

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.2014.02.001

CPZ 诱导精神分裂症样模型小鼠海马脱髓鞘改变
与行为学变化及其相关性的研究王 芸¹, 李永德¹, 彭 超¹, 程国华¹, 陈 林¹, 卢 伟¹, 孔吉明², 肖 岚³, 唐 勇¹

(1. 重庆医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室、干细胞与组织工程教研室, 重庆 400016;

2. 加拿大曼尼托巴大学人体解剖与细胞生物教研室, 加拿大 R3E 0J9;

3. 第三军医大学基础医学部组织胚胎学教研室, 重庆 400038)

【摘要】目的:研究双环己酮草酰二胺(cuprizone, CPZ)诱导 C57BL/6 小鼠建立的精神分裂症样模型小鼠海马内有髓神经纤维体积改变及其与行为学改变之间的关系。**方法:**19 只雄性 6 周龄小鼠, 随机分为实验组(9 只)和对照组(10 只), 实验组用含 0.2% (质量分数百分比, w/w) CPZ 的混合鼠饲料饲喂 6 周, 建立精神分裂症样小鼠模型; 对照组用标准鼠饲料饲喂 6 周。运用旷场实验、高架十字迷宫实验、Morris 水迷宫实验、转棒实验和探孔实验测试行为学改变; 髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)免疫组化染色及透射电镜定性观察髓鞘结构变化; 体视学方法测量并计算海马总体积及海马内有髓神经纤维体积; 统计学方法分析行为学改变与海马内有髓神经纤维体积改变之间的关系。**结果:**与对照组相比, 实验组小鼠体重下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 行为学实验结果表明: 实验组小鼠存在异常的焦虑行为($P = 0.018$)及空间认知能力障碍($P = 0.037$), 但运动能力($P = 0.443$)、探索习性($P = 0.306$)及学习记忆能力未见受损($P = 0.462$); MBP 免疫组化染色发现海马区域免疫阳性染色变浅; 透射电镜定性观察发现海马内有髓神经纤维存在脱髓鞘改变; 体视学定量测定发现, 实验组小鼠海马总体积未发生显著性改变($P = 0.955$), 而海马内有髓神经纤维体积减小($P = 0.009$); 统计学相关分析发现, 闭臂路程百分比和海马内有髓神经纤维体积呈正相关($r_s = 0.83, P = 0.003$), 开臂路程百分比和海马内有髓神经纤维体积呈负相关($r_s = -0.65, P = 0.043$)。**结论:**进一步证实 CPZ 模型小鼠可以出现类似精神分裂症样症状的行为学改变及海马内有髓神经纤维存在脱髓鞘改变, 并且发现海马内有髓神经纤维体积和行为学表现间具有一定的相关性。

【关键词】双环己酮草酰二胺; 精神分裂症; 行为学实验; 海马; 脱髓鞘; 体视学**【中图分类号】**R329.4²**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-11-20Demyelination in the hippocampus and its correlation with altered behaviors of
the cuprizone-induced mouse model of schizophreniaWang Yun¹, Li Yongde¹, Peng Chao¹, Cheng Guohua¹, Chen Lin¹,Lu Wei¹, Kong Jiming², Xiao Lan³, Tang Yong¹

(1. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, Teaching and Research Section of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Teaching and Research

Section of Human Anatomy and Cell Science, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada;

3. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, the Third Military Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the correlation between changes of the volume of the myelinated nerve fibers in mouse hippocampus and altered behaviors with a novel schizophrenia-like animal model which was established by treating C57BL/6 mice with cuprizone (CPZ). **Methods:** Totally 19 male C57BL/6 mice were randomly divided into experimental group and control group. Experimental mice received powdered rodent chow containing 0.2% CPZ for 6 weeks to establish a schizophrenia-like mouse model, while control

作者介绍: 王 芸, Email: wangyun@lzu.edu.cn,

研究方向: 神经生物学。

通信作者: 唐 勇, Email: ytang062@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 31271288, 81171238);

2012 年重庆市“百名学术学科领军人才”培养计划资助经费。

mice were fed with standard rodent chow for 6 weeks. Open field test, elevated plus maze test, Morris water maze test, turn-club test and hole board test were used to estimate behavior changes. Anti-myelin basic protein (MBP) immunohistochemistry staining and transmission electron microscope were used to investigate the structure changes of myelin sheaths. Volume density and

total volume of the myelinated nerve fibers in the hippocampus were investigated with the stereological methods. Correlation between altered behaviors and changed myelinated nerve fibers in the hippocampus was estimated with correlation analysis. **Results:** Mean weight was significantly decreased in experiment group than in control group ($P < 0.05$). Behavior test results indicated that nervous response and spatial cognitive ability of experimental mice was significantly worse than those of control mice ($P = 0.018, P = 0.037$), while action ability, exploration ability and working memory of experimental mice were not significantly different from those of control mice ($P = 0.443, P = 0.306, P = 0.462$). MBP positive nerve fibers in the hippocampus were apparently fewer than in experimental mice than in control mice. Demyelination of the myelinated nerve fibers in the hippocampus was observed under transmission electron microscope. Volume of hippocampus of experimental mice was not significantly changed compared with that of control group ($P = 0.955$), while total volume of the myelinated nerve fibers in the hippocampus of experimental mice was significantly less than that of the control mice ($P = 0.009$). Correlation analysis results suggested that the close-arm distance rate was significantly and positively correlated with volume of the myelinated nerve fibers in the hippocampus ($r_s = 0.83, P = 0.003$), while the open-arm distance rate was negatively correlated with volume of the myelinated nerve fibers in the hippocampus ($r_s = -0.65, P = 0.043$). **Conclusions:** The study further demonstrates that CPZ-treated mice display schizophrenia-like behavior changes and myelinated nerve fibers in its hippocampus undergo pathological change of demyelination. Moreover, present results indicate that changed volume of the myelinated nerve fibers in the hippocampus is correlated with altered behaviors.

【Key words】cuprizone; schizophrenia; behavioral test; hippocampus; demyelination; stereology

精神分裂症是一种严重的慢性精神疾病,全球患病率约 1%。多于青壮年起病,患者存在行为、情感及思维等多种障碍,主要表现为精神活动与环境的不协调。精神分裂症病因尚未完全阐明,但大量研究表明精神分裂症患者存在大脑结构的异常,而且这种异常很可能是由大脑发育过程中遗传因素和环境因素共同作用所致。

海马是边缘系统的重要组成部分,是精神分裂症的主要发病脑区。海马纤维投射复杂而广泛,被视为大脑的一个信息整合中心,海马是学习与记忆、情绪及认知功能相关脑区。大脑功能的正常发挥依赖于完整的神经网络,而髓鞘结构的完整是神经网络完整的结构基础之一。海马髓鞘形成到青春期才完成,而此时期正是精神分裂症的高发期。可见海马髓鞘可能在精神分裂症的发生和发展中具有重要作用。尸检研究发现精神分裂症患者海马内髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)含量减少^[1]。海马脱髓鞘改变就很可能引起与海马相关的脑功能障碍。有研究显示海马各向异性分数(fractional anisotropy, FA)值降低在精神分裂症的早期就已出现而且与认知功能障碍显著相关^[2]。FA 值是弥散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)中用于间接评价髓鞘化程度和纤维完整性的指标^[3],这就进一步提示精神分裂症中海马脱髓鞘改变可能与行为学严重程度相关。最近比较权威的《精神疾病诊断与统计手册》(the diagnostic and statistical manual of

mental disorders, DSM)第 5 版(DSM-5)拟提出:采取通过多维度症状评估来评价多种精神病理现象及严重程度^[4],足见准确评价精神疾病病理表现的严重程度及其与行为学表现之间关系的重要性。然而 DTI 主要是通过测量水分子在各个方向上的运动来间接评价神经纤维束的完整性,对髓鞘微观结构难以进行直观和准确的客观评价;尸检研究只是定性观察和髓鞘相关蛋白密度测量等半定量研究^[1],这些研究没有贯彻随机抽样的原则,这些基于二维平面的研究结果与三维空间内的结构参数之间不存在明确的对应关系,因此结果难有说服力。而体视学克服了以上的缺点,能够准确定量研究有髓神经纤维及髓鞘的相关三维结构参数,从而准确认识髓鞘病理改变的程度及其和行为学表现之间的关系。

双环己酮草酰二胺(cuprizone, CPZ)是一种选择性铜离子螯合剂,低剂量的 CPZ 可诱导中枢神经系统产生脱髓鞘改变,并伴随精神分裂症样症状^[5-7],同时非典型抗精神分裂症药物可以抑制其产生的精神分裂症样症状^[5-7],即满足动物疾病模型的 3 个判断标准,而作为精神分裂症样模型。此模型中出现了海马内有髓神经纤维的脱髓鞘改变^[8],并且低剂量饲养 6 周对海马神经元几乎无影响^[9]。因此本实验用 0.2% CPZ 诱导建立精神分裂症模型,用体质量检测、行为学测试、免疫组化和电镜观察鉴定模型的可靠性,并在此基础上应用体视学方法定量

研究海马总体积、海马内有髓神经纤维体积,并应用统计学方法分析探讨海马内有髓神经纤维体积改变和行为学改变之间的关系。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型建立

19 只雄性 C57BL/6 小鼠,6 周龄,体质量 17~19 g,实验组(9 只)用含 0.2% (质量分数百分比, w/w) CPZ (购于 Sigma_Aldrich 公司)混合饲料饲喂;对照组(10 只)用鼠标准饲料饲喂;均饲喂 6 周并给与蒸馏水。所有动物均饲喂于相同普通环境并自由摄食和饮水。

1.2 体质量测量

以开始喂食 0.2% CPZ 混合饲料当天记作饲喂第 1 天,并测量动物体质量,以后每 3 d 测量 1 次,观察 6 周内实验组和对照组体质量变化。

1.3 行为学测试

在模型制备的第 6 周末,依次进行旷场试验、高架十字迷宫实验、Morris 水迷宫实验(由第三军医大学行为学实验室提供)、探孔实验和转棒实验(由重庆医科大学生命科学研究提供)。

1.3.1 旷场实验 实验前将小鼠置于该行为学测试实验室,适应环境 60 min。实验开始时将小鼠放入旷场正中央,记录每只小鼠在 10 min 内的活动情况。每次实验结束后,清除粪便,并用 70%酒精擦拭旷场底部及周壁,消除小鼠气味,避免动物之间相互干扰。

1.3.2 高架十字迷宫实验 实验前将小鼠置于该行为学测试实验室,适应环境 60 min。实验开始时将小鼠置于高架十字迷宫中央,面朝向其中一个开放臂,记录每只小鼠在 5 min 内的活动情况。每次实验结束后消除气味,方法同旷场实验。

1.3.3 Morris 水迷宫实验 实验时水池内注入自来水,并加二氧化钛粉混匀,水温恒定在 24℃ 左右。第 1 天进行可见平台实验,第 2~5 天进行定位航行实验,2 项实验中均记录小鼠逃逸潜伏期(小鼠入水到四肢均爬上平台的时间)。第 6 天进行空间探索实验,记录小鼠穿越平台次数和平台所在象限搜寻时间。

1.3.4 探孔实验 实验时将小鼠置于探孔实验仪中央,记录 3 min 和 5 min 小鼠探孔次数。每次实验结束后消除气味,方法同旷场实验。

1.3.5 转棒实验 将小鼠置于转棒仪上,先以 4 r/min 匀速转动适应 10 min,休息 30 min 后进行测试。测试时采用加速度模式,即在 4 min 内转棒速度由 4 r/min 均匀增加到 40 r/min。

1.4 标本采集

行为学测试结束后,随机抽取对照组和实验组动物各 5 只制作大脑标本,步骤如下:(1)麻醉:用 4%水合氯醛(10 ml/kg)对小鼠进行腹腔麻醉;(2)灌注固定:经左心室先用生理盐水约 30 ml 灌注,后用 4%的多聚甲醛约 60 ml 固定后

取出大脑,并沿大脑矢状缝将左右大脑分开,每只随机抽取 1 侧大脑半球浸泡于 4%的多聚甲醛溶液,以做免疫组织化学染色;剩余 5 个大脑半球浸泡 2%的多聚甲醛和 2.5% 的戊二醛混合液,以用做电镜学分析。

1.5 免疫组织化学染色

常规石蜡包埋法包埋组织块,切取 4 μm 厚石蜡切片。组织切片经二甲苯脱蜡、枸橼酸热修复、30%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 20 min、封闭血清 37℃ 中水浴 30 min、孵育 MBP 抗体(anti-MBP 1:500 Covance 公司)4℃ 过夜,孵育生物素标记的二抗 37℃ 中水浴 20 min、辣根酶标记链霉素卵白素 37℃ 中水浴 20 min(以上每步间用 PBS 液漂洗 5 min × 3 次)、DAB 显色、复染后封片,并用显微镜拍摄获得 MBP 染色照片。

1.6 电镜标本及电镜超薄切片的制备与电镜拍摄

1.6.1 组织切片制备 用 6%琼脂分别包埋浸泡于多聚甲醛和戊二醛混合液中的左、右大脑半球。冷却后沿冠状方向切取 1 mm 厚的连续脑组织切片,每侧大脑半球获得组织切片 8~10 片,选取包含海马的脑组织切片 3、4 片。

1.6.2 电镜标本制备 在所获得的含有海马的大脑切片枕面随机叠加透明等距测试点,在测试点击中海马的地方切取约 1 mm³ 的组织块,每只动物抽取 5 个组织块。

1.6.3 电镜超薄切片制备 在 4℃ 条件下用 4% 的戊二醛浸泡并固定海马组织块 2 h,并用 0.1 mol/L PBS(pH 7.2)冲洗 3 次,在 4℃ 条件下用锇酸(OsO₄)染色 2 h。将组织块依次置于 50%、70%、90%的乙醇,90%乙醇与 90%丙酮混合物及 100%丙酮溶液中梯度脱水,然后将脱水后的组织块浸泡在 100%环氧树脂 618 中,待组织块浸透好后,先用球切法将组织块包埋成直径为 5 mm 的小球,接着用常规电镜包埋方法包埋小球。

1.6.4 电镜照片拍摄 在包埋好的每个组织块上随机切取 1 张 60 nm 的超薄切片,在透射电子显微镜下将每张超薄切片放大 6 000 倍,然后随机选取 15 个视野进行拍照,每只动物共拍摄获得 75 张电镜照片。

1.7 体视学定量分析

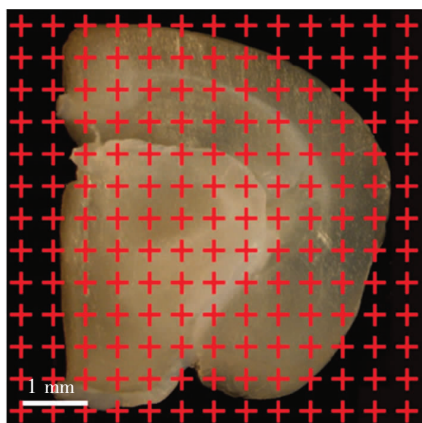
1.7.1 海马体积计算 在解剖显微镜下将已制备的 1 mm 厚的组织切片放大 10 倍,然后从枕面进行拍照。在所获得的照片上随机叠加等距测点框(图 1),分别计数落在每只动物海马内的所有测点数 ΣP(H),利用卡瓦列里原理^[10-11]计算海马总体积:

$$V(H) = t \times a(p) \times \Sigma P(H) \quad (1)$$

式中 V(H)代表每只动物海马总体积, t 为切片厚度 1 mm, a(p)为每一测点代表的面积(0.25 mm²)。

1.7.2 海马内有髓神经纤维的体积密度与总体积的计算 在拍摄得到的电镜照片上随机叠加等距测点框(图 2),分别计数落在整个海马内及海马内有髓神经纤维上的测点数。根据下面的公式^[10-11]计算海马内有髓神经纤维的体积分数:

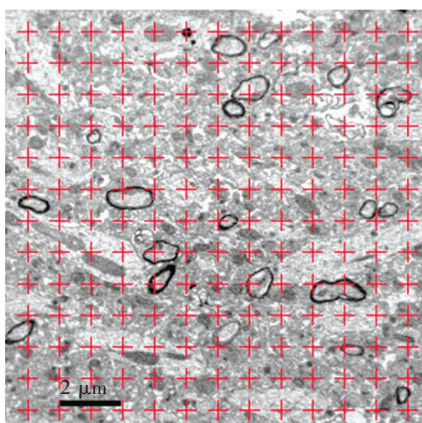
$$V_v(nf/H) = \Sigma P(nf) / \Sigma P(H) \quad (2)$$



计算落在海马内的测点数。以测试点的右上限为计数标准 ($10 \times$)

图 1 海马体积计算展示图

Fig.1 Figure demonstrating the calculation of hippocampus volume



分别计数落在整个海马及海马内有髓神经纤维上的测点数 ($6000 \times$)

图 2 海马内有髓神经纤维体积计算展示图

Fig.2 Figure demonstrating the calculation of myelinated nerve fiber volume on the hippocampus

式中 $V_v(nf/H)$ 代表海马内有髓神经纤维的体积密度, $\Sigma P(nf)$ 为落在海马内有髓神经纤维上的测点总数, $\Sigma P(H)$ 为落在海马内的测点总数。根据如下公式^[10-11]计算海马内有髓神经纤维的总体积:

$$V(nf, H) = V_v(nf/H) \times V(H) \quad (3)$$

式中 $V(nf, H)$ 代表海马内有髓神经纤维的总体积, $V_v(nf/H)$ 代表海马内有髓神经纤维的体积分数, $V(H)$ 代表海马总体积。

1.8 统计学处理

实验数据采用 SPSS 19.0 统计分析软件分析, 所列数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。水迷宫实验中逃逸潜伏期分析采用重复测量方差分析; 其余行为学数据、体视学数据均采用独立样本 t 检验; 不满足正态分布时采用 Mann-Whitney U 检验; 相关分析采用 Spearman 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 体质量变化

在同一喂养时间点比较对照组和实验组的体质量差异: 喂养第 1 天对照组和实验组间体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$), 其余饲喂各天对照组小鼠体质量均高于同期实验组, 并且体质量差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3)。

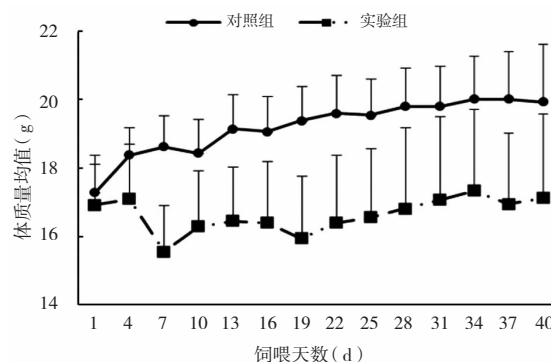


图 3 实验组和对照组体质量比较

Fig.3 Comparison on weight between experimental group and control group

2.2 行为学变化

2.2.1 旷场实验 实验组中央区域爬行时间多于对照组 ($u=2.083, P=0.037$); 实验组中央区域爬行路程多于对照组 ($t=-2.820, P=0.018$); 2 组小鼠爬行总路程差异没有统计学意义 ($t=-0.786, P=0.443$) (表 1)。

表 1 对照组和实验组旷场实验结果比较

Tab.1 Comparison on results of open-field test between experimental group and control group

分组	中央区域爬行 时间 (s)	中央区域爬行 路程 (m)	爬行总路程 (m)
对照组	14.55 ± 12.08	0.71 ± 0.41	18.56 ± 3.19^a
实验组	42.84 ± 29.77^a	1.74 ± 1.02^a	20.14 ± 5.23^a

注: a, 与对照组比较, $P<0.05$

2.2.2 高架十字迷宫实验 实验组和对照组在闭臂停留时间均多于其在开臂停留时间, 2 组进入开臂时间具有统计学差异 ($t=2.168, P=0.062$); 实验组进入闭臂时间少于对照组 ($t=2.398, P=0.029$); 实验组在开臂爬行路程百分比大于对照组 ($t=2.246, P=0.039$); 实验组在闭臂爬行路程百分比小于对照组 ($t=3.999, P=0.001$); 2 组小鼠进臂总次数差异无统计学意义 ($t=0.489, P=0.634$); 2 组小鼠总爬行路程差异无统计学意义 ($t=0.148, P=0.885$) (图 4)。

2.2.3 Morris 水迷宫实验 实验组和对照组在隐藏平台实验中逃逸潜伏期之间差异无统计学意义 (图 5)。撤平台实验中对对照组和实验组穿越平台次数之间差异无统计学意义 [(3.85 ± 1.87) 次, (4.72 ± 2.03) 次, $u=0.735, P=0.462$]; 对照组

和实验组在站台所在象限搜寻时间差异无统计学意义 [(30.95 ± 4.53) s, (31.67 ± 6.01) s, $u=0.989$, $P=0.323$]。

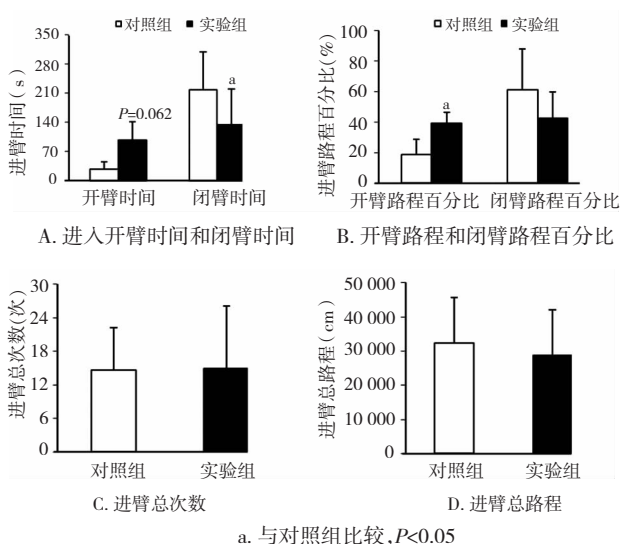


图 4 小鼠高架十字迷宫实验结果

Fig.4 Results of elevated plus maze

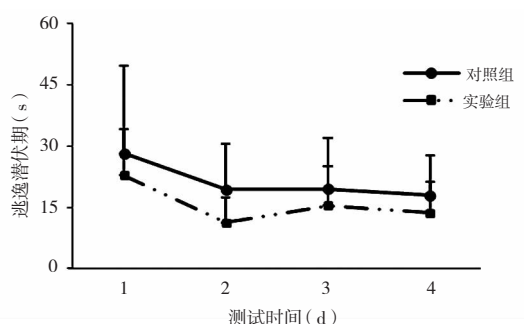


图 5 实验组和对照组水迷宫逃逸潜伏期比较

Fig.5 Comparison on escape latency time in Morris Water Maze between experimental group and control group

2.2.4 转棒实验 2 组小鼠在棒上爬行时间差异无统计学意义 ($t=0.953$, $P=0.354$) (表 2)。

2.2.5 探孔实验 对照组和实验组 3 min 探孔次数差异无统

计学意义 ($u=-1.023$, $P=0.306$); 5 min 探孔次数差异无统计学意义 ($u=-1.144$, $P=0.253$) (表 2)。

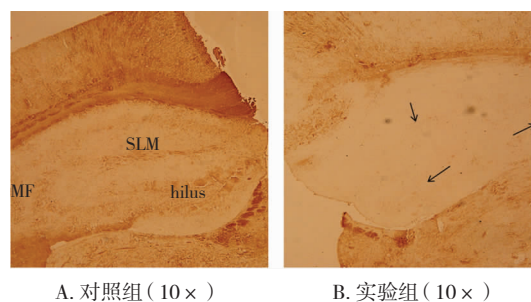
表 2 实验组和对照组棒上爬行时间和 3、5 min 探孔次数

Tab.2 Time of crawling on clubs and frequency of exploring holes in 3 min and 5 min between experimental group and control group

分组	棒上爬行时间 (s)	3 min 探孔次数	5 min 探孔次数
对照组	140.80 ± 52.64	19.30 ± 14.20	28.30 ± 21.02
实验组	119.11 ± 45.81	15.11 ± 12.10	20.22 ± 16.79

2.3 MBP 免疫组织化学染色

实验组较对照组小鼠海马区域免疫阳性染色改变明显, 海马区域 MBP 阳性染色几乎完全消失 (图 6)。



SLM. 腔隙层; MF. 苔状纤维; hilus. 门区; →. 同 A 图中相应位置

图 6 2 组小鼠海马 MBP 免疫组化染色结果比较

Fig.6 Comparison on MBP immunohistochemical staining results in mouse hippocampus between the two groups

2.4 电镜照片

对照组小鼠海马内有髓神经纤维结构致密; 实验组小鼠较对照小鼠海马内有髓神经纤维髓鞘板层结构疏松, 出现空隙, 髓鞘与轴突分离 (图 7)。

2.5 体视学分析

对照组和实验组海马体积差异无统计学意义 ($t=0.058$, $P=0.955$)。实验组海马内有髓神经纤维体积分数明显小于对照组 ($u=-2.611$, $P=0.009$); 实验组有髓神经纤维体积明显小于对照组 ($u=-2.611$, $P=0.009$) (表 3)。

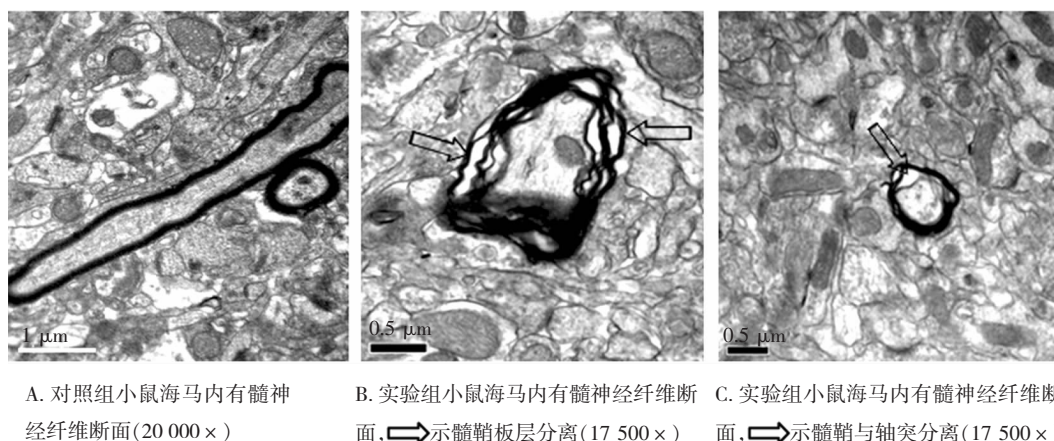


图 7 小鼠海马内有髓神经纤维透射电镜结果比较

Fig.7 Comparison on results of transmission electron microscopy concerning myelinated nerve fibers in mouse hippocampus

表 3 实验组和对照组体视学各参数比较

Tab.3 Comparison on stereological parameters between experimental group and control group

分组	海马体积 (mm ³)	有髓神经纤维体积密度	有髓神经纤维总体积 (mm ³)
对照组	15.430 ± 0.51	0.034 ± 0.012	0.517 ± 0.168
实验组	15.42 ± 0.37	0.008 ± 0.003 ^a	0.118 ± 0.045 ^a
变化率 (%)	0.0	76.5	77.2

注:a,与对照组比较,P<0.05

表 4 行为学指标和体视学参数相关分析

Tab.4 Analysis on correlation between behavioral indexes and stereological parameters

体视学参数		中央区域时间	中央区域路程	进入闭臂时间	开臂路程百分比	闭臂路程百分比
有髓神经纤维体积	r _s 值	-0.116	-0.079	0.176	-0.648 ^a	0.830 ^a
	P 值	0.751	0.829	0.627	0.043	0.003

注:a,与对照组比较,P<0.05

2.6 体视学和行为学阳性指标间的相关分析

对上述行为学实验中差异具有统计学意义的行为学参数和体视学参数进行相关分析,结果见表 4。

3 讨 论

精神分裂症病因尚未完全阐明,其临床表现的异质性很强,因此迄今为止还没有建立一个能够得到广泛认可的精神分裂症动物模型。目前研究中使用的动物模型都只可表现出某一些精神分裂样症状及某种病理改变。本实验所选用低剂量 CPZ 动物模型主要病理改变为中枢神经系统脱髓鞘改变^[5,7]。该模型小鼠存在如社交障碍、前脉冲抑制^[5,7]等较特异的精神分裂症样行为学改变,非典型性抗精神分裂症药物可改善其症状^[5-6],是一个较为成熟并得到广泛应用的精神分裂症样动物模型。有研究表明该模型在不同诱导时间点各脑区脱髓鞘程度不同,如胼胝体^[12]在 4.5~5.0 周、皮质^[12]和海马^[13]在 6 周脱髓鞘程度达到最大,因此本研究选用 6 周 0.2% CPZ 模型,以观测该模型小鼠在海马脱髓鞘可能最严重时的行为学表现,并进一步准确定量研究海马髓鞘的相关参数及其和行为学改变间的关系。本实验通过体质量观察、行为学检测、MBP 免疫组化染色和透射电镜照片分析方法对所制备动物模型进行可靠性鉴定。在动物模型制备整个过程中,实验组小鼠体质量出现了下降,与以往研究相符^[5,14]。以往研究表明 0.2% CPZ 造模 6 周小鼠出现旷场实验中央区域路程增加的行为学变化^[5,14]。有研究显示旷场实

验的中央区域爬行路程是反映动物的情感性行为的指标^[15]。本实验中实验组小鼠出现了旷场中央区域爬行路程增加。高架十字迷宫行为学测试结果与旷场实验结果相似,进一步证实实验组小鼠存在异常行为学表现。但实验组小鼠运动能力及探索习性均未发生改变,这说明本实验中小鼠异常的行为学表现并不是由于运动能力和探索习性的改变所造成的,而可能是由于实验组小鼠空间认知能力受损所造成的,因为旷场实验中央区域时间用来反映啮齿类动物的空间认知能力,本实验中该指标实验组明显高于对照组。旷场实验中的中央区域和高架十字迷宫中的开臂环境对小鼠来说均存在潜在的威胁,正常小鼠会因害怕而尽快避开,而本实验中实验组小鼠在具有潜在威胁的危险环境中活动明显增加,出现在危险环境中焦虑迟钝的异常情感表现,这与精神分裂症病人出现的以行为与环境不协调为主的特征表现非常相似。由此可见本实验中出现的行为学变化不仅说明本研究所制备的动物模型具有可行性,而且也作为 0.2% CPZ 模型可作为精神分裂症动物模型提供了强有力的证据。模型小鼠行为学结果结合 MBP 免疫组化染色及电镜下髓鞘微观结构的变化,说明本实验动物模型构建成功且可靠。

虽然精神分裂症病因未明,但精神分裂症存在神经发育异常,并且基因和环境的共同作用在其发生发展中具有重要作用,已得到研究者的认可。海马在环境应激调节中具有重要作用,多种与精神分裂症相关基因在海马内高表达^[16-17],足见海马在精

精神分裂症病因研究中的重要价值;髓鞘形成从出生前开始一直延续到出生后,海马髓鞘形成到青春期末完成,而此时期正是精神分裂症的高发期;说明明确海马髓鞘的病理改变对探讨精神分裂症病因具有非常重要的意义。尸检研究发现精神分裂症患者海马内 MBP 含量减少^[1],体视学的定量研究进一步证实精神分裂症患者海马后部少突胶质细胞数量减少^[18],众所周知少突胶质细胞是中枢系统髓鞘形成细胞,因此以上的研究提示精神分裂症患者存在海马髓鞘结构破坏和髓鞘形成障碍即脱髓鞘改变。基因组学研究发现精神分裂症患者海马少突胶质细胞和髓鞘相关基因表达异常^[19-20],进一步说明海马脱髓鞘改变可能是精神分裂症的病理学基础之一。最近比较权威的精神疾病诊断标准 DSM-5 提出:拟采取通过多维度症状评估来评价多种精神病理现象及严重程度^[4],可见对海马脱髓鞘这一病理改变客观准确定量的必要性,然而目前研究不论是活体、尸体还是动物模型研究,都无法提供精神分裂症中海马脱髓鞘改变的准确定量数据。主要原因如下:(1)针对活体研究:DTI 是目前用于活体脑白质主要纤维束检查的唯一影像学方法,对神经纤维的细微结构改变敏感,可观察神经纤维束结构及走行,其中 FA 值降低提示髓鞘结构改变和神经纤维完整性受损。虽然有研究发现精神分裂症患者额叶、颞叶、海马等脑区及胼胝体、前扣带、钩束等存在连接各脑区的神经纤维束 FA 值降低^[21],为精神分裂症存在连接障碍提供了解剖学证据,但 DTI 也存在如下的缺点:首先 FA 值主要适用于研究较大的神经纤维束,而海马是以灰质为主的脑结构,海马内神经纤维束细小,尤其是海马内有髓神经纤维含量较少,因此 DTI 对其测量的可靠性较低;其次 DTI 方法主要是通过神经纤维等结构对水分子运动的限制使得其更倾向于沿脑白质走行方向弥散的原理间接反映髓鞘化程度,因此其不能直接客观地观察到有髓神经纤维髓鞘超微结构的改变,更无法对髓鞘结构做到准确的定量。(2)针对尸体和动物模型研究:以往对精神分裂症尸体研究多为髓鞘主要结构蛋白,如 MBP 密度测量等的半定量研究^[4];虽然有研究人员运用免疫组化染色方法发现 CPZ 小鼠模型可出现大脑多个脑区脱髓鞘改变,其中包括海马^[6];并运用免疫组化化学染色的方法在不同时间点比较海马脱髓鞘程度,发现在 CPZ 诱导 6 周海马脱髓鞘程度达到最大^[13];但这些研究没有贯彻随

机抽样的原则,而密度研究也存在参照空间陷阱问题,没有能够在三维空间内对有髓神经纤维进行准确定量,因此结果很难具有说服力,而体视学方法克服了以上的缺点,能准确测量并定量有髓神经纤维及髓鞘的相关三维结构参数。本实验中电镜定性观察发现实验组小鼠海马髓鞘出现分层和髓鞘与轴突的分离等现象及有髓神经纤维直径减小等脱髓鞘改变,进一步运用体视学方法测量发现海马内有髓神经纤维体积减少了约 77%,这一结果更加准确客观的说明 CPZ 模型存在海马的脱髓鞘改变。髓鞘是包绕在轴突表面的脂质成分,主要起绝缘和加速神经传导的作用。神经纤维直径、髓鞘厚度均可影响神经信息的传导速度,因此脱髓鞘改变就可能引起传导速度的下降,而导致神经元协调刺激的能力受损,进而引起递质释放的异常,并最终引起大脑功能的异常而出现行为学改变。有证据证实白质纤维髓鞘厚度下降可导致神经传导速度减慢,引起多巴胺释放异常,进而出现类似精神病症状的行为改变^[22];另外,脱髓鞘疾病出现了精神分裂症样症状,如多发性硬化症^[23]、异染性脑白质营养不良^[24];抗精神病药物可通过调节髓鞘形成相关蛋白表达而改善精神分裂症样症状,说明脱髓鞘改变很可能在精神分裂症样症状表现中具有重要作用。临床研究发现 FA 值的降低和临床症状之间存在一定的相关性,比如:精神分裂症有幻听症状的患者其弓状束 FA 值的降低与幻觉呈显著正相关^[25];精神分裂症中海马 FA 降低和认知功能障碍显著相关^[2],提示不同脑区神经纤维完整性受损严重程度和该脑区相关的行为表现有关。众所周知海马和焦虑有关,有研究表明大鼠海马腹侧损伤可出现在高架十字迷宫中焦虑迟钝的行为表现^[26],这与本实验中实验组小鼠在该实验中行为表现非常相似,综合以上的研究结果说明海马脱髓鞘改变很可能与焦虑样行为表现有关。因此本研究将评价脱髓鞘改变的体视学参数和行为学测量指标相结合进行了统计分析,发现高架十字迷宫中开臂、闭臂爬行路程均和海马内有髓神经纤维髓鞘体积存在相关性,为精神分裂症中存在海马脱髓鞘改变提供了强有力的证据;也为通过症状评估精神疾病病理改变的严重程度提供了一定的理论依据。

本研究采用了多种行为学方法检测了 CPZ 模型中小鼠的行为学表现,证实 CPZ 模型是良好的精神分裂症样模型;首次采用了三维体视学定量方法

测定了 3 月龄 C57BL/6 正常及 CPZ 诱导 6 周的脱髓鞘小鼠海马体积及海马内有髓神经纤维髓鞘体积,为今后的针对该动物及该动物模型的研究提供了准确、可靠的定量数据;明确海马内有髓神经纤维体积与行为学改变间具有相关性,为今后通过外显行为判断大脑结构病理改变提供了一定的理论依据。但是对于海马在脱髓鞘后出现不同行为学改变的具体机制及引起海马内有髓神经纤维体积改变的具体原因等仍然不清楚,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Chambers JS, Perrone-Bizzozero NI. Altered myelination of the hippocampal formation in subjects with schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Neurochem Res*, 2004, 29(12): 2293–2302.
- [2] White T, Kendi AT, Lehericy S, et al. Disruption of hippocampal connectivity in children and adolescents with schizophrenia—a voxel-based diffusion tensor imaging study [J]. *Schizophr Res*, 2007, 90(1–3): 302–307.
- [3] Le Bihan D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(6): 469–480.
- [4] Narrow WE, Kuhl EA. Dimensional approaches to psychiatric diagnosis in DSM-5 [J]. *J Ment Health Policy Econ*, 2011, 14(4): 197–200.
- [5] Xiao L, Xu H, Zhang Y, et al. Quetiapine facilitates oligodendrocyte development and prevents mice from myelin breakdown and behavioral changes [J]. *Mol Psychiatry*, 2008, 13(7): 697–708.
- [6] Xu H, Yang HJ, Rose GM, et al. Recovery of behavioral changes and compromised white matter in C57BL/6 mice exposed to cuprizone: effects of antipsychotic drugs [J]. *Front Behav Neurosci*, 2011, 5: 31.
- [7] Xu H, Li X M. White matter abnormalities and animal models examining a putative role of altered white matter in schizophrenia [J]. *Schizophr Res Treatment*, 2011, 2011: 826976.
- [8] Yang HJ, Wang H, Zhang Y, et al. Region-specific susceptibilities to cuprizone-induced lesions in the mouse forebrain: implications for the pathophysiology of schizophrenia [J]. *Brain Res*, 2009, 1270: 121–130.
- [9] Hoffmann K, Lindner M, Groticke I, et al. Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice [J]. *Exp Neurol*, 2008, 210(2): 308–321.
- [10] Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis [J]. *Apmis*, 1988, 96(5): 379–394.
- [11] Tang Y, Nyengaard JR. A stereological method for estimating the total length and size of myelin fibers in human brain white matter [J]. *J Neurosci Methods*, 1997, 73(2): 193–200.
- [12] Gudi V, Moharrehg-Khiabani D, Skripuletz T, et al. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination [J]. *Brain Res*, 2009, 1283: 127–138.
- [13] Koutsoudaki PN, Skripuletz T, Gudi V, et al. Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 451(1): 83–88.
- [14] Franco-Pons N, Torrente M, Colomina MT, et al. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination [J]. *Toxicol Lett*, 2007, 169(3): 205–213.
- [15] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463(1–3): 3–33.
- [16] Mechawar N, Lacoste B, Yu WF, et al. Developmental profile of neuregulin receptor ErbB4 in postnatal rat cerebral cortex and hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2007, 148(1): 126–139.
- [17] Chiang CH, Su Y, Wen Z, et al. Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(4): 358–360.
- [18] Schmitt A, Steyskal C, Bernstein HG, et al. Stereologic investigation of the posterior part of the hippocampus in schizophrenia [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(4): 395–407.
- [19] Dracheva S, Davis KL, Chin B, et al. Myelin-associated mRNA and protein expression deficits in the anterior cingulate cortex and hippocampus in elderly schizophrenia patients [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 21(3): 531–540.
- [20] Katsel P, Davis KL, Haroutunian V, et al. Variations in myelin and oligodendrocyte-related gene expression across multiple brain regions in schizophrenia: a gene ontology study [J]. *Schizophr Res*, 2005, 79(2–3): 157–173.
- [21] Kyriakopoulos M, Bargiotas T, Barker GJ, et al. Diffusion tensor imaging in schizophrenia [J]. *Eur Psychiatry*, 2008, 23(4): 255–273.
- [22] Roy K, Murtie JC, El-Khodori BF, et al. Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(19): 8131–8136.
- [23] Jongen PJ, Ter Horst AT, Brands AM. Cognitive impairment in multiple sclerosis [J]. *Minerva Med*, 2012, 103(2): 73–96.
- [24] Kumperscak HG, Plesnicar BK, Zalar B, et al. Adult metachromatic leukodystrophy: a new mutation in the schizophrenia-like phenotype with early neurological signs [J]. *Psychiatr Genet*, 2007, 17(2): 85–91.
- [25] Abdul-Rahman MF, Qiu A, Woon PS, et al. Arcuate Fasciculus Abnormalities and Their Relationship with Psychotic Symptoms in Schizophrenia [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29315.
- [26] Mchugh SB, Deacon RMJ, Rawlins JNP, et al. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety [J]. *Behav Neurosci*, 2004, 118(1): 63–78.

(责任编辑:冉明会)