益肾达络饮缓解EAE模型小鼠神经系统炎症的机制研究Δ

王 响*，王诗洋，吴 元，丁文婧，谢名宗，何静文，邢天野，尚晓玲#（长春中医药大学基础医学院，长春 130117）

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2023）11-1326-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.11.08

摘 要 目的 研究益肾达络饮抑制β-制动蛋白1（β-arrestin1）表达对实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE）模型小鼠炎症因子、环磷酸腺苷（cAMP）/蛋白激酶A（PKA）/ cAMP反应元件结合蛋白（CREB）信号通路的影响，探讨益肾达络饮治疗EAE的机制。**方法** 采用随机数字表法将60只小鼠分为正常组、模型组、中药组（益肾达络饮20 g/kg）、阳性对照组（醋酸泼尼松3.9 mg/kg）、β-arrestin1 siRNA腺相关病毒（AAV-β）组、AAV-β+中药组，每组10只。除正常组外，其余各组小鼠均制备EAE模型。AAV-β组、AAV-β+中药组小鼠通过尾静脉注射AAV-β干扰β-arrestin1蛋白的表达。造模第8天开始每天灌胃相应药液/生理盐水1次，连续14 d。检测小鼠神经功能评分，观察小鼠脑和脊髓组织的病理形态学变化，检测小鼠血清中炎症因子[白细胞介素2（IL-2）、IL-23、γ干扰素（IFN-γ）]水平，检测小鼠脑和脊髓组织中β-arrestin1、cAMP、PKA、CREB蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较，模型组小鼠神经功能评分、血清中炎症因子水平以及脑、脊髓组织中β-arrestin1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；脑和脊髓组织中PKA、CREB、cAMP蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；脑和脊髓组织中大部分神经元可见胞体皱缩深染及炎症细胞聚集现象，且存在不同程度的脱髓鞘改变。与模型组比较，各给药组小鼠神经功能评分、脑和脊髓组织的病理形态学变化及大部分指标（除AAV-β组脑组织中的CREB、cAMP蛋白外）均显著逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）。与AAV-β组比较，AAV-β+中药组小鼠神经功能评分、血清中IFN-γ水平、脊髓中β-arrestin1蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），脑与脊髓组织中PKA、cAMP蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论** 益肾达络饮可能是通过抑制中枢神经系统中β-arrestin1的表达，进而激活cAMP/PKA/CREB信号通路，减轻神经系统炎症，最终缓解EAE的症状。

关键词 益肾达络饮；实验性自身免疫性脑脊髓炎；β-制动蛋白1；蛋白激酶A；cAMP反应元件结合蛋白；炎症因子

Study on the mechanism of Yishen daluo decoction in alleviating nervous system inflammation in EAE model mice

WANG Xiang, WANG Shiyang, WU Yuan, DING Wenjing, XIE Mingzong, HE Jingwen, XING Tianye, SHANG Xiaoling (School of Basic Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To study the effects of Yishen daluo decoction on inflammatory factors and cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/cAMP response element binding protein (CREB) signal pathway in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model mice by inhibiting the expressions of β-arrestin1, and to explore the mechanism of Yishen daluo decoction in the treatment of EAE. **METHODS** Sixty mice were randomly divided into normal group, model group, TCM group (Yishen daluo decoction 20 g/kg), positive control group (prednisone acetate 3.9 mg/kg), β-arrestin1 siRNA adeno-associated virus (AAV-β) group, AAV-β+TCM group, with 10 mice in each group. Except for normal group, EAE model was made in other groups. AAV-β group and AAV-β+TCM group were injected with AAV-β via tail vein to interfere with the expression of β-arrestin1 protein. Starting from the 8th day of modeling, they were given corresponding drug solution/normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 14 days. The neurological function score of mice was detected; the pathological and morphological changes were observed in the brain and spinal cord tissues of mice; the serum levels of inflammatory factors [interleukin-2 (IL-2), IL-23, interferon-γ (IFN-γ)] in mice were determined; the expressions of β-arrestin1, cAMP, PKA and CREB in brain and spinal cord were detected. **RESULTS** Compared with normal group, neurological function scores, serum levels of inflammatory factors, and protein expressions of β-arrestin1 in brain and spinal cord were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); protein expressions of PKA, CREB and cAMP in brain and spinal cord were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The deep staining of cellular shrinkage and aggregation of inflammatory cells were observed in most neurons of the brain and spinal cord, with varying degrees of demyelinating. Compared with model group, the neurological function scores, pathological changes in brain and spinal cord tissues, and most indicators (except for CREB and cAMP proteins in the brain tissue of AAV-β group) were significantly reversed ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with AAV-β group, the neurological function scores, the levels of IFN-γ in serum and β-arrestin1 in spinal cord were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), PKA

Δ**基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.81873216）

＊**第一作者** 博士研究生。研究方向：中医药治疗神经免疫疾病。电话：0431-86172310。E-mail：974950869@qq.com

＃**通信作者** 教授，博士生导师，博士。研究方向：中医药治疗神经免疫疾病。电话：0431-86172310。E-mail：xiaolingshang@sina.com

and cAMP in brain and spinal cord tissues were significantly increased in AAV-β+TCM group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Yishen daluo decoction can inhibit the expression of β-arrestin1 in the central nervous system thus activating the cAMP/PKA/CREB signaling pathway, relieving nervous system inflammation, and ultimately alleviates the symptoms of EAE.
KEYWORDS Yishen daluo decoction; experimental autoimmune encephalomyelitis; β-arrestin1; protein kinase A; cAMP response element binding protein; inflammatory factor

多发性硬化（multiple sclerosis，MS）是一种以中枢神经系统炎性脱髓鞘为特征的自身免疫病[1]。MS迄今为止病因不明，临床表现复杂多样，疾病过程难以预测，缺乏生物标志物，目前仍无法治愈。中药复方益肾达络饮是北京中医药大学东直门医院高颖教授研究团队根据多年临床经验，由中医经典名方地黄饮子化裁而来，在临床中取得了良好的治疗效果，其可缓解MS临床症状、缩短MS病程、降低MS复发率[2]。

实验性自身免疫性脑脊髓炎（experimental autoimmune encephalomyelitis，EAE）是最接近MS病理改变的实验动物模型[3]。研究发现，在EAE模型小鼠和MS患者外周血$CD4^+$T细胞中，β-制动蛋白1（β-arrestin1）的表达显著升高[4]。β-arrestin1是一类具有多种生物学功能的细胞内支架蛋白，可作为细胞质到细胞核的信息分子，通过传递G蛋白偶联受体信息来影响相关信号通路，从而调控染色质表观遗传；并且，β-arrestin1可产生包括环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）反应元件结合蛋白（cAMP response element binding protein，CREB）在内的转录复合物，从而影响CREB信号通路，促使神经营养因子的表达，最终达到神经保护作用并提高神经可塑性[5]。阻断β-arrestin1可使G蛋白偶联受体激活局部腺苷环化酶产生cAMP，并激活细胞膜上的蛋白激酶A（protein kinase A，PKA）活性[6]。本研究通过制备EAE模型小鼠，以β-arrestin1为切入点，注射β-arrestin1 siRNA腺相关病毒（β-arrestin1 siRNA adeno-associated virus，AAV-β）到小鼠体内抑制中枢神经系统中β-arrestin1的表达，并观察益肾达络饮干预后，对EAE模型小鼠血清中相关炎症因子以及cAMP/PKA/CREB信号通路的影响，以期为中医药治疗MS提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有Eclipse Ci-L型显微镜、DS-U3型成像系统（日本Nikon公司），JY600E型蛋白电泳系统（北京君意东方电泳设备有限公司），WGD-20型化学发光成像仪（美国Bio-Rad公司），HBS-1096A型酶标分析仪（南京德铁实验设备有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

益肾达络饮（汤剂）由本课题组按照文献[7]方法制备，规格为每毫升药液含生药总量2 g。醋酸泼尼松片（批号H41020214，规格5 mg/片）购自新乡市常乐制药有限公司；MOG_{35-55}多肽（多肽序列为N-MEVGWYRSPF-SRVVHLYNGK-C，批号190402-1，纯度98.4%）由北京赛百盛基因技术有限公司合成；百日咳毒素（批号180，规格50 μg）购自美国List Biological Laboratories公司；弗氏完全佐剂（批号F5881）购自美国Sigma公司；灭活结核杆菌（批号R19021，规格50 mg）购自上海瑞楚生物科技有限公司；AAV-β购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司；兔源β-arrestin1多克隆抗体（批号bs-20232R）、鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）单克隆抗体（批号bsm-33033M）、鼠源cAMP多克隆抗体（批号bs-12707R）、鼠源PKA多克隆抗体（批号bs-0520R）、鼠源CREB多克隆抗体（批号bs-20704R）、鼠源辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白G（IgG）二抗（批号bs-40296G-HRP）、鼠源辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（批号bs-40295G-HRP）均购自北京博奥森生物技术有限公司；小鼠白细胞介素2（interleukin，IL-2）、IL-23酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号分别为20221107-20176A、20221020-20179A）均购自黄石研科生物科技有限公司；小鼠γ干扰素（interferon-γ，IFN-γ）EILSA试剂盒（批号JL10967）购自上海江莱生物科技有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级C57BL/6J雌性小鼠，共60只，6～8周龄，体质量为16～18 g，由辽宁长生生物技术股份有限公司供应，动物生产许可证号为SCXK（辽）-2020-0001。动物饲养于长春中医药大学动物中心屏障系统内，环境温度为20～22 ℃，相对湿度为（50±10）%，12 h光照/12 h黑暗循环。小鼠饲养期间给予普通饲料和洁净水。本实验已通过长春中医药大学实验动物伦理委员会审查（批准编号为2020201）。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

采用随机数字表法将60只小鼠分为6组，即正常组、模型组、中药组、阳性对照组、AAV-β组、AAV-β+中药组，每组10只。适应性饲养7 d后，除正常组外，其他各组小鼠均按以下方法制备EAE模型：于小鼠背部皮下分4点（50 μL/点）注射抗原乳剂共200 μL[抗原乳剂含MOG_{35-55} 250 μg、灭活结核杆菌800 μg、磷酸盐缓冲液（PBS）100 μL、弗氏完全佐剂100 μL，使用前充分吹打混匀]；分别在注射抗原乳剂30 min和48 h后腹腔注射百日咳毒素溶液100 μL（含百日咳毒素500 ng）[8]。造模第4天，AAV-β组与AAV-β+中药组小鼠尾静脉注射AAV-β（150 μL/只，病毒滴度为1×10^{11} vg/mL），用以抑

制EAE模型小鼠体内β-arrestin1的表达。造模第8天开始，中药组、AAV-β+中药组小鼠给予20 g/kg益肾达络饮药液（为临床等效剂量）[9]，阳性对照组小鼠给予3.9 mg/kg醋酸泼尼松混悬液（为临床等效剂量），正常组、模型组、AAV-β组小鼠给予等体积生理盐水；每天灌胃1次，连续14 d。每天按“2.2”项下方法进行神经功能评分，评分≥1分即造模成功[10]。

2.2 神经功能评分

从造模第1天开始，每天按照Weaver's 15分评分法对各组小鼠进行神经功能评分，持续21 d：尾部半瘫记为1分，全瘫记为2分；四肢肢体力弱/步态改变记为1分，不完全瘫痪记为2分，完全瘫痪记为3分；尾部与四肢分数相加为小鼠的神经功能评分；死亡记为15分[10]。

2.3 样本取材

造模21 d后取材。每组取10只小鼠的血清用于ELISA检测：麻醉小鼠后，摘眼球取血约1 mL至1.5 mL离心管中，室温静置30 min，在4 ℃下以1 000×*g*离心15 min，取上层血清，于－20 ℃保存，备用。取血完成后，每组取3只小鼠用于染色实验：将小鼠固定在鼠板上，剪开胸腔，用生理盐水灌注心脏至肝脏呈灰白色，改用4%多聚甲醛灌注，待尾巴与四肢抽搐结束，取出完整的脑和脊髓，用4%多聚甲醛固定48 h。另外，每组取3只小鼠用于Western blot实验：断头后迅速取出脑和脊髓组织，速冻于液氮中标记备用。

2.4 小鼠脑和脊髓组织的病理形态学观察

分别将小鼠脑和脊髓组织常规脱水浸蜡，石蜡包埋后切片（4 μm），分别进行苏木精-伊红染色（hematoxylin and eosin staining，HE）和劳克坚牢蓝（luxol fast blue，LFB）髓鞘染色，观察脑、脊髓组织的病理形态学改变。

2.5 小鼠血清中炎症因子水平检测

取“2.3”项下血清，按照ELISA试剂盒说明书方法操作，使用酶标仪在450 nm波长下测量光密度（OD）值，通过标准曲线计算出小鼠血清中IL-2、IL-23、IFN-γ水平。

2.6 小鼠脑和脊髓组织中β-arrestin1、cAMP、PKA、CREB蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。分别将小鼠的脑和脊髓组织剪碎，称取80 mg组织放入玻璃匀浆器中，加入1 mL RIPA裂解液、10 μL苯甲基磺酰氟（PMSF），置于冰上研磨30 min；将组织匀浆移至1.5 mL离心管中，在4 ℃下以12 000 r/min离心10 min，取上清。用二喹啉甲酸（BCA）法检测上清液中总蛋白浓度，取40 μg变性后的蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（电泳时间为150 min，电压为80、120 V），电泳结束后转膜至聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上（转膜时间为90 min，转膜电流为200 mA），用5%脱脂奶粉封闭1 h；加入GAPDH（内参，稀释比例为1∶5 000）一抗和β-arrestin1、cAMP、PKA、CREB一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；以TBST洗膜3次，加入二抗（山羊抗小鼠来源二抗的稀释比例为1∶5 000，山羊抗兔来源二抗的稀释比例为1∶10 000），室温孵育90 min；TBST洗膜3次，用ECL化学发光法显色成像。使用Image J 1.51j8软件分析条带灰度值，以目的蛋白条带灰度值与内参GAPDH蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0.0软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 各组小鼠神经功能变化情况

正常组小鼠未见神经功能异常的症状；其他组小鼠于造模后10 d左右陆续开始发病，逐渐出现尾部无力、四肢力弱、步态异常、尾部及四肢瘫痪等症状。与模型组比较，中药组、AAV-β+中药组、阳性对照组小鼠的最高神经功能评分和造模后21 d的神经功能评分均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；与AAV-β组比较，AAV-β+中药组小鼠的最高神经功能评分显著降低（$P<0.05$），AAV-β+中药组和阳性对照组造模后21 d的神经功能评分均显著降低（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组小鼠神经功能评分比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	平均发病时间/d	最高神经功能评分/分	造模后21 d的神经功能评分/分
正常组	0	0	0
模型组	10.5±0.5[a]	4.38±1.09[a]	3.20±1.34[a]
AAV-β组	10.1±0.9	3.99±2.50	2.82±1.08
中药组	11.7±0.9	3.51±0.58[b]	2.65±1.78[b]
AAV-β+中药组	11.4±1.1	2.35±1.85[cd]	1.98±0.76[bd]
阳性对照组	11.3±1.2	3.71±4.00[b]	1.93±0.79[bd]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与AAV-β组比较，$P<0.05$

3.2 各组小鼠脑和脊髓组织的HE染色情况

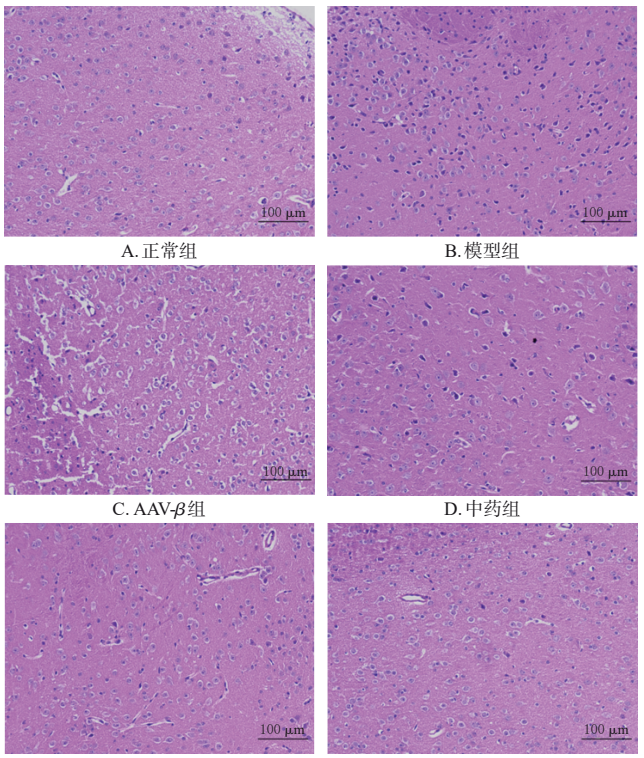
HE染色结果显示，模型组与AAV-β组小鼠脑和脊髓组织中大部分神经元可见胞体皱缩深染及炎症细胞聚集现象；中药组、AAV-β+中药组、阳性对照组小鼠脑和脊髓组织中可见神经元轻微水肿和胞体轻微皱缩深染现象。结果见图1、图2。

3.3 各组小鼠脑和脊髓组织的LFB髓鞘染色结果

LFB髓鞘染色结果显示，除正常组外，其余各组小鼠均存在不同程度的脱髓鞘改变，并可见不同程度的神经纤维稀疏。其中模型组小鼠可见大面积白质区域脱髓鞘改变，且较其他组更严重；AAV-β组较中药组、AAV-β+中药组、阳性对照组脱髓鞘程度更严重。结果见图3、图4。

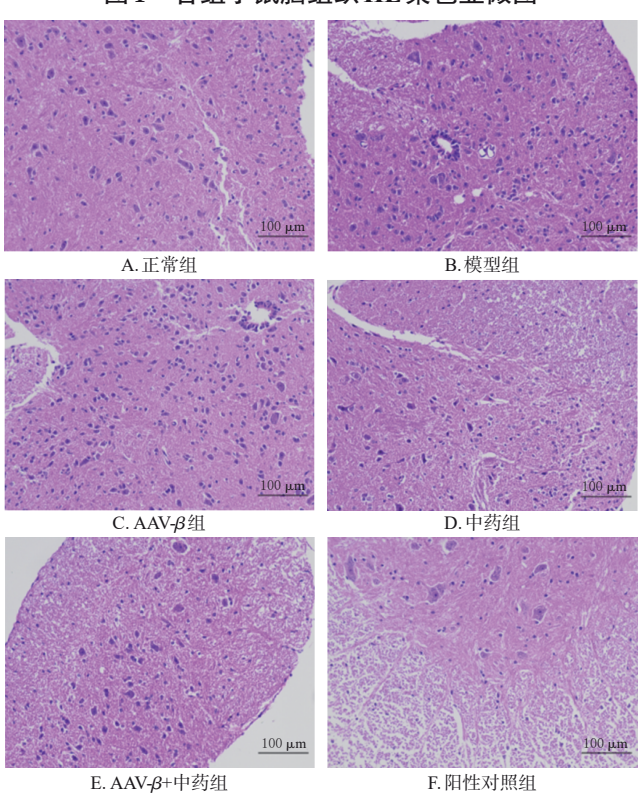
3.4 各组小鼠血清中IL-2、IL-23、IFN-γ水平测定结果

与正常组比较，模型组小鼠血清中IL-2、IL-23、IFN-γ水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组比较，中药组小鼠血清中IL-2、IL-23、IFN-γ水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），AAV-β组小鼠血清中IFN-γ水平显著升高、IL-23水平显著降低（$P<0.01$），AAV-β+中药



A. 正常组　B. 模型组
C. AAV-β组　D. 中药组
E. AAV-β+中药组　F. 阳性对照组

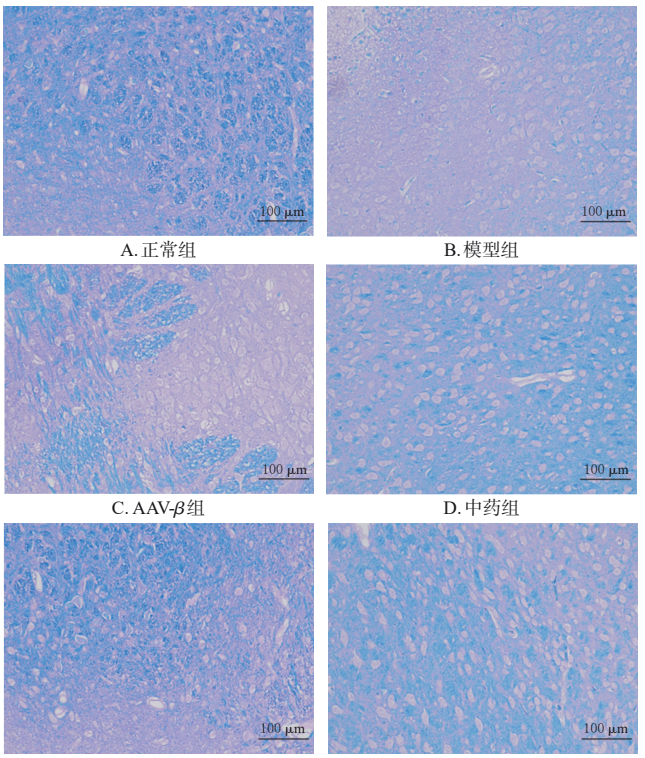
图1　各组小鼠脑组织HE染色显微图



A. 正常组　B. 模型组
C. AAV-β组　D. 中药组
E. AAV-β+中药组　F. 阳性对照组

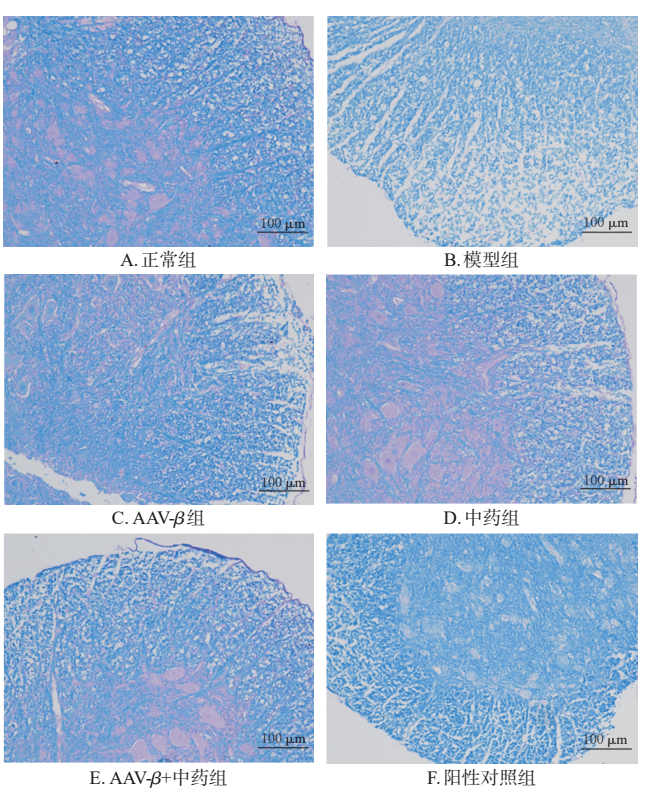
图2　各组小鼠脊髓组织HE染色显微图

组小鼠血清中IL-23水平显著降低（$P<0.01$），阳性对照组小鼠血清中IL-23、IFN-γ水平均显著降低（$P<0.01$）；与AAV-β组比较，中药组小鼠血清中IL-2、IFN-γ水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），AAV-β+中药组和阳性对照组小鼠血清中IFN-γ水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表2。



A. 正常组　B. 模型组
C. AAV-β组　D. 中药组
E. AAV-β+中药组　F. 阳性对照组

图3　各组小鼠脑组织LFB髓鞘染色显微图



A. 正常组　B. 模型组
C. AAV-β组　D. 中药组
E. AAV-β+中药组　F. 阳性对照组

图4　各组小鼠脊髓组织LFB髓鞘染色显微图

3.5　小鼠脑和脊髓组织中β-arrestin1、cAMP、PKA、CREB蛋白表达水平的测定结果

与正常组比较，模型组小鼠脑和脊髓组织中β-arrestin1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），PKA、CREB、cAMP蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。与模型组比较，AAV-β组、中药组、AAV-β+

表2　各组小鼠血清中IL-2、IL-23、IFN-γ水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，pg/mL）

组别	IL-23	IL-2	IFN-γ
正常组	74.55±6.93	257.33±37.71	50.87±16.34
模型组	84.32±7.25[a]	321.06±17.93[b]	86.00±18.76[b]
AAV-β组	68.32±7.16[c]	306.01±20.64	124.41±21.85[c]
中药组	69.26±5.72[e]	275.23±33.71[ed]	66.50±15.99[ef]
AAV-β+中药组	65.16±3.82[e]	282.71±51.30	73.44±42.60[f]
阳性对照组	67.99±4.61[e]	312.51±24.82	58.11±39.58[ef]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与正常组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与AAV-β组比较，$P<0.05$；e：与模型组比较，$P<0.05$；f：与AAV-β组比较，$P<0.01$

中药组、阳性对照组小鼠脑和脊髓组织中上述大部分指标（除AAV-β组脑组织中的CREB、cAMP蛋白外）表达水平均显著逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）。与AAV-β组比较，中药组、AAV-β+中药组、阳性对照组小鼠脑组织中PKA、cAMP蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$），脊髓组织中PKA蛋白表达水平显著升高、β-arrestin1表达水平显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；中药组小鼠脑组织中β-arrestin1表达水平、AAV-β+中药组小鼠脊髓组织中cAMP蛋白表达水平及阳性对照组小鼠脊髓组织中CREB、cAMP蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图5、表3。

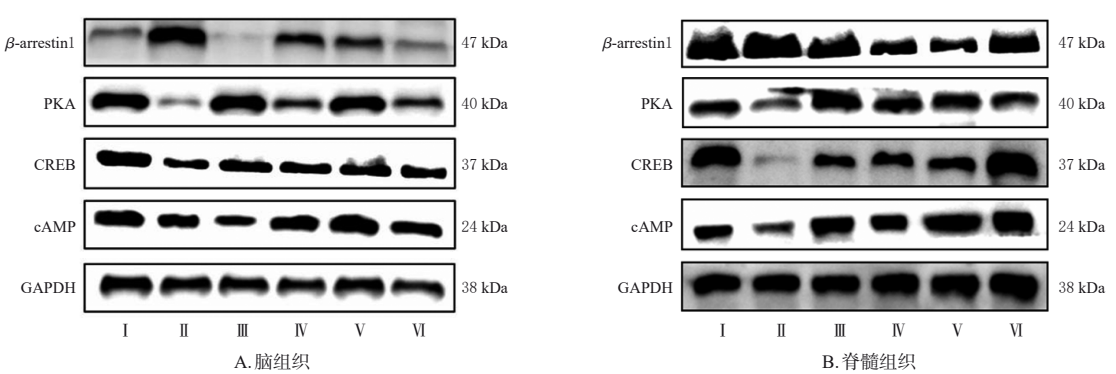
4　讨论

中医虽无MS的病名，但是根据MS的临床症状，可将MS归于“痿证”“肌痹”“青盲”等进行论治。MS的病机主要是肾精不足、湿浊内蕴、浊毒内生、毒损督脉、络损髓伤、败坏形体，根据这样的病机特点，高颖教授创立了益肾、解毒、通络法，制定了中药复方益肾达络饮。本方是在中医古方地黄饮子基础之上化裁而来，方中运用中医阴阳理论、藏象理论、整体思维等，温清并用，补泻兼施，体现了中医在治疗疾病时调节机体达到和谐状态的整体、系统思想。

本研究采用MOG_{35-55}多肽联合结核杆菌、百日咳毒素诱导EAE，采用临床治疗MS的一线药物醋酸泼尼松作为阳性对照药物[11]，研究中药的作用机制。结果显示，通过尾静脉注射AAV-β后，EAE模型小鼠脑和脊髓中β-arrestin1的表达量下降，临床症状有所减轻，在此基础之上给予中药益肾达络饮干预后，升高了小鼠脑与脊髓中β-arrestin1的表达量，神经功能评分进一步降低。

活化的$CD4^+$T细胞可通过产生IL-12、TNF-α、IFN-γ等促炎因子来介导和放大炎症反应，激活星形胶质细胞，进而导致血脑屏障的通透性增加，并在免疫细胞分泌的黏附分子、趋化因子等影响下通过血脑屏障进入中枢，进而引起神经损伤，造成MS局部脱髓鞘和轴索损伤[12]。MS患者脑脊液中的IL-2水平升高，而IL-2对调节性T细胞稳态具有重要作用；此外，IL-2还可以抑制Th17细胞的分化，在中枢神经系统炎性疾病中发挥促炎作用[13]。IL-23和IFN-γ是MS发病机制中的关键细胞因子，可以诱发和加重MS和EAE[14]。β-arrestin1是IFN-γ的负调控因子，可降低IFN-γ的表达[15]。本研究结果显示，EAE模型小鼠血清中炎症因子IL-2、IL-23、IFN-γ的表达水平升高，而益肾达络饮可以降低EAE模型小鼠血清中上述因子的表达。

β-arrestin1是G蛋白偶联受体向核内传递信号的重要介质和支架蛋白[5]。相关研究显示，β-arrestin1可抑制



Ⅰ：正常组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：AAV-β组；Ⅳ：中药组；Ⅴ：AAV-β+中药组；Ⅵ：阳性对照组

图5　各组小鼠脑和脊髓组织中β-arrestin1、cAMP、PKA、CREB蛋白表达的电泳图

表3　各组小鼠脑和脊髓组织中β-arrestin1、cAMP、PKA、CREB蛋白表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	β-arrestin1/GAPDH		PKA/GAPDH		CREB/GAPDH		cAMP/GAPDH	
	脑组织	脊髓组织	脑组织	脊髓组织	脑组织	脊髓组织	脑组织	脊髓组织
正常组	0.69±0.06	1.57±0.04	1.15±0.03	0.99±0.02	0.97±0.08	1.27±0.21	1.33±0.07	0.81±0.03
模型组	1.87±0.03[a]	1.96±0.08[b]	0.36±0.05[a]	0.39±0.03[a]	0.67±0.11[a]	0.37±0.05[a]	1.00±0.04[b]	0.53±0.02[b]
AAV-β组	0.69±0.11[c]	1.65±0.22[d]	0.63±0.23[c]	0.59±0.03[c]	0.74±0.02	0.98±0.11[d]	1.06±0.11	0.99±0.07[c]
中药组	0.96±0.06[ce]	1.27±0.04[ce]	0.90±0.05[cf]	1.01±0.06[cf]	0.89±0.06[d]	1.00±0.16[d]	1.38±0.10[cf]	1.00±0.03[c]
AAV-β+中药组	0.64±0.02[c]	0.79±0.06[cf]	1.25±0.10[cf]	0.76±0.05[ce]	0.92±0.04[d]	0.98±0.14[d]	1.46±0.12[cf]	1.27±0.09[cf]
阳性对照组	0.84±0.49[c]	1.38±0.06[ce]	1.01±0.01[cf]	1.11±0.04[cf]	0.91±0.01[d]	1.40±0.19[cf]	1.54±0.04[cf]	1.26±0.09[cf]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与正常组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与模型组比较，$P<0.05$；e：与AAV-β组比较，$P<0.05$；f：与AAV-β组比较，$P<0.01$

cAMP/PKA信号通路激活[6]，而该通路相关蛋白cAMP、PKA和CREB与神经炎症反应密切相关。其中，cAMP对免疫系统具有免疫抑制作用，可以抑制促炎细胞因子的表达[16-17]。CREB在G蛋白偶联受体信号通路中发挥着至关重要的作用，巨噬细胞中的CREB可以抑制炎症介质的产生[18]。未经磷酸化的CREB主要位于细胞核内，cAMP激活PKA后，活化的PKA进入细胞核活化CREB，从而调节靶基因的转录；CREB和β-arrestin1存在于相同的免疫共沉淀物中，两者可以相互结合[5]。本研究结果显示，益肾达络饮可下调EAE模型小鼠脑和脊髓组织中β-arrestin1的表达，并且上调EAE模型小鼠脑和脊髓组织中PKA、CREB、cAMP蛋白的表达；然而在抑制β-arrestin1表达之后，EAE模型小鼠脑和脊髓组织中PKA、CREB、cAMP蛋白的表达又上调；抑制β-arrestin1的同时给予益肾达络饮干预，可进一步下调β-arrestin1表达，激活cAMP/PKA/CREB信号通路。然而，小鼠尾静脉注射腺AAV-β后，虽然可通过血脑屏障感染神经元和胶质细胞，在小鼠体内可长期高效、均匀、广泛地分布和表达[19]，但尾静脉注射AAV-β会使病毒转导多脏器及肌肉，对中枢神经的转导特异性不足。在后续研究中可考虑改为立体定位注射的方式特异性转导中枢神经系统。

综上所述，β-arrestin1在EAE模型小鼠中枢神经系统中含量升高可能促进了神经炎症的发展，抑制了cAMP/PKA/CREB信号通路的激活，导致EAE病情进展。益肾达络饮可能是通过抑制中枢神经系统中β-arrestin1的表达，进而激活cAMP/PKA/CREB信号通路，减轻神经系统炎症，最终缓解EAE的症状。AAV-β与中药在EAE模型小鼠体内起到了协同治疗作用。由于本研究聚焦中药的作用机制与途径研究，故未对中药不同剂量的作用效果进行探索。在后续研究中，本课题组将进一步针对β-arrestin1与神经炎症、髓鞘再生、组蛋白乙酰化之间的相关性以及益肾达络饮的影响进行深入研究，进一步摸索益肾达络饮的最佳用药剂量，为中药治疗神经免疫性疾病提供研究思路。

参考文献

[1] 周游，张伶姝，杨元，等. 西维来司钠对实验性自身免疫性脑脊髓炎模型大鼠的保护作用[J]. 中国药房，2016，27(7)：903-906.

[2] 申玉娟. 益肾达络饮加减治疗复发：缓解型多发性硬化缓解期临床疗效观察[D]. 北京：北京中医药大学，2015.

[3] COLLIN L，MARTIN H，ZSUZSANNA F，et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse[J]. Current Protocols，2021，1(12)：e300.

[4] 施裕丰. β-Arrestin1的核内功能：通过影响表观遗传修饰调节基因转录及其在自身免疫中的作用[D]. 上海：中国科学院研究生院（上海生命科学研究院），2007.

[5] GOLAN M，SCHREIBER G，AVISSAR S. Antidepressants elevate GDNF expression and release from C_6 glioma cells in a β-arrestin1-dependent，CREB interactive pathway [J]. Int J Neuropsychopharmacol，2011，14(10)：1289-1300.

[6] BAILLIEG S，HOUSLAYM D. Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes[J]. Curr Opin Cell Biol，2005，17(2)：129-134.

[7] 高颖. 一种治疗多发性硬化的中药复方组合物及其制备方法：CN110538302B[P]. 2021-07-20.

[8] YUANC X，CHU T，LIU L，et al. Catalpol induces oligodendrocyte precursor cell-mediated remyelination *in vitro* [J]. Am J Transl Res，2015，7(11)：2474-2481.

[9] GUAN D，LIY X，PENG X，et al. Yishendaluo decoction attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating CXCR4 signaling[J]. Int J Clin Exp Med，2017，10(9)：13534-13541.

[10] WANGY Y，PEIS S，LIUZ H，et al. IRAK-M suppresses the activation of microglial NLRP3 inflammasome and GSDMD-mediated pyroptosis through inhibiting IRAK1 phosphorylation during experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Cell Death Dis，2023，14(2)：103.

[11] SMETS I，VANDEUN L，BOHYN C，et al. Corticosteroids in the management of acute multiple sclerosis exacerbations[J]. Acta Neurol Belg，2017，117(3)：623-633.

[12] NOURBAKHSH B，MOWRYE M. Multiple sclerosis risk factors and pathogenesis[J]. Continuum，2019，25(3)：596-610.

[13] GILIO L，FRESEGNA D，GENTILE A，et al. Preventive exercise attenuates IL-2-driven mood disorders in multiple sclerosis[J]. Neurobiol Dis，2022，172：105817.

[14] NITSCH L，PETZINNA S，ZIMMERMANN J，et al. Astrocyte-specific expression of interleukin 23 leads to an aggravated phenotype and enhanced inflammatory response with B cell accumulation in the EAE model[J]. J Neuroinflammation，2021，18(1)：101.

[15] PELZEL C，BEGITT A，WENTA N，et al. Evidence against a role for β-arrestin1 in STAT1 dephosphorylation and the inhibition of interferon-γ signaling[J]. Mol Cell，2013，50(1)：149-156.

[16] CHANGB J，LIUY R，HUJ T，et al. *Bupleurum chinense* DC improves CUMS-induced depressive symptoms in rats through upregulation of the cAMP/PKA/CREB signalling pathway[J]. J Ethnopharmacol，2022，289：115034.

[17] ZOUZ Q，CHENJ J，FENGH F，et al. Novel phosphodiesterase 4 inhibitor FCPR03 alleviates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by regulation of the cAMP/PKA/CREB signaling pathway and NF-κB inhibition[J]. J Pharmacol Exp Ther，2017，362(1)：67-77.

[18] LUAN B，YOONY S，LAY J L，et al. CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2015，112(51)：15642-15647.

[19] SEGARD D F，HAKIBILEN B D，CORALIE B R，et al. Alterations of redox dynamics and desmin post-translational modifications in skeletal muscle models of desminopathies [J]. Exp Cell Res，2019，383(2)：111539.

（收稿日期：2022-10-21　修回日期：2023-05-04）

（编辑：林　静）