



小胶质细胞在 Cuprizone 所致髓鞘脱失 动物模型中的双重性作用

梁梦茹^{1,2}, 尹琳琳¹, 陈光亮², 李 林¹

(1. 首都医科大学宣武医院药物研究室, 北京 100053; 2. 安徽中医药大学中西医结合临床学院, 合肥 230038)

【摘要】 小胶质细胞(microglia)是中枢神经系统(CNS)中固有的免疫监视细胞,是CNS的重要组成部分,构成CNS的第一道免疫防线。小胶质细胞活化是许多CNS疾病的重要病理特征之一,其在多发性硬化(MS)的发病过程中扮演重要角色。MS是以炎症反应、髓鞘脱失和轴突损伤为主要特征的CNS疾病,MS患者及实验动物脑内均可见活化的小胶质细胞,其作用机制复杂,具有致炎和抗炎双重作用。一方面小胶质细胞可通过促进吞噬、轴突再生、释放神经营养因子等作用促进髓鞘的再生修复;另一方面小胶质细胞还可通过释放炎性因子、自由基、蛋白酶等对神经元和胶质细胞发挥毒性作用。Cuprizone(双环己酮草酰二胺)所致髓鞘脱失动物模型是研究髓鞘再生修复的理想模型,了解小胶质细胞的双重性对于理解MS的发生发展,寻找疾病治疗靶点具有十分重要的理论和实际意义。在此本文对小胶质细胞在cuprizone所致髓鞘脱失动物模型中的双重性作用做一综述。

【关键词】 小胶质细胞;多发性硬化;Cuprizone 动物模型;双重性

【中图分类号】 R33;R744.5+1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014)08-0053-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.008.012

Dichotomous roles of microglia in cuprizone-induced demyelination in animal models of multiple sclerosis

LIANG Meng-ru^{1,2}, YIN Lin-lin¹, CHEN Guang-liang², LI Lin¹

(1. Department of Pharmacology, Xuan Wu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China;

2. School of Integrated Traditional Chinese & Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

【Abstract】 Microglia are the inherent macrophages and immune surveillance cells in the central nervous system (CNS) and compose the first guard of immune defense in CNS. The activation of microglia is one of the pathological features of many CNS diseases and acts as an important role during the multiple sclerosis (MS) process. MS is a CNS disease characterized by neuroinflammatory infiltration, demyelination and axonal damage. Accumulation of activated microglia at the injury site has been observed in brains of MS patients and experimental animals with complicated mechanisms. Microglia have both detrimental and beneficial roles. For instance, microglia have been shown to recruit and reactivate T cells in the CNS and release many detrimental molecules such as proteases, inflammatory cytokines, and free radicals. Conversely, they have also been observed to aid in axonal regeneration and remyelination as well as assist in the

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81001656, 81341088),首都卫生发展科研专项(首发2011-1001-06),北京市优秀人才培养资助项目(2012D005018000010),北京市科技新星计划(No. Z12111000250000)。

【作者简介】 梁梦茹(1990-),女,硕士研究生,研究方向:药理学,E-mail: 18210866414@163.com。

【通讯作者】 尹琳琳(1977-),女,副研究员,博士,研究方向:多发性硬化的病因病机及新药研发。电话:010-83198881,E-mail: yinll913@126.com。

clearance of inhibitory myelin debris. In addition, microglia have been shown to release a variety of neurotrophic factors. Cuprizone [oxalic acid bis(cyclohexylidene hydrazide)] is a well-known copper-chelating agent. Cuprizone ingestion in mice induces a highly reproducible demyelination of distinct brain regions. Discussion on the detrimental and beneficial aspects of microglia in cuprizone animal models will serve to better understand the development of MS and find out new therapeutic targets. This review will further our understanding of the dichotomous roles of microglia in cuprizone-induced demyelination in animal models of multiple sclerosis.

【Key words】 Microglia; Multiple sclerosis; Cuprizone, animal model; Dichotomous roles

中枢神经系统(CNS)包括脑和脊髓,多发性硬化(MS)发病时外周免疫细胞透过通透性增加的血脑屏障进入中枢,在中枢形成许多炎性浸润病灶,进而导致髓鞘脱失和轴索损伤。髓鞘是包绕在轴突表面的多层膜性结构,由脂类及蛋白质组成,既可保护轴索又具有对神经冲动传导的绝缘作用。髓鞘脱失是 MS 的主要病理特征,髓鞘脱失除了与少突胶质细胞的损伤有直接关系以外,还与小胶质细胞的活化密切相关^[1,2]。Cuprizone(双环己酮草酰二胺)所致髓鞘脱失动物模型能够诱导大面积髓鞘脱失而非 T 淋巴细胞介导,是研究 MS 发病过程中髓鞘脱失、再生的理想模型。小胶质细胞在 MS 髓鞘脱失、再生的过程中扮演重要角色,小胶质细胞活化对髓鞘脱失既有有害的一面,又有有利的一面,本文将对 cuprizone 所致髓鞘脱失动物模型中小胶质细胞的双重性作用做一综述。

1 Cuprizone 所致髓鞘脱失动物模型

Cuprizone 所致髓鞘脱失动物模型是研究 MS 常用的两种脱髓鞘动物模型之一。该模型采用掺有 0.2% 铜离子螯合剂 cuprizone 的饲料饲喂 C57BL/6 小鼠,若饲喂 6 周后改为饲喂正常饲料,将会引发脱失的髓鞘自发再生;若连续饲喂 12 周,将导致髓鞘不可逆性脱失^[3,4]。由于 cuprizone 可选择性作用于髓鞘形成细胞—成熟少突胶质细胞, cuprizone 通过螯合其线粒体复合体 IV 的铜离子引发能量代谢障碍,继而引发少突胶质细胞凋亡不利于髓鞘形成。在胼胝体、海马、嗅球、喉前联合、视交叉、脑干、小脑、纹状体、皮层、扣带回等脑区可见明显病灶。化学毒素 cuprizone 所诱导的髓鞘脱失动物模型能够诱导大面积髓鞘脱失,且非 T 淋巴细胞介导,是研究 MS 发病过程中髓鞘脱失、再生的经典模型,同时该模型还具有价格低廉,容易维持,重现性高等特点^[5]。有报道指出,在 cuprizone 所致髓鞘脱失动物模型的病灶部位有大量小胶质细胞聚集,提示小胶质细胞很可能在髓鞘脱失及髓鞘再生过程中发挥

重要作用。此外,另一种髓鞘脱失动物模型由溶血卵磷脂(lysolecithin 或 lysophosphatidylcholine, LPC)诱导,该模型需经脊髓胸段或腰段向中枢白质注射 LPC 诱发髓鞘脱失,在注射后第 2、4、7 天呈现出明显的髓鞘脱失、再生过程,但由于该模型髓鞘脱失、再生持续时间较短,且造模成功率不稳定等特点较少被采用。因此,本文拟在 cuprizone 所致髓鞘脱失动物模型上探讨小胶质细胞的作用。

2 小胶质细胞

小胶质细胞是 CNS 中体积最小的胶质细胞,约占胶质细胞数量的 5%,其在神经元生理活动中起着支持、营养、保护及修复等重要作用。当 CNS 受到损伤刺激后,引发小胶质细胞活化,这些活化的小胶质细胞能够对 CNS 功能产生重要影响。在帕金森病(PD)、阿尔茨海默病(AD)和多发性硬化(MS)等 CNS 退行性疾病发生发展过程中,原本对神经元起支持和营养作用的小胶质细胞可逐渐“老化”,处于“老化”状态的小胶质细胞与处于正常状态的小胶质细胞相比,分泌神经营养物质和吞噬细胞碎片的能力会有所下降,最终导致神经元因失去小胶质细胞的营养支持而发生死亡。在所有 CNS 疾病中几乎都有小胶质细胞活化,其对 CNS 既有损伤作用又有保护作用。促炎物质细菌脂多糖(LPS)和 IFN- γ 可引起小胶质细胞发生强烈炎症反应,并使其处于激活状态。处于激活状态中的小胶质细胞可分泌大量促炎症细胞因子,主要有 TNF- α 和 IL-1 β ,此外还可释放活性氧簇、超氧化物阴离子和一氧化氮等神经毒性物质,从而加重神经元和胶质细胞的损伤^[6];与此同时,激活状态中的小胶质细胞所分泌的神经营养物质(如脑源性神经营养因子(BDNF)和胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)也会大量减少,失去胶质细胞营养支持作用的神经元会发生凋亡,进而影响 CNS 功能的正常发挥^[7]。

另有研究发现^[8],神经元上的成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)表达上调,可调节小胶质细胞发挥

神经保护作用,从而减轻兴奋性氨基酸对神经元的损伤。将小胶质细胞与已发生凋亡的 T 细胞共培养,小胶质细胞可被激活并被诱导处于吞噬状态,此时小胶质细胞可释放较少促炎因子并释放较多抑炎因子,还可释放较多神经保护因子,如 IL-10、神经营养因子、TGF- β 1 等。

综上所述,通过调节小胶质细胞的不同激活状态可促使其分泌神经营养物质和抑炎因子,研究者可通过体外培养激活小胶质细胞,将其控制在可分泌较多有益物质的状态,并收集小胶质细胞所分泌的有益物质,当 CNS 发生损害需要神经营养物质支持时,应用上述物质可减轻 CNS 损伤,帮助受损神经细胞恢复正常功能^[9]。

3 小胶质细胞在 cuprizone 诱导的髓鞘脱失动物模型中有害的一面

给予 C57BL/6 小鼠含 cuprizone 的特制饲料 2 周后,脑内出现小胶质细胞聚集,至第 3 周可见显著脱髓鞘且小胶质细胞聚集数量增加,4-6 周后上述病理改变达高峰。而早期超微结构的研究表明,cuprizone 不会诱导小胶质细胞发生有丝分裂,因此病灶位置聚集的小胶质细胞很可能来自其他脑区或外周组织^[10]。

已有多项研究报道了小胶质细胞在 cuprizone 引起的脱髓鞘动物模型中的有害作用:包括对神经元和少突胶质细胞前体细胞的毒性作用、释放蛋白酶、炎性细胞因子和自由基、激活 CNS 炎症反应、致使外周 T 淋巴细胞浸润等。体外实验同样显示小胶质细胞激活会诱发神经元损伤^[11]。将 17 β -雌二醇给予 cuprizone 模型小鼠时,不仅髓鞘脱失减轻,而且还伴随着小胶质细胞活化的延迟。提示抑制小胶质细胞活化具有髓鞘保护作用^[12]。Millet 等人的研究表明注射蛋白酶体抑制剂乳胞素,对 cuprizone 模型小鼠的髓鞘再生过程有较大改善作用,可促进髓鞘再生并伴有小胶质细胞和巨噬细胞数量减少^[13]。此外,有研究报道发现,体内给予小胶质细胞活化抑制剂米诺环素不仅可以抑制小胶质细胞活化与增殖,而且还可以阻止 cuprizone 引起的脱髓鞘。由于米诺环素可显著抑制小胶质细胞的活化,从而抑制炎症相关产物的释放,以致于其在髓鞘脱失过程中的作用降低。研究发现:给予米诺环素治疗的 cuprizone 模型小鼠其体内小胶质细胞激活数目明显减少,如 CD11b 的阳性细胞数量明显减少,有助于减轻髓鞘脱失。因此,在 cuprizone

诱发的脱髓鞘模型中抑制小胶质细胞的活化可以有效缓解髓鞘脱失^[14]。

综上所述,小胶质细胞活化在 cuprizone 引起的脱髓鞘动物模型中具有有害作用,抑制小胶质细胞活化可减少髓鞘脱失,修复运动损伤,并促进髓鞘再生。

4 小胶质细胞在 cuprizone 所致髓鞘脱失动物模型中有利的一面

已有许多研究报道了小胶质细胞有益的一面,包括促髓鞘、轴突再生,帮助修复髓鞘脱失,释放神经营养因子、吞噬细胞碎片和促进少突胶质细胞前体细胞向成熟少突胶质细胞的分化^[15]。Olah 等^[16]通过对从 cuprizone 模型小鼠胼胝体部位分离到的小胶质细胞进行全基因组基因表达研究发现:小胶质细胞具有与吞噬髓鞘碎片相关的基因表型,同时其还具有通过表达相应的细胞因子和趋化因子来招募少突胶质细胞前体细胞的基因表型。推测小胶质细胞可能参与髓鞘的再生,负责启动修复过程。Jurevics 等研究发现,小胶质细胞上述相关基因表型的出现与病灶修复和髓鞘碎片的吞噬有一定的对应关系,提示小胶质细胞在清除代谢产物抑制环境恶化方面的有益作用。主要组织相容性复合物 II (MHC-II) 是一类主要存在于小胶质细胞表面的能通过血脑屏障向淋巴细胞提呈抗原的分子。MHC-II 类分子缺失的小鼠表现为髓鞘再生延迟和少突胶质细胞前体细胞分化为成熟少突胶质细胞滞后,提示小胶质细胞在促进髓鞘再生方面的有利作用。此外,在缺乏小胶质细胞分泌的细胞因子、酶,肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的小鼠中,髓鞘再生显著延迟抑或表现为更为严重的脱髓鞘,这表明小胶质细胞通过分泌上述因子在髓鞘再生过程中发挥重要作用。Morell 等研究发现,小胶质细胞还可通过招募少突胶质细胞前体细胞 (OPCs) 并促进其向成熟少突胶质细胞分化而发挥作用。髓鞘特异性标志髓鞘相关糖蛋白 (MAG) 和髓鞘碱性蛋白 (MBP) 的 mRNA 上调与小胶质细胞的聚集具有一定的相关性可以佐证上述观点^[17]。

综上所述,小胶质细胞通过清除髓鞘碎片、招募并促进 OPCs 向成熟少突胶质细胞分化、释放有利于髓鞘修复的细胞因子等方式促进髓鞘再生、修复。

5 展望

由此可见,小胶质细胞在 cuprizone 诱导的脱髓

鞘动物模型中发挥双重作用,它就像一把双刃剑,对 CNS 既有损伤作用又有保护作用,在慢性 CNS 疾病发生发展过程中,小胶质细胞的活化往往以损伤作用为主;而在急性 CNS 疾病发生发展过程中,小胶质细胞的活化则以神经保护作用为主。鉴于小胶质细胞活化的双重性,调节小胶质细胞的活化状态,趋利避害,是今后非常有意义的研究方向。

以含不同剂量的 cuprizone 饲料饲喂 C57BL/6 小鼠,随着 cuprizone 含量的增加动物出现发育迟缓的现象显著增加。若以含 0.5% 的 cuprizone 饲料饲喂 4 周龄的 C57BL/6 小鼠,致死率达 100%;而同样饲料饲喂 8 周龄小鼠,致死率降至 20%。此外, Hiremath 等研究发现,在一定剂量范围内(0.2 ~ 0.5)%,随着 cuprizone 喂食剂量的增加和时间的推移,活化小胶质细胞的数目显著增多^[10]。小胶质细胞的上述作用提示我们,如何通过调控小胶质细胞的激活状态来控制其对 CNS 功能的影响值得深入研究。然而,精确调控小胶质细胞的活化状态并非易事,若处理不慎,可能会使神经损害物质产生过多,神经营养物质产生过少。因此,如何精确调控小胶质细胞的激活状态,使之更多地发挥神经保护作用今后的努力方向。

参考文献:

- [1] Paraskevi NK, Thomas S, Viktoria G, et al. Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model [J]. *Neuro Lett*, 2009, 451:83 - 88.
- [2] 宋大为, 范凯, 张艳丽, 等. 星形胶质细胞在 cuprizone 介导的急性脱髓动物模型中的变化及其意义 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2007, 25: 40 - 542.
- [3] Adamo A, Paez P, Escobar C, et al. Remyelination after cuprizone-induced demyelination in the rat is stimulated by apotransferrin [J]. *Exp Neurol*, 2006, 198:519 - 529.
- [4] Kipp M, Clarner T, Dang J, et al. The cuprizone animal model: new insights into an old story [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118:723 - 736.
- [5] Zhang JY, Melina VJ, McMahon MT, et al. In vivo and ex vivo diffusion tensor imaging of cuprizone-induced demyelination in the mouse corpus callosum [J]. *Magn Reson Med*, 2012, 67: 750 - 759.
- [6] Olah M, Amor S, Brouwer N. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination [J]. *Glia*, 2012, 60:306 - 321.
- [7] Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, et al. Induction of neurotrophic factors GDNF and BDNF associated with the mechanism of neurorescue action of rasagiline and ladostigil: new insights and implications for therapy. [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2007, 1122: 155 - 168.
- [8] Figueiredo C, Pais TF, Gomes JR, et al. Neuron-microglia crosstalk up-regulates neuronal FGF-2 expression which mediates neuroprotection against excitotoxicity via JNK1/2 [J]. *J Neurochem*, 2008, 107:73 - 85.
- [9] 贾济, 朱萧玲, 陈绍洋. 小胶质细胞活化对中枢神经系统功能的影响 [J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2012, 33:54 - 56.
- [10] Peter A, Markus K, Akvile N, et al. 17 β -Estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice [J]. *Glia*, 2009, 57:807 - 814.
- [11] Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, et al. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice [J]. *J Neuroimm*, 1998, 92: 38 - 49.
- [12] Maren L, Jantje F, Franziska L, et al. Chronic toxic demyelination in the central nervous system leads to axonal damage despite remyelination [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 453: 120 - 125.
- [13] Millet V, Moiola CP, Pasquini JM, et al. Partial inhibition of proteasome activity enhances remyelination after cuprizone-induced demyelination [J]. *Exp Neurol*, 2009, 217:282 - 296.
- [14] Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone UAL, et al. The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32:279 - 292.
- [15] Rawji KS, Yong VW. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013:1 - 13.
- [16] Olah M, Amor S, Brouwer N, et al. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination [J]. *Glia*, 2012, 60: 306 - 321.
- [17] Jurevics H, Largent C, Hostettler J. Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination [J]. *J Neurochem*, 2002, 82: 126 - 136.

[修回日期] 2014-05-08