

慢性实验性变应性脑脊髓炎猴脊髓非病灶部位 轴突损伤的机制

王敦敬, 胡学强, 陆正齐

(中山大学附属第三医院神经病学科, 广东 广州 510630)

摘要: 【目的】探讨多发性硬化非病灶部位轴突损伤及其机制。【方法】以 8 只慢性实验性变应性脑脊髓炎猴为研究对象, 先对其进行磁共振扫描, 然后对颈髓 3-4 节段进行苏木素-伊红染色观察炎症细胞浸润、银染色及神经丝免疫组化染色观察轴突损伤、双重染色标记凋亡的少突胶质细胞, 同时观察轴突密度以及少突胶质细胞的凋亡情况。【结果】在颈髓 3-4 节段未发现实验性变应性脑脊髓炎病灶、炎症细胞浸润及髓鞘脱失, 但是存在轴突损伤以及少突胶质细胞的凋亡, 轴突密度波动于 1900~3232/单位面积, 高倍视野下平均凋亡少突胶质细胞数为 1.5~5.167。【结论】造成多发性硬化或实验性变应性脑脊髓炎非病灶部位轴突损伤的机制, 可能与少突胶质细胞凋亡有关, 而炎症细胞可能不参与非病灶部位的轴突损伤, 髓鞘脱失并不是轴突损伤的必要条件。

关键词: 实验性变应性脑脊髓炎; 多发性硬化; 轴突损伤; 猴

中图分类号: R744.5+1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0649-03

Mechanism of Axonal Injury in Nonlesion Areas of Spinal Cord of Monkey with Chronic Experimental Allergic Encephalomyelitis

WANG Dun-jing, HU Xue-qiang, LU Zheng-qi

(Department of Neurology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To investigate axonal injury and its mechanism in the nonlesion areas of multiple sclerosis (MS). 【Methods】Firstly, magnetic resonance imaging was performed on 8 monkeys with chronic experimental allergic encephalomyelitis (EAE). Secondly, all of them were killed and slices from their No.3-4 cervical segment were stained with haematoxylin-eosin (HE) for inflammatory cells, modified Bielschowsky silver impregnation and neurofilament immunohistochemical staining for axons, double staining for the apoptotic oligodendrocytes. Meanwhile, axonal density and apoptotic oligodendrocytes were detected. 【Results】Lesions, inflammatory cells and the loss of myelin sheath were not detected in the No.3-4 cervical segment, but there existed the axonal injury and apoptotic oligodendrocytes. The mean axonal density ranged from 1900 to 3232 per unit area, and mean apoptotic oligodendrocytes from 1.5 to 5.167 per one high power field. 【Conclusion】The mechanisms contributing to the axonal injury in the nonlesion areas of EAE and MS maybe include the apoptosis of oligodendrocytes, but not the inflammatory cells. The loss of myelin sheath is not the prerequisite of axonal injury.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis; multiple sclerosis; axonal injury; monkey

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2006,27(6): 649-651]

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是常见的中枢神经系统炎症性脱髓鞘疾病,是造成青壮年神经功能障碍的常见原因。近年来,研究发现 MS 也存在轴突损伤,并且当轴突损伤达到一定程度后便可造成不可逆的神经功能障碍。作者既往的

研究发现同种食蟹猴脑白质均浆诱导的猴慢性实验性变应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis, EAE)病灶内存在轴突损伤^[1]。MS 轴突损伤不仅存在于病灶内,而且还存在于非病灶内。由于非病灶在脑和脊髓中占有较大的比例,

收稿日期: 2006-04-04

基金项目: 广东省科技厅科技计划基金资助项目(2003C33801)

作者简介: 王敦敬(1974-),男,江苏徐州人,博士生;胡学强,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail: huxueqiangqm@yahoo.com.cn

探讨非病灶内轴突损伤具有更加重要的意义,但是非病灶内轴突损伤还没有引起应有的重视。本文通过对慢性 EAE 猴非病灶部位少突胶质细胞 (oligodendrocyte, ODC) 凋亡、炎性细胞浸润、轴突及髓鞘结构等进行观察,并测定轴突密度和 ODC 凋亡的关系,以初步探讨 MS 非病灶部位的轴突损伤及其机制,为 MS 治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 EAE 模型建立

于 1997 年初参照文献[2]的方法,建立了 8 只猴的 EAE 模型。然后托付给广东省实验动物中心自然放养 3 年,于 2000 年底一次性收回。所有动物均来源于广东省实验动物中心,其中雄性 4 只,雌性 4 只,年龄 3.5~4.5 岁,体质量 3.0~5.5 kg。单笼喂养,健康状况良好,符合国家实验动物使用标准(合格证号为:粤检证记 97A015)。

1.2 试剂

兔抗神经丝 200 抗体 (anti-Neurofilament 200 antibody) 由 Sigma 公司提供;小鼠抗 2,3-环核苷酸-3-磷酸二酯酶 (2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase, CNPase) 抗体由 NeoMarkers 公司提供;细胞凋亡检测试剂盒、即用型 SABC 试剂盒及 DAB 显色试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.3 磁共振扫描

在动物处死前,进行头部及颈髓磁共振扫描(飞利浦 ACSNT-15 MR 仪,见文献[1])。

1.4 病理取材及组织学检测

以戊巴比妥麻醉动物,放血处死,取脑和脊髓,并置于 40 g/L 的多聚甲醛磷酸盐缓冲液中固定。取颈髓 3-4 节段常规方法制作石蜡切片 HE 染色;采用改良的 Bielschowsky's 法对轴突进行染色(参见文献[3]);以神经丝抗体(100 倍稀释)为一抗,用 SABC 法对轴突进行免疫组化染色;采用双重染色标记凋亡的 ODC,即先采用免疫组化染色 SABC 法,以 CNPase 抗体(100 倍稀释)为一抗,标记少突胶质细胞,然后参考凋亡试剂盒中提供的方法检测凋亡细胞。

1.5 数据处理

轴突密度测定采用 BI-2000 医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司生产)计数双侧前索、

后索及侧索 6 个部位的单位面积内的轴突数目。凋亡 ODC 的测定分别计数 1 个高倍视野下($\times 400$)上述 6 个部位的凋亡细胞,取均数。做散点图,观察凋亡 ODC 与轴突密度的关系。

2 结果

HE 染色未发现炎症细胞浸润以及 EAE 病灶,轴突染色发现有轴突损伤(图 1),单位面积内的平均轴突数量在 1900~3232 之间(图 2);双重染色发现在白质及灰质内均存在凋亡的 ODC,但是未见髓鞘脱失(图 3),不同标本每个高倍视野内平均凋亡 ODC 数在 1.5~5.2 之间(图 2)。

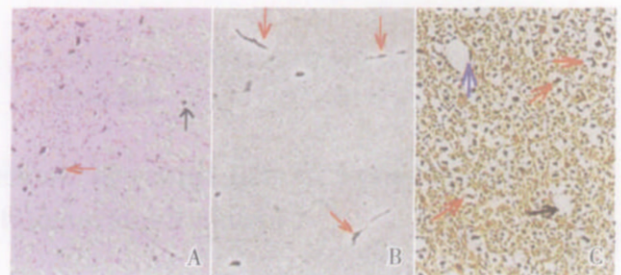


图 1 脊髓组织结构

Fig.1 Structure of spinal cord

A: HE staining ($\times 200$) showed polygonal neurons () and glial cells (), but no infiltrating inflammatory cells and lesions in the white and gray matter. B: Axonal silver staining ($\times 200$) showed contorted axons (). C: Axonal immunohistochemistry staining ($\times 400$) showed irregular axonal transect (), axonal loss () and larger space around axons ().

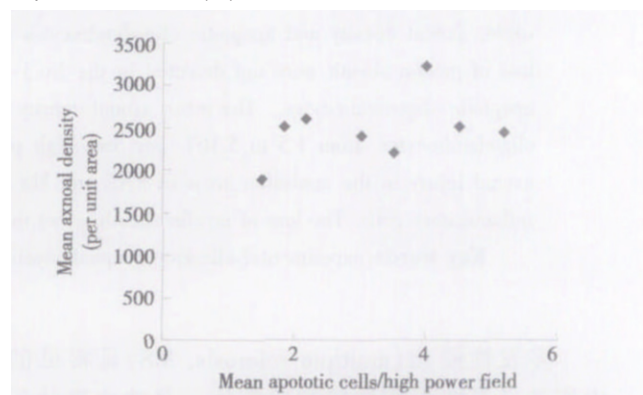


图 2 轴突密度与细胞凋亡关系图

Fig.2 Relation of mean axonal density and mean apoptotic cells

3 讨论

本组 8 例 EAE 猴进行磁共振扫描,未在颈髓

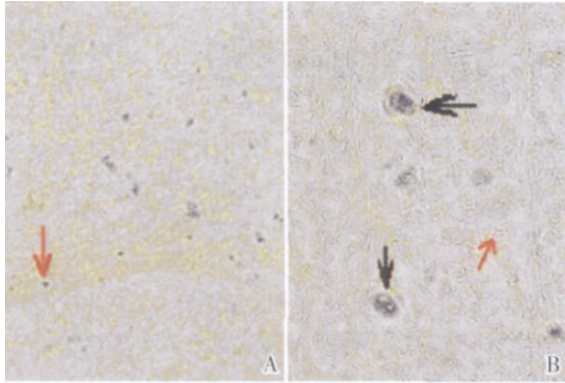


图 3 双重染色检测凋亡 ODC

Fig. 3 Double staining for detecting apoptotic ODC

A: Apoptotic ODC dispersed in the white and gray matter ($\times 100$). B: Apoptotic cells () with yellow membrane appeared indigo, myelin sheath () was complete ($\times 400$)

3-4 节段发现病灶^[1], HE 染色也未发现有病灶, 而两种轴突染色方法均发现了轴突损伤。这同目前在 MS 中的发现相一致, 即轴突损伤不仅存在于 MS 病灶部位而且存在于 MS 的非病灶部位的^[4]。轴突损伤达到一定程度就可以导致不可逆的神经功能障碍^[5]。由于非病灶部位的体积相对较大, 非病灶部位内的轴突损伤在 MS 神经功能障碍中也具有更重要的意义^[4]。目前, 认为 Wallerian 变性是造成非病灶部位轴突损伤的重要原因^[6], 而是否还有其他机制参与非病灶部位的轴突损伤鲜见报道。

本文通过 HE 染色在慢性 EAE 猴的非病灶未发现 T 细胞、巨噬细胞、浆细胞等炎症细胞的浸润, 这同普遍认为的非病灶部位无炎症细胞浸润是一致的。但是在 EAE 或 MS 病灶内通常存在数量不等 T 细胞、巨噬细胞、浆细胞等炎症细胞的浸润, 并与轴突损伤有关^[7]。因此, 可以认为炎症细胞参与非病灶部位轴突损伤的可能性不大。

本文通过双重染色发现在慢性 EAE 猴的非病灶部位存在数量不等的凋亡的 ODC。在 EAE 或 MS 的非病灶部位是否存在 ODC 凋亡及其是否参与轴突损伤尚鲜见文献报道。但是对 EAE 或 MS 病灶进行的研究发现 ODC 凋亡及损伤在轴突损伤中起着重要的作用^[2,8,9], 据此推测 ODC 凋亡在非病灶部位轴突损伤中也可能起着一定的作用。从图 2 的凋亡 ODC 与轴突密度的散点图可发现随着凋亡 ODC 数量的增加, 轴突密度并没有呈现出明显的减少趋势, 这可能与以下两方面有关: 本研究的样本量小; 非病灶部位 ODC 凋亡可能不是

造成轴突损伤的主要原因。为了明确非病灶部位 ODC 凋亡对轴突损伤的影响, 必须扩大研究的样本量; 从同一样本的不同脊髓节段观察 ODC 凋亡与轴突密度的关系; 设立阴性对照, 观察 ODC 数量与轴突密度、ODC 减少与轴突密度减少之间的关系。

本文发现在慢性 EAE 猴的非病灶部位尽管存在轴突损伤, 但是并没有出现髓鞘脱失, 说明髓鞘脱失并不是轴突损伤的必要条件。

总之, 造成 MS 或 EAE 非病灶部位轴突损伤的机制, 除了与 Wallerian 变性有关外, 可能还与 ODC 凋亡有关, 而炎症细胞可能不参与非病灶部位的轴突损伤, 髓鞘脱失并不是轴突损伤的必要条件, ODC 凋亡不是造成轴突损伤的主要原因。

参考文献:

- [1] 胡学强, 郭怡菁, 陆正齐, 等. 慢性实验性变应性猴脑脊髓炎的超微结构改变[J]. 中华神经科杂志, 2002, 35(4): 221-223.
- [2] 饶丛志, 胡学强, 陆正齐. 猴 EAE 致敏前后脑脊液 IgG 指数和 IgG 合成率的变化[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(2): 94-96.
- [3] 陈尚采, 孙曼罗. 临床病理组织与免疫组化诊断学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 487.
- [4] DE STEFANO N, GUIDI L, STROMILLO M L, et al. Imaging neuronal and axonal degeneration in multiple sclerosis[J]. *Neur Sci*, 2003, 24(Suppl 5): S283-286.
- [5] MINAGAR A, TOLEDO E G, ALEXANDER J S, et al. Pathogenesis of brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis[J]. *J Neuroimaging*, 2004, 14(3 Suppl): 5S-10S.
- [6] OH J, PELLETIER D, NELSON S J. Corpus callosum axonal injury in multiple sclerosis measured by proton magnetic resonance spectroscopic imaging [J]. *Arch Neurol*, 2004, 61(7): 1081-1086.
- [7] BRUCK W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage [J]. *J Neurol*, 2005, 252(Suppl 5): V3-9.
- [8] HOVELMEYER N, HAO Z, KRANIDIOTI K, et al. Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Immunol*, 2005, 175(9): 5875-5884.
- [9] WOLSWIJK G. Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord [J]. *Brain*, 2002, 125(Pt 2): 338-349.

(编辑 刘清海)