

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

鼯鼠感染廣東住血線蟲造成神經脫髓鞘之致病機轉 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2320-B-040-004-
執行期間：96年08月01日至97年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：賴世展

計畫參與人員：此計畫無其他參與人員：

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 97年10月23日

Pathogenesis of demyelination in mice caused by *Angiostrongylus cantonensis*

鼯鼠感染廣東住血線蟲造成神經脫髓鞘之致病機轉

計劃編號：NSC 93-2314-B-040-004

執行期限：2007-08-01~2008-07-31

主持人：賴世展

執行機構及單位名稱：中山醫學大學寄生蟲學科

中文摘要

廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*)引起中樞神經系統嚴重感染，包括慢性脫髓鞘(demyelination)疾病。關於髓鞘疾病指標性酵素 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP)在生物學所扮演的角色需要被研究。本研究以 BALB/c 鼯鼠感染廣東住血線蟲誘發脫髓鞘的腦組織和腦脊髓液中 CNP 的表現量，闡明廣東住血線蟲誘發脫髓鞘在 6 個不同的時間點 CNP 的變化，同時以定量反轉錄酶聚合酶鏈反應(reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction , RT-qPCR)和利用西方轉漬法(Western blotting analysis)測定 CNP 的含量。結果顯示在嚴重階段的腦膜腦炎或腦膜炎中 CNP 在鼯鼠腦脊髓液中與控制組相比較

下有顯著向上調節趨勢。CNP 特殊的標號定位到神經膠質細胞的細胞質，這些結果顯示中樞神經系統感染廣東住血線蟲誘發脫髓鞘與 CNP 相關聯。因此推斷從鼯鼠感染廣東住血線蟲誘發脫髓鞘產生 CNP 在腦脊髓液中的量顯示中樞神經髓鞘被破壞，因此在腦脊髓液的嗜伊紅性腦膜炎可以測定 CNP 而應用在臨床上的管理。

關鍵詞：廣東住血線蟲；腦膜腦炎；腦膜炎；脫髓鞘；CNP

英文摘要

Angiostrongylus cantonensis causes severe central nervous system (CNS) infection, including a chronic demyelinating disease. The biological role of 2', 3'-cyclic

nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNP) in myelin-related disease requires investigation. We investigated the level of CNP in the brain tissues and cerebrospinal fluid (CSF) of mice with demyelination caused by *A. cantonensis*. To elucidate the changes of CNP on demyelination caused by *A. cantonensis* were taken at six different time points, at 5–25 days post-inoculation. CNP was investigated by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction and Western blotting. CNP in mouse CSF was significantly upregulated in the severe phase of meningoencephalitis or meningitis as compared with controls. Specific labeling was localized to the cytoplasmic membrane of glial cells. These results showed that CNP was associated with *A. cantonensis*-induced demyelination of CNS. We conclude that CNP in the CSF from mice with angiostrongyliasis demyelination is an indicator of destruction of myelin in the CNS, and the measurement of CNP in the CSF of eosinophilic meningitis may be useful in clinical

management.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*; meningoencephalitis; meningitis; demyelination; CNP

前言

廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*) 會移行至宿主腦部(Mackerras and Sandars, 1954; Jindrak, 1968)。感染非適當宿主之廣東住血線蟲在腦內移行並造成機械性組織損傷引起神經的破壞 (Yoshimura *et al.*, 1994)和嗜伊紅性球神經毒蛋白分泌(Durack *et al.*, 1979; Fredens *et al.*, 1982)。此寄生蟲嚴重感染中樞神經系統並導致嗜伊紅性腦膜炎(Hsu *et al.*, 1990)或腦膜腦炎(Gardiner *et al.*, 1990)。

酵素2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) (EC 3.1.4.37)，又稱為CNP或CNPase，是早期合成寡樹突膠細胞成長的特殊髓鞘蛋白質 (Sheedlo *et al.*, 1984; Vogel and Thompson, 1988)。所有種類的哺乳動物CNP呈現兩種

形式變化的接合蛋白，在老鼠腦內包含三種變化的接合形式(Monoh *et al.*, 1989; Kurihara *et al.*, 1992)。髓鞘生源論中，CNP 佔總髓鞘蛋白質池4%的蛋白量也是合成髓鞘的第一個特殊蛋白質。而類固醇可調節內部相關髓鞘膜的摺疊(Braun *et al.*, 1990)。因此，CNP表現出與肌動蛋白細胞骨架結合的親和力，且推測CNP可以調節在寡樹突細胞胞漿膜間親密的交互作用(Braun *et al.*, 1990; De Angelis and Braun, 1996)。

生理的角色中 CNPase 還未被清楚瞭解，然而 CNP 量的表現反射出脫髓鞘和髓鞘降解的比率(Banik *et al.*, 1979)。本研究要觀察受到廣東住血線蟲感染後引起中樞神經慢性發炎誘發髓鞘酵素蛋白記號 CNP 參與其致病機轉的表現。

材料與方法

一、實驗動物

自國家科學委員會動物中心購買五週齡雄性 BALB/c 品系鼯鼠。將鼯鼠

飼育在 12 小時光照和 12 小時黑暗的光週期環境，控制室溫在 25°C，相對溼度 55%，提供動物蒸餾水及標準營養成份飼料並且在實驗的感染之前保留在我們的實驗室超過 1 個星期。研究所所有過程包含動物和他們的照顧是依據中山醫學大學委員批准實驗動物準則為標準。

二、廣東住血線蟲第三期幼蟲(L₃)之收集

本研究所用非洲大蝸牛在台中縣霧峰試驗農場飼育並感染廣東住血線蟲，將非洲大蝸牛外殼以菜刀碾碎去除，剁碎取其組織，置於組織均質器絞碎，經加入比例 1:30 (組織:消化液)的人工胃蛋白酵素消化液(pepsin, Sigma, USA)消化，置於 37°C 之恆溫箱中放入磁性攪拌子，均勻攪拌消化 2 小時。利用雙層紗布濾去雜質，加入生理食鹽水稀釋並靜置，每隔 30 分鐘倒去約一半的上清液，再加入生理食鹽水稀釋靜置，重複至完全清澈為止。取滴管吸取下層之沈澱物，放

入玻璃皿中，置於解剖顯微鏡下，觀察並吸取L₃幼蟲。以每 50 隻L₃幼蟲為一單位，置於玻璃培養皿中，收集幼蟲準備進一步感染動物。

三、鼯鼠感染試驗

BALB/c 雄性鼯鼠在感染前 12 小時均給予禁水、禁食，將鼯鼠共 120 隻隨機分為 6 組，每組 20 隻，分別為未感染對照組(Control)、感染廣東住血線蟲 5 天、10 天、15 天、20 天及 25 天。除對照組外，其餘組別每隻鼯鼠以口胃管分別灌入 50 隻第三期幼蟲，於感染後 12 小時再恢復其供水、供食。對照組則給予相同水量。

四、組織學技術(Histology)和 **Luxol fast blue-cresyl echt violet**

將組織固定於 formol-alcohol (formaline : acetic acid : 70% alcohol=1 : 1 : 20) 中 24 小時，以序列酒精脫水(dehydration with ethanol 75%, 95%, 100%)，再以二甲苯(xylene)置換酒精，用石蠟浸潤組織(滲透)，先在 paraffin : xylene = 1 : 1 之比例下

作用 24 小時，接著以 paraffin : xylene = 2 : 1 之比例下作用 24 小時，最後以 pure paraffin 作用 24 小時，聚合前置換新的石蠟並將完全浸潤的組織置於包埋盒中，加入融化的石蠟，冷卻後除去模子，在 55 °C 聚合石蠟。連續切片，厚度 10 μm，置於 38 °C 水中使其完全伸展，將切片置於沾附蛋白與甘油比例為 1:1 之玻片中央，置於 38 °C 之烘乾台上烘乾，將組織切片經二甲苯脫蠟 5 分鐘、100%酒精作用 1 分鐘、95%酒精作用 1 分鐘、75%酒精作用 1 分鐘、純水清洗 3 分鐘。切片染 Luxol fast blue-cresyl echt violet (Sigma, USA)，在染色完成之玻片上滴上 mounting media，待微乾後，蓋上蓋玻片，置於螢光光學顯微鏡下觀察並拍照。

五、定量反轉錄酶聚合酶鏈反應(reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction, RT-qPCR)

以 TRIZOL reagent 萃取鼯鼠腦

部總量核糖核酸(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 質量的核糖核酸被 2100 Bioanalyzer分析(Agilent, Palo Alto, CA, USA), 在 42°C時根據標準的流程的供給者MultiScribe 逆轉錄酶和oligo d (T)16primer 核糖核酸樣品在反轉錄為 30 分鐘 (Applied Biosystems), 使用Primer 表現軟體(Applied Biosystems) CNP Primer序列的設計由Mission Biotech company擔任(Taipei, Taiwan), CNP forward primer: 5'-CTCCAGGTGTGCTGCACTGT-3'; reverse primer: 5'-CCTCCTGCTGGGCGTATTC-3' , 進行Real-time PCR, 取 1 μ l 之 cDNA(約 50ng RNA), 加 1 μ l 之LC Fast Start DNA Master SYBR Green Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)及 3-4mM MgCl₂和 0.5mM, 最後體積為 10 μ l。PCR 條件為 95°C, 5 秒, Anneal 溫度依primer 而異, 時間為 5 秒, 最後

72°C (temperature ramp was 20 °C/sec), 8 秒, 進行 45 cycles。擴增產物的專一性由Melting curve 來判定。以 β -actin當作internal control 來校正相對的mRNA concentrations, 為了要保證實驗的準確性及再現性, 在不同的時間跑重覆的實驗, Real-time PCR 之資料利用LightCycler Software Version3.5 軟體內之second derivative maximum method 來訂定Ct, 最後再用 $\Delta\Delta C_t$ 方法來計算基因之表現量 $2^{-\Delta C_t}$, $\Delta C_t = C_{T \text{ target}} \text{ gene} - C_{T \beta\text{-actin}}$ 。

六、西方點墨法(Western blotting)

將鼯鼠腦組織溶解於cell lysis buffer(含有 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.3 M sucrose, 50 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 2mM phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF) 及 10 μ g/ml leupeptin)中進行均質, 此

均質液在 4 °C，15000 rpm，離心 10 分鐘，取上清液並進行定量。將萃取出之新鮮蛋白質，加入等量之sample buffer(H₂O，0.5M Tris，Glycerol，10% SDS，β-mercaptoethanol，10% BPB)再填注到泡製之SDS電泳膠片，進行電泳。電泳結束後，將膠片上之蛋白點轉移至 polyvinylidene fluoride(PVDF)。加入一級抗體 (Anti-β-Actin、Anti-CNP)在室溫下反應 1 小時後，洗去多餘一級抗體再加入對應之二級抗體 (HRP-conjugated secondary antibody) 於室溫下反應 40 分鐘，反應完畢後以 enhanced chemiluminescence(ECL)偵測蛋白質及其表現量。

七、組織免疫技術 (Immunohistochemistry, IHC)

將鼯鼠腦部組織切片經 100% xylene, 100% ethanol, 95% ethanol, 75% ethanol, dd-H₂O脫蠟，以PBS清洗後置於 3% H₂O₂之甲醇中反應 (去除內生性之peroxidase)，在trypsin

37 °C反應 10 分鐘後，以PBS清洗 3 分鐘 3 次，接著用 3% BSA 在 37 °C 反應 1 小時 (block非特定的結合位置)，以PBS清洗 3 分鐘 3 次，再來加入一級抗體 (normal serum 和 anti- CNP)，在 37 °C 反應 1 小時，以 PBS清洗 3 分鐘 3 次，隨後以二級抗體 (HRP-conjugated anti-mouse antibody)在 37 °C 反應 1 小時，以PBS清洗 3 分鐘 3 次，加入 HRP-streptavidin solution進行反應，以PBS清洗 3 分鐘 3 次，再利用DAB呈色，以dd-H₂O清洗 3 分鐘，接著加入hematoxylin反應，以PBS清洗 3 分鐘，再經dd-H₂O 清洗 3 分鐘 2 次，最後以順序 75% ethanol, 95% ethanol, 100% ethanol脫水，再用 100% xylene clearing，以mounting media封片，置於光學顯微鏡下觀察並拍照。

八、統計分析

不同組別所得檢測結果，以

Kruskal-Wallis 進行統計分析，以 Dunn's multiple comparison 做多重比較。結果皆以平均值±標準差(means±SD)表示，* $P < 0.05$ 表示有統計上顯著的意義。

結果

Luxol fast blue–cresyl echt violet staining

感染組鼯鼠腦部組織切片進行 Luxol fast blue–cresyl echt violet 染色，對照組顯示沒有藍色的染色(圖一，a)。相反，被感染的老鼠腦顯示強的藍色的染色在大腦和小腦的髓質(圖一，b)。

CNP 在鼯鼠腦內信使核糖核酸表現動力學的研究

定量反轉錄酶聚合酶鏈反應使用於定量 CNP 基因表現，在6個不同的時間點，從5到25天。相對的變化中與看家基因(β -肌動蛋白)相比較計算 CNP 基因表現。在20和25天信使核糖核酸表現 CNP 在腦有顯著向上調節($P < 0.05$) (圖二)。

CNP 在鼯鼠腦內蛋白質表現動力學的研究

腦部組織萃取液以西方墨點法使用特

殊的單株抗體及等量 β -肌動蛋白作為對照並加以量化圖，顯示 CNP 蛋白質反應表現於感染廣東住血線蟲後在不同時間點表現量一致，顯示從感染後開始隨著時間點的增加並未改變(圖三)。

CNP 在鼯鼠腦脊髓液內蛋白質表現動力學的研究

腦脊髓液萃取液以西方墨點法使用特殊的單株抗體及等量 β -肌動蛋白作為對照並加以量化圖，顯示 CNP 蛋白質反應表現於感染廣東住血線蟲後在不同時間點蛋白質表現量(圖四，a)。而表現量隨著時間點的增加有上升的趨勢，第20及25天最為顯著(* $P < 0.05$ ；圖四，b)。

組織免疫染色觀察脫髓鞘蛋白質在鼯鼠腦部的分佈

感染組鼯鼠腦部組織切片進行組織免疫染色，CNP 無偵測到陽性反應在神經膠細胞的細胞質膜相較於加入正常血清的在控制之老鼠(圖五，a)，在感染廣東住血線蟲後的鼯鼠加入 CNP 抗體後觀察到在神經膠細胞的細胞質膜有強的陽性免疫反應(圖

五，b)。

討論

腦部的發展CNP是主要的髓鞘相關蛋白質(Sprinkle *et al.*, 1978)，在脫髓鞘和其他的神經學疾病的病人腦脊髓液中CNP的活性會增加(Banik *et al.*, 1979)。這研究，證明感染廣東住血線蟲後的鼯鼠造成脫髓鞘期間CNP改變的表現。鼯鼠的腦使用Luxol fast blue–cresyl echt violet 染色顯示脫髓鞘，依據我們的知識，從老鼠感染寄生蟲的腦膜腦炎或腦膜炎，CNP在中樞神經的組織和腦脊髓液的表現是最初也是最廣泛的研究。本研究發現顯示獨特模式CNP表現和嗜伊紅性腦膜炎有著相互關係，可能反射這酵素包含在廣東住血線蟲引誘髓鞘脫失中。雖然CNP的生理機能仍然未知，但在廣東住血線蟲腦膜炎發展中CNP蛋白量的增加及CNP表現量的出現反射出脫髓鞘和髓鞘降解的比率(Banik *et al.*, 1979)。先前的研究顯示CNP活性在人的腦脊髓液中會表現，在正常腦脊髓液中

的活性是非常低(Banik *et al.*, 1979; Eickhoff and Heipertz, 1979)。CNP非常穩定且便於測定(Banik *et al.*, 1979)，目前的研究顯示，從感染嗜伊紅性腦膜炎或腦膜炎的鼯鼠與控制組腦脊髓液比較CNP有意義的增強表現被發現，在20和25天CNP信使核糖核酸腦組織顯示出有意義的增加表現。然而，在鼯鼠腦組織中CNP蛋白質量保持未改變，而在腦組織中沒有變化的CNP蛋白質量可能的原因是；一、腦組織勻漿中低的總比例；二、對於髓鞘受損後CNP釋放到腦脊髓液中。由廣東住血線蟲引起嗜伊紅性腦膜炎或腦膜炎在腦脊髓液中可偵測CNP蛋白質量有意義的上升，因此可作為髓鞘脫失(或髓鞘重塑)的開始記號，因此CNP可考慮很可能扮演形成的髓鞘的角色。

中樞神經髓鞘的損傷之一，最常見的原因是初級發炎攻擊寡樹突膠質細胞的髓鞘造成髓鞘損失而引起脫髓鞘疾病，在最早階段的軸突ensheathment CNP和寡樹突膠質細胞質膜相關聯(Trapp *et al.*, 1988)。

神經膠質細胞提供支持和保護為神經元。中樞神經有四種支持細胞星形狀細胞、微小膠細胞、ependymoglia和寡樹突膠質細胞(Hatton, 2002)。中樞神經髓鞘細胞產生證實了CNPase基因的表現，也證實CNPase合成被貯藏在寡樹突膠質細胞(Vogel *et al.*, 1988)。這項研究，CNP被定位在神經膠質細胞的細胞質膜中。中樞神經內部髓鞘細胞的形成，它被提議與神經膠質細胞相關，且在鼯鼠感染廣東住血線蟲腦膜腦炎也意味著有深長地影響。

因此，本研究推斷 CNP 在腦脊髓液中的表現，可指出感染廣東住血線蟲鼯鼠於中樞神經內部髓鞘被破壞和測定 CNP 在腦脊髓液中表現量，可作為臨床上有用的管理。

參考文獻

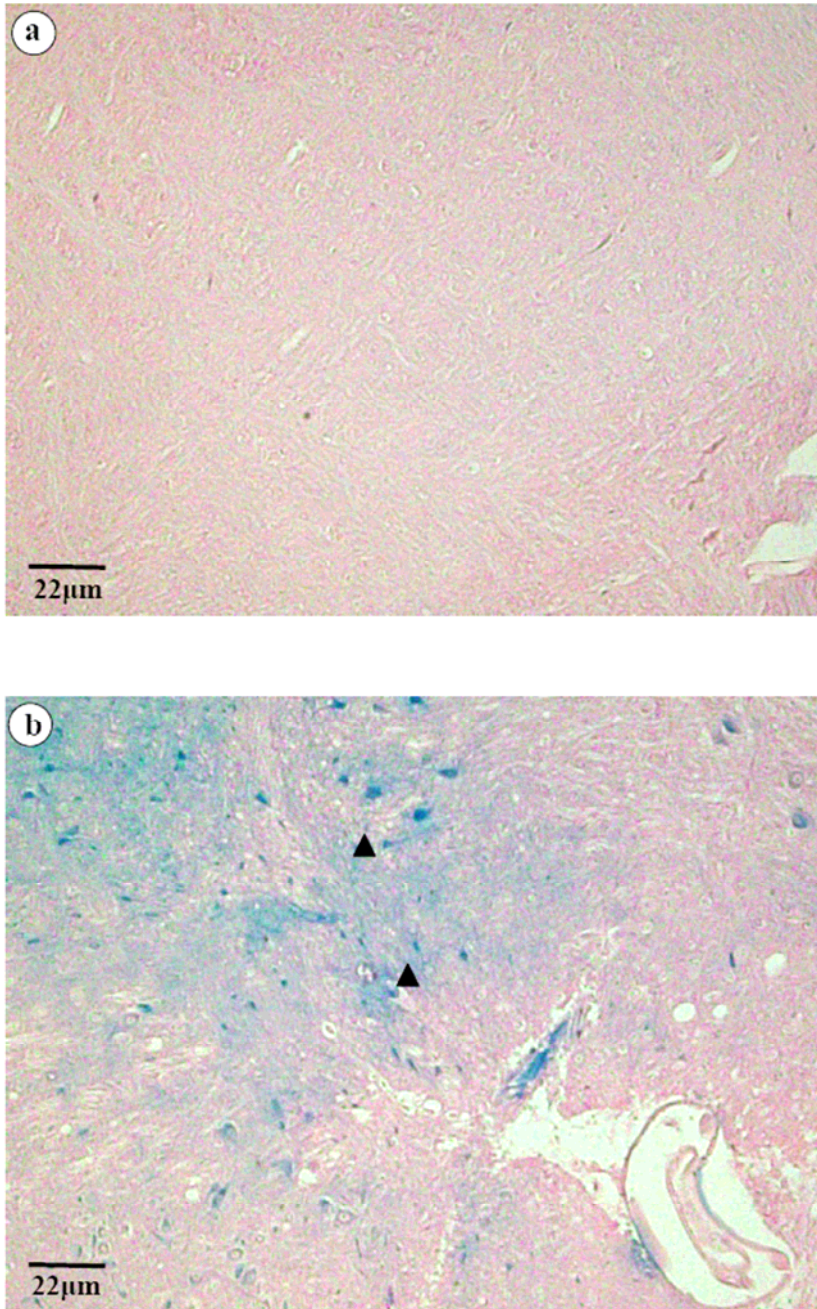
- Banik, N.L., Mauldin, L.B. & Hogan, E.L. (1979) Activity of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in human cerebrospinal fluid. *Annals of Neurology* **5**, 539-541.
- Braun, P.E., Bambrick, L.L., Edwards, A.M. & Bernier, L. (1990) 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase has characteristics of cytoskeletal proteins. A hypothesis for its function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **605**, 55-65.
- Chen, K.M., Lee, H.H., Lu, K.H., Tseng, Y.K., Hsu, L.S., Chou, H.L. & Lai, S.C. (2004) Association of matrix metalloproteinase-9 and Purkinje cell degeneration in mouse cerebellum caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *International Journal for Parasitology* **34**, 1147-1156.
- De Angelis, D.A. & Braun, P.E. (1996) 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase binds to actin-based cytoskeletal elements in an isoprenylation-independent manner. *Journal of Neurochemistry* **67**, 943-951.
- Durack, D.T., Sumi, S.M. & Klebanoff, S.J. (1979) Neurotoxicity of human eosinophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

- of America* **76**, 1443-1447.
- Eickhoff, K. & Heipertz, R. (1979) The activity of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in human cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* **92**, 303-305.
- Fredens, K., Dahl, R. & Venge, P. (1982) The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **70**, 361-366.
- Gardiner, C.H., Wells, S., Gutter, A.E., Fitzgerald, L., Anderson, D.C., Harris, R.K. & Nichols, D.K. (1990) Eosinophilic meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* as the cause of death in captive non-human primates. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **42**, 70-74.
- Hatton, G.I. (2002) Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. *Advances in Physiology Education* **26**, 225-237.
- Hsu, W.Y., Chen, J.Y., Chien, C.T., Chi, C.S., & Han, N.T. (1990) Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **9**, 443-445.
- Jindrak, K. (1968) Early migration and pathogenicity of *Angiostrongylus cantonensis* in laboratory rats. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **62**, 506-517.
- Kurihara, T., Tohyama, Y., Yamamoto, J., Kanamatsu, T., Watanabe, R. & Kitajima, S. (1992) Origin of brain 2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase doublet. *Neuroscience Letters* **138**, 49-52.
- Mackerras, M.J. & Sanders, D.F. (1954) Lifehistory of the rat lungworm and its migration through the brain of its host. *Nature* **173**, 956-957.
- Monoh, K., Kurihara, T., Sakimura, K. & Takahashi, Y. (1989) Structure of mouse 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase gene. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications* **165**, 1213-1220.
- Parsons, J.C. & Grieve, R.B. (1990) Effect of egg dosage and host genotype on liver trapping in murine larval toxocariasis. *The Journal of Parasitology* **76**, 53-58.
- Sheedlo, H.J., Doran, J.E. & Sprinkle, T.J. (1984) An investigation of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (EC 3.1.4.37, CNP) in peripheral blood elements and CNS myelin. *Life Sciences* **34**, 1731-1737.
- Sprinkle, T.J., Zaruba, M.E. & McKhann, G.M. (1978) Activity of 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase in regions of rat brain during development: quantitative relationship to myelin basic protein. *Journal of Neurochemistry* **30**, 309-314.
- Trapp, B.D., Bernier, L., Andrews, S.B. & Colman, D.R. (1988) Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. *Journal of Neurochemistry* **51**, 859-868.
- Vogel, U.S., Reynolds, R., Thompson, R.J. & Wilkin, G.P. (1988) Expression of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase gene and immunoreactive protein in oligodendrocytes as revealed by in situ hybridization and immunofluorescence. *Glia* **1**, 184-190.
- Vogel, U.S. & Thompson, R.J. (1988) Molecular structure, localization, and possible functions of the myelin-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Journal of Neurochemistry* **50**, 1667-1677.
- Yoshimura, K., Sugaya, H. & Ishida, K. (1994) The role of eosinophils in *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Parasitology Today* **10**, 231-233.

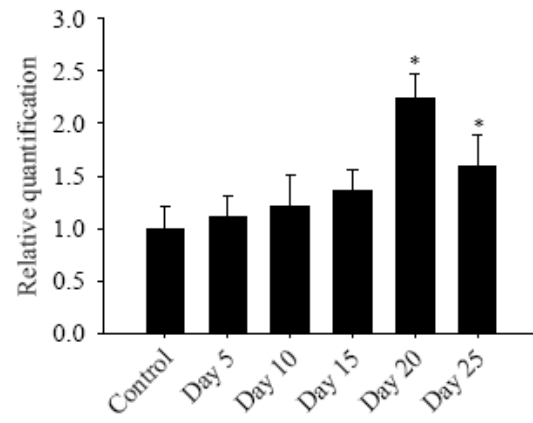
圖表

圖一、



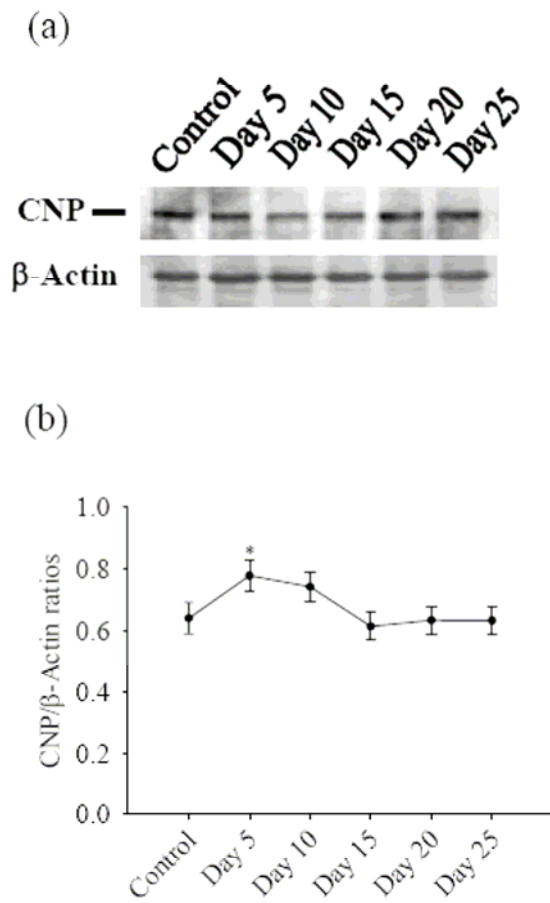
圖一、Luxol fast blue-cresyl echt violet 染色。(a)對照組顯示沒有藍色的染色。(b) 脫髓鞘的區域顯示藍色的染色。

圖二、



圖二、鼯鼠腦部組織中 CNP 信使核糖核酸表現，在 20 和 25 天 CNP 信使核糖核酸表現在腦有顯著上升(* $P < 0.05$)。

圖三、

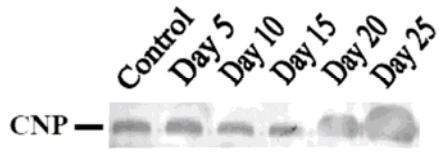


圖三、鼯鼠腦部組織CNP蛋白質的表現。(a)CNP蛋白質量在腦組織未改變。(b)

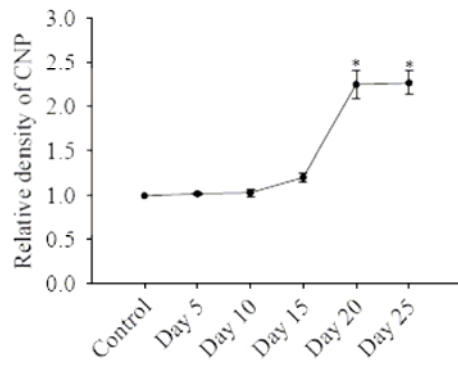
電腦-輔助影像密度測定法定量分析CNP密度。

圖四、

(a)

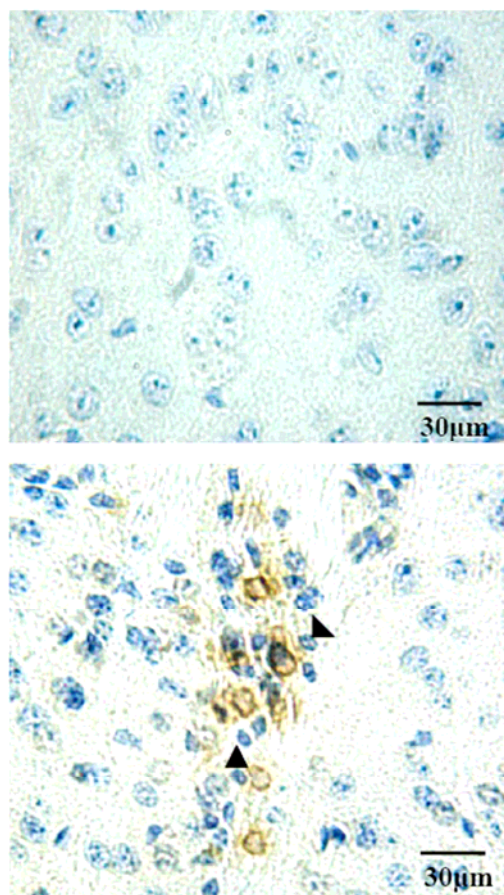


(b)



圖四、髓鼠腦脊髓液中 CNP 蛋白質的表現。(a)在脊髓液 CNP 的量到達高的強度在 20 和 25 天。(b)電腦-輔助影像密度測定法定量分析 CNP 密度，在 20 和 25 天 CNP 密度表現在腦脊髓液中有顯著上升(* $P < 0.05$)。

圖五、



圖五、組織免疫染色觀察 CNP 在感染 20 天組鼯鼠腦部的分佈。(a)正常血清在神經膠質細胞 CNP 沒有被偵測到。(b)在細胞質膜的神經膠質細胞有強的陽性信號的 CNP 被偵測到。黑色箭頭為陽性的免疫反應。