

白芍总苷对实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠 血清 Th1 型细胞因子的影响

徐晓娅¹, 郭晓聪², 李作孝^{3*}, 黄琳明¹

(1. 自贡市第一人民医院神经内科, 四川 自贡 643000; 2. 自贡市第一人民医院检验科, 四川 自贡 643000; 3. 泸州医学院附属医院神经内科, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的:**探讨白芍总苷(TGP)对实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)发病的治疗作用及其免疫学机制。**方法:**将 50 只大鼠随机分为正常对照组, EAE 对照组及低, 中, 高剂量 TGP 治疗组, 低, 中, 高剂量 TGP 治疗组大鼠造模后分别 ig TGP 50, 100, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹, EAE 对照组大鼠造模后 ig 等量生理盐水, 观察各组的发病情况及血清中 Th1 型细胞因子 γ 干扰素 (IFN- γ), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平的变化。**结果:**TGP 各剂量治疗组的症状均较 EAE 对照组轻, 发病潜伏期均较 EAE 对照组明显延长, 高峰期症状评分均较 EAE 对照组明显降低; 各 TGP 治疗组治疗后血清 IFN- γ , TNF- α 水平均显著低于 EAE 对照组。上述改变呈剂量依赖性。**结论:**TGP 对 EAE 具有治疗作用, 其治疗效果呈剂量依赖性; 其治疗机制与抑制 Th1 型细胞因子 (IFN- γ , TNF- α) 产生有关。

[关键词] 白芍总苷; 实验性变态反应性脑脊髓炎; γ 干扰素; 肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0185-03

Effect of Total Glucosides of Peony on Th1 Cytokines in Experimental Allergic Encephalomyelitis Rats

XU Xiao-ya¹, GUO Xiao-cong², LI Zuo-xiao^{3*}, HUANG Lin-ming¹

(1. Department of Neurology of Zigong First People's Hospital, Zigong 643000, China;

2. Department of Clinical Laboratory of Zigong First Peoples Hospital, Zigong, 643000, China;

3. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Luzhou Medcial College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of total glucosides of peony (TGP) on experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and the possible immunologic mechanisms. **Method:** Fifty female rats were randomly divided into five groups: the normal group, EAE model group and TGP low, medium, high dose, 10 rats each group. TGP low, medium and high dose group were ig given 50, 100, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹, while the EAE model group was given equal dose of physiological salt water. The latent period and the maximal disease score of the rats and the level of Th1 cytokines interferon gamma (IFN- γ) and tummor necrosis factor alpha (TNF- α) in blood serum were observed. **Result:** Each dose group of TGP had lighter symptoms than the EAE model group, the latent period was longer and the maximal disease score was lower than EAE model group. The level of TNF- α and IFN- γ in blood serum was lower than the EAE model group, which shoued a manner of dose-effect dependent. **Conclusion:** TGP has therapeutical effect on EAE, and the effect may be related to the decreased level of IFN- γ and TNF- α .

[Key words] total glucosides of peony; experimental allergic encephalomyelitis; interferon gamma; tummor necrosis factor alpha

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)被广泛认为是一种累及中枢神经系统(CNS)白质的自身免疫性脱髓鞘性疾病。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是公认的研究 MS 的理想动物模型。临床上 MS 的治疗多采用皮质类固醇激素及非特异性免疫抑制剂,虽有一定疗效,但毒副作用大而不宜长期使用。白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)是中药白芍根中提取的有效成分,已见临床应用于类风湿关节炎,系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的报道。但关于其与 MS 的研究报道甚少。本实验通过制作 EAE 大鼠模型并进行不同剂量 TGP 干预,探讨 TGP 对 EAE 发病及血清 Th1 型细胞因子 γ 干扰素(IFN- γ),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平的影响。

1 材料

1.1 动物 雌性 Wister 大鼠,50 只,6~8 周龄,体重 180~220 g;豚鼠 5 只,体重 400~450 g。以上动物由泸州医学院实验动物科提供。合格证号(川)医动字第 240235。

1.2 药品及试剂 白芍总苷胶囊(帕夫林,三九医药股份有限公司,以白芍总苷计 0.3 g/粒)。弗氏完全佐剂,购自美国 Sigma 公司;TNF- α 检测试剂盒,购自北京华英生物技术研究所;IFN- γ ELISA 试剂盒,购自晶美生物工程有限公司;中性甲醛固定液由泸州医学院病理教研室提供。

1.3 仪器 1/万精度的电子天平(德国 Sartorius 公司生产),TJ-6 Centrifuge 低温离心机(美国 Beckman),GC-911- γ 放射免疫计数器(中国科技大学实业总公司)。

2 方法

2.1 大鼠分组及 EAE 模型的建立^[1] 将 50 只雌性大鼠随机分为正常对照组,EAE 对照组及低,中,高剂量 TGP 治疗组,每组 10 只。将 5 只豚鼠处死后,在无菌操作下,迅速剥出脊髓,去掉马尾与脊膜,称重,加入生理盐水研磨成 50% 匀浆,与等量福氏完全佐剂混合,用注射器反复抽打成油包水乳液,即制得粗制碱性髓鞘蛋白(MBP)抗原。将 MBP 抗原注入 EAE 对照组和低、中、高剂量 TGP 治疗组大鼠双后肢足垫皮下,每只每侧 0.2 mL。正常对照组在同部位注射等剂量生理盐水。

2.2 模型干预 EAE 模型建立后常规饲养,于造模当天开始,低、中、高剂量 TGP 治疗组分别给予白芍总苷 50,100,200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ig,每天 1 次,连续 20 d;给药容积均为 10 mL·kg⁻¹。正常对照组及

EAE 模型组每日给予等量生理盐水 ig,连续 20 d。

2.3 神经功能评分及评分标准^[1] 于建模后第 1 天开始(建模当天计为第 1 天),每日同一时段由同一人单盲观察发病情况,进行神经功能评分。0 分:无明显异常;1 分:后肢不全瘫痪;2 分:后肢完全瘫痪;3 分:后肢全瘫伴前肢不全瘫;4 分:四肢全瘫或死亡;症状介于两条标准之间者以 ± 0.5 分计。

2.4 实验终止时间确定 EAE 对照组及各 TGP 治疗组大鼠四肢瘫痪,死亡或连续 3 d 症状评分无加重时作为 EAE 发病的高峰期,处死动物;未发病的动物观察 8 周后处死,正常对照组 8 周后处死。

2.5 血清 IFN- γ , TNF- α 水平的测定 实验终止时,每只大鼠经眶静脉丛取血 3~5 mL,分别采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验和放射免疫分析技术测定血清中 IFN- γ , TNF- α 的含量,检测方法按说明书进行。

2.6 统计学方法 统计学处理由 SPSS 16.0 软件完成。所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间样本均数比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 EAE 大鼠发病的影响 正常对照组大鼠未见异常表现,体重正常增加。EAE 对照组及 TGP 各剂量治疗组发病动物表现为脱毛,食欲减退,体重下降显著,出现不同程度的肢体无力,共济失调,瘫痪等,部分动物伴尿便失禁,抽搐等,但各 TGP 治疗组发病均较 EAE 对照组轻,呈剂量依赖性,以高剂量组最轻。EAE 对照组和低、中、高剂量 TGP 治疗组发病潜伏期,高峰期症状评分见表 1。

表 1 TGP 治疗对 EAE 大鼠发病潜伏期及高峰期症状评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	潜伏期 /d	高峰期症状评分 /分
EAE 对照	-	11.9 \pm 3.0	3.25 \pm 0.89
TGP 治疗	50	15.0 \pm 2.8 ¹⁾	2.40 \pm 0.99 ¹⁾
	100	17.4 \pm 3.2 ²⁾	1.50 \pm 0.85 ^{2,3)}
	200	22.0 \pm 3.2 ^{2,4,5)}	1.10 \pm 0.61 ^{2,4)}

注:与 EAE 对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 TGP 低剂量治疗组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与 TGP 中剂量治疗组比较⁵⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

从表 1 结果可以看出 低,中,高剂量 TGP 治疗组大鼠潜伏期均较 EAE 对照组延长,高峰期神经功能障碍评分均较 EAE 对照组减低,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),作用是剂量依赖性趋势。中、高剂量 TGP 治疗组高峰期神经功能障碍评

分均显著低于低剂量组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

3.2 大鼠血清 IFN- γ , TNF- α 水平变化 EAE 对照组 IFN- γ , TNF- α 水平均明显高于正常对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 EAE 对照组比较, 低, 中, 高剂量 TGP 治疗组血清 IFN- γ , TNF- α 水平明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 作用随剂量增加而增强。见表 2。

表 2 TGP 治疗对 EAE 大鼠血清 IFN- γ , TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IFN- γ	TNF- α
正常对照	-	0.33 ± 0.08 ²⁾	1.20 ± 0.34 ²⁾
EAE 对照	-	0.77 ± 0.09	2.94 ± 0.42
TGP	50	0.70 ± 0.09 ¹⁾	2.52 ± 0.40
	100	0.60 ± 0.05 ^{1,2,4)}	1.76 ± 0.36 ^{1,2,4)}
	200	0.35 ± 0.08 ^{2,4,5)}	1.51 ± 0.39 ^{2,4)}

4 讨论

EAE 作为一种中枢神经系统变态反应性脱髓鞘病变模型, 是世界公认的研究人类 MS 的动物模型。其发病机制是 T 细胞亚群比例失调或功能异常。CD4⁺ Th 细胞是 MS 发病过程中的主要效应细胞, 按其产生的细胞因子的不同分为 Th1 和 Th2 两类。Th1 型细胞因子包括 IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , INF- γ 等, 是导致 EAE 发病或复发的根源^[2]; Th2 型细胞因子主要包括 IL-10, IL-4 等, 对 EAE 的发病具有抑制作用。正常情况下, 二者处于动态平衡状态, 以维持机体正常的免疫功能; 而疾病状态下, Th0 细胞受特异性抗原刺激可向 Th1 或 Th2 方向分化, 导致 Th1/Th2 平衡失调而产生免疫漂移现象。目前一致认为 MS 是以 Th1 类反应占主导地位^[3]。

TGP 是由芍药植物根中提取的一组糖苷类物质, 包括芍药苷, 羟基芍药苷, 芍药花苷, 芍药内酯苷, 苯甲酰芍药苷, 是白芍的主要有效成分, 具有免疫调节, 抗炎等作用^[4]。

而 TGP 是否对中枢神经系统自身免疫性疾病的代表性疾病 MS 具有保护作用呢? 朱骏^[5]观察了 TGP 主要的药物活性成分芍药苷 (paeoni flori, PF) 对少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) EAE 小鼠模型的细胞免疫学变化, 细胞因子 mRNA 表达和 I κ Ba 的影响, 结果发现 PF 能够缓解 MOG EAE 小鼠炎性脱髓鞘过程, 炎性细胞的浸润明显减少, 脊髓髓鞘空泡样变现象明显减轻, 轴索损伤也显著减少; PF 能使 MOG EAE 小鼠模型脊髓内神经炎性反应缓解, 机制可能与下调致炎性细胞因子和上调抑制性细胞因子, 减低 MOG35-55 特异性淋巴细胞增殖反应, 上调

CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞, 抑制 NF- κ B 的活化, 下调 iNOS 表达和 NO 合成有关。

本研究结果提示, 正常对照组大鼠未发病, EAE 对照组及高, 中, 低剂量 TGP 治疗组大鼠经过一定潜伏期后均出现不同程度的 EAE 症状, 提示造模成功。从 TGP 对 EAE 模型大鼠发病的影响可以看出, TGP 具有延长 EAE 动物发病潜伏期, 减轻神经功能损害程度的作用, 故对 EAE 具有明显的保护作用, 其保护作用大小呈剂量依赖关系。经过对各组大鼠 TGP 治疗后血清 Th1 型细胞因子 IFN- γ , TNF- α 水平的测定可以看出, EAE 组大鼠血清 IFN- γ , TNF- α 水平明显高于正常对照组, 支持 EAE 中以 Th1 类反应为主的观点, 说明 Th1 型细胞因子 IFN- γ , TNF- α 在 EAE 发病中具有重要作用。不同剂量 TGP 治疗组大鼠血清 IFN- γ , TNF- α 水平均较 EAE 对照组明显减低, 且相对应的大鼠临床症状明显减轻, 以大剂量组作用更明显, 提示 TGP 对 EAE 大鼠的治疗作用可能通过抑制 Th1 型细胞因子 IFN- γ , TNF- α 产生有关。

Th1 类反应增强在 EAE 发病中具有重要作用, 故使用免疫调节剂抑制 Th1 细胞因子可能是 EAE 与 MS 治疗的一种有效途径。TGP 在治疗 MS 中的作用还只处于 EAE 的实验研究阶段, 相信随着对其作用机制研究的深入, TGP 通过发挥其抑制 Th1 型细胞因子等作用, 必将在防治 MS 的临床应用中扮演重要角色。

[参考文献]

- [1] 董梅, 刘瑞春, 郭力, 等. Wistar 大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎的模型建立 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2004, 12(6): 425.
- [2] Linker Israelin M, Elstner E, Klinenberg J. Vitamin D3 and its synthetic analogs inhibit the spontaneous *in vitro* immunoglobulin production by SLE-derived PBMC [J]. Immunol, 2001, 99(1): 82.
- [3] Nakajima H, Fukuda K, Doi Y, et al. Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis [J]. Eur Neurol, 2004, 52(3): 162.
- [4] 马丽, 李作孝. 白芍总苷的免疫调节功能及其临床应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 244.
- [5] 朱骏. 芍药甙在 MOG EAE 小鼠模型中的神经保护作用及其机制的研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2007.

[责任编辑 聂淑琴]