

## 小鼠颈髓后索溶血卵磷脂注射诱导轴突脱髓鞘

张永杰<sup>1\*</sup>, 吴琪<sup>1,2</sup>, 左一智<sup>1</sup>, 肖娜<sup>1</sup>, 李雷<sup>1</sup>, 顾振<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学人体解剖学系, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>中国人民解放军八二医院骨科, 江苏 淮安 223001)

**[摘要]** 目的: 注射溶血卵磷脂(lysolecithin, LPC)至小鼠颈段脊髓后索诱导轴突脱髓鞘的模型建立及评价体系。方法: 手术显微镜下, 使用微量注射器将 0.4 μl 1% LPC 注射至成年小鼠第 5 颈髓(C5)后索。1 周后处死动物, 取 C4~C6 颈髓节段, 行石蜡切片、甲苯胺蓝染色观察脱髓鞘区域, 采用 Amira 4.1.1 软件三维重建和测量脱髓鞘区域体积, 并进行电镜观察轴突脱髓鞘病变。结果: 注射 LPC 造模, 小鼠苏醒后无明显运动及感觉异常, 甲苯胺蓝染色显示注射区出现体积为  $(1.41 \pm 0.05) \times 10^6 \mu\text{m}^3$  淡蓝或白色脱髓鞘病变区, 电镜结果证实注射区轴突发生脱髓鞘样变。结论: 小鼠颈髓后索注射 LPC 可稳定诱导轴突脱髓鞘。

**[关键词]** 脱髓鞘; 脊髓后索; 溶血卵磷脂

**[中图分类号]** R744.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)11-1537-04

## Lysolecithin-induced axonal demyelination in the dorsal funiculus of mice cervical spinal segment

ZHANG Yong-jie<sup>1\*</sup>, WU Qi<sup>1,2</sup>, ZUO Yi-zhi<sup>1</sup>, XIAO Na<sup>1</sup>, LI Lei<sup>1</sup>, GU Zhen<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Human Anatomy, NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Orthopaedics, 82 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Huai'an 223001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an effective model and evaluation system for lysolecithin (LPC) induced demyelination in dorsal funiculus of cervical spinal segment in the adult mice. **Methods:** The adult mice were injected with 0.4 μl 1% LPC or normal saline into the dorsal funiculus of the 5<sup>th</sup> cervical (C5) spinal segment using glass-needle-capped syringe under the microscope. One week post surgery, mice were sacrificed and perfused, and segments of C4 to C6 were dissected and embedded in paraffin. Serial coronal sections were stained with toluidine blue. The 3D cartoon of demyelinated area of total serial sections was rebuilt, and the volume of the demyelinated area was measured by Amira 4.1.1 software. The demyelinated axons were also observed by electron microscope. **Results:** No obvious motor and sensory abnormality were found after mice recovered from the anesthesia. Toluidine blue staining result showed that there was the light blue or pale demyelination area around the injection point, and the volume of which was about  $(1.41 \pm 0.05) \times 10^6 \mu\text{m}^3$ . The demyelinated axons were confirmed by electron microscopy observation. **Conclusion:** Precise injection of LPC into the C5 dorsal funiculus of mice can stably induce the axonal demyelination.

**[Key words]** demyelination; dorsal funiculus; lysolecithin

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1537-1540]

脱髓鞘病变常见于中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的诸多疾病, 如多发性硬化症<sup>[1]</sup>、脊髓损伤<sup>[2]</sup>、缺血缺氧性脑病<sup>[3]</sup>等, 可引起广泛性轴

突失去髓鞘包裹, 进而破坏轴突传导, 导致严重的功能障碍<sup>[4]</sup>。但其确切机制尚不明确。

近年来, 基因工程小鼠广泛应用于医学研究, 制作一种简易实用的小鼠脱髓鞘模型及评价体系, 以研究某种基因突变对髓鞘再生能力的影响显得尤为重要。溶血卵磷脂 (lysolecithin, LPC) 作为一种胶质细胞毒素被广泛应用于制作啮齿类动物 CNS 脱髓鞘模型, 将 LPC 直接注射至小鼠脑或脊髓, 可有效诱导脱髓鞘病变, 并可继续观察内源性的髓鞘再生<sup>[5]</sup>。

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(81100942); 江苏省自然科学基金(BK2010539); 江苏高校优势学科建设工程项目; 南京医科大学基础医学院青年教师培养基金 (09JC012); 南京医科大学基础医学院优势学科项目(JX10131801075)

\* 通讯作者, E-mail: zhangyongjie77@163.com; njguzhen@163.com

为此,本研究在手术显微镜下,借助微量注射器及小鼠脊柱固定支架,将 LPC 精确注射至小鼠第 5 颈髓 (cervical 5 segment, C5) 后索,诱导轴突脱髓鞘,并采用病理组织学及图像三维重建技术分析其脱髓鞘区域与体积,采用电镜观察其轴突脱髓鞘病变。以此建立小鼠颈段脊髓后索脱髓鞘模型及评价体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

实验用 10 周龄雌性 C57Bl/6 小鼠,体重约 20 g,共 24 只,由南京医科大学实验动物中心提供。动物饲养、管理及使用均严格按照南京医科大学实验动物管理规范进行。

#### 1.1.2 试剂和仪器

LPC、甲苯胺蓝(美国 Sigma 公司),小鼠脊柱固定支架(美国 LISA 公司),微量注射器(美国 Hamilton 公司),SR-6N 立体定位仪(日本 Narishige 公司),手术显微镜(中国六六视觉公司),石蜡切片机、光学显微镜(德国 Leica 公司),超薄切片机(美国 RMC 公司),JEM-1010 透射电子显微镜(日本 JEM 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型制作

小鼠随机分为 3 组:①空白对照组(A 组:3 只);

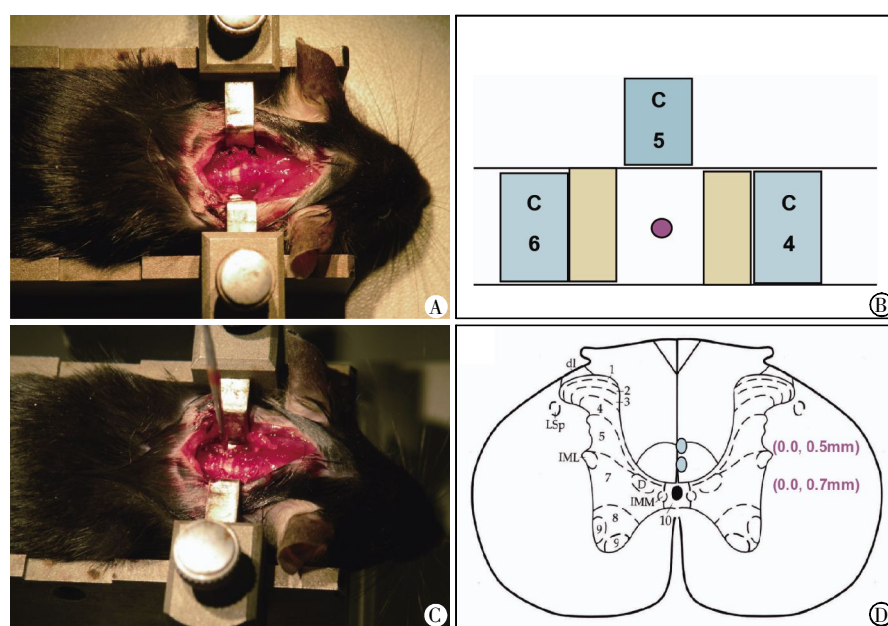
②生理盐水注射对照组(B 组:10 只);③LPC 注射模型组(C 组:10 只)。小鼠经每 100 g 体重腹腔注射 1 ml 3.5%水合氯醛麻醉后,取俯卧位,固定于小鼠脊柱固定支架<sup>[6]</sup>,纵向剪开颈部中线皮肤,钝性分离皮下筋膜及肌层,充分暴露颈段 C4~C6 椎板(图 1A),手术显微剪去除 C5 椎板(图 1A,B)。采用头端附有玻璃针尖(管口直径 50 μm,斜角 45°)的 1 μl 微量注射器将总量为 0.4 μl 的 1% LPC 注射至 C5 后索,注射点居中线,注意避开血管,深度 0.5 mm 和 0.7 mm,每个注射点注射 0.2 μl 溶液(图 1C,D),每个注射点留针 3 min,以避免注射液溢出。分层缝合肌肉、筋膜及皮肤。LPC 注射当天记为术后 0 d。手术对照组动物仅暴露脊髓,于相同位点注射与模型组动物等体积的生理盐水。

#### 1.2.2 动物灌注固定、组织取材与切片

术后 1 周,动物深麻醉后,经心脏行 4%多聚甲醛灌注固定,取含损伤部位的颈段脊髓(C4~C6),其中 B、C 组每组 6 个组织及 A 组 3 个空白对照颈段脊髓行 4%多聚甲醛固定,经梯度酒精脱水,石蜡包埋,行连续冠状石蜡切片,片厚 5 μm,用于甲苯胺蓝染色;B、C 组每组其余 4 个组织行 2%戊二醛后固定,用于半薄切片(片厚 2 μm)、超薄切片及电镜观察。

#### 1.2.3 甲苯胺蓝染色

脊髓连续冠状切片行甲苯胺蓝(含 5%甲苯胺蓝的 1%硼砂盐溶液)染色,常规脱水透明,中性树



A:小鼠固定与支架,C5 椎板切开;B:C5 椎板切开示意图;C:微玻璃管注射至 C5 后索;D:注射位点及深度示意图。

图 1 LPC 注射诱导小鼠颈髓后索脱髓鞘模型的制作

Figure 1 LPC-induced demyelination model in dorsal funiculus of mice C5 spinal segment

脂封片,光镜观察并摄片<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.4 三维重建及数据分析

每个组织选取 30 张 C4~C6 的连续切片,5 倍物镜下摄片,采用 Amira 4.1.1 软件(澳大利亚 Visage Imaging 公司)三维重建脊髓及脱髓鞘区域,并测量脱髓鞘区域体积。Excel 软件对脱髓鞘体积进行数据分析,结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

#### 1.2.5 电镜观察

C5 颈髓组织经四氧化锇溶液进一步固定、梯度丙酮脱水、环氧树脂包埋后,行半薄切片及甲苯胺蓝染色,选取脊髓后索目标区域,进一步修块,行超薄切片,醋酸铀和柠檬酸双染,透射电镜下观察并摄片。同时,甲苯胺蓝染色的半薄切片经中性树脂封片后在 100 倍油镜下观察轴突的脱髓鞘变<sup>[8]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 LPC 注射模型鼠行为学观察

LPC 注射组与生理盐水对照组小鼠在麻醉苏醒后,均可正常饮食,大小便如常,无需膀胱护理。无明显步态及躯干平衡异常,活动较自如。无挠首、舔足等感觉异常现象。

### 2.2 LPC 注射模型鼠脊髓脱髓鞘变化

甲苯胺蓝染色后,光镜下显示脊髓白质正常部

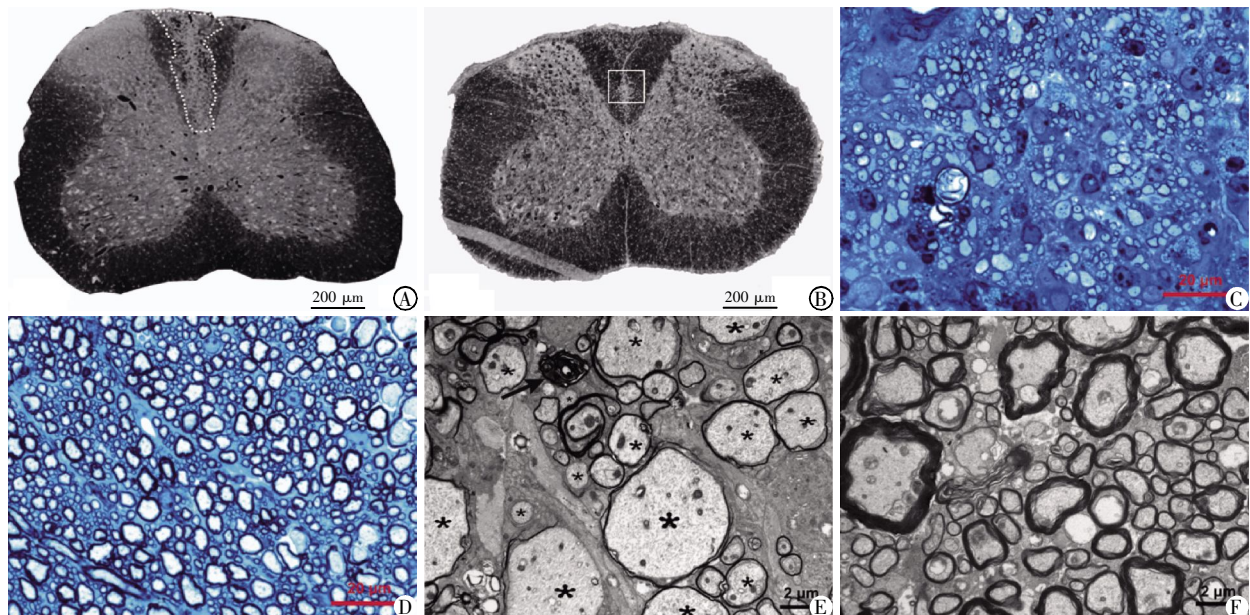
位为深蓝色,淡蓝或白色区域为脱髓鞘病变区<sup>[7]</sup>。生理盐水组在后索注射区与正常对照组小鼠无明显差异,接受 LPC 注射小鼠可见 C5 节段后索区域染色较浅,形成脱髓鞘区域(图 2A,B)。半薄切片经甲苯胺蓝染色后,在 100 倍油镜下可见:LPC 注射小鼠后索轴突髓鞘松散、变薄,出现髓鞘溃变现象(图 2C),而对照组小鼠中未见明显改变(图 2D)。采用 Amira 4.1.1 软件对 LPC 注射小鼠 C4~C6 的连续冠状切片行三维重建,可见后索脱髓鞘区域。6 只小鼠的脱髓鞘区域位置及体积基本恒定,均定位于后索,体积为  $(1.41 \pm 0.05) \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 。

### 2.3 LPC 注射模型鼠脊髓髓鞘超微结构变化

电镜下观察 C5 颈髓后索轴突的髓鞘结构。LPC 注射组小鼠在脱髓鞘区域内可见大量裸露的轴突,溃变的髓鞘显著变薄、分层、断裂、或缺失,甚至出现髓鞘皱缩崩解的现象(图 2E)。而对照组小鼠轴突的髓鞘板层结构完整致密(图 2F)。

## 3 讨论

常用的脱髓鞘动物模型有免疫制剂诱导的实验性自身免疫性脑脊髓炎模型<sup>[9]</sup>、胶质细胞毒素等诱导的细胞毒性脱髓鞘模型<sup>[10]</sup>、病毒诱导脱髓鞘模型<sup>[11]</sup>以及借助基因工程手段建立的多种转基因



A: LPC 注射组 C5 后索出现淡染区域,如虚线框内所示( $\times 40$ );B:生理盐水注射组 C5 后索白质染色较深( $\times 40$ );C:为 A 图框内区域,甲苯胺蓝染色,示 LPC 注射组显著脱髓鞘变(半薄切片,甲苯胺蓝染色,光镜观察, $\times 1\,000$ );D:生理盐水注射组甲苯胺蓝染色( $\times 1\,000$ );E:电镜示 LPC 注射组诸多脱髓鞘变的轴突(星号)及部分溃变的髓鞘(箭头)( $\times 4\,400$ );F:生理盐水注射组髓鞘板层结构完整致密( $\times 4\,400$ )。

图 2 光镜及电镜下 LPC 和生理盐水注射小鼠的 C5 脊髓形态学变化

Figure 2 The morphological changes of the C5 spinal segment of the mice treated with the LPC or NS injection under the light and electron microscope

脱髓鞘小鼠模型<sup>[12]</sup>等。不同的模型鼠有不同的表型特点,适用于不同的脱髓鞘及髓鞘再生的病理机制研究。

其中,LPC作为一种胶质细胞毒素,可通过促进活化的巨噬细胞表达磷脂酶A2,而将膜磷酸卵磷脂降解为LPC,从而诱导髓鞘降解,可较特异地损伤髓鞘细胞,对轴突影响较小<sup>[13]</sup>。LPC注射至脊髓后,脱髓鞘病变在注射后30 min即可发生,其高峰在术后1周时出现;术后10 d起即可观察到由内源性再生的少突胶质细胞形成的髓鞘再生<sup>[5]</sup>。而另一种较常用的建立脱髓鞘模型的胶质细胞毒素结合溴化乙锭辐照,可诱导脱髓鞘并可杀死内源性少突胶质前体细胞,适合于研究细胞移植等外源性因素对髓鞘再生的作用<sup>[10]</sup>。

为建立合适的小鼠脱髓鞘模型用于研究内源性髓鞘再生,本研究选用1% LPC注射诱导脱髓鞘,此剂量可有效诱导脱髓鞘,同时尽量减少对轴突的损伤。本研究选择在脱髓鞘病变的高峰即术后1周处死动物,观察脱髓鞘病变。后续实验可选择LPC注射后不同时间,如术后1、3、7、14、28 d等来进一步观察分析颈髓后索轴突脱髓鞘及内源性髓鞘再生的时程变化。并可结合电镜结果行G-ratio测量,以观察再生髓鞘的厚度<sup>[14]</sup>。

以往也有将LPC注射至小鼠脊髓腹外侧索诱导脱髓鞘模型<sup>[7]</sup>,与之相比,注射LPC至脊髓后索的优点为:①注射点相对表浅而直接,模型的稳定性与重现性较好;②后索有下行的皮质脊髓束及上行的感觉传导束<sup>[15]</sup>,可以在术后选择不同时间,行平衡木行走试验等行为学实验检测动物精细运动及平衡觉等改变;③手术对动物损伤较小,动物易存活,术后护理方便。

为保证注射LPC至成年小鼠颈髓后索手术的成功,有以下4个注意点:①需采用小鼠脊柱固定支架以固定与充分暴露小鼠颈髓;②采用头端附有玻璃针的Hamilton微量注射器及立体定位系统,以保证注射药物的剂量与注射点位置的精确性;③手术显微镜不可或缺,以提供良好的手术与注射视野;④采用经过打磨的尖细且锐利的玻璃针注射可有效避免注射点周围的牵拉性损伤。

总之,本研究结果显示注射LPC至成年小鼠颈髓后索可有效诱导轴突脱髓鞘,是一个较理想的动物模型,结合相应的病理组织学、图像分析及电镜观察,能进行有效评价,可用于脱髓鞘及内源性髓鞘再生的机制和药物干预的研究。

#### [参考文献]

- [1] Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(4): 1180-1188
- [2] Almad A, Sahinkaya FR, McTigue DM. Oligodendrocyte fate after spinal cord injury [J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(2): 262-273
- [3] Kipp M, Berger K, Clarner T, et al. Sex steroids control neuroinflammatory processes in the brain: relevance for acute ischaemia and degenerative demyelination [J]. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24(1): 62-70
- [4] Kotter MR, Stadelmann C, Hartung HP. Enhancing remyelination in disease; can we wrap it up? [J]. *Brain*, 2011, 134(Pt7): 1882-1900
- [5] Jeffery ND, Blakemore WF. Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lyssolecithin [J]. *J Neurocytol*, 1995, 24(10): 775-781
- [6] Zhang Y, Zhang YP, Shields LB, et al. Cervical central canal occlusion induces noncommunicating syringomyelia [J]. *Neurosurgery*, 2012, 71(1): 126-137
- [7] 张永杰, 顾振, 古慕峰, 等. 小鼠脊髓脱髓鞘病变后LINGO-1的动态表达变化 [J]. *解剖学研究*, 2009, 31(4): 249-252
- [8] Mi S, Miller RH, Tang W, et al. Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells [J]. *Ann Neurol*, 2009, 65(3): 304-315
- [9] 贾鹏, 曾彦英, 丁新生, 等. 人骨髓间质干细胞治疗实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠的实验研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(7): 689-693
- [10] Blakemore WF, Franklin RJ. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 318(1): 193-212
- [11] Sato F, Tanaka H, Hasanovic F, et al. Theiler's virus infection: Pathophysiology of demyelination and neurodegeneration [J]. *Pathophysiology*, 2011, 18(1): 31-41
- [12] Baes M, Aubourg P. Peroxisomes, myelination, and axonal integrity in the CNS [J]. *Neuroscientist*, 2009, 15(4): 367-379
- [13] Trotter J, Smith ME. The role of phospholipases from inflammatory macrophages in demyelination [J]. *Neurochem Res*, 1986, 11(3): 349-361
- [14] Zhang Y, Zheng Y, Zhang YP, et al. Enhanced adenoviral gene delivery to motor and dorsal root ganglion neurons following injection into demyelinated peripheral nerves [J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(11): 2374-2384
- [15] Liu Y, Shi J, Lu CC, et al. Ryk-mediated Wnt repulsion regulates posterior-directed growth of corticospinal tract [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(9): 1151-1159

[收稿日期] 2012-07-20