

左归丸和右归丸对实验性变态反应性 脑脊髓炎大鼠髓鞘及轴突再生的影响

王 蕾^{1*}, 樊永平², 龚海洋², 叶 明², 周 莉², 赵 晖¹, 穆 阳¹, 闫晓媛¹

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 首都医科大学附属北京天坛医院, 北京 100050)

[摘要] 目的: 研究左归丸和右归丸对实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)大鼠神经髓鞘和轴突再生的影响。方法: 应用髓鞘碱性蛋白(MBP)与完全福氏佐剂(CFA)按 1:1(体积比)制成抗原, 给动物两后足皮下注射 MBP 抗原免疫, 建立大鼠 EAE 模型。以醋酸泼尼松作对照, 利用髓鞘染色及免疫组织化学染色观察各组大鼠造模后 14, 28 d 大脑和脊髓髓鞘和轴突损伤及再生的变化。结果: 左归丸或右归丸干预后大鼠髓鞘脱失程度均较模型组明显减轻, MBP 及神经丝蛋白(NF200)表达显著高于模型组($P < 0.05$ 或 0.01)。结论: 左归丸和右归丸能够修复 EAE 大鼠神经髓鞘和轴突的损伤, 可能是其促进神经康复的分子机制之一。

[关键词] 左归丸和右归丸; 实验性变态反应性脑脊髓炎; 髓鞘再生; 轴突再生

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)04-0042-04

Effect of Zuo Gui Pill and You Gui Pill on Remyelination and Axonal Regeneration in Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis

WANG Lei^{1*}, FAN Yong-ping², GONG Hai-yang², Ye Ming²,
ZHOU Li², Zhao Hui¹, MU Yang¹, YAN Xiao-yuan¹

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Beijing Tian Tan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of Zuo Gui Pill and You Gui Pill on remyelination and axonal regeneration in experimental allergic encephalomyelitis (EAE) model rat. **Methods:** The rats were injected antigen containing myelin basic protein(MBP) and Freund's Adjuvant Complete(CFA) in the same volume in both rat postpeds. As a control of prednisone, the injury and regeneration of myelin and axon in rat brain and spinal cord were observed by using myelin staining and immunohistochemistry method after the rats model were made at 14 and 28 days. **Results:** The injury of myelin and axon were reduced by treated with Zuo Gui Pill and You Gui Pill in EAE rat, Both of MBP and neurofilament protein(NF200) expressions were increased significantly in the treatment groups of Zuo Gui Pill and You Gui Pill ($P < 0.05$ or 0.01) compared with the model group. **Conclusions:** Zuo Gui Pill and You Gui Pill can restore the nervous myelin and axonal injury which may be the mechanism of tonifying-kidney formulae in promoting rehabilitation in rats with EAE.

[Key words] Zuo Gui Pill and You Gui Pill; experimental allergic encephalomyelitis; remyelination; axonal regeneration

[收稿日期] 2007-08-10

[基金项目] 北京市中医药科技项目(2003 IIF21, JJ2005-8); 北京市教育委员会科技发展计划项目(KM2007100025015); 北京市自然科学基金(7062022); 国家自然科学基金(30640069)

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

实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)与人类多发性硬化(MS)的病理变化极其相似,是研究MS较理想的动物模型。EAE以特异性致敏的 CD_4^+ T细胞介导为主,以中枢神经系统(CNS)内小血管周围炎性细胞浸润及髓鞘和轴突损伤为特征^[1]。因此,在控制疾病过程中,防止髓鞘和轴突损伤及促进其恢复有重要意义^[2]。中医药治疗MS的实验研究主要集中在如何调节免疫上,如补肾固髓片^[3]、温阳补肾方^[4]、一贯煎^[5]等对EAE动物的细胞因子均有不同程度的调节作用。而对EAE髓鞘和轴突损伤干预的研究尚少。因此,本实验利用EAE大鼠模型,采用组织病理学、免疫组织化学方法观察MBP引起的大鼠脑和脊髓髓鞘和轴突的损伤,观察左归丸和右归丸对本模型大鼠髓鞘和轴突再生的作用。

1 材料

1.1 动物 120只雄性SPF Lewis大鼠,体重(200±20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。合格证号为SCXK(京)2002-0003。

1.2 药物及试剂 左归丸(熟地、山药、山茱萸、枸杞子、鹿角胶、菟丝子、川牛膝、龟胶)和右归丸(熟地、山药、山茱萸、枸杞子、鹿角胶、菟丝子、杜仲、当归、肉桂、附子)为蜜丸(北京同仁堂药店);醋酸泼尼松(天津力生制药厂)。水合氯醛(北京化学试剂公司);MBP87-99(美国ALEXIS生物化学公司);完全弗氏佐剂(Sigma公司)。兔抗大鼠髓鞘碱性蛋白(MBP)单克隆抗体、小鼠抗大鼠神经丝蛋白(NF200)单克隆抗体、生物素化羊抗兔IgG、链霉亲和素-生物素过氧化物酶复合物(SABC)试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 仪器与设备 蠕动泵(BT00-100M,保定兰格恒流泵有限公司);低温冰箱(SANYO,日本);包埋机(LEICA-EG1150H,德国);光学显微镜(Olympus-BX51,日本);医学图像分析管理系统(MIAS,北航);石蜡切片机(LEICA-RM2235,德国);照相机(SonyMVC2000-39,日本)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备 将大鼠随机分为正常对照组、模型组、激素组、左归丸组和右归丸组。每组24只。模型组和各治疗组按下述方法制作EAE模型。用10%水合氯醛(0.4g·kg⁻¹)给予大鼠腹腔注射麻醉,按750μg·kg⁻¹的量给动物两后足皮下多点一次性注射抗原(MBP与CFA的混合液)免疫,诱

导大鼠产生EAE。正常对照组大鼠两后足皮下注射等量生理盐水与CFA的混合液。

2.2 给药方法及处理 左归丸组和右归丸组在大鼠造模后分别灌胃给予左归丸混悬液(2g·kg⁻¹)和右归丸混悬液(3g·kg⁻¹按人体用量的8倍计算)。激素组在大鼠造模后灌胃给予相应剂量的生理盐水,发病后给予泼尼松混悬液0.0015g·kg⁻¹。正常对照组和模型组分别灌胃给予相应剂量的生理盐水,1次/d,共28d。选择EAE大鼠高峰期(免疫诱导第14d)缓解期(免疫诱导第28d)取材。10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,剪开胸腔,暴露心脏,左心室插管,用生理盐水灌注后,改用多聚甲醛灌注,然后取大鼠脑及脊髓组织,放置同样固定液中后固定。常规脱水、石蜡包埋,用石蜡切片机对大鼠脑及脊髓面连续切片。

2.3 脑及脊髓Weil氏髓鞘染色 石蜡切片,常规至水,用苏木素液浸泡,置于60℃温箱里20min,取出后自来水冲洗,用4%铁明矾水溶液作初步分化脱色,区分正常、髓鞘、灰质或变性区域,脱色后自来水浸洗,然后蒸馏水洗,再用Weiger氏分化液脱色。自来水充分冲洗,用稀氨水处理5min,然后充分水洗,脱水至透明,树脂封固。

2.4 脑及脊髓MBP及NF200免疫组织化学染色 按说明书进行。石蜡切片脱蜡至水。3% H_2O_2 室温孵育5~10min,蒸馏水冲洗,滴加适当比例稀释的一抗(兔抗大鼠MBP),37℃孵育1~2h。PBS冲洗,2min×3次。25℃孵育2h,再4℃过夜, PBS洗2min×3次;滴加生物素标记二抗(羊抗兔IgG),室温下20min, PBS洗2min×3次;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(SABC复合物),室温20min, PBS洗5min×4次;3,3'-四盐酸二氨基联苯胺(DAB)显色:使用DAB显色试剂盒。取1mL蒸馏水,加试剂盒中A、B、C试剂各1滴,混匀后加至切片;室温显色,镜下控制反应时间,一般10min左右;蒸馏水多次洗涤;苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片,显微镜观察。阴性对照不加一抗,以正常山羊血清和PBS代替一抗作孵育。

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5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(×400),阳性结果用积分光密度(Integral Optical Density, IOD)表示。

2.6 统计学方法 数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析, 首先做正态性检验, 若符合正态性应用单因素方差分析(One-way ANOVA), 否则用秩和检验。P < 0.05 表示差异有显著性意义。

3 结果

3.1 各组大鼠脑和脊髓组织髓鞘变化 正常对照组大鼠白质神经纤维髓鞘着色清晰, 密度较大; 模型组脱髓鞘纤维因磷脂消失而不着色, 在第 14 d 时脑及脊髓大部分髓鞘崩解、破坏, 部分区域断裂缺失, 染色变浅; 第 28 d 时, 其髓鞘部位颜色逐渐加深, 密度也慢慢增大, 各治疗组在第 14 d 时, 髓鞘脱失现象减少, 髓鞘分布较致密, 染色较深; 第 28 d 时神经髓鞘颜色逐渐加深, 密度增大。

3.2 各组大鼠脑和脊髓 MBP 免疫组织化学变化 正常对照组大鼠脑和脊髓 MBP 着色均匀, 分支长而连续, 数目多; 模型组髓鞘着色低于正常对照组, 分枝短少而不连续, 各治疗组髓鞘着色较加深, 数量较多。病理图像分析发现, 模型组 MBP 表达 IOD 值较正常对照组稍低, 各治疗组 MBP 的表达在给药后持续增加, 至 28 d 后各治疗组 MBP 的 IOD 值均有不同程度增高, 左归丸和右归丸组大鼠脑中 MBP 明显高于模型组(P 均 < 0.01), 而脊髓中左归丸组升高明显(P < 0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠造模 28 d 后大脑及脊髓中的 MBP 免疫组织化学 IOD 值变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	MBP	
		大脑	脊髓
正常对照组	—	35.04 ± 18.93	37.57 ± 24.58
模型组	—	31.54 ± 10.80	26.78 ± 13.86
激素组	0.001 5	54.80 ± 31.25	39.64 ± 20.75
左归丸组	2	88.32 ± 33.27 ²⁾	51.60 ± 25.02 ¹⁾
右归丸组	3	70.78 ± 17.73 ²⁾	32.00 ± 18.43

注: 与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01(下同)

3.3 各组大鼠脑和脊髓 NF200 免疫组织化学变化 正常对照组 NF200 纤维较长, 排列整齐; 模型组损伤后 14 d 可见少量染色阳性纤维, 纤维细小, 排列方向紊乱; 28 d 时稍有增加。各治疗组在 28 d 时大鼠脑内 NF200 增加明显, 大量染色阳性纤维, 纤维较长。病理图像分析发现, 模型组大鼠脑和脊髓 NF200 的 IOD 值较正常对照组低, 各治疗组均明显高于模型组(P 均 < 0.01), 但脊髓中 NF200 表达无明显变化。见表 2。

表 2 各组大鼠造模 28 d 后的大脑及脊髓中 NF200 免疫组织化学 IOD 值变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	NF200	
		大脑	脊髓
正常对照组	—	79.89 ± 36.89	185.95 ± 70.20
模型组	—	41.81 ± 11.56	154.08 ± 45.45
激素组	0.001 5	84.28 ± 23.20 ²⁾	163.65 ± 21.04
左归丸组	2	108.94 ± 19.64 ²⁾	154.57 ± 29.53
右归丸组	3	77.47 ± 18.56 ²⁾	167.74 ± 65.95

4 讨论

本实验用 MBP 加佐剂主动免疫敏感的 Lewis 大鼠成功地诱发了 EAE 模型, EAE 大鼠存在明显的病理学改变^[6]。大量研究表明, 脱髓鞘和轴突损伤是 MS 和 EAE 的主要病理变化。MBP 是神经系统髓鞘膜的主要蛋白成分, 形成稳定的膜状板层结构, 为有髓神经纤维提供了一个较高的膜阻抗和较低的电容作用, 是神经跳跃式冲动传导的保障, 因此 MBP 是反映 CNS 有无髓鞘脱失的一个较为特异的指标。NF 是神经元独有的结构蛋白, NF200 主要存在于轴突中, 是构成神经胞体尤其是神经轴突的细胞骨架框架。实验结果发现, EAE 大鼠血清中的 MBP 含量明显升高^[7], 大鼠白质及脊髓内髓鞘结构松解紊乱, 缺失, MBP 和 NF200 脱失和降解。表明在大鼠 CNS 中存在髓鞘和轴突的损害。目前轴突损害的原因和确切机制还不十分清楚。近年来研究证实, 神经髓鞘的破坏将造成神经支持和营养等作用减弱, 可能是引起轴突损伤的机制之一^[8]。另外, 中枢神经损伤后, 出现少突胶质细胞增多和大量髓鞘碎片, 造成神经营养因子类物质缺乏及产生抑制性因子, 如髓鞘相关糖蛋白(MAG)、Nogor-A 和少突胶质细胞/髓鞘糖蛋白(OMgp) 等均为轴突生长抑制蛋白, 其中 Nogor-A 和自身免疫脱髓鞘疾病的关系密切, 能够限制轴突延伸和细胞增生, 引起生长锥溃变^[9]。在 EAE 造成的脑和脊髓损伤后, 机体能够调动自我修复功能, 一方面减轻各种因素造成的髓鞘损伤, 另一方面通过增加 MBP 的合成, 干预髓鞘修复的微环境等, 但这种自然恢复机制远不足以完全代偿受损的髓鞘组织功能。

中医学认为 MS 的病因为先天禀赋不足及后天失调所致, 多属于中医“痿证”中的“骨痿”^[10]。肾虚是 MS 的根本病机^[11]。因此补肾生髓是治疗本病的

基本法则。左右归丸是明代张景岳创制的以补肾填精生髓为主治疗肾阴虚和肾阳虚证的有效名方。肾为先天之本,肾虚包括肾阴和肾阳两者不同程度的下降。基于“阴阳互根互用”的原理,张景岳用左归丸“阳中求阴”、右归丸“阴中求阳”以达到阴阳平衡的目的。本研究发现左右归丸能明显减轻髓鞘脱失,对大鼠髓鞘有保护作用。其机制可能与刺激 MBP 及 NF200 合成有关。因此促进新生髓鞘和轴突的建立可能是补肾生髓对本病治疗作用的基础。髓鞘和轴突的再生是一个非常复杂的过程,其间存在着大量的未知机制^[12]。关于左右归丸促进轴突再生的机制也还有待深入研究。

[参考文献]

[1] Gold R., Linington C., Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research [J]. *Brain*, 2006, 129: 1953-1971.

[2] Wang C, Gold BG, Kaler LJ, *et al.* Antigen specific therapy promotes repair of myelin and axonal damage in established EAE [J]. *J Neurochem.* 2006, 98(6): 1817-1827.

[3] 刘晓艳,孙怡,王岚芬,等.补肾固髓片对实验性变态反应性脑脊髓炎动物发病和血中 IL-2、IL-6、TNF 和

MBP 的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2000, 6(10): 10-14.

- [4] 孙红梅,白丽敏,宋发贤,等.温阳补肾方对 EAE 豚鼠脊髓内 NF- κ B p65 表达的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2002, 25(3): 36-38.
- [5] 梁辉,赵刚.一贯煎治疗多发性硬化的实验研究 [J]. *中药药理与临床*, 2005, 21(6): 10-11.
- [6] 王蕾,赵晖,樊永平,等.补肾法对脑脊髓炎大鼠生长相关蛋白 43 及微管相关蛋白 2 的影响 [J]. *首都医科大学学报*, 2007, 28(6): 17.
- [7] 王蕾,樊永平,刘秀贞.二黄方防治实验性变态反应性脑脊髓炎的实验研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2005, 20(8): 475-477.
- [8] Zhao C, Fancv SP, Kotter MR, *et al.* Mechanisms of CNS remyelination: the key to therapeutic advances [J]. *J Neurol Sci*, 2005, 233: 87-91.
- [9] Schwab ME. Nogo and axon regeneration [J]. *Curr Opin Neurobiol.* 2004, 14: 118-124.
- [10] 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.
- [11] 曹珊,韩丽.中医药防治多发性硬化的研究 [J]. *陕西中医学院学报*, 2003, 26(5): 68-70.
- [12] Kerschensteiner M., Bareyre FM., Buddeberg BS., *et al.* Remodeling of axonal connections contributes to recovery in an animal model of multiple sclerosis [J]. *J Exp Med*, 2004, 200: 1027-1038.