文章编号:1000-5404(2009)22-2189-04

论著

不同发育阶段大鼠脑髓鞘化的研究

张雨平[1,2],黄其林[2],赵聪敏[1],汤金梁[3],王亚丽[3] (第三军医大学新桥医院:[1]儿科,[2]神经外科,全军癫痫病诊治中心,[3]病理科,重庆 400037)

摘 要:目的 研究大鼠不同发育阶段脑髓鞘化的发展及规律。**方法** 应用LFB髓鞘染色、MBP免疫组化及Western blot观察不同发育阶段大鼠脑髓鞘的分布及变化。**结果** LFB及MBP免疫组化染色E18、P0、P2均未见着色,P7大鼠胼胝体中部少量LFB着色,P15两种染色均呈阳性,P30着色加深,与P90、P720类似。通过Western blot检测MBP蛋白在孕中后期已有表达,出生后随日龄增长逐渐增加,至老年期表达量最高。**结论** 大鼠脑髓鞘化从P15已经开始,P30接近成熟;观察髓鞘的最佳时间在30 d以后。

关键词: 大鼠;脑;髓鞘化;发育
中图法分类号: R-332;R322.81;R339.3 **文献标识码:** A

Myelination of rat brain at different developmental stages

ZHANG Yu-ping[1,2], HUANG Qi-lin[2], ZHAO Cong-min[1], TANG JIN-liang[3], WANG Ya-li[3] ([1]Department of Paediatrics, [2]Department of Neurosurgery, [3]Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the myelination of rat brain at different developmental stages. **Methods** Luxol fast blue staining, immunohistochemistry and Western blotting were applied to determine the distribution and alternation of myelin sheath in the brains of SD rats at different developmental stages. **Results** Negative LFB and MBP staining were shown at the stages of embryonicage 18 d (E18), postnatal age 0 d (P0) and P2. At P7, the corpus callosum was weakly stained by LFB. The positive stain of LFB and MBP occurred in P15 on the corpus callosum. With the development going on, the stain turned out stronger, especially in P30, which was similar with that in P90 and P720. The results of Western blot analysis showed the expression of MBP in rat brain was gradually increased with the development of rat brain. **Conclusion** The myelination starts before P15 in rat brain and becomes mature in P30. The optimal observation time of myelin is 30 d born after.

Key words: rat; brain; myelination; development

髓鞘化是中枢神经系统(central nervous system, CNS)发育成熟的重要标志。发育各期机体的缺氧、损伤、自身免疫机能失调等状况,均会导致CNS髓鞘化障碍,并且在不同的发育阶段表现出不同的损伤特点,成为多种脑白质病发生发展的重要原因[1,2]。研究和阐明发育过程中CNS髓鞘化的规律及其影响因素无疑对揭示脑白质病的发病机制具有重要意义。在CNS髓鞘相关疾病的基础研究中,常常以大鼠作为研究对象,然而目前有关正常大鼠脑髓鞘发育的研究鲜见报道。本研究采用劳克斯坚牢蓝(luxol fast blue, LFB)髓鞘特殊染色及髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)表达检测,对不同发育阶段大鼠脑髓鞘的变化规律进行了初步讨论,以期为揭示CNS髓鞘相关疾病的发病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

分别取孕14 d(E14)、18 d(E18),出生后0 d(P0)、7 d(P7)、15 d(P15)、30 d(P30)、90 d(P90)、720 d(P720)的SD大鼠各10只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。每组各取5只以1%戊巴比妥钠按照40 mg/kg腹腔注射麻醉。沿胸骨剑突下打开胸腔,分别从左心室、主动脉插管,剪开右心耳,先灌注生理盐水,再灌注4%的多聚甲醛(4 ℃)。灌注完毕断头分离脑组织,4%的多聚甲醛后固定12 h(4 ℃)。取大脑中1/3组织常规石蜡包埋,4 μm连续切片,脱蜡入水备用。E14、E18大鼠经麻醉孕鼠后剖腹取胚胎及胎脑,其余步骤同上。

1.2 染液的配制

LFB染液:劳克斯坚牢蓝0.1 g,95%酒精100 ml,10%冰醋酸0.5 ml,三者混和溶解后,过滤备用。核固红水溶液:核固红0.1 g,硫酸铝5 g,蒸馏水100 ml。先将硫酸铝加热溶解于蒸馏水,再加入核固红,待全部溶解后过滤备用。

基金项目:国家计生委科技攻关项目(2007B070)
Supported by the Tackling Project of Scientific and Technological Research of State Family Planning Commission(2007B070)
作者简介:张雨平,女,四川省雅安市人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事新生儿脑损伤疾病方面的研究。电话:(023)68774102,E-mail:zyaya99@163.com
通信作者:黄其林,电话:(023)68774610,E-mail:hqlmdxq@yahoo.com
收稿日期:2009-06-29;修回日期:2009-09-22

1.3 LFB-核固红染色法

①切片至100%酒精脱水,直接入LFB染液60 ℃ 16 h。②95%酒精洗去多余染液。③蒸馏水洗。④0.05%碳酸锂分色1 min。⑤70%酒精分色30 s。⑥蒸馏水洗,如着色过深可反复④⑤两步。⑦加入0.1%核固红溶液中复染1 min。⑧蒸馏水洗。⑨酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.4 MBP的免疫组织化学染色

切片用PBS(0.01 mol/L, pH 7.2)漂洗5 min×3次,双氧水甲醇去离子水(3% H_2O_2,10%甲醇)室温孵育10 min,PBS漂洗5 min×3次,2.5%免疫山羊血清室温封闭1 h。兔Anti-MBP(福州迈新),4 ℃孵育过夜。PBS漂洗5 min×3次,生物素化羊抗兔IgG(北京中杉)37 ℃孵育2 h。PBS漂洗5 min×3次,辣根标记的亲和卵白素(北京中杉)37 ℃孵育1 h。PBS漂洗5 min×3次,DAB显色。应用Image Pro Plus5图像分析软件,在前囟平面脑片(×10)上取胼胝体中间部位、两侧外囊各一个视野共3个视野,测量MBP免疫组化染色积分光密度。每组5只共15个视野,结果取其平均值。

1.5 发育各期大鼠全脑总蛋白的提取

各时相点大鼠各取5只,断头处死(孕14、18 d大鼠脑取材经剖腹取出),迅速取鼠脑,称质量按100 mg/500 μl蛋白裂解液[含MOPS 50 mmol/L (pH 7.4),DTT 0.2 mmol/L,KCl 100 mmol/L, $MgCl_2$ 0.5 mmol/L, Na_3VO_4 10 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, 蔗糖0.32 mol/L, Leupeptin、Pepstatin A、Aprotinin各5 mg/L, PMSF、Benzamidine各0.1 mmol/L]冰浴中匀浆。离心,取上清液测蛋白含量后分装,置-80 ℃冰箱待用。蛋白含量测定按改良Lowry法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.6 Western blot检测及MBP蛋白光密度

目的蛋白MBP的相对分子质量为20×10^3,选用15%的分离胶。每组取60 μg蛋白总量经SDS-PAGE电泳恒压条件(80 V)分离。凝胶中的蛋白以100 V恒压全浸湿转2 h至PVDF膜(4 ℃)。含5%脱脂奶粉的TBST(50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl,l0.1% Tween-20,pH 7.5)室温封闭2 h,MBP抗体(Chemicon, MAB386, 工作浓度1∶1 000)室温12 h,辣根过氧化物酶标记抗大鼠IgG反应2 h(37 ℃), DAB显色。以GAPDH作为上样总蛋白量的内参。用Chemi Imager ™5500型凝胶成像分析仪摄影,测量MBP蛋白条带以及对应内参的积分光密度,以MBP蛋白的积分光密度/对应内参的积分光密度值为发育期各组MBP的相对光密度。

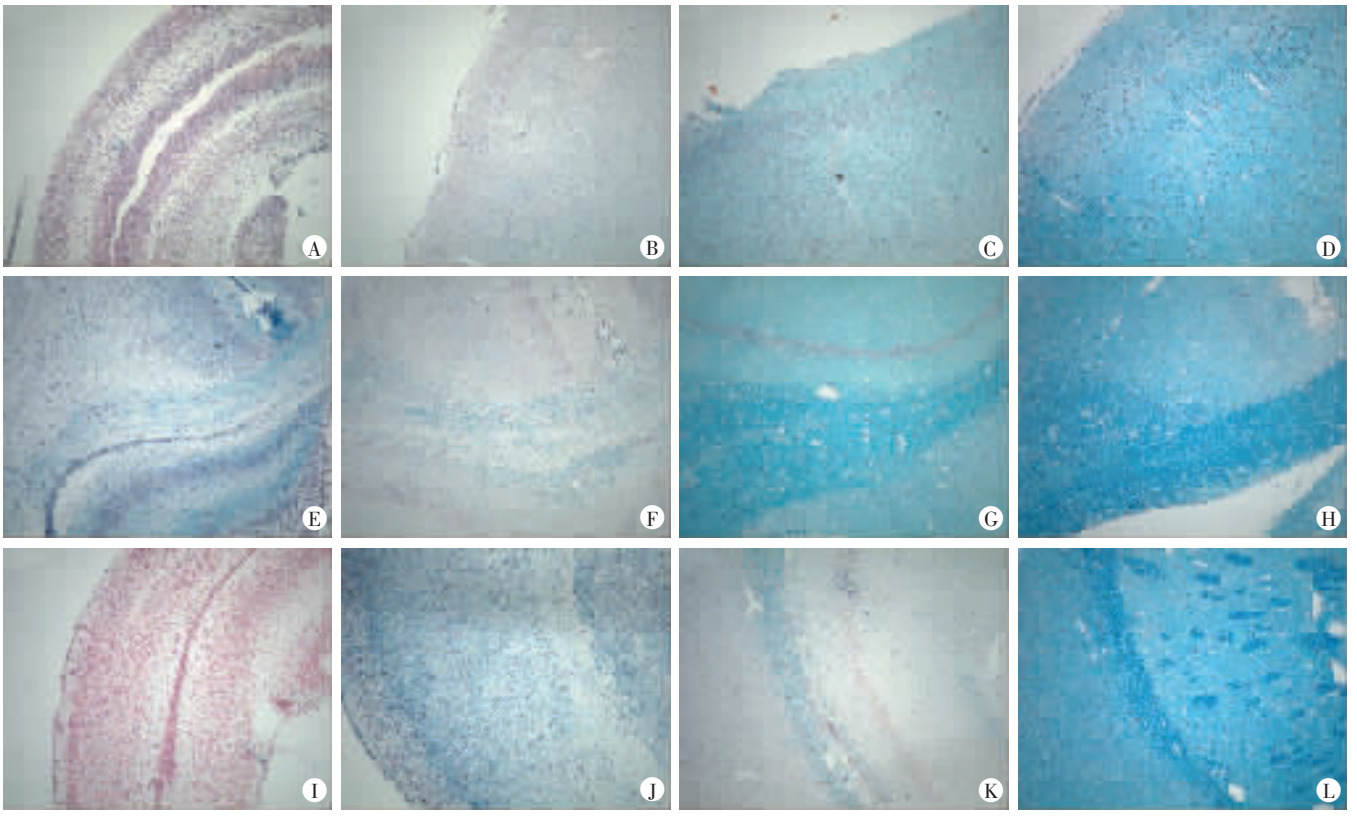
1.7 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件行t检验和方差分析。

2 结果

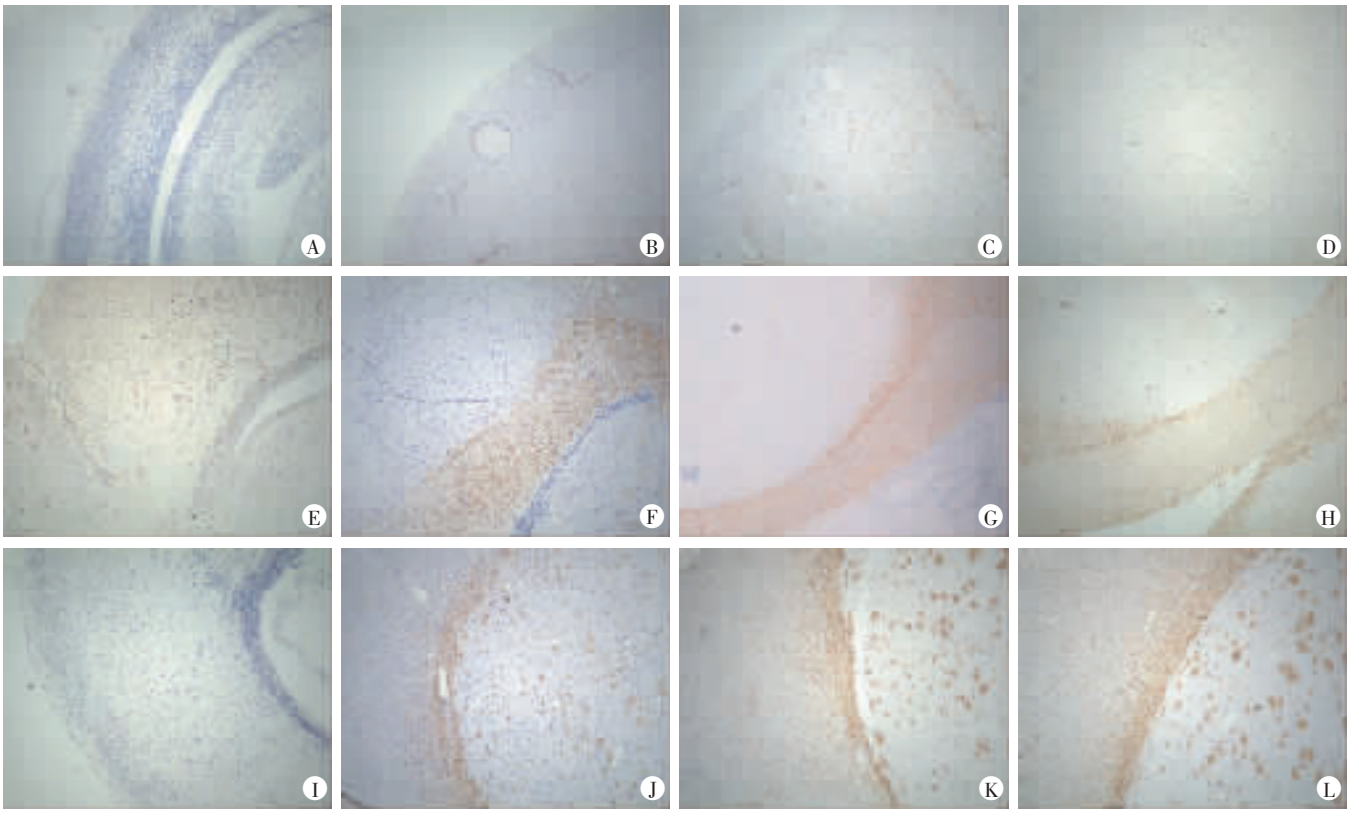
2.1 LFB染色可见

光镜下可见有髓神经纤维呈鲜蓝色,神经细胞内细胞核呈红色。E18、P0、P2大鼠脑皮质神经细胞排列稀疏,核红染明显,未见典型蓝色LFB丝状着色;P7大鼠脑皮质可见少量LFB丝状着色;P15、P30大鼠脑皮质LFB着色明显增多,呈条索状分布;P90、P720大鼠脑皮质LFB着色较深,条索状分布明显。E18、P0、P2、P7大鼠脑外囊、内囊均未见着色,P7大鼠胼胝体中部可见少量着色,P15大鼠胼胝体、外囊、内囊均着色,但颜色浅,范围较窄。P30大鼠胼胝体、外囊、内囊着色加深,P90与P720大鼠类似,上述部位着色均深。见图1。



A、B、C、D: P0、P15、P30、P720皮质; E、F、G、H:P7、P15、P90、P720胼胝体;I、J、K、L:E18、P7、P30、P90外囊

图1 不同发育阶段大鼠大脑皮质、胼胝体、外囊的LFB染色情况 (×100)



A、B、C、D: E18、P15、P90、P720 皮质; E、F、G、H:P7、P15、P30、P90 胼胝体; I、J、K、L: P2、P15、P30、P720 外囊

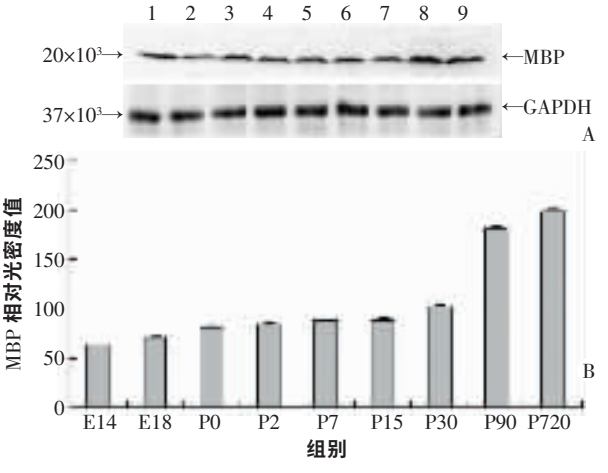
图 2　不同发育阶段大鼠大脑皮质、胼胝体、外囊的 MBP 免疫组化染色　(SABC ×100)

2.2　MBP 免疫组化染色可见

MBP 阳性结构呈现为棕黄色,选取鼠脑胼胝体、外囊、内囊及皮质进行观察。可见 E18、P0、P2、P7 大鼠皮质未见着色;P15 大鼠皮质可见少量着色;P30 皮质着色增加,呈条索状;P90、P720 更为明显。E18、P0、P2、P7 大鼠脑胼胝体、外囊、内囊均未见着色,P15 大鼠胼胝体、外囊、内囊均有着色,但较稀疏。P30 大鼠胼胝体、外囊、内囊着色与 P90 类似,均呈棕色条索状。P720 大鼠胼胝体、外囊、内囊 MBP 阳性着色深,范围广。P15 ~ P720 各组间胼胝体、外囊 MBP 光密度分别为(0.257 ±0.019, 0.338 ±0.021,0.412 ±0.016,0.436 ±0.024),有显著差异。见图 2。

2.3　Western blot 检测不同发育阶段大鼠全脑 MBP 蛋白的表达

Western blot 检测各组 GAPDH 杂交条带亮度相似。各组位于 20×10^3 蛋白条带位置均呈现 MBP 特异性蛋白杂交条带,亮度随大鼠日龄增长逐渐增强(图 3)。各日龄组相对光密度值差异有显著性($P<0.05$)。



A:Western blot 检测结果　1: E14; 2: E18; 3: P0; 4: P2; 5: P7; 6: P15; 7: P30; 8: P90; 9: P720

B:定量分析结果

图 3　Western blot 检测不同发育阶段大鼠全脑 MBP 的蛋白表达

3　讨论

脑的髓鞘化即是指脑白质的髓鞘形成,是脑发育成熟的重要标志之一。中枢神经系统(CNS)的髓鞘由少突胶质细胞(oligodendrocyte, OL)末端扁平薄膜包卷神经元轴突而形成。CNS 髓鞘的主要成分除脂质外,蛋白成分主要包括占 30% ~40% 蛋白总量的髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP),约占 50% 的蛋白脂蛋白(proteolipid protein, PLP)以及少量的髓磷脂连接糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)和髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)。目前已知的髓鞘功能有三:一是使轴突与周围组织,如相邻轴突之间绝缘,避免神经冲动的过度泛化;二是通过"跳跃式传导"的机制实现动作电

位的快速传递;三是在一些轴突受损的情况下引导轴突的再生。

关于髓鞘化的发生及发育进程,国外学者曾对人类以及实验动物进行了相关研究。人和啮齿类动物脑髓鞘化的共同特点是:始于脑干尾部,自后向前,自中央向周围。人脑最早的髓鞘化发生在孕 28 周后的胚胎[3]。至新生儿时,脑桥及小脑脚已有一定程度的髓鞘化;生后 1 ~3 个月,内囊前肢、视放射及胼胝体扣带髓鞘化开始;生后 6 个月,内囊前肢、胼胝体膝部髓鞘化开始。相较之下,额叶、顶叶、枕叶的髓鞘化发生较晚,于生后 8 ~12 个月方开始[4,5]。髓鞘化进展的速度在不同的脑区也有很大的差别,内囊后肢的髓鞘化从开始到成熟只需 6 周时间[6],而前额皮质的髓鞘化完成一直要到青春期、成年早期才结束[7]。MRI 检查亦显示,脑髓鞘形成是从胎儿 5 个月时开始,最早的髓鞘化是从延髓、桥脑、脑干背侧、小脑上下脚开始,并沿内侧丘系向头侧伸展到大脑脚、丘脑腹外侧核、内囊后肢的后部及半卵圆中心,额颞叶髓鞘化最晚[8,9]。

与人类相比,大鼠脑的髓鞘化发生相对较晚。初生大鼠的 CNS 极不成熟, 髓鞘化程度很低,仅相当人胚胎第 30 周。但鼠脑在生后迅速髓鞘化,经过生后 8 ~20 d 的快速髓鞘化期后,生后 25 d 时髓鞘总量已达到成年鼠的 50%,生后 90 ~ 100 d 髓鞘化大致完成[10]。本研究通过 MBP 免疫组化染色见 P15 大鼠脑中胼胝体、外囊、内囊及皮质均出现阳性,而在 E18、P0、P2、P7 均未见着色;P30 大鼠胼胝体、外囊、内囊及皮质阳性着色深,条索状分布明显,与 P90 类似。这与国外研究报道胼胝体、内囊和小脑白质髓鞘化在 14 d 开始,28 d 内囊髓鞘化基本成熟,35 d 胼胝体、小脑白质髓鞘化成熟的结果一致[1]。而 LFB 染色中可见 P7 大鼠胼胝体中部少量着色,提示 LFB 染色检测成熟髓鞘的特异性可能较 MBP 免疫组化染色为差。通过 Western blot 检测出的 MBP 蛋白在孕中后期已经在鼠脑少量表达,出生后随日龄增长逐渐增加,至老年期含量最高。说明在胚胎期及生后早期,虽然没有形成成熟的髓鞘,但随着成熟 OL 的数目增多以及单个 OL 生长,MBP 的表达量已逐渐增加,到老年期由于皮层有所萎缩变薄,脑组织中白质/灰质值增高,MBP 的在脑组织中的含量渐高于青壮年期[11]。上述研究结果提示,在以大鼠为对象研究髓鞘疾病时,观察时间不宜早于出生后 15 d,最佳观察时间在出生 30 d 以后。

CNS 系统的髓鞘化是一个极其复杂的过程,不同的区域开始髓鞘化的时间不一,髓鞘化的进程各异,髓鞘化完成的时间也大相径庭。在这个复杂的过程中,任何不利的因素都可能影响髓鞘化的正常进行。如围产期缺氧缺血可损伤少突胶质细胞的前体,使髓鞘化受阻,其中额叶、颞叶的白质最易受损,导致后期的脑瘫或精神发育迟缓[1,2]。此外,低血糖、营养素的不适当,特别是脂类物质摄入受限等因素也会使髓鞘化受到影响[12,13]。目前,随着早产儿存活率的提高,早产儿易患的脑白质损伤发病率有所上升,人们也越来越重视对脑白质疾病的研究。在这些研究中,早产儿脑白质损伤模型的实验动物主要采用新生大鼠,而对于正常大鼠脑髓鞘化发育的特点国内尚少见报道。本研究明确了大鼠髓鞘发育的进程,可为脑白质损伤疾病研究的模型制作、干预及检测时机选择提供实验依据。

参考文献:

[1] Levitt P. Structural and functional maturation of the developing primate brain[J]. J Pediatr, 2003, 143(4 Suppl): S35 - S45.

[2] Akundi R S, Rivkees S A. Hypoxia alters cell cycle regulatory protein expression and induces premature maturation of oligodendrocyte precursor cells[J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4739.

[3] Back S A, Luo N L, Borenstein N S, *et al*. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury [J]. J Neurosci, 2001, 21(4): 1302 - 1312.

[4] Paus T, Collins D L, Evans A C, *et al*. Maturation of white matter in the human brain: a review of magnetic resonance studies[J]. Brain Res Bull, 2001, 54(3): 255 - 266.

[5] Gao W, Lin W, Chen Y, *et al*. Temporal and spatial development of axonal maturation and myelination of white matter in the developing brain[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2009, 30(2): 290 - 296.

[6] Inder T E, Huppi P S. *In vivo* studies of brain development by magnetic resonance techniques[J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2000, 6(1): 59 - 67.

[7] Woo T U, Crowell A L. Targeting synapses and myelin in the prevention of schizophrenia[J]. Schizophr Res, 2005, 73(2 - 3): 193 - 207.

[8] 徐海波, 孔祥泉, 熊 茵, 等. 1.5T 磁共振仪评估新生儿和婴儿的正常脑髓鞘[J]. 临床放射学杂志, 2001, 20(7): 532 - 535.

[9] Manganaro L, Perrone A, Savelli S, *et al*. Evaluation of normal brain development by prenatal MR imaging[J]. Radiol Med, 2007, 112(3): 444 - 455.

[10] Watson R E, Desesso J M, Hurtt M E, *et al*. Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2006, 77(5): 471 - 484.

[11] 成戎川, 赵士福, 王亚丽, 等. 老化大鼠髓鞘蛋白脂蛋白表达变化及意义[J]. 第三军医大大学学报, 2007, 29(4): 364 - 367.

[12] Saugstad L F. From superior adaptation and function to brain dysfunction-the neglect of epigenetic factors[J]. Nutr Health, 2004, 18(1): 3 - 27.

[13] Yan H, Rivkees S A. Hypoglycemia influences oligodendrocyte development and myelin formation[J]. Neuroreport, 2006, 17(1): 55 - 59.

(编辑 汪勤俭)