

# Olig2 在 cuprizone 介导的脱髓鞘动物模型中的表达变化

陈丽萍<sup>1,2</sup>, 张静<sup>1,2</sup>, 马顺利<sup>3</sup>, 李振飞<sup>1</sup>, 张金丽<sup>1</sup>, 董梅<sup>1,2</sup>, 单明月<sup>1</sup>, 郭力<sup>1,2</sup>

- (1. 河北医科大学第二医院 神经内科, 石家庄 050000;
2. 河北省神经内科重点实验室, 石家庄 050000;
3. 河北省邢台市第三医院 神经内一科, 河北邢台 054000)

**【摘要】** 目的 探讨 Olig2 在 cuprizone 诱导的急性脱髓鞘动物模型中的表达变化规律。方法 应用含 0.2% cuprizone 饲料饲养小鼠, 通过调控饲养时间, 造成神经脱髓鞘及髓鞘再生, 使用免疫荧光染色和实时定量 PCR (qRT-PCR) 的方法, 观察模型髓鞘脱失后及髓鞘再生 2 周后 Olig2、少突胶质细胞碱性髓鞘蛋白 (MBP) 及星形胶质细胞神经胶质酸性蛋白 (GFAP) 的表达变化。结果 Cuprizone 饲养 6 周后, 动物胼胝体白质内髓鞘脱失严重, 在恢复正常饲料后, 髓鞘逐渐恢复正常结构。正常小鼠大脑 Olig2 低水平表达。髓鞘脱失后 Olig2、GFAP 表达增高, 并可见 Olig2<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> 细胞, MBP 表达明显降低。髓鞘再生 2 周后 Olig2 表达降低, MBP、GFAP 表达增高。结论 Olig2 基因在 cuprizone 诱导的脱髓鞘模型中的表达变化, 提示 Olig2 可能参与祖细胞向有活性的星形胶质细胞的分化过程, 并与胶质瘢痕的形成有关。

**【关键词】** 多发性硬化; Cuprizone; 髓鞘再生; Olig2; 小鼠

**【中图分类号】** Q95-33, R744.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0036-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.008

## Expression pattern of transcription factor Olig2 in cuprizone-induced mouse model of acute demyelination

CHEN Li-ping<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing<sup>1,2</sup>, MA Shun-li<sup>3</sup>, LI Zhen-fei<sup>1</sup>, ZHANG Jin-li<sup>1</sup>, DONG Mei<sup>1,2</sup>,  
SHAN Ming-yue<sup>1</sup>, GUO Li<sup>1,2</sup>

- (1. Department of Neurology, 2. Hebei Key Laboratory of Neurology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3. Department. of Neurology, the Third Hospital of Xingtai, Xingtai 054000)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the expression pattern of transcription factor Olig2 in cuprizone-induced mouse model of acute demyelination. **Methods** C57BL/6 mice were fed with 0.2% cuprizone to induce acute demyelination. Immunofluorescence and qRT-PCR were used, and Olig2, MBP and GFAP were detected in the brain tissues of control group and cuprizone-treated groups for 6 weeks and recovery for 2 weeks. **Results** Severe demyelination occurred in the corpus callosum following 6-weeks exposure to cuprizone, while remyelination was detected in the white matter after the mice were given diet without cuprizone. In the normal mice, Olig2 was expressed in a low level, while the expressions of Olig2 and GFAP were significantly increased, and Olig2<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells were detected after demyelination. But the expression of MBP was below the normal level with demyelination. After recovery for 2 weeks, the expression of Olig2 was lower, but the expressions of MBP and GFAP were increased. **Conclusions** Olig2 may play an important role in the glial differ-

**【基金项目】** 河北省医学科学研究课题(项目编号:20130506)。

**【作者简介】** 陈丽萍(1971年-),女,副主任医师,博士,研究方向为神经免疫疾病及髓鞘再生。E-mail: chenliping301@163.com

**【通讯作者】** 郭力,教授 E-mail: guoli6hb@163.com

entiation from neural progenitor cells into active astrocytes, and in the glial scar formation.

**【Key words】** Multiple sclerosis; Cuprizone; Remyelination; Olig2; Mice

在多发性硬化及其他许多髓鞘损害疾病,会出现髓鞘脱失,从而引起患者的神经功能损伤。少突胶质细胞是中枢神经系统的髓鞘形成细胞,来源于少突胶质细胞祖细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OPCs),这类细胞在髓鞘损伤后能分化为成熟的少突胶质细胞并参与形成新的髓鞘<sup>[1]</sup>。但是多发性硬化的患者髓鞘再生常不完全<sup>[2]</sup>,OPCs 不能够分化为少突胶质细胞,并且病理上可以见到神经胶质形成的硬化斑<sup>[3]</sup>。如何通过刺激使更多的 OPCs 增殖,来完成髓鞘修复,需要我们了解少突胶质细胞阶段性分化的分子机制。Olig2 是一种碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子,祖细胞中可表达 Olig2,其对祖细胞向神经元或胶质细胞分化起着重要的作用<sup>[4]</sup>。本研究利用 cuprizone 建立急性脱髓鞘动物模型,通过检测髓鞘脱失后不同阶段动物脑室下区域(SVZ)的 Olig2、MBP、GFAP 基因表达水平的变化来研究髓鞘脱失与再生的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及模型建立

清洁级 6~8 周龄(19~21g) C57BL/6 系小鼠 45 只,雌雄不拘,河北医科大学实验动物中心提供【SCXK(冀)2008-1-003】。随机分为实验组 30 只和对照组 15 只,实验 A 组(15 只):用含 0.2% cuprizone(上海强顺化学试剂公司)的饲料饲养 6 周;实验 B 组(15 只):cuprizone 饲养 6 周后恢复正常饲料继续饲养 2 周。对照组:动物正常饲料饲养;8 周。实验在河北医科大学第二医院神经病学实验室进行【SYXK(冀)2010-0056】。

### 1.2 Luxol Fast Blue(LFB)染色

动物应用水合氯醛麻醉后开胸,经心脏经升主动脉灌注,先用温(37℃)生理盐水 200 mL 冲净血液,再用预冷(4℃)的 4% 多聚甲醛 500 mL 快速灌注固定,1 h 后取脑放入含 4% 多聚甲醛的 PBS 溶液中后固定 4~6 h,进行石蜡包埋。石蜡切片 6 μm 厚,67℃ 烤干 2 h。脱蜡水化至 95% 酒精,0.1% Luxol Fast Blue 液(Sigma 公司)中过夜;95% 乙醇溶液、70% 乙醇溶液、双蒸水洗片;0.05% 碳酸锂溶液分化 5 min,70% 乙醇溶液、双蒸水洗片;0.1% 焦油紫溶液复染 30s;双蒸水、70% 乙醇溶液、

95% 乙醇溶液洗片,常规脱水透明、中性树胶封片。

### 1.3 免疫荧光组织化学染色

动物应用水合氯醛麻醉,灌注 4% 多聚甲醛,取脑后再固定 3h,然后浸泡 30% 蔗糖-PBS,待组织沉到瓶底时,用 O. T. C 包埋后冻存于 -80℃ 待用。进行免疫荧光染色时,应用 20 μm 冠状位脑组织的冰冻切片。切片用 PBS 洗涤,再用 10% 山羊血清室温封闭 1h,一抗孵育过夜,用 PBS 清洗两遍,然后应用相应的二抗室温孵育 30 min。Hoechst 33342 染核。一抗包括:Olig2, BrdU, 碱性髓鞘蛋白(myelin basic protein, MBP)和神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)。抗体来源:Olig2(1:200, abcam, 英国), BrdU(1:300, abcam, 英国), GFAP(1:500, Dako Cytomation, 丹麦), MBP(1:200, abcam)。免疫荧光二抗(FITC/CY5, 1:200, Beyotime, 北京), Hoechst 33342(Beyotime)染细胞核。应用激光共聚焦显微镜(OLYMPUS)采集图像。

### 1.4 实时定量 PCR (Quantitative Real Time Polymerase Chain eaction, qRT-PCR)

用超纯 RNA 提取试剂盒(CWbio. Co. Ltd, 北京)提取各组脑组织样本中总 RNA,这些组织部位主要是包括胼胝体及其周围的脑室下区域(the subventricular zone, SVZ)。所用器械均做去除 RNA 酶处理,所有操作均在冰上进行。实验操作按产品说明书进行。用 HiFi-MMLVmcDNA 第一链合成试剂盒(CWbio. Co. Ltd)进行反转录,应用 AB7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)进行 qRT-PCR 试验。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行数据的相对定量分析。用 RealSuper Mixture(with Rox)(CWbio. Co. Ltd)进行扩增,实验操作按产品说明书进行。扩增程序为:95°10 min, (95℃ 15 s, 60℃ 60 s), 40 个循环。每个 cDNA sample 在 96 孔板均设置 3 个复孔。引物序列为:

Olig2: 5'-GGGGATTATGGGGAGTCCA-3'(上游) and 5'-GGAGTGTTTCAGCCAAAGAGTCA-3'(下游);

MBP: 5'-ATGGCTCCCTGCCCCAGAAGT-3'(上游) and

5'- CCTTGGGATGGAGGTGGTGTTCG-3'(下游);

GFAP: 5'-GAGGAGGAGATCCAGTCTTAAGGA-3'(上游), 5'-GCCTCGTATTGAGTGCCAATC-3'(下

游);

$\beta$ -actin; 5'-GCCTTCCTTCTTGGGTAT -3' (上游) and 5'-GGCATAGAGGTCTTTACGG-3' (下游)。

### 1.5 统计学处理

数据统计分析采用 SPSS16.0 软件, 组间数据比较用单因素方差分析 (ANOVA)。结果用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  作为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 Cuprizone 诱导的髓鞘脱失

给予 C57BL/6 mice 0.2% cuprizone 6 周后, 可以见到在胼胝体区域髓鞘脱失, LFB 染色可见胼胝体蓝色较对照组 (给予正常饮食的老鼠) 的胼胝体颜色明显变淡 (图 1, 彩插 4)。在恢复正常饮食后, 髓鞘出现再生, 2~3 周可恢复正常。

### 2.2 Olig2 在 cuprizone 诱导的脱髓鞘模型中表达增多

在 cuprizone 诱导的脱髓鞘模型中, 在第 3 周时胼胝体和室膜下区域 Olig2 染色阳性 (Olig2<sup>+</sup>) 细胞较正常未干预小鼠脑组织增多, 到第 6 周时明显增多 (图 2), GFAP 染色阳性 (GFAP<sup>+</sup>) 细胞也同样增多 (图 2), 并且可见 Olig2<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> 细胞 (图 2), 占 GFAP<sup>+</sup> 数的 40%。应用 BrdU 标记显示, 这些 GFAP<sup>+</sup> 细胞均具有增殖活性。脱髓鞘模型中 MBP 染色阳性 (MBP<sup>+</sup>) 细胞明显减少 (图 2), 未见 Olig2<sup>+</sup>/MBP<sup>+</sup> 细胞。Cuprizone 诱导的脱髓鞘模型中, 脱髓鞘病灶区可见细胞核染色增多 (图 2, 彩插 4)。

### 2.3 Cuprizone 诱导脱髓鞘模型的髓鞘再生时 Olig2 的表达

在髓鞘逐渐修复后 (2 周), Olig2<sup>+</sup> 细胞数较前减少, MBP<sup>+</sup> 细胞增多, 仍可见大量 GFAP<sup>+</sup> 细胞。在对照组及 cuprizone 模型恢复正常饮食后髓鞘再生组中, 均未见 Olig2<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> 细胞 (图 2)。

### 2.4 实时定量 qRT-PCR 检测 Olig2、MBP 和 GFAP 的 mRNA 相对表达量的结果

正常小鼠脑组织中 Olig2 是低水平表达。当出现髓鞘脱失后, Olig2 表达显著上升 ( $P < 0.01$ ), 但在髓鞘逐渐修复后 (2 周), Olig2 表达下降。MBP 在髓鞘脱失后, 明显减低 ( $P < 0.05$ ), 髓鞘再生后又逐渐升高。GFAP 在髓鞘脱失后升高明显 ( $P < 0.01$ ), 且一直持续到髓鞘修复后 2 周 (图 3)。

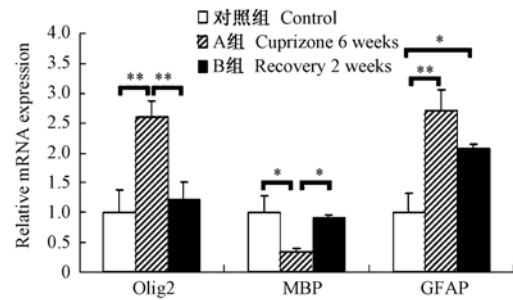


图 3 Olig2、MBP 和 GFAP 在对照组、cuprizone 饲养 6 周组及饮食恢复正常 2 周组中的 mRNA 表达变化 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 3 qRT-PCR results of Olig2, MBP and GFAP of brain tissues from groups of control, cuprizone-administration for 6 weeks and recovery 2 weeks (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ )

## 3 讨论

脱髓鞘疾病, 包括多发性硬化, 具有反复发作, 患者神经功能逐渐恶化的特点。近年来除了免疫调节治疗外<sup>[5]</sup>, 促进髓鞘再生也是一项重要举措<sup>[6]</sup>。Cuprizone 诱导的脱髓鞘模型为我们提供了从髓鞘脱失到髓鞘再生一个比较完整的、可控的过程。通过调控给予 cuprizone 的时间, 可以使动物在急性脱髓鞘后髓鞘重新恢复, 因此, 这种模型最适合于髓鞘脱失及再生机制的研究<sup>[7]</sup>。在本实验中给予小鼠 cuprizone 喂养 6 周后, 脑组织尤其是胼胝体部位出现了明显的髓鞘脱失病变。在撤除 cuprizone 换为正常饮食后 2~3 周, 髓鞘就可基本恢复正常。

在脑组织的脑室下区域 (SVZ) 中存在神经干细胞 (neural stem cells) 和多潜能的神经祖细胞 (multipotential neural precursor cells), 他们能分化为中枢神经系统中各种类型的神经细胞, 包括神经元、少突胶质细胞和星形细胞<sup>[8]</sup>。当 CNS 受到损伤后, SVZ 就能够定向分化为神经细胞来代替丢失的细胞, 但这其中的调控机制尚不十分清楚。髓鞘修复所需要的少突胶质细胞就来源于 SVZ 的神经胶质祖细胞 (OPCs), 它分化生成了髓鞘再生细胞<sup>[9]</sup>。祖细胞中可表达 Olig2, 其对祖细胞向胶质细胞分化起着重要的作用<sup>[10]</sup>。在一些病理情况下, 包括急性或慢性脱髓鞘的病灶, Olig2 在 OPCs 中的表达增高<sup>[11,12]</sup>。正常脑组织中星型细胞不表达 Olig2, 但近来有研究表明在脑组织损伤后, 星型细胞表达 Olig2。Olig2 对星型细胞增殖也是一个关键因素, 并且 Olig2 可能

也是损伤后胶质瘢痕形成的重要的决定因素<sup>[13]</sup>。在本篇报道中,我们研究了在 cuprizone 诱导的脱髓鞘模型中,SVZ 中存在与脱髓鞘相应的 Olig2<sup>+</sup> 细胞的聚集,星形细胞 GFAP<sup>+</sup> 细胞数量增加及少突胶质细胞 MBP<sup>+</sup> 细胞数量减少,并可见以 Olig2<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> 细胞。在随后的髓鞘修复过程中,Olig2<sup>+</sup> 细胞减少,生成的少突胶质细胞 MBP<sup>+</sup> 表达细胞数量增加,但 GFAP<sup>+</sup> 的星形细胞细胞数量仍然较高。qRT-PCR 也证实了上述的结果。

我们的实验也表明,在脱髓鞘期,可见 Olig2<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> 细胞,并且这些细胞 BrdU<sup>+</sup>,表明星形胶质细胞具有增殖活性。这些星形胶质细胞的作用目前并不十分清楚。星形胶质细胞形成的胶质瘢痕,对组织的功能恢复会有不利的影响,但瘢痕组织可能对机体起到了保护作用。有研究表明<sup>[14]</sup>,瘢痕组织为胶质祖细胞以及少突胶质细胞的迁移、增殖、分化提供了一个必要的微环境,所以在髓鞘再生修复的过程中,星形胶质细胞也起了重要的作用。

在研究 Olig2 与星形细胞分化关系时,有作者发现,祖细胞开始分化为 GFAP 表达阳性细胞时,它同时表达 Olig2,并且发现部分细胞出现了 Olig2 的从胞核转移至胞质表达<sup>[15]</sup>。当 CNS 受到损伤时(包括外伤、多发性硬化等)也可以在脑组织中发现 Olig2 在 GFAP<sup>+</sup> 细胞的胞质表达<sup>[16]</sup>。这些表明 Olig2 在星形细胞的分化中可能是一个关键因素。本实验中脑组织脱髓鞘后,Olig2 表达的增高,GFAP<sup>+</sup> 细胞数也增多,表明 Olig2 可能不仅是 OPCs 向少突胶质细胞分化的需要,也是星形胶质细胞分化必要的因素。通过对 Olig2 在祖细胞向不同细胞系分化的调控研究,为今后中枢神经系统损伤后促进髓鞘再生,减少胶质瘢痕的治疗提供了新的靶点。

(本文图 1,2 见彩插 4。)

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Rivera FJ, Steffenhagen C, Kremer D, et al. Deciphering the oligodendrogenic program of neural progenitors: cell intrinsic and extrinsic regulators [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19:595 - 606.
- [ 2 ] Hanafy KA, Sloane JA. Regulation of remyelination in multiple sclerosis [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585:3821 - 3828.
- [ 3 ] Bramow S, Frischer JM, Lassmann H, et al. Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2010, 133:2983 - 2998.
- [ 4 ] Gaber ZB, Novitsch BG. All the embryo's a stage, and Olig2 in its time plays many parts [J]. *Neuron*, 2011, 69:833 - 835.
- [ 5 ] 赵丽波 张健莉 付宏娟,等. 他克莫司对 EAE 鼠血清 IL-12 和 IFN- $\gamma$  的影响及其与髓鞘碱性蛋白相关性的研究 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10:23 - 25.
- [ 6 ] Huang JK, Franklin RJ. Regenerative medicine in multiple sclerosis: identifying pharmacological targets of adult neural stem cell differentiation [J]. *Neurochem Int*, 2011, 59:329 - 332.
- [ 7 ] Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, et al. The relevance of animal models in multiple sclerosis research [J]. *Pathophysiology*, 2011, 18:21 - 29.
- [ 8 ] Weiss S, Dunne C, Hewson J, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis [J]. *J Neurosci*, 1996, 16:7599 - 7609.
- [ 9 ] Jablonska B, Aguirre A, Raymond M, et al. Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13:541 - 50.
- [ 10 ] Taveggia C, Feltri ML, Wrabetz L. Signals to promote myelin formation and repair [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6:276 - 287.
- [ 11 ] Tatsumi k, Takebayashi H, Manabe T, et al. Genetic fate mapping of olig2 progenitors in the injured adult cerebral cortex reveals preferential differentiation into astrocytes [J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86:3494 - 3502.
- [ 12 ] Cate HS, Sabo JK, Merlo D, et al. Modulation of bone morphogenic protein signalling alters numbers of astrocytes and oligodendroglia in the subventricular zone during cuprizone-induced demyelination [J]. *J Neurochem*, 2010, 115:11 - 22.
- [ 13 ] Chen Y, Miles DK, Hoang T, et al. The bHLH transcription factor olig2 is critical for reactive astrocyte proliferation after cortical injury [J]. *J Neurosci*, 2008, 28:10983 - 10989.
- [ 14 ] Williams A, Piaton G, Lubetzki C. Astrocytes—friends or foes in multiple sclerosis? [J]. *Glia* 2007, 55:1300 - 1312.
- [ 15 ] Setoguchi T, Kondo T. Nuclear export of OLIG2 in neural stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte differentiation [J]. *J Cell Biol*, 2004, 166:963 - 968.
- [ 16 ] Zhao JW, Raha-Chowdhury R, Fawcett JW, et al. Astrocytes and oligodendrocytes can be generated from NG2<sup>+</sup> progenitors after acute brain injury: intracellular localization of oligodendrocyte transcription factor 2 is associated with their fate choice [J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29:1853 - 1869.

[ 收稿日期 ] 2013-09-09