论著

文章编号:1000-5404(2008)05-0386-04

脱髓鞘病变中轴突损伤的实验研究

王顺和 (重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨多发性硬化等脱髓鞘疾病中轴突的损伤以及轴突损伤出现的时间、形态特征。方法 用MOG_{35-55}蛋白多肽免疫C57BL/6J小鼠复制多发性硬化的动物模型,结合常规形态学染色和神经系统特殊染色,在疾病发作前期、疾病发作期、高峰期和慢性期不同时间点观察炎症反应、髓鞘脱失和轴突的变化。结果 髓鞘的脱失和轴突的损伤出现在疾病的发作前期,并且这种改变与炎症细胞浸润及髓鞘脱失有密切的关系。损伤的轴突在形态上表现为不规则、肿胀、直径不一致、扭曲;轴突断裂,在断端呈球状、卵圆形或橄榄状;另一种突出的变化是轴突消失。结论 脱髓鞘病变中轴突的损伤是一种早期的和普遍的病变,且轴突的损伤与多种因素有关。

关键词:实验性变态反应性脑脊髓炎;多发性硬化;脱髓鞘病变;轴突损伤
中图法分类号:R-33;R741.02;R744.5 文献标识码:A

Axonal damage of demyelination disease in mice

WANG Shun-he (Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the axonal damages in demyelination disease and its time window and morphological features of damaged axons. Methods Mouse model of multiple sclerosis (MS) was prepared by immunizing C57BL/6J mice with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides$_{35-55}$ (MOG_{35-55}) to induce experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Inflammation, demyelination and axonal damage at different time points of EAE including preonset, onset, peak and chronic were observed by common histology and specific stainings for the central nervous system. Results Demyelination and axonal damage occurred at the early stage of EAE, and was strongly related to inflammatory cell infiltration and demyelination of the central nervous system. Damaged axons showed the typical morphological features, including axon distortion, swelling, irregular diameter, axon transection with the ends ovoid, or bulb, and even axon disappearance. Conclusion Axonal damage is an early and common event in demyelination disease, and many factors might contribute to axonal damage.

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis; multiple sclerosis; demyelination; axonal damage

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种炎症性脱髓鞘变性疾病,由自身反应性淋巴细胞和炎症性淋巴因子攻击中枢神经系统引起中枢神经炎症细胞浸润、髓鞘脱失和轴突损伤,进而导致多种神经功能障碍,如肢体无力、麻痹、瘫痪、视觉障碍、感觉异常、内脏神经功能障碍等[1]。全世界大约有250万多发性硬化患者,发病年龄大多为青中年女性,男女性别比为1:(2~3),其中80%的患者为缓解-复发型[2]。

传统的观点认为,多发性硬化的病变特征是中枢神经系统的白质炎症细胞浸润、髓鞘脱失、胶质细胞增生,形成胶质瘢痕,导致硬化,而轴突相对不受影响。但是,最近的研究表明:在多发性硬化病变及其动物模型实验性变态反应性脑脊髓炎中,轴突的损伤也是一种重要的病变,并且这种不断聚集的轴突损伤和轴突的脱失是导致不可逆性神经功能障碍的主要原因[3]。临床对多发性硬化往往采用免疫抑制剂和激素治疗,但是治疗效果不理想,这或许与脱髓鞘病变中轴突的损伤有关系。因此,近年来提倡对多发性硬化采用免疫调节、抗炎症及神经保护的综合治疗[4,5]。

目前,国内关于脱髓鞘病变中轴突损伤的研究较少,尤其关于轴突损伤出现的时间、损伤轴突的组织形态学表现就更少。因此,本研究用C57BL/6J小鼠复制多发性硬化的动物模型,研究轴突损伤出现的时间窗,轴突损伤与炎症细胞浸润、髓鞘脱失的关系以及损伤轴突的组织形态学特征。

作者简介:王顺和,男,重庆市潼南县人,硕士,副教授,主要从事中枢神经脱髓鞘样疾病及神经再生方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68485789,E-mail:wangshunhe120@yahoo.com

收稿日期:2007-09-03;修回日期:2007-11-19

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

雌性 C57BL/6J 小鼠，10～12 周龄，体质量为 20 g 左右，饲养在 PC2 级实验动物中心。动物自动进食和自动饮水。所有操作过程按照有关实验动物使用管理条例进行。共 32 只小鼠分为对照组 12 只和实验组 20 只。

1.2　实验性变态反应性脑脊髓炎（experimental autoimmune encephalomyelitis，EAE）模型的建立

每只实验组动物采用皮下注射 200 μg MOG_{35-55}（Auspep，Melbourne）合成多肽，混合在完全福氏佐剂（CFA；Difco，Detroit，MI）中，其中含 4 mg/ml 灭活卡介苗。注射的当天和注射后48 h，分别由尾静脉注射 300 ng 百日咳毒素（List biol labs，Campbell，USA），用 pH 值为 7.4 的 PBS 稀释。对照组只注射 PBS。

1.3　动物一般情况观察

免疫动物后，每天观察实验动物的发病情况。根据以下的临床症状标准进行评分：0 分：无临床症状；1 分：尾部无力；2 分：后肢无力；3 分：后肢瘫痪；4 分：后肢瘫痪，并有前肢无力或瘫痪；5 分：临死状态。分别在①发病前期，约免疫后 7 d；②发病初期，一般在免疫后 12～14 d（临床评分为 1 分）；③发病高峰期，一般在免疫后 18～20 d（临床评分为 3～4 分）；④慢性期，一般在免疫后 30 d（临床评分为 3～5 分）。用过量 CO_2 处死小鼠，解剖取出脑、小脑和脊髓做进一步实验。

1.4　组织病理学检查

解剖取出小鼠的脑、小脑和脊髓，固定在 10% 的中性福尔马林中。石蜡包埋，5 μm 厚连续切片。常规 HE 染色，观察中枢神经系统的炎症细胞浸润情况并评分：0 分：无炎症细胞浸润；1 分：炎症细胞仅浸润在脑表面，即蛛网膜下腔内；2 分：轻度炎症细胞脑实质浸润；3 分：中度炎症细胞脑实质浸润；4 分：重度和弥漫性脑实质见炎症细胞浸润。

1.5　神经组织特殊染色及观察

1.5.1　Luxol Fast Blue-HE 髓鞘染色　　5 μm 厚石蜡切片，常规脱蜡、水化，入 0.1% Luxol Fast Blue 溶液，60 ℃烤箱，2 h，室温冷却 15 min，用 70% 乙醇洗去多余的染液，切片入 4% 饱和碳酸锂分化至神经白质与灰质分界清楚。切片再进行常规 HE 染色，脱水、透明、封片。根据以下标准评分：0 分：无髓鞘脱失；1 分：轻度髓鞘脱失；2 分：中度髓鞘脱失；3 分：重度髓鞘脱失。

1.5.2　Bielschowsky 轴突银染色　　5 μm 厚石蜡切片，常规脱蜡至双蒸水，入预热的 20% 硝酸银（Nitric Silver）溶液中 37 ℃烤箱，避光，染色 15 min。切片入双蒸水中洗 10 min，同时于 20% 硝酸银中加入浓氨水溶液，制成氨银溶液，将切片转移至该溶液中，37 ℃烤箱，避光，10 min。然后加入 7～8 滴发展液，显色 30 min 左右。加入 5% 硫代硫酸钠（Sodium Thiosulfate），室温，5 min。常规脱水透明、封片。根据脊髓轴突损伤的面积对轴突损伤评分，0 分：正常；1 分：损伤小于 25%；2 分：损伤面积占 25%～50%；3 分：损伤面积占 50%～75%；4 分：损伤面积大于 75%。

2　结果

2.1　EAE 模型的临床过程

实验组动物全部发病。如图 1 所示，最早出现尾部无力的时间是在免疫后第 10 天，以后发病的动物逐渐增多、症状逐渐加重，第 15 天全部动物发病。在免疫后第 20 天，动物的临床症状达到高峰期，平均临床评分为 3.8。从第 23 天后，动物的临床症状有所缓解，但维持在较高的水平。平均临床评分为 3.4。对照组动物无一发病。

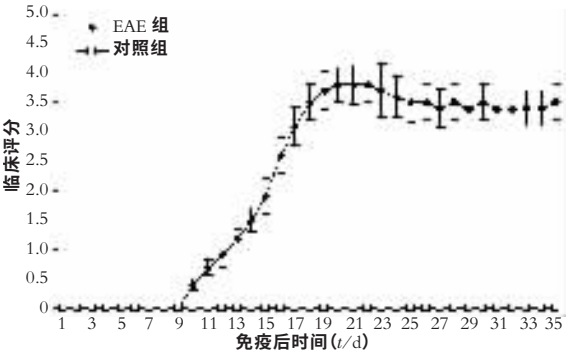


图 1　EAE 组及对照组临床经过及评分

2.2　EAE 组织形态学改变

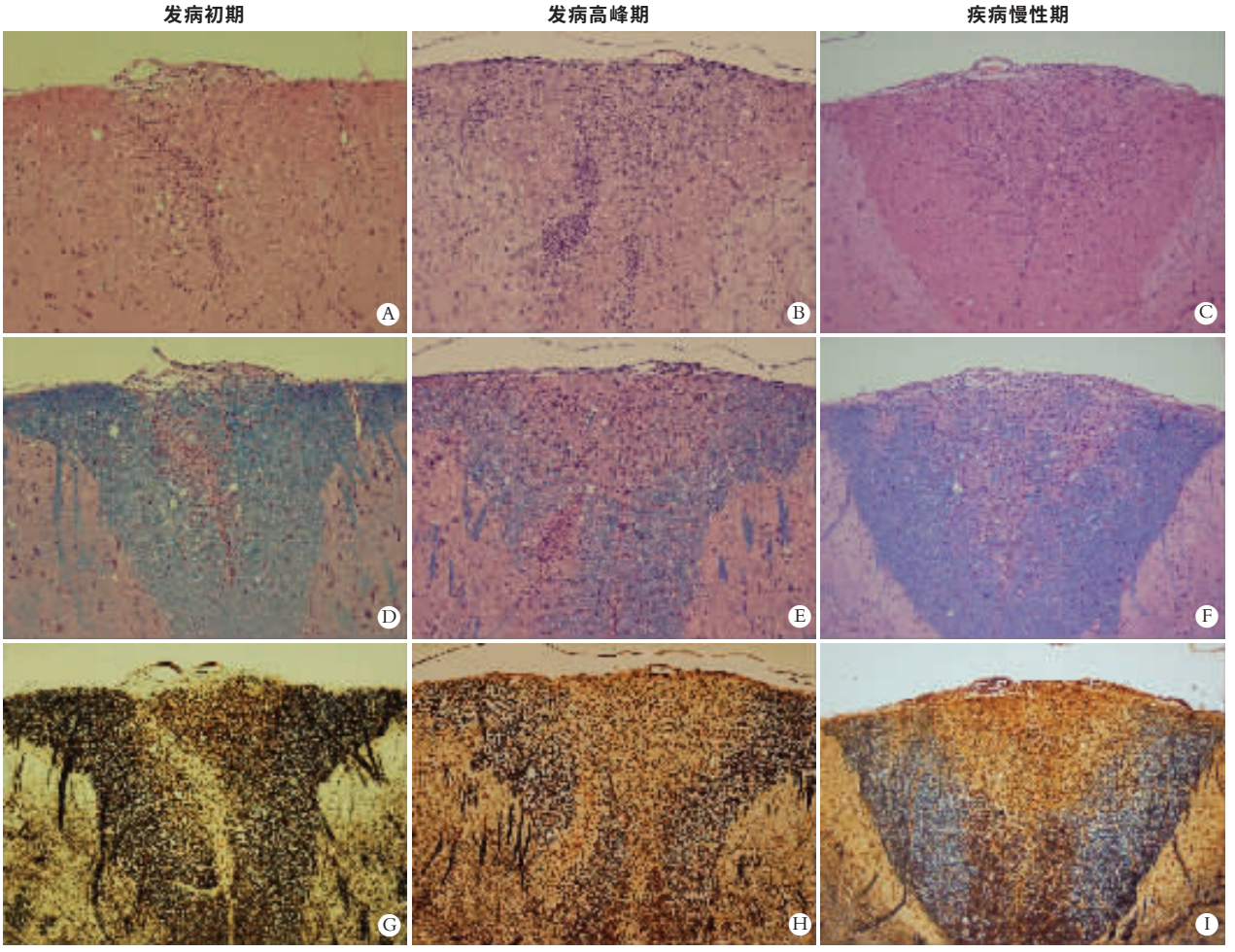
EAE 的主要组织形态学变化是血管扩张、水肿和炎症细胞的浸润。在疾病的发作期，炎症细胞主要浸润在脑的被膜下方即蛛网膜下腔中和脑白质血管周围形成血管淋巴袖套，浸润的炎症细胞类型主要是淋巴细胞，有的病例也可见到中性粒细胞（图 2A）。在疾病发作高峰期的时候，炎症细胞从蛛网膜下腔和血管周围向脑实质中扩散，数量和范围都增加。脑、小脑和脊髓的白质，尤其是脊髓的白质是主要的浸润部位（图 2B）。在慢性期时，炎症细胞的浸润也比较明显，但比高峰期有所减轻（图 2C）。在对照组中，个别病例可见轻度的炎症细胞浸润，主要在蛛网膜下腔中。图 3 所示实验组和对照组在不同时期的炎症细胞浸润程度。

2.3　EAE 模型中的脱髓鞘变化

髓鞘被 Luxol Fast Blue 染成蓝色。正常的中枢神经系统白质含有丰富的髓鞘，因此在大脑的深部白质、小脑白质和脊髓的白质均被染成蓝色。在 EAE 模型中，疾病发作初期可见髓鞘被破坏的碎片，但是没有大片的髓鞘脱失（图 2D）。在疾病的高峰期和慢性期的时候，可见大片的髓鞘脱失（图 2E、F）。在 C57BL/6 小鼠的 EAE 中，脊髓和小脑的脱髓鞘更加明显，也易于观察，尤其是脊髓的脱髓鞘。髓鞘脱失的区域往往有大量的炎症细胞浸润，表明髓鞘的破坏与炎症有一定的关系。在某些炎症细胞中可见到吞噬的髓鞘碎片。不同时间点髓鞘脱失变化见图 4。

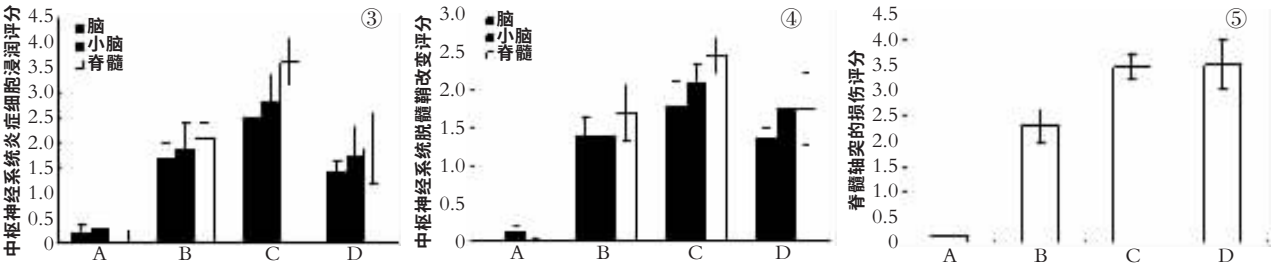
2.4　EAE 模型中的轴突损伤的形态学特征

本结果显示，在 EAE 的发作初期，已有较明显的轴突损伤，疾病高峰期和慢性期时，轴突损伤更加明显（图 5）。轴突损伤的部位往往和炎症细胞的浸润和髓鞘的脱失一致，表明轴突的损伤与炎症和髓鞘的脱失有关。损伤的轴突表现为形态不规则、肿胀、直径不一致、扭曲；轴突断裂，在断端表现为球状、卵圆形或橄榄状；另一种突出的变化是轴突的消失，这种变化往往与疾病的严重程度一致（图 2G、H、I）。



A、B、C：HE 染色；D、E、F：Luxol Fast Blue 染色；G、H、I：Bielschowsky 染色

图2 实验性变态反应性脑脊髓炎不同时期炎症、脱髓鞘及轴突损伤 （×200）



A：EAE 发作前期（免疫后 7 d）；B：EAE 发作期（免疫后 11 d）；C：EAE 高峰期（免疫后 21 d）；D：EAE 慢性期（免疫后 35 d）

图3 中枢神经系统炎症细胞浸润与时间的关系

图4 中枢神经系统髓鞘脱失与时间的关系

图5 脊髓轴突损伤变化与时间的关系

3 讨论

3.1 轴突损伤是脱髓鞘病变中的早期事件

本实验用 C57BL/6J 小鼠，以 MOG_{35-55} 多肽为抗原复制多发性硬化的动物模型。该模型为慢性进行型多发性硬化的模型。实验动物在免疫后第 10 天开始陆续发病。第 20 天时，动物的平均临床评分达到高峰。以后动物的临床症状有轻微的降低，但是维持在一个较高的平台水平。组织学检查结果表明，在疾病的发作前期，即免疫后第 7 天，中枢神经的蛛网膜下腔及少数病例的白质血管周围有轻度的炎症细胞浸润。第 10 天开始，这种炎症细胞的浸润变得明显，除了白质的血管周围外，脑实质中也可见明显的浸润。并持续到疾病的慢性期。Luxol Fast Blue 染色表明髓鞘的损伤和脱失也随疾病临床症状的加重而明显。值得特别注意的是，Bielschowsky 银染色表明在疾病发作的初期已经有轴突的损伤，这种损伤表现在形态不规则、直径不一致、扭曲。发作期时，这种改变更加明显，并伴

随着轴突的断裂,断端表现为球状、卵圆形或橄榄状。随着疾病的发展,髓鞘的脱失和轴突的损伤变得更加明显,部分病例的脊髓白质中 75% 以上的轴突消失。结合组织学改变和髓鞘染色的结果,轴突的损伤和消失与炎症细胞的浸润和髓鞘的损伤有一定的关系。

最近研究显示,脱髓鞘性病变中轴突的损伤是一种早期变化,随着病程的进展,轴突的损伤逐渐加重,并导致不可逆性神经功能障碍。据报道用免疫组织化学的方法,对多发性硬化病变组织的 β-APP(β-amyloid precursor protein)进行了检测,表明急性多发性硬化、慢性活动期等病变组织有较多的 β-APP 沉积,因为早期轴突的轴浆运输功能障碍导致 β-APP 的沉积[6]。低磷酸化的神经微丝或无磷酸化的神经微丝是轴突损伤的又一标志物,Trapp 应用抗这种神经微丝的抗体 SMI-32,结合激光共聚焦显微镜研究了多发性硬化病变脑组织,该研究表明轴突的横断是多发性硬化中轴突损伤的一种普遍的特征,并且与炎症浸润的程度有关。本研究利用 Bielschowsky 银染方法,同样揭示了在 EAE 中,脊髓轴突在发作前期已出现形态学的变化,随着疾病的进展,出现轴突的断裂、轴突的消失,在高峰期和慢性期时,部份病例脊髓中 75% 以上的轴突消失。因此,在脱髓鞘病变中轴突的损伤是一种早期的、普遍的病变,并且与炎症细胞的浸润有一定关系。

3.2　脱髓鞘病变中轴突损伤的机制

关于脱髓鞘病变中轴突损伤的机制很复杂,还未彻底阐明。最近,多发性硬化和其动物模型被广泛的认为是一种炎症性脱髓鞘性神经变性疾病[7],其轴突损伤的机制和传统的神经变性疾病、脑缺血、脑创伤等疾病中轴突损伤有共同的机制。脱髓鞘病变中轴突损伤的机制主要涉及以下几方面:①轴突的损伤与浸润的 $CD8^+$ 的细胞毒性 T 淋巴细胞有关。轴突损伤的部位和严重程度均与炎症细胞浸润的数量密切有关。$CD8^+$ 的细胞毒性 T 淋巴细胞可以直接损伤轴突,或间接的释放轴突溶解的因子,如 perforin, granzymes,使轴突损伤[8]。②病灶中除了浸润的 $CD8^+$ 的细胞毒性 T 淋巴细胞以外,浸润的巨噬细胞和增生、激活的小胶质细胞释放的细胞因子和其他炎症介质,如 TNF-α、IFN-γ 等均可以导致轴突的损伤。③氧自由基对轴突的损伤。④兴奋性神经毒性氨基酸导致轴突的损伤[9]。⑤线粒体的功能障碍,影响到能量代谢,使 Na^+-K^+ 泵的功能受损[10]。⑥轴突的钠泵增多,使钠离子内流增多,导致钠钙交换泵的逆转,使大量的钙离子内流,致使钙依赖性蛋白酶的激活,如 calpain, spectrin, phospholipase C, phosph-olipase A2, protien kinase C, nitric oxide synthase 等引起轴突的破坏[11,12]。⑦病变中抗体和补体也可以引起轴突的损伤。

一般来讲,急性期轴突的损伤与炎症反应有密切的关系,而慢性期轴突的损伤与离子泵的功能异常有关。既然轴突的损伤是脱髓鞘病变中早期的和普遍的事实,那么在多发性硬化治疗策略上应当选择神经保护的药物,结合抗炎症和免疫抑制剂的综合治疗措施,如已有研究表明钠离子通道阻滞剂如 flecainide, lamotrigine 和 phenytoin 等能有效保护 EAE 中轴突的损伤[13]。

综上所述,本研究结果表明,脱髓鞘病变中轴突的损伤是一种早期的和普遍的病变,损伤的轴突在形态上表现为形态不规则、肿胀、直径不一致、扭曲 轴突断裂,在断端呈球状、卵圆形或橄榄状;另一种突出的变化是轴突的消失。在疾病的高峰期和慢性期这种变化更加明显。同时,这种轴突的损伤与炎症反应、髓鞘脱失、各种致炎因子、离子通道的异常等多种因素有关。

参考文献:

[1] Ercolini A M, Miller S D. Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease[J]. J Immunol, 2006, 176(6): 3293 – 3298.

[2] McQualter J L, Bernard C C. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair[J]. J Neurochem, 2007, 100(2): 295 – 306.

[3] Trapp B D, Ransohoff R M, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability[J]. Curr Opin Neurol, 1999, 12(3): 295 – 302.

[4] Diem R, Sattler M B, Bahr M. Neurodegeneration and -protection in autoimmune CNS inflammation[J]. J Neuroimmunol, 2007, 184(1 – 2): 27 – 36.

[5] Aktas O, Waiczies S, Zipp F. Neurodegeneration in autoimmune demyelination: recent mechanistic insights reveal novel therapeutic targets [J]. J Neuroimmunol, 2007, 184(1 – 2): 17 – 26.

[6] Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(11): 889 – 898.

[7] Zipp F, Aktas O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases [J]. Trends Neurosci, 2006, 29(9): 518 – 527.

[8] Neumann H, Medana I M, Bauer J, *et al*. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases [J]. Trends Neurosci, 2002, 25(6): 313 – 319.

[9] Sarchielli P, Greco L, Floridi A, *et al*. Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid[J]. Arch Neurol, 2003, 60(8): 1082 – 1088.

[10] Dutta R, McDonough J, Yin X, *et al*. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients[J]. Ann Neurol, 2006, 59(3): 478 – 489.

[11] Kurnellas M P, Nicot A, Shull G E, *et al*. Plasma membrane calcium ATPase deficiency causes neuronal pathology in the spinal cord: a potential mechanism for neurodegeneration in multiple sclerosis and spinal cord injury[J]. FASEB J, 2005, 19(2): 298 – 300.

[12] Bechtold D A, Smith K J. Sodium-mediated axonal degeneration in inflammatory demyelinating disease[J]. J Neurol Sci, 2005, 233(1 – 2): 27 – 35.

[13] Black J A, Liu S, Hains B C, *et al*. Long-term protection of central axons with phenytoin in monophasic and chronic-relapsing EAE[J]. Brain, 2006, 129(Pt 12): 3196 – 3208.

（编辑　陈聪连）