文章编号:1000-5404(2013)13-1331-06

论著

不同双环己酮草酰二腙剂量诱导小鼠行为学改变及海马CA1区和DG区内有髓神经纤维改变

李永德[1,2],王 芸[1,2],程国华[1,2],彭 超[1,2],陈 林[1,2],卢 伟[1,2],孔吉明[3],肖 岚[4],唐 勇[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院人体解剖与组织胚胎教研室[1],干细胞与组织工程教研室[2];加拿大,加拿大曼尼托巴大学人体解剖与细胞科学系[3];400038 重庆,第三军医大学基础医学部组织与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所[4])

[摘要] **目的** 探讨双环己酮草酰二腙(cuprizone,CPZ)喂养动物模型作为精神分裂症动物模型的合适剂量和CPZ剂量、海马脱髓鞘改变和行为学改变间的关系。**方法** 使用0.2%、0.3%、0.4%(质量分数)3种剂量CPZ喂养C57BL/6鼠6周,与控制组比较体质量、生存时间和行为学的改变情况,运用免疫组化和光密度比较各组小鼠海马CA1区和DG区内髓鞘改变情况,使用体视学方法研究0.2% CPZ组小鼠海马分区内有髓神经纤维改变情况。**结果** 0.4% CPZ组小鼠生存时间显著性低于控制组($P<0.01$),控制组、0.2% CPZ组和0.3% CPZ组的生存时间无统计学差异($P>0.05$)。CPZ喂养组小鼠体质量显著性低于控制组($P<0.05$),且剂量越高,体质量丢失越严重。0.2% CPZ组小鼠旷场实验在中央区域的活动显著性增高($P<0.05$)。0.2% CPZ组和0.3% CPZ组小鼠海马CA1区MBP染色的平均光密度值显著性低于控制组($P<0.01$),0.2% CPZ组小鼠海马DG区MBP染色的平均光密度值显著性低于控制组和0.3% CPZ组($P<0.01$)。控制组和0.2% CPZ组海马CA1区和DG区体积无显著性差异($P>0.05$)。0.2% CPZ组海马CA1区和DG区内有髓神经纤维长度密度和总长度显著性低于控制组($P<0.05$)。**结论** 0.2% CPZ为用于诱导精神分裂症动物模型的适合CPZ剂量,0.2% CPZ喂养6周可导致小鼠海马CA1和DG区内有髓神经纤维脱髓鞘。

[关键词] 双环己酮草酰二腙;精神分裂症;海马;有髓神经纤维;体视学
[中图法分类号] R-332; R338.11; R749.15 [文献标志码] A

Different doses of cuprizone induce mice behavior alterations and changes of myelinated nerve fibers in hippocampal CA1 and DG regions

Li Yongde[1,2], Wang Yun[1,2], Cheng Guohua[1,2], Peng Chao[1,2], Chen Lin[1,2], Lu Wei[1,2], Kong Jiming[3], Xiao Lan[4], Tang Yong[1,2] ([1]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, [2]Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China; [3]Department of Human Anatomy and Cell Science, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada; [4]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical university, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore an appropriate dose of cuprizone (CPZ) for the CPZ-fed animal model as a novel schizophrenia animal model, and to investigate the possible relationship among CPZ dose, demyelination of nerve fibers in hippocampus and behavior alternations in CPZ-fed mice. **Methods** C57BL/6 mice were fed with 0.2%, 0.3% and 0.4% (w/w) of CPZ for 6 weeks, respectively, and the mice without any treatment were used as control. The body weight, survival time and behavior changes were compared between the CPZ-fed mice and the control mice. The myelin basic protein (MBP)-positive nerve fibers in CA1 and DG regions of hippocampus were stained with immunohistochemical methods, and the mean optical density (OD) of MBP-positive nerve fibers in the hippocampal CA1 and DG regions of each group were calculated and compared. The changes of the myelinated nerve fibers in CA1 and DG regions of hippocampus between the control group and 0.2% CPZ group were investigated with a stereological method. **Results** The survive time of the 0.4% CPZ group was significantly less than that of control group ($P<0.01$). The body weight of the CPZ-fed groups was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$), and the weight loss increased along with the increase of CPZ doses. In open field test, the mice fed with 0.2% of CPZ spent significantly

[基金项目] 国家自然科学基金(30973155,81171238);重庆市"百名学术学科领军人才"培养计划(2012)
[通信作者] 唐 勇, E-mail:ytang062@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130308.1536.004.html(2013-03-08)

more time in the central area of box compared with the control group ($P<0.05$). The ODs of MBP-positive fibers in CA1 region of hippocampus in the 0.2% CPZ group and 0.3% CPZ group were significantly lower than that in the control group ($P<0.01$). The OD of MBP-positive fibers in DG region of hippocampus in the 0.2% CPZ group was significantly lower than that in the control group and 0.3% CPZ group ($P<0.01$). The volumes of CA1 and DG regions of the hippocampus in the 0.2% CPZ group were not significantly different from those in the control group ($P>0.05$). The length density and total length of the myelinated nerve fibers in CA1 and DG regions of hippocampus in the 0.2% CPZ group were significantly less than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** 0.2% CPZ (w/w) was the appropriate dose for CPZ-fed animal model to mimic schizophrenia. The myelinated fibers in CA1 and DG regions of hippocampus undergo demyelination when mice are exposed to 0.2% CPZ for 6 weeks.

[**Key words**] cuprizone; schizophrenia; hippocampus; myelinated nerve fibers; stereology

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973155, 811171238), the Cultivation Plan for 100 Academic and Discipline Talented Leaders of Chongqing (2012). Corresponding author: Tang Yong, Tel: 86-23-68485633, E-mail: ytang062@163.com

精神分裂症常发病于青壮年,是危害人类健康的最常见、最严重的精神疾病之一。随着对精神分裂症的研究深入,已经证实精神分裂症患者大脑存在结构改变。其中许多研究都指出精神分裂症患者大脑内存在有髓神经纤维改变,其证据包括影像学发现精神分裂症患者白质改变[1-3],尸检发现患者的额叶白质脱髓鞘改变[4],基因学研究显示精神分裂症患者大脑内少突胶质细胞的相关基因表达异常[5-6]。基于精神分裂症患者大脑白质病变和精神病症状的特点,双环己酮草酰二腙(cuprizone,CPZ)喂养C57BL/6鼠的动物实验也被用于精神分裂症动物模型使用,因该动物模型可以诱导明显的中枢神经系统脱髓鞘[7-8],同时伴随着小鼠行为学改变[9-10],文献[8]报道CPZ喂养小鼠海马内也存在脱髓鞘改变。一直以来利用CPZ喂养的研究都侧重于胼胝体区域改变,喂养剂量为0.2%(质量分数)[11]。但是,提高CPZ剂量是否能引起更严重的行为学异常和脱髓鞘改变以模拟更严重的精神分裂症症状,以及海马改变程度、行为学改变与剂量间的关系尚少见报道。因此,本研究将CPZ喂养小鼠分为0.2%、0.3%和0.4%(质量分数)3种不同CPZ剂量组,探讨高剂量CPZ(0.3%和0.4%)喂养的小鼠作为精神分裂症动物模型的可行性,并寻找CPZ喂养剂量与小鼠行为学改变和海马脱髓鞘间的可能关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物和实验设计

选用6周龄的雄性C57BL/6小鼠作为实验对象,共80只,所有小鼠购买于重庆医科大学实验动物中心。实验药品选用CPZ,购买于Sigma-Aldrich公司。本实验分组共4组,分为控制组、0.2% CPZ组、0.3% CPZ组和0.4% CPZ组,每组小鼠各20只。控制组小鼠喂养普通动物饲料,饮水为蒸馏水。CPZ组的小鼠喂养饲料为掺杂有CPZ的普通动物饲料,饮水为蒸馏水。各CPZ组喂养掺杂不同剂量CPZ的动物饲料,0.2% CPZ组饲料为加入有0.2%质量分数CPZ粉末的普通动物饲料,其余组以此类推。小鼠购回后,按照体质量平均分配至4组,经过1周的适应期后开始实验。实验期间,小鼠体质量每隔3~4天测量1次,并随时记录死亡小鼠的死亡时间。实验进行至4周时,每组随机抽取10只进行CPZ喂养4周的相关实验并在生存分析中记录为4周后右删失数据,剩余小鼠将喂养至实验结束。实验第6周各组小鼠进行行为学测试,并于行为学测试结束后的第2天,所有小鼠被麻醉处死并取出大脑进行免疫组织化学研究和体视学定量研究,同时在生存分析中记录为6周后右删失数据。如实验中出现某组小鼠大量死亡,该组将不再进行实验(如本实验中的0.4% CPZ组)。

1.2 行为学测试

各组小鼠在实验第6周进行行为学测试,实验项目包括:旷场实验、Morris水迷宫、探孔实验和转棒实验。具体实验方法见文献[17-18]。

1.3 标本固定与取材

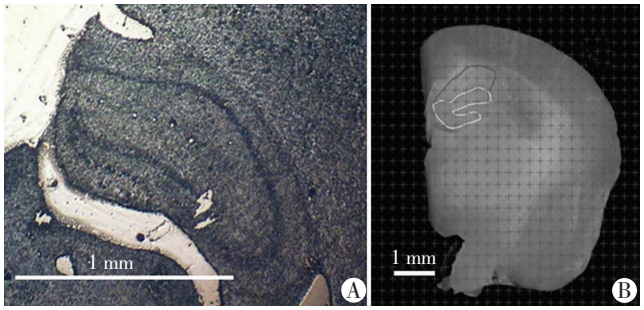
在小鼠完成以上行为学测试的第2天,小鼠经4%水合氯醛腹腔麻醉。接着采用DHL-3型灌注泵进行心脏灌注固定,先以8 mL/min的速度先后灌注0.9%的生理盐水30 mL,再以同样流速用4%多聚甲醛溶液60 mL固定。待灌注固定完成后取出小鼠大脑,沿矢状缝将大脑分离为左右两侧半脑。随机选择一侧半球于4%多聚甲醛中固定,用于免疫组化染色研究;另一侧半球使用4%琼脂进行包埋,用于体视学研究。

1.4 免疫组织化学染色和图像分析

选用抗髓鞘碱性蛋白抗体(anti-MBP 1∶500, Covance公司)作为一抗。将在多聚甲醛中固定的小鼠脑进行石蜡包埋后,作4 μm连续冠状石蜡切片,从连续切片中,每间隔20张切片抽取一张,用以进行免疫组织化学染色。切片用二甲苯脱蜡,0.01 mol/L PBS液漂洗之后进行枸橼酸热修复。30%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶20 min,PBS液漂洗后封闭血清37 ℃水浴,甩干后滴加一抗4 ℃过夜,之后滴加二抗和辣根酶标记链霉素卵白素,37 ℃中水浴20 min,PBS液漂洗后DAB显色。封片后使用连接有摄像系统的显微镜拍摄MBP染色切片。所有图片使用Image Pro Plus软件进行光密度值分析,统计分析参数为MBP染色切片的平均光密度。

1.5 电镜标本制作

将已经用琼脂包埋后的小鼠大脑半球沿冠状平面切成 1 mm 厚的连续脑片并在解剖显微镜下拍照(×10),平均一侧大脑半球可以获得 8~9 张脑片。将包含有海马结构的脑片沿枕面取一张 10 μm 的冠状冰冻切片,立即用甲苯胺蓝染色显示海马内神经元,以此作为区分海马内分区的依据(图 1A)。使用显微镜观察已被甲苯胺蓝显色的切片,同时比对小鼠大脑解剖图谱,在对应的脑片照片上确定海马 CA1 区和 DG 区的范围(图 1B)。在出现海马的脑片上,根据其照片中确定的 CA1 区和 DG 区范围,分别在 CA1 区和 DG 区内随机部位选取 1 mm^3 的组织小块制作电镜标本。将组织块在 4 ℃中用 4% 的戊二醛浸泡固定 2 h,经 0.1 mol/L PBS 液(pH 7.2)冲洗 3 次后用锇酸(OSO_4)在 4℃条件下固定 2 h。经 50%、70%、90% 的乙醇,90% 乙醇与 90% 丙酮混合物及 100% 丙酮溶液逐渐脱水后,浸泡在 100% 环氧树脂(618)中。将浸透好的组织块先用"球切法"(Isector)包埋成直径 5 mm 的小球,再按常规电镜包埋方法用树脂包埋小球。每一组织块随机切取 1 张 60 nm 厚的超薄切片。在透射电镜下每张切片放大 6 000 倍和 20 000 倍后随机抽取 10~15 个视野拍照。



A:海马冰冻切片 (甲苯胺蓝染色×40); B:分别计数落在海马 CA1 区和 DG 区内的计数点 (×10)

图 1 海马分区定位和体视学计算海马分区体积的方法

1.6 体视学定量分析

1.6.1 海马分区 CA1 和 DG 区体积 在已染色比对并确定海马 CA1 区和 DG 区的脑片照片上叠加计数测点,并分别计数每只动物所有击中海马分区 CA1 和 DG 区的测点数(图 1B),分别记为 ΣP_{CA1} 和 ΣP_{DG}。根据卡瓦列里原理公式计算体积[12-13]

$$V_{CA1} = 2 \times \Sigma P_{CA1} \times a(p) \times t \quad (1)$$

$$V_{DG} = 2 \times \Sigma P_{DG} \times a(p) \times t \quad (2)$$

V_{CA1} 和 V_{DG} 分别表示海马 CA1 体积和海马 DG 体积,a(p)表示每个测点代表的面积(每一测点代表的面积为 0.062 5 mm^2),t 表示脑片的厚度(1 mm)。

1.6.2 有髓神经纤维长度密度和总长度 在电镜照片上叠加无偏计数框[14],计数完全落在无偏计数框内和只与计数线(虚线)相交的有髓神经纤维断面,不计数与禁止线(实线)相交的有髓神经纤维断面(图 2)。海马分区 CA1 区和 DG 区内有髓神经纤维的长度密度根据下列公式计算[12-13]

$$L_v(mf/CA1) = 2 \times Q(mf)/\Sigma A_{CA1} \quad (3)$$

$$L_v(mf/DG) = 2 \times Q(mf)/\Sigma A_{DG} \quad (4)$$

$L_v(mf/CA1)$ 和 $L_v(mf/DG)$ 分别表示海马 CA1 区和 DG 区内有髓神经纤维的长度密度,Q(mf)表示所有无偏计数框计数的纤维断面数,ΣA_{CA1} 和 ΣA_{DG} 分别表示在海马 CA1 区和 DG 区电镜照片中所使用的无偏计数框的总面积。海马 CA1 区和 DG 区内有髓神经纤的总长度的计算公式为[12-13]

$$L(mf,CA1) = L_v(mf/CA1) \times V_{CA1} \quad (5)$$

$$L(mf,DG) = L_v(mf/DG) \times V_{DG} \quad (6)$$

L(mf, CA1)和 L(mf, DG)分别为海马 CA1 区和 DG 区内有髓神经纤维的总长度。

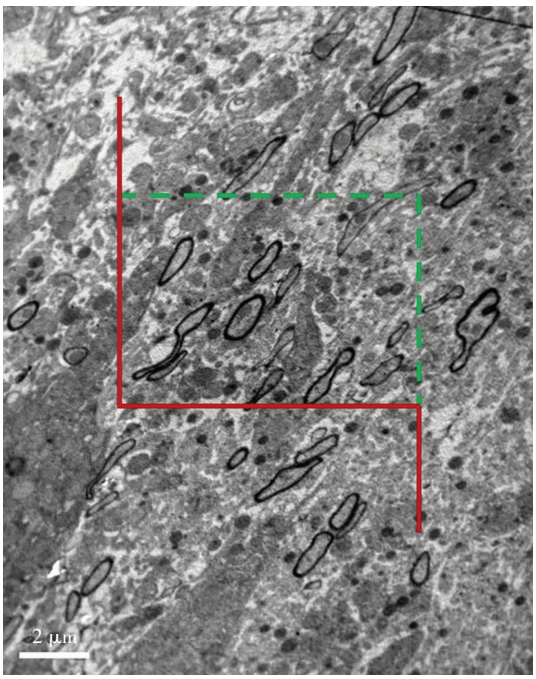


图 2 体视学计数海马分区内有髓神经纤维断面数的方法

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件,运用单因素方差分析比较各组小鼠的体质量改变、探孔实验、转棒实验、旷场实验、水迷宫可见和撤除平台行为学数据,以及 MBP 染色切片的光密度值。生存分析统计各组生存时间的差异性,利用重复测量统计分析水迷宫不可见平台行为学数据。体视学结果采用非参数检验。

2 结果

2.1 生存时间改变

生存分析结果显示,0.4% CPZ 组的小鼠的中位存活时间为 2.57 周,其的生存时间显著低于控制组小鼠($P<0.01$)。0.2% CPZ 组、0.3% CPZ 组和控制组小鼠的中位存活时间均为 6 周,3 组间无统计学差异($P>0.05$)。

2.2 体质量变化

实验开始时各组小鼠的体质量无显著性差异($P>0.05$)。实验第 1 周开始,喂养含 CPZ 饲料的小鼠组平均体质量始终显著低于控制组($P<0.01$,表 1)。第 2 周开始,0.3% CPZ 组小鼠平均体质量始终显著性低于 0.2% CPZ 组($P<0.05$),0.4% CPZ 组小鼠平均体质量始终显著性低于 0.3% CPZ 组($P<0.05$,表 1)。

2.3 行为学改变

2.3.1 旷场实验 旷场实验中,0.2% CPZ 组小鼠在中央区域活动时间和中间区域活动路程/总路程的比率均显著性高于控制组小鼠($P<0.05$),0.3% CPZ 组小鼠在旷场实验行为学测试中的表现与控制组小鼠无显著性差异($P>0.05$,表 2)。

表1　6周实验期内4组小鼠体质量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第0周	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
控制组	20	17.07±1.34	18.48±1.47	19.24±1.43	19.71±1.42	19.61±1.45	20.02±1.25	19.93±1.70
0.2% CPZ 组	20	16.98±1.16	15.65±1.28[a]	16.09±1.66[a]	15.83±1.94[a]	16.06±2.19[a]	17.34±2.39[a]	17.12±2.46[a]
0.3% CPZ 组	20	17.17±1.36	15.60±1.30[a]	14.50±1.44[ab]	13.70±1.24[ac]	13.99±1.27[ac]	13.98±1.45[ac]	13.72±1.51[ac]
0.4% CPZ 组	20	16.89±1.01	15.23±1.63[a]	13.20±1.06[acd]	12.29±1.07[acd]			

a：$P<0.01$，与控制组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与0.2% CPZ组比较；d：$P<0.05$，与0.3% CPZ组比较

表2　3组小鼠的旷场实验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	中央区域活动时间（s）	中央区域活动路程（mm）	总路程（mm）	中央区域路程/总路程	周围区域路程（mm）
控制组	10	12.69±11.24	596.49±375.02	12 688.96±2 487.79	0.05±0.03	12 092.47±2 280.95
0.2% CPZ 组	9	38.22±30.96[a]	1 485.69±1 006.97	14 568.18±4 022.35	0.09±0.05[a]	13 082.49±3 285.92
0.3% CPZ 组	10	10.07±12.29	671.44±699.29	14 851.29±5 729.10	0.04±0.03	14 179.85±5 296.39

a：$P<0.05$，与控制组比较

表3　3组小鼠水迷宫可见平台实验和撤除平台实验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	水迷宫可见平台实验			水迷宫撤除平台实验		
		潜伏期(s)	总路程(mm)	速度(mm/s)	平台象限活动距离(mm)	平台象限活动时间(s)	穿台次数
控制组	10	143.27±56.53	39 046.75±13 605.00	231.26±34.57	14 817.26±1 770.34	61.89±9.05	3.85±1.87
0.2% CPZ 组	9	99.41±49.10	31 044.38±14 779.27	229.70±32.69	15 931.83±3 976.07	63.35±12.03	4.72±2.03
0.3% CPZ 组	10	146.75±58.27	43 299.63±16 672.16	248.32±43.09	14 393.18±3 895.52	61.15±16.62	3.15±2.08

2.3.2　Morris水迷宫　3组小鼠在水迷宫可见平台和撤平台测试的行为学表现均无显著性差异($P>0.05$，表3)。在连续4d的隐藏平台获得测试中，每天的各组小鼠的逃避潜伏期之间均不存在统计学差异($P>0.05$，表4)。

表4　3组小鼠水迷宫隐藏平台获得实验的行为学研究结果(s，$\bar{x} \pm s$)

组别	n	第1天	第2天	第3天	第4天
控制组	10	112.79±85.27	77.40±44.11	77.70±49.91	71.77±38.95
0.2% CPZ 组	9	91.47±44.93	45.01±24.40	61.64±38.59	54.59±30.36
0.3% CPZ 组	10	162.18±69.73	97.22±79.03	82.79±37.14	80.24±63.47

2.3.3　探孔实验和转棒实验　0.3% CPZ组、0.2% CPZ组和控制组小鼠在探孔实验和转棒实验中的行为学表现无统计学差异($P>0.05$，表5)。

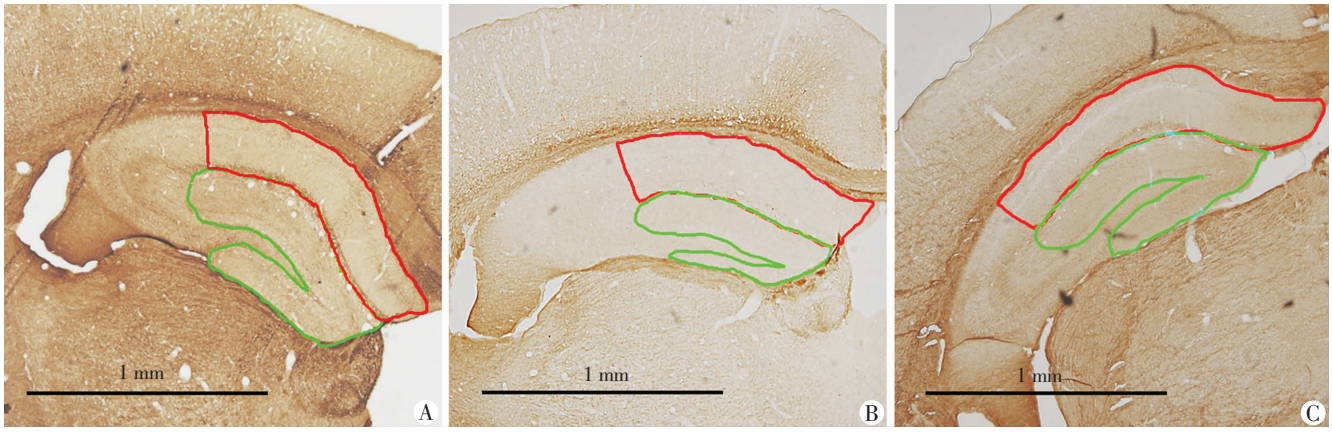
2.4　免疫组织化学染色和光密度比较

控制组海马CA1区域MBP染色阳性的纤维明显多于0.2% CPZ组和0.3% CPZ组。但是控制组海马DG区MBP阳性的纤维只明显多于0.2% CPZ组，与0.3% CPZ组海马DG区差异不明显(图3)。

控制组海马CA1区域MBP染色的光密度值(0.19±0.03)显著高于0.2% CPZ组(0.16±0.04)和0.3% CPZ组(0.16±0.03)($P<0.01$)，控制组的海马DG区MBP染色的光密度值(0.19±0.03)显著高于0.2% CPZ组(0.16±0.04)($P<0.01$)，与0.3% CPZ组海马DG区光密度(0.18±0.04)无显著差异($P>0.05$)。通过以上实验结果，我们发现0.2% CPZ组在行为学、免疫组化等方面更符合精神分裂症模型，所以在后续的体视学研究中，仅进行了控制组和0.2% CPZ组小鼠海马的比较。

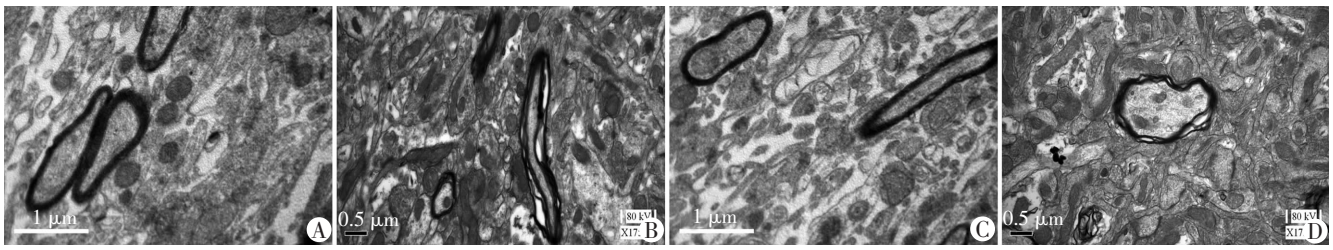
表5　3组小鼠的探孔实验和转棒实验行为学研究结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	探孔实验		转棒实验
		3 min内探孔数	5 min内探孔数	掉落时间(s)
控制组	10	19.30±14.23	28.30±21.02	140.80±52.64
0.2% CPZ 组	9	15.11±12.10	20.22±16.80	119.11±45.81
0.3% CPZ 组	10	9.80±8.47	14.70±10.60	157.40±53.54



A：控制组；B：0.2% CPZ组；C：0.3% CPZ组　红色线条框入的区域为海马CA1区，绿色线条框入的区域为海马DG区

图3　3组小鼠海马免疫组织化学染色结果　(S-P ×40)



A:控制组小鼠海马CA1区(×20 000);B:0.2% CPZ组小鼠海马CA1区(×17 500);C:控制组小鼠海马DG区(×20 000);D:0.2% CPZ组小鼠海马DG区(×17 500)

图4 透射电镜观察小鼠海马分区内有髓神经纤维变化

表6 控制组和0.2% CPZ组小鼠海马CA1区和DG区体积和有髓神经纤维的体视学结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	海马CA1区体积(mm^3)	海马DG区体积(mm^3)	海马CA1区内有髓神经纤维长度密度(m/m^3)	海马DG区内有髓神经纤维长度密度(m/m^3)	海马CA1区内有髓神经纤维总长度(m)	海马DG区内有髓神经纤维总长度(m)
控制组	6.00±1.18	4.00±0.78	100.67±67.47	107.87±52.65	634.41±532.69	430.18±219.56
0.2% CPZ组	5.30±1.02	3.63±0.67	37.51±18.65[a]	35.56±19.62[b]	194.90±86.47[a]	129.22±87.88[a]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与控制组比较

2.5 电镜结果

空白对照组小鼠海马分区内有髓神经纤维髓鞘均匀致密,CPZ组小鼠海马分区内有髓神经纤维出现明显的脱髓鞘改变(图4)。

2.6 体视学结果

0.2% CPZ组小鼠海马CA1区和DG区的体积均与控制组小鼠无统计学差异($P>0.05$)。0.2% CPZ组小鼠海马CA1区和DG区内有髓神经纤维长度密度和有髓神经纤维的总长度均显著性小于控制组小鼠($P<0.05$,$P<0.01$,表6)。

3 讨论

在生存时间和体质量改变的比较中,0.4% CPZ组小鼠的存活时间显著性低于控制组小鼠,在实验初期即表现出较高死亡率;实验第6周0.3% CPZ组小鼠体质量约为控制组平均体质量的2/3,显著性低于控制组,可能与存在严重的机体功能障碍有关。这些研究提示0.3%和0.4%剂量的CPZ喂养C57BL/6鼠并不适合作为精神分裂症动物模型。本实验结果进一步表明,0.2% CPZ剂量是建立精神分裂症样动物模型的最合适剂量。

本实验CPZ组小鼠的行为学改变出现在旷场实验中,0.2% CPZ组的中央区域活动显著性增加,提示该组小鼠对焦虑情绪反应迟钝[15]。而且,0.2% CPZ组小鼠行为学改变程度较0.3% CPZ组更为明显。其他行为学测试并未发现CPZ小鼠与控制组小鼠存在显著性差异。本研究发现的0.2% CPZ组小鼠行为学改变特点与以前的研究报道一致[9-10,16]。

各组小鼠海马切片MBP染色比较中,0.2% CPZ组和0.3% CPZ组在海马CA1区MBP染色的平均光密度值显著性低于控制组,0.2% CPZ组小鼠的海马DG区的平均光密度值显著性低于控制组。但是,0.3% CPZ组的海马DG区的平均光密度值与控制组无显著性差异,出现这一结果的原因尚不清楚。综合对比0.2% CPZ组和0.3% CPZ组小鼠在本次实验中各个项目结果,0.3% CPZ组小鼠的行为学异常并未随着CPZ剂量的增高而更加明显,反而0.2% CPZ组小鼠的行为学异常更加明显且固定,这可能是因为0.3% CPZ剂量已经造成小鼠机能损害的原因。另一方面,0.2% CPZ组和0.3% CPZ组小鼠海马分区的光密度差异提示,不同剂量的CPZ引起的海马脱髓鞘改变可能具有区域性差异。0.3% CPZ组小鼠海马DG区内MBP阳性的神经纤维没有显著性的减少,与0.2% CPZ组相反。这种反常情况可能原因为0.3% CPZ组小鼠海马DG区内髓鞘再生能力强于0.2% CPZ组,但是为什么会存在这种差异性的原因仍不清楚。这种与剂量相关的小鼠海马内的差异性结构改变可能也影响了0.3% CPZ组小鼠的行为学表现。

本实验及本课题组进行的相关研究[17-18]都证实了0.2% CPZ喂养动物模型可以作为精神分裂症动物模型,同时小鼠海马CA1区和DG区内均出现脱髓鞘改变。早前的精神分裂症研究发现患者海马体积减小[19-20],后续的研究证实了精神分裂症海马内无神经元显著性丢失[21]。精神分裂症患者大脑内存在广泛的有髓神经纤维脱髓鞘病理改变[1-3]和髓鞘形成相关的基因表达异常[5-6]。最新的磁共振弥散张量成像(DTI)技术研究发现精神分裂症海马内FA值降低[22-23],精神分裂症患者海马内的一种少突胶质细胞相关的基因表达异常[24],甚至体视学定量研究也证明了精神分裂症海马内少突胶质细胞减少[25]。这些证据都提示精神分裂症患者海马内有髓神经纤维的髓鞘发生改变。以前有研究者在CPZ诱导的精神分裂症样模型动物的海马内发现脱髓鞘变化[8]。但是,研究者采用的是免疫组织化学染色后的半定量研究方法,而且研究者没有对海马的分区进行研究。本研究运用

现代体视学方法对小鼠海马CA1区和DG区的有髓神经纤维进行了准确的三维定量研究。与以往的半定量研究方法比较,现代体视学方法具有以下优势:①保证了研究区域内组织抽样的随机性;②三维空间内随机抽样保证了神经纤维在三维空间内各个方向具有相同的抽样概率;③获得的结果是绝对值,从而避免了参照空间陷阱。此次研究的体视学结果显示,6周0.2% CPZ喂养后C57BL/6鼠海马CA1区和DG区内有髓神经纤维长度密度和有髓神经纤维总长度显著性降低,更客观准确地证实了0.2% CPZ组小鼠海马内存在脱髓鞘改变。结合以往关于0.2% CPZ喂养小鼠海马神经元不存在显著性神经元丢失的研究报道[26],这一动物模型上的改变特点可以很好的类比精神分裂症患者海马内的有髓神经纤维改变和无神经元显著丢失。因此,本研究结果表明,0.2% CPZ喂养动物模型的海马改变可为研究精神分裂症海马脱髓鞘改变提供理想的动物模型。

本实验利用不同剂量CPZ喂养C57BL/6鼠探讨建立CPZ诱导的精神分裂症样动物模型的合适剂量,通过比较各组小鼠体质量、生存时间及行为学的结果证明了0.2% CPZ剂量是建立精神分裂症动物模型的最合适剂量,并利用免疫组织化学与体视学方法确定了0.2% CPZ喂养可引起小鼠海马CA1和DG区脱髓鞘改变。这一研究结果为精神分裂症海马改变的研究提供了可靠的模型基础,为后续利用该动物模型研究精神分裂症海马改变机制提供了形态学基础。

参考文献:

[1] Bartzokis G, Nuechterlein K H, Lu P H, *et al*. Dysregulated brain development in adult men with schizophrenia: a magnetic resonance imaging study[J]. Biol Psychiatry, 2003, 53(5): 412-421.

[2] Davis K L, Stewart D G, Friedman J I, *et al*. White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction[J]. Arch Gen Psychiatry, 2003, 60(5): 443-456.

[3] McDonald C, Bullmore E, Sham P, *et al*. Regional volume deviations of brain structure in schizophrenia and psychotic bipolar disorder: computational morphometry study[J]. Br J Psychiatry, 2005, 186: 369-377.

[4] Regenold W T, Phatak P, Marano C M, *et al*. Myelin staining of deep white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and unipolar major depression[J]. Psychiatry Res, 2007, 151(3): 179-188.

[5] Hakak Y, Walker J R, Li C, *et al*. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(8): 4746-4751.

[6] McCullumsmith R E, Gupta D, Beneyto M, *et al*. Expression of transcripts for myelination-related genes in the anterior cingulate cortex in schizophrenia[J]. Schizophr Res, 2007, 90(1/3): 15-27.

[7] Gudi V, Moharregh-Khiabani D, Skripuletz T, *et al*. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination[J]. Brain Res, 2009, 1283: 127-138.

[8] Yang H J, Wang H, Zhang Y, *et al*. Region-specific susceptibilities to cuprizone-induced lesions in the mouse forebrain: Implications for the pathophysiology of schizophrenia[J]. Brain Res, 2009, 1270: 121-130.

[9] Xu H, Yang H J, McConomy B, *et al*. Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mouse exposed to cuprizone: effects of antipsychotics[J]. Front Behav Neurosci, 2010, 4: 8.

[10] Xu H, Yang H J, Zhang Y, *et al*. Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone[J]. Behav Neurosci, 2009, 123(2): 418-429.

[11] 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.

[12] Gundersen H J, Bendtsen T F, Korbo L, *et al*. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis[J]. APMIS, 1988, 96(5): 379-394.

[13] Tang Y, Nyengaard J R. A stereological method for estimating the total length and size of myelin fibers in human brain white matter[J]. J Neurosci Methods, 1997, 73(2): 193-200.

[14] 徐玲, 李琛, 杨姝, 等. 运用新的体视学方法研究大鼠胼胝体及胼胝体额区有髓神经纤维[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 56-59.

[15] Walsh R N, Cummins R A. The Open-Field Test: a critical review[J]. Psychol Bull, 1976, 83(3): 482-504.

[16] 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.

[17] 程国华, 彭超, 李永德, 等. 双环己酮草酰二腙诱导精神分裂症小鼠模型胼胝体有髓神经纤维脱髓鞘的定量观测[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(7): 598-603.

[18] 彭超, 程国华, 王芸, 等. 双环己酮草酰二腙诱导的精神分裂症样小鼠大脑皮质体积及有髓神经纤维的体视学观测[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(8): 717-721.

[19] Honea R, Crow T J, Passingham D, *et al*. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies[J]. Am J Psychiatry, 2005, 162(12): 2233-2245.

[20] Nelson M D, Saykin A J, Flashman L A, *et al*. Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study[J]. Arch Gen Psychiatry, 1998, 55(5): 433-440.

[21] Heckers S, Heinsen H, Geiger B, *et al*. Hippocampal neuron number in schizophrenia. A stereological study[J]. Arch Gen Psychiatry, 1991, 48(11): 1002-1008.

[22] Kalus P, Buri C, Slotboom J, *et al*. Volumetry and diffusion tensor imaging of hippocampal subregions in schizophrenia[J]. Neuroreport, 2004, 15(5): 867-871.

[23] Kuroki N, Kubicki M, Nestor P G, *et al*. Fornix integrity and hippocampal volume in male schizophrenic patients[J]. Biol Psychiatry, 2006, 60(1): 22-31.

[24] Dracheva S, Davis K L, Chin B, *et al*. Myelin-associated mRNA and protein expression deficits in the anterior cingulate cortex and hippocampus in elderly schizophrenia patients[J]. Neurobiol Dis, 2006, 21(3): 531-540.

[25] Schmitt A, Steyskal C, Bernstein H G, *et al*. Stereologic investigation of the posterior part of the hippocampus in schizophrenia[J]. Acta Neuropathol, 2009, 117(4): 395-407.

[26] Hoffmann K, Lindner M, Groticke I, *et al*. Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice[J]. Exp Neurol, 2008, 210(2): 308-321.

(**收稿**:2012-11-15;**修回**:2013-01-04)

(编辑 王小寒)