论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1710-04

泼尼松龙保护实验性变态反应性脑脊髓炎中轴突损伤的实验研究

王顺和[1,2],谭晓妹[1],李 苒[1],石海波[1] (重庆医科大学:[1]基础医学院病理学教研室,[2]干细胞与组织细胞工程研究室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨泼尼松龙对实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)中枢神经轴突损伤的影响以及与炎症反应及髓鞘脱失的关系。**方法** 用MOG_{35-55}蛋白多肽免疫C57BL/6J小鼠复制多发性硬化(multiple sclerosis, MS)的动物模型EAE,采用轴突的Bielschowsky染色结合常规形态学染色和神经系统髓鞘染色比较治疗组与对照组的差别。**结果** 泼尼松龙能促进EAE临床症状的缓解;减轻中枢神经轴突损伤,同时能清除病灶中浸润的炎症细胞及降低神经髓鞘的脱失。但是当停止用药后,该疾病又复发,轴突的损伤与未治疗对照组相同。**结论** 泼尼松龙能诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎的缓解,对轴突损伤有短暂的保护作用。

关键词: 轴突损伤;泼尼松龙;实验性变态反应性脑脊髓炎;中枢神经系统

中图法分类号: R593.1;R744.3;R977.11 **文献标识码:** A

Protective effects of prednisolone on axonal damage in experimental autoimmune encephalomyelitis

WANG Shun-he[1,2], TAN Xiao-shu[1], LI Ran[1], SHI Hai-bo[1] ([1]Department of Pathology, Faculty of Basic Medical Sciences, [2]Department of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of prednisolone on the protection of axonal damage in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), and the relationship of inflammatory responds with demyelination in the central nervous system. **Methods** Animal model of EAE, also as multiple sclerosis (MS) was established by immunizing C57BL/6J mice with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides$_{35-55}$ (MOG_{35-55}), and their clinical signs were scored. Totally 30 immunized C57BL/6J mice were divided into 3 groups, *i. e.*, untreated group, prednisolone continuously-treated group and prednisolone withdrawal group. Prednisolone at 60 μg/ml was added into the drinking water for the mice of the later 2 group at the onset of EAE (12 – 14 d after immunization). The drinking water was continued for the second group till the end of observation (55 d after immunization), but withdrawn for the mice of the third group at 3 d after the disappearance of symptoms. Axonal damage, inflammation and demyelination were observed by conventional histological method, Bielschowsky staining, and Luxol Fast Blue staining. **Results** Our data indicated that prednisolone could remit the clinical signs of EAE, attenuate axonal damage, eliminate the infiltrate inflammatory cells, and decrease demyelination in central nervous system. In prednisolone withdrawal group, the disease relapsed in 5 to 17 d after the drug stop, and the status of axonal damage was same as that of untreated group. **Conclusion** Prednisolone as a immune regulator can alleviate the signs of EAE and exert transitory protective effect on axonal damage.

Key words: axonal damage; prednisolone; experimental autoimmune encephalomyelitis; central nervous system

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是自身免疫T细胞介导的中枢神经系统(central nervous system, CNS)的炎症性神经变性疾病。中枢神经系统轴突损伤,包括损伤机制、损伤出现的时间以及对轴突的保护、促进轴突的再生为近年来研究的重点[1]。目前缺乏特效的治疗方法,主要是针对缓解临床症状的抗炎症或免疫调节治疗[2,3]。实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是多发性硬化的动物模型,可以在多种动物,包括小鼠中进行复制[3]。根据使用的动物种系不同,利用MOG多肽(myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides $_{35-55}$,

作者简介:王顺和,男,重庆市潼南县人,硕士,副教授,主要从事中枢神经脱髓鞘样疾病及神经再生方面的研究,发表论文25余篇。电话:(023)68485789,E-mail: wangshunhe120@yahoo.com

收稿日期:2008-03-03;修回日期:2008-05-29

MOG_{35-55})复制出慢性进行型或复发/缓解型多发性硬化的动物模型。利用这种动物模型,不仅可以研究多发性硬化的发病机制,而且可以用于多发性硬化的实验性治疗和药物疗效的评价[4]。糖皮质激素(corticosteroids)是一种激素类药物,可以用于实验性变态反应性脑脊髓炎的治疗,尤其是急性和急性复发期的治疗[5,6],但是该类药物对轴突损伤的影响以及与炎症细胞浸润、髓鞘脱失的关系少见报道。

本研究利用 MOG_{35-55}作为抗原,复制 MS 的动物模型 EAE,观察泼尼松龙对 EAE 临床症状、脊髓轴突损伤的影响,并探讨轴突损伤与炎症细胞浸润、髓鞘脱失的关系。

1　材料与方法

1.1　动物及实验分组

雌性 C57BL/6J 小鼠,10 ~ 12 周龄,体质量在 20 g 左右,饲养在 PC2 级实验动物中心。动物自动进食和自动饮水。所有操作过程按照有关实验动物使用管理条理进行。30 只雌性 C57BL/6J 小鼠分为 3 组,EAE 未治疗组 10 只,EAE 治疗组 10 只,EAE 治疗后停药组 10 只。

1.2　实验性变态反应性脑脊髓炎建立和临床评分

EAE 模型的建立根据文献[7,8]报道进行操作。每只实验组动物采用皮下注射 200 μg MOG_{35-55}(Auspep, Melbourne)合成多肽,混合在完全福氏佐剂(CFA; Difco, Detroit, MI)中,其中含 4 mg/ml 灭活卡介苗。注射的当天和注射后 48 h,分别由尾静脉注射 300 ng 百日咳毒素(List biol labs, Campbell, USA),用 pH 值为 7.4 的 PBS 稀释。免疫动物后,每天观察实验动物的发病情况。根据以下的临床症状标准给每只小鼠评分:0 分,无临床症状;1 分,尾部无力;2 分,后肢无力;3 分,后肢瘫痪;4 分,后肢瘫痪,并有前肢无力或瘫痪;5 分,临死状态。

1.3　泼尼松龙实验性治疗

根据文献[9]报道,采用 10 mg/(kg · d)的剂量,即将 30 mg 粉状泼尼松龙(prednisolone Sigma-Aldrich)溶于1 ml乙醇中,加入 500 ml 饮用水,使终浓度为 60 mg/ml。为了保持饮水中药物的浓度,每 2 天更换 1 次饮用水。对照组仅仅给予常规饮用水。根据临床的实际情况及以往的实验[8],动物免疫后的第 12 ~ 14 天开始发病,因此选择免疫后的第 14 天为开始治疗的时机,治疗后停药组从临床症状消失后第 3 天开始停药。所有实验动物观察至免疫后的第 55 天。

1.4　组织学检察

所有实验动物观察 55 d。用过量二氧化碳处死实验动物,解剖取出小鼠的脑、小脑和脊髓,固定在 10% 的中性福尔马林中。石蜡包埋,5 μm 厚连续切片。常规 HE 染色,观察中枢神经系统的炎症细胞浸润情况。根据文献[8]报道,对炎症反应程度进行评分:0 分,无炎症细胞浸润;1 分,炎症细胞仅浸润在脑表面,即蛛网膜下腔内;2 分,轻度炎症细胞脑实质浸润;3 分,中度炎症细胞脑实质浸润;4 分,重度和弥漫性脑实质见炎症细胞浸润。

1.5　神经病理学特殊染色及观察

1.5.1　Luxol Fast Blue-HE 髓鞘染色　　5 μm 厚石蜡切片,常规脱蜡、水化,入 0.1% Luxol Fast Blue 溶液中 60 ℃烤箱,2 h,室温冷却 15 min,用 70% 酒精洗去多余的染液,切片入 4% 饱和碳酸锂分化至神经白质与灰质分界清楚。切片再进行常规 HE 染色,脱水、透明、封片。根据以下标准评分:0 分,无髓鞘脱失;1 分,轻度髓鞘脱失;2 分,中度髓鞘脱失;3 分,重度髓鞘脱失。

1.5.2　Bielschowsky 轴突银染色　　5 μm 厚石蜡切片,常规脱蜡至双蒸水,入预热的 20% 硝酸银(nitric silver)溶液中37 ℃烤箱,避光,染色 15 min。切片入双蒸水中洗 10 min,同时于 20% 硝酸银中加入浓缩氨水溶液,制成氨银溶液,将切片转移至该溶液中,37 ℃烤箱,避光,10 min。然后加入 7 ~ 8 滴发展液,显色 30 min 左右,5% 硫代硫酸钠溶液(sodium thiosulfate),室温,5 min。常规脱水透明、封片。根据脊髓轴突损伤的面积对轴突损伤评分:0 分,正常;1 分,损伤小于 25% ;2 分,损伤面积占 25% ~ 50% ;3 分,损伤面积占 50% ~ 75% ;4 分,损伤面积 >75% 。

1.6　脾脏淋巴细胞增生实验

处死动物,迅速取出脾脏,制成浓度为 5×10^6 ml^{-1} 单细胞悬液,培养在含 10% 胎牛血清、谷氨酸、青霉素和链霉素的 1640 培养液中。增生实验在 96 孔培养板中进行。每孔加入 100 μl 培养液,其中含 5×10^5 个细胞。每组重复 3 孔。为了测定实验动物脾脏淋巴细胞对特异性抗原的反应,每空加入 MOG_{35-55}多肽,使终浓度达到 10 μg/ml。培养 72 h 后,于每孔中加入 2 μCi ^{3}H-thymidine,继续培养 18 ~ 24 h。细胞收集在玻璃纤维上,干燥。用液体闪烁分析仪(Packard Tri-Carb 1900TR)读取每分钟放射性计数(cpm),取 3 孔的平均数为统计结果。用 Conconavalin A (10 μg/ml)的非特异性刺激为阳性对照。

1.7　统计学处理

不同组之间的临床表现评分及组织学改变,包括炎症细胞浸润、髓鞘脱失、轴突损伤改变的差别用非配对秩和检验进行统计学处理;各组间 cpm 值比较采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　泼尼松龙实验性治疗逆转实验性变态反应性脑脊髓炎的临床症状

所有实验动物全部发病,最早出现尾部无力的时间是在免疫后第 10 天,以后发病的动物逐渐增多、症状逐渐加重,第 15 天全部动物发病。在免疫后第 20 天,EAE 未治疗对照组动物的临床症状达到高峰期,以后该组动物的临床症状维持在较高水平,临床评分为(4.10 ± 0.42)。治疗组的 EAE 动物在治疗后 10 d 内临床症状消失,重新恢复活动能力,个别延长至 20 d,但最终完全恢复。治疗组最高临床评分为(1.52 ± 0.08),与未治疗对照组比较差别具有显著性($P < 0.05$)。对治疗后停药组的动物,待临床症状消失 3 d 后,终止泼尼松龙治疗,动物重新表现出临床症状,重新出现临床症状的时间一般为停药后的第 5 ~ 17 天,平均为 9 d。在停药后 20 d,该组动物重新出现临床症状,其临床评分为(3.90 ± 0.40),与未治疗对照组比较差别不具显著性($P > 0.05$)。表明泼尼松龙实验性治疗能逆转实验

性变态反应性脑脊髓炎的临床症状，但其作用是短暂的。

2.2　泼尼松龙实验性治疗降低中枢神经系统轴突损伤

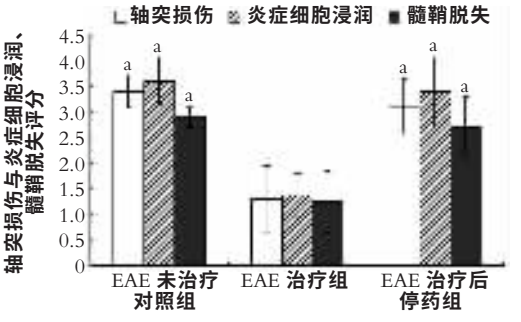
轴突的损伤是脱髓鞘病变中的一种重要的改变。损伤的轴突表现为形态不规则、肿胀、直径不一致、扭曲；轴突断裂，在断端表现为球状、卵圆形或橄榄状；另一种突出的变化是轴突的消失。EAE 未治疗对照组中轴突损伤非常明显，轴突损伤评分达到（3.40 ± 0.30），与我们以前的研究[8]报道一致。EAE 治疗组轴突损伤明显减少，轴突损伤评分为（1.30 ± 0.64），与 EAE 未治疗对照组比较差别具有显著性（$P < 0.05$）。但是治疗后停药组的轴突损伤又变得明显，其损伤的形态表现与 EAE 未治疗对照组相同，其损伤评分达到（3.10 ± 0.55），与 EAE 未治疗对照组比较差别无显著性（$P > 0.05$）（图 1，图 2 A、B、C）。

2.3　泼尼松龙降低炎症细胞浸润及减轻髓鞘脱失

EAE 未治疗对照组中见有明显的炎症细胞的浸润。脑、小脑和脊髓的白质，尤其是脊髓的白质是主要的浸润部位。炎症细胞主要是以淋巴细胞，有的病例也可见到中性粒细胞，该组动物 CNS 内炎症细胞浸润评分为（3.60 ± 0.46）。泼尼松龙治疗的 EAE 动物，其 CNS 内炎症细胞的浸润显著减少，CNS 内炎症细胞浸润评分为（1.38 ± 0.42），与未治疗对照组比较差别具有显著性（$P < 0.05$）（图 1，图 2D、E）。

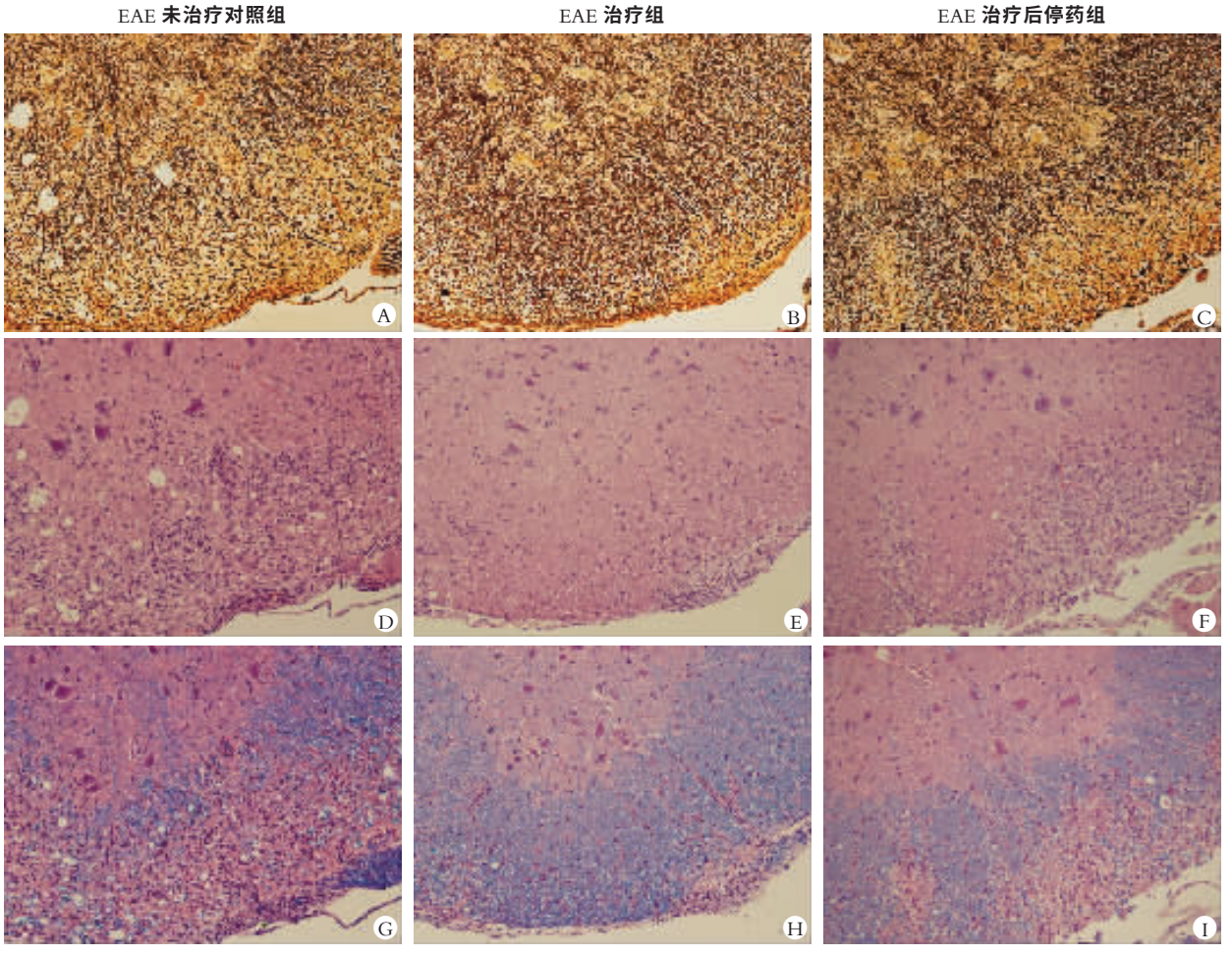
髓鞘被 Luxol Fast Blue 染成蓝色。在 EAE 未治疗动物的神经组织中，可见髓鞘被破坏的碎片，并可见大片的髓鞘脱失，其髓鞘脱失的评分为（2.90 ± 0.20）。髓鞘脱失的区域往往有大量的炎症细胞浸润，表明髓鞘的破坏与炎症有一定的关系。在某些炎症细胞中可见到吞噬的髓鞘碎片。泼尼松龙治疗的 EAE 动物，其 CNS 内髓鞘脱失显著减少，其评分为（1.25 ± 0.60），与未治疗对照组比较差别具有显著性（$P < 0.05$）（图 1，图 2 G、H）。

对于临床症状消失，评分为零，恢复活动能力的动物，在停止治疗后，随着临床症状的重新出现，中枢神经组织中炎症细胞的浸润、髓鞘的脱失又开始出现，多数动物达到非治疗组动物的程度，与 EAE 未治疗对照组比较差别无显著性（$P > 0.05$）（图 1，图 2 F、I）。



a：$P < 0.05$，与 EAE 治疗组比较

图 1　泼尼松龙减轻轴突损伤以及与炎症细胞浸润、髓鞘脱失的关系



A、B、C：Bielschowsky 轴突染色；D、E、F：HE 染色；G、H、I：Luxol Fast Blue 髓鞘染色

图 2　病理学观察各组轴突损伤以及炎症细胞浸润、髓鞘脱失的情况　（×200）

2.4　泼尼松龙降低自身反应性淋巴细胞对 MOG_{35-55} 的反应

实验结果表明,EAE 非治疗动物的脾脏淋巴细胞对特异性抗原 MOG_{35-55} 的刺激增生反应明显增加(16 981 ± 5 476)cpm,用泼尼松龙治疗后的动物脾脏淋巴细胞对特异性抗原 MOG_{35-55} 的刺激增生反应明显降低(1 250 ± 230) cpm,经方差分析,与未治疗对照组差别有显著性($P<0.05$),说明泼尼松龙的治疗可以降低淋巴细胞对特异性抗原刺激的反应性。终止治疗后,脾脏淋巴细胞对特异性抗原 MOG_{35-55} 的刺激增生反应重新增强,接近非治疗组的水平(10 099 ± 3 547)cpm,经方差分析,与未治疗对照组差别无显著性($P>0.05$)。

3　讨论

近年来对多发性硬化及 EAE 的研究中发现[10],脱髓鞘疾病或病变中轴突损伤是重要的特征之一,并且轴突损伤是一种早期改变。正因为这种不断累计的轴突损伤,只要超过一定的阈值,将导致不可逆性神经功能障碍。从免疫学发病角度来讲,具有自身免疫性的 T 淋巴细胞进入 CNS 内,与 CNS 内的自身抗原结合,导致一系列炎症反应。致敏的 T 淋巴细胞及炎症介质可以导致神经轴突的损伤[11],髓鞘破坏的产物,如 Nogo A 等,通过与轴突表面的 Nogo A 受体复合物结合,还可以抑制轴突的再生[12]。

本研究利用经典的 Bielschowsky 轴突银染色对轴突损伤进行了研究,探讨泼尼松龙对轴突损伤的影响,以及与炎症反应和髓鞘脱失的关系。研究结果表明。经泼尼松龙治疗组,轴突损伤明显减轻,与未治疗组差别有显著性。但停止用药后,轴突损伤又重新出现,提示泼尼松龙具有抑制轴突损伤的作用,但其作用是短暂的。

泼尼松龙是一种免疫抑制剂,已经被用于自身免疫性疾病的治疗。Biondo 等[9]报道,从泼尼松龙用于实验性变态反应性胃炎的实验性治疗中发现,泼尼松龙可以减少或消除胃粘膜中致病性淋巴细胞,促使胃粘膜的增生,使临床症状消失,胃的结构和功能恢复正常。国内作者[6]也有报道,泼尼松龙能抑制 CNS 的炎症反应和髓鞘脱失。本研究结果表明,EAE 治疗组中 CNS 浸润的炎症细胞明显减少,同时脾脏自身反应性 T 淋巴细胞对特异性抗原的反应性明显降低。从轴突损伤的机制中可以看出,正是因为 CNS 内炎症细胞的减少和致敏 T 淋巴细胞形成减少,抑制了轴突的损伤。

与泼尼松龙用于实验性变态反应性胃炎一样,停止用药后 EAE 动物重新出现症状。组织学上,泼尼松龙明显减轻或消除病灶中淋巴细胞的浸润,但停止用药后病灶中重新出现炎症细胞,脱髓鞘和轴突损伤又重新出现,并和未治疗组相似。目前还不清楚这种停药后重新出现在 CNS 内的炎症细胞是本身存在的或者是重新由胸腺进入到病灶中的。根据以往的研究和文献报道,泼尼松龙能引起无胸腺小鼠的实验性变态反应性胃炎的长期缓解,表明这种重新出现于 EAE 病灶中炎症细胞很大可能是重新由胸腺进入 CNS 内的[9]。因此,对自身免疫性疾病治疗的一种策略就是阻止新的自身反应性克隆的产生,同时阻止其进入 CNS 内,即使在没有免疫抑制剂的情况下,也引起长期免疫耐受,不至于引起疾病的复发。

综上所述,泼尼松龙能促进 EAE 临床症状的缓解,恢复动物的活动能力;降低自身反应性 T 淋巴细胞对特异性抗原的刺激反应和抑制淋巴组织的增生;能清除病灶中浸润的炎症细胞及降低神经髓鞘的脱失和神经轴突的损伤。但是当停止用药后,该疾病又复发,达到未治疗 EAE 对照组的损伤程度,表明单独应用免疫抑制剂泼尼松龙治疗多发性硬化,不能促使髓鞘和轴突结构与功能的恢复。因此,联合神经保护、促神经再生、神经营养因子等综合治疗措施是多发性硬化的一种治疗策略。另一方面,要彻底治愈这类疾病,不仅要清除病灶中的致病性淋巴细胞克隆,而且要防止新的致病性淋巴细胞克隆的产生,使机体对致病性抗原产生长期的免疫耐受。

参考文献:

[1] McQualter J L, Bernard C C. Multiple Sclerosis: a battle between destruction and repair[J]. J Neurochem, 2007, 100(2): 295 - 306.

[2] Frohman E M, Racke M K, Raine C S. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis[J]. N Engl J Med, 2006, 354(9): 942 - 955.

[3] 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(Pt 8): 1953 - 1971.

[4] Steinman L, Zamvil S S. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis [J]. Ann Neurol, 2006, 60(1): 12 - 21.

[5] Sloka J S, Stefanelli M. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis[J]. Mult Scler, 2005, 11(4): 425 - 432.

[6] 樊永平, 王　蕾, 张星虎, 等. 泼尼松对大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎的影响[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(8): 877 - 881.

[7] McQualter J L, Darwiche R, Ewing C, *et al*. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis[J]. J Exp Med, 2001, 194(7): 873 - 882.

[8] 王顺和. 脱髓鞘病变中轴突损伤的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 386 - 389.

[9] Biondo M, Field J, Toh B H, *et al*. Prednisolone promotes remission and gastric mucosal regeneration in experimental autoimmune gastritis [J]. J Pathol, 2006, 209(3): 384 - 391.

[10] Kornek B, Storch M K, Weissert R, *et al*. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions [J]. Am J Pathol, 2000, 157(1): 267 - 276.

[11] Neumann H, Medana I M, Bauer J, *et al*. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases[J]. Trends Neurosci, 2002, 25(6): 313 - 319.

[12] Karnezis T, Mandemakers M, McQualter J L, *et al*. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination[J]. Nat Neurosci, 2004, 7(7): 736 - 744.

(编辑　王　红)