论著

文章编号:1000-5404(2009)24-2452-03

霉酚酸酯对实验性自身免疫性脑脊髓炎的治疗作用

谭晓姝,王顺和 (重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨霉酚酸酯(mycophenolate mofetil,MMF)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)的治疗作用。**方法** 采用豚鼠全脊髓匀浆和完全弗氏佐剂(CFA)为抗原,免疫 Wistar 大鼠复制急性 EAE 模型,给予 MMF 灌胃治疗,观察其对临床症状及病理学改变的影响。**结果** 与 EAE 模型组相比,MMF 治疗组的临床症状减轻,且迅速缓解,病程明显缩短。病理学观察显示 EAE 急性期中枢神经系统大量炎症细胞浸润,在血管周围形成"血管袖套"状结构,并向周围实质扩散,病变区可见明显的髓鞘脱失和轴突损伤;MMF 治疗后病变范围及程度明显减轻。**结论** MMF 对 EAE 大鼠具有明显的治疗作用,可有效控制 EAE 的临床病情,减轻中枢神经系统的病理损害。

关键词: 实验性自身免疫性脑脊髓炎;霉酚酸酯;病理学;大鼠,Wistar;豚鼠

中图法分类号: R-332;R744.51;R979.5 **文献标识码:** A

Therapeutic effect of mycophenolate mofetil on autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats

TAN Xiao-shu, WANG Shun-he (Department of Pathology, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of mycophenolate mofetil (MMF) on rats with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** The guinea pig spinal cord homogenate (GPSCH) and complete Freund's adjuvant were used as the antigen to induce the acute EAE model in Wistar rats which were verified according to clinical scoring. Totally 36 rats were randomly and equally divided into 3 groups, that is, normal control, EAE group and MMF treatment group. In 10 d after immunization, normal saline or MMF (30 mg·kg^{-1}·d^{-1}) were given intragastrically for 7 d to the corresponding groups. The rats were sacrificed on the 16th day and 30th day after immunization for pathological changes of the brain and spinal cord. Clinical manifestation was scored during the experiment. **Results** Compared with the EAE model group, MMF-treated rats had lower clinical scores and shorter disease process. Besides, the inflammatory infiltration, demyelination and axonal damage in the central nervous system were significantly improved in MMF treatment group. **Conclusion** MMF is an effective drug in treating EAE, and can relieve the clinical signs and ameliorate pathological lesions in the central nervous system of acute EAE rats.

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis; mycophenolate mofetil; patholog; rats, Wistar; guineapigs

多发性硬化(multiple sclerosis,MS)是中枢神经系统(central nervous system,CNS)常见的自身免疫性疾病,多累及青年女性,其病理改变主要表现为弥散的炎性浸润(以白质为主)、髓鞘脱失、星形胶质细胞增生和早期轴突损害[1]。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)与 MS 在临床表现、免疫和病理学等方面具有相似的特征,因而成为研究 MS 发病机制和探索其治疗方法的理想动物模型[2]。

霉酚酸酯(mycophenolate mofetil,MMF)是一种新型的免疫抑制剂,目前已成功应用于肾脏、心脏、肝脏等器官的抗移植排斥反应。近年来,其在自身免疫性疾病领域也得到越来越广泛的运用[3]。本研究采用 Wistar 大鼠复制急性 EAE 模型,观察霉酚酸酯对其临床症状和病理变化的影响,以探讨对 EAE 的治疗作用,旨在为临床上 MS 的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 Wistar 大鼠 36 只,6~8 周龄,体质量(200±20)g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。8 周龄左右健康豚鼠,10 只,雌雄不限,体质量 350~400 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

作者简介:谭晓姝,女,重庆市人,硕士,主要从事神经病理学方面的研究。E-mail: xxxmian@sina.com

通信作者:王顺和,电话:(023)68485789,E-mail: wangshunhe120@yahoo.com

收稿日期:2009-02-25;修回日期:2009-05-29

1.2　主要实验试剂

完全弗氏佐剂(CFA)为美国 Sigma 公司产品;百日咳疫苗(bordetella pertussis vaccine,BPV),1 ml 药品中约含 1×10^{11} 个菌体,由国家卫生部上海生物制品研究所提供;霉酚酸酯由上海罗氏制药有限公司提供。

1.3　EAE 模型的建立

用过量的 3.5% 水合氯醛腹腔注射致死豚鼠,迅速在冰上取脊髓,去除脊膜称质量后,用冰生理盐水制成 50%(质量体积比)的豚鼠脊髓生理盐水匀浆,并与等体积的完全弗氏佐剂(CFA)混合,以无菌注射器在冰上抽打,直至成为油包水乳剂,此即为免疫抗原[4]。将 Wistar 大鼠以 3.5% 水合氯醛(1 ml/100 g)腹腔麻醉后,碘酒酒精局部消毒。四足足垫内各注射免疫抗原 0.1 ml,共计 0.4 ml/只,同时后足足背皮内注射百日咳疫苗(BPV)0.1 ml。

1.4　临床症状评分

免疫后(记免疫当日为 0 d),每天观察所有动物的一般情况,并根据以下标准进行临床症状评分:0 分,无任何临床症状;0.5 分,远端半侧尾无力;1 分,全尾无力;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,二便失禁;5 分,濒死状态。

1.5　实验分组及干预措施

实验分为 3 组,正常对照组、EAE 模型组和 MMF 治疗组,每组 12 只。自免疫后第 10 天起,MMF 治疗组以霉酚酸酯 30 mg/(kg·d) 的剂量进行灌胃治疗 1 周,其余两组用等量生理盐水代替。免疫后第 16 天,3 组各取 8 只大鼠处死,其中 6 只进行光镜检查,2 只用于电镜标本制备,其余大鼠观察至免疫后第 30 天处死,每天仍进行临床症状评分,以了解整个病程变化。

1.6　病理学检查的取材与评估

处死大鼠,立即解剖取出脑、小脑和脊髓,浸泡于 10% 福尔马林中固定,石蜡包埋,5 μm 厚连续切片,进行常规 HE 染色、Luxol Fast Blue-HE 髓鞘染色和 Bielschowsky 轴突银染色,观察炎症浸润、脱髓鞘和轴突损伤情况。

1.6.1　HE 染色　　HE 染色观察中枢神经系统的炎症细胞(主要为单核细胞、巨噬细胞及淋巴细胞,少数为中性白细胞)浸润情况,"血管袖套"状改变,评分标准为: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。

1.6.2　Luxol Fast Blue-HE 髓鞘染色　　髓鞘染色主要观察髓鞘脱失情况,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。

1.6.3　Bielschowsky 轴突银染色　　轴突银染可判断轴突的损伤,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,损伤面积大于 75%。

1.7　电镜检查的标本制备

3.5% 水合氯醛(1 ml/100 g)腹腔麻醉大鼠后,开胸经左心灌注 4 ℃ 的生理盐水(加肝素)及 4% 的戊二醛磷酸盐缓冲液,内灌注固定后,取脑和脊髓,于白质区取 1 ~2 mm^3 组织,按常规电镜技术制备超薄切片。

1.8　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SAS 8.2 统计软件,最大症状评分的比较采用 t 检验,组间两两比较采用 SNK 法进行统计分析。

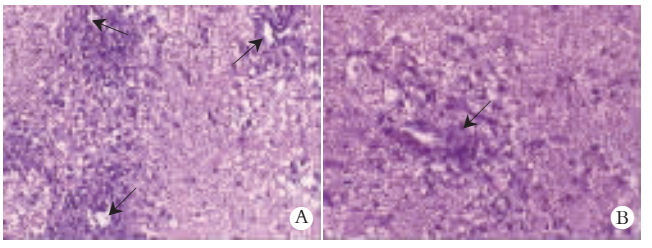
2　结果

2.1　MMF 对 EAE 大鼠临床症状的影响

大鼠于免疫后第 10 天开始陆续发病,表现为精神萎靡,体质量明显下降,尾部无力、拖垂,后肢无力,瘫痪,严重者四肢瘫痪,大小便失禁,甚至出现濒死状态。EAE 模型组大鼠临床症状逐渐加重,第 14 ~16 天为症状高峰期,该组大鼠最大症状评分为(3.40 ± 0.84)。MMF 治疗组大鼠临床症状减轻,且迅速缓解,病程明显缩短,其最大症状评分为(2.50 ± 0.71),与 EAE 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

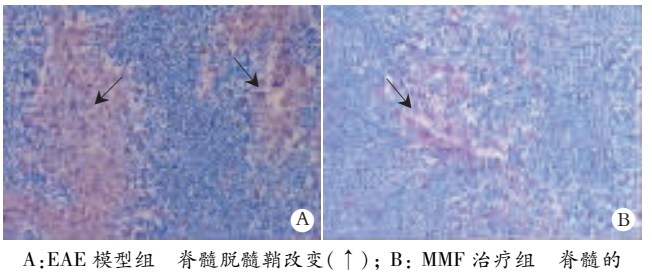
2.2　MMF 对 EAE 大鼠 CNS 病理学形态的影响

正常对照组大鼠脑及脊髓病理检查均未见异常。EAE 模型组经 HE 染色后,可见脑和脊髓实质大量炎症细胞浸润,以淋巴细胞为主,分布大多在白质区。炎症细胞除围绕在小血管周围,形成典型的"血管袖套"状改变外,还向周围实质扩散,呈散在、弥漫的浸润病灶(图 1A)。Luxol Fast Blue-HE 髓鞘染色发现,髓鞘结构疏松,水肿明显,可见大小不等的斑片状髓鞘脱失,其中大多局限在炎症改变明显的部位(图 2A)。Bielschowsky 轴突银染色显示,在炎症浸润与髓鞘脱失的区域,可观察到损伤的轴突,主要表现为轴突形态不规则、肿胀、粗细不等、断裂,严重者呈空泡样缺失(图 3A)。MMF 治疗组的炎症浸润、脱髓鞘和轴突损伤程度均较 EAE 模型组有明显改善(图 1B、2B、3B)。以脊髓为主要评估对象,对各组病变进行评分,结果见表 1。



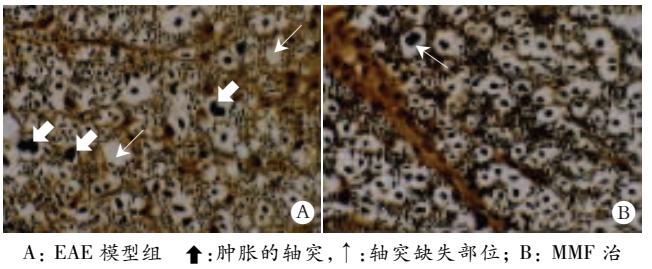
A: EAE 模型组　脊髓内可见弥漫性炎症浸润,"血管袖套"形成(↑);B: MMF 治疗组　炎性浸润明显减少(↑)

图 1　EAE 模型组和 MMF 治疗组脊髓病理学观察　(HE ×200)



A:EAE 模型组　脊髓脱髓鞘改变(↑);B: MMF 治疗组　脊髓的髓鞘改变减轻(↑)

图 2　EAE 模型组和 MMF 治疗组脊髓脱髓鞘改变
(Luxol Fast Blue-HE 染色 ×200)



A: EAE 模型组　⬆:肿胀的轴突,↑:轴突缺失部位;B: MMF 治疗组　↑:轴突损伤明显减轻

图 3　EAE 模型组和 MMF 治疗组脊髓的轴突损伤情况
(Bielschowsky 染色 ×400)

表1 各组大鼠脊髓HE染色、髓鞘染色和轴突银染评分的比较（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	HE染色	髓鞘染色	轴突银染
EAE模型组	3.83±0.41	2.17±0.75	1.83±0.75
MMF治疗组	2.17±0.98[a]	1.17±0.41[a]	1.00±0.63[a]

正常对照组各项评分均为0；a：$P<0.05$，与EAE模型组比较

2.3 MMF对EAE大鼠CNS超微结构的影响

EAE模型组可见大多数髓鞘板层状结构松解，明显分层，部分区域观察到断裂及脱失，轴索明显萎缩、水肿或细胞器消失，血管内皮细胞肿胀，毛细血管基底膜严重破坏。MMF治疗组可见少量髓鞘结构局部松解，轴索病变程度明显减轻。

3 讨论

EAE具有与人类疾病MS相似的临床特点及组织病理学改变。尽管这种运用人工免疫建立的动物模型尚不能复制出MS的所有疾病特征[1]，但多年的研究表明EAE为MS药物治疗的临床前研究提供了有用工具，已使多种药物成功应用于MS的临床治疗[4,5]。目前MS和EAE的发病机制尚未完全明了，大多数观点认为疾病的发生是由自身反应性T细胞所介导，这些活化T细胞能够穿过血脑屏障进入中枢神经系统，从而始发针对CNS髓鞘抗原的自身免疫应答，炎性免疫细胞向CNS浸润，最终导致脱髓鞘和神经系统损害。趋化分子、细胞因子和黏附分子在这一炎症性过程的调控中发挥着重要作用[6]。

霉酚酸酯（MMF）在体内脱酯化后形成具有免疫抑制活性的代谢产物霉酚酸，能高效、选择性、非竞争性、可逆性地抑制次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶，阻断鸟嘌呤核苷酸的从头合成途径，选择性地作用于T、B淋巴细胞，抑制其增殖[7,8]。目前，MMF在实质器官移植中已得到广泛应用，显示出高效、安全、毒副作用小、耐受性好等优点。进一步的研究还发现，MMF可减少抗体形成，阻止黏附分子的糖基化，并对多种细胞因子具有抑制作用[9]。由于MMF这些特殊的药理作用，可能成为治疗自身免疫性疾病的良好药物。

本实验在成功复制Wistar大鼠急性EAE模型的基础上，采用MMF[30 mg/(kg·d)]对EAE进行实验性治疗，观察其临床症状和病程变化，比较各组大鼠CNS的病理改变，以评价MMF治疗EAE的有效性。结果显示，此剂量的MMF可降低EAE的临床评分，使症状迅速缓解，缩短病程，并减轻疾病的最大损害（$P<0.05$）。光镜和电镜观察显示EAE急性期CNS大量炎症细胞浸润，在血管周围形成“血管袖套”状结构，并向周围实质扩散，病变区可观察到明显的髓鞘脱失和轴突损伤；MMF治疗后病变范围及程度明显减轻。表明MMF可有效控制EAE的临床病情，减轻CNS的病理损害。

近年来，轴突损伤在多发性硬化及其模型中的研究受到越来越多的关注。最近的观点认为轴突的损伤与消失是导致MS最终出现不可逆性神经功能障碍的主要原因[10,11]。本实验运用Bielschowsky银染色和电镜观察到EAE大鼠轴突发生了形态学和超微结构的改变，严重者甚至出现轴突缺失。这些改变在炎症浸润明显和发生髓鞘脱失的区域更易见到，说明轴突的损伤与后两者具有一定的关系。MMF可以减轻轴突的损害，推测其可能通过明显减少炎症细胞的浸润，从而达到保护轴突的作用，但其具体作用机制尚需进一步的研究。

综上所述，霉酚酸酯对EAE大鼠具有明显的治疗作用，可有效控制EAE的临床病情，减轻CNS的病理损害。此结果为治疗MS的临床研究提供了实验依据。同时，与目前临床用于治疗MS的糖皮质激素、环磷酰胺等免疫抑制药物相比，霉酚酸酯高效、毒副作用小的优点为其赢得了良好的临床应用前景，有望为MS的药物治疗提供新的选择。

参考文献：

[1] Friese M A, Montalban X, Willcox N, *et al*. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis[J]. Brain, 2006, 129(Pt 8): 1940-1952.

[2] 王顺和，谭晓姝，李 苒，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2008，30(18)：1710-1713.

[3] Suria S, Checa M D. Mycophenolate mofetil in the treatment of lupus nephritis, in patients with failure, intolerance or relapses after treatment with steroids and cyclophosphamide[J]. Nefrologia, 2007, 27(4): 459-465.

[4] 余洪俊，费 军，刘宏亮，等. 实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠大脑Olig基因表达的变化规律[J]. 第三军医大学学报，2007，29(15)：1482-1484.

[5] Forte M, Gold B G, Marracci G, *et al*. Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(18): 7558-7563.

[6] Xie C, Alcaide P, Geisbrecht B V, *et al*. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by extracellular adherence protein of Staphylococcus aureus[J]. J Exp Med, 2006, 203(4): 985-994.

[7] Chavez-Velasquez M, Pons H, Medina M, *et al*. Effects of mycophenolate mofetil in ischemic acute renal failure in rats[J]. Nefrologia, 2007, 27(4): 448-458.

[8] 韩从辉，李怀富，王玉新，等. 霉酚酸酯对树突状细胞抗原递呈功能的影响和诱导同种移植免疫耐受作用[J]. 中华医学杂志，2005，85(19)：1327-1332.

[9] Goldblatt F, Isenberg D A. New therapies for systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exp Immunol, 2005, 140(2): 205-212.

[10] 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.

[11] Tsunoda I, Tanaka T, Terry E J, *et al*. Contrasting roles for axonal degeneration in an autoimmune versus viral model of multiple sclerosis: when can axonal injury be beneficial? [J]. Am J Pathol, 2007, 170(1): 214-226.

（编辑 王小寒）