

文章编号 1006-8147(2017)01-0017-04

论 著

丹参酮ⅡA对EAE小鼠临床表现及外周Treg细胞的影响

杨 扬^{1,2}, 杨 洁¹

(1.天津医科大学免疫学系,天津 300070;2.天津市血液中心,天津 300110)

摘要 目的:探讨丹参酮ⅡA对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠临床表现以及外周调节性T细胞(Treg)的影响。方法:用MOG₃₅₋₅₅混合完全弗氏佐剂免疫C57BL/6雌性小鼠,免疫后随机分为两组,发病后治疗组每日腹腔注射丹参酮ⅡA,对照组注射同体积的磷酸盐缓冲液,观察小鼠体质量及临床评分的变化,第26天处死小鼠后进行免疫学实验和细胞计数,分析两组小鼠中枢神经系统中炎性细胞浸润和髓鞘脱失情况以及中枢和外周淋巴细胞亚群的变化。结果:丹参酮ⅡA治疗组与对照组相比,小鼠的临床评分下降,中枢神经系统中炎性细胞浸润和髓鞘脱失面积均减少,细胞计数显示外周分泌Foxp3的CD4⁺T细胞占CD4⁺T细胞群的14.1%,较对照组明显升高($P<0.05$)。结论:丹参酮ⅡA可以显著减少EAE中枢神经系统中炎性细胞的浸润和髓鞘脱失,增加外周调节性T细胞的分泌,改善实验动物的临床表现。

关键词 实验性自身免疫性脑脊髓炎;丹参酮ⅡA;多发性硬化症;调节性T细胞;小鼠

中图分类号 R744.5⁺1

文献标志码 A

Effects of Tanshinon II A on the clinical manifestation and peripheral Treg of EAE mice

YANG Yang^{1,2}, YANG Jie¹

(1. Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Blood Centre, Tianjin 300110, China)

Abstract Objective: To explore the effects of Tanshinon II A (Tan II A) on the clinical manifestation and peripheral regulatory T cells (Treg) of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice. **Methods:** C57BL/6 mice were divided into two groups randomly after EAE model was established by MOG₃₅₋₅₅. In the treatment group, Tan II A was injected intraperitoneally daily while control group was injected with the same dose of PBS after onset. Then the clinical score of mice was monitored. The inflammation, demyelination and the changes of lymphocyte subsets were analyzed in the two groups after all the mice were put to death on the 26th day. **Results:** The results showed that compared with the control group, mice in Tan II A group had significantly lower clinical scores, less area of inflammatory infiltration and demyelination. And the ratio of Foxp3 secreted by CD4⁺T cells was 14.1%, which was increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** Tan II A can reduce the demyelination and the number of inflammatory cells in EAE while increase the regulatory T cells. Tan II A can also improve the manifestation of the mice.

Key words experimental autoimmune encephalomyelitis; Tanshinon II A; multiple sclerosis; regulatory T cells; mice

多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是由T细胞介导的中枢神经系统(CNS)疾病,主要病理变化是脑白质的脱髓鞘病变和炎性细胞浸润^[1]。该病的发病人群主要是中青年,需要长期药物治疗缓解症状,但目前应用的药物主要为激素和免疫抑制剂类,副作用大不适宜长期用药。因此,找到一种适合的治疗药物已成为迫在眉睫的需要。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)的发病机制以及病理改变与MS相似,已经成为国际公认的MS研究的理想动物模型,可为MS治疗方法的研究提供实验依据^[2]。丹参酮ⅡA(Tanshinon II A, Tan II A)是一种脂溶性二萜醌类化合物^[3],是中药丹参中的主要生物活性成分。近期的

研究发现,Tan II A可以抑制脑损伤后的炎症反应,起到保护脑和脊髓的作用^[4]。本实验通过建立EAE模型,观察Tan II A是否可以改善EAE的症状,降低炎症反应减少髓鞘脱失的面积,探讨其是否可以应用于人类MS的治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级无特定病原体C57BL/6小鼠,雌性,6~8周龄,体质量16~20 g,购于北京阜康生物科技有限公司。12 h光暗交替,饲养于我实验室,室温维持在(24±2)℃,给予充足洁净食物和饮水,适应环境1周后用于实验。

1.1.2 主要仪器设备及试剂 细胞培养箱(Thermo SCIENTIFIC 3131),冰冻切片机(LEICA CM 1950),全自动石蜡包埋机(LEICA EG 1150H),莱卡石蜡切

作者简介 杨扬(1982-),女,硕士在读,研究方向:免疫学;通信作者:杨洁,E-mail:yangji@tjmu.edu.cn。

片机 (LEICA RMM 2255), 荧光显微镜 (NIKON ECLIPSE80i), 冷冻离心机 (BECKMAN COUNTER ALLEGRA), 流式细胞仪 (FACS Aria II, USA), Tan II A, MOG₃₅₋₅₅peptide (南京金斯瑞生物科技有限公司), 结核分枝杆菌 (H37RA), 完全弗式佐剂 (CFA) 不完全弗式佐剂 (IFA), 百日咳毒素 (PTX, List Biological Laboratories), 苏木精伊红染液, 固蓝染液 (Luxol fast blue, 美国 Sigma 公司), APC-anti-CD4, FIJC-anti-IFN- γ , PE-anti-IL17, FIJC-anti-CD25, PE-Foxp3 (Biolegend)

1.2 方法

1.2.1 抗原的制备 10 mg/每支的 MOG₃₅₋₅₅ 多肽冷冻干粉溶于 5 mL PBS (0.01 mmol/L) 中, 轻度涡旋, 配置成 2 mg/mL 的母液, 10 mL IFA 加入 100 mg 结核分枝杆菌 (卡介苗) 混匀。将 MOG₃₅₋₅₅ 母液和 CFA 等体积混合, 然后通过一个三通与一支空注射器相连, 抽打至油包水状态。

1.2.2 EAE 模型制备及实验分组 小鼠麻醉后颈背部两点注射乳化好的抗原, 每点 100 μ L。免疫后 0 和 48 h 分别给予小鼠腹腔注射 PTX, 250 μ L/只。成功免疫小鼠后随机将小鼠分为治疗组和对照组, 每组 10 只。然后每日监测小鼠行为能力以及神经功能表现, 发病后记录临床评分。

1.2.3 药物干预 自免疫后第 12 天起小鼠逐渐发病, 出现毛色无光泽, 步履蹒跚, 尾巴无张力, 后肢瘫痪等特点。自第 15 天起治疗组小鼠每日腹腔注射浓度为 25 μ mol/L Tan II A, 200 μ L/只, 对照组注射同体积 PBS。

1.2.4 神经功能评分标准 采用 Kono's 五分法^[9]: 基本正常, 0 分; 尾巴无张力, 1 分; 拖尾伴一侧后肢全瘫或双侧后肢半瘫, 2 分; 拖尾伴双侧后肢全瘫, 3 分; 拖尾, 双后肢全瘫伴躯干瘫痪, 4 分; 死亡, 5 分。

1.3 组织病理学实验

1.3.1 苏木精-伊红染色 (HE 染色) 免疫后第 26 天处死全部小鼠, 剪断肋骨、膈肌, 暴露心脏, 减去右心耳, 手指夹住心脏后用 9 号静脉穿刺针从心尖刺入左心室, 灌注预冷的 PBS, 当右心耳出水清亮, 肝脏颜色发白时停止灌注, 断头, 取出脑和脊髓组织, 放置于预冷的 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 沿冠面切片, 厚度 6 μ m, 进行 HE 染色。

1.3.2 Luxol fast blue 染色 组织脱蜡, 水化后行固蓝染色。

1.3.3 中枢及外周淋巴细胞分离 加入预冷的 PBS 研磨脾脏、脑和脊髓, 分别提取脾脏、脑和脊髓的单个核细胞进行流式细胞检测。在 24 孔板中每孔加

入浓度为 100 万个/mL 的细胞 1 mL, 佛波酯 50 ng, 离子霉素 500 ng, Golgistop 1 μ g 或者 BFA 进行 CD4⁺T 细胞亚型分析, 离心后加入细胞表面荧光抗体 (APC-anti-CD4) 避光孵育, 后加入胞内荧光抗体 (anti-IFN- γ 和 anti-IL-17) 进行抗原染色。样品经流式细胞仪分析后利用 FlowJo 软件分析数据。

1.4 统计学分析 用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 对两组小鼠临床评分, 中枢神经系统和脾脏中 CD4⁺T 细胞进行数据分析, 两组间样本比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 Tan II A 对 EAE 小鼠临床评分的影响 治疗组小鼠自第 18 日起临床评分较对照组显著降低, 行为能力逐渐恢复, 而对照组小鼠已成濒死状态, 见图 1。

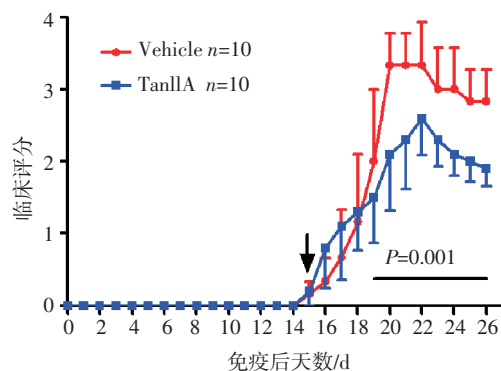


图 1 治疗组与对照组临床评分

Fig 1 The clinical scores of the Tan II A and control group

2.2 Tan II A 对 EAE 小鼠 CNS 炎性细胞浸润和脱髓鞘面积的影响 取小鼠脑和脊髓膨大段石蜡切片进行 HE 和 LFB 染色, 结果见图 2, HE 染色中治疗组小鼠脑白质的炎性细胞浸润较对照组显著减少; LFB 染色后治疗组小鼠脑白质呈现均一蓝色, 而对照组则出现较多白色脱髓鞘斑点。

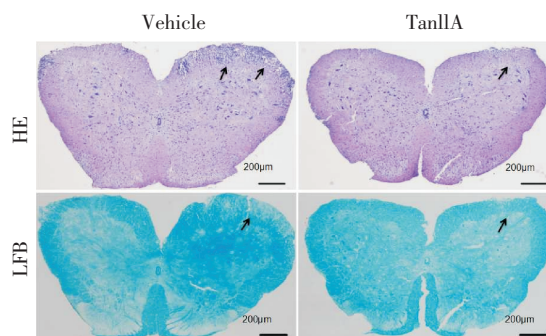
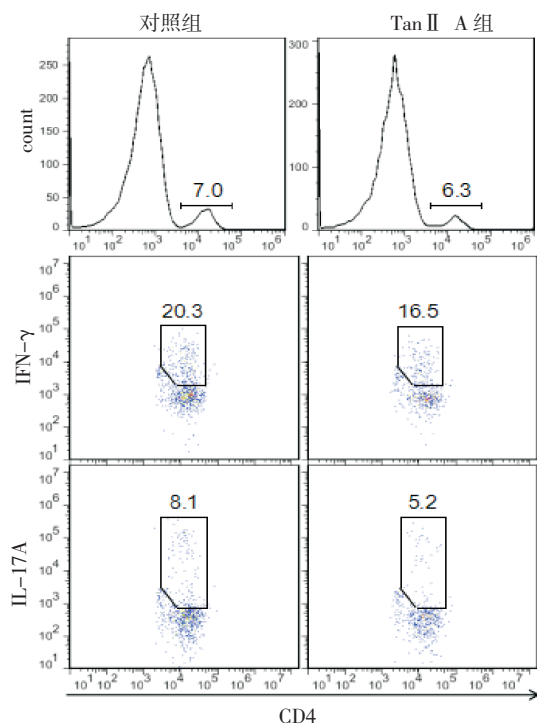


图 2 Tan II A 组与对照组 HE, LFB 染色

Fig 2 The HE and LFB staining of the Tan II A group and control group

2.3 Tan II A 对 EAECNS CD4⁺T 细胞的影响 研磨 EAE 小鼠脑和脊髓后提取单个核细胞进行 CD4⁺T 细胞亚型分析。结果见图 3, 治疗组和对照组小鼠的 CD4⁺T 细胞总数, Th1、Th17 细胞数均无明显变化; IFN- γ 和 IL-17 等促炎因子的数量在治疗组略有降低, 但尚无统计学意义 ($P>0.05$)。

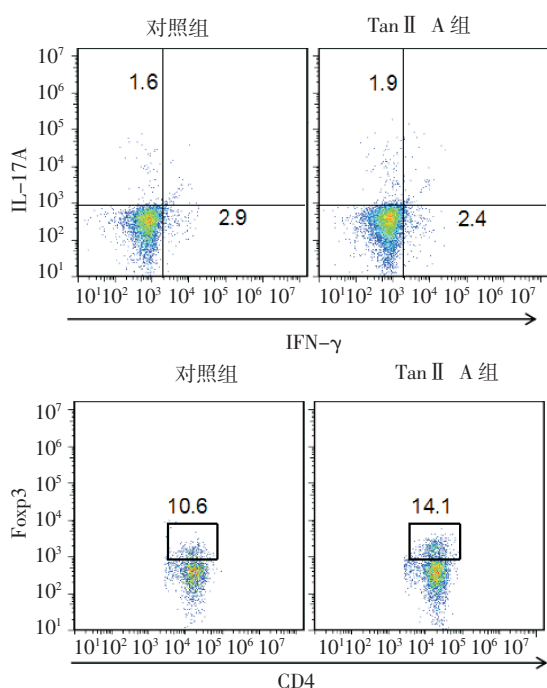
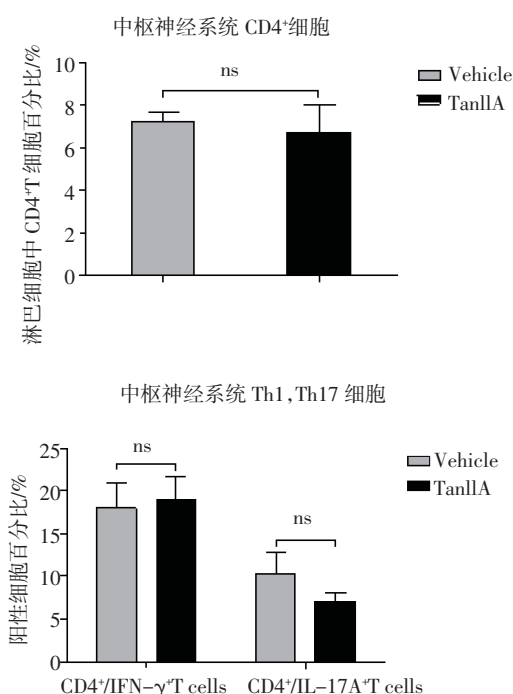


* $P>0.05$

图 3 Tan II A 组和对照组 CNS 的 CD4⁺T, Th1、Th17、IFN- γ 、IL-17 变化

Fig 3 The Th1, Th17, IFN- γ and IL-17 in the CNS of the Tan II A group and control group

2.4 Tan II A 可以增加外周淋巴细胞中 Treg 细胞的数量 研磨小鼠脾脏, 取脾单个核细胞进行流式细胞检测。结果见图 4, 外周 Th1 和 Th17 细胞在两组小鼠中计数基本无差异, 但治疗组 Foxp3 和 Treg 细胞数量明显较对照组增加 ($P<0.05$)。



* $P<0.05$

图 4 Tan II A 组和对照组外周 CD4⁺T 细胞中 Foxp3 和 Treg 变化

Fig 4 The Foxp3 and Treg in spleen of the Tan II A group and control group

3 讨论

MS 是一种主要累及中枢神经系统由 T 细胞介导的自身免疫性疾病,它的发病机制十分复杂。EAE 模型具有与 MS 非常相似的病理学特征,表现为中枢神经系统的炎性细胞浸润和脱髓鞘反应等^[6],已成为国际公认的 MS 的动物模型,为 MS 的治疗的研究做出重要贡献^[7]。本实验采用 MOG₃₅₋₅₅ 混合完全弗式佐剂配成乳化抗原免疫 C57BL/6 小鼠制备 EAE 模型。发病后的小鼠行动迟缓,体质量降低,拖尾伴四肢瘫痪,病理学检测显示出明显的炎性细胞浸润和脱髓鞘改变,说明 EAE 模型制备成功,为后续实验奠定了基础。

研究发现,初始 CD4⁺T 细胞可以分化为 Th1、Th2、Th17 和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)^[8]。Th1、Th2 和 Th17 可以分泌 IFN- γ 、IL-4、IL-17A 这些致炎因子促进炎症的发生发展。Treg 细胞是在免疫反应中发挥负向调节作用的细胞,可以抑制效应细胞的增殖和免疫活性,还可以调节 Th1/Th2 的变化^[9]。Treg 细胞活性的增强有益于炎症的转归,利于机体的康复。胞内表达叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)是 Treg 的特异性标志物,目前被用做评价 Treg 的金标准^[10]。目前研究最多的是 CD4⁺和 CD25⁺Treg。Pantazou 等^[11]发现,用抗体清除 CD4⁺、CD25⁺Treg 能促进 EAE 的发生,而转移 CD4⁺、CD25⁺Treg 能明显抑制 EAE,证实了 Treg 对 EAE 的保护作用。

Tan II A 做为丹参中的主要活性成分已经被证实具有心肌保护作用^[12],并已经广泛用于临床上许多疾病的联合用药,效果良好。近期尹鑫等^[13]的研究证实,Tan II A 可以通过降低脊髓损伤后 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等炎性因子的水平和抑制 NF- κ B、MAPKs 通路的活性来减轻脊髓损伤后的炎症反应、细胞凋亡和氧化应激反应^[14]。Tan II A 还具有神经保护作用,可以加速损伤神经的修复^[15]。由此我们推断,Tan II A 有可能作用于 MS,起到延缓疾病发展的作用。

因此本实验设计用 Tan II A 干预 EAE 模型小鼠,观察小鼠的临床症状和病理特征的变化。结果显示,应用了 Tan II A 的治疗组小鼠较对照组临床评分下降明显,行为能力显著改善,说明 Tan II A 可以有效减轻 EAE 的症状。为了证实小鼠临床症状的减轻是否与减轻炎性细胞浸润和脱髓鞘反应有关,我们取小鼠的脑和脊髓组织进行 HE 和 FLB 染色,结果明确显示 Tan II A 组小鼠的脑白质中炎性细胞浸润和髓鞘脱失较对照组明显减少。笔者进一步取小鼠的脑脊髓组织和脾脏研磨提取单个核细胞进行流式细胞分析,结果发现 Tan II A 组脾脏中 Foxp3

和 Treg 细胞较对照组明显增加,因此推测,Tan II A 有可能通过刺激 Treg 的表达来发挥控制 EAE 的炎症和脱髓鞘反应,从而改善了 EAE 的临床症状。

综上所述,本实验首次将中药有效成分丹参酮 II A 应用于 EAE,研究其对 EAE 的影响。结果证明,丹参酮 II A 可以有效改善 EAE 模型小鼠的临床症状和病理学变化。并且我们发现应用了丹参酮 II A 后的小鼠外周组织中 Treg 细胞数量显著增加,推测由于 Treg 细胞数量的增加发挥了抑制 EAE 免疫反应的作用,从而减轻 EAE 的临床症状,为丹参酮 II A 应用于人类 MS 的治疗提供依据。但是丹参酮 II A 刺激 Treg 细胞分泌以及作用于 EAE 的具体机制尚不清楚,仍需要进一步的研究探索。

参考文献:

- [1] Koch N, Sorensen P S. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology[J]. *Lancet Neuro*, 2011,9(5):520
- [2] 王秀丽,宋军,郭力. 多发性硬化关联基因的研究进展[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2011,19(6):477
- [3] Blaschek A, Storm V G K, Heinen F, et al. Neuropsychological aspects of childhood multiple sclerosis:an overview[J]. *Neuropediatrics*, 2012,43(4):176
- [4] Zheng L, Liu M, Wei M, et al. Tanshinone II A attenuates hypoxic pulmonary hypertension via modulating K⁺-v currents[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2015,205(1):120
- [5] Arton S M, Herrera B M, Yee I M, et al. Neuropsychological aspects of multiple sclerosis:an overview[J]. *Neuropediatrics*, 2013,43(4):175
- [6] Renoux C, Vukusic S. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada:a longitudinal study[J]. *Lancet Neurol*, 2009,5(10):930
- [7] Young W. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury[J]. *J Emerg Med*, 2012,11(1):13
- [8] Taoka Y, Okajima K. Role of leukocytes in spinal cord injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2000,17(3):219
- [9] 高淑英,张凤蕴,陈君平,等. 经腹腔诱导免疫耐受抑制 EAE 的实验研究[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2003,10(1):44
- [10] 尚晓峰,席娜娜,王谭,等. MOG 诱导的实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中枢及外周神经系统 CD4⁺T 及 CD8⁺T 调节性细胞变化[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010,26(8):746
- [11] Pantazou V, Schluep M, Du Pasquier R. Environmental factors in multiple sclerosis[J]. *Presse Med*, 2015,44(4 Pt 2):e113
- [12] Kfoczynska M, Kucharska A, Sinska B. The role of vitamin D in multiple sclerosis[J]. *Postepy Hig Med Doew(Online)*, 2015,40(6):1158
- [13] Yin X, Yin Y, Cao F L, et al. Tanshinone II A attenuates the inflammatory response and apoptosis after traumatic injury of the spinal cord in adult rats[J]. *Plos ONE*, 2012,7(6):e38381
- [14] Zhou L, Bondy S C, Jian L, et al. Tanshinone II A attenuates the cerebral ischemic injury-induced increase in levels of gfap and of caspases-3 and-8[J]. *Neuroscience*, 2015,288(12):105
- [15] Cao F L, Xu M, Wang Y, et al. Tanshinone II A attenuates neuropathic pain via inhibiting glial activation and immune response[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015,128(1):1

(2016-06-28 收稿)