基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1685-04

过氧化氢酶与甲基强的松龙对实验性脱髓鞘性视神经炎的抑制作用

简 嘉[1],李平华[2]

(1.重庆医科大学附属第二医院眼科,重庆 400010;2.重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究活性氧簇清除剂过氧化氢酶(Catalase,CAT)及甲基强的松龙(Methylprednisolone sodium succinate,MP)琥珀酸钠对实验性脱髓鞘性视神经炎的作用及其机制。方法:将致敏大鼠分别以 Catalase、生理盐水 (Physiologic saline,PS)及 MP 琥珀酸钠腹腔注射后分别于抗原致敏后第 7 d 及 14 d,通过 H_2O_2 测定、病理图像分析、细胞组织超微结构分析等方法研究 CAT 及 MP 对实验性变应性视神经脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)大鼠视神经炎症损伤的作用。结果:EAE 大鼠视神经 H_2O_2 含量较正常大鼠高,CAT 和 MP 能减少 EAE 大鼠视神经 H_2O_2 含量,减轻炎症反应,抑制视神经的脱髓鞘,但 MP 对 H_2O_2 清除作用及髓鞘损害的保护作用较 CAT 弱。结论:H_2O_2 可能和脱髓鞘性视神经炎的发病有一定关系。

【关键词】过氧化氢酶;甲基强的松龙;视神经炎;脱髓鞘

【中国图书分类法分类号】R 774.61 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-26

The suppessive effects of catalase and methylprednisolone sodium succinate on experimental demyelinating optic neuritis

JIAN Jia, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the pathogenesis of active oxygen scavenger (catalase,CAT) and methylprednisolone sodium succinate (MP) on experimental demyelinating optic neuritis. *Methods*: The expenimental rats received intraperitoneal injections of CAT, physiologic saline (PS) and MP after antigenic sensitization. On day 7th and 14th after antigenic sensitization, H_2O_2 measurement, patho-image analysis, and histiocyte ultrastructure analysis were applied to study the effects of CAT and MP on experimental demyelinating optic neuritis. *Results*: The concentration of H_2O_2 in optic nerves of experimental demyelinating optic neuritis was higher than that in the normal optic nerves. CAT and MP can reduce not only the content of H_2O_2 in optic nerves of EAE rats, but also the number of inflammatory cells and reactive astroglial cells, the extent of demyelination in the retrobulbar optic nerves .But the effect of MP on H_2O_2 scavenging and myelin protection was weaker than that of CAT. *Conclusion*: H_2O_2 may has some relationship with the occurrence of experimental demyelinating optic neuritis.

【Key words】Catalase; Methylprednisolone; Optic neuritis; Demyelination

作者介绍:简 嘉(1980-),女,硕士,

研究方向:视神经炎。

通讯作者:李平华,男,教授,E-mail:yanke1021@sina.com。

参 考 文 献

[1] 唐 博,罗文军.血栓闭塞性脉管炎发病机制的研究进展[J].国外医学外科学分册,2004,31(5):295-298.

[2] Kobayashi M,Ito M,Nakagawa A,et al.Immunohistochemical analysis of arterial wall cellular infiltration in Buerger's disease[J].J Vasc Surg,1999,29(3):451-458.

[3] 于爱莲,李新华,邓 文,等.血栓闭塞性脉管炎患者 T 细胞亚群的改变[J].泰山医学院学报,1994,14(4):276-277.

[4] 于爱莲,张丰雪,牟爱莉.血栓闭塞性脉管炎患者血清补体溶解免疫复合物作用的研究[J].中国实验临床免疫学杂志,1999,9(3):30-32.

[5] 王俊英,蒋米尔,薛 莲,等.血栓闭塞性脉管炎患者抗磷脂蛋白抗体检测及意义[J].上海医学,1997,20(5):280-282.

[6] Eichhorm J,Sima D,Imdschu C,et al.Antiendothelial cell antibody in thromboangiitis obliterans[J]. Am J Med Sci,1998,315(1):17-23.

[7] Halacheva K S,Manolova I M,Petkov D P,et al.Study of anti-neutrophil cytoplamic antibody in patients with thrombaogiitis obliterans (Buerger's disease)[J]. Scand J Immunol,1998,48(5):544-550.

[8] 崔新明,陈 越,潘 力,等.血栓闭塞性脉管炎血管中膜免疫复合物沉积的电镜观察[J].白求恩医科大学学报,2001,27(4):379-380

[9] 伏祥茂,景在平,郭 峰.血栓闭塞性脉管炎患者红细胞免疫功能及调节因子的研究[J].上海医学,1997,20(7):403-404.

(责任编辑:冉明会)

视神经炎(Optic neuritis,ON)是累及视神经的急性或亚急性炎症,原发性或特发性脱髓鞘性视神经炎(Idiopathic demyelinating optic neuritis,IDON)是临床最为常见的类型。目前,大剂量的甲基强的松龙(Methylprednisolone,MP)冲击疗法是临床上治疗急性视神经炎的常用方法。而近年研究表明,活性氧和氧化应激在神经退行性疾病的发病中起着重要的作用。H_2O_2 是一种活性氧成分,它参与了许多神经系统疾病的发病机制,常用作神经细胞氧化损伤的诱导剂。有研究发现活性氧簇(Reactive oxygen species,ROS)清除剂(Catalase,CAT)能通过对 H_2O_2 的解毒作用减轻 EAE 豚鼠血脑屏障(Blood-brain barrier,BBB)的损伤,从而阻止炎性介质对中枢神经系统的破坏。

本研究在建立 Wistar 大鼠脱髓鞘性视神经炎模型的基础上分别用 CAT 及 MP 进行干预,研究 CAT 及 MP 对脱髓鞘性视神经炎炎症及脱髓鞘的作用,比较两者的作用及其机制,以期为脱髓鞘性视神经炎的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与模型建立

1.1.1 实验动物 健康、雌性 Wistar 大鼠,体重 200 g 左右。清洁级雌性豚鼠,体重 400 g 左右。由重庆医科大学动物中心提供。

1.1.2 建立动物模型 将豚鼠(用过量 3.5%水合氯醛腹腔注射致死),迅速在冰上取脊髓,去除脊膜,加入事先预冷的生理盐水,配成 50%(m/v)的豚鼠脊髓生理盐水匀浆(GP-SCH),4℃保存。将等量 GPSCH 和 CFA 混合,以无菌注射器在冰上抽打,直至成为油包水乳剂的免疫抗原。

将雌性 Wistar 大鼠用 3.5%水合氯醛(1 ml/100 g 体重)腹腔麻醉后,碘酒和酒精局部消毒,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 0.1 ml(含百日咳杆菌 1×10^{11} 个)。

为观察造模是否成功,以免疫当日为 0 d 记,对大鼠进行临床症状评分。采用 Kono 等[1]的 5 分评分法,即:0 分为无症状,1 分动物尾部肌张力降低,2 分动物尾部麻痹 + 后肢肌张力低,3 分尾部麻痹 + 后肢肌张力重度低,4 分尾部麻痹 + 四肢麻痹,5 分频死状态,临床评分 2 分为发病动物。

1.1.3 实验分组与给药 将健康、雌性 Wistar 大鼠 40 只,随机分为 4 组:过氧化氢酶组(CAT 组,n=12),建立实验性变应性视神经脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)模型,抗原致敏 3 d 后,腹腔内注射 CAT 12 000 U/kg,持续 3 d,然后改为 1 200 U/kg,持续 1 周。实验对照组(PS 组,n=12),建立 EAE 模型,抗原致敏 3 d 后,注射同 CAT 组相同容量的生理盐水,持续 10 d。甲基强的松龙琥珀酸钠组(MP 组,n=12),建立 EAE 模型,抗原致敏 3 d 后,腹腔内注射 MP30 mg/kg,隔日 1 次,共 5 次。正常组(N 组,n=4),不作任何处理。

1.2 指标检测

1.2.1 视神经炎性细胞及反应性增生的神经胶质细胞计数

分别于抗原致敏后第 7 d 及 14 d 将大鼠麻醉,迅速打开胸腔及腹腔,暴露心脏和肝脏,4%PFA 沿升主动脉注入行灌注固定,取双侧球后视神经及脊髓颈膨大处石蜡包埋后纵行切片,二甲苯脱蜡,苏木素伊红(HE)染色、脱水、透明封片后置于光学显微镜下观察正常、发病及干预后大鼠视神经上的炎性细胞的分布情况,并拍照。于每张玻片内随机抽取 5 个高倍视野(400 倍),进行炎性细胞及增生的神经胶质细胞计数。整个过程均由同一个人操作。

1.2.2 视神经切片超微结构观察视神经 Ce- H_2O_2 颗粒的分布情况并计数 分别于抗原致敏后第 7 d 及 14 d 将大鼠麻醉,迅速打开胸腔及腹腔,暴露心脏和肝脏,4%PFA 沿升主动脉注入行灌注后,接着用含 $CeCl_3$ 2 mmol/L、3- 硝基 -1,2,4- 三氮唑 10 mmol/L、还原型辅酶 Ⅰ 0.8 mmol/L、PBS0.1 mol/L 及 7%蔗糖的 $CeCl_3$ 混合液继续灌注 150 ml。其后迅速取下右侧眼球及球后视神经,为对 H_2O_2 定位,组织切片须经过 2.5%GA 浸润固定,再经 1%锇酸、0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液、7%蔗糖后固定[2]。其后经梯度酒精脱水、环氧树脂包埋,制作超薄切片,电镜下观察各组 Ce-H_2O_2 颗粒在球后视神经上的分布,并对照片中铈—过氧化氢(Ce-H_2O_2)颗粒进行计数。

1.2.3 视神经切片超微结构观察髓鞘并计算残留髓鞘面积

视神经电镜切片标本制作同前,于每个标本随机抽取 10 个高倍视野(15 000 倍)照相,利用图像分析软件对视神经显微照片中的髓鞘面积进行定量计算,并对照片中铈—过氧化氢(Ce-H_2O_2)颗粒进行计数。

1.3 统计学分析

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 统计分析软件系统,分别用方差分析、t 检验等方法进行统计学处理,$P\leq0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况

实验对照组及实验组大鼠于免疫后第 8 ~ 13 d 左右均发病,表现为活动减少,进食少,体重减轻,先出现尾肌力降低,尾巴拖地不能抬起,继而后肢无力、步态异常、瘫痪,严重者出现频死状态。

2.2 组织病理学观察

脊髓切片 HE 染色后发现:致敏大鼠脊髓小血管周围有大量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主,混杂少量中性粒细胞,典型者呈血管袖套样改变。胶质细胞增生,排列紊乱。视神经切片

HE 染色后发现：大量淋巴细胞侵润，聚集，伴有少量中性粒细胞，胶质细胞增生，排列紊乱（图 1、2）。视神经超微结构显示：视神经有髓神经纤维广泛性髓鞘分层、排列紊乱、脱髓鞘（图 3、4），证实脱髓鞘性视神经炎动物模型成功建立。

2.3 各组视神经炎性细胞及反应性增生的神经胶质细胞计数

抗原致敏 7 d 后，各组视神经上未见明显的炎症细胞及反应性增生的神经胶质细胞。抗原致敏 14 d 后，PS、CAT、MP 各组视神经上的炎症细胞（淋巴细胞和少量中性粒细胞）及反应性增生的神经胶质细胞数较 N 组增加非常显著（$P<0.01$）；CAT 组、MP 组和 PS 组相比，炎性细胞及反应性增生的神经胶质细胞数明显减少（$P<0.01$）；MP 组和 CAT 组相比，两者视神经上的炎性细胞及反应性增生的神经胶质细胞数无显著性差异（$P>0.05$）各组数据见表 1。

2.4 各组视神经髓鞘面积的比较

在实验性视神经炎，包裹轴索的髓鞘脱落是其在超微结构水平上的组织病理学特征。抗原致敏 7 d 及 14 d 后视神经超薄切片透射电镜观察发现：N 组为正常髓鞘，PS 组视神经有髓神经纤维广泛性髓鞘分层、排列紊乱、脱髓鞘，线粒体肿胀，单核细胞侵润、毛细血管内皮细胞胞质局部破坏。CAT 组与 MP 组也可见视神经有髓神经纤维较广泛的髓鞘分层、排列较紊乱，脱髓鞘，线粒体肿胀，但整个病变表现相对于 PS 组要轻，且 14 d 时病变表现比 7 d 时重（图 4、5）。PS 组髓鞘面积明显小于 N 组（$P<0.01$），CAT 组及 MP 组和 PS 组相比，髓鞘面积增加，但仍小于 N 组，而 CAT 组和 MP 组相比，CAT 组髓鞘面积大于 MP 组（$P<0.05$）各组数据见表 2。

2.5 视神经上 $Ce-H_2O_2$ 颗粒计数

视神经上 $Ce-H_2O_2$ 颗粒主要聚集在毛细血管及炎性细胞周围，髓鞘周围分布较少（图 3、4、5）。抗原致敏 7 d 及 14 d 后，实验对照组（PS 组）较正常组（N 组）视神经上的 $Ce-H_2O_2$ 颗粒数增加，差异非常显著（$P<0.01$）；与 PS 组相比，CAT 组及 MP 组 $Ce-H_2O_2$ 颗粒数减少，但仍高于 N 组；MP 组 $Ce-H_2O_2$ 颗粒数高于 CAT 组，两者具有显著性差异（$P<0.05$）各组数据见表 3。

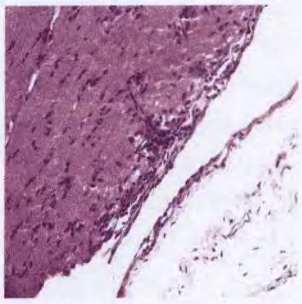


图 1 箭头所示为 14 dPS 组视神经上聚集的炎性细胞及胶质细胞（HE 染色，×400）

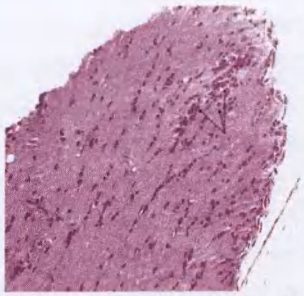


图 2 箭头所示为 14 dCAT 组视神经上聚集的炎性细胞及胶质细胞（HE 染色，×400）

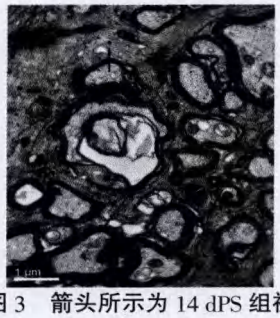


图 3 箭头所示为 14 dPS 组视神经脱髓鞘及 $Ce-H_2O_2$ 颗粒（透射电镜，×15 000）

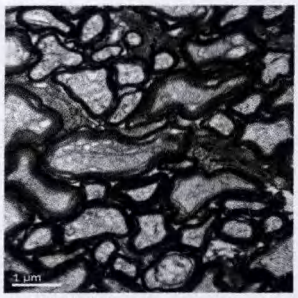


图 4 箭头所示为 14 dCAT 组视神经脱髓鞘及 $Ce-H_2O_2$ 颗粒（透射电镜，×15 000）

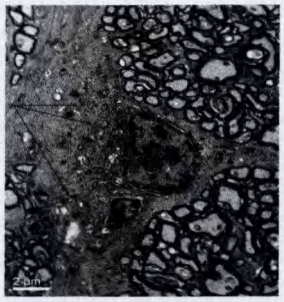


图 5 箭头所示为视神经上浸润的单核细胞及周围的 $Ce-H_2O_2$ 颗粒（透射电镜，×6 000）

表 1 抗原致敏后第 14 d 视神经上炎性细胞及反应性增生的神经胶质细胞计数（$n=6$）

分组	视神经细胞计数（个）
N 组	0
PS 组	$250 \pm 28^{\triangle}$
CAT 组	$161 \pm 8^{\triangle\blacktriangle}$
MP 组	$159 \pm 13^{\triangle\blacktriangle}$

$^{\triangle}P<0.01$ 与 N 组相比，$^{\blacktriangle}P<0.01$ 与 PS 组相比

表 2 抗原致敏后第 7 d 及 14 d 各组视神经上平均髓鞘面积比较（$n=6$）

分组	7 d	14 d
N 组	7.50 ± 0.65	7.50 ± 0.65
PS 组	$4.70 \pm 0.7^{\triangle}$	$3.39 \pm 0.92^{\triangle}$
CAT 组	$6.33 \pm 0.63^{\blacktriangle\diamond}$	$5.03 \pm 0.76^{\blacktriangle\diamond}$
MP 组	$5.58 \pm 0.42^{\triangle\blacktriangledown\triangledown}$	$4.84 \pm 0.75^{\triangle\blacktriangledown\triangledown}$

$^{\triangle}P<0.01$、$^{\blacktriangle}P<0.05$ 与 N 组相比，$^{\diamond}P<0.01$、$^{\blacktriangledown}P<0.05$ 与 PS 组相比，$^{\triangledown}P<0.05$ 与 CAT 组相比

表 3 N 组、PS 组 CAT 组和 MP 组中 Ce-H_2O_2 颗粒计数（n=6）

分组	7 d	14 d
N 组	0	0
PS 组	$1.4 \pm 0.7^{\triangle}$	$4.5 \pm 1.6^{\triangle}$
CAT 组	$0.3 \pm 0.3^{\triangle\blacktriangle}$	$1.9 \pm 0.7^{\triangle\blacktriangle}$
MP 组	$0.8 \pm 0.4^{\triangle\blacktriangledown\triangledown}$	$2.9 \pm 1.2^{\triangle\blacktriangledown\triangledown}$

$^{\triangle}P$<0.01 与 N 组相比，$^{\blacktriangle}P$<0.01、$^{\blacktriangledown}P$<0.05 与 PS 组相比，$^{\triangledown}P$<0.05 与 CAT 组相比

3 讨 论

EAE 是自身免疫性疾病 MS 的理想动物模型，EAE 模型的诱导与多个因素有关系，比如：①动物的类型、品系、年龄，性别；②所用的抗原纯度、类型、计量、物理形态和注射方法；③佐剂的来源等[2]。

活性氧簇（Reactive oxygen species，ROS）是外源性氧化剂或细胞内有氧代谢过程中产生的具有很高生物活性的含氧化合物的总称，其中最常见的有超氧化物、过氧化氢（H_2O_2）、单线态氧、氢氧根阴离子等。ROS 的产生和细胞抗氧化能力的失衡引起氧化应激[3]。氧化应激的病理结果就是氧化损伤，而氧化损伤又是血管损伤的重要因素，因此过量的ROS 对中枢神经系统的 BBB 便具有了破坏性，BBB 的破坏导致炎症细胞及有害因子侵入中枢神经系统引起脱髓鞘作用。为探索急性实验性变应性脑脊髓炎模型中，ROS 与 BBB 渗透性改变之间的关系，Guy 等[4]曾对此模型的视神经上的H_2O_2 进行定位，结果发现 H_2O_2 常常出现在 BBB 破坏的病灶处，从而推断H_2O_2 可能在改变 EAE 动物 BBB 渗透性方面扮演了重要的角色。通过对 EAE 大鼠球后视神经上的铈 - 过氧化氢反应产物进行定位观察，我们发现在抗原致敏后的 7 d 及 14 dEAE 大鼠球后视神经上 Ce-H_2O_2 主要聚集在毛细血管及炎性细胞周围，髓鞘周围分布较少，但髓鞘周围 Ce-H_2O_2 含量较正常大鼠高，CAT 治疗能降低 EAE 大鼠视神经 Ce-H_2O_2 的含量，但是并不能使其恢复到正常大鼠的水平，同时，随着 Ce-H_2O_2 含量的降低，致敏大鼠视神经的病理组织形态、超微结构改变都有不同程度的下降，提示H_2O_2 这种活性氧代谢产物可能和脱髓鞘性视神经炎的发病有一定关系。

CAT 是一种活性氧清除剂，能将过氧化氢分解成无毒的水及分子氧，CAT 是细胞内活性氧清除系统的重要组成成分，对维持细胞活性氧代谢起着重要作用。当 BBB 完整性受到破坏时，CAT 能够进入中枢神经系统。研究发现在 EAE 中，内源性的 CAT 不足以保护中枢神经系统免受 ROS 诱导的损伤，外源性给予 CAT 通过受到破坏的 BBB 进入中枢神经系统在减少其H_2O_2 含量的同时，降低了视神经的氧化损伤[5]。本研究通过对致敏后大鼠视神经炎性细胞及反应性增生的神经胶质细胞计数和脱髓鞘的观察也证实了这一点。从而推测 CAT 能通过对H_2O_2 的解毒作用，降低了H_2O_2 对血脑屏障的破坏程度，从而抑制了免疫抗原引起的视神经的炎症反应及髓鞘损害。

目前，大剂量的甲基强的松龙冲击疗法是临床上治疗急性视神经炎的常用方法。研究发现，MP 能通过降低 T 细胞和淋巴细胞表面的黏附分子的表达，进而降低淋巴细胞和血脑屏障毛细血管内皮细胞的粘附，从而减少免疫细胞进入中枢神经系统[6]。但是，MP 本身对于H_2O_2 有无影响呢？Valen 等[7]对缺血再灌注或微量H_2O_2 灌注的大鼠心脏给予 MP治疗后观察发现，MP 治疗能够减轻心脏的缺血再灌注损伤，同时发现心脏组织中的 CAT 及谷胱苷肽过氧化物酶含量上升，推测其对于心脏的保护作用是通过增加 CAT 及谷胱苷肽过氧化物酶，减少了H_2O_2 及谷胱苷肽过氧化物，降低了氧化损伤。本研究通过对致敏后大鼠视神经 Ce-H_2O_2 的含量、炎性细胞及反应性增生的神经胶质细胞计数和脱髓鞘的观察也证实了 MP 对于H_2O_2 的清除作用，但是 MP 对视神经上 Ce-H_2O_2 的清除以及髓鞘损伤的保护能力较 CAT 弱，但是对其炎性反应的抑制作用和 CAT 没有显著性差异。推测其原因可能是由于 MP对于炎性反应的控制并不仅仅从清除H_2O_2 一个方面，而是多种因素共同作用的结果，如减少某些致炎细胞因子的产生，抑制局部炎症分子的合成[8]等。而 MP 对于髓鞘损伤的保护能力较 CAT 弱也间接证实了 ROS 在视神经炎症性脱髓鞘损伤中扮演了重要的角色。

参 考 文 献

[1] Kono D H, Urban J L, Horrath S J, et al. Two minor determinants of myelin basic prtein induce experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice[J]. J Exp Med, 1988, 16(8): 213-227.

[2] 刑清和，王永铭，郑荣远. 影响 EAE 动物模型建立的因素分析[J]. 中国临床神经科学，2000，8(4)：305-306.

[3] Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(6): 247-254

[4] Guy J, McGorray S, Fitzsimmons J, et al. Disruption of the blood- brain barrier in experimental optic neuritis: immunocytochemical colocalization of H_2O_2 and extravasated serum albumin[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(3): 1114-1123.

[5] Guy J, Qi X, Wang H, et al. Adenoviral gene therapy with catalase suppresses experimental optic neuritis[J]. Arch Ophthalmol, 1999, 117(11): 1533-1539.

[6] Elovaara I, Okkonen M, Leppakynnas M, et al. Adhension molecules in multiple sclerosis: Relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy[J]. Arch Neurol, 2000, 57(9): 546-551.

[7] Valen G, Kawakami T, Tahepold P, et al. Pretreatment with mythylprednisolone protects the isolated rat heart against ischaemic and oxidative damage[J]. Free Radic Res, 2000, 33(1): 31-43.

[8] 艾 青，濮月华，张星虎. 甲基强的松龙治疗多发性硬化的机制[J]. 第四军医大学学报，2006，27(16)：1528-1530.

（责任编辑：冉明会）