

C57BL/6 小鼠性别差异对髓鞘少突胶质糖蛋白诱导的实验性自身脑脊髓炎疾病的影响*

王婷婷 杜昌升**

(上海市信号转导与疾病研究重点实验室, 同济大学生命科学与技术学院受体生物医药实验室, 上海 200092)

摘要 多发性硬化是人类常见的中枢神经系统自身免疫性炎症致脱髓鞘疾病。流行病学研究发现, 女性患者多于男性, 其平均发病时间早于男性。实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)与多发性硬化症有相似的临床症状和病理特征, 是被广泛应用于人类疾病研究的动物模型。本实验利用髓鞘少突胶质糖蛋白 MOG₃₃₋₃₅ 免疫 C57BL/6 小鼠建立 EAE 模型, 观察 29 天。通过疾病评分发现雌雄小鼠在发病率、起病时间上均无明显差别, 但雄鼠的发病症状明显比雌鼠严重。在其病理切片 HE 染色中观察到雄性小鼠中枢浸润的炎性细胞多于雌性小鼠, 并且在 LFB 染色中同样观察到雄鼠脱髓鞘区域明显增大。对其发病高峰期中枢浸润细胞的染色分析时, 可以发现雄性小鼠中浸润的 CD4⁺T 细胞及其亚群 T_H1 和 T_H17 细胞均有明显增加。这些都表明 MOG₃₃₋₃₅ 免疫 C57BL/6 小鼠建立的 EAE 模型存在着性别差异的影响, 这一发现为今后建立多发性硬化症的动物模型中动物性别的选择提供了一定的参考依据。

关键词 C57BL/6 小鼠, 实验性自身脑脊髓炎, 性别差异

学科分类号 R392.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00606

对一些自身免疫疾病如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、桥本氏甲状腺炎的研究发现, 女性比男性更容易罹患自身免疫性疾病^[1]。这种性别分布通常被认为是女性较强的免疫反应和/或性激素影响的结果^[2-3]。多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)炎性脱髓鞘疾病, 它被认为是一种针对特异性髓鞘抗原如髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)、蛋白脂蛋白(proteolipid protein, PLP)和/或髓鞘少突胶质糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)的自身免疫性疾病^[4]。与其他自身免疫性疾病一样, MS 的发病率女性比男性高^[1,3]。然而, 一系列的临床研究中性激素影响 MS 的发病率亦或是加重 MS 疾病^[5-6]的机制还尚未明确。

实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是由 CD4⁺T 细胞介导的自身免疫性疾病。抗原致敏的 T 细胞穿过血脑屏障进入中枢, 诱发对自身髓鞘抗原的免

疫应答, 导致脑及脊髓的免疫损伤。EAE 是 MS 对应的经典动物模型, 通过对其发病机制、病情发生发展规律、临床及病理改变、治疗及预防等方面的深入研究, 能够为 MS 的治疗提供充分的实验依据。

由于 MOG 存在于髓鞘膜和少突胶质细胞的最外层, 具有高度免疫原性, 并有证据证明抗 MOG 抗体在 MS 的发病过程中起重要作用^[7], 近年来, 国外学者开始应用 MOG 诱导的 EAE 作为研究 MS 的理想模型。在 MBP、PLP 诱导的 EAE 模型中, 性别差异的影响已经被观察到。然而, C57BL/6 小鼠诱导的 EAE 动物模型中, 性别差异的影响又是

* 国家自然科学基金(31000399, 31171348)和国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB910404)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-65986852, E-mail: duchangsheng@gmail.com

收稿日期: 2012-12-21, 接受日期: 2013-04-24

如何? 因此, 研究 MOG 诱导的 C57BL/6 小鼠 EAE 模型的性别差异具有十分重要的意义. 本文通过 MOG₃₅₋₅₅ 诱导免疫 C57BL/6 小鼠建立 EAE 模型, 对雌雄小鼠的 EAE 疾病进行分析, 主要包括:

a. 小鼠疾病情况的评分; b. 病理切片苏木素-伊红(HE)染色及统计; c. 病理切片 Luxol fast blue (LFB)染色及统计; d. 小鼠发病高峰期 CNS 浸润细胞的染色分析. 结果表明, 雄性小鼠无论是疾病评分, 还是 HE、LFB 染色, 明显比雌鼠严重, 对其 CNS 浸润细胞的染色分析中, 这一结果也再次得到了证明.

1 材料与方法

1.1 材料

实验用 C57BL/6 小鼠, 雌性, 8 周龄, 18~22 g, 雄性, 8 周龄, 23~27 g, 购自上海市实验动物中心; 抗原: MOG₃₅₋₅₅ 由吉泰生化公司合成, 纯度 (HPLC) > 95%; MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK 和弗氏完全佐剂 (Complete Freund's Adjuvant, CFA) 购自 Sigma 公司; 百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 购自 Calbiochem 公司; 结核菌素 (mycobacterium tuberculosis, MT) 购自 BD 公司; Luxol fast blue 购自 Sigma 公司; Percoll™ 购自 GE healthcare 公司.

1.2 EAE 模型建立

动物饲养于 (24 ± 2) °C 的环境中, 维持光-暗 12 h 循环交替, 并给以充足的食料和洁净饮水. 饲养 7 天后, 用于实验. 实验前将所有小鼠根据体重分层, 按顺序随机抽取各层小鼠均匀分配至各组. CFA 添加 MT 至终浓度为 5 g/L, 之后与浓度为 2 g/L 的 MOG₃₅₋₅₅ 溶液等比例混合后于振荡器上充分振荡成为 MOG₃₅₋₅₅ 乳剂. 各组小鼠每只脊柱背部两侧皮下注射各 0.1 ml MOG₃₅₋₅₅ 乳剂. 然后每只小鼠腹腔注射 100 ng PTX, 48 h 后每只小鼠在腹腔加注 100 ng PTX. 小鼠经 MOG₃₅₋₅₅ 免疫后, 每日按 EAE 症状评分标准对小鼠进行功能评分, 直至 MOG₃₅₋₅₅ 免疫后第 29 天. 评分标准为: 0 分, 后肢伸展, 尾巴伸展上翘, 正常步态; 1 分, 后肢伸展, 尾部张力消失、不能缠绕圆柱形物体, 正常步态; 2 分, 双后肢无力, 老鼠步态不协调, 尾下垂; 3 分, 双后肢瘫痪, 尾下垂; 4 分, 双后肢瘫痪, 前肢瘫痪或肌力减弱, 尾下垂; 5 分, 老鼠不动, 对触摸无反应, 呼吸改变症状, 濒死状态或死亡.

1.3 动物取材及病理染色

小鼠 MOG₃₅₋₅₅ 免疫后第 21 天, 采用 3.5% 水合氯醛腹腔麻醉, 按体重 1 ml/100 g, 麻醉后立即暴露心脏, 经左心室插管, 快速灌注肝素化生理盐水 150 ml, 并加灌 50 ml 4% 多聚甲醛固定, 完整取出脊髓入 4% 多聚甲醛中固定过夜. 石蜡包埋病理切片, 切片厚 5 μm. 腰段脊髓横切面进行 HE、LFB 染色, 光学显微镜下观察结果.

1.4 CNS 炎症细胞分离

MOG₃₅₋₅₅ 免疫后第 19 天 (发病高峰期) 小鼠, 经 3.5% 水合氯醛腹腔麻醉, 按体重 1 ml/100 g, 麻醉后立即暴露心脏, 经左心室插管, 快速灌注肝素化生理盐水 150 ml, 完整取出脑、脊髓. 将取好的 CNS 转移至 70 μm 细胞过滤网中, 添加 1640 培养液 (1% FBS) 并研磨 CNS 至组织完全经过滤网滤过入 50 ml 离心管中. 离心后用 Percoll™ 配制 70% (用 1×PBS 配) 及 37% (用 1640 配) Percoll™, 然后进行 CNS 中免疫细胞的密度梯度法分离, 得到分离出的细胞后重悬细胞并计数.

1.5 流式细胞分析

将上述分离得到的细胞加入 PMA (50 mg/L), Ionomycin (1 mmol/L), BFA (1 g/L) 后, 37°C 短期刺激 6 h, 离心去上清后重悬, 4°C 1000 g 离心 3 次 (每次离心完成后水平旋转离心管 180°), 每次 3 min, 离心后弃上清; 然后对 CD4⁺ T 细胞的表面染色, 即加抗体, 4°C 30 min, 避光; 用 1×PBS 重悬, 4°C 1000 g 离心 3 次, 每次 3 min, 离心后弃上清; 用 1×固定、通透液, 4°C 固定、通透 20 min; 4°C 1000 g 离心 3 次, 每次 3 min, 弃上清, 尽量吸净; 用 0.5 ml 1×清洗液, 洗 1 次; 对其亚群 T_H1、T_H17 细胞进行 IFN-γ 及 IL-17 胞内染色, 具体为加抗体, 4°C 30 min, 避光; 洗 2 次, 每次 0.5 ml 1×清洗液; 用 1×PBS (1% BSA) 缓冲液重悬细胞, 4°C 避光保存; 最后进行流式细胞检测.

1.6 数据统计

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析. 借助 Student's *t* 检验确定两组数据差异, **P* < 0.05 时差异显著.

2 结 果

2.1 病程和神经功能评分

雌雄小鼠发病后均表现为精神萎靡, 进食少, 皮毛不光滑, 并且可以发现其尾部张力消失, 后肢或四肢麻痹、大小便失禁. EAE 小鼠均在第 10 天

左右开始发病, 免疫 17 天后达到发病高峰值, 高峰期神经功能性评分雄鼠为(3.1 ± 0.2)分, 雌鼠为(2.1 ± 0.2)分, 此后第 21 天左右小鼠发病症状开始缓和直至到达一个稳定期. 将 EAE 雌雄小鼠的发病情况进行比较, 发现两者在发病率、发病时间无明显差别, 但雄鼠的发病症状明显比雌鼠严重, 并且具有显著性的差异(图 1b). 因实验中采用的是相同年龄的小鼠, 发现雄鼠的体重均明显比雌鼠重,

并且呈现出显著性差异(图 1a), 为了确定体重因素的影响, 我们进一步分析了相同年龄、体重有显著性差异的雌性小鼠之间的发病差异, 结果显示, EAE 评分没有显著性差异(图 c, d); 在雄性小鼠中进行类似的观察时, 也发现体重并无显著性影响 EAE 的发病(图 e, f). 由此可见, 同年龄的雌、雄小鼠 EAE 发病的不同主要还是受其性别的影响.

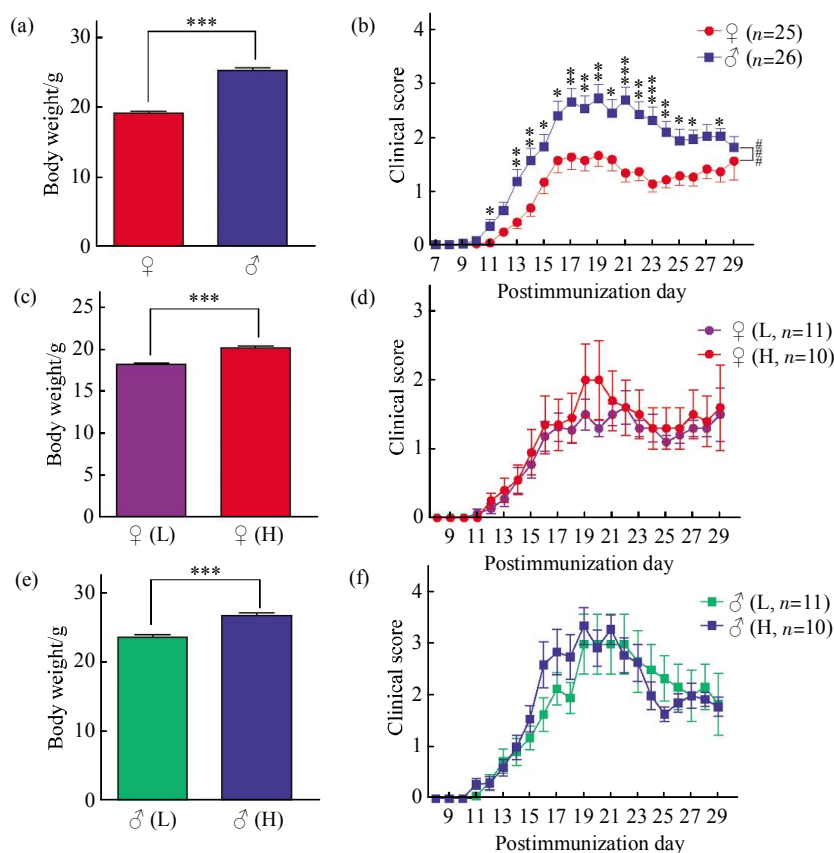


Fig. 1 Body weight and clinical score of MOG-induced EAE in female and male C57BL/6 mice

The body weight (a, c, e) were measured at day 0 after immunization, Data are $\bar{x} \pm s$, *** $P < 0.001$, versus EAE (♀), EAE (L). Mice were monitored daily for clinical symptom and scored as described in section 1.2. Results expressed are the mean clinical score. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus EAE (♀), EAE (L) (Mann-Whitney U test), $^{###}P < 0.001$ (two-way ANOVA test). The data are from three independent experiments ($\bar{x} \pm s$).

2.2 HE 染色

小鼠免疫第 21 天后取腰段脊髓横切面进行 HE 染色, 同时还分别用未诱导 EAE 的正常雌雄小鼠作为对照(图 2a). 观察到正常雌雄小鼠中未见空泡状改变以及炎性细胞的浸润, 而在 EAE 小鼠中

明显发现脊髓白质炎性细胞的浸润, 并且出现空泡状改变, 脊髓内小血管周围有大量的炎性细胞环绕. 分别对每组 3 只小鼠, 每只小鼠 10 个脊髓切片进行炎性细胞浸润数的统计, 发现雄性小鼠浸润细胞数明显多于雌性小鼠并具有显著性差异(图 2b).

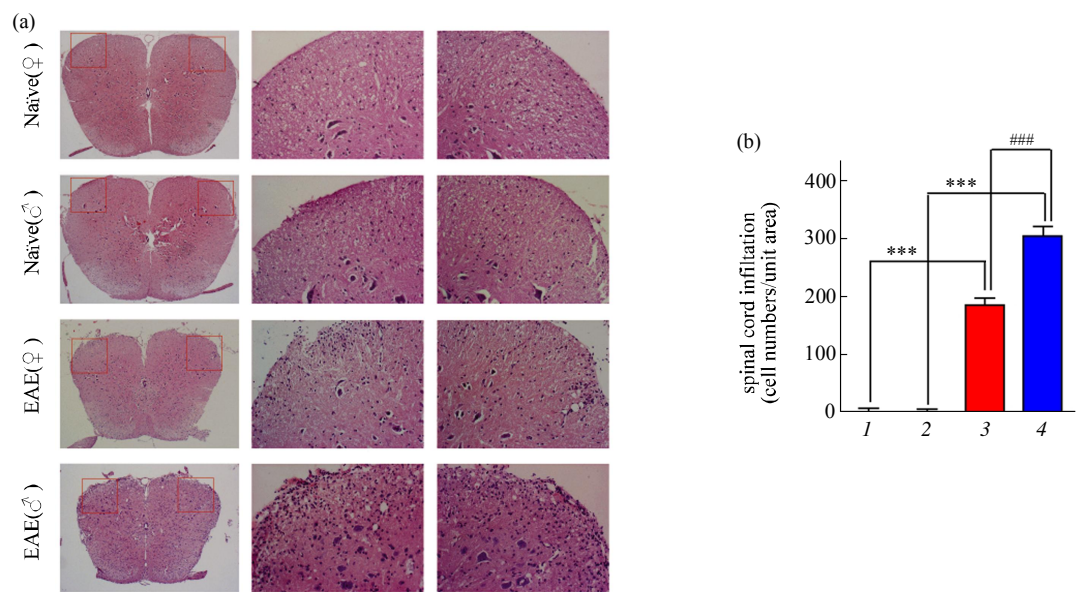


Fig. 2 HE staining of paraffin sections of spinal cords isolated from Naïve and EAE mice

(a) HE staining of paraffin sections of spinal cords isolated from naïve and EAE mice on day 21 after immunization (left panels, original magnification $\times 4$; middle and right panels, original magnification $\times 20$). (b) Quantification of spinal cord infiltrates in the sections. Three animals from each group were sacrificed and 10 sections of the spinal cord of each animal were analyzed. $***P < 0.001$, versus Naïve, $###P < 0.001$, versus EAE (♀) (Student's *t*-test). 1: Naïve(♀); 2: Naïve(♂); 3: EAE(♀); 4: EAE(♂).

2.3 LFB 染色

小鼠免疫第 21 天后取腰段脊髓横切面进行 LFB 染色, 同时还分别用未诱导 EAE 的正常雌雄

小鼠作为对照(图 3a). 观察到正常雌雄小鼠中脊髓白质的完整性, 未见空泡状改变, 而 EAE 小鼠脊髓白质中出现了大小不等的片状脱髓鞘区, 雌鼠脱

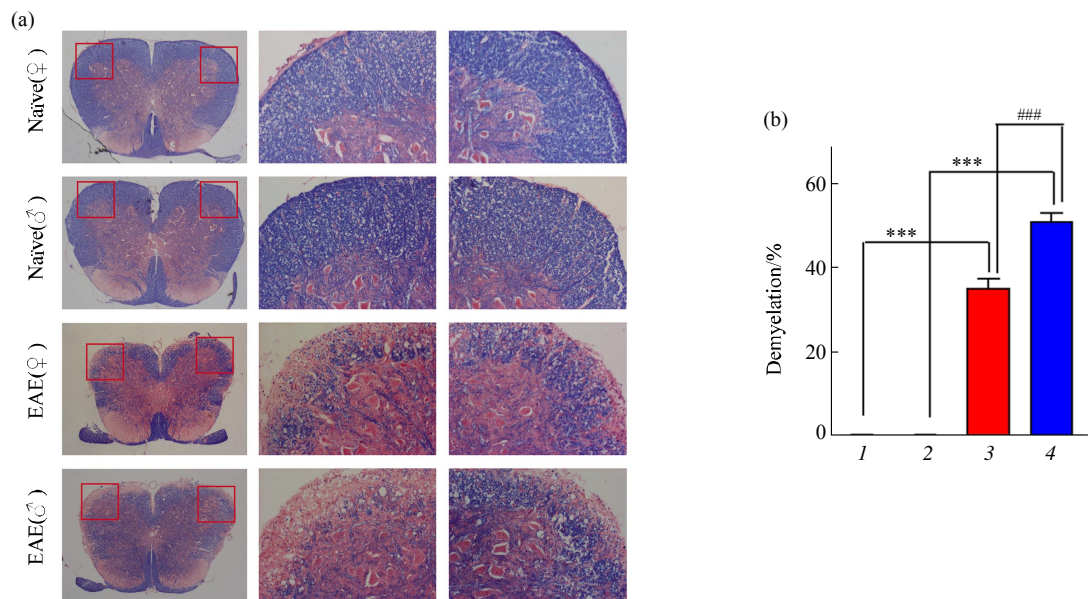


Fig. 3 Luxol fast blue staining of paraffin sections of spinal cords isolated from naïve and EAE mice

(a) Luxol fast blue staining of paraffin sections of spinal cords isolated from naïve and EAE mice on day 21 after immunization (left panels, original magnification $\times 4$; middle and right panels, original magnification $\times 20$). (b) Quantification of spinal cord infiltrates in the sections. Three animals from each group were sacrificed and 10 sections of the spinal cord of each animal were analyzed. $***P < 0.001$, versus Naïve, $###P < 0.001$, versus EAE (♀) (Student's *t*-test). 1: Naïve(♀); 2: Naïve(♂); 3: EAE(♀); 4: EAE(♂).

髓鞘区较少, 雄鼠脱髓鞘区域大于雌鼠, 并且空泡状改变也比较大. 同样, 分别对每组 3 只小鼠, 每只小鼠 10 个脊髓切片进行脱髓鞘百分比的统计, 经统计雄鼠与雌鼠的脱髓鞘百分比之间具有显著性差异(图 3b). 这与小鼠评分的结果以及中枢炎性细胞 HE 染色的结果相一致.

2.4 CNS 浸润细胞的染色分析

为了进一步了解 EAE 雌雄小鼠性别的差异, 免疫后的第 19 天, 我们将 EAE 小鼠的脑及脊髓取出匀浆后通过蔗糖密度离心, 将浸润于脑及脊髓的炎症细胞分离出来后, 进行表面和胞内染色, 最后进行流式细胞分析. 由于 EAE 是由 $CD4^+$ T 细胞介导的自身免疫性疾病, 因此我们对炎性细胞进行了 $CD4^+$ T 细胞的表面染色分析. 结果发现, $CD4^+$ T 细胞在炎性细胞中的比率较高, 雌鼠中占约 22%,

而雄鼠中高达 30%(图 4a). 通过流式细胞分析, 对 $CD4^+$ T 细胞的绝对数量值进行统计, 发现雌雄小鼠之间存在着显著性差异(图 4b). 而 T_H1 和 T_H17 细胞是 EAE 中主要的致病性 $CD4^+$ T 效应细胞, 所以我们对其亚群 T_H1 和 T_H17 细胞进行了胞内染色分析. $IFN-\gamma$ 阳性代表 T_H1 细胞, $IL-17$ 阳性代表 T_H17 细胞. 结果发现 EAE 雄性小鼠 T_H1 和 T_H17 细胞占中枢浸润的 $CD4^+$ T 细胞的百分比均显著高于雌性小鼠(图 4c), 而细胞绝对数量值也呈现出这一现象, 并且雄性小鼠 T_H1 细胞绝对数量值与雌性小鼠之间差异显著, T_H17 细胞之间差异虽然较少, 但雄鼠与雌鼠之间也存在着显著性差异(图 4d), 以上这些结果都再一次表明雌雄小鼠之间存在着显著性差异.

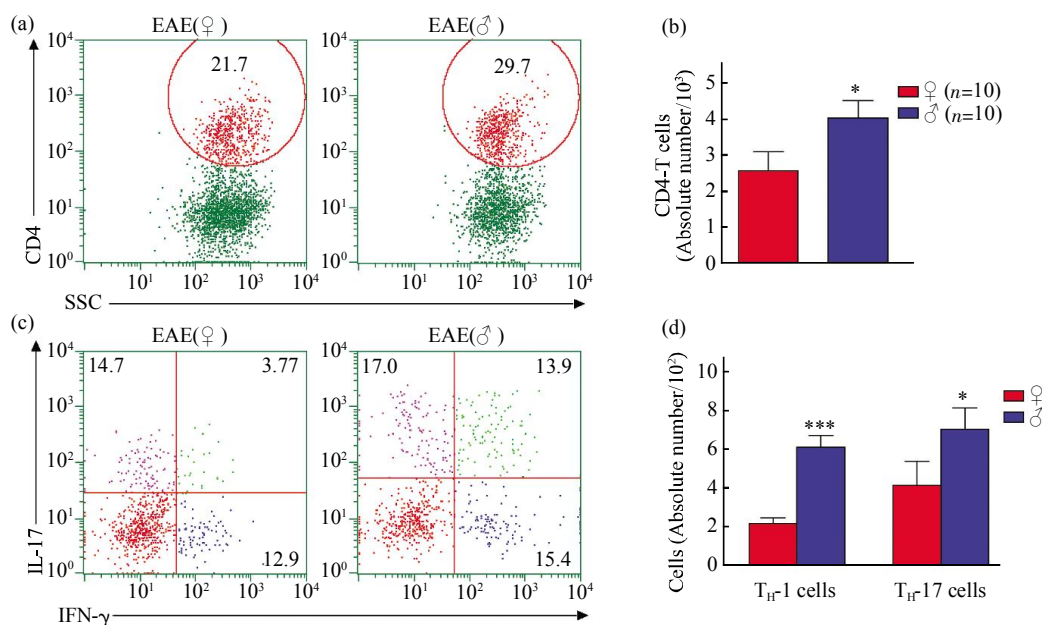


Fig. 4 CNS infiltration of pathogenic T cells

Total CNS infiltrations were isolated with 37%~70% PercollTM from MOG-EAE mice on day 19 post-immunization and analyzed by flow cytometry. (a) Representative FACS images of $CD4^+$ T cells in the CNS of EAE mice. (b) Statistical data of the FACS analysis which show the absolute number of $CD4^+$ T cells in the CNS. (c) Representative FACS images of T_H1 ($IFN-\gamma$ positive) and T_H17 ($IL-17$ positive) cells in the CNS of EAE mice. (d) Statistical data of the FACS analysis which show the absolute numbers of T_H1 and T_H17 cells in the CNS. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, versus EAE (♀) (Student's t test).

3 讨论

EAE 动物模型常用的致敏原多为脑或脊髓组织匀浆、MBP、PLP、髓鞘蛋白成分或其多肽片段

等. MOG 存在于髓鞘膜和少突胶质细胞的最外层, 虽然在髓鞘蛋白中含量很少, 只占总髓鞘蛋白成分的 0.01%~0.05%, 但它是致脑炎抗原决定簇之一且具有高度免疫原性^[8]. 用 MOG 或其多肽片段免

疫大鼠或小鼠能够逼真地再现缓解复发、原发进展、继发进展等各种类型 MS 的临床病程^[9], 所以近年来用 MOG 诱导的 EAE 逐渐成为国际上研究 MS 的主要动物模型。MOG₃₅₋₅₅ 诱导 C57BL/6 小鼠建立的模型是一种急性起病、慢性迁延的 EAE 模型, 具有发病率高、抗原结构明确、用量较小、动物来源方便、操作简便等优点。

已有一些研究表明, 使用 MBP 或 PLP 诱导 EAE 的 SJL 小鼠中, 雌性小鼠的易感性和疾病的严重程度高于雄性小鼠^[10-13]。而使用 MBP 诱导 EAE 的 Lewis 大鼠实验中, 雄性小鼠呈现出更严重和更长时间的疾病症状^[14]。在用 MOG 免疫 DA 大鼠诱发的 EAE 中, 两性的易感性没有明显区别, 但病理却发现雌鼠的炎症反应较雄鼠明显^[15]。这些研究都表明, 大多数 EAE 模型中存在着性别差异的影响。然而 MOG₃₃₋₃₅ 诱导 C57BL/6 小鼠的 EAE 模型作为常用的 EAE 小鼠模型是否存在着性别差异的影响尚不清楚。

在本实验中发现, 采用相同年龄的 C57BL/6 雌、雄小鼠经过 MOG₃₃₋₃₅ 免疫后, 通过观察疾病小鼠并对其连续评分发现, 雄鼠的疾病评分显著高于雌鼠, 同时我们在实验中观察到雄鼠的体重明显重于雌鼠, 且具有显著性差异。为了分析同年龄雌、雄小鼠 EAE 发病的不同是由于性别的因素, 还是体重的因素, 或者是两者所影响? 我们分析了同性别两组小鼠, 在体重具有显著性差异的情况下, 其疾病评分并没有显著不同。因此同年龄雌、雄小鼠 EAE 发病的不同主要还是受其性别的影响。

判断 EAE 发病症状的严重程度除了疾病评分外, 另一个重要指标主要是对病灶部位脊髓进行切片及染色, 观察细胞浸润程度以及脱髓鞘的程度。我们观察到雄鼠脊髓白质区域中的炎性浸润细胞显著多于雌性小鼠, 并且雄鼠脱髓鞘区域显著大于雌鼠。这些结果均表明雄性小鼠在 EAE 发病中更为显著, 进一步支持了评分的结果。

CD4⁺ T 细胞及其亚群 T_H1 和 T_H17 是 EAE 致病的重要细胞类群, 因此分析病灶部位的免疫细胞分型是判断 EAE 严重与否的重要依据之一, 并且通过免疫标记结合流式细胞术分析, 可以对浸润细胞的数量进行精确定量。因此我们针对中枢病灶部位的浸润细胞染色分析发现, EAE 雄性小鼠中浸润的 CD4⁺ T 细胞数量显著多于雌性小鼠, 且其亚群 T_H1 和 T_H17 细胞数量也显著高于雌性小鼠。

这些都表明 C57BL/6 小鼠在 EAE 疾病诱导中雌、雄小鼠致病的细胞群之间存在着显著性差异, 同时发现雄性小鼠发病更强。

在实验中, 我们观察到 C57BL/6 雄鼠中浸润中枢神经系统的 CD4⁺ T 细胞及其亚群 T_H1、T_H17 细胞的数量明显多于雌鼠, 这是否有可能是由于细胞活力的差别造成, 我们进一步分析了雌雄小鼠 T_H1、T_H17 细胞的活力, 结果表明 T_H1、T_H17 细胞的活力在不同性别的小鼠之间并没有相关性差异 (数据未显示)。

针对实验结果对应的临床统计依据, 我们查阅了相关的文献, 早先的一些报道中已经表明 MS 病人中, 男性较女性患者的身体残疾率和死亡率更高^[16-17], 另外也有研究表明男性患者的认知功能障碍严重于女性患者^[18-20], 这些文献都表明 MS 发病中存在着性别差异, 和本文的研究结果相一致。

综上所述, 本实验研究证实 C57BL/6 雌雄小鼠均能够很好地建立 MOG₃₃₋₃₅ 诱导的 EAE 模型, 雄性小鼠发病更强。然而在大多数的实验过程中, 研究者较多选择了 C57BL/6 雌鼠来建立 MOG₃₃₋₃₅ 诱导的 EAE 模型, 这可能与实验中观察到雄鼠个体之间易发生打架, 不易饲养, 易对实验结果有较大的影响有关。再者在 MS 病人中, 女性患者比男性患者多, 用雌性小鼠建立模型能够更接近于 MS 疾病的研究。这个由 MOG₃₃₋₃₅ 诱导的 C57BL/6 小鼠 EAE 模型, 希望能够对 MS 动物模型的选择提供新的思路, 从而更加全面地研究 MS。

参 考 文 献

- [1] Linnington C, Webb M, Woodhams P L. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol*, 1984, **6**(6): 387-396
- [2] Weinstein Y, Ran S, Segal S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol*, 1984, **132**(2): 656-661
- [3] Willenborg D O, Sjollem P, Danta G. Immunoregulation of passively induced allergic encephalomyelitis. *J Immunol*, 1986, **136**(5): 1676-1679
- [4] Birk K, Ford C, Smeltzer S, *et al*. The clinical course of multiple sclerosis during pregnancy and the puerperium. *Arch Neurol*, 1990, **47**(7): 738-742
- [5] Beeson P B. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med*, 1994, **96**(5): 457-462
- [6] Cua D J, Hinton D R, Stohlman S A. Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-

- resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J Immunol*, 1995, **155**(8): 4052–4059
- [7] Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, 1996, **85**(3): 299–302
- [8] Voskuhl R R, Pritchekian-Halabi H, MacKenzie-Graham A, *et al.* Gender differences in autoimmune demyelination in the mouse: implications for multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 1996, **39**(6): 724–733
- [9] Bernard C C, Johns T G, Slavin A, *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med (Berl)*, 1997, **75**(2): 77–88
- [10] Bebo B F, Schuster Jr. J C, Vandenbark A A, *et al.* Gender differences in experimental autoimmune encephalomyelitis develop during the induction of the immune response to encephalitogenic peptides. *J Neurosci Res*, 1998, **52**(4): 420–426
- [11] Confavreux C, Hutchinson M, Hours M M, *et al.* Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group N Engl J Med*, 1998, **339**(5): 285–291
- [12] Storch M K, Stefferl A, Brehm U, *et al.* Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol*, 1998, **8**(4): 681–694
- [13] Whitacre C C, Reingold S C, O'Looney P A. A gender gap in autoimmunity. *Science*, 1999, **283**(5406): 1277–1278
- [14] Sakuma H, Kohyama K, Park I K, *et al.* Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW.1AV1 rats. *Brain*, 2004, **127**(Pt 10): 2201–2213
- [15] Tomassini V, De Giglio L, Reindl M, *et al.* Anti-myelin antibodies predict the clinical outcome after a first episode suggestive of MS. *Mult Scler*, 2007, **13**(9): 1086–1094
- [16] Hyllested K. Lethality, duration, and mortality of disseminated sclerosis in Denmark. *Acta Psychiatr Scand*, 1961, **36**: 553–564
- [17] McAlpine D. The benign form of multiple sclerosis. A study based on 241 cases seen within three years of onset and followed up until the tenth year or more of the disease. *Brain*, 1961, **84**: 186–203
- [18] Beatty W W, Goodkin D E, Hertsgaard D, *et al.* Clinical and demographic predictors of cognitive performance in multiple sclerosis. Do diagnostic type, disease duration, and disability matter?. *Arch Neurol*, 1990, **47**(3): 305–308
- [19] Beatty W W, Paul R H, Wilbanks S L, *et al.* Identifying multiple sclerosis patients with mild or global cognitive impairment using the Screening Examination for Cognitive Impairment (SEFCI). *Neurology*, 1995, **45**(4): 718–723
- [20] Beatty W W, Aupperle R L. Sex differences in cognitive impairment in multiple sclerosis. *Clin Neuropsychol*, 2002, **16**(4): 472–480

Gender Influence on The Pathogenesis of EAE Induced by MOG in C57BL/6 Mice*

WANG Ting-Ting, DU Chang-Sheng**

(Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, Laboratory of Receptor-based Bio-medicine,
School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract Multiple sclerosis (MS), an autoimmune disease of the CNS with prominent demyelination and axonal degeneration, is more prevalent in women than men. EAE is a widely used animal model of MS for preclinical therapy development. In this report, a 29 days observation of the EAE model induced by MOG₃₃₋₃₅ in C57BL/6 mice was performed. From the clinical course, we found no significant difference between male and female mice in the incidence and onset time, but males had a more serious disease score than that in females. And histological examination of spinal cord was performed at day 21 post-immunization. Compared with male mice, female mice had a dramatic increase of leukocyte infiltration in the spinal cord. Luxol fast blue staining also revealed enhanced demyelination in male mice compared to female mice. The CNS leukocyte infiltration was also quantified by flow cytometry analysis at day 19 post-immunization. The results again confirmed that the CD4⁺ T cells accumulated in the CNS of EAE mice were increased in male mice. We further quantified the number of T_H-1 and T_H-17 cells in the CNS infiltrates and found that the absolute number of both T_H-17 and T_H-1 cells were significantly increased in male mice. Taken together, these data indicate that sex difference exists in EAE induced by MOG₃₃₋₃₅ in C57BL/6 mice, and this will provided useful indications for further studies on the selection of animals in the EAE model.

Key words C57BL/6 mice, EAE, sex differences

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00606

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31000399, 31171348) and The National Basic Research Program of China (2012CB910404).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-65986852, E-mail: duchangsheng@gmail.com

Received: December 21, 2012 Accepted: April 24, 2013