维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0851-05

实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠视神经的病理学改变

许 娜,李平华

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:动态观察实验性变态反应性脑脊髓炎(Experimental allergic encephalomyelitis,EAE)大鼠视神经的病理学变化。方法:建立 EAE 大鼠模型,采用光镜及透射电镜分别观察第 8,12,18 及 30 天大鼠视神经形态学改变。结果:各个时间段视神经发生了不同程度的改变,光镜下表现为不同程度的神经纤维空泡样变性,轴束不规则肿胀,炎细胞浸润,大量胶质细胞和胶原组织形成增生组织成网状。电镜下主要表现为轴突内空泡样变性、髓鞘松解、脱落、微丝微管消失等。结论:EAE 大鼠的视神经发生了较为严重的病理学改变。

【关键词】脑脊髓炎;实验性自身免疫性;视神经炎;脱髓鞘

【中国图书分类法分类号】R774.6; R363 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-24

Pathological changes of the optic nerve in EAE

XU Na,et al

(*Department of Ophthalmology,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To dynamically observe the pathological changes of the optic nerve in EAE. *Methods*: The animal model was established in Wistar rat.The experiment rats were randomly divided into 8,12,18,and 30day groups.The changes of optic nerve were observed using light and electron microscopes. *Results*:Under light microscope,the optic nerve fibers showed bulb—like degeneration,the axis irregularity swelling,phlegmonosis cell infiltrating,a quantity of glial cell and collagen tissue formed hyperplastic tissue. Under electron microscopy,the axons showed bulb—like degeneration,myelin sheaths were loose,microtubule and microfilament disappeared. *Conclusion*:Demyelination occurs in the optic nerve of EAE. By establishing the EAE animail model,we can see the pathological changes of the optic nerve in EAE,which can provide evidences for clinical threatment of this disease.

【Key words】 Encephalomyelifis;Experimental autoimmune;Optic Neuritis;Demyelination

视神经炎(Optic neuritis,ON)确切发病机制尚不十分清楚。越来越多的证据表明,ON 的病因多为自身免疫引起的炎性脱髓鞘,相当多的 ON 为多发性硬化的早期表现。实验性变态反应性脑脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)是通过动物对中枢神经系统髓磷脂抗原、髓鞘碱性蛋白或者蛋白脂蛋白致敏后诱发的一种自身免疫性疾病,是研究多发性硬化(Multiple sclerosis,MS)免疫病理学机制及其实验性治疗的最佳动物模型。在引起脱髓鞘改变的 EAE 的发病过程中,血脑屏障渗透性的变化起重要作用,类似这种屏障的破坏也发生在诸如 ON 和 MS 这样的免疫介导性疾病。实际上 ON 和 MS 均有血脑屏障的功能失调,使产生脱髓鞘病变的炎症细胞和体液因子能进入 CNS。磁共振成像已证实,EAE 动物模型中显示有人类 ON 中相似的视神经对照增强和脱髓鞘形成。本实验通过建立 EAE 大鼠的动物模型,在不同病程通过光镜及透射电镜从病理组织学角度动态观察 EAE 大鼠视神经的形态学改变。

作者介绍:许 娜(1978-),女,硕士生,
主要研究方向:视神经疾病。

1 材料、试剂和方法

1.1 实验动物和试剂

雌性 Wistar 大鼠,6~8 周龄,体重为 130~200g;豚鼠,雌性,体重为 330~400g,由重庆医科大学实验动物中心提供。卡介苗冻干粉和百日咳疫苗购自卫生部上海生物制品研究所,医用石蜡油(分析纯)、医用羊毛脂购于重庆化学试剂厂。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 完全福氏佐剂(Complete freund adjuvant,CFA)的配制

将羊毛脂和液体石蜡按 1:4(体积)的比例混合共热至 70℃熔融混匀,配成不完全福氏佐剂(Incomplete freund adjuvant,IFA)。临用前每毫升 IFA 加入卡介苗(4mg/L)混匀制成 CFA。

1.3 豚鼠全脊髓匀浆-完全福氏佐剂的配制

用过量 3.5%水合氯醛腹腔注射处死豚鼠,迅速冰上取脊髓,去除脊膜后用预冷的生理盐水制成 50%(m/v)的豚鼠脊髓生理盐水匀浆,再与等量的 CFA 混匀后制成油包水型乳剂,此即为免疫抗原。

1.4 动物分组和诱导方法

将 36 只大鼠随机分为 3 组:实验组 20 只,实验对照组 8 只,正常组 8 只。实验组于大鼠四足垫皮内各注射免疫抗原 0.1ml,共计 0.4ml/ 只,同时足跖背面皮内注射百日咳疫苗 0.1ml。实验对照组大鼠于四足垫皮内各注射等量 CFA 加生理盐水。

1.5 EAE 发病的评价及症状评分标准

按照 Koh[11]报告的评分标准:0 分:正常,无发病;0.25 分:尾部远端张力丧失;0.5 分:全尾部张力丧失;1 分:共济失调步态;2 分:一侧后肢麻痹;3 分:双后肢麻痹;4 分:双后肢加前肢瘫痪;5 分:濒临死亡状态。以大鼠的发病达到或者超过 1 分为临床 EAE 发病。EAE 实验组在免疫后 8 天左右开始出现症状,表现为活动减少、食欲不振,体重减轻、尾部张力降低、随后出现瘫痪症状等。而对照组和正常组大鼠到第 18 天时均没发病。

1.6 取 材

试验组大鼠分别于动物模型建立后第 8,12,18 及 30 天,用 4%的多聚甲醛心脏灌注处死(每个时间点处死 5 只大鼠)。对照组和正常组大鼠亦于免疫后第 8,12,18 及 30 天处死大鼠 2 只,用同样方法取材。各组动物摘取眼球,自筛板后 0.5mm 处取球后视神经段 3.5mm,制备电镜、光镜标本。

1.7 组织病理学检查

①HE 染色。标本石蜡包埋;作横切面半薄切片,厚度 4μm,烤片;再脱蜡至水,苏木素染色,盐酸酒精分化,伊红复染;梯度酒精脱水;二甲苯透明,中性树胶固封,光镜下观察。②2R-亮绿神经髓鞘染色:标本石蜡包埋,作横切面半薄切片厚 4mm,烤片、常规脱蜡至水,变色酸 2R 染色,亮绿复染,冰醋酸分化,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。③电镜标本制备。取新鲜标本 1mm × 1mm × 1mm 大小,用 2.5%戊二醛固定,1%的锇酸后固定,进行常规电镜样品制备、包埋、半薄切片定位,定位后制成超薄切片,铅铀双染色,然后在 Hitichi-7500 型透射电镜下观察并摄片。

2 结 果

2.1 光镜所见

正常组和实验对照组视神经没太大的改变。横切面呈类圆形,神经纤维束呈柱形均匀排列,染色均匀,其间有散在的神经胶质细胞(图 1)。免疫后第 8 天视神经大体结构和正常没太大改变。免疫后第 12 天神经轴束间出现许多大小不等空泡,轴束不规则肿胀,可见到少量单核细胞浸润(图 2)。第 18 天轴突变性部分降解,网状分层形成大量的空泡,淋巴细胞浸润,视神经纤维增殖(图 3)。第 30 天视神经内部为大量胶质细胞和胶原组织形成增生组织成网状(图 4)。神经纤维髓鞘采用 2R-亮绿染色显示:神经髓鞘呈粉红色;轴索、神经束衣和神经内衣呈绿色。变性的髓鞘因磷脂消失故不着色(图 5)。

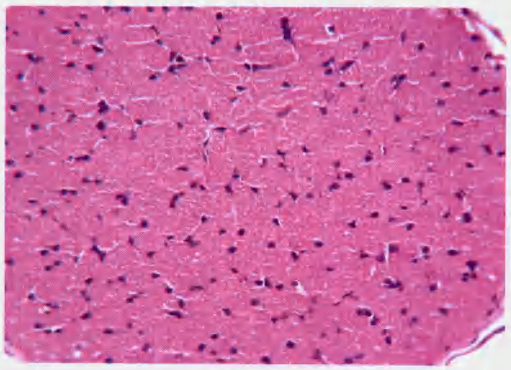


图 1 正常大鼠视神经 HE 染色×400

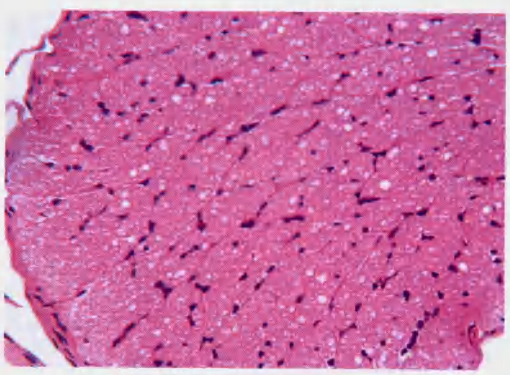


图 2 EAE 大鼠 12d 视神经 HE 染色×400

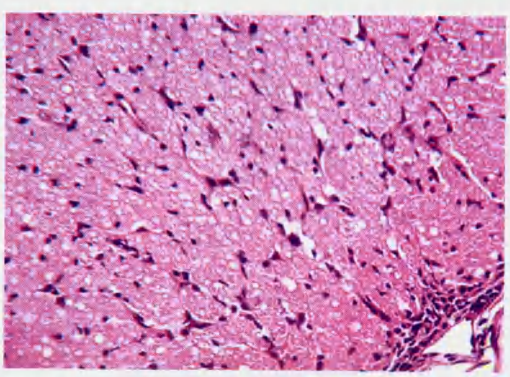


图 3 EAE 大鼠 18d 视神经 HE 染色×400

维普资讯 http://www.cqvip.com

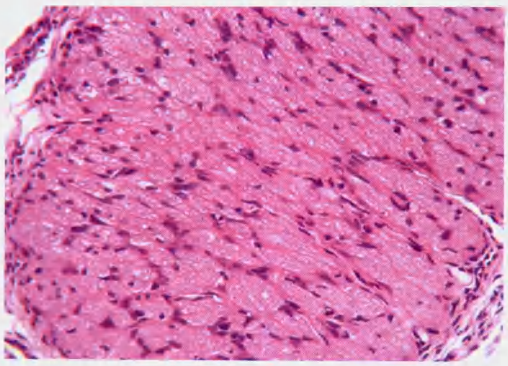


图 4 EAE 大鼠 30d 视神经视神经 HE 染色×400

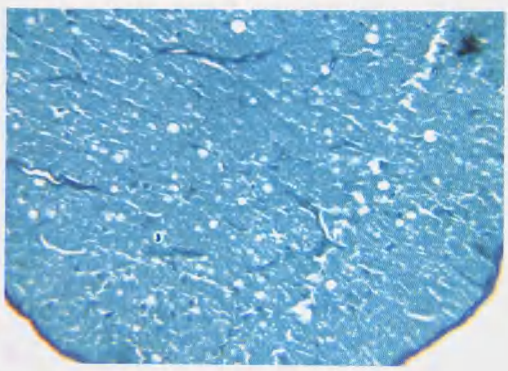


图 5 EAE 大鼠神经纤维髓鞘 2R-亮绿染色×400

2.2 电镜所见

正常视神经纤维较细，少突胶质细胞周围分布有较多的有髓神经纤维，其轴索无萎缩及水肿，多数线粒体结构正常，髓鞘密度较为均匀，厚约 0.1~0.3μm；少突胶质细胞体积较大，核略不规则，位于细胞中央，细胞内细胞器结构正常。免疫后第 8 天，视神经超微结构的改变不太明显。大部分有髓纤维结构正常，髓鞘呈板层状排列，包裹中央的轴突，轴索完整，微丝、微管及线粒体结构均正常，髓鞘密度均匀。免疫后第 12 天，少部分有髓鞘轻度水肿，髓神经轴索破坏，部分神经纤维髓鞘不规则增厚或板层状结构排列疏松，个别轴索内线粒体轻度肿胀髓鞘不规则扭曲，板层结构消失。免疫后第 18 天，绝大多数视神经均有较明显的病变，表现为不同程度脱髓鞘髓鞘板层状分离、剥脱，轴突轴膜与髓鞘间有间隙形成，髓鞘松解，轴突髓鞘部分向内向外突起，或板层分离范围扩大，夹杂着髓鞘半环行套叠，轴索明显萎缩(图 6)、水肿，电子密度低，细胞器消失，轴索及髓鞘结构破坏，板层结构消失，同时可见髓鞘泡状解离，轴突呈空泡样和均质状，微管消失(图 7)。少量淋巴细胞及吞噬细胞浸润。脱髓鞘的神经纤维增多，有一些轴索甚至破坏，髓鞘向内外突起和板层分离，严重者髓鞘向心性扩展挤压轴浆消失，还可见髓鞘塌陷(图 8)。免疫后第 30 天，视神经细胞变性、水肿及坏死逐渐减轻，有髓纤维的结构逐渐恢复正常，偶见髓鞘板层分离，轴索水肿消失(图 9)。

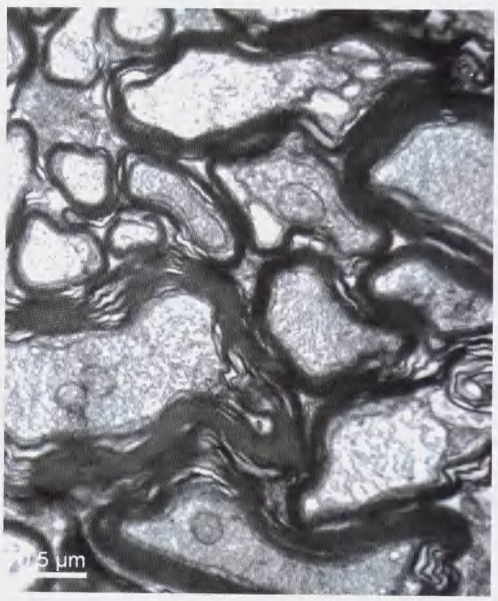


图 6 EAE 大鼠 18d 组，视神经严重水肿、脱髓鞘×25000

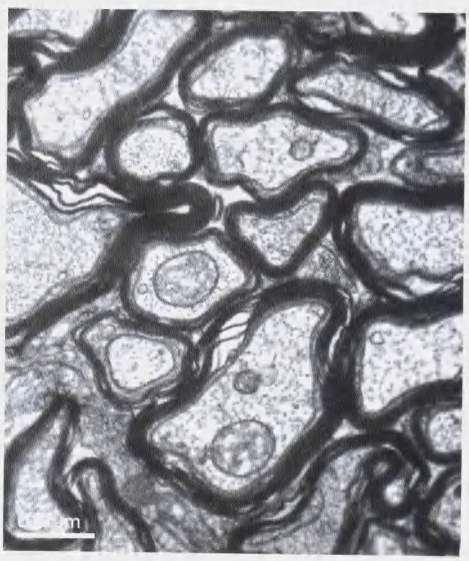


图 7 EAE 大鼠 18d 组，视神经微管消失×30000

维普资讯 http://www.cqvip.com

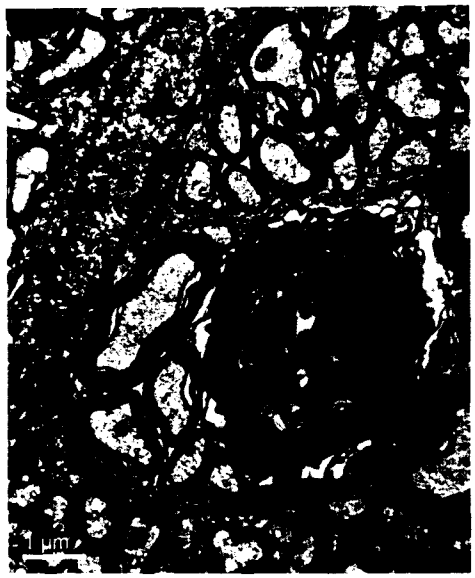


图 8 EAE 大鼠 18d 组,视神经髓鞘塌陷×12000

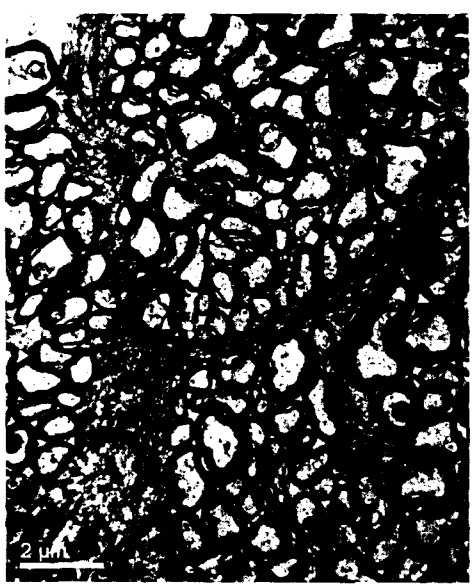


图 9 EAE 大鼠 30d 组,视神经结构逐渐恢复正常
有轻微水肿和脱髓鞘×12000

3 讨 论

ON 是累及视神经的急、亚急性炎性或脱髓鞘过程。通过对 ON 患者的随访发现约 60%的 ON 患者发展成 MS，而且随着随访时间的延长而比例增加。然而从现有资料看，国内外视神经炎的基础病理研究并不多见，有关视神经炎治疗的实验研究尤其是动物实验研究的资料更是缺乏，致使对 ON 的认识及研究始终进展缓慢，也是视神经炎相关研究难以深入下去的关键原因。在我国,多发性硬化的颅神经损害是比较突出的,尤以视神经损害的多见,这与我国多发性硬化多表现为视神经脊髓炎有关。

近年来大量学者通过对 EAE 大鼠脑和脊髓的病理改变研究发现[2~5]脊髓的前角、后角、侧角、中央管的周围及周边白质内可见大量的炎性细胞浸润，并且伴有炎性细胞周边白质髓鞘的肿胀，崩解消失,轴突肿胀,有的甚至消失。同时在脱髓鞘区内可以见到大量格子细胞存在。在脊髓膜的表面、脑干内、侧脑室周边的白质内可以看到在小血管周围的炎细胞浸润伴随周边髓鞘脱失,脑膜也可见炎细胞浸润。电镜检查可以见到脑和脊髓组织白质的髓鞘松解、崩解、脱落。这些变化同本实验中视神经的病理学改变有相似之处。本实验中,光镜下观察视神经主要表现为视神经肿胀，出现许多大小不等空泡,轴束不规则肿胀,可见到少量单核细胞、淋巴细胞浸润,神经内部为大量胶质细胞和胶原组织形成增生组织成网状,其随着时间推移呈不同程度的交错变化。超微结构病理变化主要为轴突萎缩、水肿、空泡样变性和髓鞘松解脱失,板层分离,淋巴细胞浸润,并随时间延长而加重,在发病的高峰期第 18 天最明显,随后视神经细胞变性、水肿及坏死逐渐减轻,有髓纤维的结构逐渐恢复正常。30 天后出现的修复则还需考虑其自身修复的作用。建立成熟的 EAE 动物模型表明动物在免疫后 13~14 天发病,18 天达到高峰,30 天后基本缓解,Guyton 等[6]还发现在 EAE 动物免疫后第 8 天动物的视网膜电图就发生了改变，因而我们选择免疫后第 8,12,18,30 天不同的时间点对 EAE 大鼠不同发病阶段的视神经病理学改变进行检测。同时在实验中我们也发现不同的时间点视神经脱髓鞘后的病理变化不尽相同,这与本模型的病理改变呈现节段性和局灶性,各动物的发病情况不一有关。

视神经是由视网膜神经节细胞的轴突组成的。视神经轴突在离开巩膜筛板后既有髓鞘包裹。从神经解剖的角度分析,只要病变影响了神经传导的功能,动物就会表现相应的症状和体症,包括行为学的改变和对视力的影响。ON 临床多见,但其发病特点决定了极少有标本提供做组织病理研究,相关实验性研究的文献报道较少。Ellezam 等[7]用脊髓匀浆免疫视神经钳夹伤后的大鼠,发现轴突能长入视神经,而用肝匀浆免疫则不能。检测生长抑制蛋白:髓鞘相关糖蛋白、Nogo-A、Nogo-66 受体、硫酸软骨素

维普资讯 http://www.cqvip.com

分裂蛋白等抗体水平并未升高，从而认为这种作用能与对抗脊髓匀浆的抗体有关。Schwartz[8]采用一种精确校准的视神经钳夹伤模型对神经变性类疾病引起的一系列级连反应进行了研究，发现在损伤处针对自身抗原的 T 细胞介导的免疫反应对损伤的视神经有益，这种保护性的自身免疫反应在一部分个体中可以自发引起，他们采用共聚物-1 作为抗原进行免疫。共聚物-1 是一种由 4 个氨基酸合成的聚合物，已经 FDA 批准用于多发性硬化，它可以与髓鞘相关自身蛋白发生部分交叉反应，从而轻微激活自身反应性 T 细胞，结果发现它能保护神经元免受钳夹诱导的细胞死亡。Guy[9]等应用腺病毒介导的过氧化氢酶的基因转导来降低 EAE 大鼠体内活性氧的表达，发现其可以减少活性氧对视神经的损伤作用，并推测视神经凋亡发生与氧自由基的介导有关，视神经损伤导致自由基的产生增多。在本实验中视神经主要表现为脱髓鞘性改变和细胞浸润，造成局部的能量代谢障碍，ATP 含量减少，使神经通透性和组织液含量增加，从而导致轴浆内水含量增多，造成轴突肿胀及髓鞘松解。髓鞘脱失和轴突变性的演变可导致视功能的丧失。

参 考 文 献

[1] Koh CS, Paterson PY. Suppression of clinical signs of cell-transferred experimental allergic encephalomyelitis and altered cerebrovascular permeability in lewis rats treated with a plasminogen activator inhibitor[J]. Cell-Immunol, 1987; 107(1): 52-63.

[2] Merkler D, Ernsting T, Kerschensteiner M, et al. A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination[J]. Brain, 2006; 129(8): 1972-1983.

[3] Papadopoulos D, Pham-Dinh D, Reynolds R, et al. Axon loss is responsible for chronic neurological deficit following inflammatory demyelination in the rat[J]. Exp Neurol, 2006; 197(2): 373-385.

[4] Cavallotti D, D'Andrea V, Pastore FS, et al. Pathogenesis of some neurological immune ultrastructural and morphometrical observations on rat thymus[J]. Neurol Res, 2005; 27(1): 41-46.

[5] Zehntner SP, Brickman C, Bourbonniere L, et al. Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell responses[J]. Immunol, 2005; 174(8): 5124-5231.

[6] Guyton MK, Rohrer B, Crosson C, et al. Neurodegeneration Of The Optic Nerve Occurs In Eae, An Animal Model Of Optic Neuritis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004; 45(3): 563-572.

[7] Ellezam B, Bertrand J, Dergham P, et al. Vaccination stimulates retinal ganglion cell regeneration in the adult optic nerve[J]. Neurobiol Dis, 2003; 2(1): 1-10.

[8] Schwartz M. Optic nerve crush: protection and regeneration[J]. Brain Res Bull, 2004; 2(6): 467-471.

[9] Guy J, Sun L, Qi X, et al. Suppression of mitochondrial oxidative injury by sod2 Gene transfer provides longterm protection aAgainst myelin fiber injury in tbe EAE optic nerve[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005; 6(2): 1197-1205.

(上接第 845 页)

prognostic significance of measures of heart rate dynamics after acute myocardial infarction in the beta-blocking era[J]. Am J Cardiol, 2003; 92(8): 907-912.

[5] Georg S, Marek M, Petra B, et al. Heart rate turbulence after ventricular premature beats as a predictor of mortality after acute myocardial infarction[J]. Lancet, 1999; 353(9162): 1390-1396.

[6] Bauer A, Malik M, Barthel P, et al. Turbulence dynamics: an independent predictor of late mortality after acute myocardial infarction [J]. Int J cardiol, 2006; 107(1): 42-47.

[7] Barthel P, Schneider RD, Bauer A. Risk Stratification After Acute Myocardial Infarction by Heart Rate Turbulence[J]. Circulation, 2003; 108(10): 1221-1226.

[8] Welzig CM, Shin, Dong-Gu. Lipid Lowering by Pravastatin Increases Parasympathetic Modulation of Heart Rate: G[alpha]i2, a Possible Molecular Marker for Parasympathetic Responsiveness[J]. Circulation, 2003; 108(22): 2743-2746.

[9] Vichterle D, Melenovsky V, Simek J, et al. Hemodynamics and autonomic control of heart rate turbulence[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2006; 17(3): 286-291.

[10] Lin LY, Lai LP, Lin JL, et al. Tight mechanism correlation between heart rate turbulence and baroreflex sensitivity: sequential autonomic blockade analysis[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2002; 13(5): 427-431.

[11] Wichterle D, Melenovsky V, Malik M. Mechanisms involved in heart rate turbulence[J]. Card Electrophysiol Rev, 2002; 6(3): 262-266.

[12] Lombardi F. Clinical implication of present physiological understanding of HRV components[J]. Card Electrophysiol Rev, 2002; 6(3): 245-249.

[13] Rovere MT, Pinna GD. Short-Term Heart Rate Variability Strongly Predicts Sudden Cardiac Death in Chronic Heart Failure Patients[J]. Circulation, 2003; 107(4): 567-570.

[14] Francis J, Watanabe MA, Schmidt G. HRT: a new predictor for risk of sudden cardiac death[J]. Ann Noninvasive Electrocardiol, 2005; 10(1): 102-109.

[15] Manno D, Wijetunga M. Risk Stratification and Primary Prevention of Sudden Cardiac Death; Sudden Death Prevention[J]. Critical Care Nurses, 2004; 15(3): 404-418.