

论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0696-05

不同年龄小鼠脱髓鞘动物模型中脑内星形胶质细胞激活情况的观察

王洪凯,梅峰,刘志,韦美,肖岚 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所)

[摘要] **目的** 观察星形胶质细胞在不同年龄(青壮年及中老年)cuprizone(CPZ)脱髓鞘小鼠模型中的激活特点,探讨星形胶质细胞激活与髓鞘脱失可能存在的内在联系。**方法** 选取6周龄(青壮年)及9月龄(中老年)雄性C57BL/6小鼠建立CPZ导致的急性脱髓鞘动物模型,经0.2%CPZ处理6周后,通过体质量测量及卢卡斯快蓝(luxol fast blue,LFB)染色观察模型建立是否成功,利用免疫组织化学染色检测实验组(CPZ)和对照组(CTL)小鼠胼胝体(corpus callosum,CC)及皮层(cortex,CTX)区胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)和髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)表达变化,并通过Western blot方法进一步检测GFAP及MBP蛋白表达差异。**结果** 0.2%CPZ处理6周后,青壮年CPZ小鼠于胼胝体及皮层区GFAP阳性细胞数显著增多($P < 0.01$),同时伴有显著的MBP表达下降($P < 0.01$);中老年小鼠于胼胝体区GFAP阳性细胞数增多较明显($P < 0.05$),并伴有MBP表达明显下降($P < 0.05$);GFAP阳性细胞数的增多和MBP表达下降均表现为青壮年组更加明显($P < 0.01$)。**结论** 星形胶质细胞的激活于青壮年小鼠更加明显,并与髓鞘损伤呈现出一定的正相关性,星形胶质细胞激活可能是参与髓鞘损伤的重要原因。

[关键词] 星形胶质细胞激活;脱髓鞘;年龄;小鼠

[中图分类号] R-332;R338;R363.27

[文献标志码] A

Activation of intracerebral astrocytes in a demyelination model of mice at different ages

Wang Hongkai, Mei Feng, Liu Zhi, Wei Mei, Xiao Lan (Department of Histology and Embryology, Chongqing Institute of Neurobiology, College of Basic Medial Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To observe the activating features of astrocytosis in a cuprizone (CPZ)-induced demyelination model of mice at different ages and their correlation with demyelination. **Methods** Six-week old and 9-month old male C57BL/6 mice were enrolled in this study and served as 6-week group and 9-month group, respectively. A mouse model of CPZ-induced acute demyelination was established. Six weeks after 0.2% CPZ treatment, whether the model was successfully established was observed by measuring the body weight and luxol fast blue (LFB) staining. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and myelin basic protein (MBP) in corpus callosum and cortex from 6-week group and 9-month group was detected by immunohistochemistry and Western blotting, respectively. **Results** Six weeks after 0.2% CPZ treatment, the number of GFAP positive cells in corpus callosum and cortex from 6-week group was significantly increased ($P < 0.01$), while the expression of MBP significantly decreased ($P < 0.01$); the number of GFAP positive cells in corpus callosum from 9-month group was significantly increased ($P < 0.05$), while the expression of MBP significantly decreased ($P < 0.05$). The number of GFAP positive cells was significantly greater and the expression level of MBP was significantly lower in 6-week group than in 9-month group ($P < 0.01$). **Conclusion** Activation of astrocytes is more significant in 6-week old mice and positively related with myelin sheath damage. It may be one of the important reasons for myelin sheath damage.

[Key words] activation of astrocyte; demyelination; age; mouse

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071084), the International Science & Technology Cooperation Program of China (2010DFB30820) and the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5157). Corresponding author: Xiao Lan, Tel: 86-23-68752230, E-mail: xiaolan35@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81071084);国际科技交流与合作专项(2010DFB30820);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC 2010BB5157)

[通信作者] 肖岚,电话:(023)68752230,E-mail:xiaolan35@hotmail.com

在中枢神经系统,少突胶质细胞形成髓鞘并包裹轴突,从而保证神经冲动能快速、准确地传导。越来越多的研究表明中枢神经系统的髓鞘脱失与许多神经及精神疾病的发生关系密切^[1],但脱髓鞘的具体机制尚未完全明确。在脱髓鞘过程中会出现星形胶质细胞的激活^[2],提示星形胶质细胞的激活可能是造成髓鞘损伤的重要因素之一,如果事实如此,那么星形胶质细胞的激活程度势必与脱髓鞘损伤程度相关联。本实验拟建立不同年龄 C57BL/6 小鼠的脱髓鞘动物模型,通过免疫组织化学染色及 Western blot 方法,观察不同脑区星形胶质细胞激活程度及髓鞘脱失情况,进而阐明星形胶质细胞激活与髓鞘脱失可能存在的内在联系,为星形胶质细胞在髓鞘损伤中的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型

6 周龄(体质量 15 ~ 17 g)及 9 月龄(体质量 28 ~ 32 g)清洁级雄性 C57BL/6 小鼠,各 16 只,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

Cuprizone 购自 Sigma 公司;抗山羊 MBP 多克隆抗体购自 Santa 公司;抗兔 GFAP 多克隆抗体购自 Bostert 公司;HRP 标记的兔抗山羊抗体、HRP 标记的山羊抗兔抗体均购自 DAKO 公司;DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司;ECL 显色试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.3 急性脱髓鞘动物模型的建立

将 6 周龄小鼠从 1 ~ 16 编号,从随机数字表上任意位置从上到下抄取 16 个数字并与前面编号小鼠一一对应,将抄取的 16 个数字从小到大排列,前 8 个数字对应小鼠设为实验组,余下的小鼠设为对照组,9 月龄小鼠采取同样方法进行随机分组。实验组:给予掺有 0.2% CPZ 的饲料饲育 6 周;对照组:给予正常饲料饲育 6 周。每 2 天测量 1 次体质量并记录,其余条件均保持相同。

1.4 动物取材及冰冻切片制备

动物用 1% 戊巴比妥钠将动物麻醉(50 mg/kg),暴露胸腔,经左心室插管进行灌注,用生理盐水冲洗血液(约 30 ml),待流出液澄清透明后,每组 3 只动物用于蛋白提取,小心剥离脑组织,于解剖显微镜下分离胼胝体(corpus callosum, CC; 约 50 mg)及前额叶皮层(cortex, CTX; 约 100 mg),用 PBS(0.01 mol/L)洗 3 次后加入适量 RIPA 裂解液和 PMSF(RIPA:1 ml/100 mg; RIPA:1%)于玻璃匀浆器匀浆,4 °C 12 000 r/min 离心 30 min 后吸取上清,测蛋白浓度(Bradford 法)后按 4:1 比例加入 5 × loading buffer 后于沸水中煮 5 min, -20 °C 保存备用。此外,每组 5 只动物用于组织切片,经生理盐水冲洗血液后,用 4% 的多聚甲醛进行灌注固定(约 20 ml),小心剥取脑组织置于 4% 多聚甲醛中浸泡过夜。30% 蔗糖溶液脱水,冰冻连续冠状切片(厚 20 μm),切片范围在 166 ~ 195 区域(<http://www.hms.harvard.edu/research/brain/>)。

1.5 快蓝染色

脑片经 0.01 mol/L PBS 充分漂洗后裱片于铬钼明胶包被的载玻片上,置于 37 °C 烤箱烤片 2 h,浸入 1:1 酒精/氯仿溶液中脱脂 24 h,入 95% 酒精脱水 5 min,在 Luxol 快蓝染液中染色 8 h(56 °C),95% 酒精洗涤多余染色,双蒸水漂洗,碳酸锂溶液分色约 30 s,70% 酒精继续分色 30 s,反复双蒸水漂洗,显微镜下观察正常对照切片,直至灰质部分与白质清晰区分,分色完全后,自来水冲洗 5 min,95% 酒精至 100% 酒精脱水 2 次(每次 5 min),二甲苯透明,中性树脂封片。

1.6 免疫组织化学染色

各组取相同层面冠状切片经 PBS 漂洗 3 次(5 min/次),入含 0.5% Triton-100 的 PBS 中室温漂洗 15 min,3% 双氧水中孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次,入含 0.5% Triton-100 的 1% BSA 液中 37 °C 孵育 1 h,一抗中(MBP,1:200; GFAP,1:200)4 °C 过夜;PBS 漂洗 5 min 3 次,HRP 标记的二抗(1:200)37 °C 孵育 1 h 后 PBS 漂洗 3 次,经 DAB 显色后 37 °C 烤片 2 h,经酒精梯度脱水、二甲苯透明后封片,显微镜下观察并照相。每只动物 3 张切片,同一层面胼胝体(CC 区)及皮层(CTX)区选取固定视野在显微镜下(100 × 或 200 ×)拍摄照片,用 Image-Plus Pro 5.0 软件计算免疫阳性光密度值及细胞计数。

1.7 Western blot 检测

每个样本取 30 μg 总蛋白,经 5% 浓缩胶及 10% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳后电转至 PVDF 膜上,15 V 半干电转 60 min,10% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入一抗(1:2 000)于 4 °C 过夜。PBST 漂洗 3 次后,加入 HRP 标记的二抗(1:2 000)室温孵育 2 h,PBST 漂洗 3 次后,ECL 试剂盒显色曝光。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,两组比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 模型建立情况

2.1.1 体质量变化 0.2% CPZ 喂养 6 周后,与同年龄对照组小鼠相比,6 周龄及 9 月龄 CPZ 小鼠均有不同程度的体质量下降,见图 1。

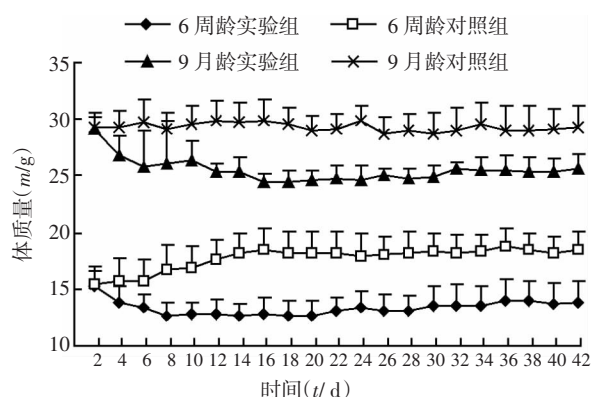


图1 模型建立期间小鼠体质量变化

2.1.2 快蓝染色结果 经 CPZ 处理 6 周后,6 周龄及 9 月龄小鼠 CC 区均出现一定程度的髓鞘脱失(图 2B、D),与同年龄对照

小鼠(图2A、C)相比,6周龄小鼠显著下降约40% ($P < 0.01$)。

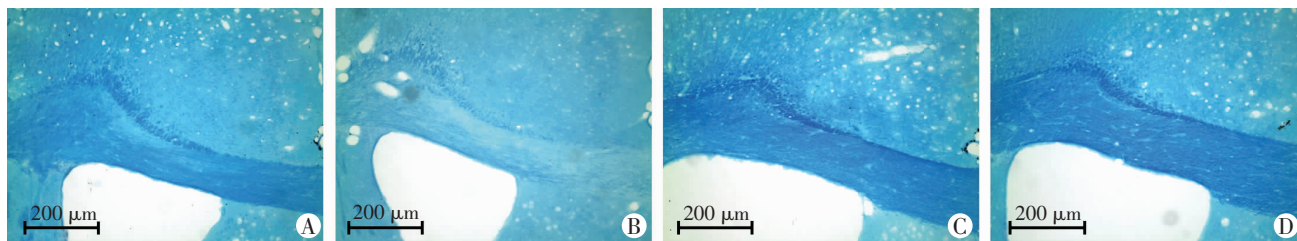
2.2 不同年龄小鼠星形胶质细胞激活观察

胶质纤维酸性蛋白(GFAP)为常用的星形胶质细胞标记物,不同年龄的C57BL/6小鼠经0.2% CPZ处理6周后,对同一层面CC及CTX区进行GFAP免疫组织化学染色及蛋白表达量测定。结果表明:青壮年(6周龄)及中老年(9月龄)小鼠CC及CTX区均有不同程度的星形胶质细胞激活,激活后星形胶质细胞体积增大,突触变粗(图3、4)。对染色结果进行统计学分析表明:相比于同年龄组CTL小鼠,青壮年小鼠激活情况更

加明显,于CC区约为对照组的4.5倍,于CTX区约为对照组的6.7倍($P < 0.01$)。Western blot检测CC及CTX区GFAP蛋白表达(图5),结果趋势同免疫组织化学染色。

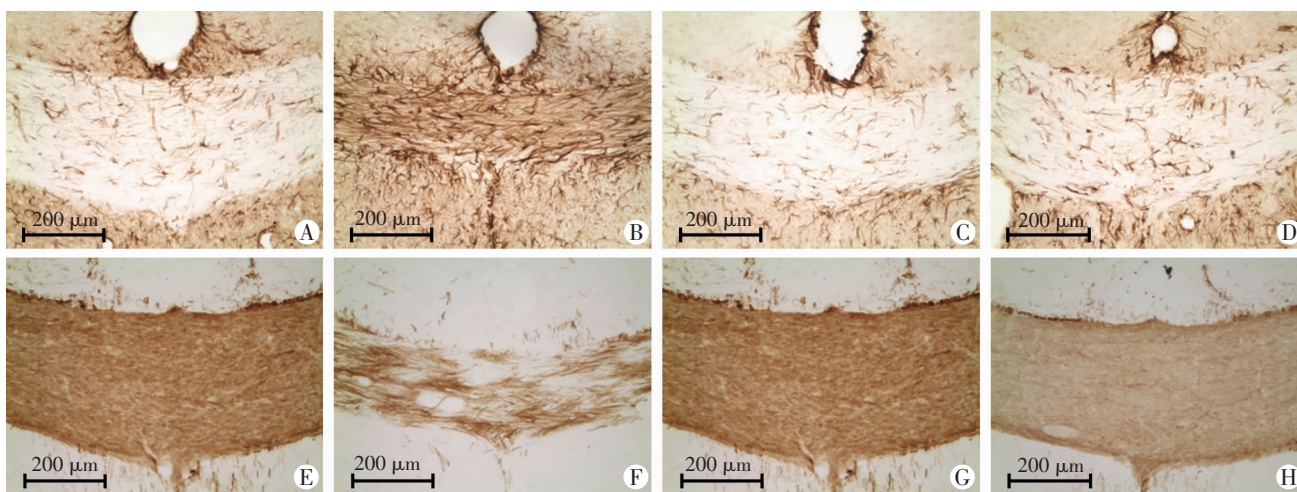
2.3 星形胶质细胞激活与脱髓鞘的关系

0.2% CPZ处理6周后,对不同年龄小鼠同一层面CC及CTX区进行MBP免疫组织化学染色及蛋白表达量测定。结果表明:青壮年(6周龄)及中老年(9月龄)C57BL/6小鼠CC区及CTX区均有不同程度的髓鞘脱失(图3、4)。对染色结果进行统计学分析表明:相比于同年龄对照组小鼠,青壮年小鼠脱髓鞘



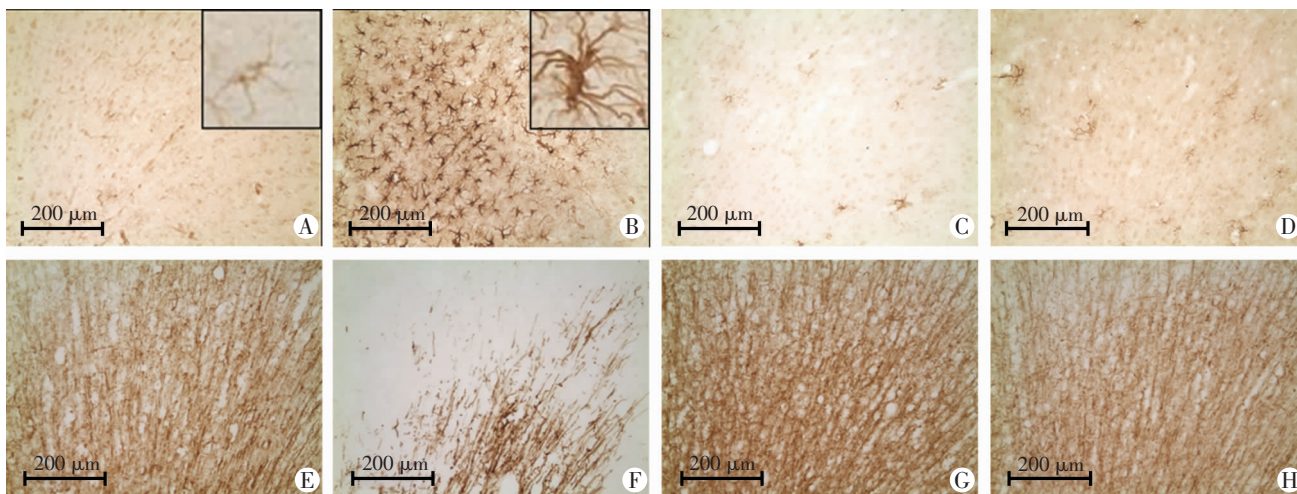
A:6周龄对照;B:6周龄实验组;C:9月龄对照组;D:9月龄实验组

图2 6周及9月龄小鼠经CPZ处理6周后快蓝染色观察



A、E:6周龄对照组;B、F:6周龄实验组;C、G:9月龄对照组;D、H:9月龄实验组;A~D:GFAP表达;E~H:MBP表达

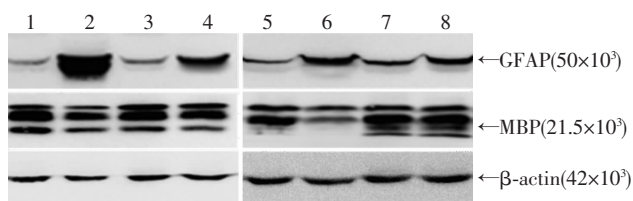
图3 0.2%CPZ处理6周后各组小鼠胼胝体区GFAP及MBP表达(S-P)



A、E:6周龄对照组;B、F:6周龄实验组;C、G:9月龄对照组;D、H:9月龄实验组;A~D:GFAP表达;E~H:MBP表达

图4 0.2%CPZ处理6周后各组小鼠皮层区GFAP及MBP表达(S-P)

更加明显(于CC区下降约37%,于CTX区下降约42%, $P < 0.01$)。Western blot检测CC及CTX区MBP蛋白表达(图5),结果同免疫组织化学染色。但是相比于脱髓鞘程度的年龄差异,星形胶质细胞激活程度的年龄差异更明显。



1:6周龄对照组CC区;2:6周龄实验组CC区;3:9月龄对照组CC区;4:9月龄实验组CC区;5:6周龄对照组CTX区;6:6周龄实验组CTX区;7:9月龄对照组CTX区;8:9月龄实验组CTX区

图5 Western blot检测胼胝体区和皮层区GFAP及MBP蛋白表达

3 讨论

双环己酮草酰二胺(CPZ)是一种铜离子螯合剂,已被广泛应用于脱髓鞘与髓鞘再生动物模型的实验研究^[3]。在C57BL/6小鼠饲料中掺入CPZ(0.2%)可以诱导大脑多个脑区高度可修复的脱髓鞘病变。经5~6周的CPZ处理之后,小鼠胼胝体区脱髓鞘作用达到最大化,这个过程称之为“急性脱髓鞘”。越来越多的研究表明:该模型可用于多发性硬化(MS)及精神分裂症等疾病的相关研究^[4]。

星形胶质细胞是中枢神经系统中一类主要的胶质细胞,其功能异常与许多疾病的发生都存在关联。Seifert等^[5-6]认为星形胶质细胞的功能障碍是导致癫痫发作的重要因素,肝性脑病的发生也与星形胶质细胞氨代谢及氧化应激等功能异常相关^[7],有研究表明星形胶质细胞可能成为帕金森病新的治疗靶点^[8]。同时人们也观察到:在髓鞘脱失过程中会伴有星形胶质细胞的激活^[3,9]。研究发现不同年龄小鼠对于CPZ的敏感性不同,老年小鼠需通过较高浓度的药物处理才能达到与青壮年小鼠相当的髓鞘脱失效果^[10]。因此,我们通过建立不同年龄小鼠脱髓鞘动物模型来观察星形胶质细胞激活与髓鞘脱失是否存在内在联系。

本研究通过观察建模期间小鼠体质量变化发现:CPZ小鼠会出现不同程度的体质量下降(图1),这与之前的报道^[11]一致。快蓝染色表明:模型小鼠CC区均出现不同程度的髓鞘脱失。以上结果证实:本实验成功建立CPZ介导的急性脱髓鞘动物模型。模型建立成功后,我们通过免疫组织化学染色及Western blot观察不同年龄小鼠星形胶质细胞激活与髓鞘脱失的联系,结果显示:在CC及CTX脑区,相对于中老年小鼠(9月龄),青壮年小鼠(6周龄)星形胶质细胞激活更

加明显($P < 0.01$),同时相应脑区的髓鞘损伤也更加明显($P < 0.01$),星形胶质细胞激活与髓鞘损伤表现为一定程度的正相关性。然而星形胶质细胞的激活与髓鞘的损伤是否只是两个单独的过程呢?近期有报道称:星形胶质细胞活化后可分泌过量的神经酰胺、白介素-15(IL-15)、TNF等可以促进少突胶质细胞凋亡^[12-14],星形胶质细胞的损伤同样可以导致髓鞘脱失^[15-16]。Saijo等^[17]在关于帕金森病的研究中发现,星形胶质细胞可以通过孤儿受体Nurr1放大由小胶质细胞介导的炎症反应,而作为CNS中巨噬细胞系统来源的小胶质细胞的活化被认为参与了髓鞘脱失的病理过程。结合本实验结论进一步提示:星形胶质细胞可能参与中枢神经系统髓鞘脱失的病理过程,并于其中起到重要作用,但星形胶质细胞的活化是否会直接导致脱髓鞘,以及具体通过何种途径损伤髓鞘还需更加深入的研究。

此外,我们还发现,星形胶质细胞激活程度的年龄差异较脱髓鞘程度的年龄差异更明显,星形胶质细胞的激活与髓鞘的损伤并没有呈现纯粹的线性关系。可能的原因:髓鞘损伤过程还受到其他因素的影响,活化后的星形胶质细胞除影响髓鞘损伤外,还参与其他的反应过程。

综上所述,星形胶质细胞的过度活化可能参与了脱髓鞘的病理过程,通过抑制星形胶质细胞的过度活化,从而保护髓鞘受到损伤可能成为相关疾病预防及治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Takahashi N, Sakurai T, Davis K L, et al. Linking oligodendrocyte and myelin dysfunction to neurocircuitry abnormalities in schizophrenia [J]. Prog Neurobiol, 2011, 93(1): 13-24.
- [2] Pott F, Gingele S, Clarner T, et al. Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia [J]. Brain Res, 2009, 1305: 137-149.
- [3] Steelman A J, Thompson J P, Li J. Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication [J]. Neurosci Res, 2012, 72(1): 32-42.
- [4] Kipp M, Clarner T, Dang J, et al. The cuprizone animal model: new insights into an old story [J]. Acta Neuropathol, 2009, 118(6): 723-736.
- [5] Seifert G, Carmignoto G, Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in epilepsy [J]. Brain Res Rev, 2010, 63(1/2): 212-221.
- [6] Seifert G and Steinhauser C. Neuron-astrocyte signaling and epilepsy [J]. Exp Neurol, 2011, [Epub ahead of print]
- [7] Haussinger D, Schliess F. Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy [J]. Neurochem Int, 2005, 47(1/2): 64-70.
- [8] 李森, 赵咏梅. 星形胶质细胞在帕金森病治疗中的新进展 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011, 20(4): 378-380.

- [9] Hiremath M M, Saito Y, Knapp G W, *et al.* Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice[J]. *J Neuroimmunol*, 1998, 92(1/2): 38-49.
- [10] Irvine K A, Blakemore W F. Age increases axon loss associated with primary demyelination in cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice[J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 175(1/2): 69-76.
- [11] Yang H J, Wang H, Zhang Y, *et al.* Region-specific susceptibilities to cuprizone-induced lesions in the mouse forebrain: Implications for the pathophysiology of schizophrenia[J]. *Brain Res*, 2009, 1270: 121-130.
- [12] Kim S, Steelman A J, Zhang Y, *et al.* Aberrant upregulation of astroglial ceramide potentiates oligodendrocyte injury[J]. *Brain Pathol*, 2012, 22(1): 41-57.
- [13] Saikali P, Antel J P, Pittet C L, *et al.* Contribution of astrocyte-derived IL-15 to CD8 T cell effector functions in multiple sclerosis[J]. *J Immunol*, 2010, 185(10): 5693-5703.
- [14] Su Z, Yuan Y, Chen J, *et al.* Reactive astrocytes inhibit the survival and differentiation of oligodendrocyte precursor cells by secreted TNF-alpha[J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(6): 1089-1100.
- [15] Marignier R, Nicolle A, Watrin C, *et al.* Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G *via* astrocyte injury[J]. *Brain*, 2010, 133(9): 2578-2591.
- [16] Sharma R, Fischer M T, Bauer J, *et al.* Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 120(2): 223-236.
- [17] Saijo K, Winner B, Carson C T, *et al.* A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death[J]. *Cell*, 2009, 137(1): 47-59.
- (收稿:2011-12-14;修回:2012-01-10)
(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)08-0700-01

冠状动脉 CT 血管成像诊断左冠状动脉主干-肺动脉瘘 1 例

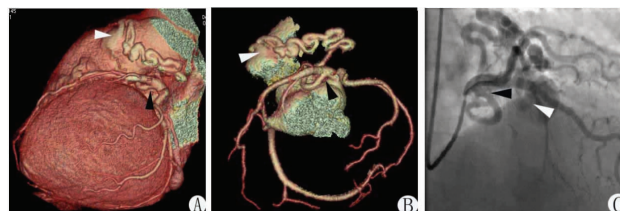
张磊,杨柳青,文利 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院放射科)

[关键词] 冠状动脉瘘;冠状动脉-肺动脉瘘;CTA
[中图分类号] R814.42 [文献标志码] B

左冠状动脉主干-肺动脉瘘是一种罕见的冠状动脉畸形,因其临床表现多样,易误诊、漏诊。本院心血管内科近期收治 1 例,现分析其冠状动脉 CT 血管造影表现如下。

1 临床资料

患者,女性,59 岁,上楼时心悸、气促,伴有夜间阵发性呼吸困难 6 月余,自服药物治疗,症状无明显缓解,近来因上述症状加重 1 周入我院治疗。既往高血压病史 1 年。外院冠状动脉 CTA 检查提示:“冠状动脉-肺动脉瘘可能”。入院查体:BP 156/84 mmHg,HR 68 次/min,律齐,胸骨左缘 2~3 肋间闻及 IIY6s1vl 粗糙的吹风样连续性杂音,舒张期更响亮。我院相关检查:心电图提示非特异性的 S T 段和 T 波改变。冠状动脉 CTA 检查:心脏及冠状动脉 VR(图 1A、B)清晰显示自左冠状动脉主干远端发出一支迂曲血管,紧贴肺动脉起始端左侧壁走行,最后注入肺动脉起始端右前部,左冠状动脉前降支、回旋支及右冠状动脉走行正常,未见明显钙化及狭窄征象,提示左冠状动脉-肺动脉瘘。冠状动脉造影(图 1C)见左冠状动脉主干远端大量团状造影剂流至肺动脉根部。该患者最终诊断为左冠状动脉主干-肺动脉瘘。入院期间给予降压、抗凝、扩冠、强化降脂等治疗后,患者症状缓解后出院。



A、B:心脏及冠状动脉 VR 示冠状动脉起始部(黑箭)及终止端(白箭);C:DSA 示左冠状动脉主干发出(黑箭)一迂曲走形血管注入肺动脉起始端(白箭)

图 1 左冠状动脉-肺动脉瘘患者冠状动脉 CTA 及 DSA 表现

2 讨论

冠状动脉瘘(coronary artery fistula, CAF)是指左右冠状动脉主干或分支与心脏或大血管之间存在的异常通道,占冠状动脉畸形(congenital coronary anomalies, CCA)的 13%^[1]。CAF 包括冠状动脉-血管瘘及冠状动脉-心腔瘘。其中冠状动脉-肺动脉瘘约占 CAF 的 17%,起源于左冠状动脉主干者尤为罕见。冠状动脉-肺动脉瘘多属先天性发育畸形,是胚胎时期心肌组织间上皮细胞构成的窦间间隙持续存在,部分伴有其他先天性畸形,少数患者因后天外伤、感染或手术等原因所致。CAF 临床表现多样,严重者可伴发心力衰竭、心肌梗死、感染性心内膜炎,甚至猝死。部分患者因为心脏杂音、心包积液、心脏扩大、进行性呼吸困难等原因就诊,相当部分的 CAF 在心脏外科手术或经冠脉造影、心脏超声检查时意外发现^[2-3]。

[通信作者] 文利, E-mail: cqzdw@163.com