论著

文章编号:1000-5404(2012)06-0534-04

17β-雌二醇对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠脊髓 Rho 激酶表达的影响

冯金洲[1],胡 晓[2],王恬竹[1],秦新月[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科[1];550002 贵阳,贵州省人民医院神经科[2])

[摘要] **目的** 探讨17β-雌二醇对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)大鼠中枢神经系统 Rho 激酶表达的影响及相关机制。**方法** 75只雌性 Wistar 大鼠分为正常组、模型组、雌激素组、DMSO 对照组和雌激素+雌激素核受体抑制剂 ICI 组。雌激素组每日皮下注射17β-雌二醇 20 μg/(kg·d),连续 10 d。雌激素+ICI 组于17β-雌二醇注射前先给予雌激素核受体抑制剂 ICI 182780 5 mg/(kg·d),比较各组大鼠神经功能评分;HE 染色观察病理学改变;免疫组织化学和 Western blot 观察 Rho 激酶表达的变化。**结果** 与对照组和模型组分别比较,雌激素组发病潜伏期延长,神经功能评分降低;HE 染色示雌激素组炎性细胞浸润减少;免疫组化检测结果显示,雌激素组 Rho 激酶阳性细胞数(8.36±1.57)明显低于模型组[(17.55±1.70), $P<0.01$];Western blot 检测结果显示,雌激素组蛋白表达相对值(0.833±0.022)显著低于模型组[(1.013±0.060), $P<0.05$];雌激素+ICI 组 Rho 激酶阳性细胞数(18.90±2.39)和蛋白表达(1.141±0.046)显著高于雌激素组($P<0.05$)。**结论** 17β-雌二醇能抑制 EAE 大鼠 Rho 激酶的表达,这种抑制作用是通过经典的雌激素核受体通路实现的。

[关键词] 实验性自身免疫性脑脊髓炎;17β-雌二醇;Rho 激酶;雌激素核受体

[中图法分类号] R744.302;R363.27;R341 [文献标志码] A

Nuclear estrogen receptor-mediated Rho-kinase expression inhibition by 17β-estradiol in the spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis rats

Feng Jinzhou[1], Hu Xiao[2], Wang Tianzhu[1], Qin Xinyue[1] ([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou Province, 550002, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of 17β-estradiol on Rho-kinase expression in the central nervous system (CNS) of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) rats and related mechanism. **Methods** Seventy-five female Wistar rats were randomly divided into a normal group, an EAE group, a DMSO control group, an E2 group, and an E2+ICI group. Except for the rats of the normal group, the rats of the other 4 groups were first given ovariectomy to construct EAE rat models. The rats of the E2 group were treated with once daily s.c. injection of 17β-estradiol [20 μg/(kg·d)] for 10 d, and the rats of the E2+ICI group were treated with a nuclear estrogen receptor antagonist ICI 182780 [5 mg/(kg·d)] before 17β-estradiol injection. Neurological function scores were recorded and compared among the groups. HE staining was applied for pathological evaluation. The expression of Rho-kinase in each group was examined by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** The treatment with 17β-estradiol resulted in a delay in EAE onset ($P<0.05$) as well as a lower neurological function score ($P<0.05$) in the E2 group as compared with those in the EAE group and the DMSO control group. The infiltration of inflammatory cells was alleviated in the E2 group showed by H-E staining. Immunohistochemistry result showed that the number of Rho-kinase-positive cells in the E2 group (8.36±1.57) was significantly lower than that in the EAE group (17.55±1.70, $P<0.01$). Western blotting results showed the expression of Rho-kinase protein in the E2 group (0.833±0.022) was significantly

[通信作者] 秦新月,电话:(023)89012478,E-mail: Qinxinyue@yahoo.com

lower than that in the EAE group (1.013 ± 0.06, $P < 0.05$). The number of Rho-kinase-positive cells (18.90 ± 2.39) and Rho-kinase protein expression (1.141 ± 0.046) in the E2 + ICI group were significantly higher than those in the E2 group ($P < 0.05$). **Conclusion** 17β-estradiol can inhibit the expression of Rho-kinase in EAE rats by classical nuclear estrogen receptor pathway.

[**Key words**] experimental autoimmune encephalomyelitis; 17β-estradiol; Rho-kinase; nuclear estrogen receptor

Corresponding author: Qin Xinyue, Tel: 86-23-89012878, E-mail: Qinxinyue@yahoo.com

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是病因未明的中枢神经系统(central nervous system, CNS)慢性炎症性自身免疫性脱髓鞘疾病。女性MS患者妊娠末期,疾病严重程度明显减轻,复发间期延长,次数减少,但随着产后雌激素水平的下降,复发增加,症状加重。提示雌激素对MS具有重要保护作用,但具体机制尚未十分明确。

Rho激酶(ROCK)是小GTP蛋白Rho A的主要效应分子,包括ROCK-Ⅰ和ROCK-Ⅱ,脑和脊髓中主要表达ROCK-Ⅱ[1]。在实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型中抑制Rho激酶的表达能减少CNS炎性细胞浸润和脱髓鞘程度,减轻临床症状[2],提示ROCK在MS和EAE病理过程中具有重要作用。雌激素能否在MS和EAE模型中抑制Rho激酶的表达尚不清楚。本实验拟探讨雌激素在EAE模型中对Rho激酶表达的影响及对Rho激酶作用的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

卡介苗(Bacille Calmette-Guerin, BCG)、百日咳毒素(pertussis toxin,中国药品食品检定研究院),17β-雌二醇、ICI-182780(Sigma),兔抗ROCK-Ⅱ多克隆抗体(Abcam),即用型兔S-P 9001免疫组化试剂盒、浓缩型DAB试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司),Western blot相关试剂(上海碧云天公司)。

1.2 动物及分组

体质量380~450 g的豚鼠8只,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供。体质量180~220 g的健康成年雌性Wistar大鼠75只,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。Wistar大鼠分为5组,每组15只,分别为正常组、模型组(EAE)、DMSO对照组、雌激素组(E2)、雌激素+ICI组(E2+ICI)。

1.3 EAE模型的建立

Wistar大鼠行双侧输卵管结扎及卵巢摘除,术后2周制备EAE模型。取新鲜豚鼠脊髓制成50%脊髓生理盐水匀浆,并与完全弗氏佐剂按照1:1制成油包水抗原乳剂,皮下注入Wistar大鼠四肢足垫及尾部,共0.5 ml/只[3]。为增强免疫,提高发病率,双后肢足背皮下注射百日咳毒素0.2 ml/只。

1.4 动物处理及标本采集

雌激素组大鼠于免疫前1 d起腹部皮下注射17β-雌二醇20 μg/(kg·d)(溶于二甲基亚砜, DMSO),连续10 d。雌激素+ICI组于每次雌激素注射前1 h颈部皮下注射ICI 182780 5 mg/(kg·d),连续10 d。DMSO对照组只皮下注射DMSO。正常组不作任何处理。所有大鼠于免疫后16 d统一处死,取脊髓组织。

1.5 神经功能评分

免疫日及免疫后每日进行神经功能评分。评分标准采用5分评分法,0分:正常,无发病;1分:动物尾无力;2分:双后肢无力;3分:双后肢麻痹;4分:双后肢加前肢瘫痪;5分:濒死状态或死亡[4]。症状介于两级之间则分别记作0.5、1.5、2.5、3.5、4.5。以达到或超过1级为临床发病。

1.6 HE染色

取Wistar大鼠脊髓组织制作石蜡切片(片厚4 μm)。切片一部分常规做HE染色,观察观察炎性细胞浸润情况,另一部分用于免疫组化检测。

1.7 免疫组化检测Rho激酶的表达

参照S-P法试剂盒说明书, DAB显色光镜下观察细胞膜或细胞质(ROCK-Ⅱ)棕黄色颗粒为阳性着色。

1.8 Western blot检测Rho激酶的表达

取新鲜脊髓组织提取全蛋白。SDS-PAGE电泳后转膜;封闭,孵一抗(1:1 000),4 ℃过夜;孵二抗,凝胶成像仪成像。结果以Quantity One图像进行条带分析,以ROCK-Ⅱ/β-actin条带密度的相对值表示蛋白表达水平。

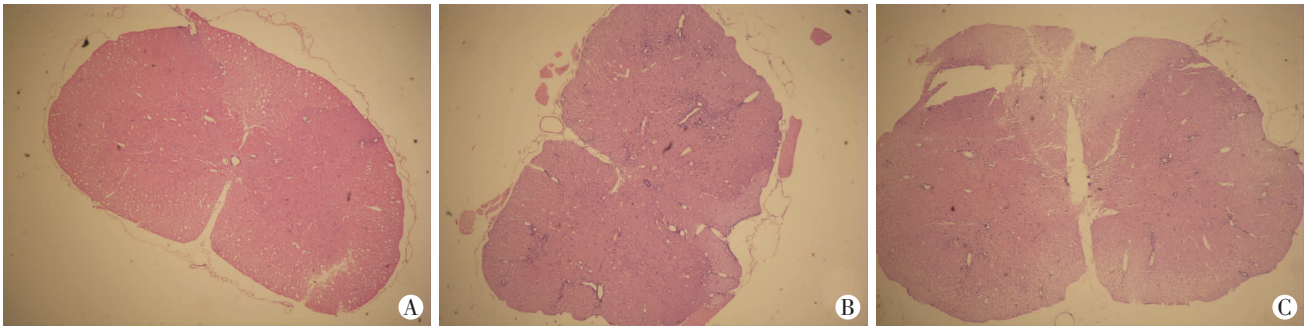
1.9 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件,发病率的比较行 χ^2 检验,组间参数比较行单因素方差分析。

2 结果

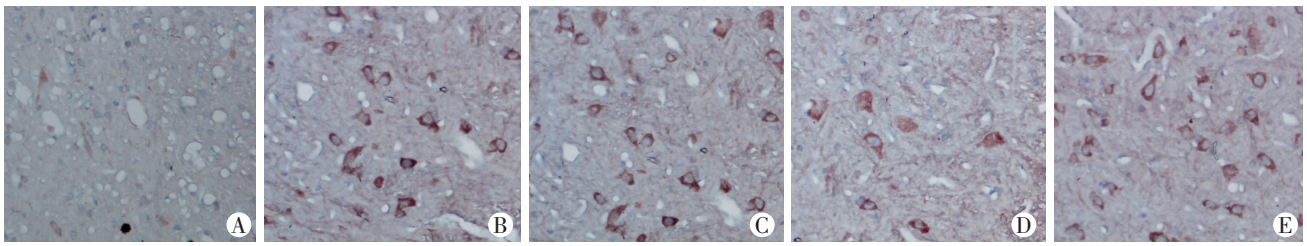
2.1 EAE大鼠神经行为学改变

EAE模型表现为急性单相病程。模型组发病12只,DMSO对照组发病13只,雌激素组发病10只, 雌激素+ICI组发病11只,各组间发病率无统计学差异($P > 0.05$)。模型组自第12



A:正常组;B:模型组;C:雌激素组

图1 脊髓炎性细胞浸润的病理学观察(HE ×40)



A:正常组;B:模型组;C:DMSO对照组;D:雌激素组;E:雌激素+ICI组

图2 免疫组织化学示各组Rho激酶的表达(S-P ×200)

天起开始发病,发病高峰时最高疾病评分(2.27±0.36);DMSO对照组自第12天起开始发病,最高疾病评分(2.15±0.31);雌激素组自第14天起发病,最高疾病评分(1.54±0.25)。与模型组比较,雌激素组发病潜伏期延长($P<0.05$),临床症状减轻,神经功能评分降低($P<0.05$);DMSO对照组与模型组相比,潜伏期与神经功能评分无统计学差异($P>0.05$)。

2.2 病理改变

HE染色示正常组大鼠脊髓无明显炎性细胞浸润(图1A);模型组炎性细胞浸润明显,血管周围有明显炎性细胞浸润,呈典型"血管袖套样"改变,且实质内亦有明显炎性细胞浸润(图1B);雌激素组炎性细胞浸润比模型组明显减轻,"血管袖套样"改变不典型,实质内亦无明显炎性细胞浸润(图1C)。

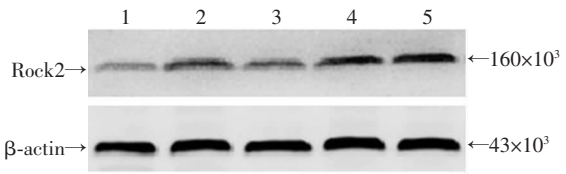
2.3 17β-雌二醇对EAE大鼠Rho激酶表达的影响

2.3.1 免疫组化检测17β-雌二醇对EAE大鼠Rho激酶表达的影响 免疫组化结果显示,Rho激酶阳性细胞主要见于灰质神经元,白质中很少表达。正常组大鼠脊髓组织很少有Rho激酶表达,阳性细胞数为(3.18±1.25),主要位于细胞质中。与正常组对比,模型组(17.55±1.70)、DMSO对照组(19.09±1.76)Rho激酶表达明显增多($P<0.01$),以细胞膜表达为主。17β-雌二醇干预后Rho激酶表达量明显降低[(8.36±1.57),$P<0.01$],细胞膜、细胞质中均有表达(图2A~D)。

2.3.2 Western blot检测17β-雌二醇对EAE大鼠Rho激酶表达的影响 Western blot检测结果显示,正常组Rho激酶蛋白表达量相对值为(0.551±0.011)、模型组为(1.013±0.060)、雌激素组为(0.833±0.022)、DMSO对照组为(1.157±0.035),模型组Rho激酶的表达明显高于正常组($P<0.01$);雌激素组Rho激酶表达明显低于模型组和DMSO对照组($P<0.05$),DMSO对照组与模型组表达无统计学差异($P>0.05$,图3)。

2.4 17β-雌二醇通过雌激素核受体抑制Rho激酶的表达

免疫组化检测结果显示,雌激素+ICI组Rho激酶的表达(18.90±2.39)与模型组和DMSO对照组相似($P>0.05$),高于雌激素组($P<0.01$)(图2B~E)。Western blot检测结果显示,雌激素+ICI组Rho激酶蛋白含量相对值为(1.141±0.046),明显高于雌激素组($P<0.05$),与模型组和DMSO对照组比较无统计学差异($P>0.05$,图3)。结果说明雌激素对Rho激酶的抑制作用被ICI 182780抑制,其抑制作用是通过雌激素核受体介导的。



1:正常组;2:模型组;3:雌激素组;4:DMSO对照组;5:雌激素+ICI组

图3 Western blot检测各组Rho激酶的表达

3 讨论

EAE是以特异性致敏的$CD4^+$ T细胞介导的,以CNS内小血管周围单核细胞浸润及髓鞘脱失为特征性改变的自身免疫性病变[5],是研究MS的常用模型。

本研究发现,17β-雌二醇干预后,EAE大鼠发病

延迟,神经功能评分明显降低,炎性细胞浸润减少。17β-雌二醇能明显抑制 CNS 中 Rho 激酶的表达,应用 ICI 182780 后,17β-雌二醇对 Rho 激酶的抑制作用消失,说明其作用是通过经典的雌激素核受体通路介导的。

雌激素对 MS 的保护作用主要表现在抑制 T 淋巴细胞和巨噬细胞向 CNS 浸润,抑制前炎性细胞因子的生成和细胞死亡[6],促进神经元和髓鞘存活[7]。ER 包括经典核受体 α(ERα)和 β(ERβ),以及胞膜上的 G 蛋白偶联受体 GPR30。雌激素的许多生物学效应是通过 ER α、ER β 介导的[8]。Tiwari-Woodruff 等[9]发现,在 EAE 中,ER α 主要介导抗炎效应,而 ER β 具有神经保护作用。亦有学者认为在 EAE 中起主要作用的是 GPR30[10]。本实验应用 ICI 182780 后 Rho 激酶表达减少,说明雌激素通过雌激素核受体抑制 Rho 激酶表达。但 ICI 182780 是一种非选择性 ERα/ERβ 拮抗剂[11],能同时抑制 ERα 和 ERβ,故尚无法确定 ER α 和 ER β 在 Rho 激酶激活中的具体作用。

Rho 激酶静息状态下主要表达在细胞质,激活后易位到胞膜附近发挥生物学作用[2]。我们发现,与模型组相比,雌激素组 Rho 激酶不仅数量上显著减少,且表达部位上在胞浆中表达比例增加,说明雌激素在抑制 Rho 激酶数量同时还能抑制 Rho 激酶的活性。

Rho 激酶在 MS 具有十分重要的作用。Rho 激酶激活失调可致淋巴细胞向 CNS 的迁移,抑制轴突再生,调节 Th1、Th17 细胞生成,破坏血脑屏障等病理改变[12-14]。抑制 Rho 激酶能有效抑制 IL-6、IL-17 等炎性细胞浸润和髓鞘破坏程度,减轻 EAE 严重程度[3,15]。Zhang 等[16]研究发现,Rho A 在正常脑组织基本不表达,在 EAE 免疫后 13 d 表达达高峰,与其临床症状相符。本实验研究结果与之相似,说明 17β-雌二醇可能是先激活上游的 Rho A 进而激活 Rho 激酶。综上所述,17β-雌二醇可通过雌激素核受体抑制 Rho 激酶的表达,减轻 EAE 严重程度,为雌激素在临床治疗 MS 等自身免疫性疾病提供了实验依据。

参考文献:

[1] Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007, 55(2): 61-75.

[2] Yu J Z, Ding J, Ma C G, *et al*. Therapeutic potential of experimental autoimmune encephalomyelitis by Fasudil, a Rho kinase inhibitor[J]. J Neurosci Res, 2010, 88(8): 1664-1672.

[3] 张艳, 秦新月, 王敬, 等. 腺病毒介导的 NgR 特异性 RNA 干扰对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠神经行为学的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(21): 2318-2321.

[4] Han M H, Hwang S I, Roy D B, *et al*. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets [J]. Nature, 2008, 451(7182): 1076-1081.

[5] 胡晓, 娄磊, 袁军, 等. 选择性雌激素受体调节剂对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的抗炎机制研究[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(9): 946-951.

[6] El-Etr M, Ghoumari A, Sitruk-Ware R, *et al*. Hormonal influences in multiple sclerosis: new therapeutic benefits for steroids[J]. Maturitas, 2011, 68(1): 47-51.

[7] Garay L, Gonzalez-Deniselle M C, Gierman L, *et al*. Steroid protection in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis[J]. Neuroimmunomodulation, 2008, 15(1): 76-83.

[8] Wu M V, Manoli D S, Fraser E J, *et al*. Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors[J]. Cell, 2009, 139(1): 61-72.

[9] Tiwari-Woodruff S, Morales L B, Lee R, *et al*. Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta ligand treatment[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(37): 14813-14818.

[10] Yates M A, Li Y, Chlebeck P J, *et al*. GPR30, but not estrogen receptor-alpha, is crucial in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral ethinyl estradiol[J]. BMC Immunol, 2010, 11: 20.

[11] Takao T, Flint N, Lee L, *et al*. 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death[J]. J Neurochem, 2004, 89(3): 660-673.

[12] LoGrasso P V, Feng Y. Rho kinase (ROCK) inhibitors and their application to inflammatory disorders[J]. Curr Top Med Chem, 2009, 9(8): 704-723.

[13] Biswas P S, Gupta S, Chang E, *et al*. Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(9): 3280-3295.

[14] Duffy P, Schmandke A, Schmandke A, *et al*. Rho-associated kinase Ⅱ (ROCK Ⅱ) limits axonal growth after trauma within the adult mouse spinal cord[J]. J Neurosci, 2009, 29(48): 15266-15276.

[15] Sun X, Minohara M, Kikuchi H, *et al*. The selective Rho-kinase inhibitor Fasudil is protective and therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neuroimmunol, 2006, 180(1/2): 126-134.

[16] Zhang Z, Schittenhelm J, Meyermann R, *et al*. Lesional accumulation of RhoA(+) cells in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2008, 34(2): 231-240.

(收稿:2011-10-12;修回:2011-11-25)

(编辑 王小寒)