文章编号:1000-5404(2013)05-0381-04

论著

大鼠脊髓压迫性损伤后脱髓鞘病变及MBP、Id2的表达变化

黄思琴[1],漆 伟[2],孙善全[2],汪克建[2],卓 飞[2],蒋 锦[2] (400016 重庆,重庆医科大学:中医药学院[1],神经科学研究中心[2])

[摘要] **目的** 分析脊髓压迫性损伤(compressed spinal cord injury, CSCI)后脱髓鞘病变与髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)、DNA结合抑制物2(inhibitor of DNA binding2,Id2)的表达变化之间的关系,以探讨CSCI脱髓鞘病变机制。**方法** 采用自行设计的方法制作SD大鼠CSCI模型,通过锇酸染色检测CSCI后1、3、7 d有髓神经纤维变化;运用免疫荧光双标和免疫印迹(Western blot)检测MBP及Id2的表达变化。**结果** CSCI后出现脱髓鞘病变,并随着压迫时间延长,髓鞘逐渐发生水肿、变性、崩解;脊髓损伤后MBP表达下调,其表达趋势与脱髓鞘溃变的严重程度一致;CSCI后,Id2广泛分布于白质,随着压迫时间延长,其表达逐渐上调。**结论** Id2表达上调,并负向调控MBP基因启动子的活性,使MBP的表达下降,是CSCI后神经纤维脱髓鞘病变的机制之一。

[关键词] 脊髓压迫性损伤;脱髓鞘病变;髓鞘碱性蛋白;DNA结合抑制物2
[中图法分类号] R341; R363.21; R651.2 [文献标志码] A

Axonal demyelination and alteration of MBP and Id2 expression after compressed spinal cord injury

Huang Siqin[1], Qi Wei[2], Sun Shanquan[2], Wang Kejian[2], Zhuo Fei[2], Jiang Jin[2] ([1]College of Traditional Chinese Medicine; [2]Institute of Neuroscience, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the relationship between axonal demyelination after compressed spinal cord injury (CSCI) and expression of myelin basic protein (MBP) and inhibitor of DNA binding 2 (Id2), and to explore the mechanism of axonal demyelination after CSCI. **Methods** The CSCI model was established with a self-made device. The changes of myelinated nerve fibers in white matter were determined by osmic acid staining at 1, 3 and 7 d following CSCI. MBP and Id2 expression levels were observed by double-labeling immunofluorescence and Western blotting. **Results** Axonal demyelination occurred after CSCI and myelin sheath became swelling, degenerative and breakdown with time extending. The expression of MBP was down-regulated after CSCI, which was consistent with the degree of demyelination. Id2 distributed widely in white matter, and its expression increased along with time extending after CSCI. **Conclusion** MBP and Id2 are associated with axonal demyelination, and may contribute to axonal demyelination after CSCI.

[**Key words**] compressed spinal cord injury; demyelination; myelin basic protein; inhibitor of DNA binding 2

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270437), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10020), the Project of Scientific and Technological of Chongqing Education Committee (KJ120312), the Project of Scientific and Technological Plan of Yuzhong District, Chongqing (20110316), and the Project of Traditional Chinese Medicine Science and Technology of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-2-138). Corresponding author: Sun Shanquan, E-mail: sunsq2151@sohu.com

脱髓鞘病变是脊髓压迫性损伤(compressed spinal cord injury, CSCI)后的重要病理改变之一。该病变可引起神经冲动在传导中发生扩散,阻碍轴突的电传导,导致运动协调性异常,肌肉痉挛或瘫痪等不可逆的神经功能障碍。目前关于CSCI后脱髓鞘的研究报道较少,特别是脱髓鞘病变的机制尚不清楚。资料显示[1-2],髓鞘的主要结构蛋白即髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)受DNA结合抑制物2(inhibitor of DNA binding2,Id2)的负向调控,该蛋白是检测脱髓鞘病变的敏感指标。因此,研究MBP和Id2的表达变化

[基金项目] 国家自然科学基金(30270437);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10020);重庆市教委科学技术研究项目(KJ120312);重庆市渝中区科技计划项目(20110316);重庆市卫生局中医药科技项目(2012-2-138)
[通信作者] 孙善全,E-mail:sunsq2151@sohu.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121229.1008.003.html(2012-12-29)

对认识大鼠CSCI后脱髓鞘病变机制有重要的意义。本研究运用自行设计的方法制作大鼠CSCI模型,观察MBP及Id2的表达变化,分析CSCI后脱髓鞘病变与MBP、Id2的表达变化之间的关系,以探讨CSCI脱髓鞘病变机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年SD大鼠51只,雌雄不拘,SPF级,体质量250~300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,实验过程中对动物处置方法符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。按随机数字表法将大鼠分为3组:正常对照组3只,每个时间点1只;假手术组3只,每个时间点1只;模型组45只,每个时间点15只。在造模过程中,分别于1、3、7 d取材,备用。

1.2 实验试剂及仪器

Id2抗体和MBP抗体购自Santa Cruz公司,少突胶质细胞标记物(rip)购自Millipore公司,驴血清、荧光二抗购自Jackson公司,1%锇酸、1%氯酸钾、浓甲醛溶液、冰醋酸等为国产分析纯试剂,恒冷切片机(Leica CM1900, German),显微照相系统(Olympus-45),激光共聚焦显微镜(leicaTCS-SP2)。

1.3 CSCI模型的制备

正常对照组不作任何处理,假手术组只做全椎板切除术,不做脊髓压迫。用自行设计的大鼠脊髓压迫器[3]制备模型组。用3.5%的水合氯醛腹腔麻醉大鼠后,无菌操作显露胸11至腰3椎板,切除第1腰椎的椎板及前后关节突,显露腰1椎体对应的脊髓,将脊髓压迫钢板直接置于暴露的脊髓上,然后将内固定器卡在胸12的上下后关节突分叉和腰2的棘突根部之间。将螺钉从内固定器小孔内拧入,直至螺钉的前端与压迫钢板接触,然后逐层缝合,将螺帽暴露在皮肤外。待麻醉苏醒后,大鼠下肢及大小便功能须完全正常,显示无脊髓损伤,即造模成功。术后第1天将螺钉拧入相同的圈数造成大鼠双下肢瘫痪,大小便失禁。每日给大鼠挤尿4、5次,并进行抗感染、预防压疮等处理。

1.4 锇酸染色检测有髓神经纤维脱髓鞘变化

用1%锇酸20 mL,1%氯酸钾60 mL,浓甲醛溶液12 mL,冰醋酸1 mL配制浸泡液。在造模后的第1、3、7天,模型组各选择5只大鼠,正常对照组和假手术组各选择1只大鼠。用3.5%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉动物,开胸暴露心脏,经左心室插管至升主动脉起始处,剪开右心耳,用微量泵灌注4 ℃生理盐水200 mL,待流出液清亮后,灌注40 g/L多聚甲醛450 mL,固定后,取出以伤段脊髓为中心,长约2 cm的脊髓组织,将组织投入浸泡液中避光浸泡贮存(室温下)。3 d后取出,流水冲洗组织1~2 d后,30%蔗糖脱水,切片,片厚10 μm,中性树胶封片。在100倍光学显微镜下观察有髓神经纤维结构变化。

1.5 免疫荧光染色检测Id2与rip共表达变化

在造模的第1、3、7天,模型组各选择5只大鼠,正常对照组和假手术组各选择1只大鼠。麻醉动物后,开胸暴露心脏,经左心室,主动脉插管,并剪开右心耳,用微量泵灌注4 ℃生理盐水200 mL,待流出液清亮后,灌注40 g/L多聚甲醛450 mL灌注固定,然后取出以伤段脊髓为中心,长约2 cm的脊髓,30%蔗糖脱水过夜(4 ℃);待脱水完全后,用恒冷冰冻切片机连续切片,片厚10 μm,备用。将不同时间点的冰冻组织切片在0.01 mol/L PBS缓冲液冲洗10 min×3次,在微波炉里高火3 min,低火5 min进行修复,然后自然冷却。用驴血清37 ℃水浴箱封闭1 h。分别滴加羊和小鼠来源的一抗Id2和rip,覆盖标本,切片置于湿盒,4 ℃冰箱孵育24 h。0.01 mol/L PBS缓冲液冲洗10 min×3次。滴加驴抗山羊、抗小鼠的荧光二抗,37 ℃水浴箱孵育1 h。0.01 mol/L PBS冲洗10 min×3次。加DAPI染核,室温5 min,0.01 mol/L PBS冲洗10 min×3次,甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.6 Western blot检测MBP和Id2蛋白表达变化

以β-actin作为内参照,分别取各时间点CSCI脊髓标本约30 mg。加入液氮,研磨组织。根据细胞量吸取全蛋白裂解液1 mL,加入一定量的蛋白酶抑制剂后加入到细胞内,12 000 r/min离心10 min,吸上清,测蛋白浓度。提取总蛋白,Lowry法进行蛋白定量,取上清液煮变性后按照蛋白定量结果进行加样。经12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳2 h。然后转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉37 ℃封闭,室温反应2 h。TBST洗膜后分别加入Id2抗体和MBP抗体孵育,4 ℃过夜。TBST洗膜后加入辣根过氧化物标记的相应二抗,室温反应2 h。TSBT洗膜后加入DAB显色。

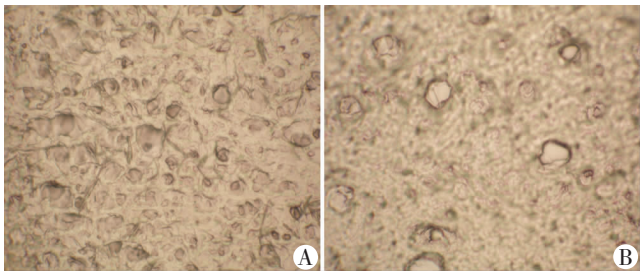
1.7 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 有髓神经纤维结构观察

正常对照组:白质形态正常,有髓神经纤维分布均匀。髓鞘规则、致密;轴浆密度均匀(图1A)。压迫7 d后:白质呈疏网状改变,有髓神经纤维大量缺失,仅可见少量残留。髓鞘水肿、变性,乃至溃变、崩解;残存的有髓神经纤维轴突肿胀,变性(图1B)。

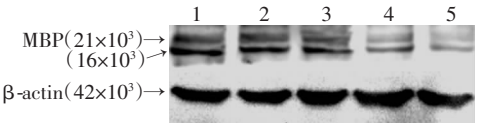


A:正常对照组;B:CSCI后7 d

图1 2组大鼠脊髓神经纤维的结构观察 (TEM ×400)

2.2 Western blot检测MBP的表达变化

各组大鼠在不同时间点的样本在特定的位置均出现特异的免疫染色反应条带,将Western blot结果条带与标准蛋白分子质量对比,正常对照组MBP蛋白表达水平最高;随着脊髓压迫的时间延长,MBP蛋白表达量逐渐下降,在压迫后7 d表达最低。模型组不同时间点的MBP蛋白表达量与正常对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$,图2、表1)。



1:正常对照组;2:假手术组;3:造模 1 d 组;4:造模 3 d 组;5:造模 7 d 组

图 2　Western blot 检测各组大鼠在造模 1、3、7 d 后 MBP 蛋白表达变化

表 1　半定量分析各组大鼠在造模 1、3、7 d 后 MBP 蛋白的表达变化

($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d
正常对照组	0.687 ± 0.011	0.686 ± 0.012	0.689 ± 0.010
假手术组	0.571 ± 0.011	0.572 ± 0.010	0.574 ± 0.012
模型组	0.468 ± 0.011[a]	0.352 ± 0.009[ab]	0.283 ± 0.006[abc]

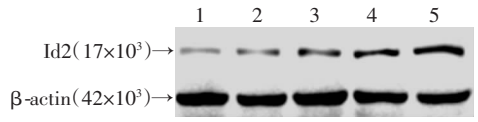
a: $P<0.05$, 与正常对照组比较; b: $P<0.05$, 与 1 d 比较; c: $P<0.05$, 与 3 d 比较

2.3　Id2 荧光双标观察

正常组 Id2 免疫阳性少突胶质细胞散在分布于白质里; CSCI 后 Id2 免疫阳性少突胶质细胞逐渐增多,在压迫后 7 d 荧光强度最大,Id2 免疫阳性少突胶质细胞广泛分布于白质内。共聚焦显微镜可观察到 Id2 和少突胶质细胞共存的情况(图 3)。

2.4　Western blot 检测 Id2 的表达变化

各组在造模 1、3、7 d 的样本在特定的位置均出现特异的免疫染色反应条带,将 Western blot 结果条带与标准蛋白分子质量相对比,正常对照组细胞质 Id2 蛋白表达水平最低;脊髓压迫后 1、3、7 d,Id2 蛋白表达量均逐渐增高,第 7 天达到峰值。模型组不同时间点的 Id2 蛋白表达量与正常对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 4、表 2)。



1:正常对照组;2:假手术组;3:造模 1 d 组;4:造模 3 d 组;5:造模 7 d 组

图 4　Western blot 检测各组大鼠在造模 1、3、7 d 后 Id2 蛋白表达变化

表 2　半定量分析各组大鼠在造模 1、3、7 d 后 Id2 蛋白表达变化

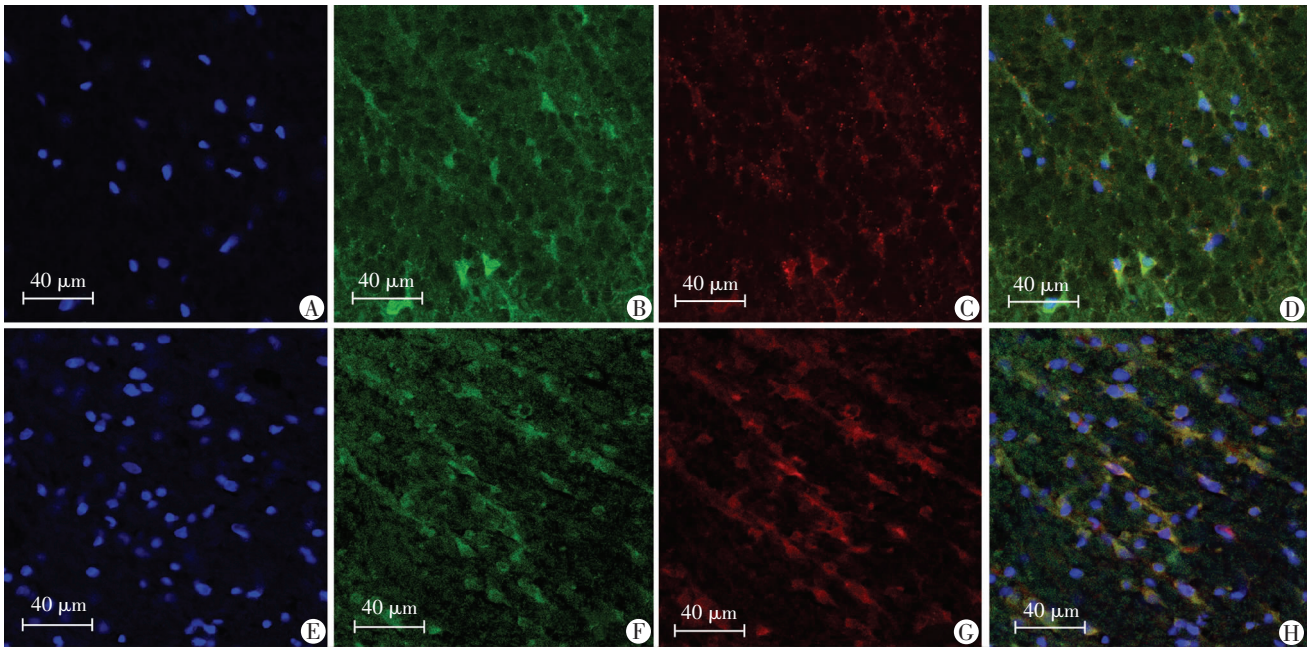
($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d
正常对照组	0.118 ± 0.001	0.117 ± 0.002	0.119 ± 0.001
假手术组	0.128 ± 0.002	0.127 ± 0.001	0.129 ± 0.001
模型组	0.169 ± 0.001[a]	0.281 ± 0.009[ab]	0.403 ± 0.001[abc]

a: $P<0.05$, 与正常对照组比较; b: $P<0.05$, 与 1 d 比较; c: $P<0.05$, 与 3 d 比较

3　讨论

CSCI 是脊柱外科常见而严重的损伤,脱髓鞘病变是其重要的病理改变之一。该病变将导致脊髓发生严重的神经功能障碍,对患者的精神及身体健康造成巨大的伤害[4-5]。目前关于神经纤维脱髓鞘病变及其机制的研究结果多是基于化学药物诱导[6]、自身免疫诱导[7]、病毒诱导[8]等脱髓鞘模型获得的,而关于脊髓机械性损伤,尤其是压迫性损伤造成的脱髓鞘病变研究报道相对较少。由于诱导脱髓鞘的条件不同,其病理改变和分子机制也不尽相同[9],因此,对 CSCI 脱髓鞘病变及其机制的研究具有十分重要的意义。



A、E:DAPI 标记细胞核;B、F:rip 的表达(FITC 标记染色);C、G:Id2 的表达(TRITC 标记染色);D、H:白质里 Id2 与 rip 共表达,散在分布(免疫双标);A ~ D:正常对照组;E ~ H:模型组

图 3　共聚焦显微镜观察正常对照组和模型组大鼠脊髓 Id2 与 rip 的共表达情况　(×800)

中枢神经系统(central nervous system, CNS)的髓鞘,主要由MBP和髓鞘蛋白脂蛋白(PLP)构成,两者占髓鞘总成分的80% ~85%[10]。其中MBP是CNS髓鞘的主要结构蛋白[11],位于髓鞘浆膜面,具有神经组织特异性[12],在维持CNS髓鞘结构和功能的稳定中发挥重要的作用。同时,MBP也是检测脱髓鞘病变的关键和敏感的指标。研究表明,在多发性硬化等CNS脱髓鞘病变过程中,MBP发生崩解,引起神经功能障碍[13]。本实验运用自行设计的方法制作CSCI模型,通过锇酸染色观察到CSCI后,脊髓神经纤维髓鞘和轴突逐渐出现水肿、变性,并随时间延长逐渐加重(图1)。Western blot结果显示,压迫后1 d,MBP的表达明显减少,之后逐渐下降,于第7天降到最低($P<0.05$,图2)。上述结果提示:CSCI后发生脱髓鞘病变,并随着压迫时间延长,髓鞘溃变程度逐渐加重;CSCI后,MBP发生崩解,MBP蛋白表达下调趋势与神经纤维脱髓鞘溃变的严重程度相一致。本研究还检测了与MBP密切相关的Id2的表达变化。Id2广泛存在于CNS,在神经系统生长发育和损伤修复过程中,主要是促进神经系统的细胞增殖、抑制细胞分化。Id2属于少突胶质细胞转录因子(oligodendrocyte lineage gene, Olig)家族。除Id2以外,该家族还包括碱性螺旋-环-螺旋(basic Helix-loop-helix, bHLH)蛋白,该蛋白分为A、B两种类型,A型含有E蛋白,B型含Olig1/Olig2等转录因子[14]。研究报道,Id2可与A型的E蛋白结合形成二聚体,阻断与Olig1/Olig2的结合,负向调控Olig的作用[15]。另外,Id2可直接与Olig1/Olig2结合从而抑制Olig的作用[16]。不仅如此,Id2和Olig1/Olig2可以相互作用负向调节MBP基因启动子的活性[17]。本实验免疫荧光双标结果显示:于正常对照组,Id2阳性少突胶质细胞在脊髓白质呈散在分布;而在脊髓受压7 d后,Id2阳性少突胶质细胞在整个白质均有分布(图3)。Western blot结果也显示:Id2蛋白表达随着压迫时间延长逐渐上调,在压迫7 d后达到峰值($P<0.05$,图4)。以上表明CSCI后,神经纤维发生脱髓鞘病变,并随压迫时间延长而逐渐加重;Id2表达上调,其表达趋势与MBP蛋白的表达呈负相关,Id2负向调控MBP基因启动子活性,使MBP的表达下降,后者导致神经纤维脱髓鞘病变的进行性加重。

综上所述,Id2和MBP的表达变化与CSCI后脱髓鞘病变关系密切,是CSCI后神经纤维脱髓鞘病变的机制之一。本研究为进一步探讨CSCI脱髓鞘病变机制及其干预性治疗提供了实验基础。

参考文献:

[1] Hallpike J F, Adams C W. Proteolysis and myelin breakdown: a review of recent histochemical and biochemical studies[J]. Histochem J, 1969, 1(6): 559 - 578.

[2] Jessen K R, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease[J]. Glia, 2008, 56(14): 1552 - 1565.

[3] 梁益建, 孙善全, 汪克建, 等. 大鼠脊髓慢性压迫性损伤实验模型的建立[J]. 中国临床解剖学杂志, 2006, 24(3): 318 - 324.

[4] All A H, Bazley F A, Gupta S, *et al*. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors aid in functional recovery of sensory pathways following contusive spinal cord injury[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47645.

[5] OGorman C, Lucas R, Taylor B. Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(9): 11718 - 11752.

[6] Bai L, Lennon D P, Caplan A I, *et al*. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models[J]. Nat Neurosci, 2012, 15(6): 862 - 870.

[7] Gong Y, Wang Z, Liang Z, *et al*. Soluble MOG35-55/I-A(b) dimers ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by reducing encephalitogenic T cells[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47435.

[8] Kim B S, Jin Y H, Meng L, *et al*. IL-1 signal affects both protection and pathogenesis of virus-induced chronic CNS demyelinating disease [J]. J Neuroinflammation, 2012, 9(1): 217.

[9] Bieber A J, Warrington A, Asakura K, *et al*. Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice[J]. Glia, 2002, 37(3): 241 - 249.

[10] Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, *et al*. Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons [J]. J Cell Biol, 1986, 102(2): 384 - 392.

[11] Kuboyama K, Fujikawa A, Masumura M, *et al*. Protein tyrosine phosphatase receptor type z negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48797.

[12] DeBruin L S, Haines J D, Wellhauser L A, *et al*. Developmental partitioning of myelin basic protein into membrane microdomains [J]. J Neurosci Res, 2005, 80(2): 211 - 225.

[13] Inglis H R, Greer J M, McCombe P A. Gene expression in the spinal cord in female lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis induced with myelin basic protein [J]. PLoS One, 2012, 7 (11): e48555.

[14] Bhattacharya A, Baker N E. A network of broadly expressed HLH genes regulates tissue-specific cell fates[J]. Cell, 2011, 147(4): 881 - 892.

[15] Teachenor R, Beck K, Wright LY, *et al*. Biochemical and phosphoproteomic analysis of the helix-loop-helix protein E47[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(9): 1671 - 1682.

[16] Gokhan S, Marin-Husstege M, Yung S Y, *et al*. Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression[J]. J Neurosci, 2005, 25(36): 8311 - 8321.

[17] Samanta J, Kessler J A. Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation[J]. Development, 2004, 131(17): 4131 - 4142.

[18] Jessen K R, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease [J]. Glia, 2008, 56(14): 1552 - 1565.

(**收稿**:2012-10-25;**修回**:2012-12-17)

(编辑 龙 亮)