文章编号:1000-5404(2012)08-0691-05

论著

Cuprizone 致小鼠脱髓鞘对胼胝体少突胶质细胞数及动物运动能力的影响

詹晓黎[1],顾思斯[2],丁 诚[2],苏 乐[3],陈兴书[1],蔡其燕[1],姚忠祥[1,4] (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[1];学员旅五队[2];学员旅九队[3];基础医学部生理学教研室[4])

[摘要] **目的** 研究 Cuprizone(CPZ)诱导 C57BL/6 小鼠脱髓鞘对胼胝体少突胶质细胞变化情况,并探讨对小鼠运动能力的调控特点。**方法** 以正常饲料喂食的6周龄雄性小鼠作为对照,实验组用含 0.2% Cuprizone 的混合饲料持续喂食6周龄雄性小鼠6周,诱导中枢神经系统脱髓鞘。用 LFB 组化和 MBP 免疫组化技术鉴定脑胼胝体区的脱髓鞘改变,确认模型的稳定可靠性。结合 MBP 和 CC-1 免疫荧光双标技术,观察脱髓鞘的胼胝体区少突胶质细胞变化情况。并通过体质量监测观察小鼠的整体功能状态变化,进一步采用行为学实验技术(旋转棒测试和旷场实验)观察对小鼠运动能力的调控效果和特点。**结果** 与正常组相比,Cuprizone 诱导脱髓鞘6周后,脑胼胝体区的髓鞘缺失明显,髓鞘结构蛋白 MBP 含量明显减少[(0.395±0.019) *vs* (0.242±0.016); $P<0.01$];应用图像分析和统计学分析发现,成熟少突胶质细胞的胞体(CC-1$^+$)和(MBP$^+$)呈平行性减少[(42.62±2.48) *vs* (25.04±3.68)/100 μm^2; $P<0.05$];在实验监测过程中,正常小鼠体质量呈上升增加,而 CPZ 组小鼠体质量先急剧下降,后趋于平稳并稍有恢复;同时行为学实验结果表明,小鼠的运动协调能力、自发活动能力都有明显减弱[(156.17±22.17) *vs* (78.50±7.80);(240.91±29.52) *vs* (163.31±21.05); $P<0.05$],但是对小鼠的探索习性并无明显影响(3.7%/5.4% *vs* 3.6%/5.3%; $P>0.05$)。**结论** 利用 Cuprizone 诱导小鼠脱髓鞘改变与少突胶质细胞减少有关,其主要影响小鼠的运动协调能力和自发活动而不影响探索习性等高级功能。

[关键词] CPZ 脱髓鞘模型;少突胶质细胞;行为学监测
[中图法分类号] R-332;R338;R363.27 [文献标志码] A

Effect of cuprizone-induced demyelination on callosal oligodendrocytes and motor function in mice

Zhan Xiaoli[1], Gu Sisi[2], Ding Cheng[2], Su Le[3], Chen Xingshu[1], Cai Qiyan[1], Yao Zhongxiang[1,4] ([1]Department of Histology and Embryology, Chongqing Institute of Neurobiology, [4]Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, [2]5th Student Team, [3]9th Student Team, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of cuprizone (CPZ)-induced demyelination on callosal oligodendrocytes and motor function in C57BL/6 mice. **Methods** Six-week old male mice fed with normal diets served as a control group and 6 week old male mice fed with mixed diets containing 0.2% CPZ for 6 weeks served as an experimental group. Demyelination in central nervous system was induced. Demyelination in cerebral callosal region was identified with luxol fast blue (LFB) and myelin structural protein(MBP) immunohistochemical staining. Stability and reliability of the established model were assayed. Demyelinated callosal oligodendrocytes were observed with MBP + CC1 double immunostaining. Overall function of mice was observed by monitoring their body weight. Characteristics of motor function in cerebral callosal region were observed with behavioral tests (Rotarod and open-field test). **Results** The demyelination in cerebral callosal region was noticeable and the MBP level was significantly lower in experimental group than in control group (0.395±0.019 *vs* 0.242±0.016, $P<0.01$) 6 weeks after induction of demyelination. Image and statistical analysis showed that the number of CC-1$^+$ was parallelly decreased with myelin protein of MBP$^+$ [(42.62±2.48)/100 μm^2 *vs* (25.04±3.68)/100 μm^2, $P<0.05$]. The body weight was increased in control group but decreased in experimental group, which then became stable and gradually recovered. Behavioral experiments showed that the motor coordinating function and spontaneous activity were significantly lower in experimental group than in control group (Rotarod test: 156.17±22.17 *vs* 78.50±7.80; Open-field test: 240.91±29.52 *vs* 163.31±21.05; $P<0.05$). However, no significant difference was found in exploration behavior of mice (3.7%/

[基金项目] 国家自然科学基金(31071056);重庆市自然科学基金(CSTCJJA10026)
[通信作者] 姚忠祥,电话:(023)68752227,E-mail:yaozhx@yahoo.com

5.4% *vs* 3.6%/5.3%, $P>0.05$). **Conclusion** CPZ-induced demyelination is related with the loss of oligodendrocytes in mice and mainly influences their motor coordinating function and spontaneous activity but not their senior function of exploration behavior.

[**Key words**] cuprizone demyelination model; oligodendrocyte; behavior monitoring

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31071056) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2011JJA10026). Corresponding author: Yao Zhongxiang, Tel: 86-23-68752227, E-mail: yaozhx@yahoo.com

多发性硬化症(multiple sclerosis,MS)是目前临床最常见的一种中枢神经系统慢性脱髓鞘疾病,伴随着运动、感觉等功能障碍的临床症状反复发作和缓解[1-3]。其病理改变为中枢神经系统炎症、脱髓鞘和轴突丢失[4-5],其原因与中枢髓鞘形成细胞——少突胶质细胞的分化成熟障碍有关[6-9]。

Cuprizone(CPZ)是一种选择性铜离子螯合化学物质,低剂量的CPZ能够诱导中枢神经系统脱髓鞘[10],但对神经元并没有特别明显的影响[11],提示CPZ主要通过引起髓鞘损伤导致中枢神经系统的变化[12-14]。因此,CPZ常作为诱导因子用来建立脱髓鞘动物模型,研究相关疾病及其恢复机制。但CPZ诱导的脱髓鞘是否通过影响少突胶质细胞的变化而发挥作用,其对动物行为学的影响有何特点等问题还不清楚。为了说明CPZ诱导小鼠脱髓鞘的少突胶质细胞变化情况,及其对小鼠运动能力的影响,本研究通过0.2% CPZ混合饲料连续喂食C57BL/6小鼠6周来诱导建立脱髓鞘模型,用组化和免疫组化技术鉴定模型的稳定可靠性;在此基础上,应用免疫荧光双标技术观察少突胶质细胞与髓鞘的变化特点,并进一步监测体质量和行为能力的变化特点。

1 材料与方法

1.1 动物分组和标本采集

20只6周龄雄性C57BL/6小鼠(第三军医大学实验动物研究中心),体质量(15.36±0.61)g,分成2组:对照组($n=10$)和脱髓鞘组($n=10$),喂养在共同的环境下。Cuprizone试剂购买于Sigma公司。所有动物喂养及处置都遵照国家实验动物管理条例以及国家实验动物管理与使用指南。

对照组给予正常饲料连续喂养6周,脱髓鞘组0.2% Cuprizone混合饲料连续喂食6周,每天监测体质量变化,每2天旋转棒行为学实验监测运动能力改变,第6周末旷场行为学实验检测自发活动和探索习性变化,并取材LFB染色、免疫组化和免疫荧光验证脱髓鞘改变。在第6周末,小鼠用1%戊巴比妥钠按10 μl/g麻醉后,迅速固定、解剖开胸腹腔,灌注针插入左心室,开始灌注生理盐水,并剪开右心耳放血,待血液冲洗干净后,其中每组5只,迅速剥离出大脑组织,冰上操作胼胝体部位取材送检电镜,剩下的5只更换成Zamboni's固定液开始灌注,待灌注充分后,剥离出大脑组织,放入Zamboni's固定液4 ℃固定>48 h,然后转入含30%蔗糖的Zamboni's固定液4 ℃固定进行脱水,待组织沉入固定液瓶底后,取出用刀片修整组织块后,平整放置在冰冻座子上,并用冰冻包埋剂包埋后,放置在冰冻切片机里-20 ℃急冻30 min后,开始冰冻切片,切成20 μm厚的组织片,收集放置在Zamboni's固定液中保存,并继续后面的实验。

1.2 形态学分析

1.2.1 卢卡斯快蓝(LFB)髓鞘特异性染色 组织片用0.01 mol PBS漂洗后,转入0.01% LFB染色液中染色,37 ℃烤箱过夜。95%酒精和蒸馏水漂洗后,0.05%碳酸锂分化数十秒至白质灰质分辨明显,70%酒精终止分化至白质染色明显,灰质染色浅为止,蒸馏水充分漂洗,晾干,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,Olympus BX60显微镜照相,Spot Advance软件收集图片数据。

1.2.2 免疫组化染色 采用髓鞘碱性蛋白(anti-MBP,1∶200,Santa Cruz公司)。组织片用0.01 mol PBS漂洗后,30%的过氧化氢封闭内源性的过氧化物酶15 min,0.01 mol PBS漂洗,捞入1% BSA/0.4% Triton-X100封闭液中37 ℃孵育30 min,组织片孵育MBP一抗37 ℃ 2 h后,转入4 ℃冰箱过夜。组织片孵育生物素标记的二抗37 ℃ 2 h后,ABC复合物孵育1 h后,DAB显示剂显色,组织片平展于载玻片上,37 ℃烤干后,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Olympus BX60显微镜照相,Spot Advance软件收集图片数据。

1.2.3 免疫荧光染色 采用髓鞘碱性蛋白(anti-MBP,1∶200,Santa Cruz公司)、少突胶质细胞(anti-CC1,1∶200,Cal-Biochem公司)。组织片用0.01 mol PBS漂洗固定液后,1% BSA/0.4% Triton-X100封闭液37 ℃封闭30 min,组织片孵育CC1一抗37 ℃烤箱2 h,然后转入4 ℃冰箱过夜。第2天,组织片孵育罗丹明红色荧光标记的二抗37 ℃烤箱2 h。组织片用0.01 mol PBS漂洗后,继续孵育MBP一抗37 ℃烤箱孵育2 h,然后转入4 ℃ 冰箱过夜。第3天,组织片孵育FITC绿色荧光标记的二抗37 ℃烤箱2 h,0.06% DAPI复染细胞核30 s,组织片平展于用酒精浸泡擦洗的载玻片上,晾干,荧光封片剂封片。Nikon Eclipse 90i荧光显微镜采集照片及NIS-Elements软件处理图片。

1.3 体质量监测和行为学实验方法

1.3.1 体质量监测 在脱髓鞘建立过程中我们用称量体质量监测小鼠整体状态的变化。每天固定时间点(12:00)称量,并分组记录。实时记录小鼠的整体改变,监测模型建立过程中的整体情况变化。

1.3.2 旋转棒测试(Rotarod Test) 在脱髓鞘建立过程中,

同时用旋转棒实验监测小鼠的协调运动能力，这是判断脱髓鞘改变情况的指标。开始建模之前，先训练小鼠在旋转棒仪（转棒式疲劳仪 YLS-4C，上海软隆科技发展有限公司）上维持平衡和运动，每天低速 5～10 r/min 练习 2 次，共练习 3 d，并在练习过程中筛选出无法适应转棒运动和无法维持在转棒上的小鼠，并剔除出小组。小鼠习惯了旋转棒运动模式后，每 2 天测试 1 次小鼠的运动能力改变：旋转速度采取 5 r/min 加速到最高速度并维持在 40 r/min，总时间持续 3 min，小鼠从旋转棒掉下或者抱着柱子连续旋转 2 周以上判定实验结束，并记录小鼠在棒上的停留时间，用来监测其运动协调能力的变化。

1.3.3 旷场实验（Open-field Test） 在第 6 周末，用旷场实验设备（插板式旷场 BW-OF302，上海软隆科技发展有限公司）检测小鼠的自发活动、行为反应和探索习性对新环境的变化。进行实验前，先适应行为学实验室环境 2 h，同时保持环境噪音和环境光线稳定。小鼠放置在 25 cm×25 cm×32 cm 的方形实验场中间，任其自由活动 10 min，避免任何声音和光线干扰，并用摄像头记录其运动轨迹并用实时分析软件分析其总路程，不同区域停留时间和不同区域运动路程。

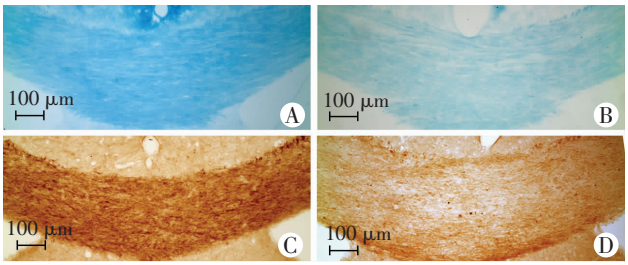
1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。免疫组化结果利用 IPP 5.0 软件进行处理后，每组数据采集 5×3×3 个样本数据进行均值独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 CPZ 模型脱髓鞘改变

正常小鼠的脑胼胝体区髓鞘染色是致密均匀，染色深，LFB 染色表现为深蓝色着色，而髓鞘碱性蛋白（myelin basic protein，MBP）免疫组化染色呈现大量棕色染色，阳性染色均匀致密。而 CPZ 喂食 6 周后，LFB 染色呈浅蓝色，阳性染色稀疏并有斑块状脱失，MBP 染色显示为弱棕色染色，弱阳性染色比较稀疏。见图 1。软件分析 MBP 平均光密度值，CPZ 脱髓鞘组只达到正常组的光密度值的 66%。



A：对照组 LFB 髓鞘染色；B：CPZ 组 LFB 髓鞘染色；C：对照组髓鞘碱性蛋白染色（SABC）；D：CPZ 组髓鞘碱性蛋白染色（SABC）

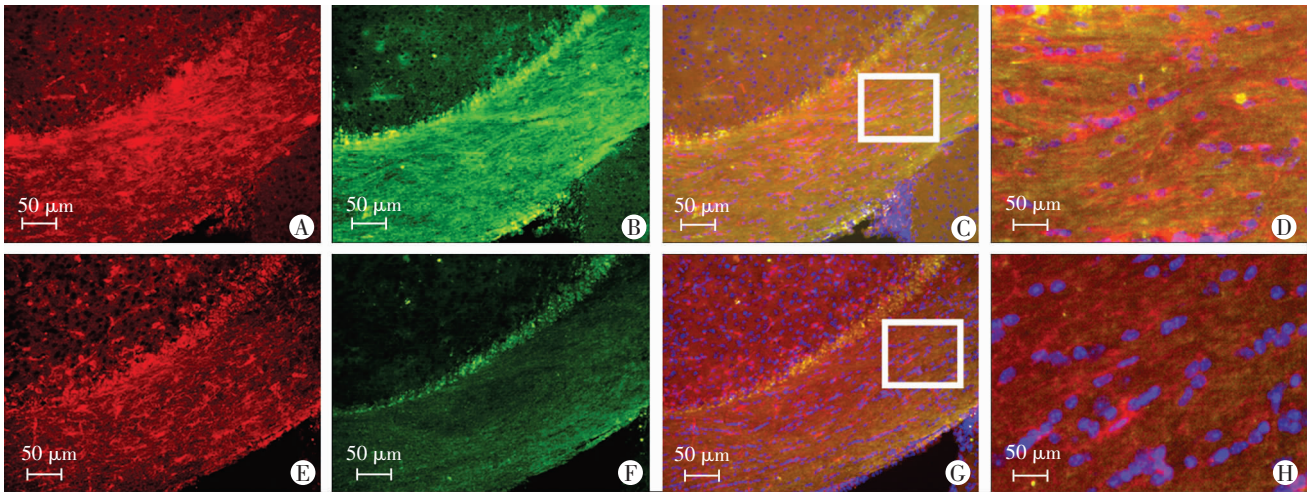
图 1 胼胝体区髓鞘改变

2.2 胼胝体区少突胶质细胞数明显减少

MBP＋CC1 免疫荧光双标染色结果见图 2。正常组胼胝体区 MBP 绿色荧光染色深，阳性染色均匀并且致密，同时 CC1 阳性细胞染色多，胼胝体区的阳性细胞数目能平均达到（42.62±2.48）/100 μm^2，而脱髓鞘组 MBP 绿色荧光染色浅，阳性染色稀疏并有斑块状丢失，同时 CC1 阳性细胞数目明显减少，胼胝体区的阳性细胞数平均只能达到（25.04±3.68）/100 μm^2。

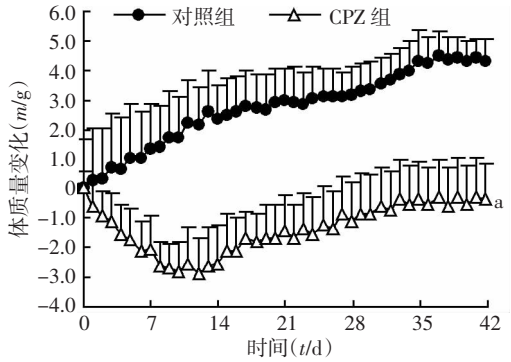
2.3 CPZ 诱导脱髓鞘能明显抑制体质量增加

见图 3。对照组小鼠在本实验过程中，体质量呈逐渐上升，其绝对值最后平均能增加到 4 g 左右，而 CPZ 诱导脱髓鞘小鼠体质量在开始的前 2 周急剧下降，体质量绝对值丢失到 3 g，表现为急性期的改变模式。而体质量在后面的 4 周缓慢的恢复最后趋于平台期，最终未能恢复到最初体质量水平，其绝对值丢失 1 g 左右，后面 4 周体质量的变化表现呈缓解代偿的过程，但是未能完全复原。



A：对照组 CC1 红色免疫荧光染色；B：对照组 MBP 绿色免疫荧光染色；C：对照组免疫双标合成图，蓝色：DAPI；D：对照组免疫双标局部放大；E：CPZ组 CC1 红色免疫荧光染色；F：CPZ 组 MBP 绿色免疫荧光染色；G：CPZ 组免疫双标合成图，蓝色：DAPI；H：CPZ 组免疫双标局部放大

图 2 免疫荧光双标染色观察 CPZ 诱导脱髓鞘导致胼胝体区少突胶质细胞明显减少

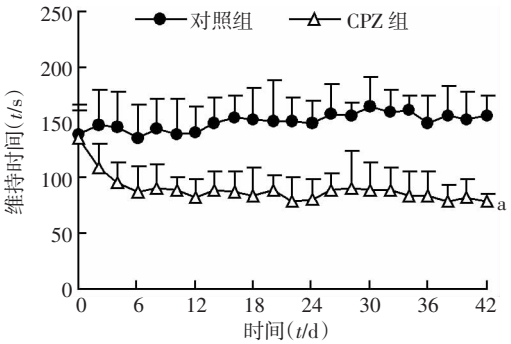


a：$P<0.01$，与对照组比较

图3 CPZ对2组小鼠体质量变化的影响

2.4 CPZ诱导脱髓鞘影响小鼠的运动能力

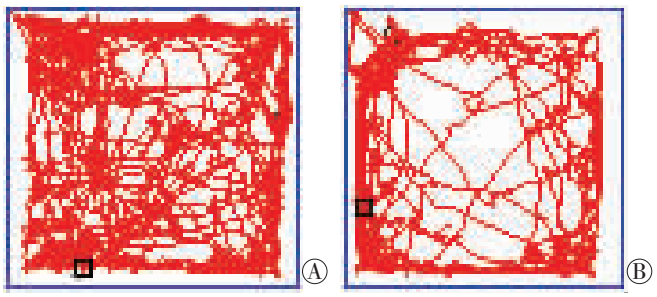
在整个实验过程中，对照组小鼠都能很好地维持在高速旋转棒上，而且很少发生单周抱柱旋转，平均维持总时间在150～160 s。而CPZ诱导脱髓鞘的小鼠，平均维持总时间在开始的第1周快速下降，而且在旋转棒上反复发生单周抱柱旋转，其平均维持总时间一直维持在较低水平，为80～90 s（图4）。



a：$P<0.05$，与对照组比较

图4 旋转棒实验测试CPZ诱导脱髓鞘对运动协调能力的改变

对照组正常小鼠在旷场实验场中10 min运动总路程能达到240 m左右，而CPZ诱导脱髓鞘组的小鼠，表现出运动总路程明显减少（$P<0.05$），其10 min总路程只有160 m左右。进一步分析其高级功能——探索习性的改变，发现CPZ诱导脱髓鞘小鼠在中间区域停留的时间比例和中间区域路程比例同正常小鼠比较并没有发生改变，都维持在3.7%和5.4%左右。总路程减少的同时探索习性并没有受到影响（$P>0.05$）。见图5。



A：对照组运动轨迹；B：CPZ组运动轨迹

图5 旷场实验测试CPZ诱导脱髓鞘对自发活动和探索习性的影响

3 讨论

目前用来研究脱髓鞘疾病的模型主要有实验性自身免疫性脑炎（experimental autoimmune encephalomyelitis，EAE）模型和Cuprizone诱导脱髓鞘模型。EAE模型通过诱导自身免疫性反应，激活T淋巴细胞对抗自身髓鞘组织的大脑炎症反应[15-16]，虽然能很好模拟中枢神经系统炎症改变和自身免疫系统损伤髓鞘等病理过程，但是其建模需要时间长，可变因素多，又是创伤性干预，而且建模不稳定，脱髓鞘有随机性，重复性不好[17]。而Cuprizone诱导脱髓鞘是最常用的脱髓鞘和髓鞘再生模型，此模型只需要通过口服给予药物干预就行，建模稳定可靠，有效，可重复性高。同时，能诱导特异性的中枢神经系统髓鞘形成细胞-少突胶质细胞死亡[18-19]。本实验通过比较LFB+MBP的染色，提示小鼠胼胝体区脱髓鞘非常明显，从形态学充分直接证明了CPZ诱导脱髓鞘模型建立非常成功。免疫荧光双标证明了胼胝体区大量脱髓鞘改变同胼胝体区的少突胶质细胞大量减少是一致和正相关的，提示在髓鞘保护和髓鞘再生过程中，重点关注髓鞘形成细胞—少突胶质细胞的保护和增殖，可能是以后有效改善髓鞘脱失情况的改变，这也是目前针对脱髓鞘疾病采取髓鞘修复和神经保护治疗策略的重点内容之一[20-21]。

Cuprizone诱导脱髓鞘模型建立过程中，监测小鼠的体质量这一整体水平的指标发现：小鼠的脱髓鞘改变可能存在不同的时间窗口。小鼠体质量在前2周的变化是最明显的过程，提示前2周可能是机体发生急性改变的过程，这也跟国外文献报道少突胶质细胞的死亡从2周就很明显相符[7,19]，研究脱髓鞘改变的急性期机制可能要特别关注CPZ诱导脱髓鞘前2周的变化，而后面4周体质量有缓慢恢复，并且趋于一个平台，这可能是一个慢性变化和代偿机制启动的过程，研究机体代偿机制或者药物保护作用可能要关注后4周这个时间窗口期。

脱髓鞘疾病临床症状都伴有运动系统的功能障碍[22]，CPZ诱导脱髓鞘模型对小鼠运动能力的影响是明确的，但对小鼠的运动习性和认知功能是否也有影响，从而影响运动能力表现，对目前的运动能力指标是否具有代表性存在争议。在实验动物模型中，脱髓鞘改变会明显影响小鼠的运动系统功能，尤其是脱髓鞘的轴突传导神经冲动减缓和衰减对运动协调能力影响明显[23]。所以在高速旋转的旋转棒上，运动协调能力

异常的小鼠不能维持自己不掉和不抱柱旋转。本实验通过检测小鼠在高速旋转棒上的停留时间[24]提示,小鼠在诱导脱髓鞘过程中伴随显著的运动协调能力的下降。这种改变是否是由于小鼠的脱髓鞘改变引起的,还是有小鼠运动习性或认知功能改变等高级功能变化而导致运动能力的下降,为了辨别这种改变,本实验利用旷场实验来进一步检测脱髓鞘后小鼠的运动能力和探索习性的改变[25],实验发现小鼠在旷场新环境中的运动总路程减少,而在中间区域停留时间和中间区域运动路程比值并没有改变,提示小鼠的自发活动因其运动能力的影响而明显减少,然而小鼠的探索习性和行为反应并没有受到影响,对其高级认知功能的影响并不明显。从而证明监测运动能力的变化特别是运动协调能力的改变是监测脱髓鞘改变的最好的一个指标[25-26]。

本实验通过对 CPZ 诱导脱髓鞘模型的建立,观察了其整体情况和行为学改变特点,脱髓鞘机制和髓鞘修护机制将是我们以后重点研究方向。本研究为以后的研究奠定了模型基础。

参考文献:

[1] Noseworthy J H, Lucchinetti C, Rodriguez M, *et al*. Multiple sclerosis [J]. N Engl J Med, 2000, 343(13): 938-952.

[2] Wingerchuk D M, Weinshenker B G. Multiple sclerosis: epidemiology, genetics, classification, natural history, and clinical outcome measures [J]. Neuroimaging Clin N Am, 2000, 10(4): 611-624, vii.

[3] Kantarci O H, Weinshenker B G. Natural history of multiple sclerosis [J]. Neurol Clin, 2005, 23(1): 17-38, v.

[4] Trapp B D, Nave K A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? [J]. Annu Rev Neurosci, 2008, 31: 247-269.

[5] Scolding N, Franklin R. Axon loss in multiple sclerosis[J]. Lancet, 1998, 352(9125): 340-341.

[6] Fancy S P, Kotter M R, Harrington E P, *et al*. Overcoming remyelination failure in multiple sclerosis and other myelin disorders[J]. Exp Neurol, 2010, 225(1): 18-23.

[7] Bruce C C, Zhao C, Franklin R J. Remyelination - An effective means of neuroprotection[J]. Horm Behav, 2010, 57(1): 56-62.

[8] Franklin R J, Ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(11): 839-855.

[9] Franklin R J. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? [J]. Nat Rev Neurosci, 2002, 3(9): 705-714.

[10] Suzuki K. Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with cuprizone[J]. Science, 1969, 163(3862): 81-82.

[11] Kondo A, Nakano T, Suzuki K. Blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in twitcher and cuprizone-intoxicated mice[J]. Brain Res, 1987, 425(1): 186-190.

[12] Binder M D, Cate H S, Prieto A L, *et al*. Gas6 deficiency increases oligodendrocyte loss and microglial activation in response to cuprizone-induced demyelination[J]. J Neurosci, 2008, 28(20): 5195-5206.

[13] Matsushima G K, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system [J]. Brain Pathol, 2001, 11(1): 107-116.

[14] Stidworthy M F, Genoud S, Suter U, *et al*. Quantifying the early stages of remyelination following cuprizone-induced demyelination[J]. Brain Pathol, 2003, 13(3): 329-339.

[15] Reynolds R, Cenci-di-Bello I, Dawson M, *et al*. The response of adult oligodendrocyte progenitors to demyelination in EAE[J]. Prog Brain Res, 2001, 132: 165-174.

[16] Jagessar S A, Heijmans N, Blezer E L, *et al*. Unravelling the T-cell-mediated autoimmune attack on CNS myelin in a new primate EAE model induced with MOG34-56 peptide in incomplete adjuvant[J]. Eur J Immunol, 2011, 42(1): 217-227.

[17] Constantinescu C S, Farooqi N, O'Brien K, *et al*. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS) [J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(4): 1079-1106.

[18] 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.

[19] Torkildsen O, Brunborg L A, Myhr K M, *et al*. The cuprizone model for demyelination[J]. Acta Neurol Scand Suppl, 2008, 188: 72-76.

[20] Herring N R, Konradi C. Myelin, copper, and the cuprizone model of schizophrenia[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2011, 3: 23-40.

[21] Van-der-Walt A, Butzkueven H, Kolbe S, *et al*. Neuroprotection in multiple sclerosis: a therapeutic challenge for the next decade[J]. Pharmacol Ther, 2010, 126(1): 82-93.

[22] Degenhardt A, Ramagopalan S V, Scalfari A, *et al*. Clinical prognostic factors in multiple sclerosis: a natural history review[J]. Nat Rev Neurol, 2009, 5(12): 672-682.

[23] Sidenius P, Nagel P, Larsen J R, *et al*. Axonal transport of slow component a in sciatic nerves of hypo- and hyperthyroid rats[J]. J Neurochem, 1987, 49(6): 1790-1795.

[24] Harsan L A, Steibel J, Zaremba A, *et al*. Recovery from chronic demyelination by thyroid hormone therapy: myelinogenesis induction and assessment by diffusion tensor magnetic resonance imaging[J]. J Neurosci, 2008, 28(52): 14189-14201.

[25] Franco-Pons N, Torrente M, Colomina M T, *et al*. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination [J]. Toxicol Lett, 2007, 169(3): 205-213.

[26] Jeon H, Ai J, Sabri M, *et al*. Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage[J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 103.

(**收稿**:2011-12-16;**修回**:2012-01-13)

(编辑 吴培红)