

急性一氧化碳中毒对大鼠少突胶质前体细胞的影响

孙瑞佼, 郭大志, 李航, 李铭鑫, 胡慧军, 潘晓雯

【摘要】 目的:通过制备急性一氧化碳中毒(acute carbon monoxide poisoning, ACOP)大鼠模型,观察大鼠中毒后中枢神经系统髓鞘改变,以及髓鞘标志物髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)和少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)特异性细胞标志物硫酸软骨素蛋白多糖 NG2 在中毒后表达的变化,为研究 ACOP 后中枢神经系统髓鞘脱失的机制提供实验依据。方法:24 只雄性健康 SD 大鼠,随机分为对照组和染毒组各 12 只。染毒组利用分次腹腔注射 CO 制作急性中毒模型,对照组注射空气。于造模后 1d、3d 取材,采用免疫组织化学染色和 Western Blot 方法检测中毒后中枢神经系统髓鞘的损伤和 MBP、NG2 表达的变化。结果:免疫组织化学染色结果显示,与对照组比较,染毒组染毒 1d 后 MBP、NG2 表达即减少,3d 时进一步降低($P<0.05$);Western Blot 结果显示,染毒组染毒 1d 后 MBP、NG2 表达即减少,3d 时进一步降低($P<0.05$)。结论:ACOP 后大鼠发生中枢神经系统脱髓鞘以及 OPCs 损伤。

【关键词】 急性一氧化碳中毒;脱髓鞘;髓鞘碱性蛋白;硫酸软骨素蛋白多糖 NG2;少突胶质前体细胞

【中图分类号】 R49;R742 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2015.01.003

Effect of acute carbon monoxide poisoning on oligodendrocyte precursor cells in rats Sun Ruijiao, Guo Dazhi, Li Hang, et al. Department of Hyperbaric Oxygen, the Navy General Hospital, Navy Clinical Medicine College of the Second Military Medical University, Beijing 100048, China

【Abstract】 Objective: To observe the changes in myelin and expression of myelin basic protein (MBP) and NG2 in the brain tissue of rats through the establishment of the acute carbon monoxide poisoning (ACOP) model, and to provide experimental evidence for the mechanism of demyelination of the central nervous system after ACOP. **Methods:** Twenty-four male rats were divided into the control group ($n=12$) and the intoxication group ($n=12$) randomly. Animals in the intoxication group were intraperitoneally injected with pure CO repeatedly, and those in the control group with air by the same protocol. The brain tissues were taken from the animals of the two groups at 1st and 3rd day after the establishment of the model. Changes in myelin were observed by immunohistochemical staining, and the expression of MBP and NG2 was detected using immunohistochemistry and Western blot. **Results:** Immunohistochemistry demonstrated that the expression levels of MBP and NG2 began to decrease at 1st day after ACOP, and there was statistically significant difference in the integral optical density (IOD) level of MBP and NG2 as compared with the control group at 3rd day after ACOP ($P<0.05$). Results of Western blot showed that as compared with the control group, the expression levels of MBP and NG2 were decreased at 1st day after ACOP, and decreased further at 3rd day ($P<0.05$). **Conclusion:** Demyelination and damage of oligodendrocyte precursor cells occurred in the brain tissue of rats after ACOP.

【Key words】 acute carbon monoxide poisoning; demyelination; myelin basic protein; chondroitin sulfate proteoglycan NG2; oligodendrocyte precursor cells

急性一氧化碳中毒(acute carbon monoxide poisoning, ACOP)是国内外最常见的意外中毒之一^[1],研究证实,脑白质的脱髓鞘改变是最常见、最主要的病理改变^[2],但髓鞘脱失机制不详。在中枢神经系统中,

少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)向少突胶质细胞(oligodendrocytes, OLs)的分化是髓鞘形成的关键步骤,也是髓鞘损伤后再生修复的主要来源^[3]。本研究应用免疫组织化学染色和 Western Blot 观察 ACOP 大鼠中枢神经系统髓鞘损伤后髓鞘标志物髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)和 OPCs 特异性细胞标志物硫酸软骨素蛋白多糖 NG2 表达的变化,为探讨 ACOP 后中枢神经系统髓鞘脱失机制提供一定的实验参考。

基金项目:海军总医院创新培育基金资助(CXPY201303)

收稿日期:2014-07-30

作者单位:第二军医大学海军临床医学院,海军总医院高压氧科,北京 100048

作者简介:孙瑞佼(1983-),男,主治医师,主要从事高压氧治疗应用方面的研究。

通讯作者:潘晓雯, huijunvip@139.com

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物:健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只(军事医学科学院实验动物中心提供),清洁级,9~10 周龄,体质量 200~250g,于 12h 明-暗交替、室温 18~20℃ 的动物房适应性饲养 1 周。自由进食标准大鼠饲料及普通自来水。②主要仪器和设备:轮转切片机(德国 Leica 公司),组织匀浆器(BIOSPEC 公司),低温水平离心机(美国),垂直电泳槽(BIO-RAD 公司),半干转移电泳仪(BIO-RAD 公司),凝胶成像分析系统(美国),全自动显微照相机(日本 Olympus)。

1.2 方法 参照 Fechter^[4] 及王耀宏等^[5] 的研究,利用分次腹腔注射 CO 法制作 ACOP 大鼠模型。参考前期预实验结果,预计染毒死亡率约 50%,故 36 只 SD 大鼠中按电脑随机数选取 24 只进行染毒,分次腹腔内注射纯品 CO 气体(99.9%,燕山石化),首次剂量 120ml/kg,后以半量追加注射 3 次,每次间隔 4h。其余 12 只作为对照组按同样方案注射空气。染毒后每隔 15~20min 观察 1 次大鼠变化。造模结束后从存活大鼠中随机选取 12 只作为染毒组纳入实验;正常对照组注射空气后无死亡,全部纳入。

1.3 检测指标 ①免疫组织化学染色:在染毒后第 1d、3d,2 组各随机取 3 只大鼠,腹腔注射 20%乌拉坦(0.7 ml/100g 体质量)麻醉,灌注,取脑,4%中性甲醛液固定 2h,30%蔗糖溶液脱水 7d,浸蜡,包埋,切片(厚度 15μm),石蜡切片脱蜡后,3%双氧水灭活内源性过氧化酶,经微波对抗原进行热修复后加入一抗 MBP、NG2,0.01mol/L PBS 清洗后,添加生物素标记的山羊抗兔二抗,37℃ 孵箱孵育 30min, PBS 清洗后加入 ABC 复合物,37℃ 孵箱孵育 30min。DAB 显色,苏木精复染,常规脱水,透明,封片。②组织蛋白样本制备及 Western Blot 分析:在相同实验节点 2 组各随机取 3 只大鼠,处死后取脑,加入 5ml 细胞裂解液及蛋白酶抑制剂充分匀浆,再加蛋白上样液,95℃ 加热 5min,离心后取上清,每孔加样 5ul,用 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,经转膜及封闭后,将膜移入含抗 MBP、NG2 多克隆抗体的一抗反应液中,4℃ 过夜,洗膜后加入二抗,室温避光缓摇 60min,洗膜后扫描,摄片。③图像分析:MBP、NG2 免疫组织化学染色结果:在光镜下采集图像,每个标本取 5 个视野,应用 Imagic-Pro 5.1 图像分析软件测定髓鞘、MBP、NG2 的积分光密度值(integral optical density, IOD)。Western Blot 以 β -actin 为内参,计算目的蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,t 检验,单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染毒后表现 大鼠腹腔注射 CO 后中毒症状与王耀宏等^[5] 文献报道类似,5~10min 出现烦躁、撞笼,15min 陆续出现少动、四肢瘫软、抽搐、昏迷,黏膜及肢端皮肤呈樱桃红色,部分发生角弓反张。上述症状体征持续至末次染毒后 6h 逐渐消失。造模后 CO 染毒组存活 14 只,死亡 10 只,尸检发现大鼠皮肤黏膜及肝脏呈典型“樱桃红”样改变,心脏、肝脏及脾脏等脏器重度充血伴散在出血点,脑组织充血水肿严重。对照组大鼠无异常表现,无死亡。

2.2 免疫组织化学染色结果 大鼠 ACOP 后 1d, MBP 表达轻度下降,与对照组比较 IOD 值差异无统计学意义;3d 后 MBP 表达进一步下降,与对照组比较 IOD 值差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1;大鼠 ACOP 后 1d, NG2 表达减少,与对照组比较 IOD 值差异无统计学意义,3d 时进一步减少,与对照组比较 IOD 值显著下降($P < 0.05$),见图 2。局部放大后观察,对照组可见数目较多的 NG2 阳性细胞,胞体小,呈圆形或椭圆形,从胞体向四周放射状伸出多数突起。染毒 3d 后 OPCs 数量减少,细胞形态异常,胞体缩小,突起减少,见图 3。具体数据见表 1。

2.3 Western Blot 检测结果 2 组大鼠脑组织中均有 MBP、NG2 表达,相对分子质量 MBP 为 18500、NG2 为 300000。MBP、NG2 在对照组中正常表达,染毒组染毒 1d 后 MBP 及 NG2 表达均减少,3d 时进一步减少,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4、5。

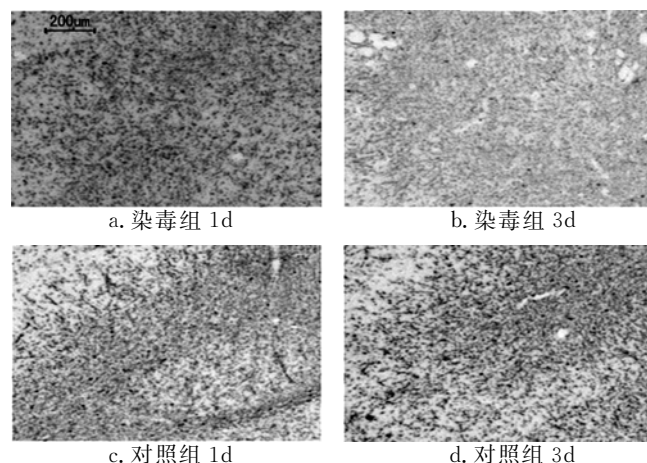


图 1a~d 大鼠脑组织 MBP 免疫组织化学染色结果($\times 40$)

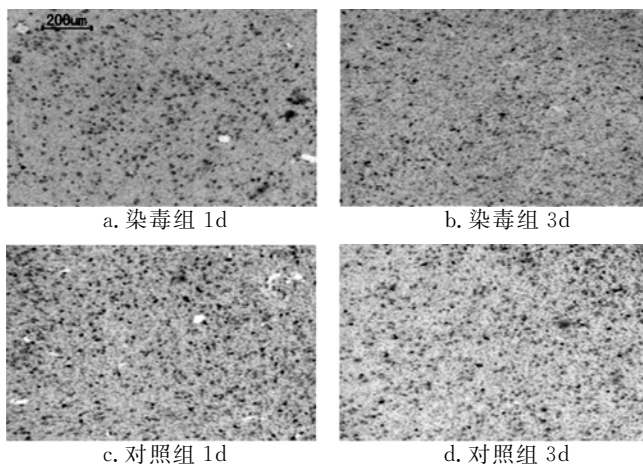


图 2a~d 大鼠脑组织 NG2 免疫组织化学染色结果($\times 40$)

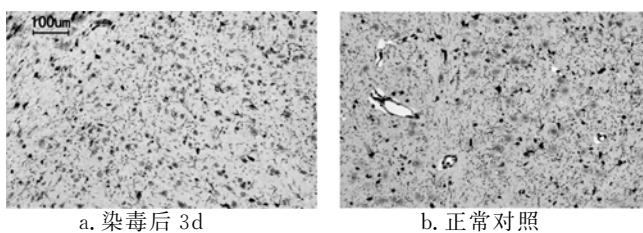


图 3a~b 3d 大鼠脑组织 NG2 免疫组织化学染色局部放大($\times 60$)

表 1 2 组 MBP 和 NG2 的 IOD 值比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	MBP		NG2	
		1d	3d	1d	3d
对照组	3	17.74 $\pm$ 0.83	18.24 $\pm$ 1.03	14.95 $\pm$ 0.75	14.56 $\pm$ 0.83
染毒组	3	16.24 $\pm$ 0.89	15.15 $\pm$ 0.75 ^a	13.22 $\pm$ 0.66	10.85 $\pm$ 0.93 ^a

与对照组比较, ^a $P < 0.05$

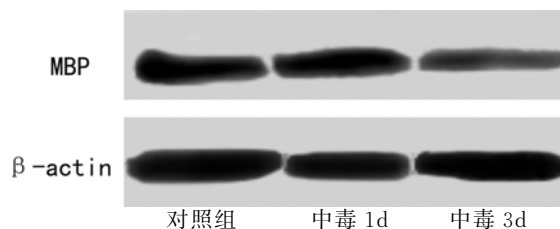


图 4 大鼠脑组织 MBP 表达的 Western Blot 电泳图

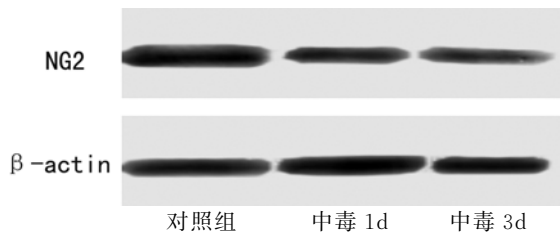


图 5 大鼠脑组织 NG2 表达的 Western Blot 电泳图

3 讨论

建立合适的动物染毒模型是进行相关中毒研究的基础,目前常用 ACOP 模型的造模方法有吸入染毒法和腹腔注射染毒法。温韬等^[6]在 Fechter 基础上改良的分次腹腔注射染毒法,具有操作简单、染毒程度容易控制等优点,注射后血碳氧血红蛋白可迅速升高至所

需水平,并引起明显中毒症状,神经系统损伤及生化指标改变均与临床所及 CO 中毒表现一致。因此本研究选用此方法进行造模。但此方法在染毒过程中有一定的死亡率,死亡率随注射剂量增加而增大,且死亡大都发生于首次注射后。王耀宏等^[5]研究发现,对体质量 240~280g 的大鼠,腹腔注射 CO 半数致死剂量为 146ml/kg,95%可信范围 129~165ml/kg。在保证大鼠出现明显中毒效应,且死亡率可接受的前提下,我们选用首次注射剂量为 120ml/kg。王耀宏等^[5]报道此剂量大鼠死亡率约 30%,而我们在前期预实验中发现死亡率约 50%,此差异推测与本研究所选用大鼠体质量较小(200~250g),耐受性相对较差有关。实验中对 24 只大鼠进行染毒,死亡 10 只,实际死亡率 41.67%。

ACOP 后脑白质脱髓鞘的机制尚不明确,在其它脑白质脱髓鞘疾病,如缺血缺氧性脑病、多发性硬化症的研究中发现,缺血缺氧后星形细胞、小胶质细胞、巨噬细胞和中性白细胞被激活后释放大量的炎性细胞因子、蛋白酶、NO 和氧自由基,这些物质均可直接或间接地造成 OLs 损伤,最终导致脑白质缺血性脱髓鞘病理改变^[7-10];多发性硬化症尽管机制不明,但其主要病理进程基本取得共识^[11],包括原发性脱髓鞘,此时很少有 OLs 的损伤;脱髓鞘过程中 OLs 的广泛丢失;原发性 OLs 损伤并导致继发性脱髓鞘;大量的巨噬细胞被激活,引起非选择性的组织损伤,不仅累及髓鞘还涉及轴突和星形胶质细胞。ACOP 对人体的损伤机制非常复杂,既往研究已证明存在与上述脑缺血缺氧、多发性硬化等疾病类似的缺氧损害、免疫损伤、氧化应激、炎症损伤等损伤机制^[12-13]。除此以外,CO 还特有细胞毒性作用,能直接作用于线粒体造成细胞损伤^[14]。ACOP 后中枢神经系统脱髓鞘是否与 OLs 受损有关,目前尚无研究报道。从本实验结果看,中毒后 1d 即可看到 MBP 表达较正常对照组减少,3d 时进一步减少,证明 ACOP 后大鼠中枢神经系统发生脱髓鞘改变。

在中枢神经系统中,OPCs 向 OLs 的分化是髓鞘形成的关键步骤,也是髓鞘损伤后再生修复的主要来源^[15]。大量研究表明在各种损伤因素导致脱髓鞘病变后,OPCs 开始增殖并迁移至脱髓鞘区域,分化为 OLs 包裹脱髓鞘轴突形成新的髓鞘。另外有研究发现在缺血损伤区域存活下来的 OLs 不能进行分化和髓鞘再生,有高度迁移和分化潜能的 OPCs 形成的新生少突胶质细胞是髓鞘再生的来源^[16]。作为髓鞘脱失后修复的主要来源,OPCs 受损会对髓鞘修复造成影响,导致修复不良或不能修复。近年来研究发现,OPCs 对缺血缺氧等刺激同样敏感,脑缺血引起的能

量耗竭、氧化应激同样会损伤 OPCs^[17-18]。另外, OPCs 膜上分布有丰富的非 N-甲基-D-天冬氨酸(non-N-methyl-D-aspartic acid, non-NMDA)受体,脑缺血后细胞间隙积聚的大量兴奋性氨基酸将激活 non-NMDA 受体,损伤 OPCs^[19]。在慢性多发性硬化患者中,OPCs 很少分化,这与患者后期髓鞘修复失败相吻合^[20]。从本实验结果来看,ACOP 后 1d 即可看到 NG2 表达减少,3d 时进一步减少;与正常对照组比较,中毒后 3d 时 OPCs 数量明显减少,残存细胞形态异常,胞体缩小,突起减少,表明 ACOP 对 OPCs 造成损伤。此外有研究显示,老年大鼠脑内的 OPCs 移动能力较弱,细胞形态与成年大鼠不同^[21],而临床上观察到在 ACOP 患者中高龄患者髓鞘脱失持续时间长,恢复慢,迟发脑病的发生率明显高于年轻患者^[22]。

综上,ACOP 在造成中枢神经系统脱髓鞘的同时,也对 OPCs 细胞造成损伤。推测 OPCs 受损后不能及时分化成 OLs 修复脱失的髓鞘,是后续发生迟发脑病的可能机制之一,有待进一步研究证实。

【参考文献】

- [1] Hampson NB, Weaver LK. Carbon monoxide poisoning: a new incidence for an old disease[J]. Undersea Hyperb Med, 2007, 34(3): 163-168.
- [2] Satoru W, Hirotaka M, Yasushi K, et al. Transient degradation of myelin basic protein in the rat hippocampus following acute carbon monoxide poisoning[J]. Neuroscience Research, 2010, 68(2): 232-240.
- [3] Fröhlich N, Nagy B, Hovhannisyan A, et al. Fate of neuron-glia synapses during proliferation and differentiation of NG2 cells[J]. Anat, 2011, 219(1): 18-32.
- [4] Fechter LD, Liu Y. MK-801 protect against carbon monoxide-induced hearing loss[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1995, 132(3): 196-202.
- [5] 王耀宏, 赵金垣, 崔书杰, 等. 急性一氧化碳中毒迟发性脑病的动物模型制备研究[J]. 中国职业医学, 2004, 31(1): 5-10.
- [6] 温韬, 赵金垣. 一种制备急性 CO 中毒迟发性脑病动物模型的新方法[J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16(3): 129-132.
- [7] Masumura M, Hata R, Nagai Y, et al. Oligodendroglial cell death with DNA fragmentation in the white matter under chronic cerebral hypoperfusion: comparison between normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. Neurosci Res, 2001, 39(4): 401-412.
- [8] Mabuchi T, Kitagawa K, Ohtsaki T, et al. Contribution of microglia/ macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2000, 31(7): 1735-1743.
- [9] Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions[J]. Prog Neurobiol, 1998, 56(2): 149-171.
- [10] Toulmond S, Parnet P, Linthorst AC. When cytokines get on your nerves: cytokine networks and CNS pathologies[J]. Trend Neurosci, 1996, 19(10): 409-410.
- [11] Brown WR, Moody DM, Thore CR, et al. Cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease and leukoaraiosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 903(1): 39-45.
- [12] Thom SR, Bhopale VM, Han ST, et al. Intravascular neutrophil activation due to carbon monoxide poisoning[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 74(16): 1239-1248.
- [13] Piantadosi CA, Zhang J, Levin ED, et al. Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat[J]. Exp Neurol, 1997, 147(2): 103-114.
- [14] Zhang J, Piantadosi CA. Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain[J]. J Clin Invest, 1992, 90(12): 1193-1199.
- [15] Nishiyama A. Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS[J]. Neuroscientist, 2007, 13(1): 62-76.
- [16] Wang A, He BP. Characteristics and functions of NG2 cells in normal brain and neuropathology[J]. Neurol Res, 2009, 31(2): 144-150.
- [17] Dewar D, Underhill SM, Goldberg MP. Oligodendrocytes and ischemic brain injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(3): 263-274.
- [18] Li L, Harms KM, Ventura PB, et al. Focal cerebral ischemia induces a multilineage cytogenic response from adult subventricular zone that is predominantly gliogenic[J]. Glia, 2010, 58(13): 1610-1619.
- [19] Matute C, Domercq M, Sánchez-Gómez MV. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance[J]. Glia, 2006, 53(2): 212-224.
- [20] Kurosinski P, Gotz J. Glial cells under physiologic and pathologic conditions[J]. Arch Neurol, 2002, 59(10): 1524-1528.
- [21] Ohta K, Iwai M, Sato K, et al. Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and aged rats after transient cerebral ischemia[J]. Neurosci Lett, 2003, 335(3): 159-162.
- [22] Huijun H, Xiaowen P, Yi W, et al. Factors affecting the prognosis of patients with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning[J]. The American Journal of Emergency Medicine, 2011, 29(3): 261-264.