文章编号:1000-5404(2013)11-1129-04

论著

大麻素 WIN55,212-2 对双环己酮草酰二腙诱导的脱髓鞘模型髓鞘修复作用的研究

穆建坤[1],刘宏亮[1],姚忠祥[2],陈兴书[3],黄嘉璐[4] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院康复科[1],基础医学部生理学教研室[2],基础医学部组织学与胚胎学教研室[3],西南医院神经内科[4])

[摘要] **目的** 探讨大麻素 WIN55,212-2 对双环己酮草酰二腙(cuprizone,CPZ)诱导 C57BL/6 小鼠脱髓鞘模型的治疗作用。**方法** 取 6 周龄 C57BL/6 雄性小鼠,分为正常组、第 2 周 WIN55,212-2 给药组与 DMSO 对照组、第 4 周 WIN55,212-2 给药组及 DMSO 对照组,每组 10 只。正常组每天喂养普通饲料,CPZ 模型持续喂养含有 0.25% CPZ 的混合饲料,在第 2 周和第 4 周时进行 WIN55,212-2 注射,DMSO 对照组则在相同条件下注射 10% 的 DMSO,继续喂养 CPZ 混合饲料。于第 3、5 周末通过体质量变化观察整体状态;旋转棒实验观察小鼠运动功能,利用 LFB 和 MBP 免疫组化技术染色观察胼胝体区域髓鞘,GFAP 染色观察星形胶质细胞。**结果** 与 DMSO 对照组相比,WIN55,212-2 给药组模型体质量下降趋势明显减缓($P<0.05$);旋转棒实验中,WIN55,212-2 给药组小鼠运动功能仍弱于正常小鼠,但是与 DMSO 对照组相比,WIN55,212-2 给药组运动功能明显改善($P<0.01$);LFB 染色结果显示 DMSO 对照组髓鞘脱失明显,WIN55,212-2 给药组介于正常与 DMSO 对照组之间,MBP 染色进一步证实了这一结果;GFAP 免疫组化实验结果显示 DMSO 对照组 CPZ 模型小鼠胼胝体区域 GFAP 阳性细胞广泛表达,而经过 WIN55,212-2 治疗的小鼠 GFAP 表达量明显低于 DMSO 对照组($P<0.05$)。**结论** 大麻素 WIN55,212-2 可通过降低髓鞘的脱失和星形胶质细胞的活化,对脱髓鞘病变具有一定缓解的作用。

[关键词] 大麻素;脱髓鞘;运动功能;髓鞘
[中图法分类号] R-332; R744.5; R971.4 [文献标志码] A

Remyelination effect of cannabine WIN55,212-2 in cuprizone-induced demyelination mice

Mu Jiankun[1], Liu Hongliang[1], Yao Zhongxiang[2], Chen Xingshu[3], Huang Jialu[4] ([1]Department of Rehabilitation, [4]Department of Neurology, Southwest Hospital, [2]Department of Physiology, [3]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the treatment effect of cannabine WIN55,212-2 (WIN) in cuprizone (CPZ)-induced demyelination model in C57BL/6 mice. **Methods** A total of 50 6-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into 5 groups, that is, normal group, the WIN treatment groups, and the corresponding DMSO groups. The mice of normal group were fed with normal lab chow everyday, and those of other groups were fed with normal lab chow containing 0.25% cuprizone. In 1 and 2 weeks after CPZ feeding, WIN dissolved in 10% DMSO was injected intraperitoneally at a dose of 1 mg/kg to the mice of WIN treatment groups, and 10% DMSO was given to the control group for 2 weeks. Overall functions of mice were observed by their weight. Their motor function was observed by Rotarod test. Luxol fast blue (LFB) staining and myelin basic protein (MBP) immunohistochemical staining were used to observe the myelination of corpus callosum, and GFAP immunohistochemical staining for astrocyte. **Results** The weight of WIN treatment groups was decreased slowly than the DMSO control group($P<0.05$). Rotarod test found that the motor function was weak in WIN treatment groups than normal mice, but significantly improved than the DMSO control ($P<0.01$). LFB staining displayed that demyelination was very obvious in the DMSO control groups, and that in the WIN treatment groups was better than the DMSO groups, but worse than the normal control ($P<0.05$), and the same results were found in immunohistochemical assay for MBP ($P<0.05$). The expression of GFAP was widely in corpus callosum of the DMSO control groups, but it was significantly lower in the WIN treatment

[通信作者] 刘宏亮,E-mail:lhliang38@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130228.1714.009.html(2013-02-28)

groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Cannabine WIN alleviates demyeination through attenuating the myeline loss and astrocyte activation.

[**Key words**] cannabine; demyelination; motor function; myelin sheath

Corresponding author: Liu Hongliang, E-mail: E-mail: lhliang38@hotmail.com

大麻素是从大麻中提取的一种活性物质,在药学中的应用已经有很长的历史,能够缓解诸多神经症状[1]。有研究发现大麻素可以通过激活CB1或CB2受体发挥免疫抑制作用,达到对多发性硬化症(multiple sclerosis,MS)等疾病的治疗作用,而在大麻素不涉及免疫调节的条件下治疗MS等脱髓鞘疾病目前却少见相关报道。

MS是一种严重的慢性炎性脱髓鞘疾病,其主要病理特征为中枢神经系统炎症,髓鞘的脱失和轴突的破坏,从而导致运动、感觉功能的障碍[2],具有反复发作性,目前对其还没有明确的治疗手段。双环己酮草酰二腙(cuprizone,CPZ)能特异性的诱导少突胶质细胞的死亡,此模型的特点为在不涉及免疫调节的条件下引起髓鞘的脱失,因此我们利用CPZ诱导的脱髓鞘模型来研究人工合成的大麻素WIN55,212-2对MS中髓鞘脱失的治疗作用,探讨大麻素治疗髓鞘脱失疾病的可能性。

1 材料与方法

1.1 动物分组和标本采集

50只6周龄C57BL/6雄性小鼠(第三军医大学实验动物中心),体质量14~16 g,分为5组:正常组(Normal),第2周注射DMSO对照组(DMSO 2)、第2周注射WIN55,212-2给药组(WIN 2)、第4周注射DMSO对照组(DMSO 4)、第4周注射WIN55,212-2给药组(WIN 4),每组10只。在相同环境下喂养。WIN55,212-2(Tocris公司)溶于10% DMSO:生理盐水1:1的混合液中,腹腔注射,1 mg/kg,每天1次,对照组注射DMSO混合液。

正常组每天喂养正常鼠粮,对照组与给药组每天喂养含有0.25% CPZ(Sigma公司)的鼠粮。在第2、4周时,给药组腹腔注射大麻素WIN55,212-2,对照组注射相同体积的10% DMSO:生理盐水混合液,每天1次,注射2周,同时继续喂养CPZ鼠粮。给药前后进行转棒实验。给药2周后(第3、5周末)进行灌注取材,用1%戊巴比妥钠麻醉后,固定,打开胸腔,灌注针扎至左心室,快速滴注37 ℃生理盐水,剪开右心耳放血,待流出清亮液体后切换至4 ℃ 4%多聚甲醛固定液缓慢滴注。固定结束后取含有胼胝体的脑组织,置于30%蔗糖脱水,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。

1.2 体质量检测和行为学实验方法

1.2.1 体质量检测 从建立模型开始,每隔1 d于下午4点对小鼠进行称量,观察其整体情况的变化。

1.2.2 转棒实验 从模型建立开始,每隔1 d对小鼠进行旋转棒实验检测,观察小鼠的运动功能状态,髓鞘脱失后小鼠的运动功能会有所下降。制造模型之前,先让小鼠在转棒仪(转棒式疲劳仪YLS-4C,上海软隆科技发展有限公司)上进行适应训练,转速为15~20 r/min,每天练习10 min,共练习2 d,第3天进行记录,在练习中筛选出运动功能较差的小鼠,剔除后对该组小鼠进行补充。正式进行记录时,转速为40 r/min,总时间为5 min,小鼠从旋转棒上掉下或抱转棒旋转2周为实验结束,记录小鼠在转棒上停留的时间。

1.3 形态学检测

1.3.1 卢卡斯快蓝(luxol fast blue, LFB)染色 切片用0.01 mol/L PBS漂洗后转入0.01%的LFB染液中37 ℃过夜,95%酒精、蒸馏水漂洗,0.05%碳酸锂分化至灰白质明显,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,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。Olympus BX60显微镜照相,图片数据的收集采用Spot Advance。

1.3.2 免疫组化染色 切片用0.01 mol/L PBS漂洗3次,5 min/次,30%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,捞至含有1% BSA/0.4% Triton X-100封闭液中,37 ℃封闭30 min,切片在稀释好的兔抗小鼠一抗anti-髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP),anti-GFAP中37 ℃孵育2.5 h,后转至4 ℃冰箱过夜。切片在含有生物素标记的山羊抗兔二抗中37 ℃孵育2 h后,加入ABC复合物37 ℃孵育1.5 h,DAB显色,切片捞至载玻片上,晾干,酒精梯度脱水,二甲苯透明,晾干,中性树胶封片。显微镜下观察。Olympus BX 60显微镜照相,图片数据的收集采用Spot Advance。免疫组化利用IPP 5.0进行分析。

1.4 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0行独立样本t检验。

2 结果

2.1 大麻素WIN55,212-2对CPZ诱导脱髓鞘模型小鼠体质量和运动功能的影响

喂养0.25% CPZ鼠粮之后,在实验结束时DMSO对照组小鼠的体质量[DMSO 2(13.29±1.29)g、DMSO 4(13.76±0.65)g]明显低于正常组[第3、5周末分别为(19.64±1.38)、(21.52±1.86)g]。与DMSO对照组相比,注射大麻素WIN55,212-2后,CPZ诱导的脱髓鞘模型小鼠的体质量有所增加[WIN 2(15.13±0.29)g、WIN 4(15.78±0.56)g,$P < 0.05$]。

转棒实验结果显示,正常组一直维持在比较平稳的水平[第3、5周末分别为(284.92±5.98)、(286.68±5.17)s]。喂养0.25% CPZ鼠粮后,DMSO对照组模型鼠的运动能力快速下降,然后维持于相对稳定的水平[DMSO 2(182.84±12.67)s、

DMSO 4(174.20±7.09)s]。与DMSO对照组相比,注射大麻素WIN55,212-2后,CPZ诱导的脱髓鞘模型小鼠的运动功能障碍明显减轻[WIN 2(206.59±26.34)s、WIN 4(197.84±16.16)s,$P<0.01$]。

2.2 大麻素WIN55,21,2-2对CPZ诱导脱髓鞘模型小鼠髓鞘的作用

正常组小鼠胼胝体区域LFB染色后颜色较深,比较均匀,主要为深蓝色[第3、5周末均为(0.14±0.01)],喂养0.25 % CPZ鼠粮后,DMSO 2组和DMSO 4组胼胝体区域髓鞘染色变浅,呈现块状,淡蓝色,与DMSO 2组(0.08±0.02)相比,DMSO 4组(0.05±0.01)胼胝体区域颜色几乎完全消失。给予WIN55,212-2治疗后发现胼胝体区域髓鞘染色[WIN 2(0.10±0.01)、WIN 4(0.07±0.01)]比同期注射DMSO的对照组明显加深($P<0.05$),块状分布减少。同时对2组给药组进行比较发现,第2周开始注射WIN55,212-2比第4周开始注射有更好的治疗效果($P<0.05$)。见图1。

2.3 大麻素WIN55,212-2对CPZ诱导脱髓鞘模型小鼠MBP表达的影响

免疫组织化学染色结果显示,正常组胼胝体区域MBP染色为深棕色,比较致密[第3、5周末分别为(0.11±0.01)、(0.10±0.00)],而DMSO 2组和DMSO 4组胼胝体区域MBP染色比正常组浅[DMSO 2(0.05±0.00)、DMSO 4(0.02±0.01)],呈斑块状,与DMSO 2组相比,DMSO 4组MBP染色几乎消失,斑块较少。注射WIN55,212-2之后,CPZ诱导的脱髓鞘模型小鼠MBP的脱失程度降低[WIN 2(0.08±0.00)、WIN 4(0.05±0.01),$P<0.05$],第2周开始注射大麻素WIN55,212-2的效果优于第4周($P<0.05$)。见图2。

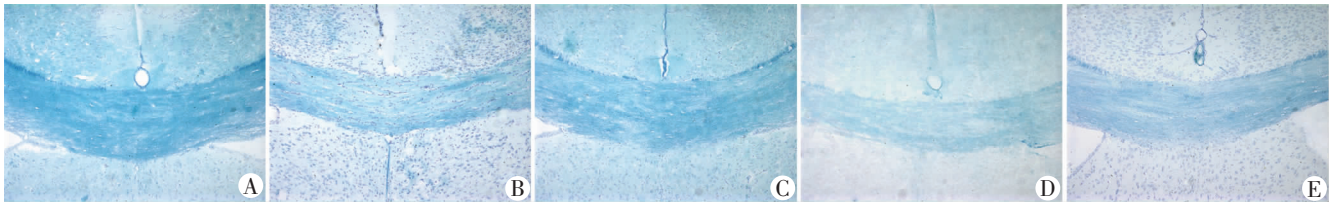
2.4 大麻素WIN55,212-2对CPZ诱导脱髓鞘模型小鼠星形胶质细胞表达的影响

免疫组化染色结果显示,正常组胼胝体区域星形胶质细胞数量较少,形态比较规则[第3、5周末分别为(21±1)、(18±2)]。DMSO 2组和DMSO 4组细胞阳性数量增多[DMSO 2(51±3)、DMSO 4(71±2)],形态不规则。注射WIN55,212-2后与同期DMSO对照组比较发现星形胶质细胞数量明显减少[WIN 2(27±2)、WIN 4(38±3),$P<0.05$],不规则细胞数量减少,组间比较发现第2周给药比第4周给药更能很好地减少星形胶质细胞的数量($P<0.05$)。见图3。

3 讨论

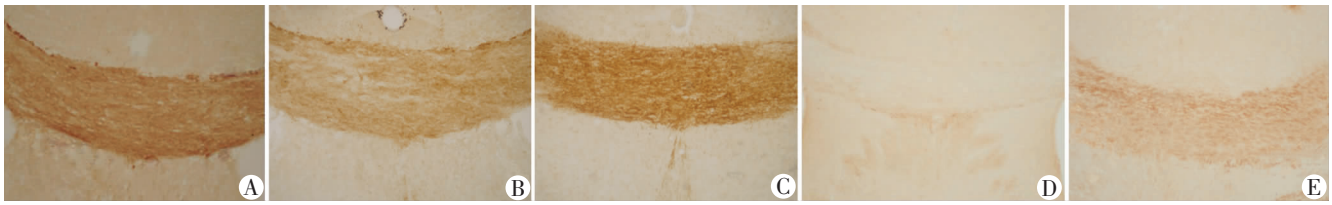
MS是一种慢性神经疾病,能够引起髓鞘的脱失,严重影响人们的生命健康,到目前为止还没有发现一种对其完全有效的治疗措施[3-4]。

大麻素主要作用被认为是一种具有缓解MS症状,并具有抗炎和神经保护作用的一种潜在的药物[5-6]。大麻素发挥作用主要通过CB1和CB2两个受体发挥作用,不管是单独通过CB1受体[7]还是CB2受体[8],大麻素都能通过免疫抑制作用达到对MS疾病的治疗作用。1 mg/kg的WIN55,212-2能同时激活CB1受体和CB2受体,优于单独应用CB1或CB2受体激动剂对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型的治疗作用[9-10]。



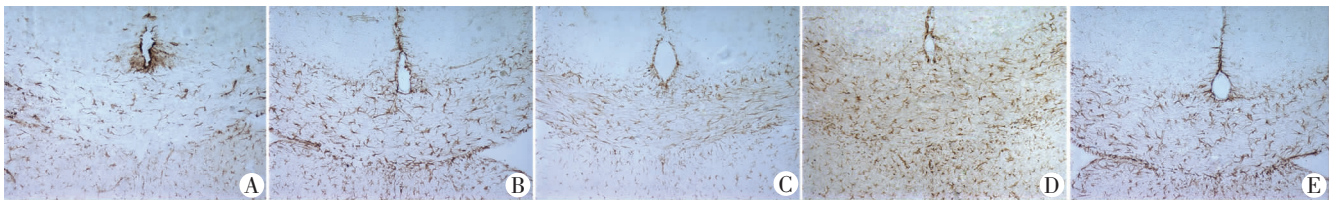
A:正常组; B:DMSO 2组; C:WIN 2组;D:DMSO 4组; E:WIN 4组

图1 各组胼胝体区域髓鞘变化 (LFB ×100)



A:正常组;B:DMSO 2组; C:WIN 2组;D:DMSO 4组; E:WIN 4组

图2 各组胼胝体区域MBP染色观察 (IHC ×200)



A:正常组; B:DMSO 2组; C:WIN 2组;D:DMSO 4组; E:WIN 4组

图3 各组胼胝体区域星形胶质细胞计数比较 (IHC ×100)

CPZ是一种选择性铜离子螯合剂,小剂量能够特异性的诱导少突胶质细胞死亡从而引起髓鞘脱失,但对神经元影响较小,也表明CPZ诱导模型主要为引起了中枢神经系统髓鞘的脱失[11-12]。在注射WIN55,212-2后我们发现WIN55,212-2能够很好地缓解CPZ诱导的脱髓鞘症状,促进运动功能的恢复,减缓髓鞘的脱失,同时能够减少星形胶质细胞的形成。目前对MS研究的模型主要为EAE和CPZ模型,EAE能够通过激活T细胞引起自身免疫反应,引起髓鞘和大脑的炎性症状[13],能很好地从免疫系统模拟MS疾病,但缺点为模型制作期间并不稳定,可变因素较多。CPZ则是从髓鞘的脱失及再生角度对疾病进行模拟,能特异性的诱导中枢神经系统少突胶质细胞的死亡,引起髓鞘脱失[14]。该模型在第2周时会出现运动功能下降等症状,在第4周时细胞死亡达到高峰[15],因此我们利用该模型在此时间段进行给药,观察大麻素WIN55,212-2对CPZ诱导的脱髓鞘模型的治疗效果。

体质量是MS等脱髓鞘患者的整体状态的1项间接指标,在模型制作过程中,我们每天对CPZ模型小鼠进行体质量的检测来观察其整体情况,结果显示注射WIN55,212-2后,能够明显改善小鼠体质量下降的趋势,表明WIN55,212-2可以改善CPZ诱导的脱髓鞘模型小鼠的整体情况,也可能有利于患者的进一步治疗。运动功能受损是MS等脱髓鞘疾病中的一个明显的特征[16]。在CPZ诱导的脱髓鞘模型中,CPZ模型小鼠的运动功能会有所的下降,我们通过旋转棒实验对其运动功能检测,发现注射WIN55,212-2后,模型鼠的运动功能较DMSO对照组得到改善,可能为以后因脱髓鞘疾病导致运动功能障碍患者的康复提供了一个新的药物治疗方法。

髓鞘脱失是MS疾病的一个显著的病理特征之一。通过LFB染色和免疫组化检测结果显示,注射WIN55,212-2后,髓鞘脱失明显减缓,证明了大麻素能够促进髓鞘的修复发挥神经保护作用,同时发现第2周给药明显优于第4周给药,因此在疾病早期我们应该进行药物治疗,从而降低少突胶质细胞的死亡。胶质瘢痕是MS等脱髓鞘疾病难以愈合的原因之一,星形胶质细胞是胶质瘢痕形成的主要成分。通过免疫组化染色观察发现,注射WIN55,212能够减少星形胶质细胞的形成,延缓疾病的进程,可能是因为星形胶质细胞形成下降导致胶质瘢痕减少从而为髓鞘的形成提供了良好环境有关。

本实验通过建立CPZ诱导的脱髓鞘模型以及利用WIN55,212-2在疾病发展的各个时间段对其进行治疗,结果显示WIN55,212-2可以在非免疫条件下通过降低髓鞘的脱失和星形胶质细胞活化达到缓解脱髓鞘病变的目的,可为大麻素在临床中治疗MS等脱髓鞘疾病提供新的证据。

参考文献:

[1] Booth M. Cannabis: A History, a book[M]. London: Random House, 2003.

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

[3] Frohman E M. Multiple sclerosis[J]. Med Clin North Am, 2003, 87(4): 867-897, viii-ix.

[4] Nave K A, Trapp B D. Axon-glial signaling and the glial support of axon function[J]. Annu Rev Neurosci, 2008, 31: 535-561.

[5] Pryce G, Baker D. Emerging properties of cannabinoid medicines in management of multiple sclerosis[J]. Trends Neurosci, 2005, 28(5): 272-276.

[6] Hong P, Lago D, Seargeant J, *et al*. Defining ankyloglossia: a case series of anterior and posterior tongue ties[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2010, 74(9): 1003-1006.

[7] de Lago E, Moreno-Martet M, Cabranes A, *et al*. Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB1 receptor-mediated anti-inflammatory effects[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(7): 2299-2308.

[8] Lou Z Y, Chen C, He Q, *et al*. Targeting CB(2) receptor as a neuroinflammatory modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Mol Immunol, 2011, 49(3): 453-461.

[9] Docagne F, Muneton V, Clemente D, *et al*. Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 34(4): 551-561.

[10] Solbrig M V, Fan Y, Hermanowicz N, *et al*. A synthetic cannabinoid agonist promotes oligodendrogliogenesis during viral encephalitis in rats[J]. Exp Neurol, 2010, 226(1): 231-241.

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

[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] 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.

[14] 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.

[15] Steelman A J, Thompson J P, Li J. Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication[J]. Neurosci Res, 2012, 72(1): 32-42.

[16] 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.

(收稿:2012-12-18;修回:2013-02-16)

(编辑 王小寒)