

# 重肌灵对 EAMG 大鼠血清 IL-4 及 IFN- $\gamma$ 水平的影响

韩 涛, 周 勇, 王旭丹, 葛东宇  
(北京中医药大学, 北京 100029)

**摘要:** 观察中药复方重肌灵对 EAMG 大鼠血清 IL-4 及 IFN- $\gamma$  调节作用。方法: 采用 N<sub>2</sub>AchR 加等量福氏完全佐剂, 多次免疫 Lewis 大鼠, 复制 EAMG 模型, 并对模型进行评价。动物随机分为正常组、佐剂组、模型组、地塞米松组和重肌灵组。采用 ELISA 法观察各组动物血清 AchRab、IL-4、IFN- $\gamma$  水平。结果: 重肌灵、地塞米松组大鼠血清 AchRab 滴度、IL-4、IFN- $\gamma$  水平明显降低, 与模型组比较, 有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ )。但两治疗组之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。结论: 重肌灵具有良好的防治 EAMG 效果, 可能是通过下调血清 IL-4、IFN- $\gamma$ , 抑制 AchRab 产生, 而起到治疗作用。

**关键词:** 重肌灵; EAMG 模型; IL-4; IFN- $\gamma$

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)02-0035-03

## Effect of Zhong Jiling to the Level of IL-4 and IFN- $\gamma$ in Serum of EAMG Rats

HAN Tao, ZHOU Yong, WANG Xu-dan, GE Dong-yu

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract:** To observe immunoregulation effect of Zhong jiling to the level of IL-4 and IFN- $\gamma$  in Serum of EAMG rats. Method: EAMG model in Lewis rat as induced by immunizing the rats for 3 times with the mixture of N<sub>2</sub>AchR and CAF, and randomly divided into 5 groups. The level of IL-4 and IFN- $\gamma$  in serum in different groups was observed by ELISA method. Results the level of IL-4 and IFN- $\gamma$  in serum in Zhong jiling group was obviously lower than that in model group. There was no significant difference ( $P < 0.01$ ). Conclusions: The mechanism of Zhong jiling to prevent and treat EAMG might be explained by lowering the level of IL-4 and IFN- $\gamma$  to restrain specific immune reaction induced by N<sub>2</sub>AchR antigen.

**Key words:** Zhong jiling; EAMG model; IL-4; IFN- $\gamma$

重症肌无力(Myasthenia gravis, MG)是由烟碱型乙酰胆碱受体(N<sub>2</sub>AchR)抗体介导的, 针对神经肌肉接头处突触后膜上 N<sub>2</sub>AchR 进行破坏的一种自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>, 既存在 AchRab 介导的体液免疫功能失常, 也存在 T 细胞依赖的细胞免疫功能失常。许多自身免疫性关病都有细胞因子(Cytokines, CK)网络失常, MG 也不例外<sup>[2]</sup>。现代医学以糖皮质激素治疗为主, 但副作用多, 且有高依赖性、高复发率等弊端, 从而限制了其使用<sup>[3]</sup>。重肌灵由中药黄芪、人参、鹿茸等组成, 具有温理奇阳, 扶元振颓作用, 临床治疗近 5000 例 MG 病人, 取得满意疗效。重肌灵对实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)大鼠有明显的防治作用, 本文重点探讨重肌灵对 EAMG 大鼠血清 IL-4 及 IFN- $\gamma$  的调节作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物** Lew 大鼠, 雌性, 体重 160~180g。购于中国医学科学院药物所动物中心。合格证: SCXK111-00-0006。

**1.2 重肌灵** 由河北以岭医药研究院提供, 批号, 2001, 12, 20。每克药粉含生药 5.9g, 用 0.5% 甲基纤维素(CMC)混悬。地塞米松: 天津药业有限公司生产, 批号, 980606。

**1.3 IL-4 及 IFN- $\gamma$  定量 EIA 试剂盒:** 购于上海森雄科技实业有限公司。

**1.4 完全福氏佐剂(CFA)** 治疗用卡介苗购自卫生部生物制品所。不完全佐剂由液体石蜡和羊毛脂(3:1)组成; 完全福氏佐剂中卡介苗含量为 10mg/ml。

**1.5 N<sub>2</sub>AchR 提取** 电鳗由厦门海域捕捞。提取方法参照 T. Allen 等方法<sup>[4]</sup>, 并稍加改进。

**1.6 EAMG 模型建立** 将 N<sub>2</sub>AchR 提取物与等量完

全福氏佐剂混匀,于大鼠足垫、背部皮下、尾根部多点注射,0.5ml/只,佐剂组注射等量的完全福氏佐剂,分别于实验的第1d、第14d、第28d,共免疫3次。正常组不做任何处理。于末次免疫2周后处死大鼠,采取血清。

**1.7 动物分组与给药** Lewis大鼠随机分为正常组、佐剂组、模型组、地塞米松组、重肌灵组、正常组、佐剂组大鼠每天灌胃给水1ml/100g;模型组大鼠每天灌胃给0.5% CMC,1ml/100g;地塞米松组大鼠每日灌胃1ml/100g(0.1mg/kg,相当于人临床用量的8倍);重肌灵组大鼠每天灌胃1ml/100g(3.28g生药/kg,相当于人临床用量的8倍),共给药42天,观察症状、测肌电图。然后颈动脉采血,分离血清,为测定AchRab、IL-4、IFN- $\gamma$ 。

### 1.8 检测方法

**1.8.1 血清中AchRab检测** 颈动脉采血,分离血清。ELISA法检测血清中AchRab<sup>[5]</sup>。

**1.8.2 血清IL-4测定** 按试剂盒说明书操作。采用双抗体夹心ABC-ELISA法。用抗大鼠IL-4单抗包被于酶标板上,标准品和样品中IL-4与单抗结合,加入生物素化抗大鼠IL-4抗体,辣根酶标记的streptavidin与生物素组合,加入酶底物OPD,终止反应。酶标仪492nm处测OD值。IL-4浓度与OD值成正比,绘制标准曲线,求出标本中IL-4浓度。

**1.8.3 血清IFN- $\gamma$ 测定** 采用双抗体夹心ABC-ELISA法。将抗大鼠IFN- $\gamma$ 单抗包被于酶标板上。余同IL-4测定法。

**1.9 统计方法** 采用SPSS软件进行组间t检验。

## 2 结果

**2.1 Lewis大鼠EAMG模型评价及重肌灵防治效果**  
从临床症状严重程度、血清AchRab、肌电图、骨骼肌中N<sub>2</sub>AchR损失率方面,模型组与正常组、佐剂组相比,有显著性差异, $P < 0.05$ ,而正常组、佐剂组之间无显著性差异, $P > 0.05$ ,说明模型建立成功。重肌灵组、地塞米松组大鼠从临床症状严重程度、血清AchRab、肌电图、骨骼肌中N<sub>2</sub>AchR损失率等方面,与模型组相比,均有明显改善,经统计学处理,有显著性差异, $P < 0.01$ ,说明重肌灵、地塞米松对EAMG有显著防治效果(结果待发表)。

**2.2 重肌灵对EAMG大鼠血清AchRab滴度的影响**

模型组大鼠血清AchRab滴度明显高于正常组、佐剂组,有显著性差异, $P < 0.01$ ;重肌灵组、地塞米松组大鼠与模型组相比,血清AchRab滴度明显降低,

有显著性差异, $P < 0.01$ ;而两给药组之间无显著性差异, $P > 0.05$ 。

表1 重肌灵对EAMG大鼠血清AchRab滴度影响( $\bar{x} \pm s$ ;  $n = 10$ )

组别	AchRab 滴度
正常组	0.003 ± 0.0068
佐剂组	0.013 ± 0.002
模型组	0.385 ± 0.02
地塞米松组	0.177 ± 0.01**
重肌灵组	0.179 ± 0.01**

注:与模型组比较\*\* $P < 0.01$

结果表明,重肌灵对EAMG大鼠N<sub>2</sub>AchR抗原诱导特异性体液免疫有明显抑制作用。

**2.3 重肌发EAMG大鼠血清IL-4、IFN- $\gamma$ 水平的影响** 模型组大鼠血清IL-4、IFN- $\gamma$ 水平明显高于正常组、佐剂组,有显著性差异, $P < 0.01$ ;重肌灵组、地塞米松组大鼠血清中IL-4、IFN- $\gamma$ 水平与模型组相比,明显降低,有显著性差异, $P < 0.01$ ;而两给药组之间无显著性差异, $P > 0.05$ 。

表2 重肌灵对EAMG大鼠血清IL-4、IFN- $\gamma$ 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ ;  $n = 10$ )

组别	IL-4 (PG/ml)	IFN- $\gamma$ (PG/ml)
正常组	56.78 ± 5.67	52.78 ± 5.82
佐剂组	58.25 ± 3.85	53.82 ± 6.94
模型组	102.90 ± 33.11	132.92 ± 19.76
地塞米松组	54.50 ± 5.12**	55.08 ± 3.86**
重肌灵组	59.71 ± 6.11**	54.88 ± 3.53**

结果表明,重肌灵能下调EAMG大鼠升高的IL-4、IFN- $\gamma$ 水平。

## 3 讨论

MG是T细胞依赖、AchRab介导的破坏骨骼肌N<sub>2</sub>AchR引起的肌无力的自身免疫病<sup>[6]</sup>。目前公认的MG动物模型是从电鳐电器官中提取的N<sub>2</sub>AchR加CFA免疫Lewis大鼠,建立EAMG模型<sup>[7]</sup>。我们从我国厦门海域捕获电鳐电器官中提取N<sub>2</sub>AchR加CFA多次免疫Lewis大鼠,制作了EAMG模型,从临床症状、血清抗AchR抗体、肌电图及骨骼肌N<sub>2</sub>AchR含量等方面确定模型是成功的。

我们以地塞米松做对照,用重肌灵治疗EAMG大鼠,发现重肌灵与地塞米松有相似疗效,可使EAMG大鼠肌无力症状明显改善,血清抗AchR抗体滴度降低,肌电图衰减好转,骨骼肌N<sub>2</sub>AchR损失率明显改善,表明重肌灵有明显的防治EAMG作用。本文重点研究重肌灵对EAMG大鼠血清IL-4、IFN- $\gamma$ 的调节作用,以探讨重肌灵免疫作用机理。

实验结果证明重肌灵、地塞米松对血清特异性抗 AchR 抗体有明显的抑制作用,表明重肌灵体内能下调 N<sub>2</sub>AchR 诱发特异性体液免疫和细胞免疫,抑制抗 AchR 抗体产生,从而减少对神经肌肉接头处 N<sub>2</sub>AchR 破坏。

诸多证据表明,细胞因子在 MG 发病和发展中起重要作用。TFN- $\gamma$  为 Th1 相关的 CK,是细胞活化早期产生的一种具有多种免疫调节作用的 CK。TFN- $\gamma$  与 IL- TNF- $\alpha$  有协调作用,从而增强 T、B 细胞活化、增殖,增强细胞与体液免疫应答。局部表达的 IFN- $\gamma$  可激发对运动终板的体液反应,从而启动 MG 病人发病。EAMG 大鼠 AchR 特异性 Th1 细胞活性增强, Th1 细胞在 AchR 的刺激下活化,分泌大量 TFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  通过上调 MHC- II 类表达,增强抗原呈递,促使 AchRab 产生,它可能是 MG、EAMG 始发因子之一<sup>[8]</sup>。IL-4 为 Th2 相关 CK,可促进 B 细胞增殖,是 B 细胞增殖、分化的有效促进剂,在 AchRab 产生中起重要作用,被认为是介导体液免疫应答的主要因子之一。EAMG 大鼠具有高滴度的抗 AchRab,且这种抗体分泌细胞及淋巴组织 IL-4mRNA 表达的细胞数增高。说明 IL-4 与 EAMG 及 MG 发生有关。IL-4 可能还与 MG 的进展和持续有关。故认为 IL-4、IFN- $\gamma$  是 MG、EAMG 中心效应分子<sup>[9]</sup>。

本实验发现 EAMG 大鼠血清 IL-4、IFN- $\gamma$  明显增高,经重肌灵、地塞米松治疗后,IL-4、IFN- $\gamma$  水平明显降低。说明重肌灵防治 MG、EAMG 部分机理可能是通过下调升高的 IL-4、IFN- $\gamma$ ,而抑制 N<sub>2</sub>AchR 特异

性 AchRab,从而起到防治作用。

#### 参考文献:

- [1] Lindstrom J, Lindbroderick, Mark I. Myasthenia gravis and the nicotinic receptor[M]. Chapman and Hall, London, 1981. 161-216.
- [2] Link J, Navikas V, Yu M, et al. Augmented interferon  $\gamma$ , interleukin-4 and transforming growth factor- $\beta$  mRNA expression in blood mononuclear cells in myasthenia gravis[J]. J Neuroimmunol, 1994, 51: 185-192.
- [3] Yi Q, Lefvert AK. Current and future therapies for myasthenia gravis[J]. Drugs Aging, 1997, 11(2): 132-139.
- [4] Allen, T. & Potter, L. T. Postsynaptic membranes in the electric tissue of Narcine III Isolation and characterization[J]. Tissue & cell, 1977, 9: 609.
- [5] 方福德,周吕,丁濂,等.现代医学实验技巧全书[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995. 335.
- [6] Lidstrom J, Shelton, K, FuJii Y. Myasthenia gravis[J]. Adv Immunol, 1988, 42: 233.
- [7] BIESECKER G, KOFFLER D. Resistance to experimental autoimmune myasthenia gravis in genetically inbred rats: association with decreased amounts of in situ acetylcholine receptor antibody complexes[J]. J Immunol, 1988, 140: 3406-3410.
- [8] Zhang Gx, Navikas V, Link H, et al. CYTOKINES AND THE PATHOGENESIS OF Myasthenia gravis[J]. Muscle & nerve, 1997, 20: 543.
- [9] Link J. Interferon  $\gamma$ , IL-4 and transform growth factor- $\beta$ mRNA expression in multiple sclerosis and myasthenia gravis[J]. Acta Neurol Scand, 1994, 158(suppl): 1-58.