

## 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

樊永平<sup>1\*</sup>, 宋丽君<sup>1</sup>, 叶明<sup>1</sup>, 周莉<sup>1</sup>, 龚海洋<sup>1</sup>, 王蕾<sup>2</sup>, 刘妍<sup>2</sup>

(1. 首都医科大学附属北京天坛医院, 北京 100050;

2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的: 观察大鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)模型脑、脊髓组织转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 免疫组化和 T 淋巴细胞亚群的表达, 比较二黄方两种剂型(汤剂、胶囊剂)作用差异。方法: 用髓鞘碱性蛋白(Myelin Basic Protein, MBP)免疫 Lewis 大鼠诱导 EAE 模型, 随机分为正常组、模型组、泼尼松组、二黄汤组及二黄胶囊组, 分别于免疫后 15 d(急性期发病)和免疫后 27 d(缓解期)随机选取各组大鼠, 取脑和脊髓组织切片进行 IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , MMP-9, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> 免疫组化染色。结果: 与模型组比, 二黄汤(免疫后 27 d)和二黄胶囊(免疫后 15 d 和 27 d)显著提高脑组织 TGF- $\beta$  表达; 二黄汤和胶囊均能显著降低免疫后 15 d, 27 d 脑和脊髓组织 IFN- $\gamma$ , MMP-9 表达。二黄汤、二黄胶囊组免疫后 15 d, 27 d 脑和脊髓组织 IFN- $\gamma$ 、免疫后 15 d 脑和脊髓组织 MMP-9 表达降低作用强于泼尼松组。与模型组比, 二黄汤组免疫后 15 d, 27 d 脑组织 CD4<sup>+</sup> 表达显著降低、CD8<sup>+</sup> 表达显著升高, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 显著降低, 免疫后 15 d CD19<sup>+</sup> 表达降低; 二黄胶囊组除免疫后 15 d 脑组织 CD8<sup>+</sup> 与模型组无显著差异外, 其他均同二黄汤组。与模型组比, 二黄汤组免疫后 15 d, 27 d 脊髓组织 CD4<sup>+</sup> 表达显著降低、CD8<sup>+</sup> 表达显著升高, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 显著降低, 二黄胶囊组免疫后 15 d, 脊髓组织 CD4<sup>+</sup> 表达显著降低、CD8<sup>+</sup> 表达显著升高, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 显著降低, 27 d CD4<sup>+</sup> 表达显著降低、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 显著降低。二黄汤和二黄胶囊组间比较无显著差异。结论: 二黄汤、二黄胶囊可上调 EAE 大鼠中枢神经系统 TGF- $\beta$  表达, 作用同泼尼松。两者均可显著降低脑和脊髓组织 IFN- $\gamma$ 、MMP-9 表达, 作用优于泼尼松。二黄汤、胶囊均可降低 CD4<sup>+</sup> 表达、升高 CD8<sup>+</sup> 表达, 改善 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值。二黄方对上述指标的影响, 可能是其减轻 EAE 神经损伤, 改善患者临床症状的部分机理所在。

[关键词] 自身免疫性疾病; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 细胞因子; 二黄汤; 二黄胶囊

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0142-05

### Influence of Erhuang Capsule on the Immunohistochemical Expression of IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , MMP-9 and Lymphocyte Subsets in Central Nervous System of EAE Rat

FAN Yong-ping<sup>1\*</sup>, SONG Li-jun<sup>1</sup>, YE Ming<sup>1</sup>, ZHOU Li<sup>1</sup>, GONG Hai-yang<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>

(1. Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the immunohistochemical expression of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and lymphocyte subsets in brain and spinal cord tissue of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) rats, and explore the mechanism of Erhuang Capsule,

[收稿日期] 2009-11-17

[基金项目] 北京市中医药科技发展基金(2003-21); 北京市中医药重点学科基金(2004京中重 14); 北京市自然科学基金(7062022); 国家自然科学基金(30640069); 首都医学发展基金重大联合项目(2005-SF-001)

[通讯作者] \* 樊永平, Tel(010) 67096665; E-mail: Yongpingf@hotmail.com

comparing the differences in action for the two dosage forms( capsule and decoction) . **Method:** Lewis rats were immunized with the myelin basic protein ( MBP) . Rats were divided randomly into normal-group, EAE-group, prednisone-group, Erhuang Decoction group and Erhuang Capsule group after post immunization ( PI) . On the day 15<sup>th</sup> and the day 27<sup>th</sup> of PI, rats were killed and the immunohistochemical staining of IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 、MMP-9、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> was performed on the sections of brain and spinal cord. **Result:** Compared with the EAE-group, Erhuang Decoction ( on day 27<sup>th</sup> PI) and Erhuang Capsule ( on day 15 and 27 PI) both can raise the expression of TGF- $\beta$  in brain tissue. Erhuang Decoction, Erhuang Capsule and prednisone can decrease the expression of IFN- $\gamma$  and MMP-9 in brain tissue and spinal cord tissue on day 15<sup>th</sup> and 27<sup>th</sup> PI; compared with the prednisone, Erhuang Decoction and Erhuang Capsule can decrease the expression of IFN- $\gamma$  in brain tissue and spinal cord tissue on day 15<sup>th</sup> and 27<sup>th</sup> PI, they can also decrease the expression of MMP-9 in brain tissue and spinal cord tissue on day 15<sup>th</sup> PI. Compared with the EAE-group, the expression of CD4<sup>+</sup> in brain tissue of Erhuang Decoction group was significantly lower than that of EAE-group on day 15<sup>th</sup> and 27<sup>th</sup> PI, while the expression of CD8<sup>+</sup> raised and CD4<sup>+</sup> /CD8<sup>+</sup> decreased ( The expression of CD19<sup>+</sup> decreased on day 15<sup>th</sup> PI) . On day 15<sup>th</sup> PI, there is no difference in the expression of CD8<sup>+</sup> between the Erhuang Capsule group and EAE-group, others were the same as Erhuang Decoction group. Compared with the EAE-group, the expression of CD4<sup>+</sup> in spinal cord tissue of Erhuang Capsule group was significantly lower than that of EAE-group on day 15<sup>th</sup>, while the expression of CD8<sup>+</sup> raised and CD4<sup>+</sup> /CD8<sup>+</sup> decreased, on day 27<sup>th</sup> PI, the expression of CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> /CD8<sup>+</sup> was decreased. There was no statistical difference between Erhuang Decoction and Erhuang Capsule. **Conclusion:** Erhuang Decoction and Erhuang Capsule both have the effect on upregulating the immunohistochemical expression of TGF- $\beta$  in central nervous system of EAE rats, playing the same role as prednisone. They can also downregulate the expression of IFN- $\gamma$  and MMP-9, are better than prednisone. Erhuang Decoction and Erhuang Capsule also can downregulate the expression of CD4<sup>+</sup> and upregulate the expression of CD8<sup>+</sup>, to improve the ratio of CD4<sup>+</sup> /CD8<sup>+</sup>. The impact on indexes described above may be the functional mechanism of Erhuang Decoction and Erhuang Capsule. There was no significant difference between Erhuang Decoction and Erhuang Capsule.

**[ Key words ]** autoimmune diseases; experimental autoimmune encephalomyelitis; cytokines; Erhuang Decoction; Erhuang Capsule

多发性硬化( multiple sclerosis, MS) 是中枢神经系统常见自身免疫性脱髓鞘疾病。我们通过临床实践创立了二黄方, 初步临床观察结果表明, 二黄方煎剂对急性发作 MS 患者的肢体麻木、疼痛有显著的改善作用, 对肢体瘫痪、视力障碍也有一定的改善作用, 具有潜在的降低复发的作用。调节患者脑脊液中细胞因子如单核巨噬细胞因子蛋白 1 ( monocyte protein-1, MCP)、组织生长因子 ( growth factor- 1, TGF- 1) 含量, 这可能是二黄方临床作用的部分机制。动物实验显示, 二黄方煎剂对急性自身免疫性脑脊髓炎( EAE) 大鼠血 T 细胞亚群和血液、脑脊液中细胞因子网络具有调节作用, 能减轻髓鞘和轴索损伤, 促进损伤组织的修复<sup>[1-4]</sup>。我们将二黄方加工成胶囊, 对二黄汤和二黄胶囊的作用进行了比较研究。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 Lewis 大鼠, 雄性, 体重 200 ~ 250 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [ 许可证号 SCXK( 京) 2007-0001 ], 饲养于首都医科大学实验动物中心国家标准实验室。

**1.2 药物及试剂** 二黄方组成: 熟地黄 12 g, 生地黄 12 g, 制首乌 15 g, 水蛭 5 g, 浙贝母 9 g, 全蝎 3 g, 连翘 12 g, 天麻 3 g, 益母草 15 g, 酒大黄 3 g。二黄汤按上方比例水煎成剂, 每 1 mL 含生药 0.7 g。二黄胶囊按上方比例加工, 制剂工艺: 以上 10 味, 浙贝母粉碎成细粉, 过筛; 其余 9 味加水煎煮 2 次, 第 1 次加水 10 倍量, 第 2 次加水 8 倍量, 每次 2 h, 合并煎液, 滤过, 滤液减压浓缩成稠膏, 70 ℃ 减压干燥, 粉碎成细粉, 加入浙贝母细粉和适量糊精, 混匀, 装入胶囊, 即得。1 g 浸膏粉相当于 2.49 g 生药; 醋酸泼

尼松由天津力生制药厂提供,批号 060802;完全福氏佐剂(CFA) Sigma 公司提供,批号 F7881;MBP87-99(human, bovine, rat) 由美国 ALEXIS 生物化学公司提供,批号 16752/a;基质金属蛋白酶-9(MMP-9,批号 bs-0397R)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ,批号 bs-0480R)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ ,批号 bs-0103R)、CD3 $^+$ (批号 bs-0550R)、CD4 $^+$ (批号 bs-0647R)、CD8(批号 bs-0648R)、CD19(批号 bs-0079R)免疫组化试剂盒,购于北京博奥森生物技术有限公司。

## 2 方法

**2.1 诱导 EAE 模型** 将 125  $\mu$ L MBP87-99 水溶液(含 MBP87-99 150  $\mu$ g)与 125  $\mu$ L CFA 混合,充分乳化制成抗原配剂。当天给予 Lewis 大鼠双后足垫 sc 多点注射 250  $\mu$ L 抗原配剂,免疫诱导 EAE。正常对照组则予足垫 sc 250  $\mu$ L 生理盐水。

**2.2 分组及药物干预** 按组别分别作以下处理:正常对照组每天生理盐水 ig,连续 27 d;模型组免疫后每天生理盐水 ig,连续给予 27 d;激素组免疫后每天生理盐水 ig,发病后(大鼠尾部张力降低)改为醋酸泼尼松混悬液(5 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ) ig,给药至免疫后第 27 天;二黄汤组免疫后每天二黄汤(10.5 g $\cdot$ kg $^{-1}$ ) ig,连续给药 27 d;二黄胶囊组免疫后每天二黄胶囊混悬液(10.5 g $\cdot$ kg $^{-1}$ ) ig,连续给药 27 d。每组 24 只。

**2.3 取材** 分别于造模后 15 d(急性期)和 27 d(缓解期)处死大鼠。用 10% 水合氯醛 4 mL $\cdot$ kg $^{-1}$  ip 麻醉大鼠,麻醉后,将大鼠置仰卧位,开腹,从大鼠肋骨两侧剪断肋骨,开胸,暴露心脏,用钝针经心尖部略左(左心室)进针,插入至升主动脉,用止血钳将针头固定好,剪开右心耳,立即用生理盐水灌洗,直至右心耳流出液体清亮,约 200 ~300 mL;关闭灌注泵开关,换 4% 多聚甲醛灌注固定,先快后慢,直至大鼠变硬,每只约用多聚甲醛 200 ~300 mL,剥离脑和脊髓,放入 4% 多聚甲醛液中固定。

**2.4 石蜡切片 TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9, CD4 $^+$ , CD8 $^+$ , CD3 $^+$ , CD19 $^+$  免疫组化染色** 按照试剂盒说明书操作。将脑和脊髓组织冲洗干净,脱水、包埋、连续切片,片厚 5  $\mu$ m。石蜡切片脱蜡至水。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 5 min  $\times$ 3 次。滴加适当比例稀释的 TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9, CD4 $^+$ , CD8 $^+$ , CD3 $^+$ , CD19 $^+$  抗体,37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 冲洗 5 min  $\times$ 3 次。25  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 4  $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 2 min  $\times$ 3 次;滴加生物素标记羊抗兔 IgG,室温下 20 min, PBS 洗 2 min  $\times$

3 次;滴加 SABC 复合物,室温 20  $^{\circ}$ C, PBS 洗 5 min  $\times$ 4 次。DAB 显色 10 min 左右,蒸馏水多次洗涤,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树脂封片,显微镜下观察。阴性对照不加一抗,以正常山羊血清和 PBS 代替 TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9, CD4 $^+$ , CD8 $^+$ , CD3 $^+$ , CD19 $^+$  抗体作孵育。

**2.5 病理图像分析** 采用 MIAS 医学图像分析管理系统对免疫组织化学染色结果进行定量分析,每组选取 3 张切片,每张切片在大脑及脊髓白质区域随机选取 6 个高倍视野( $\times$ 400),阳性结果用积分光密度(Integral Optical Density, IOD)表示。

**2.6 统计分析** 所有数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 11.5 版软件进行方差分析。

## 3 结果

**3.1 各组大鼠急性期和缓解期脑和脊髓组织 TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9 变化** 二黄汤(免疫后 27 d)和二黄胶囊(免疫后 15 d 和 27 d)显著提高脑组织 TGF- $\beta$  表达;泼尼松也可显著提高脑组织(免疫后 27 d)和脊髓组织(免疫后 27 d) TGF- $\beta$  表达;二黄汤、二黄胶囊和泼尼松组间无显著性差异。二黄汤和胶囊均能显著降低免疫后 15 d, 27 d 脑和脊髓组织 IFN- $\gamma$ 、MMP-9 表达。二黄汤、二黄胶囊组免疫后 15 d, 27 d 脑和脊髓组织 IFN- $\gamma$ 、免疫后 15 d 脑和脊髓组织 MMP-9 表达显著低于泼尼松组。二黄汤和胶囊组间无显著性差异。见表 1 ~3。

**3.2 各组大鼠急性期和缓解期脑和脊髓组织 T 淋巴细胞亚群的表达** 与模型组比,二黄汤组免疫后 15 d, 27 d 脑组织 CD4 $^+$  表达显著降低、CD8 $^+$  表达显著升高, CD4 $^+$ /CD8 $^+$  显著降低(15 d CD19 $^+$  表达降低),二黄胶囊组除免疫后 15 d 脑组织 CD8 $^+$  与模型组无显著差异外,其他变化均同二黄汤组。泼尼松组免疫后 15 d, 27 d 脑组织 CD4 $^+$  表达显著降低、CD8 $^+$  表达显著升高, CD4 $^+$ /CD8 $^+$  显著降低, 15 d CD3 $^+$  表达显著升高、CD19 $^+$  表达显著降低。二黄汤与二黄胶囊与泼尼松组比,除无升高脑组织 CD3 $^+$ (15 d)外,其他均无显著性差异。二黄汤组免疫后 15 d, 27 d 脊髓组织 CD4 $^+$  表达显著降低、CD8 $^+$  表达显著升高, CD4 $^+$ /CD8 $^+$  显著降低,二黄胶囊组免疫后 15 d、脊髓组织 CD4 $^+$  表达显著降低、CD8 $^+$  表达显著升高, CD4 $^+$ /CD8 $^+$  显著降低, 27 d CD4 $^+$  表达显著降低、CD4 $^+$ /CD8 $^+$  显著降低,泼尼松组与二黄胶囊组作用相似。见表 4 ~5。

表 1 造模后 15, 27 d EAE 大鼠脑、脊髓组织 TGF- 值 (IOD, 聊±s, n=8)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	脑		脊髓	
		免疫后 15 d	免疫后 27 d	免疫后 15 d	免疫后 27 d
正常	—	38.52 ±8.75	46.36 ±11.59	28.14 ±12.57	22.03 ±9.15
模型	—	22.82 ±10.20	26.33 ±10.07	16.15 ±5.94	16.00 ±4.84
泼尼松	0.005	28.56 ±8.95	43.59 ±20.94 <sup>2)</sup>	25.88 ±14.31	29.50 ±6.75 <sup>1)</sup>
二黄汤	10.5	24.31 ±7.27	43.99 ±15.15 <sup>2,6)</sup>	26.48 ±10.80	26.86 ±15.88
二黄胶囊	10.5	36.58 ±14.35 <sup>1)</sup>	41.82 ±11.86 <sup>2)</sup>	25.17 ±9.21	23.21 ±4.49

注:与模型组比较,<sup>1)</sup> P<0.05,<sup>2)</sup> P<0.01;与泼尼松组比较,<sup>3)</sup> P<0.05,<sup>4)</sup> P<0.01;与免疫后 15 d 比较,<sup>5)</sup> P<0.05,<sup>6)</sup> P<0.01(下同)

表 2 造模后 15, 27 d EAE 大鼠脑、脊髓组织 IFN- 值 (IOD, 聊±s, n=8)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	脑		脊髓	
		免疫后 15 d	免疫后 27 d	免疫后 15 d	免疫后 27 d
正常	—	10.26 ±2.93	15.01 ±2.19	11.79 ±3.93	16.27 ±3.15
模型	—	27.33 ±7.83	34.03 ±10.12 <sup>5)</sup>	28.65 ±5.60	36.51 ±10.85 <sup>5)</sup>
泼尼松	0.005	20.47 ±8.42 <sup>1)</sup>	20.35 ±3.77 <sup>2)</sup>	24.26 ±4.21	24.61 ±11.01 <sup>2)</sup>
二黄汤	10.5	12.77 ±4.47 <sup>2,3)</sup>	12.70 ±2.76 <sup>2,3)</sup>	16.84 ±3.72 <sup>2,3)</sup>	16.35 ±6.09 <sup>2,4)</sup>
二黄胶囊	10.5	13.51 ±3.49 <sup>2,3)</sup>	13.92 ±3.35 <sup>2,3)</sup>	21.27 ±5.91 <sup>1)</sup>	17.38 ±6.50 <sup>2,3)</sup>

表 3 造模后 15, 27 d EAE 大鼠脑、脊髓组织 MMP-9 值 (IOD, 聊±s, n=8)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	脑		脊髓	
		免疫后 15 d	免疫后 27 d	免疫后 15 d	免疫后 27 d
正常	—	64.72 ±16.83	61.55 ±15.87	36.53 ±9.83	55.47 ±16.45
模型	—	146.52 ±39.19	104.72 ±40.05 <sup>6)</sup>	114.77 ±17.54	139.27 ±24.88
泼尼松	0.005	123.23 ±36.53 <sup>1)</sup>	78.30 ±33.11 <sup>1,6)</sup>	81.74 ±10.77 <sup>2)</sup>	73.13 ±29.38 <sup>2)</sup>
二黄汤	10.5	60.10 ±15.23 <sup>2,4)</sup>	64.82 ±10.39 <sup>2)</sup>	52.74 ±16.08 <sup>2,3)</sup>	71.98 ±18.30 <sup>2)</sup>
二黄胶囊	10.5	73.28 ±14.35 <sup>2,4)</sup>	65.81 ±14.18 <sup>2)</sup>	72.46 ±16.84 <sup>2,4)</sup>	60.97 ±26.75 <sup>2)</sup>

表 4 各组大鼠急性期和缓解期脑组织淋巴细胞亚群变化 (IOD, %, 聊±s, n=8)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	15 d					27 d				
		CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>
正常	—	21.66 ±5.05	30.82 ±7.20	0.74 ±0.24	46.48 ±20.34	26.53 ±6.78	19.20 ±6.82	30.18 ±6.45	0.67 ±0.31	51.29 ±4.00	20.93 ±3.51
模型	—	64.19 ±16.37	15.97 ±4.25	4.22 ±1.26	51.78 ±21.46	45.48 ±10.14	47.70 ±15.48 <sup>6)</sup>	11.31 ±1.55	4.22 ±1.21	51.57 ±15.18 <sup>6)</sup>	25.15 ±2.43 <sup>6)</sup>
泼尼松	0.005	28.48 ±8.69 <sup>2)</sup>	30.82 ±8.98 <sup>2)</sup>	0.98 ±0.32 <sup>2)</sup>	65.14 ±12.89	26.70 ±10.48 <sup>2)</sup>	26.89 ±7.51 <sup>2)</sup>	19.44 ±5.13 <sup>1,6)</sup>	1.43 ±0.38 <sup>2)</sup>	41.74 ±8.04	22.32 ±5.18
二黄汤	10.5	21.69 ±8.82 <sup>2)</sup>	25.54 ±8.88 <sup>1)</sup>	0.96 ±0.59 <sup>2)</sup>	44.02 ±15.84 <sup>4)</sup>	21.71 ±8.32 <sup>2)</sup>	20.88 ±6.61 <sup>2)</sup>	23.36 ±8.49 <sup>2)</sup>	1.05 ±0.59 <sup>2)</sup>	51.75 ±13.20	30.70 ±10.88 <sup>3,5)</sup>
二黄胶囊	10.5	22.75 ±5.93 <sup>2)</sup>	22.89 ±5.49 <sup>3)</sup>	1.06 ±0.45 <sup>2)</sup>	51.25 ±4.64 <sup>3)</sup>	23.88 ±8.58 <sup>2)</sup>	21.71 ±5.13 <sup>2)</sup>	21.96 ±6.43 <sup>2)</sup>	1.08 ±0.45 <sup>2)</sup>	38.07 ±17.16 <sup>3)</sup>	30.60 ±9.79 <sup>3)</sup>

表 5 各组大鼠急性期和缓解期脊髓组织淋巴细胞亚群变化 (IOD, %, 聊±s, n=8)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	15 d					27 d				
		CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>
正常	—	22.64 ±4.70	29.45 ±9.00	0.87 ±0.41	39.74 ±14.28	22.27 ±11.44	23.11 ±3.22	26.80 ±6.13	0.90 ±0.24	48.26 ±14.87	23.75 ±5.54
模型	—	49.85 ±18.25	8.97 ±1.08	5.63 ±2.12	46.17 ±20.08	24.09 ±6.60	50.66 ±13.43	14.34 ±5.07	3.86 ±1.45 <sup>2,6)</sup>	39.42 ±9.59	23.51 ±5.56
泼尼松	0.005	22.37 ±6.62 <sup>2)</sup>	20.26 ±6.88 <sup>2)</sup>	1.18 ±0.44 <sup>2)</sup>	39.93 ±6.84	28.30 ±6.92	27.46 ±12.15 <sup>2)</sup>	18.48 ±7.56	1.73 ±1.20 <sup>2)</sup>	45.09 ±11.74	24.41 ±4.65
二黄汤	10.5	22.99 ±5.16 <sup>2)</sup>	21.01 ±7.30 <sup>2)</sup>	1.18 ±0.36 <sup>2)</sup>	39.55 ±8.93	26.50 ±13.08	23.43 ±8.91 <sup>2)</sup>	24.23 ±16.11 <sup>2)</sup>	1.26 ±0.75 <sup>2)</sup>	39.66 ±6.54	29.26 ±2.82
二黄胶囊	10.5	18.62 ±5.33 <sup>2)</sup>	17.96 ±6.21 <sup>1)</sup>	1.10 ±0.38 <sup>2)</sup>	40.95 ±12.15	27.02 ±6.33	23.36 ±7.90 <sup>2)</sup>	18.38 ±8.56	1.58 ±1.11 <sup>2)</sup>	41.82 ±16.42	24.68 ±5.87

#### 4 讨论

大多数研究认为在 EAE 的免疫机制中, 特异性抗原如 MBP 诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞发生免疫应答, CD4<sup>+</sup> Th 细胞由 Th0 向 Th1, Th2 或 Th3 细胞分化。Th1 细胞主要分泌 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  等, 促进细胞介导的免疫应答, 诱导 EAE; Th2 细胞主要分泌 IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  等, 促进 B 细胞增殖, 增强抗体介导的体液免疫, 抑制 EAE<sup>[5]</sup>。细胞因子的生物效应具有多样性, 在细胞因子网络中相互影响, 发挥协同或拮抗的作用。同一因子也可能扮演不同的角色, 比如急性期抗炎为主, 缓解期则促进损伤组织的修复。

在 EAE 发作期, 主要来源于 T 淋巴细胞的 IFN- $\gamma$  能增强炎症反应、促进巨噬细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞对 MHCII 和细胞内黏附分子的表达, 并能增加血管通透性、刺激巨噬细胞释放氧自由基, 引起 EAE 病情的加重<sup>[6]</sup>。MMP-9 一方面参与基底膜和细胞外基质的主要成分 I 型胶原的降解, 破坏血脑屏障, 可促使炎细胞进入中枢神经系统<sup>[7]</sup>; 另一方面它还降解髓鞘碱性蛋白, 其降解产物能进一步增强自身免疫反应, 并造成抗原决定簇的扩散, 故被证实是 MS 及 EAE 的致病因素<sup>[8]</sup>。研究发现, EAE 大鼠脑、脊髓的单核淋巴细胞样细胞有特异性 MMP-9 表达, 且发病早期 MMP-9 阳性细胞率高于发病后期、恢复期。在疾病恢复期病变处 TGF- $\beta$  出现增多<sup>[9]</sup>, 表明 TGF- $\beta$  亦对 EAE 的恢复起作用。在该实验中, 无论在急性期还是缓解期, 可见模型组大鼠中枢神经系统中 TGF- $\beta$  表达降低, IFN- $\gamma$  和 MMP-9 表达明显升高, 与文献报道一致。二黄汤和二黄胶囊既能显著提高脑组织 TGF- $\beta$  表达, 又可显著降低脑和脊髓组织 IFN- $\gamma$ , MMP-9 表达, 且疗效与激素相比仍具一定优势。

MS 患者外周血中 CD8<sup>+</sup> 细胞显著降低, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值明显升高; 脑脊液中 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 细胞明显升高, CD8<sup>+</sup> 细胞显著低于对照组及外周血, 而 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值明显高于对照组及外周血<sup>[10]</sup>。该实验中, 二黄汤组和二黄胶囊组均可见中枢神经系统 CD4<sup>+</sup> 表达显著降低、CD8<sup>+</sup> 表达显著升高, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 显著降低, 提示二黄方可通过改善 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值使疾病向愈。

二黄方是在长期临床实践基础上总结出来的治疗多发性硬化的有效方剂。该研究表明, 二黄汤、二

黄胶囊均可上调 EAE 大鼠中枢神经系统 TGF- $\beta$  表达, 促进疾病恢复; 均可显著降低脑和脊髓组织 IFN- $\gamma$ , MMP-9 表达。此外, 二黄汤、二黄胶囊通过降低中枢神经系统 CD4<sup>+</sup>, 升高 CD8<sup>+</sup>, 改善 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值, 从而对 MS 发挥作用。二黄方对上述指标的影响, 可能是其减轻 EAE/MS 神经损伤, 改善患者临床症状的部分机理所在, 两者在临床作用方面无显著差异, 为二黄胶囊的使用提供了实验依据。

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 樊永平, 王平, 张星虎, 等. 二黄方治疗多发性硬化急性发作的临床观察[ J ]. 北京中医药大学学报, 2006, 29( 4 ): 273.
- [ 2 ] 樊永平, 王平, 张星虎, 等. 二黄方治疗多发性硬化急性发作的机理研究[ J ]. 中华中医药杂志, 2007, 22( 1 ): 25.
- [ 3 ] 樊永平, 刘秀贞, 王蕾, 等. 二黄方对 EAE 大鼠外周血 NK 细胞和细胞因子的影响[ J ]. 北京中医药大学学报, 2007, 30( 3 ): 165.
- [ 4 ] Xiuzhen Liu, Yongping Fan, Lei Wang, *et al.* Effect of *erhuangfang* on cerebral and spinal demyelination and regeneration as well as expression of glial fibrillary acidic protein in rats with experimental allergic encephalomyelitis [ J ]. *Neural regeneration research*, 2007, 2( 8 ): 491.
- [ 5 ] Luciano A, Francesco S. Pathogenesis and immunotherapy of autoimmune disease [ J ]. *Immunol Today*, 1997, 18( 5 ): 205.
- [ 6 ] Sun D. Enhanced interferon-gamma-induced Ia-antigen expression by glial cells after previous exposure to this cytokine[ J ]. *Journal of Neuroimmunology*, 1991, 34( 2-3 ): 205.
- [ 7 ] Leppert D, Waubant E, Galardy R, *et al.* T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro[ J ]. *J Immunol*, 1995, 154( 9 ): 4379.
- [ 8 ] Maeda A, Sobel R. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules and multiple sclerosis[ J ]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1996, 55( 3 ): 300.
- [ 9 ] Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain[ J ]. *Journal of Experimental Medicine*, 1992, 176( 5 ): 1355.
- [ 10 ] 高敏, 高聪, 杨宁. 地黄合剂对多发性硬化患者外周血及脑脊液中 T 淋巴细胞亚群的影响[ J ]. 中国中医药科技, 2005, 12( 4 ): 207.