维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0224－04

EAE 大鼠脑中 ICAM－1、VCAM－1 的检测及意义

谢春燕，王顺和，陈利江

(重庆医科大学基础医学院病理科,重庆 400016)

【摘 要】目的:实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis,EAE)是研究多发性硬化(multiple sclerosis,MS)发病机制及探索治疗的理想动物模型。本实验通过检测急性 EAE 模型大鼠脑中细胞间粘附分子－1(intercellular adhesion molecule－1,ICAM－1)、血管细胞间粘附分子－1(vascular cell adhesion molecule－1,VCAM－1)的表达以探讨粘附分子在 EAE 发病过程中的作用及意义。方法:以豚鼠脊髓匀浆加完全福氏佐剂作为抗原,给予 Wistar 大鼠四足皮内注射,建立 EAE 模型。应用免疫组织化学技术检测 EAE 大鼠脑中 ICAM－1、VCAM－1 的表达。与对照组对比作成组 t 检验来分析其表达是否具有统计学意义。结果:ICAM－1,VCAM－1 在 EAE 大鼠脑血管内皮细胞的表达与正常对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。结论:EAE 模型建立方法稳定、可靠。ICAM－1、VCAM－1 可能参与了 EAE 的发病。

【关键词】粘附分子;实验性变态反应性脑脊髓炎;动物模型

【中国图书分类法分类号】R392.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－06－29

The detection and significance of ICAM－1 and VCAM－1 in EAE rat brain

XIE Chunyan, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: The experimental allergic encephalomyelitis(EAE) is the most suitable animal model for investigation in the pathogenesis and the treatment of EAE. The expressions of ICAM－1, VCAM－1 in Wistar rat brain of acute EAE were investigated to study the mechanism and significance of their expressions in EAE rat brain. *Methods*: All experimental Wistar rats were inoculated intradermally in feet with emulsion contained guinea pig spinal cord homogenate and complete Freund's adjuvant. The clinical manifestation and the pathological changes were observed with the aid of light and electron microscope to check the successful establishment of the model. The expressions of ICAM－1 and VCAM－1 were detected by the method of immunohistochemisty. The results of their expressions were compared by T test with controls. *Results*: Significant difference was found between the experimental group and the controul group in the expressions of ICAM－1 and VCAM－1 ($P<0.01$). *Conclusion*: The method of establishing the EAE model is stable and reliable. ICAM－1 and VCAM－1 may play a key role in the onset of EAE.

【Key words】Adhesion molecule; Experimental allergic encephalomyelitis; Animal model

多发性硬化(MS)是中枢神经系统(CNS)炎症性脱髓鞘疾病的代表。实验性变态反应性/自身反应性脑脊髓炎(EAE)动物模型的建立为 CNS 脱髓鞘疾病的发病机制的研究及其治疗方法的探索提供了切实可行的理想的动物模型。由于 EAE 的病理改变和临床表现与急性 MS 有着相似之处,故常以此作为 MS 实验研究的动物模型。

目前研究表明,EAE 是由 T 淋巴细胞介导的,以 CNS 血管周围大量单个核细胞浸润和白质脱髓鞘为病理学特征的自身免疫性疾病。CNS 在组织学上是"相对的免疫豁免部位"。这是因为(1)CNS 几乎不存在淋巴系统,(2)在 CNS 存在极低的对抗原递呈起作用的 MHC Ⅰ类和 MHC Ⅱ类分子的表达,(3)血脑屏障(BBB)是循环淋巴细胞进入 CNS 屏障。因而对于 CNS 炎性疾病,自身免疫细胞必须穿过 BBB 才能到达靶器官－CNS,正常情况下,免疫细胞不能自由进入 CNS,所以研究 CNS 炎症状态下,BBB 的主要组成部分脑血管内皮细胞表面分子的改变,是探讨 EAE 发病机制的重要环节。T 淋巴细胞粘附于血管内皮细胞是其在损伤局部发挥作用的第一步。

作者介绍:谢春燕(1978－),女,硕士,
主要研究方向:神经病理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年 Wistar 大鼠(由本校实验动物中心提供)20只,雌性,体重 180～230g,随机分成对照组和实验组,每组10只。

健康豚鼠,雌雄不限,体重 350～400g。

1.2 主要试剂

卡介苗原浆(北京生物制品研究所),百日咳疫苗(北京生物制品研究所),医用羊毛脂(重庆化学试剂厂),医用石蜡油(分析纯)(重庆化学试剂厂);

兔抗大鼠 ICAM－1 多克隆抗体,兔抗大鼠 VCAM－1 多克隆抗体,即用型 SABC(过氧化物酶)试剂盒。(免疫组化试剂均购于武汉博士德公司)

1.3 实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)动物模型的制备[1]

取体重 400g 左右的豚鼠,用过量的 3.5% 水合氯醛腹腔注射至死,迅速在冰上取脊髓,去除脊膜称重后,用冰生理盐水制成 50%(重量/体积比)的豚鼠脊髓生理盐水匀浆,4℃保存。

取羊毛脂 10g,液体石蜡油 40ml,混合盛于三角烧瓶内,高压灭菌 15 磅 30min,制成不完全福氏佐剂 4℃保存。将失活的卡介苗原浆(80mg/ml)50ul 加入 1ml 不完全福氏佐剂中,制成每 ml 含 4mg 结核杆菌的完全福氏佐剂(CFA)。将等量的脊髓匀浆和 CFA 混合,以无菌注射器在冰上抽打,直至成为油包水乳剂,此即为免疫抗原。4℃保存,12h 用完。

将 Wistar 大鼠以 3.5% 水合氯醛(1ml/100g 体重)腹腔麻醉后,碘酒酒精局部消毒。四足足垫内各注射免疫抗原 0.1ml,共计 0.4ml/只。同时后足足背皮内注射约 1×10^{11} 百日咳疫苗 0.1ml。单笼常规饲养。另外 10 只大鼠只注射不加脑脊髓匀浆的 CFA,作为模型对照。

1.4 EAE 发病的评价及症状分级标准

致敏前后至取材期间,常规饲养模型组及对照组大鼠,观察动物的一般情况,有无反应迟钝、纳差、咀嚼无力、嗜睡、乏力、爬行困难、截瘫、偏瘫及大小便失禁等,发病后按 EAE 症状评分标准进行功能评分,其标准为:0 级:未发病;1 级:双后肢轻度拖地;2 级:双后肢中度无力,明显拖地,爬行明显不稳;3 级:双后肢重度无力,但尚能移动;4 级:双后肢或四肢瘫痪,二便失禁;5 级:呈濒死状态[2]。

1.5 脑组织光镜及电镜检查

于动物发病高高峰期,即免疫后 10～14 天左右,采用 3.5% 水合氯醛(1ml/100g 体重)腹腔麻醉所有模型组及对照组动物后,打开胸腔露出心脏,从左心室插管,剪开右心耳,先灌注 4℃加肝素的生理盐水洗净循环血液,再灌注 4% 的多聚甲醛约 500ml/只,进行内固定后断头,取脑酒精梯度脱水,石蜡包埋,制成 5um 切片,作 HE 染色。在光镜下观察组织病理改变。

电镜标本取材:模型与对照组大鼠予 3.5% 水合氯醛(1ml/100g 体重)腹腔麻醉后,开胸经左心灌注 4℃的生理盐水(加肝素)及 4% 的戊二醛磷酸盐缓冲液,内灌流固定后断头,取脑,于皮质深层白质取 $2mm^3$ 组织,按常规电镜技术制备超薄切片。

1.6 免疫组织化学方法

采用 SABC 方法,实验步骤按试剂盒说明书进行。免疫组化结果的判断:在排除非特异性染色前提下,ICAM－1、VCAM－1 阳性表达以胞浆内出现棕黄色颗粒为准,以高倍显微镜下 10 个不同视野阳性细胞数的平均值作为报告值。

1.7 统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 给出,采用 spss10.0 统计软件进行成组 t 检验,$P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 EAE 动物模型的建立

实验中用未加豚鼠脊髓匀浆 CFA 免疫的模型对照组,到处死前未见发病,无 1 只出现 EAE 临床症状,脑及脊髓各节段的病理检查未发现炎性及脱髓鞘改变;经脑脊髓匀浆加完全福氏佐剂免疫的 10 只大鼠,在免疫后 10 天最先出现症状,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,最初表现为双后肢瘫,动物以前肢向前爬行,剑突以后部分着地,双后肢拖拉在后,足跖面朝上,尾张力消失,可伴大小便失禁。此症状持续 1～2 天,在此期间症状可进一步加重,出现双前肢肌张力降低,甚至出现濒死状态。

2.2 EAE 大鼠脑光镜和电镜的病理改变

光镜下可以发现 EAE 大鼠脑蛛网膜下腔小血管充血,管壁增厚,血管周围间隙增宽,血管周围存在大量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主,内皮细胞明显破坏,呈典型"袖套"(cuffing)样改变(图 1)。在白质的神经纤维束间也有炎性细胞浸润。但未看见明显的白质脱髓鞘改变,结果与国外报道相同。电镜下可见中枢神经系统超微结构发生明显的病理改变,神经胶质细胞肿胀,髓鞘明显分层、水肿甚至断裂,线粒体大量肿胀,血管内皮细胞肿胀,毛细血管基底膜有严重破坏,轴索萎缩明显(图 2)。

2.3 ICAM－1、VCAM－1 的表达

在 EAE 大鼠脑血管内皮细胞有 ICAM－1、VCAM－1 的表达,阳性细胞为棕黄色,正常对照组的脑血管内皮细胞有极少量的 ICAM－1、VCAM－

维普资讯 http://www.cqvip.com

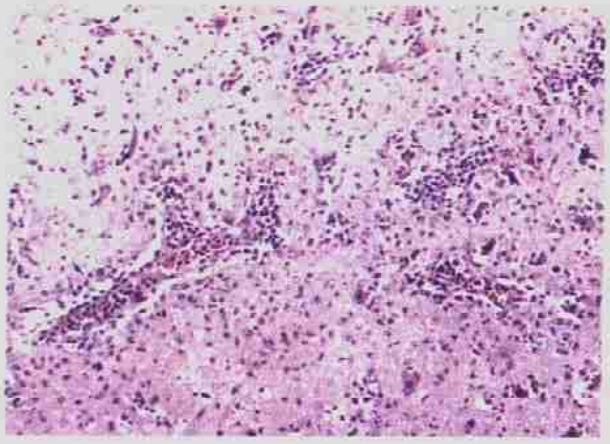


图 1 EAE 模型组大鼠脑组织的病理改变(HE×400)

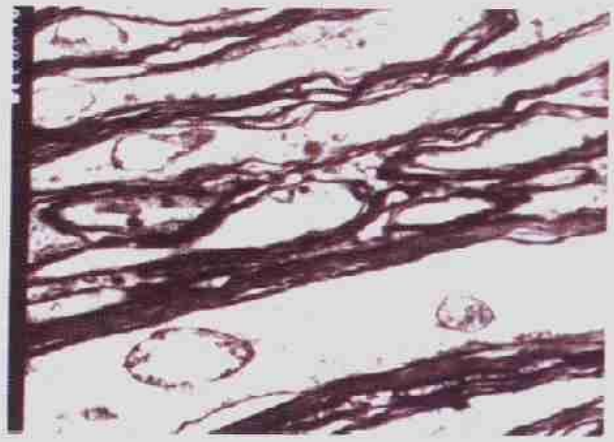


图 2 EAE 模型组大鼠髓鞘的超微结构改变(×12000)



图 3 ICAM-1 在 EAE 大鼠脑血管内皮细胞中的表达 SABC×200

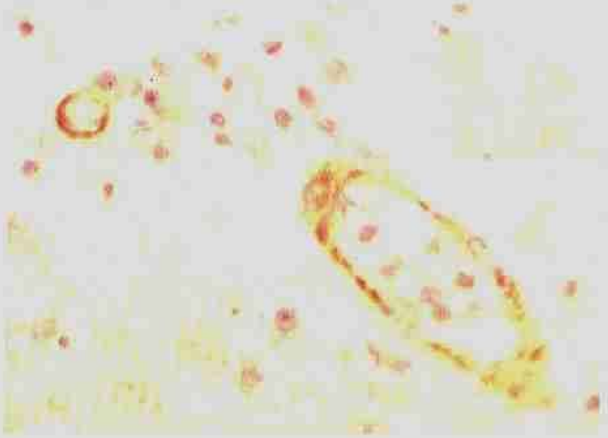


图 4 VCAM-1 在 EAE 组大鼠脑血管内皮细胞上的表达 SABC×400

1 表达(表 1,图 3,4)。

表 1 ICAM-1 和 VCAM-1 在 EAE 大鼠脑中的表达(个/视野)

	n	ICAM-1	P 值	VCAM-1	P 值
对照组	10	2.52±1.14	<0.01	0.05+0.11	<0.01
实验组	10	13.46±2.31	<0.01	12.26±1.38	<0.01

从表 1 可见,正常大鼠脑组织内仅有微量粘附分子 ICAM-1、VCAM-1 的表达。EAE 大鼠脑组织中粘附分子表达的量明显高于对照组($P<0.01$),有显著性差异。

3 讨 论

从细胞及分子水平研究脱髓鞘疾病的发病机制,人们通常采用以下几种动物模型:(1)实验性变态反应性(自身免疫性)脑脊髓炎(EAE),(2)慢性病毒脱髓鞘疾病,(3)毒素介导的有齿动物脱髓鞘[4]。其中,EAE 的髓鞘损害是由免疫反应介导的、对髓鞘或少突胶质细胞上的自身或外来抗原直接攻击所致,故与人类中枢性脱髓鞘疾病多发性硬化(MS)极为相似,因而成为急性 MS 的发病机制、病理及临床研究的最佳选择。

已有研究表明,EAE 动物的 BBB 确有改变,但淋巴细胞并不是通过此破损的 BBB 被动的进入 CNS,而是小静脉的内皮细胞主动转运到 CNS[5]。另外研究发现,将 MBP 致敏的 T 淋巴细胞直接注入实验动物的 CNS 不能诱发 EAE,但将同样数量的 MBP 致敏的 T 淋巴细胞皮下或外周注射均可引起 EAE[6]。所以提示在外周针对髓鞘成分的淋巴细胞的活化和血管内皮细胞的活性改变是启动致病的重要因素。

粘附分子[7](AM)是指由细胞产生、存在于细胞表面,介导细胞与细胞间或细胞与基质间相互接触与结合的一类膜表面糖蛋白。与白细胞穿过内皮细胞密切相关的粘附分子主要有 ICAM-1-LFA-1,VCAM-1-VLA-4。

本实验发现在 EAE 大鼠脑血管内皮细胞 ICAM-1、VCAM-1 的表达比正常组明显上调,推测其主要从以下两个方面在 EAE 的发病中发挥重

维普资讯 http://www.cqvip.com

要作用。

3.1 作为共刺激分子,活化静息的 T 细胞

静息的 T 细胞活化不仅需要 CD3/TCR 与 MHC-抗原复合体的作用,还需要 B7/CTLA-4 与 CD28,LFA-1/ICAM-1 等共刺激信号的参与。B7 分子对静息 $CD4^+$ T 细胞的共刺激作用较弱,Damle[8]等发现 VCAM-1 能大大增强 B7 分子对静息 T 细胞的增殖作用,这可能是由于 VCAM-1 导致 CD28 分子表达增强,同时 CD28 介导的胞内游离 Ca^{2+} 动员也增加。他们还发现静息 T 细胞不表达 B7 的另一配体 CTLA-4,但是在 VCAM-1 的作用下,CTLA-4 表达并与 CD28 一起协同刺激 T 细胞的活化增殖。VCAM-1 与相应配体结合,在 TCR 参与下作为共刺激分子可以诱导分化了的抗原特异性 T 细胞的活化。

3.2 在介导活化的淋巴细胞穿过 BBB 中起至关重要的作用

EAE 大鼠脑血管内皮细胞在炎症状态下表达了 ICAM-1、VCAM-1,活化的 T 细胞通过 ICAM-1-LFA-1 以及 VCAM-1—VLA-4 的途径进入 CNS;同时,T 细胞与粘附分子结合后,可诱导产生基质金属蛋白酶,降解血管外基质成分从而介导更多的 T 细胞进入 CNS。

综上所述:ICAM-1,VCAM-1 参与活化静息的 T 淋巴细胞,使其分化增殖并介导 T 淋巴细胞通过 BBB,分泌多种细胞因子,这些细胞因子再通过免疫机制,或直接作用导致髓鞘的脱失。因此 ICAM-1,VCAM-1 在 EAE 的发病以及随后的髓鞘脱失中起着重要的作用,而应用粘附分子的单克隆抗体来抑制淋巴细胞细胞与 EAE 脑内皮细胞的粘附,从而缓解 EAE 临床症状,将是我们值得进一步探讨和研究的工作。

参 考 文 献

[1] 曹翠丽,王 惠,马常升. 实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠模型的建立[J]. 解剖学杂志,2001;24(1):77-80.

[2] 林嘉友. 灌服碱性髓鞘蛋白对实验性变态反应性脑脊髓炎的抑制作用[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,1994;1(2):61-67.

[3] Matsumoto Y, Kawai K, Tomita Y, et al. Limiting-dilution analysis of thefrequency of myelin basic protein reactive T cells in lewis, PVG/C and BN rats: implication for susceptibility to autoimmune encephalomyelitis[J]. Immunology, 1990; 69: 215-260.

[4] NjeUga MK, Kodriguez M. Animal model of demyelination[J]. Current opinion in Neurology, 1996; 9: 159-164.

[5] Knobler KL, Marini JC, Goldowitz D, et al. Distribution of blood brain barrier in heterotopic brain transplants and its releationship to the lesion of EAE[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1992; 51(1): 36-39.

[6] Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Neuvous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS[J]. Immunol today, 1994; 15(5): 218-224.

[7] 金伯全. 细胞和分子免疫学[M]. 第 2 版,西安:世界图书出版公司,1994;33.

[8] Damle NK, Klussman K, Leytze G. Constimulation of J lymphocytes with integrin ligrands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 induce functional expression of CTLA-4, a second receptor for BT[J]. J Immunol, 1994; 152(6): 2686-2697.

(上接第 202 页)

Mycobacterium bovis[J]. Clin Infect Dis, 2000; 30(s3): 299-301.

[8] Kanko H, Yamada H, Mizuno S, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in Mycobacterium induced granuloma formation in TNF-alpha deficient mice[J]. Lab Invest, 1999; 79: 379-386.

[9] Beker LG, Andve LM, Amy B, et al. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine Mycobacterial infection are dose dependent[J]. Infection and Immunity, 2000; 68(12): 6954.

[10] 汤红明,刘君炎,高立芬. IFN-γ 与 TNF 联合治疗结核菌感染小鼠疗效及机理的研究[J]. 免疫学杂志,2001;17(6):457-459.

[11] 陶 昆,卢贤瑜,成海恩,等. 结核菌 H37Ra 免疫小鼠后 PPD 刺激淋巴细胞增殖转化的探讨[J]. 重庆医科大学学报,2005;1:88-90.