

• 药理 •

# 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

刘妍, 王蕾\*, 赵晖, 穆阳, 李梦园, 李明, 齐放, 王义周  
(首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的: 观察六味地黄丸和金匱肾气丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠淋巴细胞亚群和自然杀伤(NK)细胞的影响。方法: 皮下注射髓鞘少突胶质细胞糖蛋白<sub>35-55</sub>(MOG<sub>35-55</sub>)与完全弗氏佐剂(CFA)混合的抗原, 辅以腹腔注射百日咳毒素(PTX), 建立EAE模型。每天记录各组小鼠体重及神经功能评分; 造模后第12、25及40天, 用流式细胞仪检测小鼠外周血淋巴细胞亚群及NK细胞; 取各组小鼠脑和脊髓, 进行病理观察。结果: 模型组小鼠造模后第9天开始陆续发病, 第22天达到高峰, 神经功能评分为4.0分, 体重明显降低, 淋巴细胞亚群中CD8<sup>+</sup>明显降低, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值明显升高, NK细胞水平明显降低。各治疗组小鼠的神经功能评分均比模型组降低, 病程缩短, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值及NK细胞水平基本调节至正常。病理观察发现模型组小鼠大脑和脊髓病变表现为小静脉周围炎性细胞浸润形成袖套样改变及神经核固缩。激素组、六味地黄丸组和金匱肾气丸组均有不同程度减轻, 病灶区域的炎性浸润细胞数较少, 袖套样改变少见。结论: 六味地黄丸和金匱肾气丸均有防治EAE的作用。其作用机制可能与调节细胞免疫系统有关。六味地黄丸在改善EAE小鼠体重、神经评分及调节细胞免疫等方面要优于醋酸泼尼松和金匱肾气丸。

[关键词] 六味地黄丸; 金匱肾气丸; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 细胞免疫; 小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)04-0042-06

## The Effects of Liuweidihuang Pill and Jinguishenqi Pill on Lymphocyte Subgroups and Natural Killer Cells in Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

LIU Yan, WANG Lei\*, ZHAO Hui, MU Yang, LI Meng-yuan, LI Ming, QI Fang, WANG Yi-zhou  
(School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Liuweidihuang Pill and Jinguishenqi Pill on lymphocyte subgroups and natural killer(NK) cells in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE). **Methods:** The mice were immunized subcutaneously with MOG<sub>35-55</sub> emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) and intraperitoneally Pertussis toxin (PTX) for establishing EAE model. The animals were weighted and graded daily for clinical disability. At 12, 25 and 40 days after immunization, lymphocyte subgroups and NK cells in the peripheral blood of mice were detected by flow cytometer, brain and spinal cord of the mice were harvested and the pathological changes were studied. **Results:** The mice of model group onseted in succession at day 9. The clinical symptoms climaxed at day 22 with a highest score of 4.0. The weights of the mice were lowered obviously. CD8<sup>+</sup> in the lymphocyte subgroups and NK cells were decreased obviously, the value of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> was increased obviously. Clinical score of remedial group reduced and the courses of disease were shortened. The lymphocyte subgroups and NK cells were adjusted to normal state after treated by the drugs. Pathologi-

[收稿日期] 2008-07-07

[基金项目] 北京市教育委员会科技发展计划项目(KM2007100025015)

[通讯作者] \* 王蕾, Tel: (010) 83911626; E-mail: tmwangl@ccmu.edu.cn

cally, infiltrated inflammatory cells were observed around vein to form sleeve, the nuclei were pyknosis in model group mice. The inflammatory cells foci comparatively decreased, sleeve-like changes were seldom seen in prednisone, in Liuweidihuang Pill and Jinguishenqi Pill treated groups. **Conclusions:** Liuweidihuang Pill and Jinguishenqi Pill have the effects on prevention and treatment the mice with EAE. The mechanism may regulate the cell immune system. Liuweidihuang Pill is superior to prednisone acetate and Jinguishenqi Pill in improving the weight of EAE mice, nerve score and regulating the immune cells.

[ **Key words** ] Liuweidihuang Pill; Jinguishenqi Pill; EAE; cell immunity; mice

多发性硬化(MS)是以中枢神经系统白质脱髓鞘病变为特点的自身免疫性疾病。其发病机制非常复杂,目前认为和免疫功能紊乱密切相关,主要是由自身免疫反应性 CD4<sup>+</sup> T 细胞介导的对自身组织髓鞘蛋白等起反应的 T 辅助细胞 1(Th1) 型促炎症免疫应答。临床目前尚无理想的治疗方法。据临床统计,MS 患者经常会伴有不同程度的肾阴亏虚和肾阳不足的症状,可采用滋阴、补阳的方法予以治疗<sup>[1]</sup>,而六味地黄丸和金匱肾气丸分别为中医滋阴、补阳的代表方。本文旨在通过髓鞘少突胶质细胞糖蛋白<sub>35-55</sub>(MOG<sub>35-55</sub>)制备实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)小鼠模型,从免疫学及病理学角度,研究中药复方防治 MS 的可能作用机制,为临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药品** 六味地黄丸及金匱肾气丸(又名桂附地黄丸)均为北京同仁堂生产,批号分别为:7011264,8010939。醋酸泼尼松片由天津太平洋制药有限公司生产,批号:061203。MOG<sub>35-55</sub>多肽(MEYVWYRSPFSRVVHLYRNGK,纯度 HPLC>96%)由北京中科亚光生物科技有限公司合成,批号:C213405。完全弗氏佐剂(CFA,含热灭活结核菌 H37RA 5 mg/mL)和百日咳毒素(PTX)由美国 Sigma 公司提供,批号分别为:067K8614,077K1023。抗小鼠 FITC-CD3(CAT. 11-0031-82)、抗小鼠 PE-CD4(CAT. 12-0042-81)、抗小鼠 PECy5-CD8(CAT. 15-0081-81)、PE-NK(CAT. 12-5971-81)均由美国 eBioscience 公司提供。水合氯醛(分析纯)等由北京化学试剂公司生产,批号:050902。

**1.2 动物** SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体重 18~22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。动物许可证号:SCXK(京)2007-0001。

## 2 实验方法

**2.1 模型制备** 将小鼠随机分为 2 组,实验组( $n=180$ )和正常组( $n=45$ )。实验组小鼠分别于背侧中

线两侧皮下 4 点注射 MOG<sub>35-55</sub> 与 CFA 按 1:1 混合的乳化抗原( $2\ 500\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),免疫当天及第 2 天给实验组小鼠腹腔注射 PTX 500 ng/只,诱导小鼠产生 EAE。正常组只注射生理盐水。

**2.2 处理方法** 将实验组小鼠再分为模型组、激素组、六味地黄丸组及金匱肾气丸组,每组动物 45 只。正常组、模型组、激素组发病前灌服生理盐水,激素组发病后(第 9 天)灌服醋酸泼尼松混悬液( $0.006\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,按人体重量的 9 倍计算,下同),六味地黄丸组灌服六味地黄丸混悬液( $2.31\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),金匱肾气丸组灌服金匱肾气丸混悬液( $2.31\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。每天 1 次,共 40 d。每天观察动物的发病情况,记录小鼠体重及神经功能评分,统计小鼠发病的潜伏期、发病率等。

**2.3 指标观察** 评分标准按照参考文献[2]方法并做修改:0 分:正常,未发病;1 分:鼠尾张力障碍;2 分:部分后肢瘫痪或步态不稳;3 分:完全后肢瘫痪;4 分:部分或完全前肢瘫痪;5 分:濒死状态或死亡。免疫后第 12, 25, 40 天,小鼠目内眦静脉丛取血,EDTA-2K 抗凝,流式细胞仪法检测 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 及 NK 细胞。灌注取小鼠脑及脊髓组织,放入多聚甲醛固定液中固定。常规脱水、石蜡包埋,用石蜡切片机对小鼠脑及脊髓面连续切片。经苏木精伊红染色,光学显微镜下观察其病理变化。

**2.4 统计学处理** 数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。用 SPSS 11.5 版统计软件进行统计分析,首先做正态性检验,若符合正态性应用 ANOVA,否则用秩和检验。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对小鼠发病率、潜伏期及病程的影响** 模型组小鼠的发病率为 100%,而激素组、六味地黄丸组及金匱肾气丸组发病率有所降低,分别为 53.33%, 53.33%, 73.33%,均明显低于模型组( $P<0.01$ )。激素组发病的潜伏期较模型组有明显延长( $P<$

0.01), 六味地黄丸组和金匱肾气丸组也可延长潜伏期, 但和模型组相比, 无统计学意义。而六味地黄丸组和金匱肾气丸组均能明显缩短病程 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 对小鼠发病率、潜伏期及病程的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

| 组别     | 剂量<br>( $g \cdot kg^{-1}$ ) | 发病率<br>(%)          | 潜伏期<br>(d)                      | 病程<br>(d)                       |
|--------|-----------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 模型组    | —                           | 100.00              | 13.86 $\pm$ 3.42                | 25.14 $\pm$ 3.76                |
| 激素组    | 0.006                       | 53.33 <sup>2)</sup> | 26.14 $\pm$ 12.62 <sup>2)</sup> | 23.25 $\pm$ 2.77                |
| 六味地黄丸组 | 2.31                        | 53.33 <sup>2)</sup> | 18.60 $\pm$ 8.87                | 18.00 $\pm$ 11.45 <sup>1)</sup> |
| 金匱肾气丸组 | 2.31                        | 73.33 <sup>2)</sup> | 19.13 $\pm$ 11.08               | 19.17 $\pm$ 9.27 <sup>1)</sup>  |

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

**3.2 不同时间小鼠的体重变化比较** 造模前各组间体重无统计学差异。造模后第 3 天开始, 模型组小鼠体重开始明显下降, 与正常组比较, 有显著差异 ( $P < 0.01$ )。但并未开始发病, 到第 8 天左右体重有所恢复, 但同时出现尾部下垂等症状, 第 12 天左右, 大部分小鼠陆续发病, 体重又开始下降, 并于发病高峰期第 23 天左右降到谷底, 随后开始上升, 逐渐恢

表 2 各组小鼠不同时间点神经功能评分比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

| 组别     | 剂量( $g \cdot kg^{-1}$ ) | 第 9 天           | 第 17 天                        | 第 22 天                        | 第 33 天                        | 第 40 天                        |
|--------|-------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 模型组    | —                       | 0.20 $\pm$ 0.63 | 1.36 $\pm$ 1.08               | 2.43 $\pm$ 1.02               | 1.64 $\pm$ 1.08               | 1.71 $\pm$ 1.07               |
| 激素组    | 0.006                   | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.36 $\pm$ 0.63 <sup>2)</sup> | 1.21 $\pm$ 1.19 <sup>2)</sup> | 0.93 $\pm$ 1.00 <sup>1)</sup> | 0.93 $\pm$ 1.00 <sup>1)</sup> |
| 六味地黄丸  | 2.31                    | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.50 $\pm$ 0.53 <sup>2)</sup> | 0.80 $\pm$ 1.63 <sup>2)</sup> | 0.70 $\pm$ 0.82 <sup>1)</sup> | 0.67 $\pm$ 0.71 <sup>2)</sup> |
| 金匱肾气丸组 | 2.31                    | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.53 $\pm$ 0.64 <sup>2)</sup> | 1.47 $\pm$ 1.41 <sup>2)</sup> | 0.93 $\pm$ 0.96 <sup>1)</sup> | 1.07 $\pm$ 1.03               |

**3.4 对小鼠外周血淋巴细胞亚群和 NK 细胞的影响** 造模后第 12 天, 和正常组小鼠比较, 除激素组 CD3<sup>+</sup> 及金匱肾气丸组外, 其他各组 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。但 CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> 及 NK 细胞水平各组无明显变化。见表 3。而造模后第 25 天, 各实验组 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 与正常组小鼠比较均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 模型组与治疗组之间无明显差异。各治疗组 CD8<sup>+</sup> 与模型组相比较均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。模型组的 CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> 比值与正常组比较, 明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而各治疗组均可显著降低其水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。NK 细胞水平激素组较模型组和正常组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而其他各组间无显著性差异。见表 4。造模后第 40 天, 各组 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 均无显著性差异。模型组小鼠的 CD8<sup>+</sup> 水平明显低于正常组 ( $P < 0.05$ ), 激素组显著高于模型组 ( $P < 0.01$ ), 六味地黄丸组也明显高于模型组 ( $P < 0.05$ )。模型组的

复。各治疗组的体重变化趋势大致相似, 但六味地黄丸组小鼠体重下降缓慢, 在第 20 天时与模型组和金匱肾气丸组比较, 体重下降明显减缓, 有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。

**3.3 不同时间小鼠的神经功能评分比较** 模型组小鼠在免疫后第 9 天开始出现症状, 表现为精神萎靡, 体重下降, 尾部无力, 拖垂, 后肢无力, 严重者后肢瘫痪。到第 17 天, 模型组小鼠的神经功能评分明显高于各给药组 ( $P < 0.01$ )。第 22 天时, 发病达到高峰, 而激素、六味地黄丸及金匱肾气丸各治疗组均较模型组评分明显降低 ( $P$  均  $< 0.01$ )。第 32 天后, 病情趋于平稳, 但未恢复到正常, 第 40 天时模型组评分明显仍高于各给药组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 但金匱肾气丸组与模型组相比, 有下降趋势, 但无统计学意义。首次发作评分情况与体重下降时间基本吻合。激素组、六味地黄丸组及金匱肾气丸组小鼠发病相对延后。各治疗组评分均较模型组有所降低, 尤以六味地黄丸组评分值较低, 病情较轻。见表 2。

CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> 比值与正常组比较, 有升高趋势。激素组与模型组比较明显降低 ( $P < 0.05$ )。六味地黄丸组与金匱肾气丸组与模型组比较有降低趋势。模型组 NK 细胞较正常组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 激素组、六味地黄丸组与模型组比较, NK 细胞明显上升 ( $P < 0.05$ )。金匱肾气丸组仅有上升趋势。见表 5。

**3.5 各组小鼠脑和脊髓的组织病理学变化** 正常的小鼠脑组织着色均匀, 结构有序完整, 神经细胞胞质核分明。白质细胞成分较少, 少量神经胶质细胞散在分布, 小静脉血管周围及白质浅层可见极少量淋巴细胞(见图 1A)。模型组小鼠大脑小血管周围炎性细胞浸润明显, 浸润细胞以淋巴细胞、单核细胞和浆细胞为主, 围绕血管周围间隙形成血管套, 血管壁增厚, 致使血管腔狭窄, 血管周围间隙增宽。病灶主要分布在皮质白质交界处、脑室旁白质、海马 CA-1 区、内囊、海马背侧联合纤维等白质区(见图 1B, C, D)。各治疗组小鼠脑组织病理学改变类似,

同模型组相比,均有不同程度减轻,如病灶区域的炎性浸润细胞数及“血管套”改变明显少于对照组。海马 CA-1 区炎性细胞浸润也明显减少(见图 1E, F)。

表 3 造模后第 12 天小鼠外周血淋巴细胞亚群和 NK 细胞的变化( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别     | 剂量<br>(g·kg <sup>-1</sup> ) | CD3 <sup>+</sup><br>(%)    | CD4 <sup>+</sup><br>(%)    | CD8 <sup>+</sup><br>(%) | CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup><br>(%) | NK<br>(%)     |
|--------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|---|---------------|
| 正常组    | —                           | 34.90 ± 6.82               | 22.11 ± 4.54               | 12.77 ± 3.80            | 1.80 ± 0.33                               | 32.06 ± 5.64  |
| 模型组    | —                           | 40.34 ± 2.83 <sup>3)</sup> | 28.74 ± 4.82 <sup>4)</sup> | 13.97 ± 1.87            | 2.06 ± 0.22                               | 26.90 ± 7.10  |
| 激素组    | 0.006                       | 38.05 ± 2.99               | 28.12 ± 4.55 <sup>3)</sup> | 14.90 ± 5.47            | 2.03 ± 0.53                               | 30.25 ± 6.87  |
| 六味地黄丸组 | 2.31                        | 40.10 ± 4.52 <sup>3)</sup> | 29.89 ± 4.60 <sup>4)</sup> | 15.28 ± 7.00            | 2.14 ± 0.51                               | 28.52 ± 10.03 |
| 金匱肾气丸组 | 2.31                        | 37.59 ± 3.98               | 26.22 ± 4.00               | 11.73 ± 2.30            | 2.31 ± 0.60                               | 29.86 ± 8.47  |

注:与正常组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

表 4 造模后第 25 天小鼠外周血淋巴细胞亚群和 NK 细胞的变化( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别     | 剂量<br>(g·kg <sup>-1</sup> ) | CD3 <sup>+</sup><br>(%)    | CD4 <sup>+</sup><br>(%)    | CD8 <sup>+</sup><br>(%)      | CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup><br>(%) | NK<br>(%)                    |
|--------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|---|------------------------------|
| 正常组    | —                           | 34.02 ± 3.67               | 21.42 ± 2.60               | 14.45 ± 2.36                 | 1.50 ± 0.17                               | 22.60 ± 6.25                 |
| 模型组    | —                           | 45.70 ± 4.93 <sup>4)</sup> | 29.60 ± 3.10 <sup>4)</sup> | 16.22 ± 3.66                 | 1.87 ± 0.25 <sup>3)</sup>                 | 22.80 ± 6.38                 |
| 激素组    | 0.006                       | 49.13 ± 7.07 <sup>4)</sup> | 27.87 ± 6.14 <sup>4)</sup> | 20.08 ± 3.45 <sup>1,4)</sup> | 1.42 ± 0.39 <sup>2)</sup>                 | 16.06 ± 6.78 <sup>1,3)</sup> |
| 六味地黄丸组 | 2.31                        | 50.11 ± 4.44 <sup>4)</sup> | 30.91 ± 3.51 <sup>4)</sup> | 20.18 ± 2.74 <sup>1,4)</sup> | 1.55 ± 0.27 <sup>1)</sup>                 | 20.23 ± 6.76                 |
| 金匱肾气丸组 | 2.31                        | 50.01 ± 6.24 <sup>4)</sup> | 30.28 ± 6.02 <sup>4)</sup> | 21.05 ± 4.32 <sup>2,4)</sup> | 1.47 ± 0.32 <sup>1)</sup>                 | 17.38 ± 5.09                 |

表 5 造模后第 40 天小鼠外周血淋巴细胞亚群和 NK 细胞的变化( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别     | 剂量<br>(g·kg <sup>-1</sup> ) | CD3 <sup>+</sup><br>(%) | CD4 <sup>+</sup><br>(%) | CD8 <sup>+</sup><br>(%)    | CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup><br>(%) | NK<br>(%)                  |
|--------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---|----------------------------|
| 正常组    | —                           | 39.03 ± 4.72            | 22.74 ± 3.00            | 15.76 ± 3.15               | 1.53 ± 0.34                               | 26.22 ± 11.34              |
| 模型组    | —                           | 33.22 ± 7.31            | 21.10 ± 5.46            | 11.15 ± 2.77 <sup>3)</sup> | 1.93 ± 0.41                               | 15.60 ± 2.13 <sup>3)</sup> |
| 激素组    | 0.006                       | 40.58 ± 5.79            | 23.04 ± 5.42            | 17.78 ± 2.73 <sup>2)</sup> | 1.32 ± 0.33 <sup>1)</sup>                 | 23.90 ± 6.09 <sup>1)</sup> |
| 六味地黄丸组 | 2.31                        | 41.78 ± 10.40           | 25.18 ± 8.82            | 16.63 ± 4.45 <sup>1)</sup> | 1.59 ± 0.68                               | 24.64 ± 8.94 <sup>1)</sup> |
| 金匱肾气丸组 | 2.31                        | 39.02 ± 9.80            | 22.09 ± 6.90            | 14.73 ± 4.59               | 1.53 ± 0.40                               | 23.43 ± 7.07               |

#### 4 讨论

MS 在中医中属于“痿证”中的“骨痿”,早期以肝肾阴虚为主,晚期以脾肾阳虚或阴阳两虚为主,肾虚为本病之本<sup>[3-4]</sup>。本病的病位主要在脑和脊髓,而肾藏精,主骨生髓,脑为髓之海,故补肾应贯穿始终。六味地黄丸由熟地黄、山萸肉、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓 6 味药组成,是中医滋补肾阴的代表方,临床用于治疗 MS,既可增强机体免疫力,又可抑制免疫反应,治疗和预防多发性硬化的发作<sup>[5]</sup>。金匱肾气丸由熟地黄、山萸肉、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓、桂枝、附子 8 味药组成,是中医温补肾阳的代表方,方中补阳与滋阴药为伍,旨在微微生火,少火生气,既滋阴之虚以生气,又使肾阳振奋,也是治疗 MS 的常用方。

EAE 与人类 MS 自身免疫性疾病在临床、生化、

免疫及病理等诸多方面具有相同的特征,所以它是目前国际公认的 MS 的较理想动物模型<sup>[6-8]</sup>。本文采用 MOG<sub>35-55</sub> 诱导 C57BL/6 小鼠,平均 9 d 左右发病,22~ 25 d 达到高峰,第 26 天左右开始恢复,在第 32 天左右,病情趋于稳定,且体重随着病情的加重或减轻而变化。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。实验研究表明醋酸泼尼松、六味地黄丸和金匱肾气丸均可以延缓病情发作,缩短病程,还可以降低 EAE 神经功能的评分,作用相近。病理观察模型组小鼠大脑白质及脊髓内小血管周围有炎性细胞浸润,呈特征性的袖套改变,而激素组、六味地黄丸和金匱肾气丸组小鼠的上述现象明显减轻,说明激素、六味地黄丸和金匱肾气丸能够改善 EAE 所致的中枢神经系统病理改变,减轻病灶

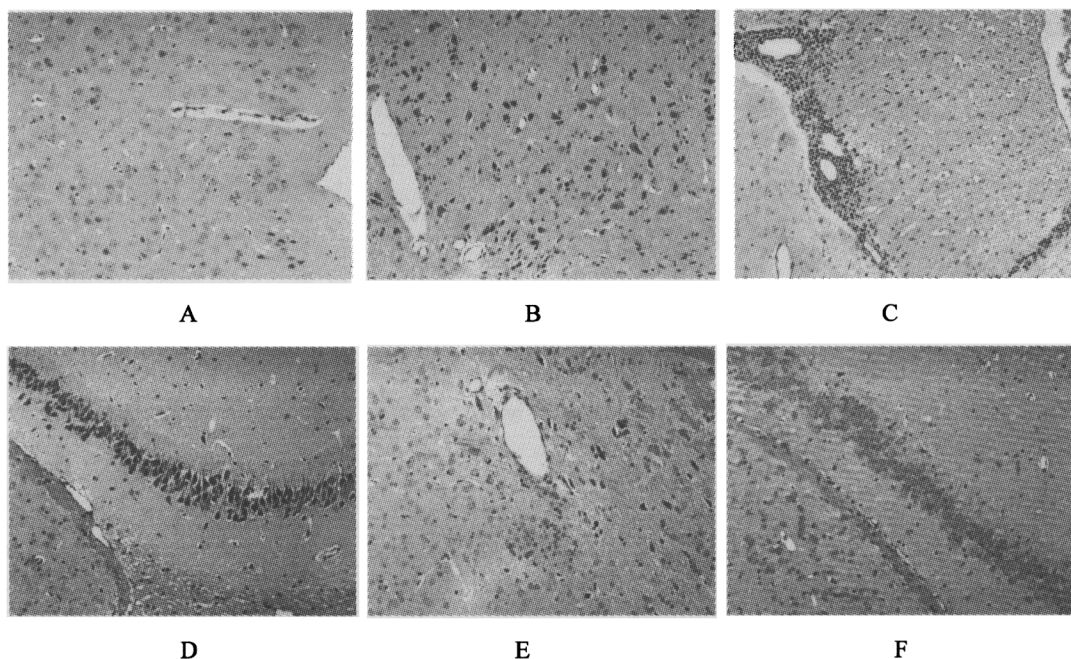


图 1 各组小鼠脑和脊髓的组织病理学变化

1. 正常组小鼠大脑组织着色均匀, 结构有序完整, 神经细胞胞质核分明(A × 200); 2. 模型组小鼠大脑炎性细胞浸润明显, 并伴有神经元核固缩, 变性坏死(B × 200), 小血管周围炎性细胞浸润明显, 并形成血管套, 神经元核固缩(C × 200), 海马 CA1 区炎性细胞浸润明显, 病灶变性坏死(D × 200); 3. 六味地黄丸组小鼠大脑病灶区域的炎性浸润细胞数及血管套明显减少(E × 200), 海马 CA1 区炎性细胞浸润明显减少(F × 200)。

区域的炎性浸润细胞数、软化灶等。

MS 是自身免疫性疾病, 细胞免疫在 MS 的发病机制中占有重要地位。临床研究表明, MS 患者外周血及脑脊液中淋巴细胞亚群异常, 如 Heinz Wiendl<sup>[9]</sup> 等采用流式细胞仪对 32 例 MS 患者外周血及脑脊液 (CSF) 淋巴细胞亚群进行了检测, 结果示 MS 患者外周血 CD8<sup>+</sup> 细胞显著低于对照组, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值明显上升, CSF 中 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 细胞显著高于对照组及外周血, 而 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值明显高于对照组及外周血。本实验 EAE 模型小鼠的外周血中也有类似表现, 尤其在急性期时变化明显, 表现为 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 明显升高, CD8<sup>+</sup> 降低, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值明显升高; 治疗组的 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 也有明显升高, CD8<sup>+</sup> 明显升高, 而 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值恢复正常。说明六味地黄丸和金匱肾气丸组有调节淋巴细胞亚群的作用。与激素的调节作用相似。

国内外也有关于 MS 患者 NK 细胞功能的研究报道, 研究表明, MS 患者的 NK 细胞百分率和活性均降低, 是 MS 患者免疫系统异常的特征之一, 其机制可能与 MS 患者体内的各种细胞因子分泌量不平衡, 失去对 NK 细胞功能的正常调节, 另外 NK 细胞从血中迁移可促使其数量减少等<sup>[10]</sup>。本实验发现

模型组小鼠的 NK 细胞在发病初期及急性期无明显变化, 在缓解期明显降低, 经治疗后激素组和六味地黄丸组能够明显提高 NK 细胞的表达, 说明其有调节 NK 细胞而介导细胞免疫作用。而金匱肾气丸不如六味地黄丸作用显著。

总之, 各治疗组均能改善 EAE 小鼠临床症状和评分, 降低 EAE 的发病率, 促进恢复, 缩短病程, 减轻 EAE 小鼠中枢神经系统炎症反应和髓鞘脱失, 可能是通过调节细胞免疫系统来防治 EAE 的。但该剂量在总体疗效上, 六味地黄丸效果在改善 EAE 小鼠体重、神经评分及调节细胞免疫等方面要优于醋酸泼尼松和金匱肾气丸。由此可见, 滋补肾阴类中药有更强的缓解 EAE 病情的作用。

#### [参考文献]

- [1] 张保平, 唐英, 陈志令. 从肝肾论治多发性硬化探讨[J]. 浙江中医杂志, 2006 41(1): 16-17.
- [2] Kono RH, Urban JL, Horvath SJ, et al. Two minor determinants of myelin basic protein induce experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice[J]. J Exp Med, 1988, 168(1): 213-217.
- [3] 杨艳, 吴燕, 林亚明. 多发性硬化的中医药辨证治疗概况[J]. 云南中医学院学报, 2004, 27(1): 56-58.

- [ 4 ] 樊永平. 中医药辨证治疗多发性硬化的优势与不足 [ J ]. 北京中医, 2005, 24( 4 ): 209-211.
- [ 5 ] 范新发, 贺建修. 六味地黄汤治疗多发性硬化 1 例 [ J ]. 中医杂志, 1999, 40( 5 ): 314.
- [ 6 ] Stinissen P, Raus J, Zhang JW, *et al.* Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies [ J ]. Crit Rev Immunol, 1997, 17( 1 ): 33-75.
- [ 7 ] Mancardi G, Hart BA, Capello E, *et al.* Restricted immune responses lead to CNS demyelination and axonal damage [ J ]. J Neuroimmunol, 2000, 107( 2 ): 178-183.
- [ 8 ] 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 ): 99-101.
- [ 9 ] Wiendl H, Neuhaus O, Mehling M, *et al.* The CD28 related molecule ICOS: T cell modulation in the presence and absence of B7. 1/2 and regulational expression in multiple sclerosis [ J ]. J Neuroimmunol. 2003, 140( 1-2 ): 177-187.
- [ 10 ] 闫晓波, 韩 葳, 王维治. NK 细胞参与多发性硬化免疫致病的机制 [ J ]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2003, 10( 3 ): 174-176.