

# 益肾达络饮对实验性自身免疫性脑脊髓炎 TNF- $\alpha$ 的影响

关东升<sup>1</sup>, 高颖<sup>2\*</sup>

(1. 河南中医学院, 郑州 450003; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 研究肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 在实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 发病中的作用, 观察中药复方益肾达络饮干预 EAE 的疗效, 探讨其治疗 EAE 的作用机制。方法: 选用雌性 SJL/J 小鼠 95 只, 随机分为正常组、泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组、益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组、益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  加泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组, 从开始造模后 7 d 开始 ig 给药, 连续 15 d, 从急性期、复发期采用免疫蛋白印迹法、免疫组化法测定 EAE 小鼠中枢神经组织中 TNF- $\alpha$  蛋白表达的变化。结果: 益肾达络饮能降低 EAE 的复发率 ( $P < 0.05$ ), 改善 EAE 模型小鼠神经功能评分 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组、益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组、益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  加泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组中枢神经组织 TNF- $\alpha$  表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。结论: 降低 TNF- $\alpha$  的表达水平, 有助于缓解 EAE 病损程度; 益肾达络饮能降低 EAE 的复发率, 有效改善 EAE 小鼠神经功能损伤; 醋酸泼尼松和益肾达络饮调节 TNF- $\alpha$  的表达水平可能是治疗 EAE 的机制之一。

**[关键词]** 多发性硬化; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 益肾达络饮

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0279-04

**[doi]** 10.11653/syfj2013170279

## Effects of Yishen Daluo Decoction on TNF- $\alpha$ in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

GUAN Dong-sheng<sup>1</sup>, GAO Ying<sup>2\*</sup>

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China;

2. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore relationship of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) with the clinical course in the central nervous system (CNS) of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice, and to explore the mechanism and effects of Yishen Daluo decoction (YDD) for treatment of EAE. **Method:** Ninety-five SJL/J mice were randomly divided into normal group, prednisone  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  group, YDD  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group and YDD  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  + prednisone  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  group. Immunohistochemistry and western blot were used to explore the expression of TNF- $\alpha$  in the CNS in SJL/J mice after 15 d administration. **Result:** Compared with model group, YDD could reduce the relapse rate of EAE, improve the neurological function score ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the content in central nervous system of TNF- $\alpha$  was reduced in normal group, prednisone-treated group, YDD group, prednisone-YDD complex treated group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** TNF- $\alpha$  mediated inflammatory cascade might play an important role in the mechanism of CNS inflammatory infiltration and axonal injury in EAE. Treatment with YDD can reduce the relapse rate of EAE, improve the neurological function score. The therapeutic mechanism of YDD is proposed by regulating the level of TNF- $\alpha$ .

**[Key words]** multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; tumor necrosis factor  $\alpha$ ; Yishen Daluo decoction

**[收稿日期]** 20121226(019)

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81202657)(81072770); 河南中医学院博士青年基金项目(BSJJ2009-041); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A360556)

**[第一作者]** 关东升, 博士, 讲师, 从事多发性硬化的实验与临床研究工作, Tel: 0371-60905746, E-mail: gds349@126.com

**[通讯作者]** \* 高颖, 博士, 教授, 从事中医药防治神经系统疾病的临床与实验工作, Tel: 010-84013212, E-mail: chen-tang@263.net

肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 是具有广泛生物学效应的细胞因子,也是介导内毒素休克、全身炎症反应综合征、急性肺损伤和多器官功能障碍综合征 (MODS) 的重要起始因子<sup>[1]</sup>。多发性硬化 (MS) 是以中枢神经系统 (CNS) 白质脱髓鞘为主要特征的自身免疫性疾病,炎症性级联反应是导致脱髓鞘和轴索变性的主要原因<sup>[1-2]</sup>。目前 MS 的病因及病机仍不十分清楚,也无理想的防治措施。益肾达络饮是根据 MS 毒损督络、戕害肾阳及脑髓、败坏形体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<sup>[3]</sup>。在之前的研究中已证实,益肾达络饮对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 具有治疗作用,尤其对复发-缓解 (R-R) 型 EAE 具有降低复发率的治疗作用。而且益肾达络饮具有调节 p38MAPK、NF- $\kappa$ B 信号通路的作用,其具体机制需进一步明确<sup>[4-5]</sup>。

本研究建立了 SJL/J 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 模型。探讨 TNF- $\alpha$  与 EAE 发病的内 在关系,及其复方益肾达络饮治疗 EAE 的作用 机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 雌性 SJL/J 小鼠 95 只,8~12 周龄,体 重 (19.81 $\pm$ 2.0) g,来自美国 Jackson 实验室,动物 许可证号 SCXK (京) 2005-0013。饲养于中国中医 科学院基础研究所二级动物中心。

## 1.2 药物与试剂

**1.2.1 药物及配制** 醋酸泼尼松 (天津力生制药 股份有限公司,批号 0801002,用去离子水配制成 0.39 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>溶液);益肾达络饮由熟地黄,鹿角胶,石 菖蒲,草薢,栀子,豨莶草,生甘草等药组成,饮片购 自北京同仁堂股份有限公司,经传统水煎法煎煮,用 双层棉纱布过滤,收集滤液合并煎煮浓缩制成含生 药 2 g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>,分装灭菌后 4 $^{\circ}$ C 保存备用)。

**1.2.2 试剂** 抗原蛋白脂蛋白 (PLP 139-151,北京 赛百盛生物工程公司,纯度 >95%,批号 171212- 1),完全福氏佐剂 (美国 Sigma 公司,批号 67K8614),百日咳杆菌 (北京生物制品研究所,批号 200602),免疫组化兔抗小鼠 anti-TNF- $\alpha$  单抗 (北京 中杉金桥生物技术有限公司,批号 N-19),Western blot 兔抗小鼠 anti-TNF- $\alpha$  单抗 (英国 Abcam 公司, 货号 ab6671),兔二步法检测试剂盒 (北京中杉金桥 生物技术有限公司)。

## 2 方法

**2.1 EAE 动物模型的建立** 将 100  $\mu$ L PLP139~

151 水溶液 (含 PLP139~151 150  $\mu$ g) 与 100  $\mu$ L 完 全福氏免疫佐剂混合,充分乳化制成油包水的抗原 配剂。第 1 天 SJL/J 小鼠上腹部 sc 0.2 mL 的抗原 配剂,第 1 天和第 3 天 0.1 mL/只 (含 0.6 $\times$ 10<sup>6</sup> 个百 日咳杆菌) 百日咳杆菌液 iv,制备 EAE 动物模型。

**2.2 分组与给药** 分为 5 组:正常组 (生理盐水)、 模型组 (造模,生理盐水)、泼尼松组 (3.9 mg $\cdot$  kg<sup>-1</sup>)、益肾达络饮组 (20 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)、益肾达络饮 + 泼 尼松组 (20 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> + 3.9 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>),自造模第 7 天 开始 (开始发病) ig 给药,1 次/d,连续 15 d。实验分 2 批:第 1 批 (每组 9 只) 于造模后 60 d 内 (60 d 为 复发高峰期) 动态观察小鼠行为学特征,进行神经 功能评分;第 2 批 (每组 12 只) 于造模 22 d (初次发 病高发期),处死小鼠,取脑和脊髓,用于免疫组化 和免疫蛋白印迹 (Weestern blot) 测定。

**2.3 动物神经功能评分** 造模后 60 d 内,每日记 录实验小鼠体重、动态观察临床体征,进行神经功 能评分,实验动物的评分标准根据 Kono 等<sup>[6]</sup> 的 5 级评 分法。0 分:不发病;1 分:尾部张力降低或轻度步态 笨拙;2 分:尾部无张力,和/或中度步态异常,和/或 姿态维持缺乏;3 分:肢体力弱;4 分:肢体麻痹;5 分:濒死状态。

平均开始发病时间 = 神经功能评分 >1 的天数;

平均最高分 = Sum (最高得分)/N;

平均发病时长 = 发病结束时间 - 发病开始时间 + 1;

复发 (Relapse):神经功能评分增加 1 分以上并 伴有体重突然下降 (>7%)<sup>[7]</sup>。

**2.4 TNF- $\alpha$  免疫组织化学法染色** 取造模后 22 d 时间点脑白质和脊髓切片,使用兔二步法 PV-6001 试剂盒,DAB 显色。结果使用奥林巴斯 BX-60 型显 微镜观察分析。

**2.5 TNF- $\alpha$  Western blot 法检测** 取造模后 22 d 时 间点脑和脊髓标本使用电动匀浆器低温条件下匀 浆,RIPA 裂解液提取蛋白,BCA 蛋白浓度分析试剂 盒测定蛋白浓度。以经 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶 电泳后将电泳产物转移至 NC 膜上,加入一抗 (Anti- TNF- $\alpha$  单抗使用封闭液 1:500 稀释) 及二抗 (1:6 000 稀释),ECL 法显影。应用 NIH Image J 1.41 计算灰 度值,与内参做比值后进行分析 (以  $\beta$ -actin 为内 参)。

**2.6 数据处理方法** 用 SPSS 13.0 进行统计学分 析。实验所测数据进行正态性检验和方差齐性检 验,以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较用单因素方差分析;以  $P < 0.05$  作为具有统计学意义的标准。

### 3 结果

**3.1 造模后 60 d 内 EAE 小鼠行为学观察** 各治疗组与模型组相比,开始出现神经功能缺损时间明显延迟 ( $P < 0.05$ ), 平均最高分明显降低 ( $P <$

$0.05$ ), 平均发病时间缩短 ( $P < 0.05$ ); 益肾达络饮组可明显降低 EAE 小鼠的复发率 ( $P < 0.05$ ); 益肾达络饮加泼尼松治疗组与泼尼松治疗组相比, 平均发病时间缩短 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

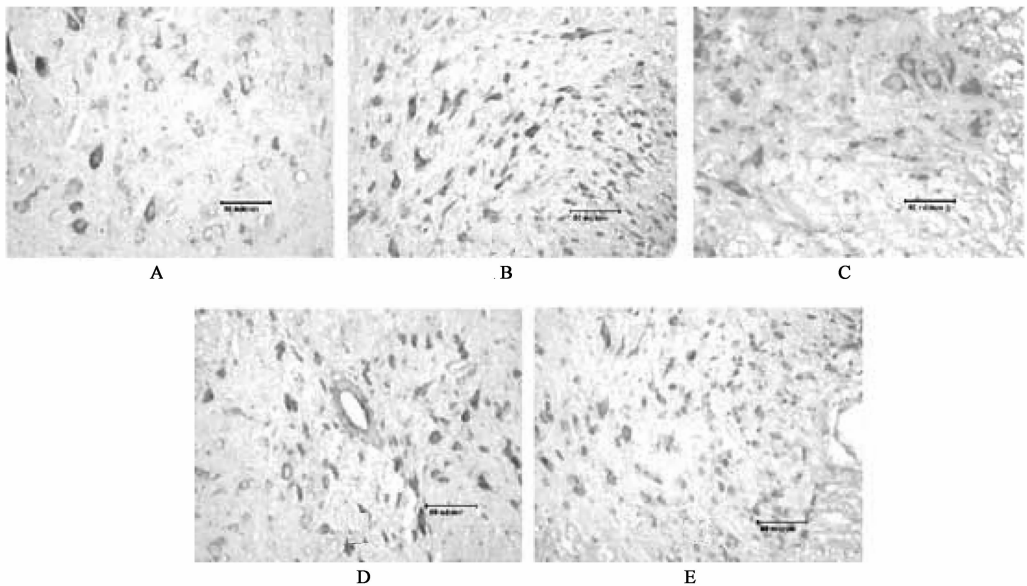
表 1 益肾通络饮对 EAE 小鼠神经功能评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	平均开始发病时间/d	平均最高分/分	平均发病时长/d	复发率/%
模型	-	10.00 $\pm$ 2.40	4.00 $\pm$ 0.50	49.11 $\pm$ 3.44	89
泼尼松	$3.9 \times 10^{-3}$	12.44 $\pm$ 4.28 <sup>1)</sup>	3.33 $\pm$ 0.70 <sup>1)</sup>	45.11 $\pm$ 3.66 <sup>1)</sup>	89
益肾达络饮	20	12.78 $\pm$ 4.24 <sup>1)</sup>	3.00 $\pm$ 0.50 <sup>1)</sup>	42.00 $\pm$ 2.34 <sup>1)</sup>	33 <sup>1)</sup>
益肾达络饮 + 泼尼松	$20 + 3.9 \times 10^{-3}$	14.67 $\pm$ 4.95 <sup>1)</sup>	3.44 $\pm$ 0.53 <sup>1)</sup>	41.44 $\pm$ 3.28 <sup>1,2)</sup>	33 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

**3.2 对 EAE 小鼠脑脊髓 TNF- $\alpha$  表达的影响** 造模后 22 d 正常脑、脊髓阳性细胞较稀少, 阳性颗粒主要位于细胞膜。在模型组、泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组、益肾

达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组、益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  加泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组损伤区域可见阳性细胞增多, 炎性细胞深染, 可见病变部位阳性细胞聚集, 见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; D. 益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;

E. 益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  + 泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组(图 2 同)

图 1 益肾达络饮对 EAE 小鼠脑脊髓 TNF- $\alpha$  表达的影响(免疫组化)

**3.3 对 EAE 小鼠脑脊髓 TNF- $\alpha$  蛋白表达的影响** 与模型组相比, 正常组、泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组、益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组、益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  加泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组 TNF- $\alpha$  表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 益肾达络饮  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  加泼尼松  $3.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组, 3 个治疗组之间比较, 无统计学差异。见图 2。

### 4 讨论

复发-缓解型(R-R)为 MS 临床最常见的类型, 占 MS 患者的 80%<sup>[1]</sup>。目前, 对 MS 的治疗尚缺乏理想的药物, 临床常用泼尼松和免疫抑制剂治疗 (weestern blot), 虽然对于控制病损的程度疗效肯定,

但均不能减少 R-R 型 MS 复发率。益肾达络饮复方益肾达络饮是本学科经过多年临床观察, 根据多发性硬化毒损督络、戕害肾阳及脑髓、败坏形体的病理理论制定的。临床实践表明, 益肾达络饮尤其对 R-R 型 MS 在缩短病程、延缓复发、降低复发率方面具有一定疗效。因此, 有必要对益肾达络饮的有效性及其治疗机制进行研究。

EAE 是研究 MS 的经典模型, SJL/J 小鼠是国内外研究者普遍认可的建立 R-R 型 EAE 的实验动物<sup>[7]</sup>。目前国内没有可供研究者使用的 SJL/J 小鼠。笔者从美国 Jackson 实验室引进 SJL/J 小鼠。

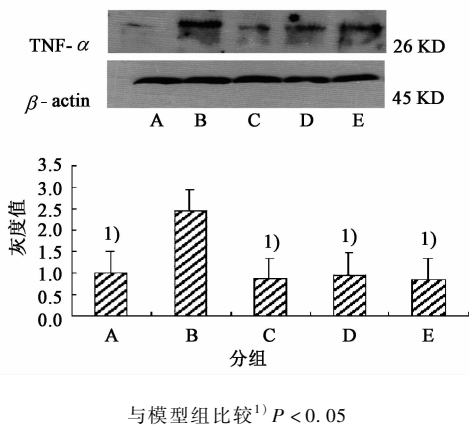


图 2 益肾达络饮对 EAE 小鼠脑脊髓 TNF-α 蛋白表达的影响 (Western blot) ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

本研究使用该 SJL/J 小鼠建立的 R-R 型 EAE 发病率 100%, 复发率较高、发病稳定, 病理改变典型。

TNF-α 是单核细胞等分泌的促炎症细胞因子, 体内过量表达的 TNF 在多种感染性和自身免疫性疾病的发病机制中起着重要作用<sup>[8-12]</sup>。Sharief 等<sup>[13]</sup>报告 MS 患者血清、脑脊液中 TNF-α 浓度增高。表明 MS 病人的血、血清和培养上清液中 TNF-α 水平与临床病程相关, 与血脑屏障的受损程度密切相关。TNF-α 不仅能刺激巨噬细胞释放炎症介质, 体外实验还发现它对髓鞘具有毒性作用<sup>[11]</sup>。

本研究通过免疫组织化学法和蛋白免疫印迹法进行定性和半定量分析了 EAE 小鼠中神经系统 TNF-α 的表达水平变化。本实验结果显示, TNF-α 的表达水平与 EAE 的发病程度呈正相关; 醋酸泼尼松和益肾达络饮对 EAE 小鼠神经系统 TNF-α 的表达具有抑制作用, 二者联合应用抑制效应并不比单用更强。这提示: ①降低 TNF-α 的表达水平, 有助于缓解 EAE 病损程度; ②p38MAPK 信号转导通路对 TNF-α 的表达具有重要的调节作用; ③醋酸泼尼松和益肾达络饮调节 TNF-α 的表达水平可能是治疗 EAE 的机制之一。

[参考文献]

[1] Romme Christensen J, Börnsen L, Hesse D, et al. Cellular sources of dysregulated cytokines in relapsing-remitting multiple sclerosis [J]. J Neuroinflammation, 2012, 14(1):215.

[2] Sato D K, Nakashima I, Fukazawa T, et al. Neutralizing antibodies are associated with a reduction of interferon-β efficacy during the treatment of Japanese multiple

sclerosis patients [J]. Tohoku J Exp Med, 2012, 228(2):85.

[3] 尚晓玲, 高颖. 关于多发性硬化病因病机的理论探讨 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(6):414.

[4] 关东升, 高颖, 娄丽霞, 等. 益肾达络饮对实验性自身免疫性脑脊髓炎 NF-κB 信号传导通路的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(7):732.

[5] 高颖, 关东升, 娄丽霞, 等. 益肾达络饮对实验性自身免疫性脑脊髓炎 p38MAPK 信号转导通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(2):267.

[6] Kono D H, Urban J L, Horvath S J. Two minor determinants of myelin basic protein induce experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice [J]. J Exp Med, 1988, 168(1):213.

[7] Nicolò C, Sali M, Di Sante G, et al. Mycobacterium smegmatis expressing a chimeric protein MPT 64-proteolipid protein (PLP) 139-151 reorganizes the PLP-specific T cell repertoire favoring a CD8-mediated response and induces a relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Immunol, 2010, 184(1):222.

[8] Chen Y L, Chen Y S, Lin H H, et al. Immunostimulatory flagellin from Burkholderia pseudomallei effects on an increase in the intracellular calcium concentration and up-regulation of TNF-alpha by mononuclear cells [J]. Microbiol Immunol, 2007, 51(1):81.

[9] 刘妍, 张平, 李明, 等. 补肾方对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 T 辅助细胞 1, 17 和调节性 T 细胞的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):116.

[10] 贾莹, 王秀丽, 张风华, 等. 黄连温胆汤加减方对大鼠自身免疫性神经炎的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9):237.

[11] 樊永平, 宋丽君, 叶明, 等. 二黄胶囊对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠中枢神经系统细胞因子和淋巴细胞亚群免疫组化表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5):142.

[12] 刘妍, 王蕾, 赵晖, 等. 六味地黄和金匱肾气丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠淋巴细胞亚群和 NK 细胞的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4):42.

[13] Sharief M K, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-α and disease progression in patients with multiple sclerosis [J]. New Engl J Med, 1991, 8(15):325.

[责任编辑 李玉洁]