基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0364-03

雷公藤甲素对 EAE 大鼠视网膜神经节细胞的作用及机制

谭 蔚,李平华

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察雷公藤甲素(Triptolide,TP)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)大鼠视网膜神经节细胞(Retinal ganglion cells,RGCs)的作用及可能机制。方法:45 只雌性 SD 大鼠随机分成 3 组:正常组、EAE 组、TP 组。豚鼠脊髓全匀浆加完全福氏佐剂免疫 SD 大鼠建立 EAE 模型,TP 组于免疫当天至第 14 d 雷公藤甲素 0.1 mg/kg 每日腹腔注射,分别于 EAE 大鼠发病后第 1 d(初期)、7 d(高峰期)、14 d 及 30 d(恢复期),观察各个时间段大鼠视神经的病理变化,免疫组化法检测视网膜单核细胞趋化因子 -1(Monocyte chemokine protein-1,MCP-1)、胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)的表达,TUNEL 法检测 RGCs 凋亡。结果:EAE 大鼠在发病后第 7 d 左右达到高峰,MCP-1 发病初期出现在 EAE 大鼠视网膜上,发病后第 7 d 开始明显下降,病理改变视神经可见炎性细胞侵润及脱髓鞘,TP 组大鼠 MCP-1 及 GFAP 表达较 EAE 组降低($P<0.01$),神经节细胞凋亡数量与 EAE 组比较无明显差别($P>0.05$)。结论:雷公藤甲素能减轻视神经的炎症反应,下调视网膜 MCP-1 及 GFAP 的表达,但不能直接减少视网膜神经节细胞凋亡。

【关键词】实验性视神经炎;单核细胞趋化因子 -1;视网膜神经节细胞;雷公藤甲素

【中国图书分类法分类号】R774.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-05

Effects and mechanism of triptolide on retinal gonlion cells of rats with EAE

TAN Wei, et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of triptolide (TP) on retinal gonlion cells of SD rats with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), and to analyze its possible mechanism. *Methods*: EAE models were induced in SD rats, the TP group received triptolidedayly intraperitoneal injection from immunization day to 14 days. The pathological changes in optic nerve were observed, the expression of MCP-1, GFAP and the apoptosis of RGCs in retina were detected. *Results*: Demyelination and inflammatory cell infiltration showed in optic nerve, MCP-1 appearred in the retina at the initial stage, and begine to decline after onset 7 days. The expression of MCP-1 and GFAP were lower in TP group, compared with the EAE group with statistically significant difference ($P<0.01$), while with no significant difference on the apoptosis of RGCs ($P>0.05$). *Conclusion*: Triptolide inhibit the expression of MCP-1 and GFAP, have no significant effects on the apoptosis of RGCs.

【Key words】Experimental optic neuritis; Monocyte chemokine protein-1; Retinal gonlion cells; Triptolide

视神经炎(Optic neuritis,ON)是累及视神经的急性、亚急性炎性病变,少数呈慢性病程,其确切的发病机制尚不十分清楚。视网膜神经节细胞(Retinal ganglion cells,RGCs)是视网膜的主要组成成分,其轴突构成视神经。视神经炎常伴有视网膜神经节细胞的凋亡。视神经炎是目前人群(尤其是青壮年)致盲的主要原因,RGCs 凋亡及轴突损伤是导致视力永久性丧失的最终原因。很多学者认为视神经炎时 RGCs 损伤是继发于炎性细胞浸润之后,由炎性细胞引起[1]。

雷公藤甲素(Triptolide,TP)是雷公藤的主要活性成份,具有抗炎及免疫抑制等作用,用于类风湿性关节炎、慢性肾炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、皮肤病等各种自身免疫性疾病的研究及治疗,但对视神经及视网膜神经节细胞的影响如何未见报道。本研究用实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)模型作为实验性视神经炎模型,观察其对实验性视神经炎大鼠视网膜神经节细胞的作用,并对其机制进行初步探讨。

作者介绍:谭 蔚(1981-),女,硕士,

研究方向:视神经疾病。

通讯作者:李平华,男,教授,E-mail: 67716761@qq.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

雌性 SD 大鼠,6 ~ 8 周龄,体重 180 ~ 200 g;豚鼠,雌雄不分,体重 350 ~ 400 g,由重庆医科大学实验动物中心提供;百日咳疫苗(BPV)购自卫生部上海生物制品研究所,浓度为

10^{11} 个/ml；MCP-1、GFAP 多克隆抗体以及 SABC 试剂盒购于武汉博士德生物公司；TUNEL 试剂盒购于美国 Roche 公司；完全福氏佐剂（CFA）购于美国 Sigma 公司；雷公藤甲素购于成都普思生物科技有限公司。

1.2 动物模型的建立及分组

1.2.1 抗原乳剂的制备 参考许娜等的方法[2]，过量麻醉处死豚鼠，迅速冰上取脊髓，去除脊膜后与等量的生理盐水配成 50% 的豚鼠脊髓生理盐水匀浆，再与等量的 CFA 混合抽打成油包水样乳剂，即为抗原乳剂。

1.2.2 动物分组 45 只雌性 SD 大鼠随机分成正常组 5 只，EAE 组 20 只，TP 组 20 只。EAE 组及 TP 组每只大鼠于双后肢足垫皮下注射 0.2 ml 抗原乳剂，共计 0.4 ml。后肢皮下加注 0.1 ml BPV。TP 组于免疫当天至第 14 d 每日腹腔注射 0.1 mg/kg 雷公藤甲素，EAE 组则用同样方法注射等量生理盐水。临床分级按照 Zhang GX 的标准[3]，以发病 1 分以上作为 EAE 临床发病。

1.3 取材、免疫组织化学染色

大鼠于免疫后第 8 d 开始发病，发病当天记为发病第 1 d，分别于发病第 1、7、14、30 d，EAE 组及 TP 组每个时间段各取 4 只大鼠，用 4% 的多聚甲醛心脏灌流固定，取出视神经及眼球，用预冷的 4% 的多聚甲醛固定 12～24 h。常规石蜡病理切片（片厚 5 μm），一部分作 HE 染色，另一部分免疫组化染色测定视网膜中单核细胞趋化因子 -1（Monocyte chemokine protein-1，MCP-1）和胶质纤维酸性蛋白（Glial fibrillaryacid protein，GFAP）的表达，TUNEL 法检测 RGCs 凋亡。

1.4 病理图像分析及统计方法

光境下观察阳性反应呈棕黄色，每张切片随机选取 5 个高倍视野（×400），计阳性反应数，取平均值。各项指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件进行分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床评分

EAE 组、TP 组分别为 2.93 ± 0.68，1.76 ± 0.52，两组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。EAE 组发病时间（11.44 ± 1.71）d，TP 组大鼠发病时间为（14.02 ± 0.43）d，与 EAE 组比较差别具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2 视神经病理改变

正常组视神经横切面呈类圆形，纵切面神经纤维呈柱形均匀排列，染色均匀，其间散在神经胶质细胞，无炎性细胞浸润。EAE 组大鼠视神经轴突变性降解，网状分层形成大量空泡，可见不同程度的淋巴细胞、单核细胞浸润，轴突数目较正常组明显减少，弥漫脱髓鞘改变（图 1）。TP 组较 EAE 组炎症细胞浸润减少，轴突数量以及脱髓鞘的变化不明显（图 2）。

2.3 MCP-1 在视网膜神经节细胞层的表达

在 EAE 大鼠发病初期视网膜上即可见 MCP-1 明显表达（图 3），一直持续到发病高峰期，随后开始下降，发病后第 30 d 几乎无表达，与正常组比较 $P>0.05$。在发病后第 1 和 7 d，TP 组 MCP-1 的表达较 EAE 组明显减少，与 EAE 组比较差别具有显著统计学意义（$P<0.01$），恢复期即发病后第 14 d 及 30 d，差异不明显（$P>0.05$）。正常组大鼠视网膜中几乎未见 MCP-1 表达。

表 1 趋化因子 MCP-1 的表达（$\bar{x} \pm s$，n=10）

组别	1 d	7 d	14 d	30 d
EAE 组	26.14 ± 2.85	25.24 ± 1.51	10.28 ± 2.05△	0.12 ± 0.31
TP 组	14.89 ± 1.56◆	14.09 ± 1.05 ◆	6.08 ± 1.44△▲	0.10 ± 0.32▲

△：$P<0.01$，与发病后第 7 d 比较；▲：$P>0.05$，与 EAE 组比较；◆：$P<0.01$，与 EAE 组比较；注：正常组 MCP-1 的表达为 0.00 ± 0.11

表 2 视网膜 GFAP 的表达（$\bar{x} \pm s$，n=11）

组别	1 d	7 d	14 d	30 d
EAE 组	37.69 ± 2.65	44.07 ± 2.75▼	20.33 ± 2.76	8.35 ± 1.17
TP 组	15.22 ± 2.26▼	23.40 ± 5.27▽▼	10.17 ± 0.67▼	7.05 ± 0.48

▽：$P<0.01$，与发病后第 1 d 比较；▼：$P<0.01$，与 EAE 组比较；注：正常组 GFAP 的表达为 7.01 ± 0.40

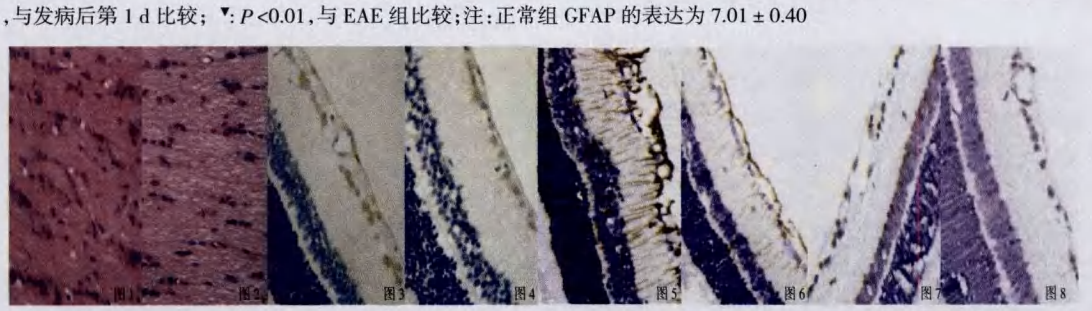


图 1 EAE 组视神经 HE（7 d，HE × 400）；图 2 TP 组视神经 HE（7 d，HE × 400）；图 3 EAE 组大鼠视网膜 MCP-1（1 d，× 400）；图 4 TP 组大鼠视网膜 MCP-1（1 d，× 400）；图 5 EAE 组大鼠视网膜 GFAP（7 d，× 400）；图 6 TP 组大鼠视网膜 GFAP（7 d，× 400）；图 7 EAE 组大鼠 RGCs 凋亡（7 d，× 400）；图 8 TP 组大鼠 RGCs 凋亡（7 d，× 400）

2.4 视网膜 GFAP 的表达

正常大鼠视网膜内界膜下和神经纤维层可见少许棕色阳性 GFAP 纤维，GFAP 的表达主要集中在 RGCs 的胞膜及其纤维的周围，在 EAE 大鼠视网膜各层均可见 GFAP 阳性纤维，贯穿于视网膜全层（图 5），初期可见明显的 GFAP 阳性着色，发病后第 7 d 达到高峰，GFAP 阳性染色进一步加深、密集，TP 组与 EAE 组比较，GFAP 的表达明显减少，有显著差异性（P<0.01）。

2.5 视网膜神经节细胞凋亡

正常大鼠视网膜几乎未见凋亡阳性细胞，凋亡指数 0.00 ± 0.28；EAE 组大鼠可见明显 RGCs 凋亡，高峰期尤为明显，高峰期 EAE 组和 TP 组神经节细胞凋亡指数分别为：35.24 ± 1.23，36.20 ± 6.53，两组比较无明显统计学意义（P>0.05）。与正常组间差别具有明显统计学意义（P<0.01）。

3 讨 论

EAE 是目前公认的经典实验动物模型用作多发性硬化（Multiple sclerosis，MS）的研究，MS 是累及中枢神经系统的慢性自身免疫疾病，该病可引起视神经、脊髓和脑内神经组织的散在多处的脱髓鞘硬化斑，其中以视神经受累最多见。越来越多的证据表明视神经炎与 MS 有密切关系。EAE 作为 MS 常用动物模型无论是在 MRI 还是病理方面与急性视神经炎都极为相似。MS 发病的根本原因就是血脑屏障破坏而导致淋巴细胞和单核细胞等炎症细胞的侵润。研究表明，趋化因子在这一发病机制中起到重要作用。MCP-1 是 CC 趋化因子家族的成员之一，主要引起单核细胞/巨噬细胞、树突细胞及活化淋巴细胞聚集[4]。已观察到 MCP-1 在 EAE 大鼠的脑、脊髓以及周围神经中表达。Huang 等发现，MCP-1 是 EAE 发病的关键因子之一，与 EAE 的发病及严重程度有关[5,6]，可作为检测 EAE 病理过程的指标之一。星形胶质细胞在炎性脱髓鞘疾病如：MS 和 EAE 中明显活化，研究表明星形胶质细胞与 EAE 的发病有着密切关系，在 MS 患者的脑组织的活性病灶中星形胶质细胞大量表达 MCP-1，脑内活化的星形胶质细胞能放大量促炎因子[7]。这些炎症介质对中枢神经系统内神经细胞是有害的，可加重神经组织的损伤。GFAP 是星形胶质细胞的主要成分，可作为星形胶质细胞的特异性标记物。本实验选择了 EAE 大鼠发病的几个典型时期，观察 MCP-1 以及 GFAP 在不同时期视网膜节细胞层的表达情况。探讨其与视神经炎及视网膜神经节细胞凋亡的关系。

TP 又称雷公藤内酯、雷公藤内酯醇，是从雷公藤提取的三环二萜类内酯醇，是雷公藤提取物中具有免疫抑制及抗炎作用的主要活性成分，近 20 年来被广泛用于类风湿性关节炎、慢性肾炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮等各种自身免疫性及炎性疾病的治疗。雷公藤的免疫抗炎作用是多靶点、多部位，既能作用于多种细胞，其作用机制主要是抑制多种细胞因子、粘附分子和趋化因子的分泌。体外实验表明，雷公藤甲素能抑制巨噬细胞表达 IL-1、TNF-α 以及 NF-κB 等促炎性细胞因子，抑制各种趋化因子的产生等[8]，还能诱导活化期（S+G_2/M 期）淋巴细胞凋亡。这些都是其发挥抗炎作用的主要机制。我们选择雷公藤甲素对 EAE 大鼠进行早期干预性治疗，通过观察视神经的病理变化、检测 MCP-1 及 GFAP 在视网膜的表达，对其对视神经及视网膜神经节细胞的作用及机制进行探讨。结果显示：MCP-1 阳性细胞反应分散地分布在视网膜神经节细胞层，在 EAE 临床发病初期开始表达，一直持续到高峰期，提示 MCP-1 可能参与了视网膜及视神经炎症细胞的趋化，参与始发炎性反应，并随疾病发展，高峰期进一步参与炎性细胞的积聚。GFAP 与 MCP-1 的表达基本一致，说明二者可能存在一定的关系，MCP-1 可能由活化星形胶质细胞产生。雷公藤甲素能减轻 EAE 大鼠的临床症状并推迟发病，对实验性视神经炎有一定作用，能够减少视神经炎性细胞浸润，实验组轴突数量以及脱髓鞘的变化不如 EAE 组明显，同时观察到实验组视网膜 GFAP及 MCP-1 的表达较 EAE 组明显减少，说明雷公藤甲素能够明显抑制视网膜神经节细胞层炎症因子的表达，起到减轻炎症反应的作用。

视神经炎是临床上主要致盲眼病之一，发病原因尚不十分清楚。有学者认为视神经炎时炎性细胞破坏血－视网膜屏障，直接侵入视神经视网膜引起 RGCs 凋亡，他们认为 RGCs 凋亡是继发于炎性细胞浸润之后，由炎症细胞引起[1]。也有人认为，RGCs 凋亡并非炎症引发的髓鞘脱失而导致的继发性神经元损伤[9]。不管是何种原因所致，针对各种炎性细胞的治疗仍然是目前临床上视神经炎的主要治疗手段。糖皮质激素是临床上用于治疗急性视神经炎最为经典的药物，但近年来很多研究显示：糖皮质激素并不能到达直接的神经保护作用[10,11]，Diem 发现糖皮质激素对视网膜神经节细胞的存活呈负相关[12]。本次实验所用的雷公藤甲素与糖皮质激素作用相似，未表现出对神经节细胞的直接保护作用，事实上雷公藤甲素的作用与糖皮质激素不同，它是通过兴奋下丘脑－垂体－肾上腺轴的下丘脑，启动内源性糖皮质激素，增加循环中的糖皮质激素。它促进自身皮质激素的合成代谢，而非替代，使其避免或抵消了激素的某些副作用，亦从一定方面反映了其临床价值和意义。

我们的实验观察到 EAE 大鼠视神经上不同程度炎性细胞侵润，提示炎性细胞参与了急性视神经炎的发生，在视神经及神经节细胞的损伤中扮演着重要角色。雷公藤甲素虽然抑制了视网膜上炎症因子的表达，但未能减少 RGCs 凋亡，说明炎症反应只是神经节细胞凋亡病因的一个方面，其发病机制还很多，有待进一步研究。雷公藤甲素作用广泛，加上脱髓鞘视神经炎病因复杂，如何减少其副作用，更好地发挥其治疗作用，将成为我们以后研究的重点及主要方向。

参 考 文 献

[1] Shindler K S, Ventura E, Dutt M, et al. Inflammatory demyelination induces axonal injury and retinal ganglion cell apoptosis in experimental

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0367-05

他克莫司对大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎的实验性治疗

石海波[1],王顺和[1],郑 娟[1],李晗宇[1],姜 蓉[2],唐 艳[3],陈舜琦[4],张 凌[5]

(1.重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016;2.重庆医科大学干细胞与组织工程实验室,重庆 400016;3.重庆酉阳县人民医院妇产科,重庆 409800;4.重庆开县人民医院泌尿科,重庆 405427;5.重庆秀山县人民医院病理科,重庆 409900)

【摘 要】目的:研究新型免疫抑制剂他克莫司(Tacrolimus,FK506)对大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)的治疗作用和作用机制,并与已论证的传统治疗方法甲基泼尼松龙对 EAE 实验治疗做临床对比其疗效。方法:豚鼠脊髓匀浆和完全福氏佐剂制成的混合液诱导 SD 大鼠建立 EAE 模型,免疫 10 d 后将 FK506 分别以 1 mg/kg,0.5 mg/kg 剂量给予每日腹腔注射 EAE 大鼠,连续给药 10 d,观察其发病情况,外周血 T 淋巴细胞 CD3 、CD4 、CD8 、NK 细胞比率,免疫后 30 d,观察脑、脊髓组织病理变化,免疫组织化学生长相关蛋白 43(Growth associated protein 43,Gap-43)显示神经再生的形态学证据。结果:FK506 能减轻 EAE 的临床症状,促进 EAE 的临床缓解和恢复;减轻中枢神经系统的炎症浸润;减轻髓鞘和轴突损伤,促进轴突再生作用,且停药后未见动物复发。结论:FK506 对实验性变态反应性脑脊髓炎有一定的实验性治疗作用。

【关键词】多发性硬化;实验性变态反应性脑脊髓炎;大鼠;他克莫司

【中国图书分类法分类号】R453.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-16

Experimental study of tacrolimus for experimental autoimmune encephalomyelitis in rats

SHI Hai-bo, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To explore the efficacy and therapeutic mechanism of immune inhibitor tacrolimus (FK506) for experimental autoimmune encephalomyelitis rats and compare the efficacy of FK506 and confirmed traditional methyllprednisolone. *Methods*: the guinea pig spinal cord homogenate in complete freund's adjuvant was used to induce the acute EAE in SD rats FK506 at the dosage of 1 mg/kg and 0.5 mg/kg were intraperitoneally injected to EAE

作者介绍:石海波(1981-),男,硕士,
研究方向:神经系统脱髓鞘疾病及神经再生研究。
通讯作者:王顺和,男,教授,E-mail: wangshunhe120@yahoo.com。

optic neuritis[J]. Exp Eye Res, 2008, 87(3): 208-213.

[2] 许 娜,李平华. 实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠视神经的病理学改变[J].重庆医科大学学报,2007,32(8): 851-855.

[3] Zhang G X,Yu S,Gran B, et al.Glucosamine abrogetes the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of Th2 response[J]. Immunol, 2005,175(11): 7202-7208.

[4] Banisor I,Leist T P,Kalman B.Involvement of beta chemokines in the development of inflammatory demyelination[J].J Neuroinflanmation,2005, 2(1): 7-22.

[5] Huang D R,Wang J,Kivisakk P,et al.Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigenspecific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis[J].J Exp Med,2001,193(6):713-726.

[6] Orlikowski D,Chazaud B,Plonquet A,et al.Monocyte chemoattractant protein 1 and chemokine receptor CCR2 productions in Guillain-Barre syndrome and experimental autoimmune neuritis[J].J Neuroimmunol,2003,134(1-2):118-127.

[7] Mrak R E,Griffin W S.Interleukin-1,neuroinflammation,and Alzheimer's disease[J].Neurobiol Aging,2001,22(6):903-908.

[8] 刘 浩,刘志红,陈朝红,等.雷公藤内酯醇对 T 淋巴细胞核因子-KB 及其抑制分子的影响[J].南京大学学报(自然科学版),2000,36(5):603-609.

[9] Meyer R, Weissert R, Diem R,et al.Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis[J].J neurosci,2001,21(16):6214-6220.

[10] Hickman S J,Kapoor R,Jones S J,et al.Corticosteroids do not prevent optic nerve atrophy following optic neuritis[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry,2003,74(8):1139-1141.

[11] Parry A,Corkill R,Blamire A M,et al.Beta-Interferon treatment does not always slow the progression of axonal injury in multiple slerosis[J]. J Neurol ,2003,250(2):171-178.

[12] Diem R,Hobom M, Maier K,et al.Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during aotoimmune CNS inflammation by inhibition of an endo- genous neuroprotective pathway[J]. The Journal of Neurosience, 2003, 23(18):6993-7000.

(责任编辑:冉明会)