大鼠海马神经元小的神经突分化为轴突。随后发现由牵拉诱导形成的轴突与自发形成的轴突标志性蛋白完全一致^[31]。Kunze等^[32]的研究证实,局部的外力刺激通过影响细胞骨架蛋白Tau在细胞内的分布来诱导神经元产生极性。Tau是神经元产生极性的一个重要蛋白质。尽管机械力可诱导神经元产生极性,但详细机制仍不清楚。神经元极化后,这种极化并不是一成不变的,而是可逆的,其中力发挥重要的作用。典型的神经元仅有一个轴突,但张力牵拉可诱导形成多个轴突^[31]。现在提出一种假说,轴突形成后会抑制其他小的神经突生长,力学刺激可以减除这种抑制^[33],引起产生极化的效应器重新分布,进而诱导出多个轴突^[33]。

2.3 外力作用促进轴突延伸

神经元培养2~3 d时,其他神经突仍然处于静止状态或进行小幅度的生长,而轴突则处于持续无

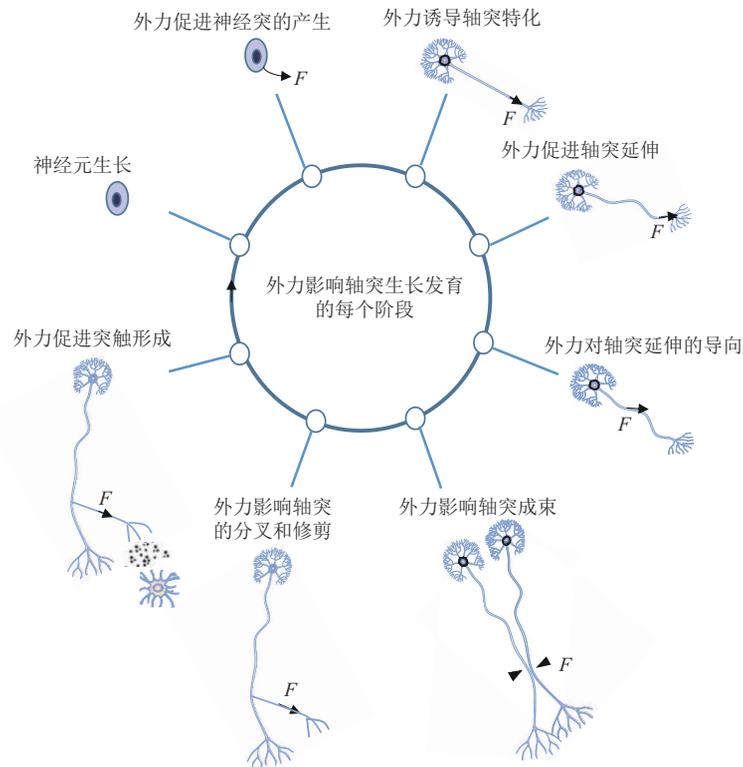


Fig. 3 Exogenous forces influences every phase of neuronal growth

图3 外力影响轴突生长发育的每个阶段

外力促进神经突的产生 (neurite initiation); 外力诱导轴突特化 (axon specification); 外力促进轴突延伸 (axon elongation); 外力对轴突延伸的导向 (axon guidance); 外力影响轴突成束 (axon fasciculation); 外力影响轴突的分叉和修剪 (axon branching and pruning); 外力促进突触形成 (synaptogenesis)。

回缩的生长, 这一阶段称为轴突延伸期^[24]。早在1984年, Bray^[26]就发现, 如果沿着轴突机械拉伸持续30 min, 可诱导其延伸超过300 μm。轴突除了增加长度外, 还增加直径, 而且保持正常的超微结构与纵向的微管、神经丝排列^[26-27]。在此过程中, 神经元能够感受到力刺激并以增加新蛋白、膜脂以及细胞骨架成分作为响应^[26]。最近发现所有类型的神经元生长期间, 轴突受到牵拉均会做出与刺激强度呈正相关的延伸。轴突受到拉伸时, 其延伸速率要远远大于生理范围内的生长速率。例如, DRG 神经元轴突受到牵拉时在两个星期内从100 μm伸长到10 cm, 生长速度是300 μm/h, 是正常生长速度的10倍^[32]。也有研究发现, 不同的拉伸方式引起轴突延伸的拉伸阈值不同。PC12细胞与鸡的感觉神经元, 用玻璃微管牵拉神经元生长的基底引起神经突生长的力学阈值为1 nN。鸡的前脑神经元黏附磁性小球后通过磁场施加磁性力(磁性微球), 诱导神经元延伸的阈值为15~100 pN。

如果低于阈值, 力学拉伸仅引起粘弹性变形, 当外力释放后轴突又发生回缩^[26]。最近的研究发现, 低于阈值的力长时间作用, 同样可以促进轴突的生长。一种可能的解释是长时间低强度力学刺激影响的是轴突的黏性成分, 短期的高强度力学刺激影响的是轴突的弹性成分^[33]。

2.4 外力作用影响轴突延伸方向与轴突成束

轴突形成后要沿着一定的路线寻找下一级神经元或目标细胞。轴突的GC作为其延伸的导向器, 检测环境状况并决定轴突的延伸方向。已有的实验证据显示, 外力可以影响轴突的延伸方向。很早就发现, 轴突的形成与延伸沿着外力的作用方向^[34-35]。外力作用可引起细胞骨架重构, 以适应力学作用方向。轴突成束依赖于轴突膜上蛋白质的相互作用。这种相互作用既可促进成束也可引起成束的轴突分离。Schelski等^[35]揭示了机械张力调控轴突成束的机制, 即机械张力通过调控轴突间N钙黏蛋白的相互作用来调节神经元轴突的成束。

2.5 外力作用促进轴突的分叉和修剪

轴突的分叉与修剪是保证神经系统形成正常突触连接的前提条件。轴突的分叉为单个神经元与多个神经元建立突触连接提供了保证。而轴突修剪又排除了过多与无效的轴突分支。De Vincentiis等^[24]报道拉伸力可促进轴突分支的产生。在海马神经元上发现,对轴突施加10 pN的拉伸力2 d后可促进轴突二级与三级分支的增加。机制分析发现,力促进分支形成的早期阶段依赖于促进肌动蛋白的聚合,后期则促进微管的聚合。也有的研究^[36-37]认为,张力是轴突侧枝生存所必须的信号,但是如果仅沿着一个侧枝的方向施加张力不仅可以引起其稳定性,也可引起回缩与消失。机械张力在轴突修剪中可稳定其拉伸的侧枝而促进附近的侧枝回缩或者消失^[38-41]。这些情况发生在机械力超过阈值,引起局部钙离子浓度大幅度增加,生长锥塌陷,失去了与细胞外基质间的黏附,侧枝像弹簧一样回缩,最后建立新的黏附。

2.6 外力可以促进突触形成

GC一旦到达靶细胞,可形成分叉并与下一级神经元建立突触连接,形成神经网络。沿着轴突方向的机械力可影响突触的各个方面,包括突触囊泡的动力学、突触传递、兴奋性与网络形成^[42-44]。其中,突触形成的关键步骤是突触囊泡在轴突末端的聚集。Siechen等^[44]发现囊泡在突触前聚集依赖于机械拉伸。应用外科手术的办法切断了运动神经元轴突末端,经过机械拉伸后末梢仍可聚集突触囊泡。5%的应变作用0.5 h,可引起囊泡的聚集增加两倍。他们推测,可能是由于机械拉伸促进肌动蛋白的聚集,为囊泡的聚集提供了支架与轨道^[44]。Ahmed等^[43]也观察到机械拉伸可影响局部和整个神经元突触囊泡聚集的动力学,但机制需要进一步研究。外力还可以影响突触的功能,进而调控神经元间信号传递。一些研究发现外力刺激可瞬间引起可逆的自发性与诱发性神经递质的释放增强。有趣的是,机械拉伸使突触传递增强并不需要生理状态Ca²⁺触发的囊泡与突触前膜融合这一步骤^[43-44],推测机械刺激可直接调控神经递质释放的通路。Fan等^[45]发现力学刺激还可以调控突触的兴奋性,持续低强度的拉伸轴突可以增强神经元的电活性,而周期性的拉伸每次拉伸后均可增强神经元的兴奋性。神经元对过去所受的拉伸刺激保持有“记忆”,每次刺激由于前一次刺激的残余而增强。De Vincentiis等^[46]的研究结果也证实,机械拉伸明显

的增强自发性突触后电流的频率,但不影响幅值。长时间拉伸(14 d)神经元,激发的突触电流的频率与幅值均明显的增加^[45, 47]。Fan等^[45]推测,机械拉伸增强突触囊泡的聚集可增强其与突触前膜搭靠(docking)的频率,进而促进囊泡的释放率与释放量。Roy等^[48]发现力刺激可引起神经网络的重构,牵拉轴突或者树突可促进新的分支形成,并在1 h内形成新的突触连接。在这个过程中神经突可伸长60 μm,直到与下一级轴突或树突接触,即力刺激可以引起新的有效突触形成。但机械诱导产生与生理状态下形成的突触功能是否相同,目前尚不明确。

3 外力作用的分子效应

力学作用可引起化学物质从轴丘向轴突末端转运。力刺激需要持续一定的时间,如果刺激时间很短神经突又恢复到原来的生长模式^[38-40]。诱导新的神经突产生,力刺激强度需要超过一点的阈值。不同类型的神经元力刺激的阈值不同,在几百pN到nN范围。轴突的生长率为0.1~0.3 μm·h⁻¹·pN⁻¹。也有人发现,足够长的时间较小的力刺激也能诱发神经突的形成^[33-34]。当较大的力作用在神经突上由于新物质的增加不会引起断裂,新增物质可以由胞体转运到神经突末端。轴突的生长速度取决于神经丝与微管的聚合速度,因为其作为物质转运的轨道。轴突的延伸速率不能超过物质的转运速率。物质的移动速率为0.3~3 mm/d,以走走停停的方式转运^[41]。因此,长时间施加较大强度的力可以引起轴突断裂。在力学加载促发的轴突延伸过程中,轴突杆直径不变或变粗,但物质如何沿着轴突补充而防止拉伸导致变细的机制依然不清楚^[42]。在2011年,Suter等^[49-50]提出了牵拉生长模型(stretch-growth model),认为在拉伸状态下轴突物质的增加可以发生在轴突的任何位置。这个假说与顶端生长模型(tip-growth model)不一致,顶端生长模型认为GC为唯一的生长位置,物质只在此位置增加^[51-52]。拉伸生长模型不是顶端生长模型的替代,而是旨在提供一个统一的轴突生长模型。目前认为,GC是物质补充的主要部位,但施加力后其他部位也可能是物质增加的位置^[53-54]。拉伸促进生长是通过促进整体物质沿轴突向前移动还是同时促进局部新物质的合成组装或者是影响物质的转运率来调控生长依然不清楚。

3.1 外力作用影响轴突中细胞骨架的动力学

细胞骨架除了提供结构支持外, 还调控局部蛋白质、细胞器、囊泡的运输。低强度的力加载可影响微管与微丝的动力学, 涉及到GC的外周和中心部分^[50]。大于阈值的机械拉伸可诱导肌动蛋白丝滑移, 引起张力释放^[46]。机械力也可通过激活力敏感离子通道引起钙离子内流而促进肌动蛋白聚合, 或者促进整合素介导的点黏附成熟或者抵消膜上存在的张力^[47-52]。Baker等^[53-56]报道局部施加力载荷可以加长丝状伪足中的肌动蛋白骨架并诱导膜脂成分转运到GC细胞膜。延伸的轴突中含有聚合的肌动蛋白丝, 肌动蛋白丝施加与突触延伸方向相反的回缩力。研究者认为, 外力通过降低膜张力为肌动蛋白的聚合与肌动蛋白单体的插入提供了空间^[56-57]。外力同样影响微管的动力学, 微管在外力拉伸方向聚合。机械力可引起微管滑移, 因为分子马达可以响应机械力^[58]。拉伸GC, 由于与肌动蛋白的耦联, 微管从中心结构域向外周结构域转移, 但不改变微管的聚合与解聚速率^[59]。拉伸整个轴突, 从轴突杆到GC的整个轴突的微管密度显著增加, 但它们在结构和极性上都是正常的^[47]。有趣的是, 研究发现用诺可达唑(nocodazole)使微管解聚阻断了应力诱导轴突的生长, 而用紫杉醇(paclitaxel)稳定微管的合成保留了应力对轴突生长的促进作用, 这表明微管聚合对维持拉伸诱导生长起至关重要的作用^[47]。这种作用具有特异性, 抑制肌球蛋白II和肌动蛋白聚合对拉伸促进生长没有显著的影响。微管密度的增加有助于降低轴突杆内的净收缩力, 改变力的平衡, 刺激GC向前运动。

3.2 外力作用影响轴突的物质转运

胞体向轴突进行囊泡、颗粒和细胞器转运是神经元维持正常功能的必须条件。对轴突施加张力可明显的影响轴突的物质转运。在DRG神经元GC中线粒体的转运明显降低, 但囊泡的转运明显增强^[59-63]。张力可改变囊泡的转运速度和方向, 这可能是由于影响细胞骨架的重构, 进而促进了囊泡在GC的积累。张力也会影响轴突中分子马达的活性, 但张力影响哪一种马达目前尚不清楚。另外, 张力也可以直接影响囊泡的移动^[59]。

3.3 外力作用影响轴突钙离子内流

机械力通过调控神经元离子通道的活性来影响其功能、发育和生理状态。机械拉伸可影响神经元胞内钙浓度。低幅度的力刺激可引起细胞外钙内流

和胞内钙瞬变。但细胞培养基中的钙被去除后神经突(包括GC)不再对力刺激响应^[51-62], 表明力刺激引起神经元的响应通过钙离子来介导。Glogauer等^[55]发现局部力刺激超过阈值(~274 pN)可激活机械力敏感的离子通道, 导致钙内流进而引起神经突回缩。增加的钙离子从GC向轴突杆、其他侧枝和胞体扩散, 在20~30 s内消失。实验还观察到除了刺激GC, 力作用神经突的其他位置也可以引起细胞外钙内流, 但刺激胞体仅引起胞体小幅度的钙内流^[63-64]。Tay等^[64]发现, 刺激强度从0.1 nN增加到1 nN可诱导皮层神经网络钙内流, 增加了钙波的频率与幅值。力刺激可激活N型钙通道, 引起的钙浓度升高15 min后恢复到基线水平, 长时间的刺激神经元钙恢复到基线水平主要原因是N型钙通道的失活导致^[56]。

4 总结与展望

本文系统地综述了外力与自身内力是如何调控轴突生长的, 这一领域研究在神经再生领域将会有潜在的应用^[65-66]。外力可以调控神经元生长与发育的各个阶段, 不同大小和作用时间的力均可诱导轴突生长。外力还可以影响细胞骨架的重建、轴突物质转运、力敏感离子通道。力刺激可以影响肿瘤细胞、免疫细胞的迁移与干细胞的分化, 其机制与力对神经元的影响基本类似, 但对力刺激的敏感程度明显不同, 具体机制需要进一步研究。另外, 力学因素和生化信号的细胞内信号通路之间相互影响, 这些信号中任何一种的变化都可能改变细胞对另一种刺激的反应, 即机械力与生化信号对于发育中的大脑中轴突生长一样重要。因此, 机械力也可能对于轴突再生过程至关重要^[66]。本课题组过去的研究也发现, 细胞外基质硬度可以影响培养的神经网络的电活性, 并具有细胞外基质成分依赖性^[67-68]。Koser等^[3]确定力敏感离子通道Piezo1为神经元对细胞外基质的感受器关于力学刺激调控轴突生长与神经网络功能的详细机制仍不清楚, 需要进一步深入研究。另一个相关的问题是, 如何通过机械力调控神经元轴突生长来实现再生策略。近年来, 随着技术的进步, 许多技术都可实现通过机械加载诱导轴突生长, 这为体外定向培养神经组织与受伤神经组织的修复提供了物理方法, 有着巨大的临床应用潜力。然而, 到目前为止, 这些技术没有一种处于临床前阶段。为了能在临床上应用, 还需要进一步地研究了解内源性机械力如何在神经系统

中发生, 以及外源性机械力如何在体内或体外通过模仿发育过程来加速修复机制。

参 考 文 献

- [1] Lamoureux P, Buxbaum R E, Heidemann S R. Direct evidence that growth cones pull. *Nature*, 1989, **340**(6229): 156-162
- [2] Song H J, Poo M M. The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol*, 2001, **3**(3): E81-E88
- [3] Koser D E, Thompson A J, Foster S K, *et al.* Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci*, 2016, **19**(12): 1592-1598
- [4] Martinez G F, Fagetti J, Richeri A. Extracellular matrix stiffness negatively affects axon elongation, growth cone area and F-actin levels in a collagen type I 3D culture. *J Tissue Eng Regen M*, 2022, **16**(2): 151-162
- [5] Franze K. Integrating chemistry and mechanics: the forces driving axon growth. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2020, **36**: 61-83
- [6] Thompson A J, Pillai E K, Dimov I B, *et al.* Rapid changes in tissue mechanics regulate cell behaviour in the developing embryonic brain. *eLife*, 2019, **8**: e39356
- [7] Conde C, Caceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*, 2009, **10**(5): 319-332
- [8] Gardel M L, Schneider I C, Aratyn-Schaus Y, *et al.* Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, **26**: 315-333
- [9] Peskin C S, Odell G M, Oster G F J. Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys J*, 1993, **65**(1): 316-324
- [10] Ladan A, Erika E, Ban J, *et al.* Comparison of the force exerted by hippocampal and DRG growth cones. *PLoS One*, 2013, **8**(8): e73025
- [11] Kubo Y, Baba K, Toriyama M, *et al.* Shootin 1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *J Cell Biol*, 2015, **210**(4): 663-676
- [12] Koch D, Rosoff W J, Geller H M, *et al.* Strength in the periphery: growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons. *Biophys J*, 2012, **102**(3): 452-460
- [13] Fuhs T, Reuter L, Vonderhaid I, *et al.* Inherently slow and weak forward forces of neuronal growth cones measured by a drift-stabilized atomic force microscope. *Cytoskeleton*, 2013, **70**(1): 44-53
- [14] Hyland C, Mertz A F, Forscher P, *et al.* Dynamic peripheral traction forces balance stable neurite tension in regenerating Aplysia bag cell neurons. *Sci Rep*, 2014, **4**: 4961
- [15] Pampaloni F, Lattanzi G, Jonas A, *et al.* Thermal fluctuations of grafted microtubules provide evidence of a length-dependent persistence length. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(27): 10248-10253
- [16] Laan L, Husson J, Munteanu E L, *et al.* Force-generation and dynamic instability of microtubule bundles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(26): 8920-8925
- [17] Dubey P, Jorgenson K, Roy S. Actin assemblies in the axon shaft - some open questions. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, **51**: 163-167
- [18] Krieg M, Stühmer J, Cueva J G, *et al.* Genetic defects in β -spectrin and tau sensitize *C. elegans* axons to movement-induced damage via torque-tension coupling. *eLife*, 2017, **6**: e20172
- [19] Flynn K C, Laskowski C J, Umlauf M, *et al.* Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury. *Science*, 2011, **331**(6019): 928-931
- [20] Dent E W, Gupton S L, Gertler F B. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, **3**(3): 594-601
- [21] Mclean D R, Van Ooyen A, Graham B P. Continuum model for tubulin-driven neurite elongation. *Neurocomputing*, 2004, **58**: 511-516
- [22] Oliveri H, Goriely A. Mathematical models of neuronal growth. *Biomech Model Mechanobiol*, 2022, **22**(1): 89-118
- [23] De Vincentiis S, Falconieri A, Scribano V, *et al.* Manipulation of axonal outgrowth via exogenous low forces. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(21): 27
- [24] De Vincentiis S, Falconieri A, Raffa V. Induction of axonal outgrowth in mouse hippocampal neurons via bacterial magnetosome. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(8): 4126
- [25] Dotti C G, Sullivan C A, Banker G A. The establishment of polarity by hippocampal-neurons in culture. *J Neurosci*, 1988, **8**(4): 1454-1468
- [26] Bray D. Axonal growth in response to exoerimentally applied mechanical tension. *Dev Biol*, 1984, **102**(2): 379-389
- [27] Falconieri A, Taparia N, Vincentiis S D, *et al.* Magnetically-actuated microposts stimulate axon growth. *Biophys J*, 2022, **121**(3): 374-382
- [28] Dominguez-Romero M E, Slater P G. Unraveling axon guidance during axotomy and regeneration. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(15): 8344
- [29] Lamoureux P, Altun-Gultekin Z F, Lin C, *et al.* Rac is required for growth cone function but not neurite assembly. *J Cell Sci*, 1997, **110**(5): 635-641
- [30] Odde F. Tensile force-dependent neurite elicitation via anti- β 1 integrin antibody-coated magnetic beads. *Biophys J*, 2003, **85**(1): 623-636
- [31] Magdesian M H, Lopez-Ayon G M, Mori M, *et al.* Rapid mechanically controlled rewiring of neuronal circuits. *J Neurosci*, 2016, **36**(3): 979-987
- [32] Fukata Y, Kimura T, Kaibuchi K. Axon specification in hippocampal neurons. *Neurosci Res*, 2002, **43**(4): 305-315
- [33] Lamoureux P, Ruthel G, Buxbaum R E, *et al.* Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. *J Cell Biol*, 2002, **159**(3): 499-508
- [34] Kunze A, Tseng P, Godzich C, *et al.* Engineering cortical neuron polarity with nano magnets on a chip. *ACS Nano*, 2015, **9**(4): 3664-3676
- [35] Schelski M, Bradke F. Neuronal polarization: from spatiotemporal

- signaling to cytoskeletal dynamics. *Mol Cell Neurosci*, 2017, **84**:11-28
- [36] Pfister B J, Iwata A, Meaney D F, *et al.* Extreme stretch growth of integrated axons. *J Neurosci*, 2004, **24**(36): 7978-7983
- [37] Raffa V, Falcone F, De Vincentiis S, *et al.* Piconewton mechanical forces promote neurite growth. *Biophys J*, 2018, **115**(10): 2026-2033
- [38] Falleroni F, Bocchero U, Mortal S, *et al.* Mechanotransduction in hippocampal neurons operates under localized low picoNewton forces. *iScience*, 2022, **25**(2): 103807
- [39] Lowery L A, Van Vactor D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(5): 332-343
- [40] Katiyar K S, Struzyna L A, Das S, *et al.* Stretch growth of motor axons in custom mechanobioreactors to generate long-projecting axonal constructs. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, **13**(11): 2040-2054
- [41] Anava S, Greenbaum A, Ben Jacob E, *et al.* The regulative role of neurite mechanical tension in network development. *Biophys J*, 2009, **96**(4): 1661-1670
- [42] Palavalli A, Tizon-Escamilla N, Lecuit T. Deterministic and stochastic rules of branching govern dendrite morphogenesis of sensory neurons. *Curr Biol*, 2021, **31**(3): 459-472
- [43] Ahmed W W, Li T C, Rubakhin S S, *et al.* Mechanical tension modulates local and global vesicle dynamics in neurons. *Cell Mol Bioeng*, 2012, **5**(2): 155-164
- [44] Siechen S, Yang S Y, Chiba A, *et al.* Mechanical tension contributes to clustering of neurotransmitter vesicles at presynaptic terminals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(31): 12611-12616
- [45] Fan A, Stebbings K A, Llano D A, *et al.* Stretch induced hyperexcitability of mice callosal pathway. *Front Cell Neurosci*, 2015, **9**:292
- [46] De Vincentiis S, Fakonieri A, Mainardi M, *et al.* Extremely low forces induce extreme axon growth. *J Neurosci*, 2020, **40**(26): 4997-5007
- [47] Brown A. Slow axonal transport: stop and go traffic in the axon. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, **1**(2): 153-156
- [48] Roy S, Coffee P, Smith G, *et al.* Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport. *J Neurosci*, 2000, **20**(18): 6849-6861
- [49] Suter D M, Miller K E. The emerging role of forces in axonal elongation. *Prog Neurobiol*, 2011, **94**(2): 91-101
- [50] Feldman E L, Axelrod D, Schwartz M, *et al.* Studies on the localization of newly added membrane in growing neurites. *J Neurobiol*, 1981, **12**(6): 591-598
- [51] Oliveri H, Gorieli A. Mathematical models of neuronal growth. *Biomech Model Mechan*, 2022, **21**(1): 89-118
- [52] De Rooij R, Kuhl E, Miller K E. Modeling the axon as an active partner with the growth cone in axonal elongation. *Biophys J*, 2018, **115**(9): 1783-1795
- [53] Baker J E, Smith R D, Shannon S F, *et al.* Actin sliding velocities are influenced by the chemical driving force of actin-myosin binding. *Biophys J*, 2009, **96**(3): 496A
- [54] Deshpande, Vikram S., *et al.* A bio-chemo-mechanical model for cell contractility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(38): 14015-14020
- [55] Glogauer M, Arora P, Mcculloch C a G. Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching. *J Dent Res*, 1997, **76**: 3169-3169
- [56] Pita-Thomas W, Steketee M B, Moysidis S N, *et al.* Promoting filopodial elongation in neurons by membrane-bound magnetic nanoparticles. *Nanomedicine*, 2015, **11**(3): 559-567
- [57] Shingyoji C, Nakano I, Inoue Y, *et al.* Dynein arms are strain-dependent direction-switching force generators. *Cytoskeleton*, 2015, **72**(8): 388-401
- [58] Schaefer A W, Schoonderwoert V T G, Ji L, *et al.* Coordination of actin filament and microtubule dynamics during neurite outgrowth. *Dev Cell*, 2008, **15**(1): 146-162
- [59] Loverde J R, Ozoka V C, Aquino R, *et al.* Live imaging of axon stretch growth in embryonic and adult neurons. *J Neurotrauma*, 2011, **28**(11): 2389-2403
- [60] Kunze A, Murray C T, Godzich C, *et al.* Modulating motility of intracellular vesicles in cortical neurons with nanomagnetic forces on-chip. *Lab Chip*, 2017, **17**(5): 842-854
- [61] Loverde J R, Pfister B J. Developmental axon stretch stimulates neuron growth while maintaining normal electrical activity, intracellular calcium flux, and somatic morphology. *Front Cell Neurosci*, 2015, **9**: 308
- [62] Franze K, Gerdemann J, Weick M, *et al.* Neurite branch retraction is caused by a threshold-dependent mechanical impact. *Biophys J*, 2009, **97**(7): 1883-1890
- [63] Miles L, Powell J, Kozak C, *et al.* Mechanosensitive ion channels, axonal growth, and regeneration. *Neuroscientist*, 2022. doi: 10.1177/10738584221088575
- [64] Tay A, Di Carlo D. Magnetic nanoparticle-based mechanical stimulation for restoration of mechano-sensitive ion channel equilibrium in neural networks. *Nano Lett*, 2017, **17**(2): 886-892
- [65] Winter C C, He Z, Jacobi A, *et al.* Axon regeneration: a subcellular extension in multiple dimensions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2022, **14**(3): a040923
- [66] Motz C T, Kabat V, Saxena T, *et al.* Neuromechanobiology: an expanding field driven by the force of greater focus. *Adv Health Mater*, 2021, **10**(19): 2100102
- [67] Zhang Q Y, Zhang Y Y, Xie J, *et al.* Stiff substrates enhance cultured neuronal network activity. *Sci Rep*, 2014, **4**:6215
- [68] Wen Y Q, Gao X H, Wang A P, *et al.* Substrate stiffness affects neural network activity in an extracellular matrix proteins dependent manner. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, **170**: 729-735

Mechanobiology of Neuronal Axon Growth*

SUN Yan-Li, ZHAO Hu-Cheng**, FENG Xi-Qiao

(Institute of Biomechanics and Medical Engineering, Department of Engineering Mechanics, School of Aerospace Engineering,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract As a complex system, axons need to extend a long distance to form synapses with next neurons or target cells in the development of nervous system. During this complex movement, neuronal axons form precisely ordered structures in their spatial distribution. In the past, it was thought that the formation of such ordered structures was mainly guided by the chemical concentration gradient of morphogenesis. However, recent studies have found that mechanical cues play an important role in regulating the neurite initiation, elongation and sprouting, nerve fasciculation, and neuron maturation. Thus, axon extension is essentially a mechano-chemical coupling process. This paper discusses the origin of the cellular forces controlling axon growth and pathfinding, the mechanism of axons perceiving mechanical stimuli from the environment, and the mechanism of mechanical force regulating axon extension and related signal transduction. We also discuss how forces are generated and sensed *in vivo*, and which molecular mechanisms are responsible for responding to mechanical signals. The research in this field will provide important reference for understanding the neurological diseases and nerve regeneration.

Key words axon growth, mechanical regulation, mechanobiology

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0303

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (12072176, 12011530059, 12032014, 11620101001, 11772175).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-62782771, E-mail: zhaohc@mail.tsinghua.edu.cn

Received: June 27, 2022 Accepted: August 19, 2022