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)

rats respetively for daily for ten days.Clinical features were observed, their peripheral blood lymphocytes CD3, CD4, CD8 and NK subsets were counted, pathology changes of brain and spinal cord were observed, and the evidence of nerve regeneration was shown by immunohistochemistry stain. *Result*: FK506 could relieve remits the clinical phenonoue of EAE promote the climical and release and recoveny of EAE, decrease the inflammatory infiltration in the CNS, decrease demyelination and axonal damage in CNS , promote for axons regeneration .Furthermore, no replase after stopping drug was observed. *Conclusion*: FK506 as a immune inhibitor can be used the Autoimmune disease, such as EAE.

【Key words】 Multiple sclerosis(MS); Experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE); Rat; Tacrolimus

多发性硬化(Multiple sclerosis, MS)是中枢神经系统常见的自身免疫性疾病,以中枢神经系统炎症细胞浸润、髓鞘脱失、少突胶质细胞凋亡和轴突损伤为特征[1],发病特点为时间上和空间上的多发性,导致多种神经功能障碍、如肢体无力、视觉障碍、感觉异常、认知功能障碍等[2]。全世界约有二百五十多万多发性硬化患者,发病年龄以青壮年人群为主,近年来,在我国的发病率呈上升趋势。

MS 尚无特别有效的治疗方法,临床治疗以调控机体免疫反应为主,传统的糖皮质激素等免疫抑制药物是使用最为广泛,具有一定治疗效果,但其副作用较大,所带来的不良反应不容忽视,因此,寻找 MS 新的治疗药物及途径是众多医学研究者努力的方向。

他克莫司(Tacromulis, FK506)是一种新型免疫抑制剂,是一种广泛应用于器官移植的大环内酯类免疫抑制药物,于 1984 年从日本筑波山土壤中被分离到。具有高效低毒的优点。最近,研究者发现他克莫司与神经免疫亲和素 FK506 结合蛋白(FK506 Bincling proteins, FKBP)结合还具有促神经再生和神经保护和的作用[3]。

本研究利用髓鞘碱性蛋白(Myelin basic protein, MBP)作为抗原,复制 MS 的动物模型 EAE(Experimental autoimonune encephalomyelitis, EAE)观察 FK506 对 EAE 临床症状、中枢神经组织炎症细胞浸润、髓鞘脱失、脊髓轴突的损伤以及 FK506 对淋巴细胞增殖的影响探讨 FK506 治疗多发性硬化的病理学机制。

1 材料与方法

1.1 动物

雌性 SD 大鼠,7~8 周龄,体重在 200 g 左右,SPF 雄性豚鼠,体重 400 g,均购于重庆医科大学动物实验中心。

1.2 药物与试剂

卡介苗、FK506 、百日咳疫苗(上海生物制品研究所),医用羊毛脂(重庆化学试剂厂),医用石蜡油(分析纯)(重庆化学试剂厂),大鼠 CD3 试剂盒 LOT 05010207),CD4 试剂盒(LOT 0409),CD8 试剂盒(LOT 0709)和 NK 试剂盒(LOT 02020401)(美国 California Caltag 公司)。

1.3 实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)动物模型的制备[4]

取体重 400 g 左右的豚鼠,用过量的 3.5%水合氯醛腹腔注射至死,迅速在冰上取脊髓,去除脊膜称重后,用冰生理盐水制成 50%(重量/体积比)的豚鼠脊髓生理盐水匀浆,4℃保存。取羊毛脂 10 g,液体石蜡油 40 ml,混合盛于三角烧瓶内,高压灭菌 15 磅 30 min,制成不完全福氏佐剂 4℃保存。将失活的卡介苗原浆(80 mg/ml)50 μl 加入 1 ml 不完全福氏佐剂中,制成每 ml 含 4 mg 结核杆菌的完全福氏佐剂(Complete freund's adjuvant, CFA)。将等量的脊髓匀浆和 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℃保存,12 h 用完。将 SD 大鼠以 3.5%水合氯醛(1 ml/100g 体重)腹腔麻醉后,碘酒酒精局部消毒。4 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约 1×10^6 百日咳疫苗 0.1 ml。

1.4 动物分组及给药

将 SD 大鼠随机分为 4 组,FK506A 组(n=10),FK506B 组(n=10),EAE 模型组(n=10),对照组(n=5)。在免疫后第 10 d,FK506A 组以 FK506 1 mg/kg 腹腔注射给药,FK506B 组以 Fk506 0.5 mg/kg 腹腔注射给药,模型组只注射生理盐水。

1.5 SD 大鼠 EAE 发病情况的临床评分[5,6]

根据文献的方法对 EAE 发病情况进行分级和评价,0 分:正常;1 分:鼠尾张力障碍;2 分:部分后肢瘫痪或步态不稳;3 分:完全后肢瘫痪;4 分:部分或完全前肢瘫痪;5 分:濒死状态或死亡[5]。同时记录大鼠的体重变化和死亡率。

1.6 流式细胞检测

在实验第 20 d 分别在尾尖采血 30 μl,EDTA 抗凝,用流式细胞仪法测 T 淋巴细胞 CD3+、CD4+、CD8+ 比率变化。

1.7 病理学观察

在实验的第 26 d,随机将各组大鼠予 3.5%水合氯醛(10 ml/kg 体重)腹腔麻醉后,开胸常规左心室灌注 4℃的生理盐水(加肝素)及 4%的多聚甲醛灌注内固定后,取脑和脊髓,4% 甲醛固定 48 ~ 72 h,石蜡包埋,制成 5 μm 厚切片,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。

1.7.1 神经病理学特殊染色及观察[7] Luxol Fast Blue-H.E. 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 H·E·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。

Bielschowsky 轴突银染色 5 μm 厚石蜡切片，常规脱腊至双蒸水，入预热的 20% 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% Nitric Silver 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% 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：损伤面积大于 75%[4]。

1.7.2 GAP-43 免疫组织化学染色 5 μm 厚石蜡切片，常规脱腊至双蒸水，加入 3%H_2O_2 浸泡 10 min 后入 PBS 洗 3×3 min，再加入柠檬酸缓冲液，放入微波炉抗原修复冷却至室温，加入封闭血清 37℃温箱 30 min，将温箱中的载玻片取出，用吸水纸擦干载玻片反面和正面组织周围的血清，加一抗，4℃过夜，将载玻片从冰箱中取出，放入 PBS 中洗 3 次，每次 5 min，擦干组织周围的 PBS 后加上二抗，然后置于 37℃温箱中 0.5 h，将片子从温箱中取出，放入 PBS 中洗 3 次，每次 5 min，擦干组织周围的 PBS 后加上 SABC，然后置于 37℃温箱中 0.5 h，入 PBS 中洗 3 次，每次 5 min，擦干组织周围的 PBS 后加上 DAB 显色并镜下观察，显色后的片子用清水冲洗一段时间后，浸泡于苏木精中染色 3 min，脱水，透明，封片。

1.8 统计学处理

所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示，数据处理在 SAS8.2 统计软件上完成，临床症状高峰评分，病程持续时间和体重下降最高值的比较采用 t 检验；组间两两比较采用 SNK 法进行统计分析。$P \leq 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 FK506 对 EAE 的临床疗效

FK506 能减轻 EAE 的临床症状，促进 EAE 的临床缓解和恢复，且停药后未见动物重新出现临床症状。与模型组比较，FK506 组的平均发病时间较晚，大多在免疫后 16~18 d 发病，且临床症状较轻，发病持续时间也较短，发病后 2~3 d 后逐渐恢复活动能力。

2.2 中枢神经系统病理变化

评价实验性变态反应性脑脊髓炎中枢神经组织的作用，我们采用常规 HE 染色结合神经组织特殊染色方法，Luxol Fast Blue 髓鞘染色和 Bielschowsky 轴突银染色，观察神经组织中炎症细胞浸润、髓鞘脱失和轴突的损伤。

EAE 中见有明显的炎症细胞的浸润。疾病早期炎症细胞主要浸润在脑的被膜下方即蛛网膜下腔中和脑白质血管周围形成血管淋巴袖套。随着病变的发展，炎症细胞从蛛网膜下腔和血管周围向脑实质中扩散。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。Fk506 组对照组，炎症细胞的浸润显著减少图(A、B、C)。

髓鞘被 Luxol Fast Blue 染成蓝色。正常的中枢神经系统白质含有丰富的髓鞘，因此在大脑的深部白质、小脑白质和脊髓的白质均被染成蓝色。在 EAE 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。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。与 EAE 组对照组比较，FK506 组与泼尼松龙组的神经组织，髓鞘的损伤明显减轻(图 D、E、F)。Bielschowsky 轴突银染色的结果与 Luxol Fast Blue 髓鞘染色的结果一致，FK506 组轴突的损伤较轻图(G、H、I)。

大量实验证实，无论外周神经或是中枢神经损伤后，作为生长锥内最具活性的一种神经元特异性蛋白——生长相关蛋白 -43(Growth associatedprotein 43，GAP-43)均会迅速升高，它的增加预示神经组织正在进行再生。免疫组织化学染色图(J、K、L)显示，在处理组(FK506A，FK506B)的神经元的胞体、轴突有大量的棕红色 GAP-43 染色颗粒。用光学显微镜标准目镜方格测量系统(10×10)，在 40 倍物镜下，于Ⅱ板层内 GAP-13 反应产物最密集处计数内、中、外 3 个视野的颗粒数。每只动物取 3 张切片进行计数，取其平均数。阳性细胞数为(195.96±21.51)个。FK506A 组和 FK506B 组神经元胞体和轴突内 gap43 颗粒和染色强度增加，阳性细胞数分别为(454.52±17.63)(397.19±19.09)个。与 EAE 组比较，差别显著具有统计学意义($P<0.05$)。

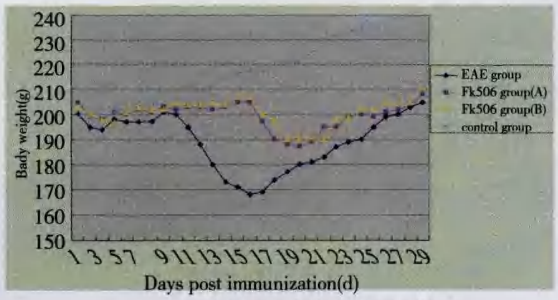


图 1 实验各组动物体重动态变化

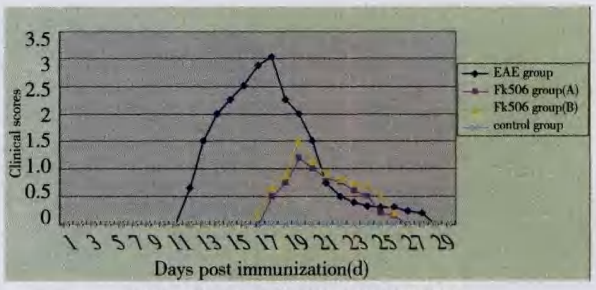


图 2 实验各组动物临床经过及评分

表 1　各组临床症状比较($\bar{x} \pm s$)

组别	发生率	潜伏期(d)	发病天数(d)	临床评分	体重变化(g)
对照组	0/5	–	–	–	20.45 ± 13.45
EAE 组	9/10	10.21 ± 1.08	16.52 ± 0.83	3.02 ± 0.98	−39.62 ± 13.64
FK506(A)	9/10	14.61 ± 1.74	10.34 ± 0.61	1..21 ± 0.31	−12.52 ± 5.26
FK506(B)	9/10	14.08 ± 1.39	10.91 ± 1.21	1.52 ± 0.36	−11.34 ± 5.19

表 2　EAE 组和实验组大鼠在脊髓第二板层 GAP-43 阳性纤维密度

组别	次数	脊髓第二板层 GAP-43 阳性纤维密度($\bar{x} \pm s$)
EAE	10	195.96 ± 21.51
FK506A	10	454.52 ± 17.63
FK506B	10	397.19 ± 19.09

表 3　在 4 组中，免疫后 20 d 大鼠 T 淋巴亚群和 NK 细胞比率的改变

组别	n	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	NK
对照组	5	70.1 ± 1.2	52.17 ± 3.89	22.44 ± 1.57	1.91 ± 0.13	3.61 ± 0.15
EAE	9	67.22 ± 1.21	51.27 ± 2.13	21.16 ± 1.53	2.09 ± 0.26	8.52 ± 1.16
FK506A	9	58.17 ± 0.96	41.34 ± 1.41	14.43 ± 0.74	2.61 ± 0.21	1.07 ± 0.41
FK506B	9	60.28 ± 2.13	44.12 ± 2.69	13.2 ± 1.17	2.84 ± 0.51	1.89 ± 0.21

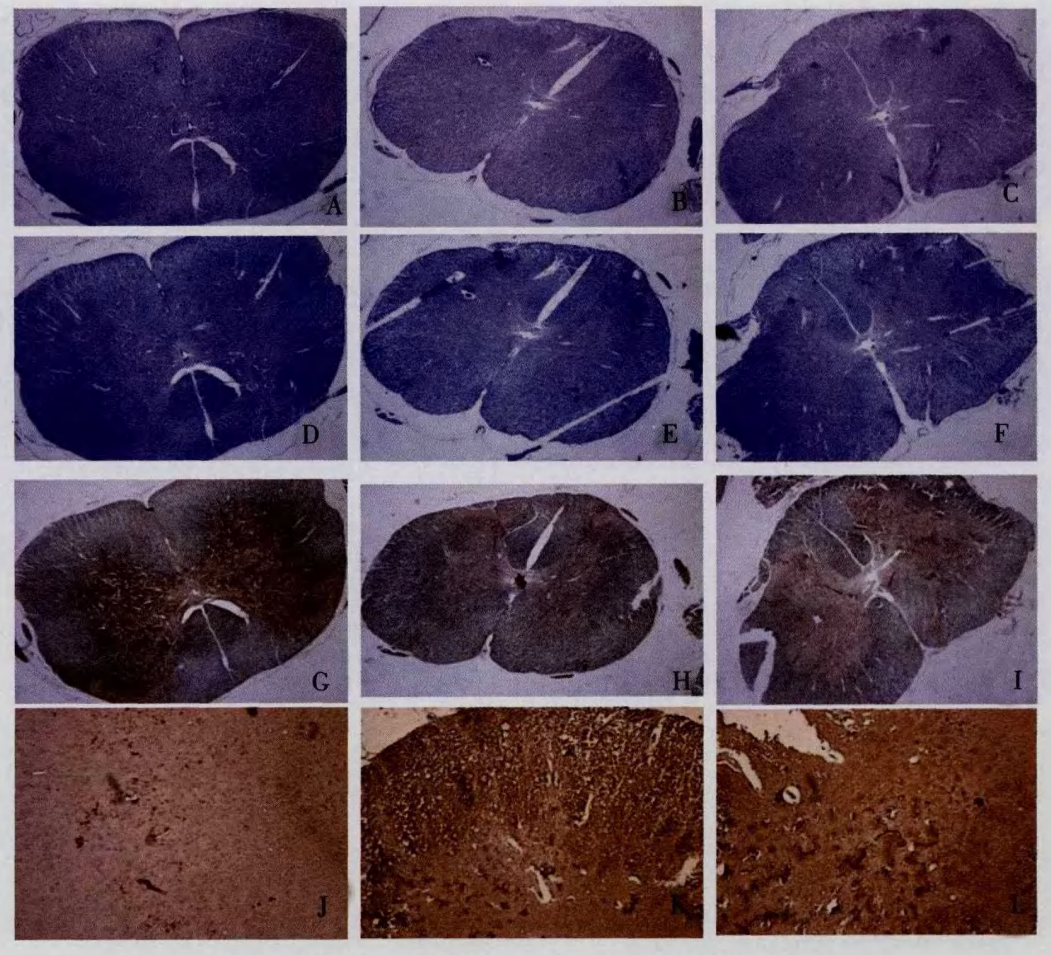


图 A、B、C 示常规 HE 染色；图 D、E、F 示 Luxol Fast Blue 染色；图 G、H、I 示 Bielschowsky 染色；图 J，K，L 示 gap-43 免疫组织化学染色（×100）

图 3　脊髓炎症细胞浸润、髓鞘脱失和轴突损伤对照

2.3 流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞亚群比率

在实验第 20 d，模型组(FK506A 组，FK506B 组)大鼠外周血 T 淋巴细胞 CD3 、CD4 、CD8 比率较对照组低，NK 比率较模型组低($P<0.05$)(表 3)。

3 讨 论

MS 是神经内科临床疑难病症之一。实验性变态反应性脑脊髓炎是人类多发性硬化的动物模型，其病理学特征和临床过程与多发性硬化具有许多的相似性，已用于多发性硬化的实验性治疗。在以往不断有研究证实，轴突损伤发生 MS 的早期，且轴突损伤是造成患者伤残的主要原因。轴突的损伤与浸润的 CD8+ 的细胞毒性 T 淋巴细胞有关。轴突损伤的部位和严重程度均与炎症细胞浸润的数量密切有关。CD8+ 的细胞毒性 T 淋巴细胞可以直接损伤轴突，或间接的释放轴突溶解的因子如 perforin，granzymes，使轴突损伤[8]。FK506 是一种免疫抑制剂，在对脊髓损伤的模型中具有神经保护，神经营养，和促进神经再生作用和抑制 T 细胞增生，活化。因此，本实验的目的主要观察 FK506 是否能减轻实验性变态反应性脑脊髓炎中炎症细胞的浸润和促进临床症状的缓解，观察其减轻髓鞘脱失和轴突损伤和以及轴突再生的作用。

从实验结果我们可以发现，FK506 能改善 EAE 动物的临床评分和较短时间内恢复动物的活动能力，并延缓动物的发病时间，停药后未见动物复发。组织学上，FK506 能明显减轻或消除病灶中淋巴细胞的浸润，减轻髓鞘的脱失和轴突损伤，与 Bruce G. Gold[9]等人的研究报道相一致。与甲基泼尼松龙对 EAE 的实验性治疗中对比中发现，甲基泼尼松龙对 EAE 有确切疗效，可有效改善 EAE 动物的临床评分和恢复动物的活动能力，但停用甲基泼尼松龙的治疗后，动物重新出现临床症状，髓鞘脱失和轴突损伤又明显出现，达到未治疗组的程度。在 MS 的脱髓鞘病变中，细胞免疫异常在其发生发展中具有重要作用，有文献研究表明 MS 患者外周血及脑脊液中存在淋巴细胞亚群的异常，外周血中 CD8+T 细胞显著降低，CD4+ /CD8+ 比值升高；CD4+ 、CD8+T 细胞减少[10,11]，外周血反复活动的 CD4+/CD8+ 比值往往倾向于疾病的活动[12]。而在我们的实验中发现，外周血 CD4、CD8+T 细胞，NK 细胞数量的显著降低，CD4+/CD8+ 比值升高，显示动物的发病时间明显延缓，症状明显减轻，而这种变化与动物中枢神经系统内的炎症细胞浸润，髓鞘的脱失，轴突的损伤的程度出现明显的相关性。有研究显示，把 MBP 特异性 T 淋巴细胞注入动物的中枢神经系统，并不致病，但如果注入动物外周循环系统则可致病，提示辅助性 T 细胞激活和 / 或血管壁损害是致病的。FK506 的免疫抑制作用的机制是抑制活性 T 淋巴细胞核因子去磷酸化，减少 IL-2 的分泌，从而抑制 T 细胞增生、活化。EAE 是 Th1 型免疫占优势的自身免疫性疾病，FK506 对 EAE 大鼠的临床症状的减轻和发病时间的延缓可能是通过减低白介素 -2 水平，从而抑制 Th1 辅助性 T 细胞的增值活化实现的。另外，FK506 能显著减低 CD8+T 细胞水平，从而减低其对 EAE 大鼠的轴突损失，可能也是减轻 EAE 大鼠临床症状的原因。免疫组织化学 gap-43 染色结果显示，EAE 组中枢神经系统神经元胞体和轴突也有少量浅褐色颗粒，实验组神经元及其胞体染色强度明显高于 EAE 组。本实验结果提示，FK506 通过抑制 CD4+、CD8+T、NK 细胞的增生活化，从而减轻中枢神经系统的炎症细胞浸润，并一定程度上促进轴突的再生加快动物运动功能的恢复来治疗 EAE。

参 考 文 献

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

[2] 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.

[3] Gold B G, Yew J Y, Zeleny Pooley M, et al. The immuno suppressant FK506 increases GAP 243 mRNA levels in axotomized sensory neurons[J]. Neurosci L ett, 1998, 241 :25228.

[4] 曹翠丽，王 惠，马常升.实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠模型的建立[J].解剖学杂志，2001，24(1)：77-80.

[5] Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, et al, Evidence for widespread axon damage at earliest clinical stage of multiple sclerosis [J].Brain, 2003, 126 (Pt2):43-437.

[6] 林嘉友. 灌服碱性髓鞘蛋白对实验性变态反应性脑脊髓炎的抑制作用[J].中国神经免疫学和神经病学杂志，1994，1(2)：61-67.

[7] 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(5)：387(06-21).

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

[9] Bruce G G.FK506 and a nonimmunosuppressant derivative reduce axonal and myelin damage in experimental autoimmune encephalomyelitis: Neuroimmunophilin ligand-mediated neuroprotection in a model of multiple sclerosis[J] .Neuroscience Research(77).367-377.

[10] 高 敏，高 聪，杨 宁.地黄合剂对多发性硬化患者外周血及脑脊液中 T 淋巴细胞亚群的影响[J].中国中西医结合杂志，2002，22(6)：437-438.

[11] Maimone D, Reder A T.Soluble CD8 levels in the CSF andserllm of patients with mutiple sclerosis[J].Neurology, 1991, 41(6):851-854.

[12] Weiner H L, Hailer D A, Fallis R J, et al.Altered blood T-cell subsets in patients with multiple sclerosis[J].NeuroImmunol, 1984, 6(2):115 -121.

(责任编辑：冉明会)