文章编号:1000-5404(2013)12-1237-05

论著

少突胶质细胞前体细胞在双环己酮草酰二腙诱导的脱髓鞘模型中的变化特点

黄嘉璐[1],穆建坤[2],孟召友[1],周振华[1],陈康宁[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:神经内科[1],康复科[2])

[摘要] **目的** 观察神经胶质细胞在双环己酮草酰二腙(cuprizone,CPZ)诱导的脱髓鞘模型中的变化特点,探讨其与髓鞘再生的内在联系。**方法** 选8周龄C57BL/6雄性小鼠,分为正常组、急性脱髓鞘组及髓鞘再生组。正常组每天饲养正常鼠粮;模型组小鼠饲养含有0.2% CPZ的混合鼠粮,连续饲养6周;髓鞘再生组在连续喂养6周CPZ鼠粮后,换用正常鼠粮2周。实验过程中通过卢卡斯快蓝染色及透射电镜技术判断脑组织胼胝体区髓鞘脱失及恢复程度,通过免疫组化及免疫荧光技术检测脑内NG2,Olig2和GFAP的表达来评估少突胶质细胞前体细胞及星形胶质细胞的变化特点。**结果** 与正常组相比,急性脱髓鞘组胼胝体髓鞘脱失明显,Olig2、GFAP表达明显升高($P<0.05$),侧脑室旁外侧隔核(LSD)NG2升高水平较胼胝体区(CC)更为明显($P<0.05$,$P<0.01$);髓鞘再生组髓鞘有所修复,Olig2、GFAP表达仍高于正常组,但较急性脱髓鞘组有一定程度降低($P<0.05$)。**结论** 髓鞘损伤期少突胶质细胞前体细胞不能有效迁移至受损部位,修复期Olig2表达降低,星形胶质细胞持续高水平表达可能是髓鞘修复障碍的影响因素。

[关键词] 双环己酮草酰二腙;脱髓鞘;髓鞘再生;少突胶质细胞前体细胞;Olig2;星形胶质细胞
[中图法分类号] R-332;R338.1;R744.502 [文献标志码] A

Characteristics of oligodendrocyte precursor cells in cuprizone-induced demyelination models

Huang Jialu[1], Mu Jiankun[2], Meng Zhaoyou[1], Zhou Zhenhua[1], Chen Kangning[1] ([1]Department of Neurology, [2]Department of Rehabilitation, Southwest hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To explore the characteristics of oligodendrocyte precursor cells in cuprizone (CPZ)-induced demyelination models. Methods Eight-week old male C57BL/6 mice were randomly divided into a control group, a demyelination group (CPZ 6 weeks) and a remyelination group (CPZ 6 weeks + normal diet 2 weeks). The mice of the control group were fed with normal diet, and those of the demyelination group and remyelination group were fed with mix diet containing 0.2% CPZ for 6 weeks. Then the mice of the remyelination group were given normal diet instead of CPZ for another 2 weeks. Luxol fast blue (LFB) staining and transmission electron microscopy were used to test the myelin sheath of corpus callosum (CC) in the brain. The expression levels of neuron-glial antigen 2 (NG2), oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in brain tissues were detected by immunohistochemistry and immunofluorescence. Results Compared with the control group, the myelin sheath significantly reduced, and the expression levels of Olig2, GFAP and NG2 in CC were significantly higher in the demyelination group ($P<0.01$). The expression of NG2 in lateral septal nucleus (LSD) were higher than that in CC ($P<0.05$). The expression levels of Olig2 and GFAP in the remyelination group were significantly higher than that in the control group ($P<0.05$), but were significantly lower than that in the demyelination group ($P<0.05$). Conclusion Oligodendrocyte precursor cells cannot migrate to the site of injury in time. Sustained high level of astrocytes and reduction of Olig2 may be the influencing factors for myelin sheath repair disorder at the repair stage.

[**Key words**] cuprizone; demyelination; remyelination; oligodendroglial progenitor cells; Olig2; astrocyte

Corresponding author: Chen Kangning, E-mail: ckn_640827@126.com

中枢神经系统中,少突胶质细胞(oligodendrocyte,OL)包绕轴突形成髓鞘协助神经电信号的高效传递,其崩解死亡后引发的髓鞘脱失是多发性硬化(multiple sclerosis,MS)等众多脱髓鞘疾病的主要特征[1],而髓鞘再生障碍一直是这类疾病的治疗难点。近年来,人们将越来越多的目光投向少突胶质细胞前体细胞(oligodendroglial progenitor cells,OPCs)和相关转录因

[通信作者] 陈康宁,E-mail:ckn_640827@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130427.1708.001.html(2013-04-27)

子上面。OPCs也称为NG2细胞[2],具有神经干细胞的部分特性和分化潜能,为参与髓鞘形成的主要细胞;Olig家族是一种与少突胶质细胞的发育和成熟密切相关的转录因子,包括Olig1、Olig2和Olig3三种因子[3],其中Olig2主要参与OPCs的增殖和分化[4],目前认为,Olig家族是促进髓鞘修复的重要因素[5]。因此,了解OPCs和Olig家族在髓鞘损伤和修复中的变化规律对寻找疾病的治疗靶点具有重要意义。

双环己酮草酰二腙(cuprizone,CPZ)是一种铜螯合剂,可靶向性的诱导少突胶质细胞死亡而引发髓鞘脱失,中断给药后髓鞘可自行修复,这种特点使其尤其适合于髓鞘脱失及再生机制的研究[6]。本实验主要通过观察CPZ诱导的脱髓鞘模型脑内各种胶质细胞的变化规律,探索髓鞘再生与其内在联系。

1 材料与方法

1.1 动物分组和标本采集

27只8周龄C57BL/6雄性小鼠(购于第三军医大学实验动物中心),体质量18~22 g,分为正常组、急性脱髓鞘组及髓鞘再生组,每组9只。急性脱髓鞘组小鼠饲养含有0.2% CPZ的混合鼠粮,连续饲养6周;髓鞘再生组为连续饲养6周CPZ混合鼠粮后,换用正常鼠粮2周;正常组饲养正常鼠粮,3组小鼠置于相同环境喂养。

每组取3只小鼠用于组织切片。取材前,先用1%戊巴比妥钠按10 μL/g麻醉小鼠,然后迅速打开胸腔,左心室进针,37 ℃生理盐水快速滴注,并剪开右心耳放血,待流出清亮液体换成4 ℃ 4%多聚甲醛固定液缓慢滴注。固定完全后取脑,置于4 ℃ 4%多聚甲醛中后固定>48 h,转入30%蔗糖磷酸盐溶液中脱水,待脑组织下沉后进行冰冻切片,切片厚度为20 μm,置于4%多聚甲醛固定液中4 ℃保存待用。每组取3只小鼠用于蛋白提取,小心剥离脑组织,冰上分离剔除大脑皮质及海马区,剩余组织用0.01 mol/L PBS漂洗,加入适量RIPA裂解液和PMSF(RIPA:1 mL/100 mg;RIPA:1%)于玻璃匀浆器匀浆,4 ℃ 12 000 *r*/min离心30 min,小心吸取上清,测蛋白浓度,按比例加入5×Loading Buffer后入沸水煮5 min,-80 ℃保存备用。

1.2 主要试剂

CPZ购自Sigma公司;NG2兔抗鼠一抗购自Millipore公司,Olig2及GFAP兔抗鼠一抗均购自Protein Tech Group公司;罗丹明红色荧光标记的鼠抗兔二抗、HRP标记的山羊抗兔二抗、DAB显色试剂盒及DAPI染液购自北京中杉金桥公司;BCA蛋白浓度试剂盒、蛋白裂解液均购自Bostert公司;ECL显色试剂盒购自Millipore公司。

1.3 形态学检测

1.3.1 卢卡斯快蓝(LFB)染色 首先,0.01%的LFB染液60 ℃烤箱过夜预热。次日,0.01 mol/L PBS充分漂洗组织切片,后转入预热的LFB染液中,入60 ℃烤箱2 h,95%酒精洗涤多余染色,双蒸水漂洗,反复置于0.05%碳酸锂,70%酒精中分色,并于双蒸水反复漂洗,注意及时镜下观察,待白质染色明显,灰质染色浅时分色终止,最后蒸馏水充分漂洗,经酒精梯度脱水、二甲苯透明后中性树胶封片,普光显微镜进行照相,Spot Advance软件采集图片。

1.3.2 免疫组织荧光染色 组织切片用0.01 mol/L PBS漂洗3次,5 min/次,滴加含有1% BSA/0.4% Triton X-100封闭液,37 ℃封闭30 min,切片分别入稀释好的兔来源一抗anti-Olig2(1∶100)anti-GFAP(1∶200)中4 ℃冰箱过夜。第2天,0.01 mol/L PBS漂洗切片3次,然后入含有罗丹红色:荧光标记的二抗中常温孵育2 h,0.01 mol/L PBS漂洗3次,0.06% DAPI染核30 s,0.01 mol/L PBS漂洗掉多余染液后用荧光封片剂封片。Nikon Eclipse90i荧光显微镜采集图片。

1.3.3 免疫组织化学染色 组织切片用0.01 mol/L PBS漂洗3次,5 min/次,3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶15 min,0.01 mol/L PBS漂洗3次,1% BSA/0.4% Triton X-100封闭液37 ℃封闭30 min,切片在稀释好的兔来源一抗anti-NG2(1∶200)中4 ℃冰箱过夜。第2天,0.01 mol/L PBS漂洗3次切片,然后入含有辣根过氧化物酶标记的二抗中37 ℃孵育2 h,0.01 mol/L PBS漂洗3次,DAB显色,经酒精梯度脱水、二甲苯透明后中性树胶封片。Olympus BX60普光显微镜进行照相,Spot Advance软件分别采集胼胝体区(corpus callosum,CC)及侧脑室旁背外侧隔核区域(lateral septal nucleus dorsal part,LSD)的图片,用Image Plus Pro 5.0软件计算免疫阳性光密度值及细胞计数。

1.3.4 透射电镜观察 每组取3只小鼠用于电镜观察。小鼠迅速取脑置于2.5%戊二醛中,冰上分离胼胝体部分并切成1 mm×1 mm×1 mm小块,0.1 mol/L PBS漂洗2次,10 min/次;1%锇酸后固定2 h;0.1 mol/L PBS漂洗;丙酮梯度脱水;环氧树脂618包埋;半薄切片定位;超薄切片,铀染,铅染;FEI公司TECNAI10透射电子显微镜观察,计算有髓组织比例。

1.3.5 Western blot检测 每个样本按总蛋白40 μg量取,分别于5%浓缩胶(70 V,40 min)及12%分离胶(90 V,90 min)进行SDS-PAGE电泳,后转至PVDF膜上,250 mA半干电转1 h,5%脱脂奶粉液封闭30 min后加入一抗(1∶1 000)于4 ℃过夜。次日,PBST漂洗4次,每次10 min,加入HRP标记的二抗(1∶5 000)室温孵育2 h,PBST漂洗4次,10 min/次,ECL试剂盒显色曝光。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0进行统计分析,数据以$\bar{x} \pm s$表示,免疫组化采用IPP5进行分析,进行独立样本t检验。

2 结果

2.1 各组小鼠髓鞘的变化

LFB染色发现,正常组小鼠胼胝体区域的髓鞘染色为深蓝色,结构较为致密[光密度值为(0.14±0.02)]。与正常组相比,急性脱髓鞘组髓鞘染色较浅,结构不均匀[光密度值为(0.06±0.01),$P<0.05$]。髓鞘再生组胼胝体区域髓鞘染色明显变深[光密度值为(0.09±0.01)],优于急性脱髓鞘组($P<0.05$),但仍不如正常组,见图1。

透射电镜下观察胼胝体部分髓鞘细微结构可见,正常组轴突外髓鞘结构完整,厚度均匀,有髓组织比例较大[(65±3)%];

急性脱髓鞘组髓鞘结构松散,大部分区域轴索外无髓鞘包裹,并有轴索的萎缩;髓鞘再生组髓鞘比例较急性脱髓鞘组增多[(23 ± 2)% *vs* (7 ± 2)%, $P < 0.05$],但髓鞘厚度及有髓组织比例仍远远低于正常组($P < 0.01$)。

2.2 少突胶质细胞前体细胞的变化规律

通过免疫组化染色发现,正常组 NG2 阳性细胞突起丰富从胞体放射放出,细胞较大,呈星形状态,为棕色爪状细胞结构,其中 CC 区视野下数量较少[(6 ± 1)],LSD 区略多[(10 ± 1)];而喂养 6 周 CPZ 混合鼠粮之后,急性脱髓鞘组 NG2 在 CC 区域与正常对照组没有明显区别[(7 ± 2), $P > 0.05$],但 NG2 阳性细胞数量明显增多[(11 ± 3), $P < 0.05$]。同时对 LSD 区进行观察发现,急性脱髓鞘组的阳性细胞数量(16 ± 2)明显高于正常组[(10 ± 1), $P < 0.05$]和髓鞘再生组[(10 ± 1), $P < 0.05$]。对 LSD 区和 CC 区阳性细胞比较发现,治疗后 LSD 区少突胶质细胞前体细胞数量明显多于 CC 区($P < 0.05$),见图 2。

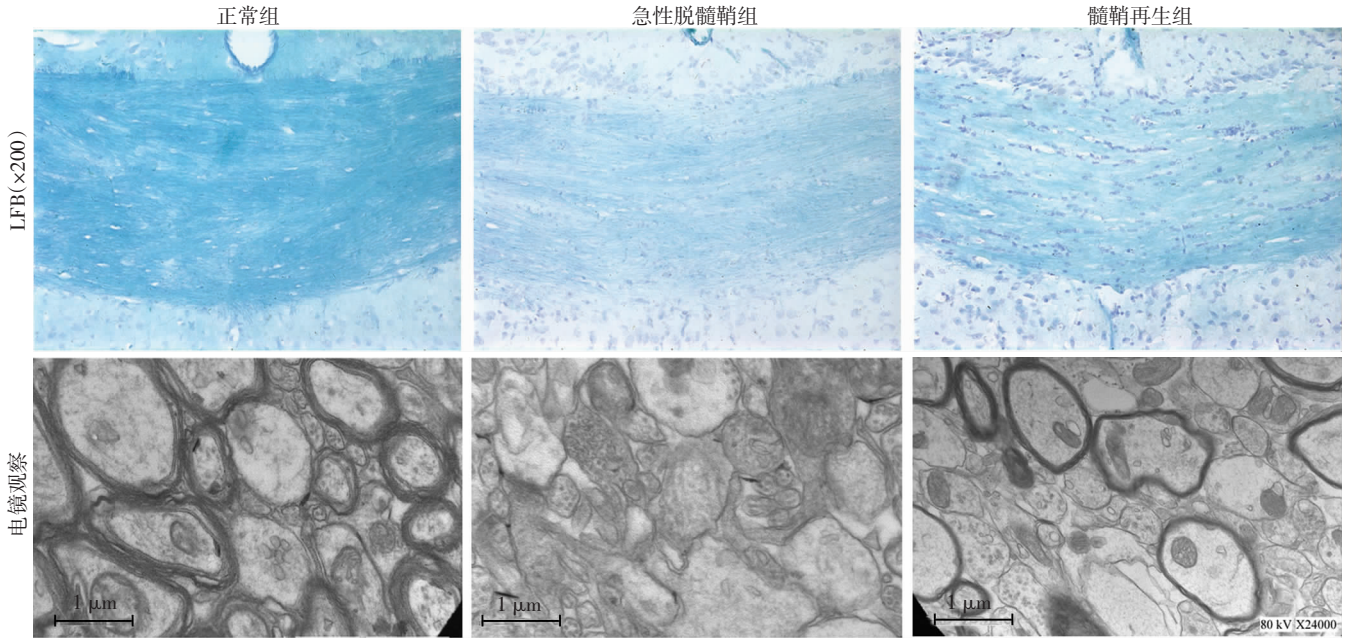


图 1 各组小鼠胼胝体区髓鞘变化

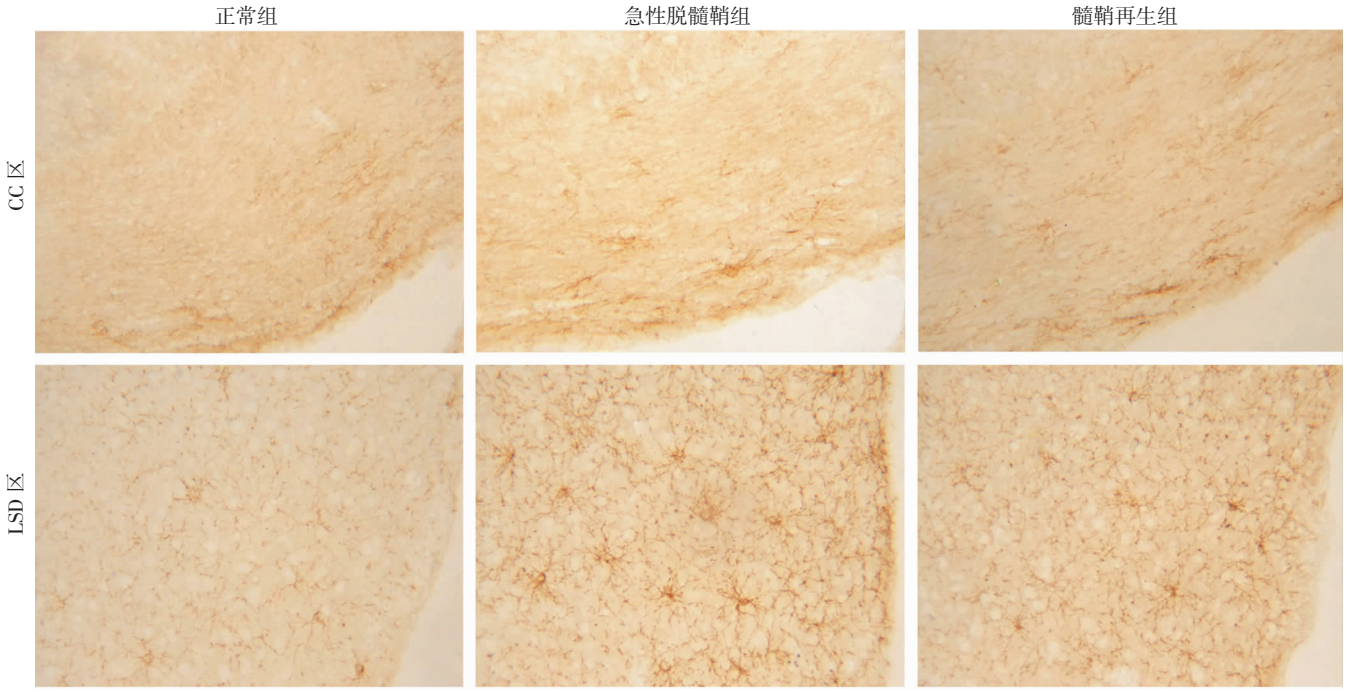


图 2 免疫组化观察各组小鼠 CC 区和 LSD 区 NG2 变化 (NG2 ×200)

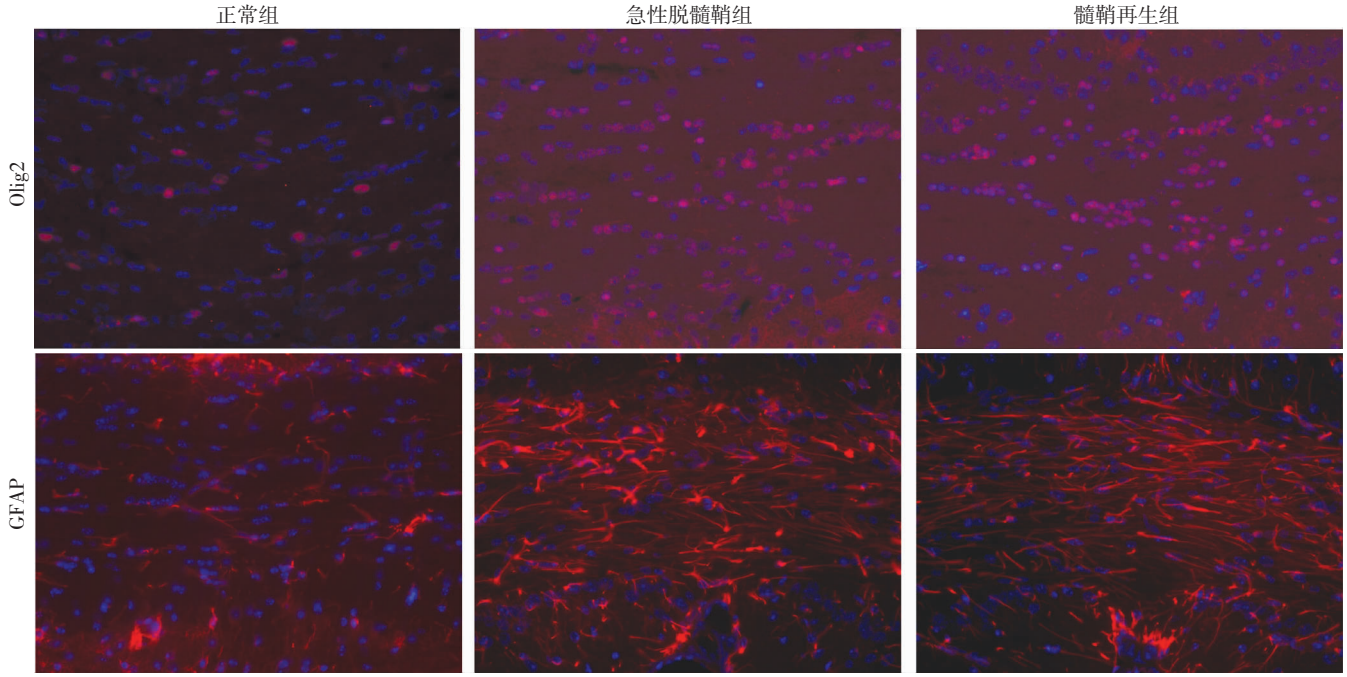


图3 各组小鼠胼胝体区及 Olig2 星形胶质细胞变化 （免疫荧光显微镜 ×200）

2.3 Olig-2、GFAP 在 CPZ 小鼠各时期的变化

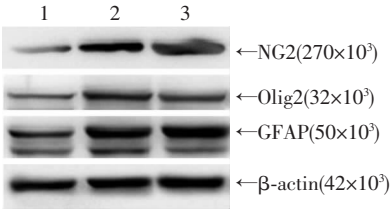
对 Olig-2 进行免疫荧光染色发现，Olig2 主要在核中表达，红色阳性结果与蓝色 DAPI 核染重合，正常组胼胝体区域 Olig2 数量较少，急性脱髓鞘组 Olig2 较正常组增加[(23 ± 3) *vs* (9 ± 2)，$P < 0.05$]，而切换正常鼠粮 2 周后，小鼠胼胝体区域的 Olig2 数量明显低于急性脱髓鞘组[(14 ± 2)，$P < 0.01$]，见图 3。

2.4 星形胶质细胞在 CPZ 小鼠各时期的变化特点

GFAP 免疫荧光染色发现，CC 区的星形胶质细胞被挤在局限的区域，胞体呈细丝状，突起向两端射出，表现为双极细胞形态；正常组星形胶质细胞数量较少，喂养 CPZ 鼠粮 6 周之后，数量比正常组明显增高[(54 ± 3) *vs* (16 ± 2)，$P < 0.05$]，异常细胞形态增多，胞体和轴突变得不规则，在切换正常鼠粮喂养2 周之后，星形胶质细胞数量与急性脱髓鞘组相比没有明显变化[(46 ± 3)，$P > 0.05$]，但仍高于正常组($P < 0.05$)，细胞形态开始恢复到正常细胞水平，异常细胞数量减少，见图 3。

2.5 Western blot 检测脑组织中各种蛋白的表达

与正常组相比，喂养 CPZ 鼠粮 6 周后 NG2 表达明显升高[(0.64 ± 0.03) *vs* (0.16 ± 0.02)，$P < 0.05$]，切换正常鼠粮 2 周NG2 表达仍然处于高水平[(0.60 ± 0.02)，$P < 0.05$]，与急性脱髓鞘组无明显差异($P > 0.05$)；正常组 Olig2 表达较低(0.13 ± 0.01)，急性脱髓鞘组 Olig2 明显升高[(0.57 ± 0.02)，$P < 0.05$]，髓鞘再生组 Olig2 虽仍然高于正常组[(0.44 ± 0.02)，$P < 0.05$]，但较急性脱髓鞘组略低($P < 0.05$)；急性脱髓鞘组和髓鞘再生组 GFAP 表达无明显差异[(0.86 ± 0.02)，(0.81 ± 0.03)，$P > 0.05$]，均明显高于正常组[(0.25 ± 0.01)，$P < 0.05$]。见图 4。



1：正常组；2：急性脱髓鞘组；3：髓鞘再生组

图4 Western blot 检测各组小鼠脑组织中各种蛋白的表达

3 讨论

CPZ 是一种铜离子螯合剂，能够特异性的作用于中枢神经系统的少突胶质细胞并导致其死亡，引起髓鞘脱失。不间断喂养 C57BL/6 小鼠含有 0.2% CPZ 的混合鼠粮，6 周时小鼠髓鞘完全脱失但 OPCs 处高峰期，此时为急性脱髓鞘模型，终止喂养 CPZ 混合鼠粮后髓鞘可自行修复，这种模型尤其适合研究髓鞘脱失和再生过程中少突胶质细胞及其前体细胞的相关变化特点[6]。

有研究发现[7]，OPCs 在早期 MS 病灶明显升高，此时约 1/3 的 OPCs 处于向成熟 OL 转变的阶段，而慢性 MS 病灶中 OPCs 数量远远低于急性病灶，向成熟 OL 转变的细胞也所剩无几，OPCs 在髓鞘损伤区域的募集障碍和向成熟 OL 分化障碍一直是脱髓鞘疾病的治疗难点及研究热点。Olig2 是 OL 转录因子家族中的一员，属于碱性-环-螺旋（basichelix-loop-helix，bHLH）因子，Olig2 与 OL 的分化和中枢神经系统髓鞘

形成有关[8]，Copray 等[9]在体外实验中发现，过度表达的 Olig2 可以诱导神经干细胞向成熟 OL 分化，Ligon 等[10]也同样发现 Olig2 有诱导 OPCs 定向分化为成熟 OL 的作用。由于 NG2 表达阳性的细胞可定向分化为少突胶质细胞，NG2 往往被用来做 OPCs 的特异性标记物，研究发现 NG2 细胞起源于侧脑室室管膜下区（subventricular zone，SVZ），具有迁延特性[2]。因此，我们在实验中除对髓鞘脱失区域——CC 区进行所有目的蛋白的观察外，对 NG2 还增加了 LSD 区的观察。

通过 CPZ 模型来研究神经胶质细胞与髓鞘修复的内在联系发现，实验中 CPZ 模型体重在脱髓鞘期表现为一种下降趋势，这与之前的报道相符[11]。卢卡斯快蓝和透射电镜技术被用于评估模型髓鞘脱失及修复，检测发现6周脱髓鞘组髓鞘有明显的脱失，证明模型制作成功，而经过2周的正常鼠粮饲养后，髓鞘有一定程度的修复。

本实验中发现，不同时期 CPZ 模型脑组织的不同区域 NG2 细胞数较正常组有不同的变化。其中，急性脱髓鞘组 CC 区 NG2 表达与正常组无明显差别，但在 LSD 区 NG2 表达显著增高；髓鞘再生组 CC 区 NG2 表达较其他两组为高，LSD 区 NG2 表达较急性脱髓鞘组略低，这表明 OPCs 虽然在髓鞘损伤期应激性增加，但是不能及时迁移到损伤部位进行髓鞘修复。通过对 Olig2 的检测发现，与正常组相比，急性脱髓鞘组 CC 区 Olig2 明显增多，而髓鞘再生组 Olig2 表达虽然较正常组略高，但远远低于急性脱髓鞘组。由此可以推测，在急性脱髓鞘期，OPCs 不能及时迁延到受损部位，虽然此时 Olig2 增多，但由于无作用载体，无法发挥其促少突胶质细胞成熟的作用，限制了髓鞘的修复；而在髓鞘修复期，虽然一定数量 OPCs 迁延到受损区，但此时损伤区 Olig2 表达降低，OPCs 不能得到足够因子的诱导，再次限制其向成熟 OL 分化。

GFAP 检测星形胶质细胞的活化发现，GFAP 在髓鞘损伤期及修复期均保持较高水平。文献[12]报道，星形胶质细胞活化并产生胶质瘢痕是影响轴突再生、神经功能重建的重要因素之一；近年来也有研究发现[13]，活化的星形胶质细胞本身可分泌各种细胞因子抑制少突胶质细胞再生，促进其凋亡，阻碍髓鞘修复；持续高水平的活化星形胶质细胞是限制髓鞘修复的重要因素。

综上所述，各种胶质细胞在不同阶段有不同的表达特点，选择适当时间对其分别进行干预，最大程度的发挥每种细胞的作用优势，将提高髓鞘修复的效率，这种策略或许将是今后临床研究的重点。

参考文献：

[1] Pott F, Gingele S, Clarner T, *et al*. Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia[J]. Brain Res, 2009, 1305: 137-149.

[2] Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, *et al*. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(1): 9-22.

[3] Lu Q R, Yuk D, Alberta J A, *et al*. Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system[J]. Neuron, 2000, 25(2): 317-329.

[4] Ligon K L, Fancy S P, Franklin R J, *et al*. Olig gene function in CNS development and disease[J]. Glia, 2006, 54(1): 1-10.

[5] Fancy S P, Zhao C, Franklin R J. Increased expression of Nkx2. 2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS[J]. Mol Cell Neurosci, 2004, 27(3): 247-254.

[6] 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.

[7] Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, *et al*. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis[J]. Brain, 2008, 131(Pt 7): 1749-1758.

[8] Takebayashi H, Yoshida S, Sugimori M, *et al*. Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3[J]. Mech Dev, 2000, 99(1/2): 143-148.

[9] Copray S, Balasubramaniyan V, Levenga J, *et al*. Olig2 overexpression induces the *in vitro* differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 1001-1010.

[10] Ligon K L, Kesari S, Kitada M, *et al*. Development of NG2 neural progenitor cells requires Olig gene function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(20): 7853-7858.

[11] 詹晓黎，顾思斯，丁诚，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2012，34(8)：691-695.

[12] Albrecht P J, Dahl J P, Stoltzfus O K, *et al*. Giliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival[J]. Exp Neurol, 2002, 173(1): 46-62.

[13] Kim S, Steelman A J, Zhang Y, *et al*. Aberrant upregulation of astroglial ceramide potentiates oligodendrocyte injury[J]. Brain Pathol, 2012, 22(1): 41-57.

（**收稿**：2013-03-06；**修回**：2013-04-16）

（编辑　王小寒）