

· 经典名方 ·

补阳还五汤对自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠神经保护作用的机制探讨

刘建春¹, 张红珍¹, 郭文娟¹, 柴智¹, 尉杰忠², 于婧文², 肖保国³, 马存根^{1,2*}
(1. 山西中医药大学神经生物学研究中心, 晋中 030619; 2. 大同大学脑科学研究所, 山西大同 037009; 3. 复旦大学附属华山医院神经病学研究所, 上海 200025)

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤(BYHWT)在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)发展的不同阶段的神经保护作用 and 机制。方法:采用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 35-55 多肽(MOG₃₅₋₅₅)诱导 36 只 C57BL/6 雌性小鼠建立实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型,随机分为 EAE 9, 17, 28 d 组以及 BYHWT 9, 17, 28 d 组。BYHWT 各组于免疫后第 3 天开始灌胃给药(50 g·kg⁻¹·d⁻¹),EAE 组以相同方式等体积给予生理盐水,每天 1 次,连续至免疫后 9, 17, 28 d。采用国际通用的五级临床症状评分观察 BYHWT 对 EAE 小鼠的干预作用;采集小鼠脊髓标本,进行苏木素-伊红(HE)染色和固蓝(LFB)染色观察 BYHWT 的神经保护作用;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脊髓神经营养因子(BDNF)和生长相关蛋白-43(GAP-43)等的表达。结果:补阳还五汤治疗后可明显抑制脊髓炎细胞浸润,减轻髓鞘脱失;与 EAE 组比较,BYHWT 各给药组 Nogo-A 在脊髓表达显著下调($P < 0.01$),与 EAE 17, 28 d 组比较,BYHWT 17 d 组和 28 d 组 BDNF 在脊髓中表达明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 EAE 9, 17 d 组比较,BYHWT 9, 17 d 组 GAP-43 在脊髓中表达显著上调($P < 0.01$)。结论:补阳还五汤可以通过上调 NTFs 类物质的表达,下调神经抑制因子的表达,改善局部神经生长微环境而发挥神经保护的作用。

[关键词] 补阳还五汤; 多发性硬化; 脑源性神经营养因子; 生长相关蛋白-43; Nogo-A 蛋白; 神经生长微环境
[中图分类号] R289;R246.6;R392;R322.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0055-07
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191340
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190318.1311.003.html>
[网络出版时间] 2019-03-19 13:12

Neuroprotective Mechanism of Buyang Huanwu Tang on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice

LIU Jian-chun¹, ZHANG Hong-zhen¹, GUO Wen-juan¹, CHAI Zhi¹, YU Jie-zhong²,
YU Jing-wen², XIAO Bao-guo³, MA Cun-gen^{1,2*}

(1. *Research Center of Neurobiology, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;*
2. *Institute of Brain Science, Datong University, Datong 037009, China;*
3. *Institute of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200025, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the neuroprotective effect and mechanism of Buyang Huanwu Tang (BYHWT) on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) at different stages. **Method:** The 36 female C57BL/6 mice were immunized subcutaneously with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides (MOG₃₅₋₅₅), then randomly divided into 9, 17, 28 d EAE control group. Each BYHWT group was orally given drugs on the 3rd day after immunization (50 g·kg⁻¹·d⁻¹), and EAE control group was given the same volume of normal saline in the same way once a day for 9, 17 and 28 d after immunization. The effect of BYHWT on EAE mice was observed with

[收稿日期] 20181116(012)
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473577);黄芪资源产业化及产业国际化协同创新中心项目(HQXTCXZX2016-020)
[第一作者] 刘建春, 硕士, 副教授, 从事神经系统形态学研究, E-mail: liujc68@163.com
[通信作者] * 马存根, 博士, 教授, 博士生导师, 从事神经免疫学研究, E-mail: macungen2001@163.com

internationally accepted clinical score. Brain and spinal cord specimens were collected at 9, 17 and 28 d after immunization. The neuroprotective effect of BYHWT was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and solid blue staining (LFB). The expressions of BDNF and GAP-43 in spinal cord and brain were detected by Western blot. **Result:** After treatment, BYHWT can significantly inhibit myelitis cell infiltration and alleviate myelin loss. Compared with EAE group, the expression of Nogo-A in the spinal cord of each BYHWT group was significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the expression of BDNF in the spinal cord was significantly up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the BYHWT group 17 and 28 d group compared with EAE group 17 and 28 d group. Compared with EAE 9, 17 d group, GAP-43 expression was significantly up-regulated in the spinal cord of BYHWT 9, 17 d group ($P < 0.01$). **Conclusion:** BYHWT can improve the local nerve growth microenvironment and promote the expression of NTFs, reduce the expressions of neuroinhibitory factors, and play a role in neuroprotection.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang; experimental autoimmune encephalomyelitis; brain-derived neurotrophic factor; growth-related protein-43; Nogo-A protein; nerve growth microenvironment

多发性硬化(MS)是中枢神经系统(CNS)的自身免疫疾病。炎性细胞浸润、轴突变性及髓鞘脱失为主要病理特征^[1]。现代医学治疗多发性硬化多使用免疫抑制剂和免疫调节剂,抑制炎症脱髓鞘性病变的进程,但不能减轻髓鞘脱失,且这些药物产生的副作用也较大^[2],MS仍无特效疗法,寻求理想的治疗方法是亟待解决的问题。

正常状态下,神经微环境中的神经营养因子使神经组织维持正常功能;而神经损伤后神经微环境中神经营养类物质缺乏,导致轴突生长抑制^[3]。大量的研究发现,一些中药复方及其有效成分能够调节神经生长的微环境,促进神经营养因子、神经再生相关蛋白的表达,有助于神经轴突的再生^[4]。如补阳还五汤通过补气、活血协同作用能显著促进脑缺血后神经发生和神经功能恢复^[3]。中医学通过对MS的研究探索认为,其基本病机是本虚标实,气虚血瘀证为MS常见证型,治疗应征对病症,采用补气,活血的方法^[6]。补阳还五汤(BYHWT)出自清代医家王清任《医林改错》,具有补气活血通络之功效。本课题组前期研究证实,BYHWT灌胃给药 $50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为最佳剂量,可通过调节脾中T细胞亚群比例及诱导脊髓组织中M1型巨噬细胞转化为M2型,抑制Rho相关激酶II(ROCK II)/Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- κB (NF- κB)炎性通路,发挥其抗炎和免疫调节作用^[7-10]。本研究在前期研究的基础上,发挥中药多靶点、整体调节的特点^[10],以国际通用的MS经典动物模型(EAE)小鼠为研究对象,从调节神经生长的微环境方面探讨补阳还五汤在EAE疾病不同时期(疾病潜伏期、发病高峰期和疾病缓解期)的神经保护机制,为临床应用益气活血

法防治中枢神经系统自身免疫性疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 8~10周龄C57BL/6小鼠36只,体重18~22g,购自北京维通利华公司,合格证号SCXK(京)2016-0006。经山西中医药大学伦理委员会批准,动物实验遵守国际动物实验委员会的实验动物伦理原则。饲养于山西中医药大学神经生物学研究中心动物房,实验前小鼠在清洁级动物房饲养(25℃左右),自由饮食喂养1周。

1.2 药物及试剂 补阳还五汤为《医林改错》的原方剂量,黄芪120g,当归6g,川芎4.5g,赤芍4.5g,地龙3g,西红花3g,桃仁3g,药材购自北京同仁堂药店,并由山西中医药大学段秀俊副教授鉴定。髓鞘少突胶质细胞糖蛋白35-55多肽(MOG₃₅₋₅₅,上海强耀生物科技有限公司,批号9001);tuberculosis bacilli(TB),结合分枝杆菌(美国Difco公司,批号分别为3231141,231141);弗氏佐剂(美国Sigma公司,批号601103);百日咳毒素(PTX,瑞士Alexis公司,批号12687-177);BCA蛋白浓度测定试剂盒,RIPA裂解液(碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0010,P0013B);兔抗脑源性神经营养因子(BDNF)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号25699-1-AP);兔抗Nogo-A,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为BA1309,BA1054);兔抗GAP-43抗体(英国Abcam公司,批号ab75810);兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(杭州贤至生物有限公司,批号AB-P-R001)。

1.3 仪器 U-niversal Hood II型凝胶成像分析仪

(美国 Bio-Rad 公司); CM1950 型冰冻切片机(德国 Leica 公司); DYCZ-40 型凝胶电泳设备, PowerPac™ Basic 型凝胶转膜仪(北京六一生物科技有限公司); SpectraMax® Plus 384 型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); DM4000B/DFC450C 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); TS-1 型水平摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 EAE 小鼠模型建立^[11] 将 MOG₃₅₋₅₅ 10 mg 溶解于生理盐水 2 mL 中, TB 12 mg 溶于完全弗氏佐剂 2 mL; 采用针管混合器将两种溶液充分混合, 制成油包水样乳白色混悬液。乙醚麻醉小鼠后, 在小鼠脊髓腰骶膨大处背侧中线两侧, 皮下注射抗原乳剂(0.1 mL/只)。上述造模药的配制和注射严格按照文献[11]的方法进行。将免疫 2 d 后记录为第 2 天, 免疫当天和第 2 天, 腹腔注射 PTX 300 ng/只。以小鼠出现尾部肌张力下降为 EAE 发病起始, 即模型制备成功^[12]。

2.2 补阳还五汤的制备 药物按常规中药煎煮方法, 将药物在蒸馏水 1 000 mL 中浸泡 2 h, 煎煮 1 h, 纱布滤过, 渣滓再加蒸馏水 800 mL 煎煮 0.5 h, 得第 2 次滤液, 将 2 次滤液合并, 过滤掉药渣, 浓缩至 75 mL, 相当于生药 50 g·kg⁻¹, 得率为 28%, 分装于 5 mL 离心管, 4 °C 冷藏备用。

2.3 动物分组及用药 按体质量分层, 随机将 36 只 8~10 周龄 C57BL/6 雌性小鼠分为 EAE 9, 17, 28 d 组以及 BYHWT 9, 17, 28 d 组, 共 6 组, 每组 6 只。小鼠于免疫后第 3 天开始灌胃给药(500 μL·d⁻¹) BYHWT 各组灌胃给药剂量为 50 g·kg⁻¹·d⁻¹^[7], EAE 组以相同方式和体积给与生理盐水, 每天 1 次, 连续至免疫后 9, 17, 28 d。

2.4 EAE 临床症状评分 采用国际通用的 5 分法^[13], 在免疫当天起每隔 1 d 定时观察和评估实验小鼠症状, 评估标准为正常状态记 0 分; 尾部张力消失, 步态轻度笨拙记 1 分; 一侧后下肢无力, 步态不稳, 被动翻身后但仍可复位记 2 分; 两后肢瘫痪, 被动翻身后不能恢复, 但给予刺激后可以挪动记 3 分; 两后肢瘫痪伴前肢瘫痪记 4 分; 濒死状态或死亡记 5 分。症状介于两者评分之间者以 ±0.5 分计。

2.5 采集标本 免疫后的第 9 天记为疾病潜伏期, 第 17 天记为发病高峰期, 第 28 天记为症状缓解期。在免疫后第 9, 17, 28 天 3 个时间点, 腹腔注射 10% 水合氯醛(0.2 mL/只)麻醉小鼠, 每组随机取 3 只采用磷酸盐缓冲液(PBS)进行心脏灌注至肝脏

发白, 同时将小鼠快速冰上解剖脊髓和脑组织, 用于蛋白含量后采用蛋白免疫印迹法(Western blot)分析。各组剩余的小鼠先进行心脏灌注, 然后采用 4% 多聚甲醛进行体内组织固定至小鼠尾巴翘起, 分离脊髓和脑, 包埋剂包埋, 于液氮中冷冻, 制备 10 μm 的冰冻切片, 进行髓鞘 HE 染色。

2.6 HE 染色检测脊髓炎细胞浸润情况 将脊髓冰冻切片在蒸馏水中浸泡 2 min, 苏木精染色 5 min, 自来水冲洗 5 min, 0.5% 盐酸-乙醇分化 15 s, 自来水冲洗 1 min, 伊红染色 2 min, 自来水冲洗 5 min, 依次经过 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 晾干, 用中性树胶封片, 光镜下观察。

2.7 髓鞘染色法检测脊髓髓鞘脱失情况 取脊髓切片于 95% 乙醇中浸泡 15 min, 浸于固蓝液中, 57 °C 温箱孵育过夜, 依次经过 95% 乙醇溶液、去离子水浸洗 5~10 min, 0.05% 碳酸锂快速浸洗, 70% 乙醇分化至灰质与白质能够清晰辨别, 去离子水浸洗 5 min, 梯度乙醇脱水, 70% 乙醇中 30 s, 70% 乙醇中 30 s, 80% 乙醇中 30 s, 90% 乙醇中 30 s, 95% 乙醇中 30 s, 100% 乙醇中 1 min, 100% 乙醇中 2 min; 二甲苯透明 2 次, 各 5 min, 中性树胶封片, 光镜下观察。

2.8 Western blot 检测 BDNF, GAP-43, Nogo-A 蛋白表达 脊髓和脑组织称质量, 按比例加入组织裂解液在冰上充分裂解, 采用 BCA 法测定脊髓和脑组织蛋白含量。制备蛋白上样缓冲液, 用微量加样器将制备好的蛋白样品约 40 μg 和 marker 5 μL 加入上样孔。采用凝胶电泳分离蛋白, 然后, 用湿式转移法将分离的蛋白凝胶转移到硝酸纤维(PVDF)膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 加入 BDNF(1:500), GAP-43(1:1 万), Nogo-A(1:200) 和 GADPH(1:1 000) 一抗, 4 °C 过夜; 次日洗涤后, 用封闭液稀释相应的 HRP 标记二抗(1:5 万), 室温孵育 2 h。洗膜, 化学发光显示蛋白条带, 检测条带, 并进行统计学分析。

2.9 统计学方法 数据处理采用 Graph Pad Prism 5.0 统计分析软件, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较使用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BYHWT 对 EAE 小鼠发病时间和临床症状的影响 EAE 17, 28 d 组小鼠自免疫后的第 9 天开始起病, 小鼠此时出现精神萎靡, 皮毛失去光泽, 在免疫后 17 d 达到症状高峰期, 临床症状评分最高可达 4.5 分, 小鼠尾部及四肢肌力下降, 有的小鼠出现瘫

疾;与 EAE 组的平均起病时间比较, BYHWT 17, 28 d 组平均起病时间明显推迟 ($P < 0.05$), 临床症状评分显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 补阳还五汤对 EAE 小鼠发病时间和临床症状的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1 Effect of BYHWT on clinical symptoms and morbidity time of EAE mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	平均起病时间 /d	平均最高临床评分 /分
EAE	-	10.60 ± 1.14	3.30 ± 0.11
BYHWT	50	12.80 ± 0.84 ¹⁾	1.56 ± 0.38 ²⁾

注:两组发病率均为 100%;与 EAE 组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

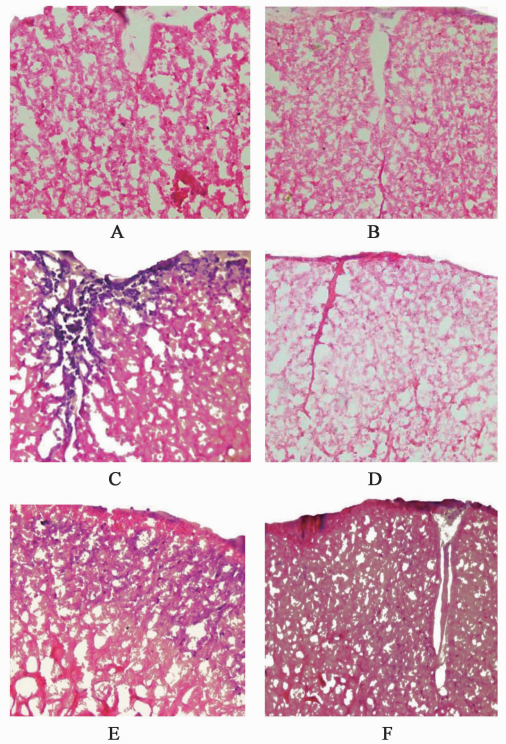
3.2 BYHWT 治疗对脊髓炎细胞浸润的影响 EAE 9 d 组脊髓中有少量炎细胞浸润,与 EAE 9 d 组比较, BYHWT 9 d 组小鼠的脊髓组织中无炎细胞浸润; EAE 17 d 组小鼠的脊髓组织中出现大量炎细胞浸润;与 EAE 17 d 组比较, BYHWT 17 d 组小鼠的脊髓中未见明显炎细胞浸润; EAE 28 d 组小鼠的脊髓组织中炎细胞浸润减少,与 EAE 28 d 组比较, BYHWT 28 d 组小鼠的脊髓中已无明显炎细胞浸润。见图 1。

3.3 BYHWT 治疗对脊髓髓鞘脱失的影响 BYHWT 治疗可减少脊髓的髓鞘脱失。疾病潜伏期,与 EAE 9 d 组比较, BYHWT 9 d 组小鼠的脊髓白质结构细密;发病高峰期, EAE 17 d 组小鼠的脊髓组织中可见大面积髓鞘脱失,与 EAE 17 d 组比较, BYHWT 17 d 组小鼠的脊髓白质中髓鞘脱失面积较少 ($P < 0.01$)。发病缓解期,与 EAE 28 d 组比较, BYHWT 28 d 组髓鞘脱失率减少 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 2。

3.4 BYHWT 对 BDNF, GAP-43, Nogo-A 蛋白表达的影响 与 EAE 各组比较, BYHWT 各组脊髓中 Nogo-A 的表达显著降低 ($P < 0.01$), 在脊髓中 BYHWT 9 d 组与 EAE 9 d 组比较无统计学意义, 而 BYHWT 17, 28 d 组与 EAE 17, 28 d 组比较表达明显上调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); GAP-43 在脊髓中表达结果显示, BYHWT 9, 17 d 组与 EAE 9, 17 d 组比较表达显著上调 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 3。

4 讨论

MS 是一种主要累及中枢神经系统白质的炎性脱髓鞘疾病,具有时间和空间复发的临床特征,目前尚无理想的治疗办法。MS 属于中医“痿证”范畴,气虚血瘀证是 MS 的一个重要证候要素之一,是



A. EAE 9 d 组; B. BYHWT 9 d 组; C. EAE 17 d 组; D. BYHWT 17 d 组; E. EAE 28 d 组; F. BYHWT 28 d 组 (图 2, 3 同)

图 1 BYHWT 治疗对脊髓炎性细胞浸润的影响 (HE, ×200)
Fig. 1 Effect of BYHWT on inflammatory cell infiltration of spinal cord (HE, ×200)

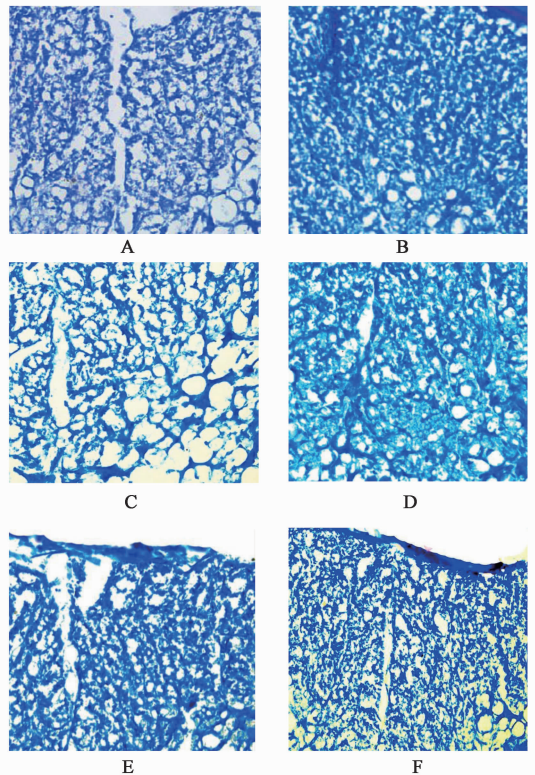


图 2 BYHWT 治疗对小鼠脊髓髓鞘脱失的影响 (LFB, ×200)
Fig. 2 Effect of BYHWT on spinal cord myelin loss in mice (LFB, ×200)

表 2 BYHWT 治疗对小鼠脊髓髓鞘脱失的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of BYHWT on myelin sheath depigmentation of spinal cord in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	髓鞘脱失占脊髓蛋白质面积的百分比/%
EAE 17 d	-	63.30 ± 2.29
BYHWT 17 d	50	33.57 ± 4.14 ¹⁾
EAE 28 d	-	37.62 ± 1.78
BYHWT 28 d	50	19.26 ± 1.61 ²⁾

注:与 EAE 17 d 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 EAE 28 d 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 BYHWT 对 BDNF, Nogo-A, GAP-43 蛋白在脊髓的表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of BYHWT on expressions of BDNF, Nogo-A and GAP-43 proteins in spinal cord ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GAP-43/GAPDH	Nogo-A/GAPDH	BDNF/GAPDH
EAE 9 d	-	0.30 ± 0.01	0.76 ± 0.04	0.48 ± 0.06
BYHWT 9 d	50	0.48 ± 0.02 ¹⁾	0.62 ± 0.03 ⁴⁾	0.64 ± 0.01
EAE 17 d	-	0.40 ± 0.02	0.67 ± 0.02	0.66 ± 0.01
BYHWT 17 d	50	0.67 ± 0.02 ²⁾	0.54 ± 0.03 ⁵⁾	0.86 ± 0.01 ⁵⁾
EAE 28 d	-	0.54 ± 0.00	0.72 ± 0.06	0.84 ± 0.02
BYHWT 28 d	50	0.85 ± 0.01 ³⁾	0.58 ± 0.01 ⁶⁾	1.06 ± 0.14 ⁶⁾

注:与 EAE 9 d 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 EAE 17 d 组比较²⁾ $P < 0.01$;与 EAE 28 d 组比较³⁾ $P < 0.01$;EAE 9 d 组比较⁴⁾ $P < 0.01$;与 EAE 17 d 组比较⁵⁾ $P < 0.01$;与 EAE 28 d 组比较⁶⁾ $P < 0.01$ 。

导致许多重要症状出现的核心病机^[14]。补阳还五汤为清代名医王清任所创气虚血瘀理论的代表方剂,原方中重用生黄芪其用量占全方总药量的 84.21%,旨在气旺以促血行,并助诸药之力,活血祛瘀,通经活络。本研究在免疫后第 3 天给予灌胃干预治疗,在 EAE 潜伏期(免疫后第 9 天),EAE 高峰期(免疫后第 17 天)和 EAE 缓解期(免疫后第 28 天),分别取脑和脊髓组织进行研究。结果显示 BYHWT 可明显降低 EAE 的发病率,使 EAE 发病高峰期和缓解期的神经功能评分下降,有效改善了 EAE 的临床症状。病理结果证实,在 EAE 发病高峰期和缓解期,BYHWT 可抑制脊髓炎性细胞浸润和髓鞘脱失。

大量的研究发现,补阳还五汤有神经保护和促进神经再生的作用^[15-16],其作用机制可能包括促进表皮生长因子、成纤维细胞生长因子等正性调控因子的表达,改善中枢神经轴突损伤后神经营养因子类物质缺乏的微环境。促进神经再生相关蛋白的表达,维持神经细胞存活、促使神经元之间的连接结构突触增长和细胞的有丝分裂^[17-18];解除负性调控因

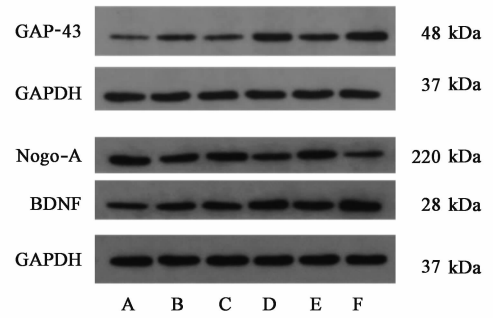


图 3 脊髓 BDNF, Nogo-A, GAP-43 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expressions of BDNF, Nogo-A and GAP-43 in spinal cord

子,如髓鞘抑制蛋白、谷氨酸受体、肾上腺皮质激素等的抑制作用,从而减轻继发性损伤,最终诱导神经干细胞增殖、迁移、定向分化以及突触形成等^[19]。补阳还五汤通过上调缺血环境下脑组织中神经营养因子和神经生长因子的表达,诱导突触相关蛋白 GAP-43 和突触后致密蛋白-95 (PSD-95) 的表达,促进脑缺血后大鼠神经元突触重塑^[20]。神经营养因子在神经元存活、生长、迁移以及与其他细胞建立功能性联系或在神经元轴突的再生等方面起诱导、调节和控制作用^[21]。BDNF 可以通过多种途径,如促进再生相关基因 GAP-43 和 T 细胞的表达,通过 ERK 增加第二信使 cAMP 的表达水平等促进轴突再生^[22-23]。BDNF 不仅可以促进神经纤维的再生,而且还可以减少二次损伤中残余轴突的脱髓鞘反应^[24-25]。GAP-43 蛋白是一种膜相关磷蛋白,主要表达于发育或再生轴突的生长锥末端,是未来研究神经再生和轴突可塑性机制的关键蛋白之一,主要参与轴突生长、突触重构以及儿茶酚胺和神经肽类物质的分泌^[26-27]。Gupta 等^[28]通过实验证明,GAP-43 蛋白在阳性 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑

丙酸 (AMPA) 受体调节剂和 BDNF 发挥促神经生长和轴突侧枝发芽方面的作用和神经元可塑性方面作用过程中是一种共同的中介物, GAP-43 可能治疗在神经变性疾病中是一个新的治疗靶点。本实验中, BYHWT 治疗可以诱导 BDNF 和 GAP-43 表达, 促进髓鞘的修复和再生。

脊髓损伤后引起的轴索损伤是一系列的二次损伤。研究人员从分化的少突胶质细胞中成功分离了一种抑制蛋白, 命名为 Nogo 蛋白, 包含 3 种同型异构体: Nogo-A, Nogo-B 和 Nogo-C^[29]。研究证明, Nogo-A 在体内和体外实验中都表现出强烈的抑制轴突生长的作用^[30], 抑制 Nogo-A 可以促进轴突生长和功能恢复。因此, 在本研究中 BYHWT 抑制 Nogo-A 的表达, 也将有助于神经突触和髓鞘的保护和再生。

综上所述, BYHWT 治疗 EAE 可明显改善疾病高峰期和疾病缓解期临床症状、减轻髓鞘脱失, 可能与 BYHWT 通过补气、活血、祛瘀、通络, 促进神经营养因子 BDNF 和神经再生蛋白 GAP-43 上调, 抑制 Nogo-A 的表达, 从而改善了神经生长的微环境密切相关。

总之, BYHWT 可通过多靶点、多途径, 整体调节, 发挥神经保护作用。BYHWT 治疗 EAE 的作用机制可能与促进 BDNF 和 GAP-43 表达以及抑制 Nogo-A 的表达关联。BYHWT 通过补气、活血、祛瘀、通络, 有望为临床治疗 MS 提供一种安全可靠、疗效显著且副作用小的有效治疗选项。

[参考文献]

[1] 李蕊, 胡学强. 多发性硬化的治疗进展[J]. 实用医院临床杂志, 2013, 10(3): 1-6.

[2] 于婧文, 李艳花, 张辉, 等. 新型 Rho 激酶抑制剂 FSD-C11 化合物抑制 EAE 的作用研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2015, 22(3): 156-161.

[3] 张辉, 张海飞, 李艳花, 等. ROCK 抑制剂在中枢神经再生和修复中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(11): 1227-1229, 1233.

[4] 王义周, 寇爽, 刘妍, 等. 中医药促进中枢神经再生的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 197-201.

[5] 曲铁兵, 俞天虹, 刘志婷, 等. 补阳还五汤及其拆方对大鼠脑缺血后神经发生的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(3): 342-347.

[6] 刘建春, 张红珍, 郭文娟, 等. 补阳还五汤防治多发性硬化作用机理概述[J]. 中医杂志, 2016, 57(13):

1155-1159.

[7] 王晓庆, 田倩倩, 李艳花, 等. 补阳还五汤对 EAE 小鼠免疫调节的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(1): 52-57.

[8] 田倩倩, 李艳花, 尉杰忠, 等. 补阳还五汤对实验性自身免疫性脑脊髓炎单核巨噬细胞的免疫调控作用[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(2): 200-207.

[9] 田倩倩. 补阳还五汤对实验性自身免疫性脑脊髓炎单核巨噬细胞的免疫调控研究[D]. 太原: 山西中医药大学, 2017.

[10] 郑华珠, 王利胜, 吴银爱, 等. UPLC-MS/MS 联合细胞膜固相色谱法分析补阳还五汤作用于神经元样 PC12 细胞的效应成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 14-20.

[11] LOU Z Y, CHEN C, HE Q, et al. Targeting CB 2 receptor as a neuroinflammatory modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Mol Immunol, 2011, 49(3): 453-461.

[12] 张若楠, 柴智, 樊慧杰, 等. 五子衍宗丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠防治作用及其机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1316-1319.

[13] Urban J L, Kumar V, Kono D H, et al. Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy [J]. Cell, 1988, 54(4): 577-592.

[14] 樊永平, 王少卿. 论多发性硬化血瘀与活血化痰治法[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 3819-3821.

[15] 王义周, 寇爽, 刘妍, 等. 中医药促进中枢神经再生的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 197-201.

[16] 郭文娟, 张红珍, 李艳花, 等. 补阳还五汤促进中枢神经再生作用研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(3): 434-436.

[17] Herzog C, Otto T. Regeneration of olfactory receptor neurons following chemical lesion: time course and enhancement with growth factor administration[J]. Brain Res, 1999, 849(1/2): 155-161.

[18] O'kusky J R, Ye P, D'ercole A J. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development [J]. J Neurosci, 2000, 20(22): 8435-8442.

[19] Prinjha R, Moore S E, Vinson M, et al. Neurobiology: inhibitor of neurite outgrowth in humans [J]. Nature, 2000, 403(6768): 383-384.

[20] 刘会贤, 刘敬霞, 俞维, 等. 补阳还五汤和星蒺承气汤对脑缺血大鼠神经元突触重塑及胶质源性神经营养因子和神经生长因子表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(3): 702-705.

- [21] Lichtman J W, Taghert P H. Trophic factor theory matures[J]. Nature, 1987, 326(6111):336.
- [22] 籍新潮, 徐如祥. 脑源性神经营养因子在中枢神经系统损伤中的多种神经保护作用及其机制的研究进展[J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2016, 2(3): 168-172.
- [23] Kwon B K, LIU J, Messerer C, et al. Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 3246-3251.
- [24] de Groot D M, Coenen A J M, Verhofstad A, et al. *In vivo* induction of glial cell proliferation and axonal outgrowth and myelination by brain-derived neurotrophic factor[J]. Mol Endocrinol, 2006, 20(11):2987-2998.
- [25] XIAO J, Hughes R A, Lim J Y, et al. A small peptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor promotes peripheral myelination[J]. J Neurochem, 2013, 125(3): 386-398.
- [26] Frey D, Laux T, XU L, et al. Shared and unique roles of CAP23 and GAP-43 in action regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity [J]. Cell Biol, 2000, 149(7):1443-1454.
- [27] 刘健, 杨小玉, 杨茂光, 等. 中枢神经损伤后 GAP-43 蛋白对神经再生及轴突导向作用及其机制的研究进展[J]. 吉林大学学报, 2013, 39(1):180-183.
- [28] Gupta S K, Mishra R, Kusum S, et al. GAP-43 is essential for the neurotrophic effects of BDNF and positive AMPA receptor modulator S18986 [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(4):624-637.
- [29] Walmsley A R, Mir A K. Targeting the Nogo-A signalling pathway to promote recovery following acute CNS injury [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(24):2470-2484.
- [30] 赵喆, 邓其跃. Nogo-A 在中枢神经系统损伤后再生及发育中的作用[J]. 局解手术学杂志, 2012, 21(6): 659-661.

[责任编辑 孙丛丛]