

# 黄连温胆汤加减方对大鼠自身免疫性神经炎的作用

贲莹<sup>1\*</sup>, 王秀丽<sup>2</sup>, 张凤华<sup>1</sup>, 梁文杰<sup>1</sup>, 张培楠<sup>1</sup>

(1. 河北医科大学中西医结合学院, 石家庄 050091; 2. 河北医科大学第二医院, 石家庄 050091)

**[摘要]** 目的: 探讨黄连温胆汤加减方对大鼠实验性自身免疫性神经炎(EAN)的影响及其机制。方法: 应用周围神经髓鞘抗原(P2<sub>57-81</sub>多肽)与完全弗氏佐剂的混合液免疫 Lewis 大鼠, 建立 EAN 动物模型并随机分为黄连温胆汤加减方高剂量组(HL 高组)、黄连温胆汤加减方低剂量组(HL 低组)、EAN 模型组、正常组。HL 高组和 HL 低组于免疫当天至第 15 天每天固定时段灌胃给予黄连温胆汤加减方浓煎剂 1 次, 剂量分别为 26.89, 6.79 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。观察各组发病情况, 坐骨神经中 T 细胞、巨噬细胞浸润及组织病理学变化, 检测外周血中 17 型辅助 T 细胞(Th17 细胞)和叉头状转录因子 3 阳性调节 T 细胞(Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞)比例和淋巴结中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、干扰素-γ(IFN-γ)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-17(IL-17)mRNA 水平。结果: HL 高组的最初发病时间为(11.92 ± 1.38) d, 迟于 EAN 组(P < 0.05), 其高峰期临床评分为(2.41 ± 1.09), 髓鞘脱失的组织学评分为(0.58 ± 0.51), 均显著低于 EAN 组(P < 0.05); HL 高组和 HL 低组 T 细胞、巨噬细胞浸润明显减少, 外周血中 Th17 细胞比例(1.88 ± 0.47)%, (2.71 ± 0.39)% 较 EAN 组显著减少(P < 0.05), Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞比例(15.06 ± 1.35)%, (9.18 ± 1.00)% 较 EAN 组显著增加(P < 0.05), 淋巴结中促炎细胞因子 TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17mRNA 表达 HL 高组分别为(0.38 ± 0.02)%, (0.45 ± 0.08)%, (0.34 ± 0.13)%, (0.63 ± 0.17)%; HL 低组分别为(0.45 ± 0.03)%, (0.60 ± 0.05)%, (0.74 ± 0.12)%, (1.04 ± 0.17)% 与 EAN 组比较明显下降(P < 0.05)。结论: 黄连温胆汤加减方能够抑制 EAN 大鼠的自身免疫反应, 对 EAN 有治疗作用。

**[关键词]** 黄连温胆汤; 实验性自身免疫性神经炎; Th17 细胞; Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞; 细胞因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0237-06

**[收稿日期]** 20110711(010)

**[通讯作者]** \* 贲莹, 硕士, 讲师, 主要从事为中西医结合神经病学研究, Tel: 0311-86265078, E-mail: benyfortunate@sohu.com

Free Radi Biol Med, 1999, 27(3): 388.

- [5] 唐力英, 王祝举, 赫炎, 等. 决明子中苷类化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 35.
- [6] 潘正军, 陆祈, 潘丽, 等. 决明子水提液对高血压小鼠血压血脂及肾脏结构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 195.
- [7] 潘正军, 陆祈, 潘丽. 决明子水提液对高血压小鼠血压血脂及肾脏结构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 203.
- [8] Ju M S, Kim H G, Choi J G, et al. Cassiae semen, a seed of Cassia obtusifolia, has neuroprotective effects in Parkinson's disease models[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(8/9): 2037.
- [9] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8): 1015.

- [10] 王春怡, 陈艳芬, 李卫民, 等. 黄芪葛根汤对实验性糖尿病及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 144.
- [11] 梁雷, 边宝林, 王宏洁. 中药降血糖活性成分研究近况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 227.
- [12] Dias A S, Porawski M, Alonso M, et al. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Nutr, 2005, 135(10): 2299.
- [13] Nakano M, Orimo N, Katagiri N, et al. Inhibitory effect of astraxanthin combined with flavangenol on oxidative stress biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Int J Vitam Nutr Res, 2008, 78(4/5): 175.
- [14] 江涛, 郑洁静, 赵亮, 等. 晶状体抗氧化能力指数的测定[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 77.

[责任编辑 聂淑琴]

## Effects of Huanglian Wendan Decoction on Experimental Autoimmune Neuritis in Lewis Rats

BEN Ying<sup>1\*</sup>, WANG Xiu-li<sup>2</sup>, ZHANG Feng-hua<sup>1</sup>, LIANG Wen-jie<sup>1</sup>, ZHANG Pei-nan<sup>1</sup>

(1. Integrated Chinese Traditional and Western Medical College of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects and mechanism of Huanglian Wendan decoction on experimental autoimmune neuritis (EAN). **Method:** EAN model was established by immunizing Lewis rats with peripheral nerve myelin sheath antigen (P2<sub>57-81</sub>) peptide and complete Freund's adjuvant (CFA). Lewis rats were randomly divided into Huanglian Wendan decoction high-dose group and low-dose group, the EAN model group and normal group. Huanglian Wendan decoction high-dose group and low-dose group were lavaged with 26.89 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> or 6.79 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> once daily from day 0 to day 15 post-immunization. The effects were assessed in terms of appearance of clinical signs, histopathology and T cells, macrophages infiltrating in sciatic nerve sections, T help 17 (Th17) cells and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T (Foxp3<sup>+</sup> Treg) cells in peripheral blood, mRNA levels of inflammatory cytokines: tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-17 (IL-17) in the lymph nodes. **Result:** Huanglian Wendan decoction high-dose group primary neurological signs were found at day 11.92  $\pm$  1.38, it was later than that in EAN group. The maximal neurological score (2.41  $\pm$  1.09) and the mean histological scores (0.58  $\pm$  0.51) of high-dose group were lower than that in EAN group. Huanglian Wendan decoction high-dose group and low-dose group reduced accumulation of macrophages and T cells in sciatic nerves. In peripheral blood, Foxp3<sup>+</sup> Treg cells in high-dose group and low-dose group (15.06  $\pm$  1.35, 9.18  $\pm$  1.00)% were increased, but Th17 cells (1.88  $\pm$  0.47, 2.71  $\pm$  0.39)% were decreased. Furthermore, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 mRNA levels in the lymph nodes of high-dose group (0.38  $\pm$  0.02)%, (0.45  $\pm$  0.08)%, (0.34  $\pm$  0.13)%, (0.63  $\pm$  0.17)% and low-dose group (0.45  $\pm$  0.03)%, (0.60  $\pm$  0.05)%, (0.74  $\pm$  0.12)%, (1.04  $\pm$  0.17)% significantly suppressed. **Conclusion:** Huanglian Wendan decoction could effectively suppress autoimmune response in EAN, it can treat EAN effectively.

**[Key words]** Huanglian Wendan decoction; experimental autoimmune neuritis; Th17 cell; Foxp3<sup>+</sup> Treg cells; cytokine

吉兰-巴雷综合征 (Guillain-Barre syndrome, GBS) 又称急性炎症性脱髓鞘性多发性神经根炎, 是由于非特异性感染所引起的自身免疫性多发性周围神经病。病理改变是周围神经组织中小血管周围淋巴细胞和巨噬细胞浸润导致周围神经炎症及髓鞘脱失, 严重病例可出现继发轴索变性。GBS 的治疗可以分为对症支持治疗和病因治疗 (包括血浆交换和免疫球蛋白静脉滴注)。虽然这些治疗有效, 但仍有大概 5% 的患者死亡, 有超过 25% 的患者有肢体无力等后遗症。血浆交换和免疫球蛋白静脉滴注治疗昂贵, 加重患者的经济负担, 且血浆交换也只能在有条件的医院进行。因此, 有必要建立更加有效且廉价的治疗方法。通过长期的临床观察发现, GBS 患者中医辨证多为湿热证, 治疗上应用清热燥湿, 理

气化痰的黄连温胆汤加减, 取得了较好的效果。

实验性自身免疫性神经炎 (experimental autoimmune neuritis, EAN) 与 GBS 有着相似的临床表现和免疫学特点, 是 GBS 理想的动物模型。本研究应用黄连温胆汤加减方对 EAN 大鼠进行干预, 观察其治疗效果, 从免疫学层面分析其抗炎作用机制, 初步解释其对 EAN 治疗作用机制。

### 1 材料

**1.1 动物** Lewis 雄性大鼠 48 只, 清洁级, 8 ~ 10 周龄, 170 ~ 200 g, 购自河北医科大学实验动物中心, 许可证号 SCXK(冀)2003-1-003。

**1.2 药物** 黄连温胆汤加减方由清半夏 9 g, 陈皮 9 g, 枳实 6 g, 黄连 6 g, 茯苓 6 g, 黄芪 9 g, 丹参 6 g, 鸡血藤 6 g, 甘草 3 g 组成, 方中药物购自乐仁堂, 经

河北医科大学中医学院中药教研室鉴定为正品。按常规方法浸泡 30 min,煎煮 3 次,过滤、浓缩。

**1.3 试剂** 周围神经髓鞘抗原(P2<sub>57-81</sub>)多肽购自上海吉生生化有限公司;CD3 抗 T 淋巴细胞抗体、ED1 抗活化的巨噬细胞抗体购自 Serotec 公司;白细胞介素-17(IL-17)抗体、Foxp3 染色缓冲组合购自 eBioscience 公司。总 RNA 提取试剂(Trizol)、逆转录试剂盒购自大连宝生物有限公司,引物参照 Gene Bank 序列,应用 Primer Express 5.0 软件合成,由大连宝生物工程技术服务有限公司合成。

**1.4 仪器** 正置显微镜(Olympus BX53);扩增仪(Thermo Px2);凝胶成像系统(Gel Loglc 100);流式细胞仪(Becton Dickinson FACSCalibur)。

## 2 方法

**2.1 分组** 将实验大鼠随机分为黄连温胆汤加减方高剂量组(HL 高组)、黄连温胆汤加减方低剂量组(HL 低组)、EAN 模型组、正常组,每组 12 只。

**2.2 模型制备** HL 高组、HL 低组及 EAN 模型组大鼠双后肢足底注射 200 μL 抗原乳剂(由含 200 μg P2<sub>57-81</sub> 的 100 μL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(PBS)和 100 μL 完全弗氏佐剂(CFA)用针式匀浆器混匀成油包水乳剂)<sup>[1]</sup>致敏当日记为第 0 天。HL 高组和 HL 低组大鼠于免疫当天至第 15 天每天固定时段灌胃给药 1 次,参照《人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表》黄连温胆汤加减方浓煎剂给药剂量按生药量计为:HL 高组 26.9 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,HL 低组 6.8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。EAN 模型组灌服相应体积的蒸馏水。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 发病情况评估** 免疫后每天对大鼠进行神经系统体征评分<sup>[2]</sup>。0 级:无异常;1 级:尾部张力降低;2 级:尾瘫,翻正反射部分缺失;3 级:翻正反射缺失;4 级:步态失调、姿态异常;5 级:后肢轻瘫;6 级:中度瘫痪;7 级:后肢严重瘫痪;8 级:四肢瘫痪;9 级:濒死;10 级:死亡。

**2.3.2 大鼠坐骨神经的组织学变化** 用免疫组织化学方法对 T 细胞、巨噬细胞浸润情况进行检测。于第 16 天麻醉后处死大鼠,取两侧的坐骨神经,用 4 ℃ 4% 的多聚甲醛固定过夜,石蜡油包埋,连续切片(4 μm)。常规脱蜡、灭活内源酶、微波修复抗原、滴加 10% 标准猪血清封片。加一抗:CD3 抗 T 淋巴细胞(1:50),ED1 抗活化的巨噬细胞(1:100),于 4 ℃ 孵育过夜。加二抗室温孵育,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 ℃ 孵育 40 min,DAB 显色,苏木

素轻度复染、封片、观察。应用 Image-Pro Plus 系统(×400)采集图像,进行坐骨神经阳性细胞面积分析,结果用阳性细胞面积占坐骨神经横切片面积的百分比表示。

劳克坚牢蓝(luxol fastblue, LFB)髓鞘染色,应用 Image-Pro Plus 系统(×400)采集图像,观察组织学改变,并进行组织学评分<sup>[3]</sup>。0 分:血管周围正常;1 分:血管附近有轻度细胞浸润;2 分:紧靠血管的区域有细胞浸润及髓鞘脱失;3 分:细胞浸润及髓鞘脱失遍及切片。

**2.3.3 大鼠外周血中 Th17 细胞、Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞含量检测** 采集大鼠外周血液 100 μL,加入红细胞裂解液,用 0.5% 皂苷的缓冲液洗透化处理 10 min。在室温下用兔抗鼠 IL-17 抗体(1:100, eBioscience)进行细胞孵育 1 h。应用缓冲液清洗二次,于暗室内用 FITC-标记的羊抗兔 Ig-F(ab)<sub>2</sub> 片段(1:100, eBioscience)进行孵育 1 h,而后进行流式细胞检测。

为了检测 Foxp3 表达,用 Foxp3 染色缓冲组合(eBioscience)固定并透化血细胞。用 FITC 标记的 Foxp3 抗体染色。而后进行流式细胞检测。

**2.3.4 大鼠淋巴结中细胞因子的变化** 将大鼠腹股沟淋巴结迅速转移至 -70 ℃ 冰箱保存,用 Trizol 法提取组织中 RNA。用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17 的 mRNA 表达水平。引物序列:TNF-α (sense, 5'-TGATCGGTCCCAACAAGGA-3', antisense, 5'-TGCTTGGTGTTTGTCTACGA-3'); IFN-γ (sense, 5'-AAAGACAACCAGGCCATCAG-3', antisense, 5'-CTTTTCCGCTCCTTAGGCT-3'); IL-6 (sense, 5'-GCCCTTCAGGAA CAGCTATG-3', antisense, 5'-CAGAATTGCCATTGCAACAAC-3'); IL-17 (sense, 5'-TGGACTCTGAGCCGCATTGA-3', antisense, 5'-GACGCATGGCGGACAA TAGA-3')。取 PCR 产物 10 μL 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统成像,再用 Quantityone 软件分析数据,获得各电泳条带的平均吸光度, Cat L/GAPDH 的灰度比值,即为 Cat L 的相对表达含量。

**2.4 统计学分析** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,所有实验数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,均数比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

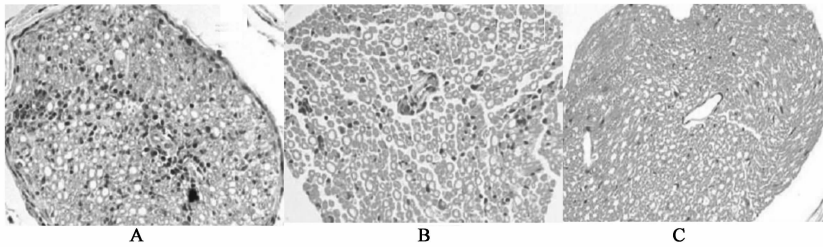
## 3 结果

**3.1 病情评分情况** 造模的所有大鼠均发生 EAN。HL 高组发病时间较 EAN 模型组和 HL 低组显著延迟(*P* < 0.05)。HL 高组疾病高峰期(免疫后第 15 天)临床评分明显低于 EAN 模型组和 HL 低

组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 3.2 坐骨神经的髓鞘脱失和炎症细胞浸润情况

HL 高组和 HL 低组大鼠坐骨神经血管周围髓鞘脱失及炎性细胞浸润情况较 EAN 组均有不同程度减轻 (见图 1)。3 组的组织学评分分别为:  $0.58 \pm 0.51$ ,  $1.17 \pm 0.72$ ,  $1.58 \pm 0.62$ 。HL 高组的组织学评分较 EAN 模型组和 HL 低组显著降低 ( $P < 0.05$ )。



A. EAN 模型组; B: 黄连温胆汤  $6.79 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; C. 黄连温胆汤  $26.89 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组 (图 2 同)

图 1 坐骨神经组织病理学改变 (LFB 染色,  $\times 400$ )

EAN 模型组大鼠坐骨神经 T 细胞和巨噬细胞浸润, 其中巨噬细胞最多, 占优势。HL 低组和 HL 高组 T 细胞、巨噬细胞浸润较 EAN 模型组明显减少

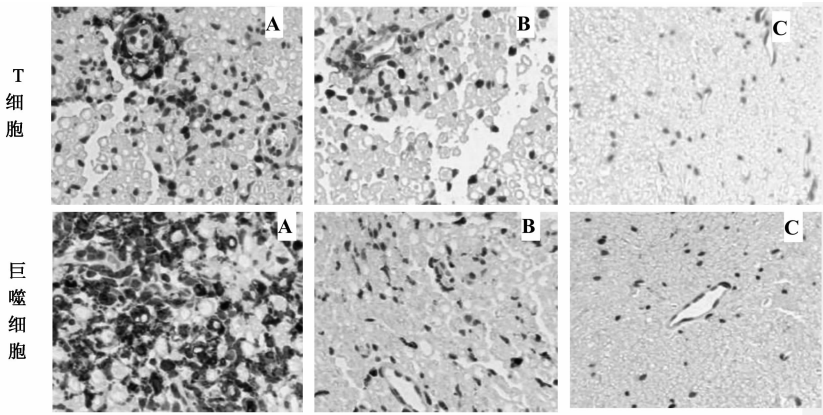
表 1 发病情况及病情评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	最初发病时间 $/\text{d}$	高峰期评分
正常	-	-	-
EAN 模型	-	$9.08 \pm 1.16$	$6.25 \pm 1.60$
黄连温胆汤	6.79	$10.25 \pm 1.60$	$5.00 \pm 1.85$
	26.89	$11.92 \pm 1.38^{1,2)}$	$2.41 \pm 1.09^{1,2)}$

注: 与 EAN 模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 HL 低组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 2 同)。

( $P < 0.05$ )。HL 高组 T 细胞、巨噬细胞浸润较 HL 低组明显减少 ( $P < 0.05$ )。见图 2, 表 2。

### 3.3 外周血中 Th17 细胞、Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞检测情



A: EAN 模型组; B: 黄连温胆汤  $6.79 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; C: 黄连温胆汤  $26.89 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组

图 2 坐骨神经中 T 细胞、巨噬细胞浸润情况 ( $\times 400$ )

表 2 T 细胞、巨噬细胞面积占坐骨神经横切片面积的百分比 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	T 细胞/%	巨噬细胞/%
正常	-	-	-
EAN 模型	-	$0.56 \pm 0.11$	$6.1 \pm 1.37$
黄连温胆汤	6.79	$0.33 \pm 0.09^{1)}$	$3.63 \pm 0.89^{1)}$
	26.89	$0.23 \pm 0.07^{1,2)}$	$1.61 \pm 0.70^{1,2)}$

量明显减少 ( $P < 0.05$ ), Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞含量明显增加 ( $P < 0.05$ ) 见表 3。

表 3 外周血中 Th17 细胞和 Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞比例 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

分组	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Th17 细胞 $/\%$	Foxp3 <sup>+</sup> Treg 细胞 $/\%$
正常	-	$1.19 \pm 0.26$	$5.01 \pm 0.94$
EAN 模型	-	$3.60 \pm 0.39^{1)}$	$6.24 \pm 0.72^{1)}$
黄连温胆汤	6.79	$2.71 \pm 0.39^{2)}$	$9.18 \pm 1.00^{2)}$
	26.89	$1.88 \pm 0.47^{2,3)}$	$15.06 \pm 1.35^{2,3)}$

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 EAN 模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 HL 低组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 4 同)。

况 EAN 模型组外周血中 Th17 细胞、Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞显著高于正常组 ( $P < 0.05$ )。与 EAN 组比较, HL 低组和 HL 高组大鼠外周血中 Th17 细胞含量显著减少 ( $P < 0.05$ ), Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞含量显著增加 ( $P < 0.05$ )。HL 高组与 HL 低组比较, Th17 细胞含

3.4 淋巴结中细胞因子表达情况 EAN 模型组大鼠淋巴结中 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 的 mRNA 表达水平较正常组显著升高 ( $P < 0.05$ )。HL 低组和 HL 高组大鼠淋巴结中 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 的

mRNA 表达水平较 EAN 模型组显著下降 ( $P < 0.05$ )。HL 高组与 HL 低组比较, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-

6, IL-17 的 mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3, 表 4。

表 4 淋巴结中细胞因子 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

分组	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TNF- $\alpha$ mRNA	IFN- $\gamma$ mRNA	IL-6 mRNA	IL-17 mRNA
正常	-	0.17 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.08	0.36 $\pm$ 0.09
EAN 模型	-	0.63 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	0.75 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	0.97 $\pm$ 0.15 <sup>1)</sup>	1.29 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>
黄连温胆汤	6.79	0.45 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>	0.60 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	0.74 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	1.04 $\pm$ 0.17 <sup>2)</sup>
	26.89	0.38 $\pm$ 0.02 <sup>2,3)</sup>	0.45 $\pm$ 0.08 <sup>2,3)</sup>	0.34 $\pm$ 0.13 <sup>2,3)</sup>	0.63 $\pm$ 0.17 <sup>2,3)</sup>

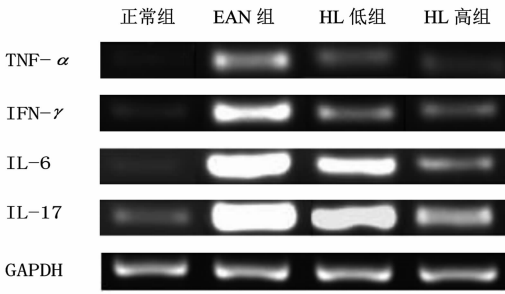


图 3 淋巴结中细胞因子 mRNA 表达

#### 4 讨论

依据 GBS 的主要表现为四肢对称性迟缓性瘫痪, 应属中医“痿病”范畴。《素问·生气通天论》云: “因于湿, 首如裹, 湿热不攘, 大筋软短, 小筋弛长, 软短为拘, 弛长为痿。”我们通过长期的临床观察发现 GBS 患者中医辨证确是多为湿热证, 与《素问》记载一致。

黄连温胆汤出自清代陆廷珍的《六因条辨》, 其功效为清热燥湿, 理气化痰。近年, 一些学者研究发现温胆汤有一定的神经保护和抑炎作用。胡亚萍等<sup>[4]</sup>发现加味温胆汤对  $A\beta_{25-35}$  神经毒性有拮抗作用, 杨翠萍等<sup>[5]</sup>研究结果表明温胆汤对精神分裂症模型鼠海马的病理损伤有一定的保护作用。刘莉等<sup>[6]</sup>通过实验证明黄连温胆汤能够抑制炎症反应, 降低代谢综合征大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-6 水平。本研究中应用黄连温胆汤加减方对 EAN 大鼠进行干预, 结果发现: 黄连温胆汤加减方可明显的减轻 EAN 病情, 减轻周围神经中的炎性反应和髓鞘脱失, 减少 T 细胞、巨噬细胞浸润, 使 EAN 大鼠外周血中 Th17 细胞减少, Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞增加, 而且, 黄连温胆汤加减方干预的 EAN 大鼠淋巴结中多种促炎细胞因子 mRNA 表达下降。

在病理方面, 活化的自身反应辅助性 T 细胞, 可识别抗原呈递细胞上的周围神经自身抗原, 对 EAN 的启动起着重要作用<sup>[7]</sup>。活化的巨噬细胞通过直接吞噬攻击和分泌炎症介质引发髓鞘脱失。清

除巨噬细胞并抑制他们的活性可抑制 EAN 的发展<sup>[8]</sup>。在我们的研究中发现黄连温胆汤可减少 T 细胞、巨噬细胞在周围神经系统中的浸润, 因此, 它能够减轻局部炎症和髓鞘脱失, 改善 EAN 病情。

促炎细胞因子如 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17, 在 EAN 中起着启动和促进作用<sup>[9]</sup>。IFN- $\gamma$  通过激活巨噬细胞释放氧自由基, 促进 T 细胞和巨噬细胞向周围神经系统移行, 增加血-神经屏障的通透性, 诱导巨噬细胞上 MHC II 类分子表达, 从而促进 EAN 炎症和随后的免疫反应。TNF- $\alpha$  在 EAN 中主要由巨噬细胞、T 细胞和施万细胞产生, 它能激活巨噬细胞和施万细胞并且增加血-神经屏障的通透性, 从而促进 EAN 的发生。IL-6 是一种主要的免疫反应介质。IL-6 在 EAN 中的作用包括刺激 B 细胞, 诱导急性期反应并且损伤血神经屏障的完整性。IL-17 是由 Th17 细胞产生。它刺激 IL-6、氧化亚氮 (NO) 和前列腺素 E<sub>2</sub> 的产生从而扩大局部炎症, 间接趋化中性粒细胞和单核细胞向炎症部位移行, 并且增加 ICAM-1, 促进 T 细胞激活<sup>[10-11]</sup>。黄连温胆汤加减方减少了促炎细胞因子如 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 的表达, 并可能因此减轻 EAN 的自身免疫应答。

Th17 细胞分泌 IL-17 和 IL-17F 并在宿主防御抵抗细胞外病原体和诱导自身免疫的组织损害及炎症过程中起着决定性的作用。现已证实 Th17 细胞的病理的作用是促发多种自身免疫和炎症性疾病, 包括类风湿性关节炎、多发性硬化、哮喘、狼疮等<sup>[10]</sup>。IL-6 是已知的对初始辅助性 T 细胞向 Th17 细胞分化起着重要作用的细胞因子。在本研究中, 通过黄连温胆汤加减方治疗, EAN 大鼠淋巴结中 IL-6, IL-17 的 mRNA 表达显著的减少, 外周血中 Th17 细胞减少。

Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞抑制免疫系统的激活, 并因此预防了过度的炎症反应和 (或) 自身免疫, 从而致免疫耐受和免疫稳态<sup>[12]</sup>。有证据显示 Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞能够减弱自身免疫疾病实验动物模型中 (包括关

节炎、结肠炎、糖尿病、自身免疫性脑脊髓炎、狼疮等)的免疫应答<sup>[13]</sup>。在 EAN 中,我们的研究数据显示外周血中 Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞增多,可能抑制了自身免疫性神经炎。因此,黄连温胆汤加减方诱导外周血中 Foxp3<sup>+</sup>细胞的增加可以减轻 EAN 炎症。

在本研究中,黄连温胆汤加减方能够抑制 EAN 大鼠的自身免疫反应,对 EAN 有治疗作用,我们可依此对 GBS 患者进行辨证治疗。

#### [参考文献]

[ 1 ] 吴云,王化冰,王维治. 实验性自身免疫性神经炎相关细胞的免疫机制 [J]. 中华神经科杂志, 2006, 39 (9):629.

[ 2 ] Cavaletti G, Mata S, Fasano A, et al. Lipid-free versus lipid-bound P2 protein-induced experimental allergic neuritis: clinicopathological, neurophysiological, and immunological study [J]. J Neurosci Res, 2000, 62 (5): 709.

[ 3 ] Hartung H P, Schafer B, Heining K, et al. The role of macrophages and eicosanoids in the pathogenesis of experimental allergic neuritis. Serial clinical, electrophysiological, biochemical and morphological observations [J]. Brain, 1998, 111 (10): 1039.

[ 4 ] 胡亚萍,王平,胡永年,等. 加味温胆汤含药脑脊液抗 A $\beta$  细胞毒性作用及其机制的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13 (7): 26.

[ 5 ] 杨翠萍,蔡长春,杨晓金,等. 温胆汤对精神分裂症模型鼠海马谷氨酸和 N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17

(9):152.

[ 6 ] 刘莉,隋艳波. 黄连温胆汤加减对代谢综合征大鼠胰岛素抵抗及脂肪细胞因子的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38 (3): 385.

[ 7 ] Schabet M, Whitaker J N, Schott K, et al. The use of protease inhibitors in experimental allergic neuritis [J]. J Neuroimmunol, 1991, 31 (3): 265.

[ 8 ] Maurer M, Toyka K V, Gold R. Cellular immunity in inflammatory autoimmune neuropathies [J]. Rev Neurol, 2002, 158 (12): S7.

[ 9 ] Zhu J, Mix E, Link H. Cytokine production and the pathogenesis of experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barre syndrome [J]. J Neuroimmunol, 1998, 84 (1): 40.

[ 10 ] Bettelli E, Korn T, Oukka M, et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells [J]. Nature, 2008, 453 (7198): 1051.

[ 11 ] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8 (5): 337.

[ 12 ] Tang Q, Bluestone J A. The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation [J]. Nat Immunol, 2008, 9 (3): 239.

[ 13 ] O'Connor R A, Anderton S M. Multi-faceted control of autoaggression: Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in murine models of organ-specific autoimmune disease [J]. Cell Immunol, 2008, 251 (1): 8.

[责任编辑 聂淑琴]