论著

文章编号:1000-5404(2007)15-1482-03

实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠大脑 Olig 基因表达的变化规律

余洪俊[1],费 军[2],刘宏亮[1],汪 琴[1],姚忠祥[3] (第三军医大学:[1]西南医院康复科,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所全军战创伤中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042,[3]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,重庆 400038)

提 要:目的 研究实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis,EAE)大鼠大脑 Olig1,Olig2 和 Nkx2.2 基因的表达规律。**方法** 采用注射豚鼠脊髓匀浆的方法制作 Wistar 大鼠 EAE 模型。实时 RT-PCR 检测基因表达的相对值。**结果** 正常大鼠大脑 Olig1,Olig2 和 Nkx2.2 都低水平表达。EAE 大鼠症状发作后第 6 天,其表达水平达最高峰,与正常组比较,相差显著($P<0.05$)。三者的变化规律一致。**结论** Olig 基因表达量的增高程度可能是 EAE 大鼠髓鞘修复不完全的因素之一。

关键词: 实验性态反应性脑脊髓炎;Olig1;Olig2;Nkx2.2

中图法分类号: R-332; R394.3; R744.3 **文献标识码:** A

Olig expression in rats of experimental allergic encephalomyelitis

YU Hong-jun[1], FEI Jun[2], LIU Hong-liang[1], WANG Qin[1], YAO Zhong-xiang[3] ([1]Rehabilitation Department, Southwest Hospital, Chongqing 400038, [2]Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [3]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the experessions of Olig1, Olig2 and Nkx2.2 in th brain tissues of rats of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). **Methods** The Wistar rats were immunized with guinea pig's homogenated spinal cord mixed with CFA. The expressions of the three genes were detected by real-time PCR. **Results** In normal rats, Olig1, Olig2 and Nkx2.2 expressed in low level. On day 6 after onset of the symptoms of EAE, the experessions of Olig1, Olig2 and Nkx2.2 reached the peak value, with significant difference with those of normal rats ($P<0.05$). **Conclusion** The increasing extent of Olig1, Olig2 and Nkx2.2 is related to incomplete remyelination in EAE.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis; Olig1; Olig2; Nkx2.2

Olig 基因包括 Olig1、Olig2 和 Olig3 基因,Nkx2.2 是 Olig2 的同源结构域。其中,Olig1、Olig2 和 Nkx2.2 是与神经系统发育密切相关,且有决定性作用的基因[1]。已有的研究表明,局灶性脱髓鞘病变大鼠模型中,在造模后的第 6 天,造病变部位组织的 Olig1、Olig2 和 Nkx2.2 的表达水平达最高峰。在造模后的 3 周,脱髓鞘组织的髓鞘再生已经完全。采用老年大鼠进行相同实验,造模后老年大鼠的 Olig 基因表达水平无明显升高,也没有高峰期。即使在造模后 6 周,脱髓鞘部位的髓鞘再生不明显。但是在造模后即给予老年大鼠药物干预,Olig 基因的表达水平明显升高,3 周后髓鞘再生完全。据此认为,Olig 基因表达上调是脱髓鞘后髓鞘自发修复的重要原因之一[2,3]。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30572364)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30572364)

作者简介: 余洪俊(1974-),女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事神经再生方面的研究。电话:(023)68765361,E-mail:yuhongjundoctor@sohu.com

通讯作者: 姚忠祥,电话:(023)68752229,E-mail: yaozhx@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2006-08-31;**修回日期:** 2007-03-30

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种在青少年时期发病的中枢神经系统(CNS)脱髓鞘疾病。病理变化主要有脊髓、脑干、小脑与大脑白质中多发性脱髓鞘病灶。此病目前无有效的治疗方法。而 MS 死亡患者尸检发现,散在的脱髓鞘病变部位有自发性髓鞘再生存在,但是这种自发性髓鞘再生的程度不完全[4]。实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis,EAE)是目前公认的作为研究 MS 的动物模型。本研究中,我们主要研究在成年雄性 EAE 大鼠模型症状发作后,Olig 基因(Olig1,Olig2 和 Nkx2.2)的表达变化规律。观察 Olig1、Olig2 和 Nkx2.2 基因的表达是否上调? 以及上调的程度。该研究是课题组关于孕酮干预治疗 MS,促进髓鞘再生研究的基础内容之一。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用 6~8 周龄的雄性 Wistar 大鼠 18 只,体质量 100~200 g。均来自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。大鼠分为 6 组,每组 3 只。豚鼠 3

只，体质量 400 g 左右，周龄、雌雄不限，购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2　大鼠脑组织取材　　分别在发病后第 2、6、10、15、25 天取材，每组每次各取 3 只。正常组在购回大鼠后立即取材。取材部位：大鼠全脑经中线分为两份对等的大脑半球。取右侧大脑半球前 2/5 部分约 100 mg 脑组织（包括白质和灰质）。

1.1.3　主要仪器和试剂　　real time PCR 仪（Rotor 3000），离心机（eppendorf certrifuge 5810R）。TaKaRa RNAiso Reagent 试剂盒，TaKaRa SYBR ExScript RT-PCR 试剂盒（Code No：DDR053A），Biospin 胶回收试剂盒（BioFlux ，code：BSC02M1）。氯仿（重庆化学试剂厂），异丙醇（重庆化学试剂厂），焦碳酸二乙酯（DEPC，Sigma），百日咳疫苗（北京生物制品研究所），完全福氏佐剂（CFA，Sigma）。

1.1.4　引物序列　　PCR 引物由大连宝生物制品有限公司设计合成。Olig1 上游引物：5′-GAAAGCCCAGGCCACGAGTA-3′，下游引物：5′-AGAACTGTCAGGCCAGCCAGA-3′，扩增产物 154 bp。Olig2 上游引物：5′-TCAAGTCATCTTCCTCCAGCAC-3′，下游引物：5′-GGCTCAGTCATCTGCTTCTTATCTT-3′，扩增产物 88 bp。Nkx2.2 上游引物：5′-CTTGGTTCAGTTCCTTCATATTGG-3′，下游引物：5′-TTGGGTCTCTCTCTCTCTTTGTTTT-3′，扩增产物 137 bp。内参照物 β-actin 上游引物 5′-GAGGGAAATCGTGCGTGA C-3′，下游引物 5′- CTGGAAGGTGGACAGTGA G-3′，扩增产物 445 bp。

1.2　方法

1.2.1　EAE 动物模型制备　　用新鲜的豚鼠脊髓制成匀浆加上等体积的完全福氏佐剂（CFA），充分乳化后按 0.5 ml/只予大鼠足垫内及背部皮下注射。同时后足足背皮内注射百日咳疫苗 0.1 ml（含百日咳杆菌 1×10^{11} 个）。

豚鼠脊髓匀浆的制作方法：取体质量 400 g 左右的豚鼠，用过量的 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉豚鼠致死。立即在冰上取全段脊髓去除脊膜称质量，按 1 g 豚鼠脊髓加 1 ml 预冷的生理盐水的比例，在冰浴中用电动匀浆机（3 000 r/min）匀浆 3 min（每匀浆 1 min，间隔 1 min），制成豚鼠脊髓匀浆（GPSCH）。将等量的 GPSCH 和 CFA 混合，以无菌注射器在冰上抽打，直至成为油包水乳剂，此即为免疫抗原。4 ℃保存，12 h 用完[5]。

神经功能评分：免疫当日及免疫后每日，每只大鼠定时进行称质量和神经功能评分。EAE 动物均不同程度存在毛色发暗，体质量减轻。神经功能评分标准：0 分：无神经症状；1 分：尾部无力，拖地；2 分：后肢轻度无力，但肌力可达 3 级以上；3 分：后肢无力明显，肌力低于 3 级；4 分：后肢瘫痪；5 分：濒死状态或死亡。3～5 分常伴有大小便失禁。以评分大于/等于 1 分为 EAE 模型制作成功[6]。

将取材后剩余大鼠脑组织经福尔马林固定后进行锇酸染色，光镜下检查是否有脱髓鞘病变。阳性者说明 EAE 模型制作成功。

1.2.2　大鼠脑组织总 RNA 提取　　采用 RNAiso Reagent 试剂盒（TaKaRa，code：D312）提取总 RNA。所用器械均去除 RNA 酶处理，所有操作均在冰上进行。操作步骤按说明书进行。以电泳和波长 260nm 光谱吸收情况来判定提取的 RNA 的质量和浓度。

1.2.3　实时 RT-PCR　　采用 TaKaRa SYBR ExScript RT-PCR Kit（Code No：DRR053A），cDNA 合成：采用 10 μl 反应体系，含 5×ExScript Buffer 2 μl，dNTP Mixture 0.5 μl，Oligo dT Primer 0.5 μl，ExScript RTase 0.25 μl，RNase inhibitor 0.25 μl，总 RNA 5 μl，RNase Free dH_2O 2.5 μl。反转录反应条件：42 ℃（15 min），95 ℃（2 min）。PCR 反应：采用 20 μl 反应体系，含 2×SYBER Premix Ex *Taq* 10 μl，10 μmol/L PCR Forward Primix 0.4 μl，10 μmol/L PCR Reverse Primix 0.4 μl，模板 cDNA 溶液 2.0 μl，灭菌 dH_2O 7.2 μl。反应条件：95 ℃ 10 s 预变性，95 ℃ 5 s、60 ℃ 20 s 40 次循环扩增。扩增产物回收，制作标准曲线。试验采用相对定量的方法。

1.2.4　cDNA 扩增产物回收　　采用 Biospin 胶回收试剂盒（BioFlux ，code：BSC02M1）。操作方法按说明书进行。

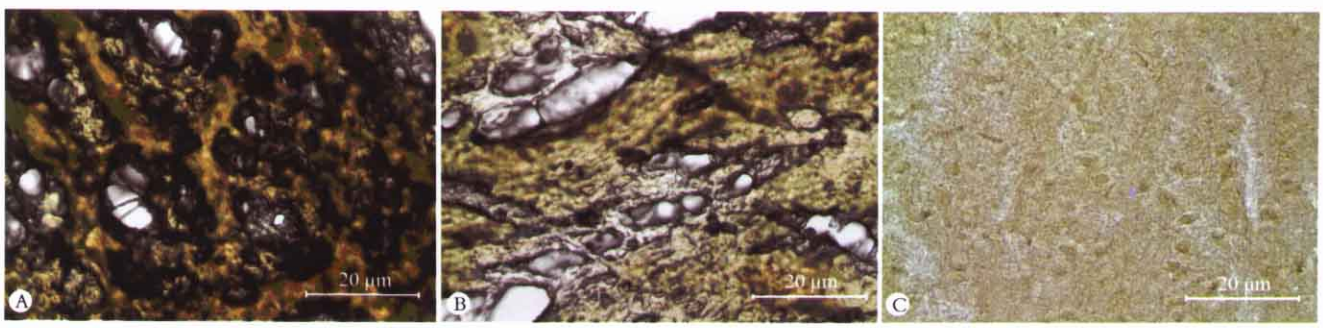
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件，进行 t 检验。

2　结果

2.1　EAE 模型大鼠运动功能评分和髓鞘染色结果

所有进行豚鼠脊髓匀浆免疫的大鼠均存在体质量下降，食欲降低的症状。在免疫后 12～14 d，神经功能评分均大于或等于 2 分，Marchi 锇酸髓鞘染色后均见不同程度的脱髓鞘病变（图 1）。说明大鼠均开始发病，EAE 模型制作成功，大鼠可以用于实验。在造模成功后 25 d，仍然可见大鼠大脑有大量脱髓鞘病变。



A：EAE 模型大鼠症状发作后第 6 天，见大量脱髓鞘病灶；B：EAE 模型大鼠症状发作后第 25 天，仍然可见大量脱髓鞘病灶；C：正常大鼠；图片中黑色部分为脱髓鞘病灶

图 1　大鼠大脑髓鞘染色光镜观察　（Marchi 锇酸髓鞘染色 ×400）

2.2　实时 RT-PCR 检测 Olig1，Olig2 和 Nkx2.2 的 RNA 相对表达量的结果

正常大鼠大脑 Olig1，Olig2 和 Nkx2.2 都低水平表达。EAE 大鼠症状发作后第 6 天，其表达水平达最高峰，与正常组比较，相差显著（$P<0.05$）。但是在发病后第 2 天、第 10、15 天和第 25 天，正常大鼠与 EAE 模型大鼠大脑 Olig1，Olig2 和 Nkx2.2 的

表达量无明显差别($P>0.05$)。在 EAE 模型大鼠大脑,Olig1、Olig2 和 Nkx2.2 三者的变化规律一致(表 1)。

表 1 正常大鼠与 EAE 大鼠发病后不同时间点 Olig 基因的表达量

组别	Olig1	Olig2	Nkx2.2
正常组	12.7±9.0	78.2±47.5	478.9±228.1
EAE 组			
第 2 天	1.0±1.0	147.5±87.2	3 069.3±2 815.3
第 6 天	121.0±63.0[a]	173.2±55.3[b]	7 010.6±1 345.3[b]
第 10 天	5.8±5.0	62.3±20.3	3 546.4±1 591.7
第 15 天	3.4±1.9	12.4±10.7	348.4±291.7
第 25 天	49.7±45.5	23.8±22.8	5 037.4±3 876.8

a: $P<0.01$,与正常组比较;b: $P<0.05$,与正常组比较

3 讨论

3.1 Olig 基因在少突胶质细胞系发育中的作用

Olig1 和 Olig2 基因是少突胶质细胞(oligodendrocyte,OL)谱系基因,在 2000 年被确定。在神经系统发育过程中,Olig 基因是少突胶质细胞细胞系最早的标记,是与少突胶质细胞前体细胞(oligodendrocyte precursor cells,OPCs)的分化密切相关的重要基因,限定了分化成 OL 的前体细胞的总数,可能决定了胚胎脊髓神经干细胞的命运:分化成神经细胞或者是 OL[1]。它们在发育中和成年者的 CNS 少突胶质细胞系特异性表达,而在星形胶质细胞、雪旺细胞和其他外周神经系统的胶质细胞中不表达[7]。Olig1 和 Olig2 主要与少突胶质细胞系的分化和 CNS 髓鞘形成有关。在运动神经元发生过程中,Olig1 不能测得,但是当 OL 细胞系进行分化,Olig1 的表达明显升高。有观点认为,Olig2 和 Nkx2.2 在同一细胞内表达增加是 OPs 分化为 OL 的必要条件[8],且只有 PDGF-Rα+/Olig1+/Olig2+/Nkx2.2+的 Ops 才能分化成 OL[2,3]。

3.2 Olig 基因与 EAE 的关系

髓鞘再生是机体对脱髓鞘病变的自我修复过程,OPCs 是参与 CNS 髓鞘修复的主要细胞。目前认为髓鞘再生与两方面因素有关:①OPCs 在损伤区域的募集;②募集的 OPCs 分化成 OL。在正常白质,OPCs 的数量保持稳定,处于休眠期。当 OL 减少或者出现脱髓鞘的情况时,OPCs 发生应答,开始增殖、移行,最终分化成 OL 形成髓鞘,修复损伤[4]。EAE 是研究多发性硬化的动物模型。多发性硬化是典型的脱髓鞘疾病,症状阶梯式恶化的主要原因在于每次发病后髓鞘修复不完全。在多发性硬化患者脱髓鞘性胶质硬化斑中可见 OPCs 的募集减少[4],或者有大量 OPCs 集聚,但是未分化成 OL[9]。

EAE 模型造模成功,大鼠大脑发生脱髓鞘病变,Olig1、Olig2 和 Nkx2.2RNA 的表达水平上调,表达高峰出现在模型大鼠发病后的第 6 天。高峰期出现时间和变化的规律与局部药物注射药物所致的脱髓鞘病变的检测结果一致,说明 EAE 模型大鼠已经开始针对脱髓鞘病变进行髓鞘自发修复。自发修复的启动可能不是 MS 髓鞘再生不完全的原因,是髓鞘再生过程中的其他一些因素导致了髓鞘再生不完全。实验中我们采用的是实时 RT-PCR 的方法检测 Olig 基因的 RNA,模型组与正常组之间最大差别分别为 10、2、15 倍。而文献报道,成年大鼠实验组采用免疫组化的方法检测细胞内 Olig 蛋白的表达,实验组与正常组之间的差别在 350~400 倍,在造模后 3 周,髓鞘完全再生。老年大鼠实验组与正常组之间的差别在 150~200 倍,及即使在造模后 6 周,髓鞘再生也不完全[2,3]。而本实验中,模型组与正常组之间 Olig 基因表达量的差别更小,在 EAE 大鼠症状发作后 25 d,仍然可见明显的脱髓鞘病变(图 1B)。在第 10、15 天,脱髓鞘病变也很明显(图未列出)。我们无法比较两种模型之间 Olig 基因 RNA 和蛋白表达量的差异,但是模型组和正常组之间表达量的差别可能与髓鞘再生是否完全有密切关系。

参考文献:

[1] Zhou Q, Wang S, Anderson D J. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors [J]. Neuron, 2000, 25(2): 331-343.

[2] Fancy S P, Zhao C, Franklin R J. Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS[J]. Mol Cell Neurosci, 2004, 27(3): 247-254.

[3] Ibanez C, Shields S A, El-Etr M, *et al*. Systemic progesterone administration results in a partial reversal of the age-associated decline in CNS remyelination following toxin-induced demyelination in male rats [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2004, 30(1): 80-89.

[4] Wolswijk G. Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells[J]. J Neurosci, 1998, 18(2): 601-609.

[5] 董 梅,刘瑞春,郭 力,等. Wister 大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎的模型建立[J]. 脑与神经疾病杂志, 2004, 12(6): 425-428.

[6] Legge K L, Min B, Bell J J, *et al*. Coupling of peripheral tolerance to endogenous interleukin 10 promotes effective modulation of myelin-activated T cells and ameliorates experimental allergic encephalomyelitis [J]. J Exp Med, 2000, 191(12): 2039-2052.

[7] Wegner M. Expression of transcription factors during oligodendroglial development[J]. Microsc Res Tech, 2001, 52(6): 746-752.

[8] Zhao C, Fancy S P, Kotter M R, *et al*. Mechanisms of CNS remyelination--the key to therapeutic advances[J]. J Neurol Sci, 2005, 233(1-2): 87-91.

[9] Chang A, Tourtellotte W W, Rudick R, *et al*. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis[J]. N Engl J Med, 2002, 346(3): 165-173.

(编辑 王 红)