

EAE 小鼠中枢神经系统中 CD11b mRNA 的变化 及益肾达络饮对其的影响

吴彦青¹, 高颖^{2*}, 朱陵群², 娄丽霞², 张冬梅²

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150;

2. 北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室, 北京 100700)

[摘要] **目的:**观察实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠不同发病时期脑和脊髓组织中 CD11b mRNA 的表达变化,明确益肾达络饮的干预机制。**方法:**采用 MOG₃₅₋₅₅ 抗原免疫 C57BL/6 小鼠诱导 EAE 模型,随机选取分为正常组、佐剂组、模型组、醋酸泼尼松 3.9 mg·kg⁻¹组、益肾达络饮 20 g·kg⁻¹组,在造模后第 7 天开始灌胃给药,直到相应时间点进行取材。采用实时荧光定量 PCR 测定免疫后 7 d(发病前期)、14 d(发病初期)、24 d(发病急性期)、40 d(慢性持续期)4 个不同时间点 EAE 小鼠脑和脊髓组织中 CD11b mRNA 表达的变化。**结果:**与正常组比较,在免疫后 14、24、40d,模型组 EAE 小鼠大脑中 CD11b mRNA 表达分别升高至 2.39 ± 1.09, 3.20 ± 1.14, 1.58 ± 0.36 ($P < 0.05$)。与模型组比较,在免疫后 40 d 激素组和益肾达络饮组 EAE 小鼠大脑中 CD11b mRNA 的表达水平明显降低 ($P < 0.05$);与正常组比较,激素组、益肾达络饮组在免疫后 40 d CD11b mRNA 在 EAE 小鼠大脑中表达水平无显著改变;在免疫后 14 d 激素组 EAE 小鼠脊髓中 CD11b mRNA 的表达水平明显降低。**结论:**单核细胞是实验性自身免疫性脑脊髓炎的潜在调节细胞;中药复方益肾达络饮干预 EAE 的作用机制与中枢神经系统单核细胞黏附分子 CD11b 的调节密切相关。

[关键词] 多发性硬化;实验性自身免疫性脑脊髓炎;CD11b mRNA;益肾达络饮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0141-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014080141

[收稿日期] 20130404(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072770)

[第一作者] 吴彦青,医学博士,讲师,从事中医药防治脑病的基础与临床研究工作,Tel:022-59596173,E-mail:wyqbs120@163.com

[通讯作者] *高颖,医学博士,教授,从事中医药防治脑病的基础与临床研究工作,Tel:010-84013148,E-mail:gaoying973@126.com

- [5] Wu Jiaying, Pan Zongfu, Wang Zhiqiang, et al. Ginsenoside Rg₁ protection against β -amyloid peptide-induced neuronal apoptosis via estrogen receptor α and glucocorticoid receptor-dependent anti-protein nitration pathway[J]. Neuropharmacology, 2012, 63(3):349.
- [6] 杨秋娅,李晓宇,刘皋林. 人参皂苷 Rb₁ 的药理作用进展研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(15):1233.
- [7] 王宪玲,贾建平. 自发性 2 型糖尿病小鼠发病早期认知功能的研究[J]. 首都医科大学学报, 2007, 28(1):75.
- [8] 陈新梅. 人参皂苷 Rg₁ 鼻腔喷雾剂的药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):219.
- [9] 曲梅花,房春燕,张秀荣,等. 2 型糖尿病与轻度认知障碍[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(8):791.
- [10] 张英强. 张发荣教授治疗糖尿病脑病经验[J]. 四川中医, 2000, 18(11):1.
- [11] Terwel D, Muyliaert D, Dewachter I, et al. Amyloid activates GSK-3 β to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice[J]. Am J Pathol, 2008, 172(3):786.
- [12] 宋志赞,朱成琳,师方园,等. 人参皂苷 Re 体外抗氧化能力及其对血清剥夺神经细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):225.
- [13] Xiu-Yun Songa, Jin-Feng Hub, Shi-Feng Chua, et al. Ginsenoside Rg₁ attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 β /tau signaling pathway and the A β formation prevention in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 710(15):29.

[责任编辑 聂淑琴]

Expression of CD11b mRNA in Central Nervous System and Effect of Yishen Daluo Decoction in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

WU Yan-qing¹, GAO Ying^{2*}, ZHU Ling-qun², LOU Li-xia², ZHANG Dong-mei²

(1. Affiliated Second Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300150, China; 2. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Ministry of Education, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of TCM, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To elucidate the CD11b mRNA expression of brain and spinal cord tissue during the different phase in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice, and to explore the mechanism of Yishen Daluo decoction (YSDL) on EAE. **Method:** C57BL/6 mice were immunized with the MOG₃₅₋₅₅. Mice were divided randomly into normal-group, adjuvant group, EAE-group, prednisone-group, YSDL-group. RT-PCR was used to quantify the gene expression levels of immune/inflammatory cell (the monocyte marker CD11b), accumulated in brain and spinal cord tissue of mice at different time points of EAE including pre-onset (on day 7th), onset (on day 14th), peak (on day 24th) and chronic phase (on day 40th) after immunization. **Result:** Compared with model group, CD11b mRNA levels in the cerebrum were significantly decreased 40 days after immunization in hormone-treated group and YSDL-treated group. CD11b mRNA levels in the spinal cord were significantly decreased 14 days after immunization in hormone-treated group. **Conclusion:** The monocyte is one of potential mediators of EAE. The therapeutic mechanism of YSDL is to mediate the expression of CD11b on the surface of monocyte.

[Key words] multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; CD11b mRNA; Yishen Daluo decoction

实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 和人类的自身免疫性疾病多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 在临床、生化、免疫以及病理改变等诸多方面具有高度相同或相似的特征,因此,EAE 是目前公认的研究 MS 免疫病理学机制以及其实验性治疗的最佳动物模型^[1-3]。目前研究认为,免疫炎性细胞向中枢神经系统 (CNS) 的迁移和浸润是 MS 发病的主要因素^[4-5]。淋巴细胞介导血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 损害继而浸润中枢神经系统是 MS 发病特征之一。研究显示 MS 特征性病理改变为中枢神经系统内散在而多发的脑白质或脊髓中的脱髓鞘病灶血管周围 T 细胞、B 细胞及单核/巨噬细胞浸润,大量非特异性炎性细胞识别髓鞘抗原,EAE 临床症状的出现与大量非特异性白细胞进入 CNS 同时发生^[6-7]。CD11b 是单核细胞表达的细胞黏附分子,CD11b 是黏附分子中白细胞整合素 $\beta 2$ 亚家族的重要成员,CD11b 与其配体 ICAM-1 的结合促使中性粒细胞、单核细胞与内皮细胞的牢固黏附,在过度炎症反应所致的脑功能障碍中发挥关键性的作用^[8-9]。

研究表明^[10],CD11b 在实验性免疫性脑脊髓炎和多发性硬化的发病过程中起着关键作用。目前 MS 中枢神经系统中 CD11b 的动态变化尚不十分清楚,也无理想的针对不同阶段炎症的合理防治措施。

为明确 EAE 发病过程中中枢神经系统炎症程度的动态变化及中药益肾达络饮的作用机制,本部分研究运用荧光定量 RT-PCR,以 β -actin 作为对照,检测不同时间点 CD11b mRNA 在 EAE 小鼠脑和脊髓中的表达变化,为 MS 在发病过程中中枢神经系统炎性聚集提供依据和下一步可能干预的途径。

1 材料

1.1 动物 108 只 8~10 周龄雌性 C57BL/6 小鼠,购自中国医学科学院实验动物研究所,体重 (18.4 ± 0.8) g 许可证号 SCXK (京) 2005-0013。小鼠饲养在中国中医科学院基础研究所二级动物中心饲养室。

1.2 试剂 完全弗氏佐剂 (CFA,美国 Sigma 公司,批号 049K8700); 结核分支杆菌 (H37RA,美国 DIFCO 公司,批号 0172191); 百日咳毒素 (PTX,美国 Sigma 公司,批号 P7208); MOG₃₅₋₅₅ 多肽

[MEVGWYRSPFSRVVHLYNGK,北京赛百盛生物工程公司合成,纯度(HPLC)98.3%];Power Sybr Green PCR Master 试剂(美国ABI公司,批号4367659)。

1.3 药物 益肾达络饮(石菖蒲: 栀子: 熟地黄: 豨莶草为2: 2: 4: 3)饮片购自北京中医药大学东直门医院,常规方法进行浸泡煎煮,收集滤液并文火煎煮浓缩制成生药 2 g·mL⁻¹的水提取物。醋酸泼尼松(天津力生制药股份有限公司,批号 081206),用去离子水配制成 0.39 g·L⁻¹溶液。

2 方法

2.1 EAE 动物模型的建立 采用 MOG₃₅₋₅₅ 抗原免疫 C57BL/6 小鼠:将等体积的 MOG₃₅₋₅₅ 水溶液(每 100 μL 含 MOG₃₅₋₅₅ 200 μg)和完全福氏免疫佐剂(每 100 μL 含结核杆菌 H37RA 500 μg)混合并充分乳化后制成油包水的抗原乳剂。于免疫动物当天记为第 0 天,在模型组、激素组以及中药组每只小鼠背侧脊柱中线两侧分 4 点皮下注射共计 0.2 mL 的 MOG₃₅₋₅₅ 抗原配剂,佐剂组每只小鼠背侧脊柱中线两侧分四点皮下注射共计 0.2 mL 不含 MOG₃₅₋₅₅ 的油

包水乳剂;注射完配剂 30 min 后,佐剂组、模型组、激素组、中药组每只小鼠 ip 0.1 mL(含 400 ng PTX)百日咳毒素溶液,48 h 后再次 ip 0.1 mL PTX 溶液;正常组小鼠在免疫诱导时只注射生理盐水,不进行任何药物干预。

2.2 动物分组与给药 实验按照 4 个取材时间点,即造模后 7 d(发病前期)、14 d(发病初期)、24 d(发病急性期)和 40 d(慢性期)。实验前将所有 C57BL/6 小鼠随机分组:正常组(24 只)、佐剂组(24 只)、模型组(24 只)、激素组(18 只)、中药组(18 只),共 5 组。免疫后第 7 d 起,中药组小鼠每天给予小鼠灌服 10 mL·kg⁻¹(生药 2 g·mL⁻¹)益肾达络饮药液,激素组小鼠每天给予小鼠灌服 10 mL·kg⁻¹(0.39 g·L⁻¹)醋酸泼尼松药液,正常组、佐剂组、模型组小鼠在免疫后 7 d 起每天给予小鼠灌服 10 mL·kg⁻¹生理盐水,直至相应时间点取材。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 CD11b mRNA 的表达
2.3.1 引物 CD11b 和 β-actin 引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行合成,具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Gene	5' Primer(5'-3')	3' Primer(5'-3')
CD11b	ATGGAGCATCAATAGCCAGCCT	AGCTGTGAAGAACCTCTGAGCA
β-actin	AGGCCAACCGTGAAGATG	TGGCGTGAGGAGAGCATAG

2.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 小鼠在相应时间点断头处死后,在超净工作台上迅速取出大脑和脊髓组织,装入冻存管后放入液氮冷冻。取脑或脊髓组织约 100 mg,采用异硫氰酸胍一步法抽提组织总 RNA。所提总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳确定其完整性,采用紫外分光光度计检测所提 RNA 含量和纯度。取 2.0 μg 总 RNA 进行逆转录反应,采用 SYBR Green 荧光染料技术进行实时荧光定量 PCR 扩增。记录其循环阈值(Ct),每个样品中靶基因的相对 mRNA 表达采用相对定量公式 2^{-ΔΔCt} 计算,其中 ΔCt 值 = 靶基因 Ct 值 - β-actin Ct 值。

2.4 统计学处理 用 SPSS 13.0 统计学软件进行相应的统计学分析,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)检验进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, P < 0.05 为差异显著。

3 结果

与正常组比较,免疫后 7 d,EAE 小鼠脑内 CD11b mRNA 的表达显著降低(P < 0.05),而脊髓内表达未见显著异常;至免疫后 14 d,EAE 小鼠脑

和脊髓内 CD11b mRNA 的表达均显著上升(P < 0.05, P < 0.01);免疫后 24 d,EAE 小鼠脑和脊髓内 CD11b mRNA 的表达均显著升高(P < 0.01);免疫后 40 d,EAE 小鼠脑内 CD11b mRNA 的表达仍显著升高(P < 0.01),而脊髓 CD11b mRNA 内表达未见显著异常。与正常组比较,经过益肾达络饮治疗后在 24 d EAE 小鼠脑组织 CD11b mRNA 的表达同样出现显著上升(P < 0.01)。与模型组比较,经过益肾达络饮治疗后在 40 d 小鼠脑组织 CD11b mRNA 的表达比较均出现了显著下降(P < 0.01)。经过益肾达络饮治疗后 EAE 小鼠脊髓组织 CD11b mRNA 的表达在 14 d 和 24 d 同样明显升高(P < 0.05),而在 40 d 时 CD11b mRNA 的表达未见明显异常。见表 2~3。

经过激素治疗后在 14,24 d EAE 小鼠脑组织 CD11b mRNA 的表达同样出现显著上升(P < 0.01, P < 0.05),但是与模型组比较,小鼠脑组织 CD11b mRNA 的表达在 40 d 出现了显著下降(P < 0.01)。经过激素治疗后 EAE 小鼠脊髓组织 CD11b mRNA

的表达在 14 d 时同样出现升高 ($P < 0.05$), 而与模型组比较 CD11b mRNA 的表达明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2~3。

佐剂组在免疫后 7 d, 与正常组比较, 小鼠

脑内 CD11b mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.05$), 免疫后 14 d, 佐剂组小鼠脑内 CD11b mRNA 的表达显著上升 ($P < 0.05$)。见表 2~3。

表 2 益肾达络饮对 EAE 小鼠脑内 CD11b mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	各取材时间 CD11b/ β -actin			
		7 d	14 d	24 d	40 d
正常	-	1.03 ± 0.26	1.03 ± 0.26	1.04 ± 0.31	1.02 ± 0.20
佐剂	-	0.60 ± 0.30 ¹⁾	2.78 ± 0.81 ¹⁾	1.26 ± 0.26 ²⁾	0.93 ± 0.23 ²⁾
模型	-	0.68 ± 0.27 ¹⁾	2.39 ± 1.09 ¹⁾	3.20 ± 1.14 ¹⁾	1.58 ± 0.36 ¹⁾
泼尼松	3.9 × 10 ⁻³	-	3.17 ± 1.61 ¹⁾	2.42 ± 1.31 ¹⁾	1.00 ± 0.22 ²⁾
益肾达络饮	20	-	2.08 ± 0.74	2.56 ± 1.47 ¹⁾	1.01 ± 0.39 ²⁾

注: 与同时时间点正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

表 3 益肾达络饮对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 CD11b mRNA 在脊髓组织中相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	各取材时间 CD11b/ β -actin			
		7 d	14 d	24 d	40 d
正常	-	1.11 ± 0.55	1.02 ± 0.24	1.13 ± 0.65	1.36 ± 1.18
佐剂	-	1.82 ± 0.95	0.73 ± 0.30 ²⁾	1.57 ± 0.34 ²⁾	1.32 ± 0.71
模型	-	1.76 ± 0.37	5.87 ± 1.80 ¹⁾	7.41 ± 4.64 ¹⁾	1.47 ± 0.59
泼尼松	3.9 × 10 ⁻³	-	3.13 ± 2.03 ^{1,2)}	4.75 ± 3.21	0.82 ± 0.44
益肾达络饮	20	-	4.15 ± 1.94 ¹⁾	5.12 ± 2.50 ¹⁾	0.86 ± 0.27

注: 组间同时间点与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

MS 产生的内在基础是先天禀赋不足或五劳七伤所致的肾精不足, 也是内化、外受之湿热浊毒作用于机体出现神经功能损伤的前提条件^[11]。根据导师高颖教授的学术思想和脑病学科多年的临证治验, 结合本病临床特点, 综合 MS 中医药诊治研究进展以及相关工作基础, 笔者认为 MS 是由于肾精不足, 脏腑功能失调, 从而导致湿热浊毒内生、毒损督络、戕害脑髓、败坏形体而发病, 并拟定益肾化浊、解毒通络作为 MS 的治疗原则, 即从本论治(益肾)、祛除病理因素(解毒化浊)、矫正病理途径(通畅督络)^[12]。益肾达络饮(由熟地黄、萆薢、栀子、豨莶草等药物组成)是高颖教授根据 MS 的病机理论创立的具有益肾化浊、解毒通络功效的中药复方, 前期的研究表明, 益肾达络饮对急性发作 MS 患者的肢体麻木、疼痛有显著的改善作用, 具有潜在的降低复发的作用, 同时可以显著减轻 EAE 神经损伤和血脑屏障损伤^[13-17]。

MS 及其动物模型 EAE 是一类主要由 T 细胞介导的自身免疫性疾病, T 细胞针对髓鞘成分的反应在 MS 的发病过程中起到了关键的作用。其主要发

病机制是某种诱因作用下激活的 T 细胞透过 BBB 进入到脑实质结合中枢的抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 抗原, 通过再刺激分泌出大量的趋化因子和细胞因子, 进一步促使 B 细胞和巨噬细胞的活化, 募集外周血 T 细胞、单核细胞以及 B 细胞等进入到炎症部位, 从而导致中枢神经轴索的损害以及神经组织的炎症脱髓鞘反应^[18-19]。

在 MS 和 EAE 发病过程中会发生过度的炎症反应, 作为重要黏附分子的 CD11b 在中性粒细胞膜表面表达明显增加, 其与内皮细胞表面的黏附分子 ICAM-1 的结合促成了中性粒细胞与内皮细胞的紧密黏附, 进而产生呼吸爆发, 中性粒细胞释放了大量的氧自由基、蛋白水解酶、细胞因子及炎性介质, 最终促成了血脑屏障的破坏与脑水肿的形成。可以说, 白细胞(特别是中性粒细胞)与血管内皮细胞的牢固黏附及其后所产生一系列的病理反应是进一步导致血脑屏障破坏和脑水肿发生的重要原因之一。

本实验采用 MOC₃₅₋₅₅ 免疫 C57BL/6 小鼠诱导 EAE 模型, 平均 12.33 d 左右发病, 24 d 达到高峰。前期预实验已将药物大、中、小 3 个剂量进行了比较, 结果得出中剂量药物的作用最佳, 遂作为本实验

药物所用剂量。

本实验观察了免疫后7,14,24,40 d EAE小鼠脑和脊髓内CD11b mRNA的表达,免疫后14,24,40 d的EAE小鼠脑内CD11b mRNA的表达量均显著高于正常值($P < 0.05$),在免疫后7 d EAE小鼠脑内CD11b mRNA的表达出现了反应性降低($P < 0.05$)。本实验的研究结果表明,益肾达络饮显著降低了免疫后40 d小鼠脑组织CD11b的水平($P < 0.05$);在发病初期与正常组比较,益肾达络饮组小鼠脑组织CD11b的表达未见显著改变。鉴于益肾达络饮在EAE免疫后40 d和发病初期抗炎反应中的关键作用,故推断益肾达络饮可能减轻了EAE慢性持续期脑组织的过度炎症反应,抑制了一定程度的炎症级联反应。

本实验通过对EAE小鼠4个不同时间点的脑和脊髓组织中CD11b mRNA测定,探讨了益肾达络饮对EAE损伤的保护作用,为临床EAE神经保护的成功提供了实验依据。但由于本实验未能对脑组织超微结构作对比观察,故有待于今后研究中加以不断完善。

[参考文献]

- [1] Compston Alastair, Coles Alasdair. Multiple sclerosis [J]. *Lancet*, 2008, 372(9648):1502.
- [2] 赵亚朴,李秀芹,王沛,等. 多发性硬化症发病机制研究进展[J]. *白求恩军医学院学报*, 2005, 3(2):99.
- [3] Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz J D, et al. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(10):3420.
- [4] Sloane E, Ledebner A, Seibert W, et al. Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental multiple sclerosis;MOG-EAE behavioral and anatomical symptom treatment with cytokine gene therapy [J]. *Brain Behavior Immunity*, 2009, 23(1):92.
- [5] Lu J Q, Fan Y, Mitha A P, et al. Association of alpha-synuclein immunoreactivity with inflammatory activity in multiple sclerosis lesions [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68(2):179.
- [6] 徐全刚,王晓辉,田书娟. 趋化因子MCP-1, MIP-1 α 在EAE小鼠脊髓中的表达[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2007, 15(3):216.
- [7] Bennett J, Basivireddy J, Kollar A, et al. Blood-brain

barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 229(1/2):180.

- [8] 周晓峰,王晶,赵妍,等. 乌司他丁对心肺复苏后大鼠脑组织含水量及CD11b的影响[J]. *中国现代医生*, 2009, 47(17):25.
- [9] 刘洪斌,吴咸中,李东华,等. 凉血活血方对脓毒症大鼠白细胞系列黏附分子表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(1):44.
- [10] Bullard D C, Hu X, Schoeb T R, et al. Critical requirement of CD11b (Mac-1) on T cells and accessory cells for development of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 2005, 175(10):6327.
- [11] 吴彦青,高颖. 湿热与多发性硬化症候特点的相关性探析[J]. *中医研究*, 2011, 24(1):7.
- [12] 吴彦青,高颖. 益肾化浊解毒通络法治疗复发-缓解型多发硬化理论探析[J]. *中医研究*, 2011, 24(2):1.
- [13] Yanqing Wu, Ying Gao, Lingqun Zhu, et al. Effects of Yishen Daluo decoction on blood-brain barrier integrity in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Neural Regeneration Research*, 2011, 6(15):1151.
- [14] 关东升,高颖. 益肾达络饮对实验性自身免疫性脑脊髓炎TNF- α 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(17):279.
- [15] 吴彦青,高颖,朱陵群,等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中枢神经组织中ZO-1mRNA的变化及益肾达络饮对其的影响[J]. *中国中医急症*, 2012, 21(12):1936.
- [16] 吴彦青,高颖,朱陵群,等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中枢神经组织中CD4mRNA的变化及益肾达络饮对其的影响[J]. *中国中医急症*, 2012, 21(11):1760.
- [17] 吴彦青,高颖,朱陵群,等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中枢神经组织中CD8mRNA的变化及益肾达络饮对其的影响[J]. *中医研究*, 2013, 26(3):62.
- [18] Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, et al. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation[J]. *Brain*, 2000, 123(Pt6):1174.
- [19] Rosso C, Remy P, Creange A, et al. Diffusion-weighted MR imaging characteristics of an acute stroke-like form of multiple sclerosis[J]. *AJNR*, 2006, 27(5):1006.

[责任编辑 聂淑琴]